

Aus dem Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

„Thrombozyten-Aggregation und koagulatorische Zellfunktionen  
im Verlauf der essentiellen Thrombozythämie“

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Tatjana Wiegand  
aus Freudenstadt

Bad Vilbel, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Jurk

2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. et med. habil. Matthias Rudolf Bros

Tag der Promotion: 05.12.2025

Nachnutzungslizenz: Deposit-Lizenz, CC BY-NC-ND Lizenz

Für meinen Großvater Stephan-Lutz Tobatzsch

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	I
TABELLENVERZEICHNIS .....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	VI
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURDISKUSSION .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Essentielle Thrombozythämie .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Epidemiologie .....	2
2.1.2 Klinik .....	2
2.1.3 Pathogenese .....	3
2.1.4 Diagnostik .....	5
2.1.5 Differentialdiagnostik .....	6
2.1.6 Risikostratifizierung .....	6
2.1.7 Therapie .....	7
2.1.8 Prognose .....	10
2.1.9 Folgen/Erkrankungstransformationen .....	10
<b>2.2 Thrombozyten .....</b>	<b>11</b>
2.2.1 Thrombopoese .....	11
2.2.2 Funktionen .....	11
2.2.3 Cytosolische und membrangebundene Bestandteile .....	12
<b>2.3 Hämostase .....</b>	<b>15</b>
2.3.1 Primäre Hämostase .....	15
2.3.2 Sekundäre Hämostase .....	17
<b>2.4 Thrombozyten-Agonisten .....</b>	<b>19</b>
2.4.1 Physiologische Thrombozyten-Agonisten .....	19
2.4.2 weitere Thrombozyten-Agonisten .....	24
<b>2.5 Mononukleäre Zellen und Wechselwirkungen mit Thrombozyten .....</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Geräte .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Reagenzien .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Software .....</b>	<b>34</b>
<b>3.5 Studie .....</b>	<b>34</b>
3.5.1 Studiendesign .....	34
3.5.2 Genehmigung .....	35
3.5.3 Patienten- und Kontrollprobandenkollektiv .....	35
3.5.4 Datenschutz .....	36
3.5.5 Statistische Datenauswertung .....	37
<b>3.6 Venöse Blutentnahme .....</b>	<b>37</b>

<b>3.7</b>	<b>Gewinnung des Thrombozyten-reichen, -armen und -freien Plasmas</b> .....	<b>38</b>
<b>3.8</b>	<b>Gewinnung isolierter Thrombozyten</b> .....	<b>39</b>
<b>3.9</b>	<b>Gewinnung mononukleärer Zellen</b> .....	<b>40</b>
<b>3.10</b>	<b>Lumi-Aggregometrie</b> .....	<b>41</b>
3.10.1	Allgemeines Versuchsprinzip .....	41
3.10.2	Versuchsdurchführung .....	42
3.10.3	Auswertung der Thrombozytenaggregation und ATP-Freisetzung.....	43
<b>3.11</b>	<b>„Calibrated Automated Thrombography“ (CAT)</b> .....	<b>46</b>
3.11.1	Allgemeines Versuchsprinzip .....	46
3.11.2	Thrombingenerierung im PFP und PRP .....	47
3.11.3	Thrombingenerierung isolierter Thrombozyten und mononukleärer Zellen .....	50
3.11.4	Auswertung der Thrombingenerierung .....	52
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Deskriptive Statistik</b> .....	<b>53</b>
4.1.1	Patientencharakteristika .....	53
4.1.2	Kontrollprobandencharakteristika .....	58
<b>4.2</b>	<b>Explorative Datenanalyse</b> .....	<b>59</b>
4.2.1	Gruppenvergleiche im 1. Follow-up .....	59
4.2.2	Intraindividuelle Vergleiche der Thrombozytenfunktion im 1. Follow-up zum Ersteintritt .....	112
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>148</b>
<b>5.1</b>	<b>Deskriptive Datenanalyse</b> .....	<b>148</b>
<b>5.2</b>	<b>Explorative Datenanalyse</b> .....	<b>150</b>
5.2.1	Thrombozytäre Aggregation und ATP-Sekretion von Patienten mit ET .....	150
5.2.2	Dysfunktionen in der Thrombingenerierung von Patienten mit ET .....	160
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>182</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>185</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>196</b>
<b>8.1</b>	<b>Tabellen: Minima, Mediane, Maxima, Perzentile, Ranges</b> .....	<b>196</b>
8.1.1	Agonisten-induzierte thrombozytäre Aggregation (mittels Chronolog) .....	196
8.1.2	Agonisten-induzierte thrombozytäre ATP-Freisetzung (mittels Chronolog).....	199
8.1.3	Plasmatische Thrombingenerierung (mittels CAT) .....	200
8.1.4	Thrombozytäre Thrombingenerierung (mittels CAT).....	201
8.1.5	Thrombingenerierung der isolierten Thrombozyten (mittels CAT).....	209
8.1.6	Thrombingenerierung der mononukleären Zellen (mittels CAT) .....	221
<b>8.2</b>	<b>Tabellen: P-Werte</b> .....	<b>233</b>
8.2.1	Agonisten-induzierte thrombozytäre Aggregation (mittels Lumi-Aggregometrie) 233	
8.2.2	Agonisten-induzierte thrombozytäre ATP-Freisetzung (mittels Lumi-Aggregometrie).....	234
8.2.3	Plasmatische Thrombingenerierung (mittels CAT) .....	234
8.2.4	Thrombozytäre Thrombingenerierung (mittels CAT).....	235

8.2.5	Thrombingenerierung isolierter Thrombozyten (mittels CAT) .....	237
8.2.6	Thrombingenerierung mononukleärer Zellen (mittels CAT) .....	241

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
AML MO	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AS	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure, Aspirin®
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Kationen
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid, Kalziumchlorid
CALR	Gen, welches für das Calreticulin-Protein codiert
cAMP	cyclic adenosine monophosphate, zyklisches Adenosinmonophosphat
cPLA2	cytosolic phospholipase A2, zytosolische Phospholipase A2
CAT	calibrated automated Thrombography, kalibrierte automatische Thrombografie
CGS	Citrate-Glucose-Sodium, Citrat-Glucose-Natrium
Cl <sup>-</sup>	Chloridionen
CLEC2	C-type lectin-like receptor 2
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
COX-1	Cyclooxygenase-1
CP	Creatinphosphat, Kreatinphosphat
CPK	Creatinphosphatkinase, Kreatinphosphatkinase
CRP	C-reaktives Protein
CVRF	kardiovaskuläre Risikofaktoren
CVX	Convulxin
DAG	Diazylglyzerol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
δ-SPD	delta storage pool deficiency = δ-Speicherpool-Mangel“
DTS	Dichtes Tubulussystem
EE	Ersteinschluss
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EP	Eigenplasma
EPCR	endothelialer Protein-C-Rezeptor
ET	essentielle Thrombozythämie

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ETP	endogenes Thrombin Potential
FcR	Fc Rezeptor
FU	Follow-up
FX	Gerinnungsfaktor X
G	Gauge
g	Gramm
GP	Glykoprotein
GTPase	Guaninriphosphatase
HBSS	Hank´s balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
Hkt	Hämatokrit
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HU	Hydroxyurea
INR	International Normalized Ratio
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
<i>JAK2</i>	Gen, welches für das Enzym Januskinase 2 codiert
JAK2V617F	spezifische Punktmutation im <i>JAK2</i> -Gen
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KP	Kontrollplasma
l	Liter
LOX	Lipoxygenase
LTA	Lichttransmissions-Aggregometrie
M	Molar
max.	maximal
MCP-1	Monozyten chemotaktische Protein 1
MF	Myelofibrose
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar = Millimol pro Liter
MNC	mononuclear cells, mononukleäre Zellen
mol	Mol
MPL	myeloproliferatives Leukämie-Protein $\triangleq$ Thrombopoetin-Rezeptor
<i>MPL</i>	“myeloproliferative leukemia virus oncogene“. Ein Gen, welches für das MPL-Protein codiert, den Thrombopoetin-Rezeptor

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MPN	myeloproliferative Neoplasien
MZS	Mikrozirkulationsstörungen
Na <sup>+</sup>	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Natriumcitrat
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug = nicht-steroidale Antiphlogistika
PAR	Protease-aktivierender Rezeptor
PBS	phosphate buffered solution, phosphatgepufferte Salzlösung
pegINF $\alpha$	pegyliertes Interferon alpha
PF4	Plättchenfaktor 4
PFP	platelet-free plasma, Thrombozyten(=Plättchen)-freies Plasma
PI 3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-disphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB/Akt	Proteinkinase B/Akt
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pM	Pikomolar
PMF	primäre Myelofibrose
Post-ET-MF	Post-essentielle Thrombozythämie-Myelofibrose
PPP	platelet-poor plasma, Thrombozyten(=Plättchen)-armes Plasma
PRP	platelet-rich plasma, Thrombozyten(=Plättchen)-reiches Plasma
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
PV	Polycythaemia vera
rpm	revolutions per minute, Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
TF	tissue factor, Gewebefaktor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor, Gewebefaktor-Signalwegs-Inhibitor
TG	Thrombingenerierung
Thr	Thrombin

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TM	Thrombomodulin
TP	Thromboxan-Rezeptor
TPO	Thrombopoietin
t-RAEB	RAEB (refraktäre Anämie mit Exzess an Blasten) in Transformation
TRAP	Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid
TSP-1	Thrombospondin-1
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TZ	Thrombozyten
U	Units (= Einheiten)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
vWD	von-willebrand-disease (= von Willebrand Jürgens Syndrom)
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
WP	washed platelets, gewaschene Thrombozyten
$\bar{x}$	im Durchschnitt/Mittelwert/Mean
x g	Zentrifugalbeschleunigung

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verteilungsmuster der Treibermutationen in der ET .....	3
Tabelle 2: Haupt- und Nebenkriterien zur Diagnosestellung der ET.....	6
Tabelle 3: Übersicht der zytosolischen Thrombozytenbestandteile und deren Inhalt .....	13
Tabelle 4: Übersicht der thrombozytären Zellmembranbestandteile .....	14
Tabelle 5: Eingesetzte Geräte und deren Hersteller .....	29
Tabelle 6: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien.....	30
Tabelle 7: Eingesetzte Reagenzien und Puffer mit jeweiliger Zusammensetzung und/oder Konzentration .....	31
Tabelle 8: Eingesetzte Software-Programme .....	34
Tabelle 9: Agonisten für die Lumi-Aggregometrie-Versuche.....	43
Tabelle 10: Versuchsreihen für die Thrombinoskop-Messungen mit PRP und PFP.....	49
Tabelle 11: Versuchsreihen für die Thrombinoskop-Messungen für MNC und WP mit Plasmatauschversuchen (Eigen-Plasma (autolog) vs. Kontroll-Plasma (Plasma von gesundem Spender) .....	51
Tabelle 12: Wichtigste Thrombogramm-Parameter .....	52
Tabelle 13: Auflistung demographischer und klinischer Merkmale der ET-Patienten im 1. FU .....	54
Tabelle 14: Auflistung definierter Laborparameter der ET-Patienten im 1. FU .....	57
Tabelle 15: Auflistung demographischer Merkmale und Laborparameter der Kontrollprobanden, jeweils zum Zeitpunkt ohne und nach dreitägiger ASS-Einnahme (100mg/d).....	58

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Generiertes PRP nach einmaliger Zentrifugation einer Citrat-Monovette .....	39
Abbildung 2: Pipettierschema der Versuchsreihen für die Thrombinoskop-Messungen mit PRP und PFP .....	49
Abbildung 3: Pipettierschema der Versuchsreihen für die Thrombinoskop-Messungen mit MNC und WP .....	51
Abbildung 4: Arachidonsäure-induzierte thrombozytäre Aggregation.....	60
Abbildung 5: Kollagen-induzierte thrombozytäre Aggregation bei Zugabe von 2 µg/ml (A) und 10 µg/ml (B).....	62
Abbildung 6: TRAP-6-induzierte thrombozytäre Aggregation bei Zugabe von 10 µM (A) und 50 µM (B). .....	64
Abbildung 7: Kollagen-induzierte ATP-Freisetzung.....	66
Abbildung 8: TRAP-6-induzierte ATP-Freisetzung.....	67
Abbildung 9: „Lag time“ in PFP nach Zugabe von TF. ....	69
Abbildung 10: „Lag time“ in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).....	71
Abbildung 11: „Time to peak“ in PFP nach Zugabe von TF. ....	73
Abbildung 12: „Time to peak“ in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).....	75
Abbildung 13: „Thrombin peak“ in PFP nach Zugabe von TF. ....	77
Abbildung 14: „Thrombin peak“ in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).....	79
Abbildung 15: „Endogenes Thrombinpotential“ (ETP) in PFP nach Zugabe von TF.....	82
Abbildung 16: ETP in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E). .....	84
Abbildung 17: „Lag time“ isolierter Thrombozyten resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	87
Abbildung 18: „Time to peak“ isolierter Thrombozyten resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	90
Abbildung 19: : „Thrombin peak“ isolierter Thrombozyten resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	93
Abbildung 20: ETP isolierter Thrombozyten resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C). ....	96
Abbildung 21: „Lag time“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	99

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 22: „Time to peak“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	102
Abbildung 23: „Thrombin peak“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	105
Abbildung 24: ETP mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C). ....	109
Abbildung 25: Vergleich der Kollagen-induzierten thrombozytären Aggregation im EE und 1. FU .....	113
Abbildung 26: Vergleich der TRAP-6-induzierten thrombozytären Aggregation im EE und 1. FU .....	114
Abbildung 27: Vergleich der Kollagen-induzierten ATP-Freisetzung im EE und 1. FU .....	115
Abbildung 28: Vergleich der TRAP-6-induzierten ATP-Freisetzung im EE und 1. FU .....	116
Abbildung 29: Vergleich der „Lag time“ vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E) .....	118
Abbildung 30: Vergleich des „Thrombin peak“ vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E). ....	120
Abbildung 31: Vergleich des ETP vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).....	123
Abbildung 32: Vergleich der „Lag time“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	126
Abbildung 33: Vergleich des „Thrombin peaks“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	128
Abbildung 34: Vergleich des ETPs mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	130
Abbildung 35: Vergleich der Kollagen-induzierten thrombozytären Aggregation im EE und 1. FU .....	131
Abbildung 36: Vergleich der TRAP-6-induzierten thrombozytären Aggregation im EE und 1. FU .....	132
Abbildung 37: Vergleich der Kollagen-induzierten ATP-Freisetzung im EE und 1. FU .....	134
Abbildung 38: Vergleich der TRAP-6-induzierten ATP-Freisetzung im EE und 1. FU .....	135
Abbildung 39: Vergleich der „Lag time“ vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E) .....	137

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 40: Vergleich des „Thrombin peak“ vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E). .....	139
Abbildung 41: Vergleich des ETP vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).....	141
Abbildung 42: Vergleich der „Lag time“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C). .....	143
Abbildung 43: Vergleich des „Thrombin peaks“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	145
Abbildung 44: Vergleich des ETPs mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).....	147

## 1 EINLEITUNG

Bei der essentiellen Thrombozythämie (ET) handelt es sich um eine monoklonale myeloproliferative Neoplasie (MPN), die durch eine chronische Thrombozytose ( $>450 \times 10^9/l$ ) gekennzeichnet ist. Die Patienten haben ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse, sowie paradoxerweise auch ein erhöhtes Blutungsrisiko (1). Weshalb es bei manchen Patienten zu den oben genannten Ereignissen kommt und bei anderen wiederum nicht, ist bisher nur ungenau verstanden (2).

Die Dissertation ist Teil der monozentrisch prospektiven Pilotstudie "Untersuchung der Thrombozyten- und Leukozytenfunktion bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie" des Centrums für Thrombose und Hämostase (CTH) der Universitätsmedizin Mainz, die sich mit der Hypothese beschäftigt, dass nicht die Thrombozyten-Konzentration, sondern eher die Thrombozyten-Dysfunktionen bezüglich des Phänotyps und der Funktionskapazität ausschlaggebend für die klinisch heterogenen Pathomechanismen der ET sind (positives Ethikvotum Landesärztekammer Rheinland-Pfalz: 837.262.16 (10581) 04.08.2016). (2)

In dieser Arbeit war das Ziel zu untersuchen, ob sich bei ET-Patienten mit *JAK2V617F*-Mutation und *CALR*-Mutationen Veränderungen in den Thrombozytenfunktionen (Aggregation, ATP-Freisetzung, Thrombingenerierung), den Leukozytenfunktionen (speziell die Thrombingenerierung der mononukleären Zellen [MNC]), sowie im Einfluss der Plasmabestandteile auf die Thrombingenerierung in Plasmatauschversuchen zeigen. Dafür wurden die Methoden Lumi-Aggregometrie und die „Calibrated Automated Thrombography“ (CAT) verwendet.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die pathophysiologischen Mechanismen der ET besser zu verstehen und potenziell neue Strategien zur individuell angepassten Risikobewertung und Therapie aufzuzeigen.

## 2 LITERATURDISKUSSION

### 2.1 ESSENTIELLE THROMBOZYTHÄMIE

Die essentielle Thrombozythämie (ET) wird neben der Polycythaemia vera (PV), der Primären Myelofibrose (PMF) und der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) zu den Erkrankungen der myeloproliferativen Neoplasien (MPN) (früher myeloproliferatives Syndrom) gezählt (3). Dabei handelt es sich um monoklonale autonome (also nicht zytokin-abhängige) Proliferationen myeloischer Stammzellen, sodass es zur Vermehrung einer oder mehrerer hämatopoetischer Zellreihen kommt (3). Die CML unterscheidet sich von den anderen drei Erkrankungen genetisch hinsichtlich des mutierten Philadelphia-Chromosoms, weshalb die ET, PV und PMF im Gegensatz zur CML als philadelphia-negative MPN eingeordnet werden (4). Die ET ist charakterisiert durch eine gesteigerte Megakaryopoese, die zu einer Thrombozytose im peripheren Blut führt. Im Initialstadium können auch alle drei Zellreihen erhöht sein (Thrombo-, Erythro-, Leukozytose). Die Thrombozytenzahl steigt meist langsam an und kann Werte von bis zu über  $1.000 \times 10^9/l$  erreichen (1, S.105 ff.). Gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO) handelt es sich um eine ET, wenn die Thrombozytenkonzentration langfristig über  $450 \times 10^9/l$  steigt, die Knochenmarksbiopsie ET-typische Merkmale aufweist (siehe Tabelle 2: Haupt- und Nebenkriterien zur Diagnosestellung der ET), sowie keine WHO Kriterien anderer MPN zutreffen. Außerdem muss entweder eine der genetischen Mutationen *JAK2*-, *CALR*- oder *MPL*-Mutation vorliegen oder explizit ein anderer klonaler Marker gefunden bzw. eine reaktive Ursache ausgeschlossen werden. Die genaue Ursache der ET ist bis dato unbekannt. (1, 3)

#### 2.1.1 Epidemiologie

Die jährliche Inzidenz der ET liegt bei 0,9 pro 100.000 Menschen. Das mediane Diagnosealter liegt zwischen 55 und 60 Jahren, wobei Männer 1,5 - fach häufiger betroffen sind als Frauen. (1)

#### 2.1.2 Klinik

ET-Patienten können variable Symptome zeigen. Etwas über 30 % der Patienten sind sogar asymptomatisch (1). So werden bis zur Hälfte der ET-Patienten nur rein zufällig entdeckt (5). Bei symptomatischen Patienten sind die häufigsten Symptome Migräne, Kopfschmerzen und Schwindel (6). Häufig kommt es zu Mikrozirkulationsstörungen an Händen und Füßen und zur Erythromelalgie (1). Meist folgen im Verlauf thromboembolische Komplikationen, die auch die häufigste Todesursache bei der ET darstellen (1). Die Leberventhrombose ist typisch für diese Erkrankung (6).

## LITERATURDISKUSSION

Die Splenomegalie ist bei der ET im Vergleich zu den anderen myeloproliferativen Neoplasien (PV, PMF, CML) selten und eher im späteren Krankheitsverlauf in milder Form zu beobachten. (1, 6)

Bei der ET kann auch eine erhöhte Blutungsneigung auftreten. Die Patienten präsentieren dann hämorrhagische Diathesen (1), wie beispielsweise Blutergüsse nach Bagatellverletzungen, häufiges Zahnfleisch- oder Nasenbluten.

Bei Schwangeren kommt es zum vermehrten Auftreten von Fehlgeburten im ersten Trimester. (3)

### 2.1.3 Pathogenese

Die MPN weisen eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Pathogenese auf, die durch die gemeinsamen Mutationen bedingt ist. Ungefähr 97 % der MPN-Fälle zeigen mindestens eine somatisch erworbene Treibermutation in einem Gen, das für die Januskinase 2 (*JAK2*), Calreticulin (*CALR*) oder den Thrombopoetin-Rezeptor (*MPL*) kodiert (7). Je nach Erkrankung unterscheidet sich lediglich das Verteilungsmuster der Mutationen. Beispielsweise zeigen PV-Patienten zu etwa 95 % eine *JAK2*-Mutation und ET-Patienten nur zu etwa 55 % (8). Die *JAK2*-, *CALR*- sowie *MPL*-Mutationen führen zu einer Hochregulation des JAK-STAT-Signaltransduktionsweges (5), welcher die Informationen von extrazellulären Zytokinen (z.B. TPO, EPO, IL3, G-CSF(9)) nach intrazellulär zu den Zielgenen übermittelt und damit die Proliferation hämatopoetischer Zellen steigert. Neben diesen drei Treibermutationen finden sich bei manchen Patienten auch Nicht-Treiber-Mutationen auf anderen Genen, z.B. *TET2*, *ASXL1*, *CBL*, *EZH2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *SRSF2*. (10)

Außerdem tragen entscheidend zu der Pathogenese der MPN erhöhte Zytokinlevel bei, die einen chronisch inflammatorischen Zustand erzeugen. In MPN-Patienten sind dadurch Marker der Thrombozyten-, Leukozyten-, Endothel- sowie Gerinnungsaktivierung erhöht. (11)

Im Folgenden wird genauer auf die *JAK2*-, *CALR*- und *MPL*-Mutationen eingegangen. Tabelle 1 veranschaulicht das Verteilungsmuster der Treibermutationen bei der ET.

**Tabelle 1: Verteilungsmuster der Treibermutationen in der ET**

Mutationen	Anteil aller ET-Patienten
<b><i>JAK2</i></b>	50-60 %
<b><i>CALR</i></b>	20-30 %
<b><i>MPL</i></b>	1-10 %
<b>Keine der drei Mutationen („triple negative“)</b>	10-25 %

[Marin Oyarzun *et al.* (11)]

Rund die Hälfte der ET-Patienten weisen eine *JAK2*-Mutation auf (12). Sie ist meist eine Punktmutation, die aufgrund eines Austauschs der Aminosäure Valin mit Phenylalanin auf

## LITERATURDISKUSSION

Codon 617 in Exon 14 zustande kommt. Deshalb spricht man genauer von der *JAK2V617F*-Mutation (13, 14). Außerdem kann es in selteneren Fällen zu einer Mutation in *JAK2* auf Exon 12 kommen (14). Das *JAK2*-Gen codiert für eine zytosolische Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die mit dem Transkriptionsfaktor STAT interagiert und den JAK/STAT-Signalweg bildet (15). Dieser spielt eine zentrale Rolle in der Hämatopoese. Eine Mutation im *JAK2*-Gen führt zu einem Funktionsgewinn („gain of function“), der zur unkontrollierten Aktivierung intrazellulärer Signalwege über Rezeptoren hämatopoetischer Zytokine (Erythropoetin, Thrombopoetin, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) führt und dadurch zur verstärkten Proliferation aller drei Zellreihen (Erythropoese, Thrombopoese, Granulozytopoese) beiträgt (12).

Das Vorhandensein einer *JAK2V617F*-Mutation ist mit der Erhöhung bestimmter Marker verbunden, die ein höheres prothrombotisches Potential aufzeigen. Beispielsweise ist diese Mutation, im Gegensatz zur *CALR*- oder *MPL*-Mutation, mit einer höheren thrombozytären Membranoberflächen-Expression von P-Selektin (16) und TF, sowie einem vermehrten Aufkommen von Aggregaten aus Thrombozyten und polymorphnuklearen Leukozyten assoziiert (17). Im Gegensatz dazu ist das Vorhandensein einer *JAK2V617F*-Mutation mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung einer Post-ET-Myelofibrose assoziiert (18).

Calreticulin ist physiologischerweise an der zellulären Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (13). Kommt es zur Mutation, handelt es sich um Insertionen oder Deletionen in Exon 9 (10), die eine Verschiebung des Leserasters der Aminosäuren bei der Translation für das Protein Calreticulin verursachen. Dies führt zur Bildung eines neuen C-Terminus. (12)

Eine *CALR*-Mutation findet sich bei 20-30 % der ET-Patienten (11) und führt zu einer pathologischen Interaktion mit dem *MPL*-Rezeptor (19). Dies resultiert in einer Aktivierung und anhaltenden *JAK2*-Signalisierung (11) und damit in einer autonomen Steigerung der Thrombopoese.

Nur etwa 1-10 % der Patienten mit essentieller Thrombozythämie sind von einer *MPL*-Mutation, p.M515L oder p.M515K (10), betroffen. Es handelt sich jeweils um eine Punktmutation im Exon 10 des myeloproliferativen-Leukämie-Gens, welches für den Thrombopoetin-Rezeptor codiert. Dadurch kommt es bei einer Mutation zur ligandenunabhängigen dauerhaften Wachstumsstimulation von TPO-empfindlichen Zellen (11, 13).

Diejenigen ET-Patienten, die keine der drei eben beschriebenen Treibermutationen aufweisen (~ 10-25 %), werden als „triple-negative“ bezeichnet (11).

### 2.1.4 Diagnostik

Zur Beurteilung und Diagnostik von Patienten mit Verdacht auf ET gehören ein vollständiges großes Blutbild, eine Knochenmarksbiopsie und genetische Tests zur Feststellung von Genmutationen. Im Labor zeigt sich eine anhaltende Thrombozytose von  $\geq 450 \times 10^9/l$ , eine Hyperurikämie sowie LDH-Erhöhung aufgrund des erhöhten Zellumsatzes. (1, 3)

Die Detektion der speziellen Treibermutationen und anderer somatischer Mutationen mit Hilfe genetischer Tests ist sehr wichtig, da die Art der Mutationen die klinischen Merkmale, Komplikationen und die Prognose bestimmen (13).

Zuerst testet man auf das Vorliegen einer *JAK2V617F*-Mutation. Falls diese nicht nachgewiesen werden kann, wird als nächstes auf die *CALR*-Mutation getestet und bei ebenso negativem Ergebnis testet man auf das Vorliegen einer *MPL-W515K/L*-Mutation. Wurde keine der drei Mutationen gefunden, muss mithilfe der Untersuchung auf das bcr-abl-Onkogen eine CML ausgeschlossen werden. (14)

Ist aber mindestens eine der drei Mutationen als positiv getestet worden, so muss zur weiteren Differenzierung zwischen ET, PV oder primäre Myelofibrose bzw. präfibrotische Myelofibrose eine Knochenmarkspunktion erfolgen (14). In knochenmarksmikroskopischen Untersuchungen zeigen sich bei der ET gehäuft vermehrte und vergrößerte Megakaryozyten ohne Reifungsstörungen mit multilobulierten Kernen (1, 20). Im peripheren Blutaussstrich finden sich vergrößerte Thrombozyten (1).

Die endgültige Diagnose der ET wird letztendlich über die zuletzt 2016 von der World Health Organization (WHO) neu definierten Kriterien gestellt. Die WHO definiert vier Hauptkriterien und zwei Nebenkriterien, die in der Tabelle 2 aufgeführt sind. Damit die Diagnose ET gestellt werden kann, müssen alle vier Hauptkriterien oder die ersten drei Hauptkriterien und ein Nebenkriterium erfüllt sein.

**Tabelle 2: Haupt- und Nebenkriterien zur Diagnosestellung der ET**

<b>Hauptkriterien</b>
1. Anhaltende Thrombozytenzahl $>450 \times 10^9/l$
2. Knochenmarksbiopsie: zeigt hauptsächlich die Proliferation der Megakaryozyten-Linie mit vermehrten, vergrößerten, aber reifen Megakaryozyten mit hyperlobulierten Kernen. Keine signifikante Steigerung oder Linksverschiebung der neutrophilen Granulopoese oder Erythropoese. Keine oder nur geringe Faservermehrung.
3. Ausschluss einer PV, PMF, CML, eines MDS oder einer anderen myeloischen Neoplasie
4. Nachweis einer <i>JAK2</i> -, <i>CALR</i> - oder <i>MPL</i> -Mutation
<b>Nebenkriterien</b>
1. Vorhandensein eines anderen klonalen Markers
2. Ausschluss einer reaktiven Thrombozytose (z.B. Entzündung, Infektion, Eisenmangelanämie)

[Arber *et al.* (21)]

### 2.1.5 Differentialdiagnostik

Differentialdiagnostisch kommt es ebenso zu erhöhten Thrombozytenzahlen bei z.B. chronischen Entzündungen, Malignomen, Traumen, Operationen, Blutverlust, Splenektomie oder Eisenmangel. Dann spricht man von sekundären bzw. reaktiven Thrombozytosen. Da sich die Symptome der myeloproliferativen Erkrankungen überlappen, müssen auch die anderen bereits oben erwähnten MPN wie die PV, PMF und CML differentialdiagnostisch in Betracht gezogen und ausgeschlossen werden. (1)

### 2.1.6 Risikostratifizierung

Für die Durchführung der richtigen Behandlung der ET müssen Leitlinien herangezogen werden. Zurzeit sind die Leitlinien des *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) die aktuellsten. Sie berücksichtigen das im Jahre 2015 von Barbui *et al.* revidierte IPSET-Thrombosemodell (International Prognostic Score for Essential Thrombocythemia) zur Risikostratifizierung und Therapieempfehlung. Nach diesem Modell werden die ET-Patienten in vier Risikogruppen eingeteilt, für die es jeweils andere Therapieempfehlungen gibt. Zu den drei Risikofaktoren, nach denen die ET-Patienten in die passende Gruppe eingeteilt werden, gehören ein Alter von über 60 Jahren, vorherige thrombotische Ereignisse und Anwesenheit einer *JAK2V617F*-Mutation. Die Risikogruppen werden eingeteilt in „Sehr-niedrig-Risiko“ (Alter  $< 60$  Jahren, keine Thromboseanamnese, keine *JAK2V617F*-Mutation), „Niedrig-Risiko“ (Alter  $< 60$  Jahren, keine Thromboseanamnese, vorhandene *JAK2V617F*-Mutation), „Intermediär-Risiko“ (Alter  $\geq 60$  Jahren, keine Thromboseanamnese, keine *JAK2V617F*-Mutation) und „Hoch-Risiko“ (vorhandene Thromboseanamnese **oder** Alter  $\geq 60$  Jahren mit vorhandener *JAK2V617F*-Mutation). (4, 14)

## LITERATURDISKUSSION

Allgemein sind bei der Erkrankung ET die Prädiktoren für die Entwicklung einer arteriellen Thrombose (ischämischer Schlaganfall, kardiovaskuläre Ereignisse und periphere Arterienerkrankungen (11)) sowohl ein Alter über 60 Jahren als auch eine vorhandene Thromboseanamnese, eine Leukozytose ( $>11 \times 10^9/l$ ), eine *JAK2V617F*-Mutation oder vorhandene kardiovaskuläre Risikofaktoren (CVRF) wie arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus, Hypercholesterinämie oder Tabakkonsum. Im Gegensatz dazu scheint für die Entwicklung einer venösen Thrombose (Tiefe Beinvenenthrombose (TVT), Lungenembolie (11)) nur das männliche Geschlecht ein Prädiktor zu sein. (14, 22, 23)

Zusätzlich zur Thrombose der großen Gefäße können auch transiente Thrombozytenaggregate kleine Gefäße verstopfen und zu mikrovaskulären Störungen führen, wie z. B. Erythromelalgie und Sehstörungen (11).

Eine Thrombozytenzahl von mehr als  $1000 \times 10^9/L$  ist mit einem geringeren Risiko für arterielle Thrombosen verbunden und steht im Zusammenhang eines erworbenen von-Willebrand-Syndroms (23), dafür besteht aber ein erhöhtes Blutungsrisiko. Risikoarme Patienten mit extremer Thrombozytose werden demnach gesondert betrachtet. (14)

Bei der Evaluation des Thromboserisikos bei *JAK2V617F*-Mutationsträgern kristallisierte sich ein zweifacher Anstieg der vaskulären Ereignisse heraus (24).

Eine *CALR*-Mutation ist mit einer vergleichsweise geringeren Inzidenz thrombotischer Ereignisse assoziiert (14).

Eine *MPL*-Mutation erhöht die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer okkulten präfibrotischen PMF oder das Risiko einer fibrotischen Progression (3).

### 2.1.7 Therapie

Das derzeit wichtigste Ziel der Behandlung der essentiellen Thrombozythämie ist die Prävention vaskulärer Ereignisse (die bei 10-20 % der Patienten auftreten können (3)), also die Minimierung des Thrombose- und Blutungsrisikos, da bisher noch keine krankheitsmodifizierenden Medikamente existieren. Die Therapie ist weder kurativ noch zeigt sie ein verlängertes Überleben oder verhindert die leukämische oder fibrotische Transformation. (3)

Grundsätzlich sollte **Primärprävention** betrieben werden. Empfohlen wird die Gewichtsreduktion auf Normalgewicht, regelmäßige körperliche Bewegung, Einstellen des Nikotinkonsums und eine adäquate Thromboseprophylaxe (z.B. die Vermeidung langen Sitzens, das Tragen von Kompressionsstrümpfen auf Reisen sowie die Vermeidung von Exsikkose). Bestehende kardiovaskuläre Risikofaktoren (CVRF) müssen behandelt werden. (25)

## LITERATURDISKUSSION

Die III. Medizinische Klinik und Poliklinik/LLC (Leukämie-/Lymphom Centrum) und UCT (Universitäres Zentrum für Tumorerkrankungen) der Universitätsmedizin Mainz orientiert sich in ihrem Behandlungspfad (Stand: Oktober 2020)(26) an dem 2015 von Tiziano Barbui *et al.* (27) revidierten IPSET-Thrombosemodells, welches die ET-Patienten in vier Risikogruppen einteilt. (26)

**„Sehr-niedrig-Risiko“ Patienten** ohne vorhandene CVRF bedürfen keiner Therapie, sondern werden nach der „watch and wait“-Strategie beobachtet. Liegen allerdings CVRF oder Mikrozirkulationsstörungen vor, ist eine einmalige Gabe von 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS; Aspirin®) pro Tag zur antithrombotischen Therapie indiziert (26). Wobei Ayalew Tefferi und Tiziano Barbui in ihrem klinischen Update 2019 zu hämatologischen Erkrankungen hier eine einmal täglich niedrig dosierte Gabe von 81 mg ASS pro Tag empfehlen (14). ASS ist vor allem bei der Verhinderung mikrovaskulärer Episoden wirksam (28).

Bei Thrombozytenwerten über  $1000 \times 10^9/l$  sollte die Aspirintherapie vorsichtig abgewägt und ein möglicherweise erworbenes von-Willebrand-Jürgen-Syndrom zuerst ausgeschlossen werden. Falls das Labor abnormale Werte des von-Willebrand-Faktors (vWF) zeigt und/oder Blutungen bestehen, ist die Aspiringabe kontraindiziert bzw. sollte das individuelle Risiko der Blutungsneigung mit ASS im Vergleich zum Thromboserisiko ohne ASS abgewägt werden. (20)

**„Niedrig-Risiko“ Patienten** erhalten eine ASS-Therapie unabhängig der CVRF (26). So empfehlen Tefferi et Barbui 2019 eine einmal tägliche niedrig dosierte ASS-Gabe und bei Vorhandensein von CVRF sollte die ASS-Einnahme auf zweimal täglich erhöht werden (14).

Auch bei **„Intermediär-Risiko“ Patienten** gilt die ASS-Therapie unabhängig der bestehenden CVRF sowie individuell eine zusätzliche zytoreduktive Therapie, falls entweder die Patienten schon das 65. Lebensjahr erreicht haben oder CVRF vorliegen und/oder eine Leukozytose von  $>10/nl$  besteht (14, 26).

Je nach individuellem Behandlungsverlauf kann die Therapie von diesem vereinfachten Schema abweichen und beispielsweise schon bei „Niedrig-Risiko“ Patienten eine zytoreduktive Therapie von Nöten sein, falls z.B. Hämorrhagien auftreten, Mikrozirkulationsstörungen trotz ASS-Einnahme bestehen oder eine Leukozytenzahl von  $>15/nl$  besteht. Allgemein gilt, dass die Behandlung der ET sehr individualisiert angepasst werden muss. (26)

**„Hoch-Risiko“ Patienten** erhalten eine zytoreduktive Therapie mit Hydroxyurea (HU), pegyliertem Interferon oder Anagrelid (26). Zusätzlich empfiehlt sich die zweimal tägliche ASS-Gabe (arterieller Thrombose in Anamnese) oder systemische Antikoagulation (bei venöser Thrombose in Anamnese) (14).

## LITERATURDISKUSSION

Neue Daten weisen darauf hin, dass generell die einmal täglich niedrig dosierte ASS-Gabe nicht ausreichen würde, um eine adäquate Unterdrückung der Thromboxan-A<sub>2</sub>-Synthese der Blutplättchen zu bewirken, da der Thrombozytenumsatz bei ET-Patienten beschleunigt ist. Die zweimalige ASS-Gabe am Tag würde hingegen zu einer wirksamen Unterdrückung führen. Deshalb wird für einige Patienten zweimal täglich ASS empfohlen (z.B. Patienten mit Hochrisikoerkrankungen und früherer arterieller Thrombose). (29)

Hydroxyurea (HU) ist das Medikament der ersten Wahl zur Zytoreduktion bei „Hoch-Risiko“ Patienten (26). HU wirkt als Inhibitor der Ribonukleotidreduktase, wodurch die DNA-Synthese beeinflusst wird und es zu einer Senkung der Thrombozyten- als auch der Leukozytenzahl kommt (30). An der Universitätsmedizin Mainz werden initial 15 - 20 mg/kg KG/Tag gegeben und die Thrombozytensenkung auf  $<450 \times 10^9/l$  angestrebt. Die HU-Dosis wird je nach Blutbild angepasst (26).

Mit der HU-Behandlung verfolgt man zwei Ziele:

- 1.) Die Reduktion der Thrombozytenkonzentration auf unter  $450 \times 10^9/l$ , weil erhöhte Thrombozytenkonzentrationen außerhalb der normalen Werte mit einem erhöhten Blutungsrisiko und nicht mit erhöhter Thrombosegefahr assoziiert sind (31). Werte zwischen  $450-600 \times 10^9/l$  sind tolerierbar, v.a. wenn niedrigere Dosen HU dafür benötigt werden (32).
- 2.) Korrektur einer Leukozytose ( $WBC \geq 11 \times 10^9/l$ ); da mehrere Studien zeigen, dass das Auftreten einer Thrombose vielmehr durch eine Leukozytose und nicht durch eine Thrombozytose beeinflusst wird (32).

HU ist das am häufigsten verschriebene Medikament der ersten Wahl für ET-Patienten, da es einfach zu verabreichen ist, ein gutes Wirksamkeits- und Nebenwirkungsprofil aufweist und die Inzidenz von Therapieresistenzen gering ist (29). Demgegenüber weist HU jedoch auch teratogene und embryotoxische Wirkungen auf; es bestehen Bedenken hinsichtlich einer Gonadentoxizität und Mutagenität. Daher sind von der Therapieempfehlung jüngere Menschen ( $<40$  Jahren), insbesondere Frauen im gebärfähigen Alter und Schwangere, ausgeschlossen. Beobachtungsstudien haben gezeigt, dass Patienten mit MPN unter der Therapie mit HU kein erhöhtes leukämisches Transformationsrisiko haben. Im Gegensatz dazu wurde die Behandlung mit radioaktivem Phosphor (P<sup>32</sup>), Alkylatoren (z.B. Chloram-Bucil) oder Pipobroman mit einem signifikant höheren Leukämierisiko in Verbindung gebracht. (29)

Bei Unverträglichkeiten, Kontraindikationen, Resistenz oder Ausbleiben des Therapieerfolges unter Hydroxyurea stehen noch Anagrelid (z.B. Xagrid<sup>®</sup>), als das einzige zugelassene Medikament der zweiten Wahl in Deutschland, sowie das als „off label use“ genutzte pegylierte Interferon- $\alpha$ -2a (25) (Pegasys<sup>®</sup>) zur Verfügung. (10, 29)

## LITERATURDISKUSSION

Nach dem Behandlungsschema der Universitätsmedizin Mainz werden in oben genannten Situationen oder bei isolierter Thrombozytose als Zweitlinientherapie 0,5 - 2,5 mg/Tag Anagrelid (Xagrid<sup>®</sup>) gegeben (26). Anagrelid reduziert die Thrombozytenzahl selektiv, indem es die Reifung der Megakaryozyten inhibiert (33, 34). Zudem hemmt es die zyklische AMP-Phosphodiesterase III. Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse aus kontrollierten Studien mit ET-Patienten und angesichts der potenziell kardiovaskulären Toxizität wird Anagrelid, insbesondere bei älteren Patienten, nur selten eingesetzt und gilt als Zweit-Linien-Medikament (29, 35).

Pegyliertes Interferon (Pegasys<sup>®</sup>) wird an der Universitätsmedizin Mainz gerne alternativ zu HU als „off label use“ für die Behandlung insbesondere jüngerer ET-Patienten (<60 Jahre) genutzt (26). Hierbei werden 90 µg/Woche subkutan zur Nacht gegeben, wobei auch eine Applikation nur alle zwei bis drei Wochen möglich ist (26). Die Dosisanpassung erfolgt via Blutbild-Kontrolle und Nebenwirkungsprofil (26). Pegyliertes Interferon verringert die Allellast von Treibermutationen, was auf eine krankheitsmodifizierende Wirkung hindeutet (36).

### 2.1.8 Prognose

Die essentielle Thrombozythämie ist eine nicht heilbare indolente Erkrankung mit einer recht guten Prognose. Aufgrund der thrombotischen Ereignisse, die die Erkrankung komplizieren können, haben die ET-Patienten eine kürzere Lebenserwartung als die gesunde Allgemeinbevölkerung (13). Dabei liegt die mediane Überlebenszeit bei 20 Jahren (37). Bei Patienten, die jünger als 60 Jahre sind, liegt die mediane Überlebenszeit bei etwa 33 Jahren (37). Bei rechtzeitiger Diagnostik kann man jedoch gut gegen die Entwicklung thromboembolischer Komplikationen vorgehen, sodass die Lebenserwartung von ET-Patienten gegenüber der Normalbevölkerung nur geringfügig eingeschränkt ist.

ET-Patienten mit einer *JAK2*-Mutation haben einen etwas ungünstigeren Verlauf als Patienten mit einer *CALR*-Mutation (1). Tefferi *et al.* beschreiben 2014 allerdings, dass der *JAK2/CALR*-Mutationsstatus oder die *JAK2V617F*-Allelbelastung nachweislich das Überleben mit ET nicht beeinflusst (37).

### 2.1.9 Folgen/Erkrankungstransformationen

Die Thrombose ist nach wie vor die Hauptursache für Morbidität und Mortalität bei Patienten mit einer MPN, mit einem hohen Rezidiv-Risiko auch unter adäquater antithrombotischer und zytoreduktiver Behandlung. 15 - 30 % der ET-Patienten entwickeln diese Hauptkomplikation der Erkrankung. (11)

Bei der ET besteht zusätzlich das Risiko der Fibrosierung und Sklerosierung des Knochenmarks (1). So kann es selten auch zu Erkrankungstransformationen kommen, bei denen die ET in eine PV und/ oder in 15 % (38) der Fälle direkt in eine post-ET-Myelofibrose

## LITERATURDISKUSSION

(fibrotische Transformation, PMF-ähnlicher Phänotyp) übergehen kann. Außerdem ist der Übergang in eine akute Leukämie (leukämische Transformation) zwar sehr selten, dennoch möglich. (1, 38, 39)

Die leukämischen Transformationsraten nach 15 Jahren werden auf etwa 2,1 - 5,3 % geschätzt, die fibrotischen Transformationsraten sind im gleichen Intervall etwas höher mit 4 - 11 % (3).

## 2.2 THROMBOZYTEN

Die Blutplättchen sind zentrale Zellen in der primären wie auch sekundären Hämostase. Sie sorgen dafür, dass die Blutstillung und Blutgerinnung abläuft und auf den Ort der Verletzung begrenzt wird, indem sie zellgebunden Thrombin auf ihrer Oberfläche generieren und so die Fibrinbildung sowie Entstehung eines stabilen Thrombus ermöglichen. (40)

Thrombozyten sind kleine kernlose, bikonvex scheibenförmige Fragmente der Megakaryozyten. Ihr Durchmesser liegt bei 2 - 4  $\mu\text{m}$  und die physiologische Thrombozytenkonzentration im peripheren Blut liegt bei 150 – 450  $\times 10^9/\text{l}$ . (41-43)

Sie haben eine relativ kurze Lebensdauer von 8 - 11 Tagen (42).

### 2.2.1 Thrombopoese

Die Thrombopoese beginnt im Knochenmark. Dort differenzieren sich aus hämatopoetischen Stammzellen die polyploiden Megakaryozyten. Sie bilden im Knochenmark pseudopodiale Ausläufer, so genannte Protrombozyten, welche sich zwischen Zellen der sinusoidalen Endothelschicht ausdehnen, davon dann Thrombozyten formen, abschnüren und in den Blutstrom abgeben. (42, 44)

Sinkt die Thrombozytenzahl im peripheren Blut, sorgt Thrombopoietin (TPO) über den Thrombopoetin-Rezeptor (c-MPL-Rezeptor) für die Stimulierung der Megakaryozyten, wodurch diese Prothrombozyten bilden. TPO wird in der Leber und den Nieren gebildet. (42)

Blutplättchen werden nach etwa zehn Lebenstagen, wenn sie vorher nicht aktiviert wurden, von Makrophagen in der Leber und Milz abgebaut (43). Daneben fungiert auch die Lunge als Thrombozyten-Reservoir und als potenzieller Ort für Oberflächenmodifikationen und Thrombozyten-Clearance (Abbau). (45)

### 2.2.2 Funktionen

Die Thrombozyten stehen im Mittelpunkt der primären wie auch der sekundären Hämostase. Sie sind somit aktive Mitspieler der Blutstillung, Blutgerinnung und Wundheilung. Dadurch sind sie ebenso an akuten atherothrombotischen Ereignissen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall sowie an der Genese der Arteriosklerose maßgeblich beteiligt. Viele Prozesse laufen dabei zellgebunden auf der Thrombozytenoberfläche ab. (46)

Außerdem übernehmen Thrombozyten wichtige Funktionen als Abwehrzellen, v.a. in der unspezifischen, aber auch in der spezifischen Immunreaktion. Sie gehören neben den Leukozyten zu den wichtigsten Detektoren von Pathogenen. (40)

Thrombozyten agieren als Entzündungszellen (40), sind am Schutz des Endothels beteiligt und gelten als wichtige Modulatoren der Angiogenese (46). Es wird ihnen auch eine Beteiligung an Tumorwachstum und -metastasierung zugeschrieben (46).

### **2.2.3 Cytosolische und membrangebundene Bestandteile**

Blutplättchen sind reich an cytosolischen und membrangebundenen Bestandteilen. Tabelle 3 und Tabelle 4 verschaffen einen Überblick darüber. Besonders hervorzuheben sind die speziellen Granulatypen in den Thrombozyten, welche sie bei Aktivierung sezernieren und dadurch vielfältige Funktionen ausüben können. Am häufigsten sind  $\alpha$ -Granula (47), die Adhäsionsproteine wie vWF und Fibrinogen enthalten, aber auch Substanzen mit unterstützender oder hemmender Funktionen der Gerinnung (z.B. Gewebefaktor („tissue factor“ (TF)), Gerinnungsfaktoren V, VII, XI, XII und Protein S), der Fibrinolyse (z.B. Plasminogen) sowie der Angiogenese (z.B. den Angiogenese-Inhibitor Thrombospondin 1). Die Proteine und Peptide können schon in den Megakaryozyten synthetisiert, durch Endozytose aus dem Blutplasma aufgenommen oder auch selbständig intrathrombozytär gebildet werden. (42, 47, 48)

Bei Sezernierung der  $\alpha$ -Granula verbleiben die Substanzen dann durch den Exozytoseprozess entweder auf der Thrombozytenmembranoberfläche (P-Selektin) oder sie werden ins Plasma ausgeschüttet (Plättchenfaktor 4 (PF4),  $\beta$ -Thromboglobulin). (49)

Die  $\delta$ -Granula werden auch als „dichtes“ Granula bezeichnet, weil sie eine hohe Elektronendichte aufweisen. Sie beinhalten proaggregierende Faktoren, die der Rekrutierung weiterer Thrombozyten während der Aggregation dienen. (42, S.976f.)

Die dichten Granula werden bei der Thrombozytenaktivierung freigesetzt, können aber nicht wieder aufgefüllt werden (50). Die Inhalte der  $\delta$ -Granula verstärken in erster Linie die Thrombozytenaggregation und die Thrombozyten-abhängige Koagulation. Gemeint sind vor allem ATP und ADP, sowie die Botenstoffe Serotonin und Histamin. (47)

Die Lysosomen in den Blutplättchen beinhalten Enzyme wie Hydrolasen, die zum Abbau der extrazellulären Matrix und zur Zellmigration beitragen (47). Ein möglicher Beitrag zur Hämostase oder Thrombose ist noch unbekannt (51).

Aus den komplexen Membransystemen der Thrombozyten wird Arachidonsäure freigesetzt (40). Das dichte Tubulussystem (DTS) enthält viele wichtige Enzyme, z.B. die Cyclooxygenase 1 (COX1) und Thromboxan-Synthetase, welche die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) aus der Arachidonsäure katalysieren. (40, 42, S.976f.)

## LITERATURDISKUSSION

Außerdem enthält das DTS einen großen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pool, der während der Thrombozytenaktivierung mobilisiert wird.  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse sind zentrale Auslöser bei der Thrombozyten-Aktivierung, -Rekrutierung und -Aggregation. (50)

Die Glykoproteine in der Thrombozytenmembran bilden Rezeptoren für unterschiedliche Thrombozyten-Agonisten. Diese Glykoprotein-Rezeptoren müssen teilweise erst noch in einen aktivierten Zustand überführt werden, damit die Agonisten an sie binden können (z.B. GPIIb-IIIa) (42, S.976f.).

**Tabelle 3: Übersicht der zytosolischen Thrombozytenbestandteile und deren Inhalt**

Zellbestandteile	Inhalt (übergeordnete Stoffklassen)	Genauere Inhaltsstoffe
sRNA und mitochondriale DNA		
Mitochondrien		
$\alpha$ -Granula	Proteoglykane:	PF4
		$\beta$ -Thromboglobulin
		histidinreiches Glycoprotein
	adhäsive Glycoproteine:	vWF
		Fibronektin
		Vitronektin
		Thrombospondin 1 (Angiogenese-Inhibitor)
		P-Selektin (49)
	Gerinnungsfaktoren:	Fibrinogen
		V, VII, XI, XII
		Protein S
		Plasminogen
	Wachstumsfaktoren:	PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, VEGF
Protease-Inhibitoren:	$\alpha$ 2-Antitrypsin, $\alpha$ 2-Makroglobulin, TFPI (52)	
Zytokine	z.B. Interleukin-1 $\beta$ , sCD40L (52)	
$\delta$ -Granula	Kleine nicht-Protein-Moleküle	ATP, ADP
		Polyphosphate (47)
		Pyrophosphate
		Serotonin, Histamin
		$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$

LITERATURDISKUSSION

<b>Lysosomen</b>		Hydrolasen, Cathepsine und Heparinasen
<b>Zytoskelett</b>		Aktinfilamente und Mikrotubuli
<b>komplexe Membransysteme</b>	kanalikuläres System:	Bestandteil: Arachidonsäure Inhalt: u.a. TF (53)
	dichtes Tubulussystem (DTS):	Bestandteile: COX, Thromboxan-Synthetase, cycloAMP Inhalt: v.a. Ca <sup>2+</sup>

Referenzen: (40, 42, 47, 49)

**Tabelle 4: Übersicht der thrombozytären Zellmembranbestandteile**

<b>Membranbestandteile</b>	<b>Funktion</b>
<b>GPIb-V-IX</b>	vWF-Rezeptor
<b>GPIb-IX</b>	Ko-Rezeptor für PARs (Protease-aktivierte Rezeptoren; v. a. aktiviert durch Serinproteasen wie Thrombin)(54)
<b>PAR1, PAR4</b>	Thrombin-Rezeptoren
<b>GPIa-IIa</b>	Kollagen-Rezeptor
<b>GPVI</b>	Kollagen-Rezeptor, Fibrinogen-Rezeptor(45)
<b>GPIIb-IIIa (Integrin <math>\alpha_{IIb}\beta_3</math>)</b>	Fibrinogen-Rezeptor
<b>P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub></b>	ADP-Rezeptoren
<b>P2X<sub>1</sub></b>	ATP-Rezeptor
<b>Thromboxan-Prostanoid-Rezeptor (TP)</b>	TxA <sub>2</sub> -Rezeptor
<b>5HT<sub>2A</sub></b>	Serotonin-Rezeptor
<b>CLEC2</b>	Podoplanin Rezeptor(45)
<b>Phospholipide</b>	Phosphatidylcholin, Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin
<b>Cholesterol</b>	Membranfluidität, Membranstabilität, Signalmodulation
<b>Glykolipide</b>	Zellinteraktion, Signalübertragung

Referenzen: (42, 50, 54-56)

## 2.3 HÄMOSTASE

Zu den zentralen Aufgaben der Hämostase zählen die Aufrechterhaltung des flüssigen Blutzustands, die Blutstillung bei Gefäßverletzungen, der Verschluss des Gefäßendothels sowie die Rekanalisierung des Gefäßes nach Wiederherstellung der Gefäßintegrität durch Fibrinolyse. Die Hämostase umfasst auch die Wundheilung und den Schutz der endothelialen Barriere. (57)

Die blutstillenden/ -gerinnenden Prozesse nach einer Gefäßverletzung bestehen aus einem vaskulären Teil (verletztes Gefäßendothel), einem zellulären Teil (v.a. Thrombozyten, Monozyten, Leukozyten) und einem plasmatischen Teil (Gerinnungsfaktoren), wobei nach traditioneller Einteilung während der primären Hämostase v.a. die Thrombozyten eine große Rolle spielen und es zur vorübergehenden Blutstillung kommt und bei der sekundären Hämostase, die mit der Blutgerinnung gleichzusetzen ist, vor allem der plasmatische Teil agiert. Dieses plasmatische Gerinnungsmodell der Hämostase ist jedoch mittlerweile veraltet und wird von aktuelleren Denkansätzen aus neuen Forschungsergebnissen überholt, da die drei beteiligten Teile - vaskulär, zellulär, plasmatisch - vor allem während der sekundären Hämostase offensichtlich sehr viel enger miteinander agieren als angenommen (57). Nach der Blutgerinnung folgt die Fibrinolyse für die Gefäßrekanalisierung. Kommt es zu Störungen in diesem System, kann dies zu erhöhter Blutungsneigung oder erhöhtem Thromboserisiko führen. (42, S.979)

Normalerweise besteht ein Gleichgewicht von latenter Blutgerinnung und antikoagulativen Prozessen. Die Prozesse laufen ständig nebeneinander her. Zum Beispiel setzt das Gefäßendothel Stickstoffmonoxid und Prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ) sowie Ectonucleotidasen (spalten ADP und ATP) und Thrombomodulin (inaktiviert Thrombin) frei, um die Thrombozytenadhäsion, -aktivierung sowie -aggregation zu hemmen. Dadurch wird die Bildung unerwünschter Thrombozytenaggregate verhindert. (42, (S. 981), 45)

Im Folgenden wird sich auf die ausführlichere Erläuterung der primären und sekundären Hämostase konzentriert.

### 2.3.1 Primäre Hämostase

Kommt es zu einer Verletzung des Gefäßendothels, folgt eine reflektorische, etwa 60 sekundige Gefäßkonstriktion, ausgelöst durch Freisetzung vasokonstriktorischer Triggersubstanzen (Serotonin und Katecholamine) aus den Endothelzellen und den Thrombozyten. Dies resultiert in einer Verlangsamung des Blutflusses, wodurch die nachfolgende zelluläre und plasmatische Blutstillung unterstützt wird. (42, S.979)

Bei Gefäßverletzungen wird die subendotheliale Matrix freigelegt und Thrombozyten können Verbindungen über spezifische Rezeptoren mit Proteinen wie vWF, Thrombospondin 1

## LITERATURDISKUSSION

(TSP-1) und Kollagen eingehen. Dabei legiert sich das thrombozytäre Membran-Glykoprotein GP-Ib-V-IX(57) mit vWF oder TSP-1 und das GP-VI mit Kollagen. Auch CLEC2 (C-type lectin-like receptor 2) scheint ein sehr potenter Thrombozyten-Adhäsionsrezeptor zu sein (58). Thrombozyten adhären so an der verletzten Gefäßwand und dichten das Gefäß zunächst ab. Da dies aber noch sehr instabile Verbindungen sind, könnten diese jeden Moment durch den Blutstrom abreisen. Durch die Adhäsion werden Signalkaskaden in den Thrombozyten ausgelöst, die zu Konformationsänderungen von Oberflächenrezeptoren und zu Pseudopodienbildung der Thrombozyten führen (52). Jetzt können auch die thrombozytären Glykoproteine GP-IIb/IIIa an Fibrinogen binden und GP-Ia/IIa an Kollagen. Das an GP-IIb/IIIa (auf adhärenen Thrombozyten) gebundene Fibrinogen kann dann zirkulierende Thrombozyten über deren GP-IIb/IIIa-Rezeptor binden. Durch diese so entstandenen Fibrinogenbrücken kommt es zur Thrombozytenaggregation. Herrschen sehr starke Scherkräfte in einem Gefäß, ist auch der vWF in der Lage, Thrombozyten über GPIIb/IIIa - vWF - GPIIb/IIIa – Brücken aggregieren zu lassen (59). Gleichzeitig setzen durch Adhäsion aktivierte Thrombozyten den Inhalt ihrer  $\alpha$ - und  $\delta$ -Granula frei (siehe Kapitel 2.2.3, Tabelle 3). Bei diesem Exozytosevorgang werden die Granulamembranproteine entweder auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert (z.B. P-Selektin) oder ins Blutplasma sezerniert. Bei der Sekretion der  $\alpha$ -Granula verschmilzt dessen Membran mit der Plasmamembran und setzt verschiedene Glykoproteine, wie P-Selektin (CD62P) auf der Oberfläche der Thrombozyten frei. P-Selektin und andere aktivierungsabhängige Glykoproteine, darunter CD40L, vermitteln die Bindung der Thrombozyten an neutrophile Granulozyten und Monozyten. (50)

ADP und Serotonin aus den  $\delta$ -Granula, sowie die unabhängig von den Granula sezernierten Thrombozytensubstanzen TxA<sub>2</sub> und PAF (platelet-activating factor) (60) übernehmen die Aufgaben der autokrinen Stimulierung, sowie der Aktivierung und Rekrutierung weiterer Thrombozyten. Die aus den  $\alpha$ -Granula sezernierten Gerinnungsfaktoren (FV, FVII, FXI, FXII) beschleunigen die Blutgerinnung, wohingegen sezernierte Wachstumsfaktoren und Zytokine die Wundheilung fördern. (50)

Werden Thrombozyten in erhöhtem Maße aktiviert (z.B. simultan durch Thrombin und Kollagen), können sie zusätzlich gerinnungsaktive Mikropartikel abschnüren (52). Diese Mikropartikel exprimieren dann von Thrombozyten stammende Glykoproteine wie u.a. GPIIb/IIIa (CD41/CD61) und Aktivierungsmarker wie P-Selektin (CD62P) (61, 62). Außerdem enthalten sie neben den aktiven Enzymen wie Cyclooxygenase-1 (COX-1) und 12-Lipoxygenase (ALOX12) auch Gerinnungsfaktoren und Immunmediatoren (61, 62). Thrombozytären Mikropartikeln werden laut einigen Studien eine wichtige Rolle bei der Hämostase, der Entstehung von Thrombosen, bei kardiovaskulären Erkrankungen und bei Autoimmunprozessen sowie der Krebsentwicklung zugesprochen (61).

## 2.3.2 Sekundäre Hämostase

Als sekundäre Hämostase bezeichnet man die eigentliche Blutgerinnung. Sie dient der Stabilisierung des zuvor während der primären Hämostase entstandenen instabilen Thrombus. Aus didaktischen Gründen wird die sekundäre Hämostase teils noch nach dem Modell von Paul Morawitz (42) in zwei unterschiedliche Aktivierungswege und Enzymkaskaden eingeteilt, den extrinsischen und intrinsischen Weg, die beide am Ende in einer gemeinsamen „Endstrecke“ münden über die Aktivierung des Gerinnungsfaktors X (FX) und Bildung des Prothrombinase-Komplexes, welcher der Thrombingenerierung dient. TF ist das entscheidende Protein, das die Hauptrolle in der Initiierung des extrinsischen Signalweges spielt (Initiierungsphase), wobei die Amplifizierung (Verstärkungsphase) den intrinsischen Weg benötigt.

Der extrinsische Weg startet mit dem Transmembran-Rezeptor TF in Verbindung mit dem Gerinnungsfaktor FVIIa. Der intrinsische Weg startet *in vitro* durch hydrophile Oberflächen, *in vivo* durch den autoaktivierten FXIIa (bzw. getriggert durch Kollagen, Polyphosphate oder „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs) (57)), der Präkallikrein zu Kallikrein umwandelt und so eine Gerinnungskaskade auslöst, bei der nacheinander die Gerinnungsfaktoren FXI, IX, FX und Prothrombin aktiviert werden.

Heutzutage wissen wir, dass die beiden Wege nicht unbedingt als getrennt angesehen werden können, da viele Interaktionen stattfinden und letztlich unter physiologischen intravasalen Bedingungen nur ein durch TF initiierten Aktivierungsweg der plasmatischen Gerinnung existiert. Daher teilt ein aktuelleres Hämostase-Modell, das zellbasierte Modell (ursprünglich beschrieben von Douglas Monroe (63, 64)), die Blutgerinnung (sekundäre Hämostase) in drei Phasen auf. Eine Phase der Initiierung, eine Verstärkungsphase und eine Vermehrungsphase. (57, 65)

### 2.3.2.1 Initiierungsphase

Eine entscheidende Rolle in der Initiierung der Blutgerinnung spielt das Protein „tissue factor“ (TF, Gewebefaktor). TF ist auch als Thromboplastin, CD142 oder Gerinnungsfaktor III bekannt (42(S.981), 57). Außerdem ist TF der einzige Gerinnungsfaktor, der ein integrales Membranprotein mit einer extrazellulären, transmembranären und cytosolischen Domäne darstellt (42, S.984). Er liegt aber auch in löslicher Form als eine Spleißvariante im Blut vor (66, 67).

Physiologisch ist der TF auf blutgefäßumgebenden Zellen zu finden, zudem wird er auch auf jeweils aktivierten Endothelzellen, Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten exprimiert, z.B. bei Entzündungsprozessen (40). Thrombozyten besitzen sogar zwei TF-Quellen: ihre abgeschnürten Mikropartikel nach Thrombozytenaktivierung und ihr de-novo-synthetisiertes TF. Diese Quellen dienen der Initiierung und auch der Verstärkung (s.u.) der Gerinnungskaskade. (48)

Bei einer Gefäßverletzung können durch die Freilegung des Subendothels die TF-tragenden Fibroblasten sowie TF-tragenden glatten Muskelzellen mit dem Blut in Kontakt treten (57, 64). Faktor VIIa bindet an den TF auf den Zellen, aktiviert die Gerinnungsfaktoren IX und X, FXa bildet mit FVa den sogenannten Prothrombinase-Komplex auf TF-präsentierenden Zellen. Dieser Prothrombinase-Komplex dient der Umwandlung von Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) (57, 64). Da sich im Plasma Inhibitionskomplexe wie der „Tissue Factor Pathway Inhibitor“ (TFPI) und Antithrombin befinden, wird die Diffusion von FXa zu anderen Zellmembranen, um weitere Prothrombinase-Komplexe bilden zu können, verhindert und damit die lösliche FXa-Menge sowie letztlich die Thrombinmenge noch geringgehalten (57).

### **2.3.2.2 Verstärkungsphase**

Diese in der Initiierungsphase generierte Thrombinmenge reicht nicht aus, um genügend Fibrin und einen stabilen Thrombus zu formen, jedoch können die kleinen Thrombinmengen durchaus weitere Thrombozyten sowie die Gerinnungsfaktoren V, VIII und XI aktivieren (63, 68). (40)

### **2.3.2.3 Amplifikationsphase**

Für die Stabilisierung des während der primären Hämostase entstandenen Thrombozytenaggregats ist die genügende Fibrinbildung unerlässlich. Dafür müssen zuerst große Mengen an Thrombin generiert werden. Dies geschieht durch koordinierte rezeptorvermittelte Bindungen von Gerinnungsfaktoren auf der Thrombozytenoberfläche. (46) Nachdem TF-tragende Zellen Thrombin gebildet und dieses dann weitere Thrombozyten aktiviert, kommt es auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten, durch deren Oberflächenpräsentation von prokoagulantem Phospholipiden (Phosphatidylserin (69)), zur koordinierten Anlagerung des Tenase- und Prothrombinase-Enzymkomplexes. Der Tenase-Komplex, bestehend aus FIXa/FVIIIa, katalysiert die Aktivierung des FX. Jetzt kann sich der Prothrombinase-Komplex aus FXa/FVa zusammenlagern und die Reaktion von Prothrombin zu Thrombin katalysieren, sodass es in kurzer Zeit zu einer massiven Thrombingenerierung („Burst“) auf der Thrombozytenoberfläche, also nur am Ort der Verletzung, kommt. (40, 57)

Thrombin spaltet Fibrinogen in Fibrinmonomere, welche polymerisieren und als Fibrinpolymere durch Faktor XIIIa quervernetzt werden (70). Dies führt zur explosionsartigen Fibrinbildung in Thrombozytenaggregaten, ausreichend für die Bildung eines stabilen Fibrinnetzes, welches letztlich zum Wundverschluss führt. (40)

## 2.4 THROMBOZYTEN-AGONISTEN

### 2.4.1 Physiologische Thrombozyten-Agonisten

Die in den folgenden Unterkapiteln beschriebenen löslichen Agonisten Thrombin, ADP, TxA<sub>2</sub> und Adrenalin stimulieren die Thrombozyten direkt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Unter normalen Umständen steht keiner dieser Agonisten für zirkulierende Blutplättchen in ausreichender Konzentrationen zur Verfügung. (71)

#### 2.4.1.1 Thrombin

Als Thrombin bezeichnet man den Gerinnungsfaktor IIa, dessen Synthese durch TF initiiert wird (siehe Kapitel 2.3.2.1). Mithilfe des auf der Thrombozytenoberfläche befindlichen Prothrombinase-Komplexes aus Faktor Xa und Va wird Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) gespalten. Thrombin ist eine proteolytisch aktive Serin-Protease, welche durch Abspaltung von zwei kleinen Peptiden die Reaktion von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert und somit zur Bildung eines stabilen Thrombozytenaggregats beiträgt. (60)

S. R. Coughlin beschrieb in seinem Review von 2005 (72), dass Thrombin eine Vielzahl an Reaktionen in anderen Zellen auslöse. Es bewirke zum einen die Aktivierung der Thrombozyten, also dessen Formveränderungen, Sekretionsmechanismen, die Mobilisierung von P-Selektinen und CD40 Liganden auf die Membranoberfläche und die Aktivierung des Membranintegrins GPIIb/IIIa. In kultivierten Endothelzellen bewirke Thrombin die Freisetzung von vWF, Produktion von Chemokinen und auch die P-Selektin-Mobilisierung an dessen Membranoberfläche. Außerdem kann Thrombin bei Gefäßverletzungen über die glatten Muskelzellen eine Vasokonstriktion auslösen und vieles mehr. (72)

Wie bereits von S. R. Coughlin beschrieben, fungiert Thrombin als hochpotenter Thrombozytenaktivator (72). Dafür bindet Thrombin an thrombozytäre Rezeptoren und spaltet einen kleinen Teil davon ab (60), damit eine Signalkaskade ins Zellinnere ausgelöst und die Thrombozyten aktiviert werden. Zu diesen humanen Thrombozyten-Rezeptoren zählen die Protease-aktivierenden Rezeptoren PAR1 und PAR4. Die Protease-aktivierenden Rezeptoren (PAR) sind G-Protein-gekoppelt (Gq, G12/G13, PAR1 ist auch Gi-gekoppelt (55, 72, 73)) und spielen eine wichtige Rolle bei Hämostase, Thrombose und auch bei entzündlichen Geschehen (72). Thrombin bindet an PAR und spaltet irreversibel dessen N-terminale extrazelluläre Domäne ab, sodass ein neues N-terminales Ende entsteht, welches als intramolekularer Selbstligand an PAR bindet und es zur Konformationsänderung von PAR kommt, wodurch transmembranäre Signalkaskaden ausgelöst werden (72). PAR4 benötigt zur Aktivierung höhere Thrombinkonzentrationen als PAR1 (55, 74, 75).

Außerdem kann Thrombin seine eigene Produktion durch autokrine Stimulierung über die Bindung an die Untereinheit GPIb $\alpha$  des Komplexes GP-Ib-IX-V auf der Thrombozytenoberfläche initiieren und verstärken (76). Die Bindung über GPIb $\alpha$

## LITERATURDISKUSSION

(Ko-Rezeptor für PARs) beschleunigt die Proteolyse und Aktivierung von thrombozytären PAR1 (77, S.252). Es ist zudem möglich, dass GPIIb/IIIa als direkter oder indirekter Kofaktor für PAR4 fungiert (77, S.252).

Die Ergebnisse von Brian Estevez *et al.* (54) zeigten ebenfalls eine enge Kooperation zwischen den GPIIb/IIIa und PARs-Signalwegen. Das GPIIb/IIIa Glykoprotein bindet hochaffin an Thrombin. Es konnte gezeigt werden, dass gerade bei niedrigen Thrombinkonzentrationen das Vorhandensein von und damit die Bindung an GPIIb/IIIa und die Kooperation mit den PARs Signalwegen für die Thrombozytenaktivierung unerlässlich sei, und damit auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Thrombosen spiele.

Thrombin aktiviert zudem die Gerinnungsfaktoren FV, FVIII, FIX (78, S.743), FXI und FXIII. FVa kann dann die Prothrombinaseaktivität als Cofaktor verstärken, damit noch mehr Thrombin gebildet wird. Der Gerinnungsfaktor FVIIIa wirkt als Kofaktor von FIXa und bildet den sogenannten Tenasekomplex auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten, der die Bildung von FXa katalysiert und somit die Thrombusbildung weiter beschleunigt. Der von Thrombin aktivierte Gerinnungsfaktor FXIa wandelt auch FIX in FIXa um. Zum Ende der Gerinnungsphase katalysiert der Thrombin-aktivierte FXIIIa die Bildung kovalenter Vernetzungen zwischen benachbarten Fibrinketten, um ein elastisches, polymerisiertes Fibrin-Gerinnel zu erhalten (79). (57)

All diese durch Thrombin bedingten Reaktionen und die Thrombingenerierung selbst findet auf der thrombozytären Zelloberfläche statt (72).

Freies, im Kreislauf zirkulierendes Thrombin hingegen ist sehr kurzlebig und bindet Thrombomodulin auf anormalem Endothel. Dadurch verändert Thrombin seine Spezifität und kann das Protein-C-System aktivieren, sodass FVa und FVIIIa abgebaut und damit die Blutgerinnung gehemmt wird. (60, 72)

### 2.4.1.2 ATP, ADP

Die Nukleotide Adenosindi (ADP)- und Adenosintriphosphat (ATP) werden u.a. aus zerstörten Erythrozyten (80) sowie aus den  $\delta$ -Granula aktivierter Thrombozyten freigesetzt und wirken als sogenannte „sekundäre Agonisten“, da sie zwar nicht die primäre Thrombozytenaktivierung initiieren, aber als Reaktion darauf ausgeschüttet werden, um die Aktivierung weiterer Blutplättchen in unmittelbarer Umgebung zu verstärken (50).

ADP ist ebenso ein Beispiel für einen sogenannten "schwachen" Agonisten, der von sich aus nur eine geringe Sekretion und eine submaximale GPIIb/IIIa-Aktivierung fördert und als alleiniger Agonist nur eine reversible Aggregation auslöst. Sobald jedoch nach Stimulation der Thrombozyten durch andere Agonisten vermehrt ADP aus den  $\delta$ -Granula freigesetzt wird, verstärkt ADP die Aktivierungsreaktion der Thrombozyten durch Bindung an purinerge Rezeptoren und ermöglicht so die Bildung stabiler Thrombozytenaggregate. (77, 81)

## LITERATURDISKUSSION

Dabei interagiert ADP mit den purinergen Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>. Der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor ist Gq-gekoppelt, wodurch bei Stimulierung die Phospholipase C-β aktiviert (PLC-β) wird. Die PLC-β katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>), wobei zusätzlich Diacylglycerol (DAG) entsteht (73). IP<sub>3</sub> führt zu einer enormen Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung aus dem dichten Tubulussystem und DAG führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (73). Die PKC führt u.a. zur Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors (α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>) (82). Durch all diese Reaktionen kommt es zur thrombozytären Formveränderung („shape change“ mit Pseudopodienbildung) und transienten (reversiblen) Aggregation. (50, 71, S.451)

Der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor hingegen ist Gi-gekoppelt. Bei Aktivierung kommt es zur Hemmung der Adenylatzyklase (83), zur Senkung des zyklischen AMP (cAMP), zur Stimulierung des PI3K-Weges und schließlich auch zur Verlängerung des Anstiegs des thrombozytären cytosolischen Ca<sup>2+</sup> (71, S.451). Außerdem steigert ADP über den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor die Thrombingenerierung (84, 85) und aktiviert den GPIIb/IIIa-Rezeptor, was wiederum zur Plättchenaggregation führt (83, 86).

Die Thrombozytenaktivierung durch freigesetztes ADP wird durch dessen enzymatische Umwandlung in inaktives Adenosinmonophosphat (AMP) durch endotheliale Ekto-ADPase/CD39 begrenzt (50).

Marina Panova-Noeva *et al.* demonstrierten, dass durch den ADP-Stimulus ET-Patienten, vor allem die JAK2V617F-mutierten sowie die mit ASS therapierten, mit einer pathologisch hohen Aggregationsantwort sowie einer vermehrten Thrombinbildung der Thrombozyten im Gegensatz zu gesunden Kontrollprobanden reagieren (80).

ATP dient vorerst der Energieübertragung. Als Spaltprodukt entsteht dabei ADP, was wiederum als Thrombozytenagonist fungiert (42). An den P2Y-Rezeptoren auf humanen Thrombozyten wirkt ATP kompetitiv antagonistisch zu ADP (87). Allerdings ist ATP der einzige Agonist des P2X<sub>1</sub>-Rezeptors. Hierbei handelt es sich um einen ligandengesteuerten Ionenkanal, bei dessen Aktivierung es zum massiven Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Thrombozyten kommt. Für sich allein hat dies keine ausgeprägte Wirkung, daher wird dem P2X<sub>1</sub>-Rezeptor eher eine unterstützende und beschleunigende Funktion der Signalwege anderer Thrombozyten-Agonisten zugeschrieben. (71, S.908)

### 2.4.1.3 Thromboxan A<sub>2</sub>

Bei Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) handelt es sich um ein Arachidonsäurederivat, ein Eicosanoid. Die Arachidonsäure ist integraler Bestandteil vieler biologischer Zellmembranen und wird bei Bedarf durch Phospholipasen [v.a. die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)], aus den Membranen herausmobilisiert und für die Bildung von Eicosanoiden (Thromboxan, Prostaglandine und Leukotriene) umgebaut. (78, S.14, S.627)

## LITERATURDISKUSSION

TxA<sub>2</sub> wird an der Thrombozytenmembran aus Arachidonsäure mithilfe der Cyclooxygenase (COX1) und Thromboxan-Synthetase (aus dem dichten Tubulussystem der Plättchen) über das Zwischenprodukt Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) gebildet. Bei Thrombozytenaktivierung wird das TxA<sub>2</sub> dann Granula-unabhängig freigesetzt. (50, 60)

Im Labor kann mit Hilfe des Agonisten Arachidonsäure der eben beschriebene Eikosanoid-Syntheseweg getestet und mögliche Störungen aufgedeckt werden (88).

Das sezernierte TxA<sub>2</sub> bindet an seine Gq- und G12/G13-gekoppelten (73) Thromboxan-Prostanoid-Rezeptoren (TP $\alpha$ , TP $\beta$ ) und potenziert stimulierende Prozesse (50, 60). Durch die darauffolgende Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa wird ein aggregationsförderndes Signal vermittelt (60, 89). Zusammen mit dem thrombozytär sezernierten ADP verstärkt TxA<sub>2</sub> die Aktivierung weiterer Thrombozyten; es fördert also die Thrombozytenaggregation und die Entleerung der Thrombozytengranula (60). Zusammen mit Serotonin wirkt TxA<sub>2</sub> zusätzlich vasokonstriktorisch (60).

Der Stimulationsweg des TxA<sub>2</sub> ist hingegen nicht essentiell für die Thrombozyten-Aktivierung, -Sekretion oder -Aggregation (50). Daher hemmt die Blockierung dieses Weges durch Acetylsalicylsäure (COX-Inhibitor), TxA<sub>2</sub>-Rezeptor-Inhibitoren oder TxA<sub>2</sub>-Synthase-Inhibitoren die Thrombozytenaktivierung auch nicht vollständig (50).

### **2.4.1.4 Adrenalin**

Adrenalin (Epinephrin) stimuliert die Blutplättchen über Bindung an G $\alpha$ -gekoppelte  $\alpha_{2A}$ -Rezeptoren (73). Der Adrenalin-Signalübertragungsweg teilt sich eine gemeinsame Endstrecke mit dem durch ADP stimulierten P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Signalwegs. Dies könnte erklären, weshalb P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Inhibitoren (Ticlopidin, Clopidogrel) bei der antithrombotischen Therapie ischämischer arterieller Gefäßerkrankungen nicht so erfolgreich sind wie erhofft. (50)

### **2.4.1.5 Kollagen (Adhäsionsprotein)**

Adhäsionsproteine stimulieren Thrombozyten über Quervernetzungen, "Clustering" von spezifischen Rezeptoren und nachfolgender Tyrosinkinase-abhängiger Signaltransduktion (46).

Kollagen ist das häufigste Protein in unserem Körper und auch das wichtigste in der extrazellulären Matrix. Kollagene sind die Strukturproteine des Bindegewebes und zählen zur Gruppe der Glykoproteine. Bisher sind 20 verschiedene Kollagentypen bekannt. Jedoch ist dessen Aufbau im Prinzip immer der gleiche. Drei linksgängige Kollagen- $\alpha$ -Ketten lagern sich zu einer rechtsgängigen Tripelhelix zusammen. Die Art der Kollagen- $\alpha$ -Ketten und die Kombination der Zusammenlagerungen derer ergibt die unterschiedlichen Kollagentypen. Die größte Gruppe innerhalb der Kollagene bilden die fibrillären Kollagene mit den Typen I, II, III, V und XI. Die Fibrillen entstehen durch eine Zusammenlagerung der Tripelhelices, welche durch Schiff-Basen quervernetzt sind und ein sehr stabiles Konstrukt bilden. (78, S.396 f.)

## LITERATURDISKUSSION

Freigelegtes Kollagen in der subendothelialen Matrix eines verletzten Gefäßes kommt in Kontakt mit Thrombozyten und wechselwirkt mit ihnen über zwei verschiedene Mechanismen: die indirekte Bindung an die Thrombozytenoberfläche über intermediäre Proteine sowie die direkte Erkennung von Kollagenrezeptoren. Beispielsweise bindet Kollagen indirekt brückenbildend über den vWF, den GP Ib/V/IX-Komplex oder den aktivierten GP IIb/IIIa-Komplex an die Thrombozyten. Für die Bindung direkt an Kollagenrezeptoren der Thrombozyten werden verschiedene Membranproteine vorgeschlagen: mitunter GPIa/IIa, GPIIb/GPIV (CD36) sowie GPVI. (90)

GP-VI ist der wichtigste Aktivierungsrezeptor für Kollagen (90). Auf Thrombozyten bildet er einen Komplex aus zwei GPVI-Rezeptoren, die über deren FcRy-Kette dimerisieren (91). Die Thrombozytenaktivierung über die GPVI-Kollageninteraktion ist eine einzigartige Reaktion, die sich von den Aktivierungswegen anderer Thrombozytenrezeptoren unterscheidet (91).

Jurk *et al.* fassen in ihrem Paper 2005 (50) den genauen Aktivierungssignalweg von Kollagen über GP-VI zusammen. Kollagen bindet dabei an die Fc-Rezeptor- $\gamma$  (FcRy) Kette des GP-VI. Dies führt zur Phosphorylierung des „Immunrezeptor-Tyrosin-basierten Aktivierungsmotivs“ (ITAM) der FcRy Kette durch die Src-Tyrosinkinase Lyn und Fyn mit nachfolgender Bindung und Aktivierung der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Syk. Das wiederum führt zur Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2), zur nachfolgenden IP $_3$ -Synthese und dann zu ähnlichen Prozessen, wie sie bei Gq-gekoppelten Rezeptoren ablaufen (50). Infolgedessen kommt es zu Konformationsänderungen der Rezeptoren GP-IIb/IIIa (bindet Fibrinogen, vWF oder Kollagen(90)) und GP-Ia/IIa (bindet Kollagen), wodurch die Thrombozytenformveränderung und –ausbreitung gefördert wird (46, 50).

Eine Kollagenfibrille hat mehrere Bindungsstellen, um mehrfach GP-VI binden zu können. Dadurch „clustert“ Kollagen die Rezeptoren, es kommt also zu Quervernetzungen auf der Thrombozytenmembran, welche die aktivierenden Signalkaskaden auslösen über ITAM-Sequenzen. (40, 46)

Studien haben gezeigt, dass Kollagen Typ I und III (welcher in der Gefäßintima und –media, sowie in atherosklerotischen Plaques vorkommt) (92) zu den stärksten Plättchen-aktivierenden Substanzen gehören (93).

### **2.4.1.6 von-Willebrand-Faktor (Adhäsionsprotein)**

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) wird überwiegend von Endothelzellen, aber auch aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten freigesetzt. Er kann sowohl frei im Plasma vorliegen, wie auch an Kollagen gebunden in der extrazellulären Matrix. Dort fungiert er als Adapterprotein [adhäsives Glykoprotein (42, S.977)] und bindet mit seiner A1 Domäne an GPIb $\alpha$  des GPIb-IX-V Thrombozyten-Rezeptor-Komplexes (77, S.400) sowie an GPIIb/IIIa. Dadurch kommt es zur Adhäsion der Thrombozyten an die subendotheliale Matrix. Außerdem stabilisiert der vWF den FVIII im Plasma durch Bildung eines großen Proteinkomplexes. Kommt es zu einem Defekt oder Mangel des vWF, so spricht man vom sogenannten

Von-Willebrand-Syndrom, bei dem es sich um die häufigste angeborene Gerinnungsstörung handelt. (60, S.700f.)

### **2.4.2 weitere Thrombozyten-Agonisten**

#### **2.4.2.1 TRAP-6**

Das Thrombin-Rezeptor-Aktivierungs-Peptid 6 („thrombinreceptor activating peptide“, TRAP-6) ist ein synthetisch hergestelltes Hexapeptid, welches die Struktur und Funktion von Thrombin nachahmt. Es entspricht einer Aminosäuresequenz, die durch den von Thrombin gespaltenen Thrombinrezeptor PAR1 (Protease-aktivierter Rezeptor) (55) freigelegt wird. Diese Spaltung, durch die ein neuer N-Terminus entsteht, ist notwendig, um einen neuen Liganden zu kreieren, der den PAR1 dann intramolekular bindet und aktiviert (94). TRAP-6 enthält die ersten 6 Aminosäuren Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn des durch normalerweise Thrombin neu gespaltenen N-Terminus von PAR1. Ein anderes synthetisch hergestelltes Peptid ist das TRAP-14, welches die ersten 14 Aminosäuren des N-Terminus enthält. (95)

Die TRAPs sind in der Lage, Aggregation und Sekretion durch ähnliche Mechanismen wie Thrombin zu induzieren (94). Dies geschieht jedoch nicht in vollem Ausmaß, da die TRAPs nur PAR1 binden können, wohingegen Thrombin auf humanen Thrombozyten die Rezeptoren PAR1 und PAR4 bindet und spaltet, an GPIIb $\alpha$  bindet und auch noch weitere Gerinnungsfaktoren aktivieren kann (57, 72, 76).

Lit-Fui Lau *et al.* fassten in ihrem Paper zusammen, dass TRAP-6 und -14 (genauso wie Thrombin auch) eine mitogene Aktivität haben, die Wundheilung stimulieren und auch ähnliche Wirkungen auf die Endothel- und Muskelzellen sowie humane Monozyten haben. Wenn allerdings im gleichen System durch Antagonisten oder ASS-Gabe die Konzentrationen von ADP und TxA<sub>2</sub> reduziert wurden, traten durchaus Unterschiede zwischen den TRAPs und Thrombin auf. TRAPs waren weniger effizient in ihren Wirkungen: sie konnten keine so großen irreversiblen Thrombozytenaggregate auslösen; sie verursachten eine zu geringe Oberflächenexpression des aktivierten Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa als für die Aggregation eigentlich notwendig und produzierten nicht so große und langanhaltende intrazelluläre Signale wie Thrombin. Es resultierte keine volle Aggregation durch die TRAPs. (95)

Setzt man TRAP als Thrombozytenagonist im Labor ein, kann eine Störung im PAR1-Signalweg oder im PAR1 selbst aufgedeckt werden.

#### **2.4.2.2 Convulxin**

Das Protein Convulxin wurde erstmals 1981 von Prado-Franceschi und Vital Brazil aus dem Toxin der Klapperschlange *Crotalus durissus terrificus* isoliert. Es zählt zur Familie der C-Typ-Lektine (96). Convulxin besitzt eine heterodimere Struktur, da es aus zwei über

## LITERATURDISKUSSION

Disulfidbrücken miteinander verbundenen Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) besteht, welche den Komplex  $\alpha_3\beta_3$  bilden (97).

Mit hoher Affinität bindet Convulxin an Thrombozyten und wirkt dort als potentes Blutplättchen-aggregierendes Protein (98). Dabei bindet es ausschließlich an den Kollagenrezeptor GPVI (p62) und führt wie Kollagen auch zur „Clusterung“ der Rezeptoren und zu ähnlichen Signalkaskaden in den Thrombozyten (98). Es kommt zur Aktivierung der Phospholipase Cy2 (PLC<sub>γ</sub>2) durch Tyrosin-Phosphorylierung (98). Die PLC führt zum Anstieg von Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>), welches zum Ca<sup>2+</sup>-Anstieg führt, und Diacylglycerin (DAG), welches wiederum die PKC aktiviert (98, 99). Diese Prozesse enden in einer Thrombozytenaktivierung und –aggregation (99).

Convulxin hat sich als ein sehr potenter Thrombozytenagonist herauskristallisiert; es werden nur geringe Mengen benötigt, um eine maximale Aggregation zu induzieren (98).

### 2.4.2.3 Ristocetin

Ristocetin ist ein heute nicht mehr therapeutisch genutztes Antibiotikum. Schon 1971 haben M.A. Howard und B.G. Firkin beobachtet, dass Ristocetin *in vitro* die Thrombozytenaggregation in „Plättchen-reichem-Plasma“ (PRP) induziert (100). Dabei fördert es die Interaktion des vWF mit dem thrombozytären Glykoprotein GPIb (101). *In vitro* nutzt man deshalb gerne Ristocetin, um den Effekt des vWFs zu imitieren und um das Vorhandensein und die Intaktheit des GPIb $\alpha$ -V-IX-Komplexes sowie dessen Interaktion mit dem vWF bzw. Defekte im vWF zu bestimmen (101, 102).

Es ist bekannt, dass Ristocetin sowohl an den vWF bindet, als auch an GPIb und an die Thrombozytenmembranoberfläche (102, S.394).

Howard und Firkin führten ihre Versuche mit einem turbidimetrischen Aggregometer durch; auch heute wird auf diese Weise die Ristocetin-induzierte-Thrombozytenaggregation gemessen. Kommt es zu Beeinträchtigungen der Reaktion auf Ristocetin, kann das eine qualitative oder quantitative Störung des vWF oder GPIb andeuten. Wenn nur hohe Ristocetin-Konzentrationen eine Thrombozytenaggregation auslösen, kann dies zum einen auf ein Bernard-Soulier-Syndrom (Defekt/Mangel an GPIb $\alpha$ -V-IX) oder auf ein schweres von-Willebrand-Jürgens-Syndrom (vWD; Defekt/Mangel an vWF) hinweisen. Alternativ kann eine verstärkte Reaktion auf Ristocetin auf ein vWD Typ 2B (Defekt des vWF) oder auf einen thrombozytären (Pseudo-) vWD (Defekt von GPIb $\alpha$ -V-IX) hindeuten. (102)

## 2.5 MONONUKLEÄRE ZELLEN UND WECHSELWIRKUNGEN MIT THROMBOZYTEN

Die mononukleären Zellen (MNC) des peripheren Blutes setzen sich aus allen Zellen mit einem runden Zellkern zusammen: Lymphozyten (B-, T- und Natürliche Killer [NK] - Zellen), Monozyten und dendritische Zellen. All diese Zellen gehören der übergeordneten Gruppe der Leukozyten an. Die Lymphozyten nehmen dabei einen Anteil von 70 - 90 %, die Monozyten von 10 - 20 % und die dendritischen Zellen von nur 1 - 2 % ein. Zentrifugiert man das humane Vollblut mit einem Antikoagulant (z.B. Citrat), so befinden sich die Monozyten - auf welche in dieser Arbeit ein besonderer Fokus gelegt wird - innerhalb des sogenannten „buffy coats“, ein dünner Leukozytenfilm, der sich zwischen den roten Blutkörperchen und dem hellen Plasma gebildet hat (siehe Kapitel 3.7, Abbildung 1). (103)

Monozyten zirkulieren im peripheren Blut und sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie stammen ursprünglich aus dem Knochenmark und werden ständig ins Blut abgegeben. Sie sind die Vorläuferzellen von dendritischen Zellen und der ins Gewebe diffundierten und differenzierten Makrophagen, welche im Gewebe verschiedenste Funktionen der Immunabwehr ausüben (v.a. Phagozytose). (67, 104)

Bernd Engelmann und Steffen Massberg führten 2013 den Begriff Immunothrombose ein, welcher das Zusammen- und Wechselspiel des angeborenen Immunsystems mit dem Gerinnungssystem verdeutlichen sollte (105). Letztlich diene dies der intravaskulären Immunabwehr, da Krankheitserreger besser erkannt und deren Eindringen bzw. Verbreitung im Gewebe verhindert werden (105).

Die Verbindung des angeborenen Immunsystems mit dem Gerinnungssystem besteht darin, dass Leukozyten - speziell Monozyten, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten (keine MNC) - unter besonderen Bedingungen eine phänotypische Transformation durchlaufen und TF exprimieren, sowie proinflammatorische und prokoagulante Substanzen produzieren und ausschütten können (106). Hierbei exprimieren die Neutrophilen TF viel eher durch die Aufnahme von Mikropartikeln und synthetisieren diesen nicht selbst (48).

Zu solchen sogenannten besonderen Bedingungen zählen entzündliche Geschehen (auch steril) oder Gefäßverletzungen. Die Leukozyten reagieren zum einen auf die Einleitung von Gerinnungsprozessen und zum anderen auf entzündliche extrazelluläre Stimuli wie IL-1, IL-2, IL-6, Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Lipopolysaccharide und C-reaktives Protein (CRP) (67). (107)

Monozyten sind die größte intravaskuläre Quelle für TF (67, 108). Sie exprimieren physiologisch eine geringe Menge und in aktiviertem Zustand große Mengen an TF auf ihrer Oberfläche (106). So wirken sie maßgeblich an der Thrombingenerierung und damit an der Aktivierung, Adhäsion und Thrombusformation von Thrombozyten sowie an der Aktivierung der sekundären Hämostase mit (106). Monozyten sind dadurch wichtige Mitspieler bei der

## LITERATURDISKUSSION

Thrombusbildung, Wundheilung, bei chronischen Entzündungen, Krebs, Atherosklerose, Thrombosen oder an disseminiert intravasalen Koagulationen (DIC) bei Sepsis (109).

Obwohl die Leukozytenaktivierung die Hämostase maßgeblich beeinflusst, können andersherum auch aktivierte Thrombozyten und aktive Gerinnungsfaktoren die prokoagulante und proinflammatorische Aktivität von Leukozyten verstärken (106). Aktivierte Thrombozyten sind aufgrund ihrer P-Selektin-Präsentation auf der Oberfläche maßgeblich an der Aktivierung von Monozyten beteiligt (109). Denn Glykoproteine wie P-Selektin (CD62P) sind ausschließlich auf der Membran der  $\alpha$ -Granula in ruhenden Thrombozyten lokalisiert. Bei der Granulasekretion bei Thrombozytenaktivierung verschmelzen die Granulamembran mit der Thrombozytenmembran, wodurch P-Selektin nun auf der Thrombozytenoberfläche freiliegt. Diese P-Selektine binden an den Leukozytenrezeptor P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) (67), der sich auch meist auf den von den Leukozyten abgeschnürten TF-tragenden Mikropartikeln befindet (48), und vermitteln zusammen mit anderen aktivierungsabhängigen Glykoproteinen (z.B. CD40L) die Bindung der Thrombozyten an Monozyten und neutrophile Granulozyten und führen so auch zur Hochregulierung der TF-Expression auf Monozyten (110). (50, 111)

Zusätzlich fördert diese Monozyten-Thrombozyten-Aggregatbildung auch die Expression von CD11b/CD18 (Mac-1) auf Monozyten, was wiederum die Interaktionen mit Thrombozyten über Fibrinogen, welches Mac-1 mit dem thrombozytären Glykoprotein IIb/IIIa verbindet, erleichtert (67, 112).

Auch das generierte Thrombin auf der Thrombozytenoberfläche wirkt chemotaktiv auf Monozyten (113), indem es u.a. an deren PAR1-Rezeptoren bindet (106). Durch Spaltung des G-Protein-gekoppelten PAR1 läuft in den Monozyten der Phospholipase A2-Signalweg ab, der die Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und AP-1 aktiviert (109). Sie sorgen für die Regulation der TF-Expression auf Monozyten (109). Außerdem wird durch Thrombin über den PAR-Signalweg die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-6 und der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha(TNF- $\alpha$ ), initiiert (106, 114).

Kommt es zu einer verstärkten Aktivierung der Thrombozyten, z.B. durch die Kombination aus Kollagen und Thrombin, so können sie **Mikropartikel** abschnüren (52). Die Mikropartikel vermitteln u.a. eine Wechselwirkung von Leukozyten untereinander sowie von Leukozyten mit dem Gefäßendothel (40, 46). Leukozyten (Monozyten und Granulozyten) lagern sich an ein entstandenes Thrombozytenaggregat an (52). Ob dies der Begrenzung des Thrombus oder der Vergrößerung dient ist bisher nicht erforscht (52).

ET-Patienten haben erhöhte Level an Monozyten-Thrombozyten-Aggregaten (67).

Auch während eines Entzündungsprozesses im vaskulären System können sowohl Thrombozyten als auch Endothelzellen sowie Monozyten aktiviert werden und TF auf ihrer

## LITERATURDISKUSSION

Oberfläche exprimieren (52). Beispielsweise bindet das CRP an den Monozyten-Rezeptor FcγRIIa (CD32), woraufhin CD40-Rezeptoren exprimiert werden. CRP und der CD40-Ligand induzieren letztlich die TF-Expression in Monozyten (67). Auf Monozyten bildet der TF auch einen Komplex mit FVIIa und kann FX binden und aktivieren. Thrombozyten oder deren sezernierte Mikropartikel lagern sich an die TF-exprimierenden Zellen an und so wird ein ursprüngliches Entzündungsgeschehen mit Gerinnungs- und Thromboseprozessen verknüpft. (52, 67)

Darüber hinaus unterstützen Leukozyten im Blut die Aufrechterhaltung des Blutflusses. Ruhende Monozyten beispielsweise exprimieren die Antikoagulanzenfaktoren endothelialer Protein-C-Rezeptor (EPCR), Thrombomodulin (TM) und Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (TFPI). (106)

Auch bei der Thrombusrekanalisation spielen Monozyten eine wichtige Rolle. Sie dringen in das Innere des Thrombus ein, phagozytieren Thrombusbestandteile und initiieren die Thrombolyse, indem sie u.a. das „Monozyten chemotaktische Protein“ MCP-1 sezernieren, um weitere Monozyten an den Thromboseherd zu rekrutieren und zur Organisation sowie Auflösung von Venenthromben beizutragen. Monozyten sind in der Lage, Fibrin abzubauen sowie die Neovaskularisierung des Thrombus zu veranlassen. (67)

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Materialien wie Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien in Tabellen aufgelistet, das Studiendesign näher erläutert und die verwendeten Methoden Lumi-Aggregometrie sowie das „Calibrated Automated Thrombinoscope“ genauer beschrieben.

#### 3.1 GERÄTE

Tabelle 5: Eingesetzte Geräte und deren Hersteller

Gerät	Typ	Firma
<b>Automatisches Hämatologie-Analysegerät</b>	Sysmex KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Hamburg
<b>Kolbenhub-Einkanalpipetten</b>	Research <sup>®</sup> Plus, variabel 0,1-2,5 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling
	Research <sup>®</sup> Plus, variabel 0,5-10 µl	
	Research <sup>®</sup> Plus, variabel 2-20 µl	
	Research <sup>®</sup> Plus, variabel 10-100 µl	
	Research <sup>®</sup> Plus, variabel 20-200 µl	
	Research <sup>®</sup> Plus, variabel 100-1000 µl	
<b>Magnetrührer</b>	NeoMag D-6010	neoLab <sup>®</sup> , Heidelberg
<b>Lumi-Aggregometer</b>	Chrono-Log-Aggregometer, Model 700	Chrono-Log Corporation, USA
<b>pH-Meter</b>	pH/ORP Meter, HI 2211	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen
<b>Präzisionswaage</b>	CPA1003P	Sartorius AG, Göttingen
<b>Rollenmischer</b>	Sunlab <sup>®</sup> Rollenmischer; Modell SU 1400/ D-8400	Sunlab <sup>®</sup> , Germany
<b>Thrombinoskop</b>	Fluoroskan Ascent <sup>™</sup> FL	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, USA

<b>Vortexmischer</b>	Neo-Vortex D-6012	neoLab <sup>®</sup> , Heidelberg
<b>Wasserbad (mit Einsätzen)</b>	ED-AP (042) (5A max. 60 °C)	Julabo GmbH, Seelbach
<b>Zentrifuge</b>	Allegra X-30R Centrifuge (Rotoren: SX4400, F2402H)	Beckmann Coulter <sup>™</sup> , Krefeld

### 3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 6: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
<b>Aufziehkanülen</b>	BD Microlance <sup>™</sup> , 20 G x 1½"- Nr.1, 0,9 mm x 40 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<b>Blutentnahmeröhrchen</b>	S-Monovette <sup>®</sup> Citrat 10 ml 9 NC, mit Antikoagulans: 0,106 M Citrat	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<b>Feindosierungsspritzen</b>	Inject <sup>®</sup> -F, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<b>Kanüle mit Schlauch zur Blutentnahme</b>	Safety-Multifly <sup>®</sup> -Set 21 G	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<b>Küvetten</b>	Chrono-Log Glasküvetten	Probe & Go Labordiagnostik GmbH, Osburg
<b>Latexhandschuhe</b>	Sempercare <sup>®</sup> Premium	Lohmann & Rauscher GmbH & Co.KG, Neuwied
<b>Magnetrührstäbchen</b>		A. Hartenstein GmbH, Würzburg
<b>Mikrotiterplatten</b>	PS-Microplate, 96-Wells, u-förmiger Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
<b>Pipettenspitzen</b>	TipOne 0,1-10 µl	StarLab GmbH, Hamburg
	TipOne 1-200 µl	StarLab GmbH, Hamburg
	TipOne 1000 µl	StarLab GmbH, Hamburg
	Gelloading 1-200 µl	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
<b>Polypropylen-Röhrchen mit konischem Boden</b>	Cellstar <sup>®</sup> Tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	Cellstar <sup>®</sup> Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

## MATERIAL UND METHODEN

<b>Polypropylen-Röhrchen mit rundem Boden</b>	Röhrchen 14 ml, Zwei-Positionen-Belüftungsstopfen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
<b>Reagenzröhrchen</b>	Polystyrol, 5 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
<b>Reaktionsgefäße</b>	SafeSeal Gefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<b>Rührstäbchen</b>	Chrono-Log Stir bars	Probe & Go Labordiagnostik GmbH, Osburg
<b>Spritzen</b>	2 ml, Braun Injekt®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
	5 ml, BD Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
	10 ml, BD Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<b>Spritzenfilter</b>	Rotilabo®-Spritzenfilter, CA, steril, Porengröße 0,2 µm, 25 mm Durchmesser	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>Transferpipetten</b>	Einmal-Pasteurpipetten mit integriertem Saugball 3,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

### 3.3 REAGENZIEN

**Tabelle 7: Eingesetzte Reagenzien und Puffer mit jeweiliger Zusammensetzung und/oder Konzentration**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Konzentration/ Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Dextranlösung (10 %)</b>	1 ml enthält: 0,1 g Dextran, Aqua ad injectabilia	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz, Mainz
<b>Dextranlösung (6 %)</b>	6 ml Dextranlösung (10 %), 4 ml 0,9 % isotonische Natriumchlorid-Lösung, 0,054 g NaCl	
<b>Apyrase</b>	500 U/ml	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt

MATERIAL UND METHODEN

<b>Aqua ad injectabilia Braun</b>		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<b>Arachidonsäure Natriumsalz</b>	5 mg/ml in 98 % Ethanol gelöst	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
<b>ATP-Standard (Adenosintri-phosphat-Standard)</b>	0,4 µM	Probe & go Labordiagnostik GmbH, Osburg
<b>Chrono-Lume</b>	2 µM Luciferin/Luciferase	Probe & go Labordiagnostik GmbH, Osburg
<b>Chrono-Par Collagen</b>	1 mg/ml native Kollagenfibrillen (Typ I)	Probe & go Labordiagnostik GmbH, Osburg
<b>Citrat</b>	Molare Masse: 294,19 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>Convulxin</b>	100 µg/ml gelöst in HBSS (Hank's balanced Salt Solution)	Enzo Life Science GmbH, Lörrach
<b>CGS-Puffer, pH 6,5 (Citrate-Glucose-Sodium-Puffer)</b>	120 mM NaCl, 12,9 mM Citrat, 30 mM Glucose	
<b>Creatinphosphat (CP) Dinatriumsalz Tetrahydrat</b>	500 mM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
<b>Creatinphosphatkinase (CPK) aus Hasenmuskel</b>	1000 U/ml	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
<b>EGTA-Lösung (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)</b>	500 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>FluCa-Kit</b>	Fluo-Puffer + Fluo-Substrat	Stago Deutschland GmbH, Düsseldorf
<b>Glukose</b>	Molare Masse: 180,16 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>HBSS (Hank's balanced Salt Solution)</b>	53,3 mM KCl; 4,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1379,3 mM NaCl; 3,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 55,6 mM Dextrose	Life Technologies GmbH, Ober-Olm

MATERIAL UND METHODEN

<b>Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)</b>	Molare Masse: 238,31 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>Hepes-Puffer; pH 7,4</b>	145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM Hepes, 10 mM Glucose	
<b>Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9 % (w/v) Infusionslösung</b>	1 ml enthält: 9 mg Natriumchlorid, Molare Konzentration: 1 ml enthält: 0,154 mol Na <sup>+</sup> , 0,154 mol Cl <sup>-</sup>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<b>Kaliumchlorid (KCl)</b>	Molare Masse: 74,56 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)</b>	Molare Masse: 203,3 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Molare Masse 58,44 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	Molare Masse: 84,01 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>Natriumhydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Molare Masse: 141,96 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>Natriumhydroxid (NaOH)</b>	2 mol/l	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
<b>PBS (phosphate buffered solution, phosphatgepufferte Salzlösung)</b>	10 x konzentrierte Lösung: 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM Phosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
<b>PBS, pH 7,4</b>	10x PBS-Fertigprodukt 1:10 in ddH <sub>2</sub> O gelöst	
<b>PPP-Reagenz (platelet-poor-plasma-reagent, Plättchen-armes-Plasma-Reagenz)</b>		Stago Deutschland GmbH, Düsseldorf
<b>PRP-Reagenz (platelet-rich-plasma-reagent, Plättchen-reiches-Plasma-Reagenz)</b>		Stago Deutschland GmbH, Düsseldorf

## MATERIAL UND METHODEN

<b>Salzsäure (HCl)</b>	2 mol/l	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
<b>Thrombin (Bovine)</b>	100 U/ml in 0,9 % NaCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
<b>Thrombin-Kalibrator (thrombin-calibrator)</b>		Stago Deutschland GmbH, Düsseldorf
<b>TRAP-6</b>	40 mM in DMSO	Bachem Distribution Service GmbH, Weil am Rhein
<b>Tyrodepuffer, pH 7,4</b>	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO <sub>3</sub> , 0,42 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5,5 mM Glucose, 5 mM Hepes	

### 3.4 SOFTWARE

Tabelle 8: Eingesetzte Software-Programme

Software	Hersteller
<b>Aggrolink8 for Windows, Version 1.2.7</b>	Chrono-Log Corporation, USA
<b>EndNote™ X9</b>	Thomson Reuters, USA
<b>GraphPad Prism 8.3.1</b>	GraphPad Software, USA
<b>Microsoft Office 2016 für Windows: Word, Excel</b>	Microsoft Corporation, USA
<b>Sysmex-Software; Version 1KXNH 00-10</b>	Sysmex Europe, Hamburg
<b>Thrombinoscope™ Software, Version 5.0.0.742</b>	Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande

### 3.5 STUDIE

#### 3.5.1 Studiendesign

Diese Dissertation ist Teil der vom „Bundesministerium für Bildung und Forschung“ (BMBF) geförderten grundlagenforschungsorientierenden monozentrisch prospektiven Pilotstudie „Untersuchung der Thrombozyten und Leukozytenfunktion bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie“ des Centrums für Thrombose und Hämostase (CTH) der Universitätsmedizin Mainz, die sich mit der Hypothese beschäftigte, dass nicht die Thrombozyten-Konzentration, sondern vielmehr die Thrombozyten-Dysfunktion (Phänotyp und die Funktionskapazität) ausschlaggebend für die klinisch heterogenen

## MATERIAL UND METHODEN

Pathomechanismen der ET sind. Ziel dieser Studie waren umfassende Untersuchungen des hämostatischen und entzündlichen Thrombozytenaktivierungspotentials durch fortgeschrittene in-vitro-Thrombozytenfunktionstests sowie die Untersuchung von Leukozytenfunktionen bei Patienten mit der Diagnose ET. Hiermit sollte das Ziel verfolgt werden, die spezifischen Pathomechanismen der klinischen Krankheitsausprägungen näher zu identifizieren zur Ermittlung individueller Risikofaktoren, damit möglicherweise darauf aufbauende individuelle Therapieschemata entwickelt werden können.

Die Pilotstudie lief von April 2016 bis April 2019.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Erforschung möglicher Veränderungen in den Thrombozytenfunktionen (Aggregation, ATP-Freisetzung, Thrombingenerierung), den Leukozytenfunktionen (speziell die Thrombingenerierung der mononukleären Zellen [MNC]), sowie in der Interaktion zwischen Thrombozyten und MNC im 1-Jahres-Follow-up (1. FU) von sich in Behandlung befindenden Patienten mit essentieller Thrombozythämie.

Hierfür wurde eine Beobachtungsstudie mit einem prospektiv kontrollierten Längsschnittstudiendesign durchgeführt. Vor der Durchführung der Untersuchungen wurde die methodische Hilfe und Beratung bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) eingeholt.

### **3.5.2 Genehmigung**

Das Studienprotokoll erhielt am 04.08.2016 ein positives Ethikvotum vom Ethik-Komitee der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz. [Studien-Nr.: 837.302.12, 25.07.12; 2018-13290 1, 27.07.2018; 837.262.16 (10581)].

### **3.5.3 Patienten- und Kontrollprobandenkollektiv**

#### **3.5.3.1 Fallzahl**

Im Rahmen dieser Studie kam es von September 2016 bis August 2018 zum Einschluss von insgesamt 19 ET-Patienten, von denen 13 eine vollständige Follow-up-Untersuchung erhielten und in der vorliegenden Dissertation beschrieben werden. Als Kontrollgruppe dienten 10 gesunde erwachsene Probanden.

#### **3.5.3.2 Patientenkollektiv - Rekrutierung sowie Ein- und Ausschlusskriterien**

Die Rekrutierung des Patientenkollektivs erfolgte in Zusammenarbeit mit der III. Medizinischen Klinik (Hämatologie, Internistische Onkologie, Hämostaseologie, Stammzelltransplantation, Pneumologie) der Universitätsmedizin Mainz. Es wurden Patienten mit bereits diagnostizierter oder dem Verdacht auf ET ausgesucht und über die Studie aufgeklärt, sodass nach Unterschreiben der Einwilligungserklärung für die Studienteilnahme die benötigte

## MATERIAL UND METHODEN

Blutentnahme erfolgen konnte. Die regelmäßigen Termine der ET-Patienten wurden dann für weitere Blutentnahmen genutzt, um die Untersuchungen vervollständigen zu können.

Für die Studienteilnahme der Patienten wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien definiert:

Einschlusskriterien:

- Bestätigte ET-Diagnose nach den WHO Diagnostikkriterien (2016) (21)
- Alter  $\geq$  18 Jahre
- Bestätigte *JAK2V617F*- (Januskinase-2) oder *CALR*- (Calreticulin) Mutation
- Schriftliche Einwilligungserklärung

Ausschlusskriterien:

- Leukozytenzahl  $\geq$  20.000/ $\mu$ l
- Patienten mit akutem/subakutem thromboembolischem Ereignis (innerhalb von 6 Wochen ab Einschluss in die Studie)
- Schwangerschaft
- ET-Patienten mit *cMPL*- (humanes myeloproliferatives Leukämieprotein Onkogen) Mutation
- ET-Patienten unter Anagrelid oder Interferon- $\alpha$  Therapie
- fehlende schriftliche Einwilligungserklärung

### 3.5.3.3 Kontrollprobandenkollektiv

Die Rekrutierung des Probandenkollektivs für die Kontrollgruppe erfolgte spontan und freiwillig. Es wurden 10 gesunde Probanden rekrutiert, welche jeweils einmal ohne vorausgehende Einnahme von ASS oder anderer Thrombozyten-beeinflussender Medikamente (innerhalb der letzten 10 Tage vor der Blutentnahme) untersucht wurden und bei welchen die darauffolgende Blutentnahme nach 3-tägiger ASS-Einnahme (einmal täglich 100 mg) erfolgte. Die Einverständniserklärung zur Studienteilnahme erfolgte vor der Blutentnahme.

### 3.5.4 Datenschutz

Im Rahmen der Studie liefen alle Untersuchungen und Verwendungen von Personendaten datenschutzkonform ab (gemäß der europäischen Datenschutzverordnung). Die ärztliche Schweigepflicht wurde eingehalten, die Aufklärung und Unterzeichnung der Einverständniserklärung (u.a. Zustimmung der pseudonymisierten Weitergabe personenbezogener Daten an Dritte einschließlich im Rahmen von Publikationen) zur Studienteilnahme erfolgte vor der Blutentnahme. Die angegebenen Daten zur Person (Name,

Alter, Geschlecht, Diagnose, aktueller Gesundheitszustand, Krankheitsverlauf) und die generierten Laborergebnisse wurden als pseudonymisierte Daten auf gesicherten Servern gespeichert, auf die nur Studienbefugte Zugriff haben.

### **3.5.5 Statistische Datenauswertung**

Das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) stand den Doktoranden der AG Jurk des CTHs für die Datenauswertung beratend zur Seite. Die Auswertung der Messergebnisse dieser Dissertation erfolgte deskriptiv über Word- und Excel-Tabellen sowie die Statistiksoftware GraphPad Prism 8.3.1. Zunächst wurden Box-Whisker-Plots mit Minimum und Maximum, 25 %- und 75 %-Perzentile sowie dem Medianwert erstellt, anhand derer statistische Auswertungen angefertigt wurden. Zur Evaluierung der Datenverteilung innerhalb der einzelnen Gruppen, orientierend an der Gaußschen Normalverteilung, wurde der Shapiro-Wilk Normalitätstest angewendet. Für den Gruppenvergleich normalverteilter Daten wurde der T-Test genutzt, für nicht normal verteilte Daten der Mann-Whitney-Test. Aus den errechneten P-Werten wurden Tabellen gestaltet, die sich im Anhang befinden. Aufgrund einer zu geringen Fallzahl von nur 13 ET-Patienten und 10 Kontrollprobanden konnte man bei den Ergebnissen dieser Studie nicht von einer statistischen Signifikanz, sondern allenfalls von einer statistischen Auffälligkeit (falls der errechnete P-Wert im Gruppenvergleich unter dem Signifikanzniveau von 5 % ( $<\alpha$  (0,05)) lag) oder einer Tendenz sprechen.

Im zweiten Ergebnisteil dieser Dissertation, also für den intraindividuellen Vergleich zwischen den Messergebnissen aller 13 Patienten im 1. Follow-up (1. FU) und dem Ersteinschluss, wurden zur visuellen Darstellung Verlaufs-Punktdiagramme herangezogen, jedoch keine statistische Auswertung durchgeführt.

## **3.6 VENÖSE BLUTENTNAHME**

Die Blutentnahme der eingewilligten Patienten fand in der hämatologischen Ambulanz der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mainz statt. Den Kontrollprobanden wurde das Blut direkt im Labor des CTH (AG Jurk) abgenommen.

Dabei punktierte man im Regelfall eine Vene in der Ellenbeuge mithilfe einer 21-Gauge Nadel und nahm das Blut in vier 10 ml S-Monovetten<sup>®</sup> mit Citrat (finale Konzentration 10,6 mM Na<sub>3</sub>Citrat) (sowie eine 10 ml S-Monovette EDTA zur Auswertung eines kleinen Blutbildes) ab. Es wurde darauf geachtet, dass die abgenommenen Citratröhrchen zur Vermengung des Vollblutes mit dem Antikoagulans nur vorsichtig geschwenkt (niemals geschüttelt) wurden. Es durften maximal 60 Minuten vergehen, bis die Blutproben im Labor zur Weiterverarbeitung und Versuchsdurchführung ankamen. Selbst beim Transport wurde darauf geachtet, dass die Blutproben möglichst wenig Erschütterungen ausgesetzt waren, sowie auf Raumtemperatur

(RT) warmgehalten wurden, damit es nicht zur Präaktivierung der Thrombozyten kam. Im Labor angekommen, wurde sofort ein kleines Blutbild aus einer EDTA- sowie Citrat-Monovette mit dem Sysmex Cell Counter erstellt.

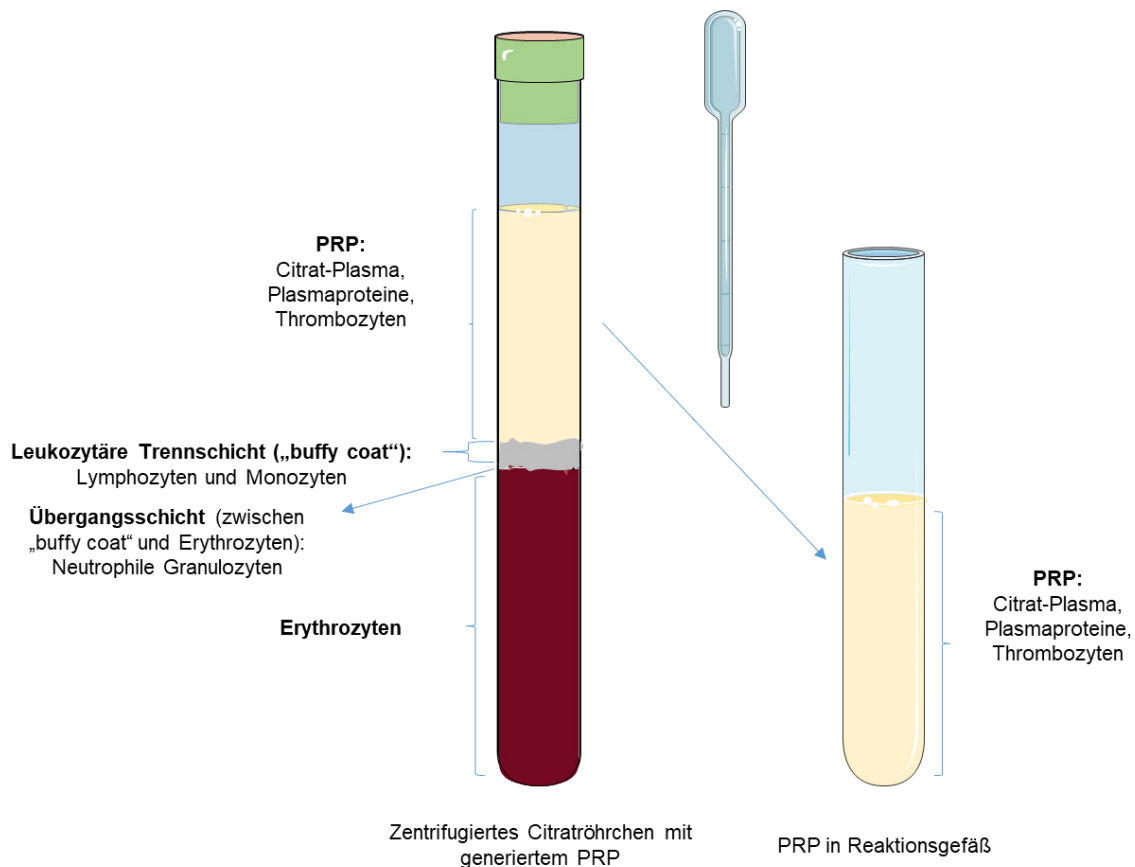
### **3.7 GEWINNUNG DES THROMBOZYTEN-REICHEN, -ARMEN UND -FREIEN PLASMAS**

Für die Herstellung von ausreichend Thrombozyten-reichem Plasma („platelet-rich plasma“, PRP) für die Versuche dieser Arbeit benötigte man insgesamt vier 10 ml Vollblut-Citrat-Monovetten. Diese wurden für 10 Minuten bei 200 xg (Rotor SX4400, accel 9, decel 2, RT) zentrifugiert. Danach entstand aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Blutzellen eine sichtbare leukozytäre Trennschicht („buffy coat“) zwischen dem sich darüber liegendem gelblichen PRP (in dem sich noch Citrat-Plasma, Plasmaproteine und Thrombozyten befanden) und dem darunter liegenden rötlichen Erythrozyten (siehe Abbildung 1). Das PRP wurde mit einer Transferpipette vorsichtig abgenommen (das Abpipettieren erfolgte mit kleinem Abstand zu der leukozytären Trennschicht, damit keine Verunreinigung des PRPs mit Leukozyten erfolgte) und in ein 5 ml Polystyrol-Reagenzröhrchen gegeben. Davon wurde wieder ein kleines Blutbild erstellt, um die Thrombozytenkonzentration zu messen.

Die Citrat-Monovetten wurden nun ein zweites Mal für 10 Minuten zentrifugiert, allerdings mit 2000 xg und einer Bremse von 9 (accel 9, decel 9, RT). Es entstand wieder ein gelblicher Überstand, bei dem es sich um Thrombozyten-armes Plasma („platelet-poor plasma“, PPP) handelte. Dieses wurde mit einer Transferpipette in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert.

Für die ET-Patienten brauchte man letztlich aber Thrombozyten-freies Plasma („platelet-free plasma“, PFP) für die Versuche, weil die Patienten teils so viele Thrombozyten hatten, dass ein schon von Thrombozyten befreites PPP nicht gewährleistet werden konnte. Deshalb wurden die mit PPP befüllten Reaktionsgefäße mit dem kleinen Rotor F2402H in der Zentrifuge ein weiteres Mal für 10 Minuten zentrifugiert bei 17800 rpm (29099 xg, accel 9, decel 9, RT).

Für die Lumi-Aggregometrie-Versuche wurde das PRP mit autologem PFP auf 200.000 Thrombozyten/ $\mu$ l verdünnt und für die CAT-Versuche wurde das PRP auf 150.000 Thrombozyten/ $\mu$ l verdünnt.



**Abbildung 1: Generiertes PRP nach einmaliger Zentrifugation einer Citrat-Monovette**

### 3.8 GEWINNUNG ISOLIERTER THROMBOZYTEN

Unter isolierten Thrombozyten versteht man Thrombozyten, die frei von jeglichen ihnen normalerweise umgebenden Plasmabestandteilen sind. Für die Herstellung von sogenannten „washed platelets“ (WP) benötigte man zunächst eine 10 ml Citrat-S-Monovette mit Vollblut. In dieses Citratröhrchen wurden 40 µl EGTA-Lösung (finale Konzentration: 3 mM) und Apyrase (finale Konzentration: 0,2 U/ml) gegeben. Apyrase ist ein Enzym, welches das freigesetzte ADP aus eventuell zerstörten Erythrozyten oder Thrombozyten in AMP umwandelt, damit die Thrombozyten nicht bereits durch das freigesetzte ADP stimuliert werden.

Dieses Gemisch wurde dann für 10 Minuten bei 200 xg (decel 2, RT) zu PRP zentrifugiert. Das PRP wurde nun vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen, sodass keine Leukozyten oder Erythrozyten das PRP verunreinigten, und in ein großes Polypropylen-Röhrchen mit rundem Boden pipettiert. Das abgenommene PRP wurde mit CGS-Puffer (man wählte diesen Puffer mit einem leicht sauren pH-Wert von 6,5, damit die Thrombozyten durch den Zentrifugationsstress nicht voraktiviert wurden) 1:1 verdünnt und 5 bis 10 Minuten bei RT stehen gelassen. Nach dieser Ruhezeit wurde eine leichte 10-minütige Zentrifugation mit 80 xg (decel 1, RT) durchgeführt, damit die Leukozyten als Pellet am Boden ausfallen und man das „reinere“ PRP nun in ein neues Polypropylen-Röhrchen mit rundem Boden transferieren

konnte. Dieses wurde nochmals mit einer höheren g-Zahl von 380 xg für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation wurde der Plasmarückstand abgenommen, verworfen und die übrig gebliebenen Plättchen (das Pellet) nochmals gewaschen, d.h. zuerst in 1ml CGS-Puffer gelöst und dann mit weiteren 2 ml hinzugefügtem CGS-Puffer gewaschen. Nach einer weiteren Ruhezeit von 5 bis 10 Minuten folgte die letzte Zentrifugation bei 380 xg (decel 2, RT). Das überschüssige Plasma wurde verworfen, das Thrombozytenpellet mit 500 – 1000 µl (abhängig von Pelletgröße) Hepes-Puffer (pH = 7,5) resuspendiert und eine kurze Einwirkzeit eingehalten. Abschließend bestimmte man die Konzentration der Thrombozyten im Sysmex Cell Counter.

### **3.9 GEWINNUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN**

Zur Extrahierung mononukleärer Zellen („mononuclear cells“, MNC) wurden zunächst 4 ml Vollblut aus einer 10 ml Citrat-S-Monovette mittels Transferpipette entnommen und auf zwei Reagenzröhrchen verteilt (je 2 ml). Nun wurden jeweils 0,5 ml einer 0,2 µm gefilterten 6-prozentigen Dextranlösung (in 0,9 % NaCl) in die Reagenzröhrchen gegeben und vorsichtig mit der Transferpipette vermischt. Es folgte eine Inkubationszeit von mindestens 45 Minuten bei RT. Die Dextranlösung sorgte dafür, dass die Erythrozyten im Vergleich zu den anderen Zellen schneller sedimentierten. Der entstandene Überstand mit der angereicherten MNC-Fraktion wurde aus beiden Reagenzröhrchen abgenommen, in ein gemeinsames 14 ml Polypropylen-Röhrchen mit rundem Boden transferiert, vorsichtig vermischt und auf zwei Polypropylen-Röhrchen gleichmäßig verteilt. Jedes Röhrchen wurde nun bis auf 10 ml mit CGS-Puffer (pH 6,5) aufgefüllt und bei 70 xg (decel 9, RT) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation entstand ein Pellet mit MNC und der Überstand, welcher Thrombozyten und Erythrozyten enthielt, wurde abpipetiert und verworfen. Ein Pellet der zwei Röhrchen wurde nun mit 300 µl patienteneigenem PFP gelöst und das andere Pellet wurde mit 300 µl PFP einer gesunden Kontrolle (entsprach nicht der Kontrollgruppe aus dieser Dissertation) gelöst. Danach wurden diese Gemische jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt und im Sysmex Cell Counter die Konzentration der MNC (v.a. Monozyten und Lymphozyten) gemessen. Die Gemische sollten nahezu keine roten Blutkörperchen (RBC) enthalten und eine Thrombozytenzahl von unter 100.000/µl aufweisen.

Da die Lymphozyten für die Thrombingenerierung weniger relevant sind, konzentrierte man sich in diesem Versuch auf die thrombingenerierenden Monozyten und stellte hier die MNC auf eine definierte Konzentration ein. Ziel war es, eine MNC-Konzentration (MXD#) von mind.  $0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$  zu erreichen und wenn nötig mit dem jeweiligen PFP auf diese Konzentration zu verdünnen.

### 3.10 LUMI-AGGREGOMETRIE

#### 3.10.1 Allgemeines Versuchsprinzip

1962 beschrieb zuerst Gustav Born die Plättchenaggregation durch ADP und modifizierte einen Photorimeter, um die Aggregation in plättchenreichem Plasma kontinuierlich messen zu können (115). Darauf folgend designte R.D. Feinman *et al.* 1977 das erste Lumi-Aggregometer, durch welches das gleichzeitige Messen der Plättchenaggregation und ATP-Sekretion in PRP (mittels der optischen Dichte) oder in Vollblut (per elektrischer Impedanzmessung) möglich wurde (116). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Lumi-Aggregometer handelte es sich um das Chrono-Log-Aggregometer Model 700. Es ermöglicht die Messung der durch Agonisten induzierten Plättchenaktivierung *in vitro* in PRP oder Vollblut (nicht in dieser Arbeit genutzt). Es misst dabei gleichzeitig die Thrombozytenaggregation und die ATP-Sekretion. Die Aggregationsmessung fußt auf der optischen Lichttransmissionsmethode, wie sie erstmals von Gustav Born 1962 beschrieben wurde (115, 117). Die Probenkammern sind so konzipiert, dass für die Aggregations-Messung ein Infrarot-Lichtstrahl durch zwei Küvetten scheint, von denen eine PRP und die andere PFP (als Referenz) enthält (116). Silizium-Fotodioden erfassen das Licht, das durch die Proben hindurchtreten kann (116).

Die PRP-Probe wird willkürlich als 0 %-Transmission bzw. 0 %-Aggregation (Nullwert; noch VOR Zugabe eines Agonisten) betrachtet; die PFP-Probe wird als 100-prozentige Lichttransmission/Aggregation betrachtet. Wenn nun ein Agonist der PRP-Probe hinzugegeben wird, werden die Plättchen angeregt und es kommt durch die beginnende Formveränderung („shape change“) und Aggregation zu Veränderungen der Lichttransmission, die über die Zeit auf dem Aufnahmegerät aufgezeichnet werden. Die Zunahme der Lichttransmission ist dabei proportional zur Thrombozyten-Aggregation. (49, 116, 118)

Die Versuche laufen unter ständigem leichtem Rühren der Proben ab, mithilfe von Magnetrührstäbchen bei 1000 rpm (rev/min, „revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute). Dadurch wird der notwendige Thrombozytenkontakt untereinander und damit die maximale *in-vitro* Plättchenaggregation gewährleistet. (119)

Die ATP-Sekretion hingegen wird mit der Lumineszenz-basierenden Messmethode (mit einem Photomultiplier) gemessen. Die Lumineszenz beruht auf einer biologischen Reaktion, wie sie auch in Glühwürmchen stattfindet. Dabei reagiert das aus den  $\delta$ -Granula („dense bodies“) der Thrombozyten freigesetzte ATP mit einem Luciferin-Luciferase-Reagenz (Chrono-Lume). Die durch den Photomultiplier gemessene Emission der entstandenen Chemolumineszenz ist proportional zur freigesetzten ATP-Menge. (118, 120-122)

D-Luciferin + ATP  $\xrightarrow{\text{[Luciferase]}}$  Chemolumineszenz + Oxyluciferin + AMP + H<sub>2</sub>O + CO<sub>2</sub>  
(vgl. (77, S.567))

## MATERIAL UND METHODEN

Zur Kalibrierung der Lumineszenz und Messung der sezernierten ATP-Menge wird zunächst die Lichtemission eines ATP-Standards mit bekannter ATP-Konzentration in PRP gemessen (88, 123).

Außerdem kann man mithilfe der Lumineszenz-basierenden Messmethode die freigesetzte ADP-Menge aus den  $\delta$ -Granula der Thrombozyten bestimmen, indem man eine Versuchsreihe mit zusätzlichem Kreatinphosphat und Kreatinphosphokinase ansetzt. Als Initiator der Thrombozytenaktivierung wurde Kollagen (10  $\mu$ l/ml) verwendet. Mithilfe der katalysierenden Funktion der Kreatinphosphokinase konnte nun das freigesetzte ADP durch Kreatinphosphat zu ATP phosphoryliert werden und so zur totalen ATP-Konzentration beitragen. Für die Berechnung der ADP-Menge musste man die errechnete ATP-Menge aus dem vorherigen Versuch (der nur mit 10  $\mu$ g/ml Kollagen ablief) von der totalen Konzentration des generierten ATP im nächsten Versuch nach Zugabe der Reagenzien Kollagen, CP und CPK, subtrahieren. Die Lumineszenz-Messung der ATP-Sekretion liefert einen eindeutigen Beweis für eine normale oder gestörte Freisetzung von ATP aus den „dense Granula“. Dies erhöht die Sensitivität des Tests gegenüber Sekretionsstörungen und Thrombozyten-Granula-Mangel („storage pool deficiency“). (116)

Die Lumi-Aggregometrie ist die aktuell etablierteste *in-vitro*-Methode zur simultanen Testung der Plättchenaggregation und ATP-/ADP-Generierung der Thrombozyten. Die Fähigkeit oder Unfähigkeit der Thrombozyten, auf bestimmte Agonisten zu reagieren, ist die Grundlage für die Differenzierung von Thrombozytenfunktionsstörungen. (116)

Die Limitierung stellt hier, wie bei der Aggregometrie nach Born, die benötigte Mindestkonzentration von 150.000 Thrombozyten/ $\mu$ l im PRP dar (meistens standardisiert auf 200.000/ $\mu$ l), damit die Aggregation standardisiert ablaufen kann.

### 3.10.2 Versuchsdurchführung

Spätestens 15 Minuten vor Versuchsbeginn sollte das Chrono-Log Aggregometer und das dafür nötige Notebook mit der Software AGGRO/ LINK<sup>TM</sup>8 (Version 1.2.3) für die Versuchsdurchführung vorbereitet werden, damit sich das Gerät auf 37 °C erwärmen kann.

Für diesen Versuch wurden das PRP und PFP gewonnen (wie in 3.7 beschrieben), wobei das PRP für diese Methode mit dem Lumi-Aggregometer noch mit autologem PFP auf 200.000 Thrombozyten/ $\mu$ l verdünnt wurde.

Zur Vorbereitung wurden die Glasküvetten mit jeweils einem Magnetrührstäbchen bestückt, mit Ausnahme der Küvette für das PFP (PPP-Standard). In diese Küvette für das PPP-Standard wurden 500  $\mu$ l PFP, in die restlichen sechs Küvetten jeweils 450  $\mu$ l PRP pipettiert und im Chrono-Log vorgewärmt.

Als Letztes mussten noch die nötigen Reagenzien vorbereitet werden (siehe Tabelle 9). Hierfür mussten Verdünnungen von TRAP-6 (Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6; 2 mM) und

## MATERIAL UND METHODEN

Kollagen Typ I (100 µg/ml) mit Tyrodepuffer angesetzt werden. Die Standardreagenzien Chrono-Lume Lumineszenz-Reagenz, ATP-Standard, Chrono-Par-Collagen und Arachidonsäure waren bereits im Labor vorhanden.

Um den ATP-Standard einrichten zu können, musste eine Küvette mit PRP zunächst mindestens 3 Minuten im Gerät aufgewärmt werden, dann wurden 50 µl Chrono-Lume pipettiert, 2 Minuten Inkubationszeit bei gleichmäßigem Rühren abgewartet, dann 5 µl ATP-Standard hinzugeben, die Küvettenabdeckung des Gerätes verschlossen und den ATP-Peak in der Software in der „Ideal Range“ von 20 bis 60 % platziert. Dann wurde der Test gestoppt und der errechnete ATP-Standard gespeichert. Dieser war wichtig, um bei den folgenden Messungen einen Vergleich für die ATP-Generierung zu haben. (Genaueres Prozedere wird im Gerätehandbuch (116) beschrieben).

Die Küvette mit dem PFP für das „PPP-Standard“ wurde in den dafür vorgesehenen Platz im Gerät gestellt und galt als Referenz für die folgenden Messungen mit den Agonisten. Dafür wurde nacheinander jeweils in die Küvetten mit den 450 µl PRP zuerst 50 µl Chrono-Lume gegeben, nach 2 Minuten Inkubationszeit im Gerät das jeweilige Agonisten-Reagenz hinzu pipettiert und die Messung für 6 Minuten gestartet. Insgesamt wurden nach diesem Schema fünf Messungen durchgeführt: mit dem Agonisten Arachidonsäure und jeweils mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Chrono-Par Collagen sowie von TRAP-6. Bei der sechsten Messung mit den Agonisten Chrono-Par Collagen + CP + CPK änderte man die Pipettierreihenfolge etwas ab, indem man nach dem PRP und Chrono-Lume erst CP, dann CPK und zum Schluss Chrono-Par Collagen hinzupipettierte. Diese letzte Versuchsreihe wurde zur Bestimmung der ADP-Freisetzung durchgeführt.

**Tabelle 9: Agonisten für die Lumi-Aggregometrie-Versuche**

	Kollagen		TRAP-6		Arachidonsäure
Finale Konzentration	2 µg/ml	10 µg/ml (+/- CP+CPK)	10 µM	50 µM	0,5 mg/ml
Verdünnungen und Stammkonzentrationen	100 µg/ml (Stock 1:10)	Stock 1 mg/ml	2 mM (Stock 40 mM, 1:20)	2 mM	Stock 50 mg/ml (~153 mM)

### 3.10.3 Auswertung der Thrombozytenaggregation und ATP-Freisetzung

Die Auswertung der jeweiligen Messungen für die Aggregation sowie ATP-Sekretion erfolgte graphisch mithilfe des Software-Programms AGGRO/ LINK™8 (Version 1.2.3). Dabei können

## MATERIAL UND METHODEN

verschiedene Parameter ausgewertet werden (z.B. „Lag time“, „Slope“, „Amplitude“, „Area under the curve“), wobei in dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf den Parameter „Amplitude“ gelegt wurde, jeweils für die Graphen der Thrombozytenaggregation und ATP-Sekretion. Die „Amplitude“ beschreibt in der Aggregationskurve die maximale Thrombozytenaggregation in % und in der ATP-Sekretionskurve die maximal generierte ATP-Menge in nmol über die Zeit. Die „Area under the curve“ beschreibt die Fläche unter der ATP-Kurve und spiegelt damit die Gesamtkonzentration der über die Zeit generierten ATP-Menge wider. Wichtig zur Beschreibung der Aggregation ist noch die Aggregationsrate („slope“), die der Steigung der Kurve in % pro Minute entspricht. Man spricht von der „Lag time“, wenn man die Latenzzeit in Minuten beschreiben möchte, also die Verzögerungszeit, bis es zur sichtbaren Reaktion nach Zugabe eines Agonisten kommt. (49)

Nach Zugabe eines Thrombozytenagonisten kommt es je nach Art und Konzentration des Agonisten zur Initiierung der reversiblen Formveränderung („shape change“) von Thrombozyten, sowie zur Bildung reversibler kleiner Mikroaggregate oder direkt zur Bildung irreversibler Formveränderungen und Aggregaten (88). Dabei kann die Aggregationskurve mono- oder biphasisch verlaufen. Die „shape change“ (Formänderung) der Thrombozyten äußert sich in einer kurzen, temporären Abnahme der Lichttransmission relativ zu Beginn der Aggregationskurve. Mit Zunahme der gebildeten Plättchenaggregate nimmt allerdings auch die Lichttransmission wieder zu. Somit kann man durch die Änderungen der Lichttransmission Rückschlüsse auf das Aggregationsverhalten der Thrombozyten auf verschiedene Agonisten ziehen. (49)

Die in meinen Experimenten verwendeten Substanzen TRAP-6, Kollagen und Arachidonsäure haben an sich spezielle Signalwege und Ansatzpunkte in der Aktivierung der Thrombozyten und damit des Hämostasesystems. TRAP-6 aktiviert die Thrombozyten nur über den PAR1-Rezeptor (56) (i.Ggs. zu Thrombin, welches über die PAR1- und PAR4-Rezeptoren, sowie das Glykoproteine GP Iba und das durch Thrombin gespaltene GPV aktivierend wirkt (55, 124)). Der Agonist Kollagen führt in PRP zu einer charakteristisch langen „Lag time“ von 30-60 Sekunden, die Aggregationskurven verlaufen typischerweise monophasisch und bei fehlender Reaktion auf Kollagen kann das auf eine Membranabnormalität, einen Sekretionsdefekt oder die Therapie mit ASS oder anderen nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) hinweisen (88). Mit Arachidonsäure als Thrombozytenagonist verläuft die Aggregationskurve i.d.R. auch monophasisch, es entsteht keine „Lag time“ und die Messung ist sinnvoll zur Detektion von Störungen im Eikosanoid-Signalweg (inkl. der von ASS und NSAID gehemmten Cyclooxygenase) (88).

Mit Beginn der Aggregation beginnt auch die Kurve der ATP-Sekretion zu steigen. Vor allem, wenn es zur thrombozytären Formveränderung, Aktivierung und Bildung irreversibler

## MATERIAL UND METHODEN

Aggregate kommt, schütten die Thrombozyten vermehrt ATP und ADP aus ihren  $\delta$ -Granula aus, um noch mehr Thrombozyten aktivieren zu können.

In der Versuchsreihe mit Kollagen, Kreatinphosphat (CP) und Kreatinphosphokinase (CPK) wurden im Vergleich zu den Versuchen ohne CP/CPK viel höhere ATP-Kurven generiert, da hier zusätzlich das sezernierte ADP aus den  $\delta$ -Granula durch CP und CPK zu ATP phosphoryliert wurde. Wie bereits im Kapitel „Allgemeines Versuchsprinzip“ erwähnt, kann man mithilfe dieser speziellen Versuchsreihe die von den Thrombozyten sezernierte ADP-Menge bestimmen.

Nach der ADP-Mengenberechnung ist es möglich, die ATP/ADP-Ratio zu erstellen. Sie liegt physiologisch zwischen 1,5 - 2,0 (125), wohingegen sich innerhalb der  $\delta$ -Granula eine größere Menge an ADP als ATP befindet und die ATP/ADP-Ratio deshalb hier auch nur Werte von 0,65 - 0,78 annimmt (126). Wenn im Granulamaterial eine ATP/ADP-Ratio  $>2$  gemessen wird, könnte das auf einen „ $\delta$ -Speicherpool-Mangel“ (delta storage pool deficiency,  $\delta$ -SPD) hinweisen (81, 126, 127). Je höher die ATP/ADP Ratio ist, desto wahrscheinlicher ist ein  $\delta$ -SPD. Da ATP jedoch zum einen metabolisch im Zytoplasma synthetisiert wird und zum anderen in den  $\delta$ -Granula der Thrombozyten gespeichert sein kann, ist die ATP-Konzentration bei Vorliegen eines Speicherdefekts ( $\delta$ -SPD) oder einer Sekretionsstörung der  $\delta$ -Granula in beiden Fällen höher als die ADP-Konzentration. Man kann also keine Aussage darüber treffen, ob es sich tatsächlich um einen  $\delta$ -SPD mit einem ADP-Mangel oder lediglich um eine Sekretionsstörung handelt mit „vollständigem“ Granulainhalt. (81)

ASS und andere NSAIDs hemmen die COX [irreversibel (ASS) bzw. reversibel (andere NSAIDs)] und vermindern somit die durch  $\text{TxA}_2$  (Bildung getriggert durch den Agonisten Arachidonsäure) vermittelte Freisetzung der dichten Granula ( $\delta$ -Granula) sowie seine positive Feedback-Funktion auf die Signalwege anderer niedrig-dosierter Thrombozytenagonisten (z.B. ADP, Adrenalin, Kollagen), sodass deren Reaktionsantworten ebenso reduziert ausfallen. Ban B. Dawood *et al.* beschreiben, dass die ASS-Sensitivität hierbei stark von der Konzentration der Agonisten abhängt. Je geringer die Agonistenkonzentration, desto empfindlicher reagieren die Thrombozyten auf den ASS-Einfluss und zeigen eine entsprechend abgeschwächte Aggregationsantwort. Die Sekretions- und Aggregations-Reaktionen auf hohe Konzentrationen der meisten Agonisten (Ausnahmen: ADP, Adrenalin) bzw. auf starke Agonisten wie Thrombin und TRAP-6 scheinen jedoch unbeeinflusst davon zu sein. (128)

Aufgrund dieser negativen Einflüsse auf die Thrombozytenfunktion wurde sichergestellt, dass die Kontrollprobanden in der Versuchsreihe ohne ASS bereits 10 Tage vor der Blutentnahme weder NSAIDs noch andere thrombozytenfunktionsbeeinflussende Medikamente eingenommen hatten.

### 3.11 „CALIBRATED AUTOMATED THROMBOGRAPHY“ (CAT)

#### 3.11.1 Allgemeines Versuchsprinzip

In dieser Arbeit wurde mithilfe eines Thrombinskops (Fluoroskan Ascent™ FL) eine kalibrierte automatisierte Thrombographie („Calibrated automated thrombography/thrombogram“, CAT) durchgeführt. Mit dem CAT ist es möglich, die *in vitro* Thrombingenerierung kontinuierlich zu bestimmen und dabei das aktivierte Gerinnungssystem zu betrachten, um hierbei pathologische und physiologische Funktionen zu testen. Üblicherweise erfolgt dies in plättchenarmem Plasma (PPP) bzw. plättchenreichem Plasma (PRP).

Im PPP zeigt das CAT alle Störungen von Gerinnungsfaktoren (außer Faktor XIII) und die Wirkung von allen Antikoagulanzen. Im PRP wird größtenteils das physiologische Thrombozyten-abhängige Gerinnungssystem widerspiegelt, außerdem können Störungen des „von-Willebrand-Faktors“ aufgedeckt werden und man sieht die Wirkung von Thrombozytenhemmern (v.a. Aspirin und Abciximab). (129)

Die Messung der Thrombingenerierung erfolgte mithilfe eines speziellen fluoreszenzbasierten ELISA-Readers (Thrombinskop). In dem Versuch wird das fluorogene Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC (129) eingesetzt, das von dem Enzym Thrombin gespalten wird und dadurch ein fluoreszierendes Signal entsteht (Detektion bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm). Das Thrombinskop misst die Freisetzung der fluoreszierenden Spaltprodukte, die sich proportional zur generierten Thrombinmenge verhalten.

Die Höhe des Fluoreszenzsignals ist abhängig von der Farbe des Plasmas, dem Alter des Filters, der Lampe sowie der Farbe und dem Material der 96-Well-Platte. Deshalb wurde in eine „Referenz-Well-Reihe“ ein sogenannter Thrombin-Kalibrator („thrombin-calibrator“) als Referenzsubstanz dem PFP hinzugegeben, welches nicht gerinnen sollte (129). Dieser Thrombin-Kalibrator enthielt einen  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Thrombin-Komplex mit bekannter konstanter Thrombinaktivität. Der Komplex spaltet (genau wie Thrombin) das fluorogene Substrat, wird jedoch nicht durch Gerinnungsinhibitoren (z.B. Antithrombin, Heparin, Dabigatran oder Argatroban) beeinflusst, wodurch eine konstante Thrombinaktivität gewährleistet wird (129). Aus dem Anstieg der Thrombingenerierungskurve kann dann der Kalibrierungsfaktor entnommen werden, welcher für die Umrechnung der Fluoreszenzsignale in die generierte Thrombinkonzentration benötigt wird (130).

Die „Referenz-Well-Reihe“ wurde anschließend mit dem gleichen Plasma in einer anderen Well-Versuchsreihe, die dann mit einer Triggersubstanz zur Initiierung der Gerinnung ergänzt wurde, kontinuierlich verglichen. Dadurch konnten die oben genannten Störfaktoren mit den Kalibratordaten verrechnet sowie die exakte Thrombinentstehung während des Ablaufs der Gerinnungskaskaden über die Zeit bestimmt werden. (131)

Die Erstellung eines Thrombogramms, also eine zeitliche Kinetik der Thrombingenerierung, ist von hoher klinischer Relevanz. Im Gegensatz zur herkömmlichen Bestimmung der

## MATERIAL UND METHODEN

Blutungszeit im Labor ist das Thrombinoskop deutlich sensitiver bei der Erfassung sowohl sehr niedriger als auch hoher Reaktivitäten des Gerinnungssystems (9) sowie beim Nachweis des Einflusses antithrombotischer Medikamente. Dadurch können antithrombotische Therapien und Gerinnungsstörungen gut überwacht werden.

Zur Durchführung des Tests wurden jeweils 20 µl des Thrombin-Kalibrators in einen dreier Well-Satz (Well = kleine Vertiefung/Mulde) einer 96-Well-Mikrotiterplatte (mit u-förmigem Boden) per „reverse pipetting“ und 20 µl von unterschiedlichen Triggersubstanzen in je einen anderen dreier Well-Satz pipettiert. Nach der blasenfreien Zugabe von je 80 µl des Plasmas (PFP und PRP) [Cave: Thrombin und Convulxin wurden erst nach PRP und PFP hinzupipettiert) wurde die Well-Platte in das Gerät getan, welches die Platte auf 37 °C erwärmte, um physiologische Temperaturverhältnisse zu schaffen. Nun gab das Instrument selbstständig je 20 µl FluCa (Gemisch aus dem fluorogenem Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC und Fluo-Puffer (129) (enthielt final 17 mM Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)) in jedes Well hinzu, damit die Gerinnung ablaufen und die Messung gestartet werden konnte.

Mit der CAT wurden in dieser Arbeit zwei Versuche durchgeführt. Im ersten Versuch wurde die Thrombingenerierung in PFP und PRP mittels unterschiedlicher Gerinnungstrigger (Triggersubstanzen) gemessen. Hierbei wird mit dem PFP die plasmatische Thrombingenerierung gemessen, da keine Thrombozyten in der Versuchsreihe vorhanden sind. Im PRP prüfte man dann die Gerinnungsleistung bzw. Thrombingenerierung auf der Thrombozytenoberfläche, also die zelluläre Thrombingenerierung. Im zweiten Versuchsdurchlauf wurde speziell die Thrombingenerierung von isolierten Thrombozyten (WP) und mononukleären Zellen (MNC) jeweils in autologem (Eigen-) wie auch in Kontrollplasma\* untersucht.

\* Es handelte sich hierbei NICHT um das Plasma des in dieser Dissertation untersuchten Kontrollprobandenkollektivs (n = 10).

### **3.11.2 Thrombingenerierung im PFP und PRP**

Für den ersten Versuch dieser Arbeit mit der CAT wurde die Thrombingenerierung in PFP und PRP untersucht. Der Versuchsablauf wird im Folgenden beschrieben.

Zuerst mussten die Programmeinstellungen in der Thrombinoscope™ Software vorgenommen werden: Die Temperatur wurde auf 37 °C eingestellt, sodass das Gerät vorwärmen konnte. Außerdem wurde die Thrombin-Kalibrator-Aktivität festgelegt (auf der Phiole des Reagenzes vermerkt; ca. 650 nM), die Versuchsreihen definiert (jeweils Dreifachausfertigungen) und zwei Polypropylen-Röhrchen mit konischem Boden in den dafür vorgesehenen Platz im Thrombinoskop (Fluoroskan Ascent™ FL) gestellt, wobei eines davon mit Wasser befüllt wurde und das andere leer blieb.

## MATERIAL UND METHODEN

Danach galt es, die nötigen Substanzen vorzubereiten: PFP und PRP wurden nach dem bereits in Kapitel 3.7 beschriebenen Schema hergestellt, die Thrombozytenkonzentration mit dem Sysmex Cell Counter gemessen und dann auf 150.000/µl mit autologem PFP verdünnt. Verdünnungen von Thrombin (0,5 U/ml) und Convulxin (250 ng/ml und 5 µg/ml) mit Tyrodepuffer wurden angesetzt und auf Eis gekühlt.

Danach folgte die Herstellung der Thrombinoskop-Reagenzien. Dafür wurden jeweils 1 ml deionisiertes Wasser (Aqua ad injectabilia) einem PPP- und PRP-Reagenz sowie dem Thrombin-Kalibrator hinzugegeben und leicht geschwenkt. Sie wurden als Trigger benutzt, um entsprechend in PPP (bzw. PFP) oder PRP die Thrombingenerierung zu initiieren. Das PPP-Reagenz besteht aus einer Mischung aus TF (5 pM) und Phospholipiden (4 µM), die die im PFP fehlenden Thrombozytenoberflächen ersetzen sollen, auf denen physiologischerweise die thrombingenerierenden Reaktionsschritte ablaufen. Da keine Thrombozyten vorhanden sind, kann also nur die plasmatische Thrombingenerierung geprüft werden. Das PRP-Reagenz, welches dem PRP hinzugegeben wird, enthält nur 1 pM TF und keine Phospholipide, da das PRP Thrombozyten enthält und damit schon genug Oberflächenphospholipide zur Initiierung der Thrombingenerierung vorhanden sind. Dadurch kann die zelluläre Thrombingenerierung gemessen werden.

Bei der Herstellung des FluCa (aus FluCa Puffer und FluCa Substrat) mussten mindestens 1150 µl pro Versuchsdurchlauf entstehen (Anleitung in der Packungsbeilage; Verhältnis 40 : 1, Puffer : Substrat). Das FluCa wurde dann ins 37 °C warme Wasserbad gestellt.

Jetzt blieb Zeit, die 96-Well-Mikrotiterplatte so zu beschriften und zu pipettieren, wie zu anfangs auch die Versuchsreihen in der Thrombinoscope™ Software (Version 5.0.0.742) definiert wurden. Es wurde ein bestimmtes Pipettierschema eingehalten, in dem mit dem Kalibrator begonnen wurde, danach die PPP/PRP-Reagenzien pipettiert wurden, dann wurde der Tyrodepuffer und das Plasma (PRP/PFP) hinzugegeben.

Die Versuchsreihe mit Tyrode diente dazu, dass man einen Basalwert für PRP erhielt, der höchstens Hinweise auf eine Voraktivierung bzw. Reaktivität der Zellen gab, ohne jeglichen Einfluss von Triggersubstanzen der Gerinnung.

Erst zum Schluss, kurz vor der Messung, wurden Thrombin und Convulxin in die jeweiligen Wells pipettiert (siehe Abbildung 2 und Tabelle 10), damit es nicht zur verfrühten Aktivierung der Gerinnungskaskade kam.

## MATERIAL UND METHODEN

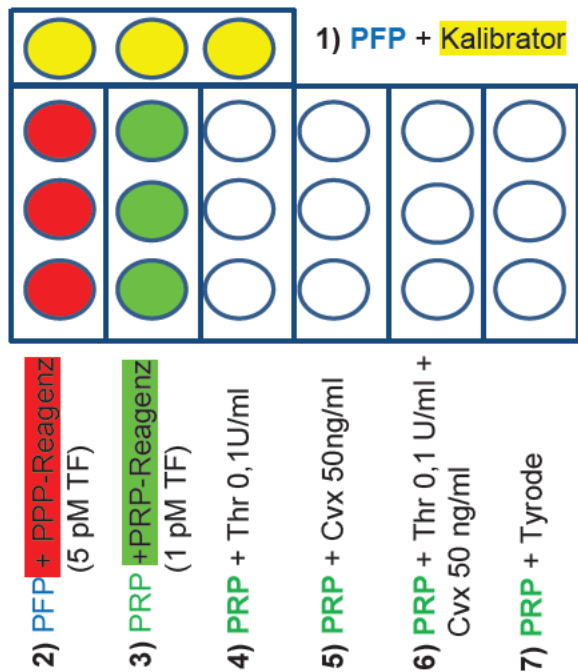


Abbildung 2: Pipettierschema der Versuchsreihen für die Thrombinoskop-Messungen mit PRP und PFP

Tabelle 10: Versuchsreihen für die Thrombinoskop-Messungen mit PRP und PFP

Versuchsreihe	1	2	3	4	5	6	7
Plasma	PFP	PFP	PRP	PRP	PRP	PRP	PRP
Reagenz	Thrombin Kalibrator	PPP-Reagenz (mit TF)	PRP-Reagenz (mit TF)	Bovines Thrombin	Convulxin	Bovines Thrombin + Convulxin	Tyrodepuffer
Endkonzentration im Well		5 pM TF, 4 µM Phospholipide	1 pM TF	0,1 U/ml	50 ng/ml	0,1 U/ml Thrombin + 50 ng/ml Convulxin	

Die Mikrotiterplatte wurde zügig in das Gerät eingelegt und ein Messintervall von 20 Sekunden für insgesamt 60 Minuten festgelegt. Dann wurde vom Gerät automatisch FluCa in die vorher definierten Versuchsreihen hinzugefügt und die Platte geschüttelt. Die Messungen starteten und endeten automatisch nach 60 Minuten. Die Thrombinoscope™ Software (Version 5.0.0.742) generierte eine Auflistung der fertiggestellten Thrombogramme, woraufhin die Daten in Excel exportiert werden konnten.

### **3.11.3 Thrombingenerierung isolierter Thrombozyten und mononukleärer Zellen**

Die Herstellung der isolierten Thrombozyten („washed platelets“, WP) erfolgte wie in 3.8 beschrieben. Die Konzentration der Thrombozyten wurde im Sysmex gemessen und auf 150.000/ $\mu$ l verdünnt.

Die Isolierung der MNC mit der angereicherten Monozytenfraktion erfolgte wie in 3.9 beschrieben. Die Monozyten-Konzentration wurde im Sysmex gemessen und auf  $0,5 \times 10^3$  Zellen/ $\mu$ l verdünnt.

Die Verdünnungen der WP wie auch der MNC erfolgten jeweils zum einen mit autologem PFP vom Patienten und zum anderen mit PFP eines gesunden Kontrollspenders (nicht aus der ET-Kontrollprobandengruppe). Mit dem Vergleich dieser Messungen in Eigenplasma (EP) wie in Kontrollplasma (KP) wurde speziell der Einfluss von Plasmabestandteilen auf die Thrombingenerierung der Thrombozyten bzw. der Monozyten untersucht.

Die Versuchsreihen mussten im CAT definiert und das Gerät auf 37 °C erwärmt werden.

Für diesen Versuch wurde nur ein Teil der Reagenzien aus dem vorher beschriebenen Versuch in Kapitel 3.11.2 benutzt, und zwar nur der Thrombin-Kalibrator, Tyrode (zur Bestimmung der basalen Thrombingenerierung), das PRP-Reagenz mit 1 pM TF und Thrombin (0,1 U/ml).

Das Pipettierschema ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Zuerst wurde der Kalibrator pipettiert. Es folgte das PRP-Reagenz, dann Tyrode und das PFP des Patienten. Als Nächstes wurde das MNC- und WP-Plasma pipettiert und zum Schluss das Thrombin (siehe Abbildung 3 und Tabelle 11). Die Mikrotiterplatte wurde in das Gerät gelegt, in dem die automatische Zugabe von FluCa erfolgte und die 60-minütige Messung begann.

## MATERIAL UND METHODEN

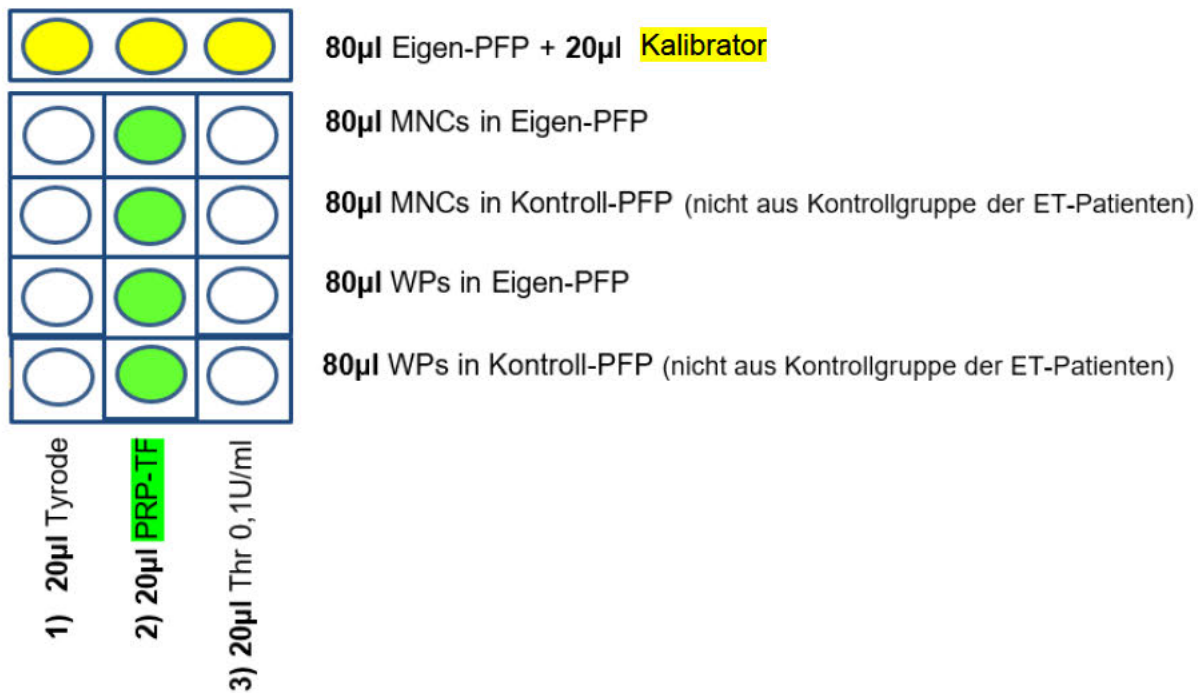


Abbildung 3: Pipettierschema der Versuchsreihen für die Thrombinoskop-Messungen mit MNC und WP

Tabelle 11: Versuchsreihen für die Thrombinoskop-Messungen für MNC und WP mit Plasmatauschversuchen (Eigen-Plasma (autolog) vs. Kontroll-Plasma (Plasma von gesundem Spender))

Versuchsreihe	1	2	3
Verdünnungen	MNC in Eigen-PFP	MNC in Eigen-PFP	MNC in Eigen-PFP
	MNC in Kontroll-PFP	MNC in Kontroll-PFP	MNC in Kontroll-PFP
	WP in Eigen-PFP	WP in Eigen-PFP	WP in Eigen-PFP
	WP in Kontroll-PFP	WP in Kontroll-PFP	WP in Kontroll-PFP
Reagenz [Endkonzentration im Well]	Tyrodepuffer	PRP-Reagenz [1 pM TF]	Bovines Thrombin [0,1 U/ml]

### 3.11.4 Auswertung der Thrombingenerierung

Mithilfe der Thrombinoscope™ Software wurden die gemessenen Daten pro Versuchsreihe als gemittelte Thrombingenerierungskurven dargestellt und die einzelnen Thrombin-Parameter (siehe unten) quantifiziert. Sie umfassen die gesamte Kinetik der Thrombinbildung, somit auch die verschiedenen Phasen der Gerinnungsreaktionen: die Initialphase der Thrombinbildung, die Expansionsphase, die Abschwächungsphase der Thrombinbildung und schließlich die Inaktivierungsphase des entstandenen Thrombins (132). Und damit werden auch alle pro- und antikoagulatorischen Reaktionen berücksichtigt, die die Thrombinformation beeinflussen (133).

Letztlich analysiert die CAT Parameter wie die „Lag time“, „Time to peak“, den „Thrombin peak“ und das endogene Thrombinpotential („endogene thrombinpotential“, ETP). Zur Begriffserläuterung dient die unten aufgeführte Übersichtstabelle (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Wichtigste Thrombogramm-Parameter**

Parameter	Erläuterung	Einheit
„Lag time“	Verzögerungszeit bis zum Start der Thrombinbildung	[min]
„Time to peak“	Zeit bis zum Erreichen des Peaks	[min]
„Thrombin peak“	Höchster gemessener Thrombinbildungswert während des gesamten Testdurchlaufs	[nM Thrombin]
<b>ETP (endogenes Thrombinpotential)</b>	Insgesamt gebildete Thrombinmenge im Zeitverlauf; entspricht der Fläche unter der Kurve	[nM x min]

(134-137)

Eine verlängerte „Lag time“ und „Time to peak“, ein erniedrigter „Thrombin peak“ sowie ein kleineres ETP zeigen einen hypokoagulatorischen Zustand an. Konträr dazu spiegeln eine verkürzte „Lag time“ und „Time to peak“, ein erhöhter „Thrombin peak“ und ein hohes ETP einen hyperkoagulatorischen Zustand wider. (136)

Die Parameter „Time to peak“, „Thrombin peak“ und ETP variieren jedoch recht unabhängig von der „Lag time“ und könnten eine abnormale TG anzeigen, auch wenn die „Lag time“ normal wäre (135).

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 DESKRIPTIVE STATISTIK

#### 4.1.1 Patientencharakteristika

Insgesamt wurden 22 Patienten mit essentieller Thrombozythämie (ET) für die Studie rekrutiert, von denen drei keiner Mutation zugeordnet werden konnten und somit als „triple-negativ“ galten. Diese ET-Patienten erfüllten die Einschlusskriterien nicht mehr und wurden von der Studie ausgeschlossen. Von den übrig gebliebenen 19 Patienten konnten bis zum Ablauf der Studie nur 13 für eine „Follow-up“-Untersuchung, mit etwa einem Jahr Abstand zum Ersteinschluss, gewonnen werden. Deshalb werden in dieser Dissertation die Follow-up-Untersuchungen von 13 ET-Patienten analysiert und mit der Erstuntersuchung (EE) intraindividuell verglichen. Dabei ist von besonderem Interesse, ob und wie sich die Thrombozytenfunktion sowie die plasmatische und thrombozytäre Thrombingenerierung seit der Erstuntersuchung verändert haben. Hierfür war zu evaluieren, ob ein Wechsel der Medikation zwischen den beiden Untersuchungsterminen stattfand oder ob Komplikationen (z.B. thromboembolische Ereignisse oder Erkrankungstransformationen) eintraten, sei es aufgrund der Medikation an sich oder der Erkrankung. In der unten aufgeführten Tabelle 13 sind jeweils patientenbezogen auf die 1. FU-Untersuchung die wichtigsten demographischen und klinischen Charakteristika aufgelistet und in der Tabelle 14 sind definierte Laborwerte von der 1. FU-Untersuchung zusammengestellt.

Insgesamt wiesen zehn Patienten eine *JAK2V617F*-Mutation auf, von denen vier zum Zeitpunkt der ersten Nachuntersuchung eine zytoreduktive Therapie mit Hydroxyurea (HU) erhielten. Von den restlichen sechs *JAK2V617F*-positiven Patienten erhielten vier von vornherein keine HU-Therapie und zwei von ihnen, P9 und P10, hatten zum 1. FU einen Therapiewechsel von HU auf Anagrelid. Im Gegensatz dazu hatten drei Patienten eine Calreticulin-Mutation (*CALR*). Nur ein *CALR*-positiver Patient wurde bereits im EE zweifach zytoreduktiv mit HU plus Anagrelid therapiert (P11), wohingegen P12 einen Therapiewechsel von HU auf pegyliertes Interferon- $\alpha$  (pegINF $\alpha$ ) hatte und bei P13 HU aufgrund zunehmender Anämie und fallender Thrombozytenzahlen (a.e. bedingt durch Entwicklung einer Post-ET-Myelofibrose) abgesetzt wurde ohne Ansetzen einer Alternativtherapie. Unabhängig davon nahmen im 1. FU die Mehrheit der ET-Patienten ASS (100 mg/Tag) ein (n = 11, Ausnahmen: P4, P9).

Fast alle Patienten (ausgenommen P5 und P6) wiesen zudem kardiovaskuläre Risikofaktoren (CVRF) auf. Darunter fielen Nikotinabusus, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie. Typische Symptome einer ET, wie Mikrozirkulationsstörungen (MZS), thromboembolische Ereignisse und Blutungen, traten auch in unserem Patientenkollektiv bereits vor der Erstevaluierung im EE auf. Die Mehrzahl der Patienten (n = 9) wies mindestens

## ERGEBNISSE

ein Blutungsereignis im Sinne einer hämorrhagischen Diathese auf; bei sechs Patienten wurden Mikrozirkulationsstörungen und bei vier Patienten thrombotische Komplikationen dokumentiert. Zum 1. FU sind allerdings bei keinem der Patienten neue derartige Ereignisse aufgetreten. Zwei Patienten (P9 und P13) zeigten einen komplikativen Krankheitsprogress zur sogenannten Post-ET-Myelofibrose.

**Tabelle 13: Auflistung demographischer und klinischer Merkmale der ET-Patienten im 1. FU**

(ET = essentielle Thrombozythämie, P = Patient, EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin, ASS = Acetylsalicylsäure, HU = Hydroxyurea, CVRF = Kardiovaskuläre Risikofaktoren, MZS = Mikrozirkulationsstörungen, vWS = von-Willebrand-Syndrom, Post-ET-MF = Post-ET-Myelofibrose, ♀ = weiblich, ♂ = männlich, X = vorhanden, \* = Therapiewechsel, a = anamnestisch diagnostiziert, l = laborchemisch diagnostiziert)

ET-Patienten (n = 13)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
<b>Geschlecht</b> (♂: ♀, 4:9)	♀	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♀
<b>Alter bei EE,</b> (in Jahren), ( $\bar{X}$ = 58,46)	59	87	69	77	30	51	52	56	51	56	59	42	71
<b>Alter 1. FU</b> (in Jahren), ( $\bar{X}$ = 59,62)	61	88	70	78	31	52	52	57	52	57	61	43	73
<b>Mutation</b>	<b>JAK2V617F</b>										<b>CALR</b>		
											Typ-2 Inser- -tion	Typ-1 Dele- -tion	Typ-2 Inser- -tion

ERGEBNISSE

ET-Patienten (n = 13)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
<b>Therapie:</b>													
<b>ASS (100 mg/d)</b>	X	X	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X	X
<b>+ HU</b>													
<b>im EE (n = 9)</b>	X	X	X	X	-	-	-	-	X	X	X (+ Ana- grelid)	X	X
<b>im 1. FU (n = 5)</b>	X	X	X	X	-	-	-	-	_*	_*	X (+ Ana- grelid)	_*	_*
<b>- HU</b>													
<b>im 1. FU (n = 8)</b>					X	X	X	X	X	X		X	X
<b>CVRF: (n = 11)</b>	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X
<b>Klinik:</b>													
<b>MZS (n = 6)</b>	X	-	-	-	X	X	-	-	X	X	X	-	-
<b>Thrombose (n=4)</b>	-	-	X	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-
<b>Blutungs- ereignis (n = 9)</b>	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
<b>Erworbenes vWS (n = 7)</b>	Xa	-	-	-	Xa,l	Xa	Xa	-	Xa	Xa	-	-	Xa
<b>Progression zur Post-ET-MF (n = 2)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X

## ERGEBNISSE

Wie sich aus der Tabelle 14 ablesen lässt, sind in der Mehrzahl der Fälle, bei neun (P2, P4, P5, P6, P7, P9, P10, P12, P13) von 13 Patienten, die Thrombozytenkonzentrationen nach mindestens einjähriger Therapie vom EE zum 1. FU gesunken, wobei zu vermerken sei, dass hierunter auch Patienten ohne zytoreduktive Therapien waren (P5, P6, P7, P13). Im Gegensatz dazu hat P8 (keine zytoreduktive Therapie) im 1. FU eine nahezu gleichbleibende Thrombozytenkonzentration wie im EE gezeigt. Auffällig war, dass der Patient P1 mit einer deutlichen Steigerung der Thrombozytenkonzentration reagiert hat, obwohl er einer zytoreduktiven Therapie mit HU unterzogen wurde (siehe Tabelle 13). Die durchschnittliche Thrombozytenkonzentration der ET-Patienten im 1. FU betrug  $497,77 \times 10^9/l$ , wohingegen sie im EE noch bei  $639,69 \times 10^9/l$  lag. Dies spiegelte zwar insgesamt eine Tendenz zur Normalisierung der Thrombozytenkonzentration wider, jedoch konnte im Schnitt der Referenzbereich von  $150 - 400 \times 10^9/l$  (orientiert an Sysmex KX-21N Referenzwerten) nicht erreicht werden. Immerhin lagen die Thrombozytenkonzentrationen von sechs Patienten (P2, P3, P4, P8, P9, P13) im 1. FU direkt im Referenzbereich.

Im EE gab es zwei Patienten (P5, P12) mit einer extremen Thrombozytose von über  $1000 \times 10^9/l$ , wobei sich die Werte im 1. FU bei P5 kaum veränderten (P5 hatte keine zytoreduktive Therapie aufgrund eines günstigen Risikoprofils inklusive jungen Alters; watch and wait Strategie) und sich bei P12 jedoch ein großer Therapieerfolg einstellte (durch den Wechsel von HU auf pegINF $\alpha$ ) mit einer Senkung der Thrombozytenkonzentration um mehr als 50 % vom EE zum 1. FU.

Die Leukozytenkonzentrationen der ET-Patienten lagen im Mittel bei  $6,5 \times 10^9$  Leukozyten/l (Sysmex-KX-21N Referenzwerte:  $4-10 \times 10^9/l$ ) und damit im Referenzbereich. Die Erythrozytenkonzentrationen lagen hingegen bei  $\bar{X} = 4,15 \times 10^6/\mu l$  (Sysmex-KX-21N Referenzwerte: ♀ =  $4,2 - 5,4 \times 10^6/\mu l$ ; ♂ =  $4,6 - 6,2 \times 10^6/\mu l$ ) und damit sogar im Schnitt unterhalb des Referenzbereiches.

Dem Patienten P5 wurde ein erworbenes von-Willebrand-Syndrom auch laborchemisch diagnostiziert (siehe Tabelle 13 und Tabelle 14), da er im Verhältnis zum vWF-Antigen-Spiegel eine abnorm niedrige vWF-Aktivität aufwies (qualitativer vWF-Mangel(138)) und die vWF-Aktivität/-Antigen Ratio somit kleiner als 0,7 war. Dieser Patient P5, aber auch die anderen Patienten mit einem erworbenen von-Willebrand-Syndrom (P1, P6, P7, P9, P10, P13) bzw. diejenigen mit einer gleichzeitigen vWF-Aktivität/-Antigen Ratio  $>0,7$  (P6, P7, P9, P10, P13) hatten ein Blutungsereignis.

Zudem zeigen die Laborwerte, dass die *JAK2V617F*-positiven Patienten (P1–P10) im Vergleich zu den *CALR*-positiven Patienten (P11–P13) mehrheitlich höhere, wenngleich im physiologischen Bereich liegende Hämoglobin- und Hämatokritwerte aufwiesen.

ERGEBNISSE

**Tabelle 14: Auflistung definierter Laborparameter der ET-Patienten im 1. FU**

(ET = essentielle Thrombozythämie, P = Patient, EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, vWF = von-Willebrand-Faktor, X = vorhanden, \* = diagnostiziertes erworbenes von-Willebrand-Syndrom)

ET-Patienten		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
Thrombozytenkonzentration, [x10 <sup>9</sup> /l]	EE	467	452	343	267	1157	764	651	378	781	991	436	1128	501
	1. FU	710	397	344	353	1045	622	631	371	224	434	482	526	332
Leukozytenkonzentration, [x10 <sup>9</sup> /l]	1. FU	6,1	8	6	5,5	8	7	5,2	4,8	11,5	6,1	7,3	3,6	6
Erythrozytenkonzentration, [x10 <sup>6</sup> /µl]	1. FU	4,08	3,78	4,57	3,09	4,58	4,2	4,35	5,09	5,5	4,3	2,76	4,22	3,44
Hämoglobinkonzentration, [g/dl]	1. FU	12,8	13	13,8	12,9	13,1	12,2	13,8	13,3	15,3	13,2	9,7	11,7	9,5
Hämatokrit, [%]	1. FU	38,8	38,4	40,8	34,7	39,1	36,8	38,7	40,6	49	40	28,2	35,1	28,5
Fibrinogenkonzentration, [mg/dl]	1. FU	271	326					152	273	411	326		395	304
vWF-Antigen, [%]	1. FU		154			85	119	138		214	98		156	129
vWF-Aktivität, [%]	1. FU		140			50	89	96		178	92		116	98
vWF-Aktivität/-Antigen Ratio	>0,7		X				X	X		X	X		X	X
	<0,7					X*								

### 4.1.2 Kontrollprobandencharakteristika

Um einen Vergleich zu den Messergebnissen der ET-Patienten anzustellen, wurden in dieser Studie zehn gesunde Kontrollprobanden rekrutiert. Anamnestisch waren sie völlig gesund und wiesen keinerlei pathologische Auffälligkeiten in ihren Blutwerten auf. Das Blut dieser zehn Kontrollprobanden wurde sowohl ohne ASS-Einnahme (oder anderer Blutwerte-beeinflussender Medikamente) als auch nach einer dreitägigen ASS-Einnahme von 100 mg/d abgenommen, untersucht und ausgewertet. Die Geschlechterverteilung war ausgeglichen (fünf weibliche und fünf männliche Probanden) und das durchschnittliche Alter beider Kontrollgruppen lag gerundet zwischen 38 und 39 Jahren. Weitere Probandenmerkmale sowie selektierte Laborwerte zum Zeitpunkt der Blutuntersuchungen finden sich in der unten aufgeführten Tabelle 15.

**Tabelle 15: Auflistung demographischer Merkmale und Laborparameter der Kontrollprobanden, jeweils zum Zeitpunkt ohne und nach dreitägiger ASS-Einnahme (100mg/d)**

(ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl)

	Kontrollprobanden OHNE ASS	Kontrollprobanden MIT ASS
<b>Gesamtzahl (n)</b>	10	10
<b>weiblich (n)</b>	5	5
<b>männlich (n)</b>	5	5
<b>Alter zum Untersuchungszeitpunkt in Jahren im <math>\bar{x}</math>, (Range)</b>	38,4 (23–68)	39,2 (24–69)
<b>Thrombozytenkonzentration [<math>\times 10^9/l</math>] im <math>\bar{x}</math>, (Range)</b>	236,1 (174–300)	228,3 (167–291)
<b>Leukozytenkonzentration [<math>\times 10^9/l</math>] im <math>\bar{x}</math>, (Range)</b>	5,19 (4–6,5)	4,63 (2,9–5,7)
<b>Erythrozytenkonzentration [<math>\times 10^6/\mu l</math>] im <math>\bar{x}</math>, (Range)</b>	4,35 (3,64–4,65)	4,35 (3,87–4,88)
<b>Hämoglobin [g/dl] im <math>\bar{x}</math>, (Range)</b>	12,92 (9,3–14,2)	12,9 (10,8–14,7)
<b>Hämatokrit (%) im <math>\bar{x}</math>, (Range)</b>	41,67 (29,3–40,8)	37,7 (32,3–43,1)

## 4.2 EXPLORATIVE DATENANALYSE

### 4.2.1 Gruppenvergleiche im 1. Follow-up

In den folgenden Unterkapiteln wurde die Thrombozytenfunktion der ET-Patienten im 1. FU mit den Kontrollgruppen (mit und ohne ASS-Therapie) verglichen. Dabei wurden die Messungen mit einem Lumi-Aggregometer und einem Thrombinoskop („Calibrated automated thrombogram“, CAT) durchgeführt, wobei sich in der Ergebnisdarstellung auf ausgewählte Parameter konzentriert wurde.

Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Patienten nach ihren Mutationen und der zytoreduktiven Therapie mit HU in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt. So ergab sich eine Gruppe mit *JAK2V617F*-positiven Patienten unter HU-Therapie ( $n = 4$ ), eine Gruppe mit *JAK2V617F*-positiven Patienten ohne HU-Therapie ( $n = 6$ ), eine Gruppe mit einem *CALR*-positiven Patienten unter HU-Therapie ( $n = 1$ ) und die letzte Gruppe mit *CALR*-positiven Patienten ohne HU-Therapie ( $n = 2$ ). Um Vergleiche zu den Kontrollprobanden zu ermöglichen, wurden die Werte der Kontrollgruppen mit sowie ohne ASS-Therapie in die grafische Darstellung integriert.

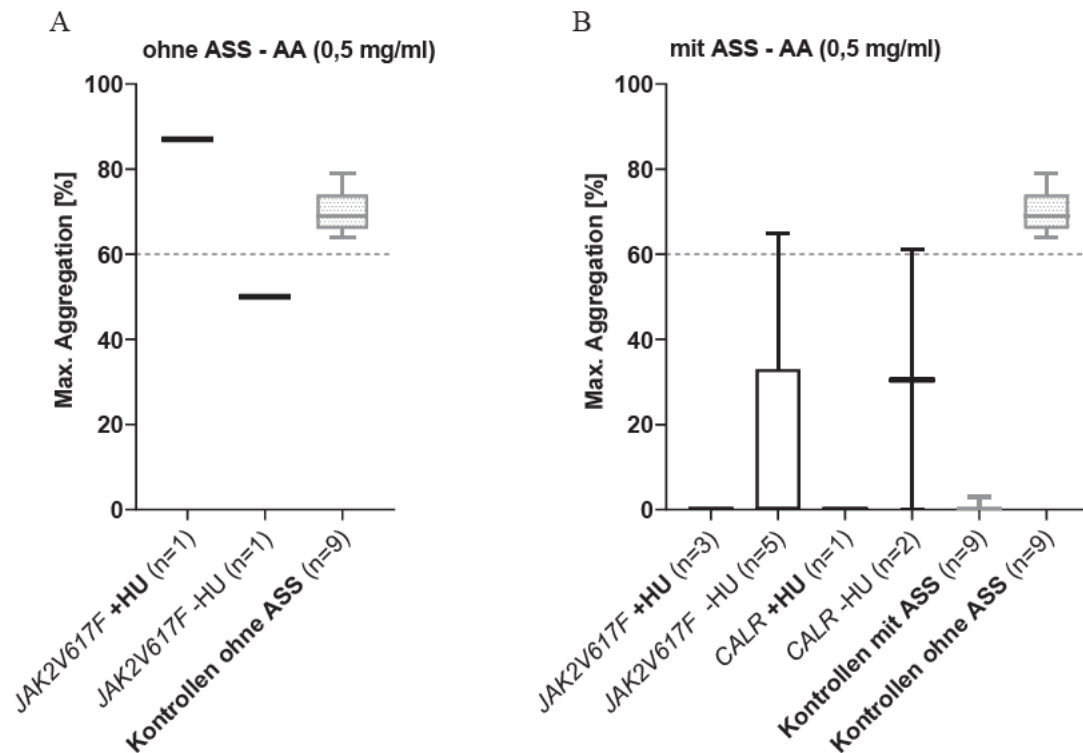
Wie die statistische Analyse bei den Gruppenvergleichen durchgeführt wurde, wird im Kapitel „3.5.5 Statistische Datenauswertung“ beschrieben. Statistische Vergleichstests (Unpaired t-test, Mann-Whitney test) konnten aufgrund des geringen Patientenkollektivs nur mit den Gruppen  $n \geq 3$  durchgeführt werden. Somit gibt es keine statistischen Gruppenvergleichstests mit den *CALR*-positiven Patienten, sondern nur zwischen den *JAK2V617F*-positiven Patienten und den beiden Kontrollgruppen mit und ohne ASS. Falls sich eine statistische Auffälligkeit ( $p < 0,05$ ) bei den Gruppenvergleichen darstellen ließ, sind die dazugehörigen p-Werte immer im Fließtext erwähnt. Die kompletten statistischen Auswertungen durch die Statistiksoftware GraphPad Prism 8.3.1 mit p-Werten und deskriptiver Statistik (Minimum, 25 % Perzentile, Median, 75 % Perzentile und Maximum) finden sich im Anhang.

#### 4.2.1.1 Messung der Agonisten-induzierten thrombozytären Aggregation mittels Lumi-Aggregometrie

Durch Stimulation der Thrombozyten mit Agonisten in hoher Konzentration – wie 0,5 mg/ml Arachidonsäure (AA), 10 mg/ml Kollagen sowie 50  $\mu$ M TRAP-6 – werden hohe Aggregationswerte erwartet. Aufgrund laborinterner Kontrolluntersuchungen und nach Althaus *et al.* (139) wurde deshalb ein Cut-Off-Wert von  $\geq 60$  % maximaler Aggregation festgelegt, der nur in den dazugehörigen Grafiken zur übersichtlicheren Darstellung auch als gestrichelte Linie integriert wurde.

In den unten aufgeführten Messergebnissen der Lumi-Aggregometrie besteht die Kontrollgruppe nur aus 9 Kontrollprobanden (aufgrund von nicht verwertbaren Daten eines Kontrollprobanden) im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem CAT (10 Kontrollprobanden).

4.2.1.1.1 ARACHIDONSÄURE-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE AGGREGATION



**Abbildung 4: Arachidonsäure-induzierte thrombozytäre Aggregation.**

Darstellung der maximalen thrombozytären Aggregation in % der jeweiligen Gruppe. Durchführung der Versuche im Chrono-Log-Aggregometer unter Verwendung von PRP plus Chrono-Lume Lumineszenz-Reagenz und Zugabe von 0,5 mg/ml Arachidonsäure. **A)** Aggregationsantworten der JAK2V617F-positiven Patientengruppen (mit und ohne HU-Therapie) als auch der Kontrollgruppe jeweils ohne ASS-Therapie. **B)** Aggregationsantworten der JAK2V617F-positiven sowie CALR-positiven Patientengruppen und der Kontrollgruppen jeweils mit ASS-Therapie. Gestrichelte Linie stellt in A) und B) den Cut-Off-Wert von  $\geq 60\%$  dar.

(ASS = Acetylsalicylsäure, AA = Arachidonsäure, JAK2V617F = eine Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, n = Anzahl.)

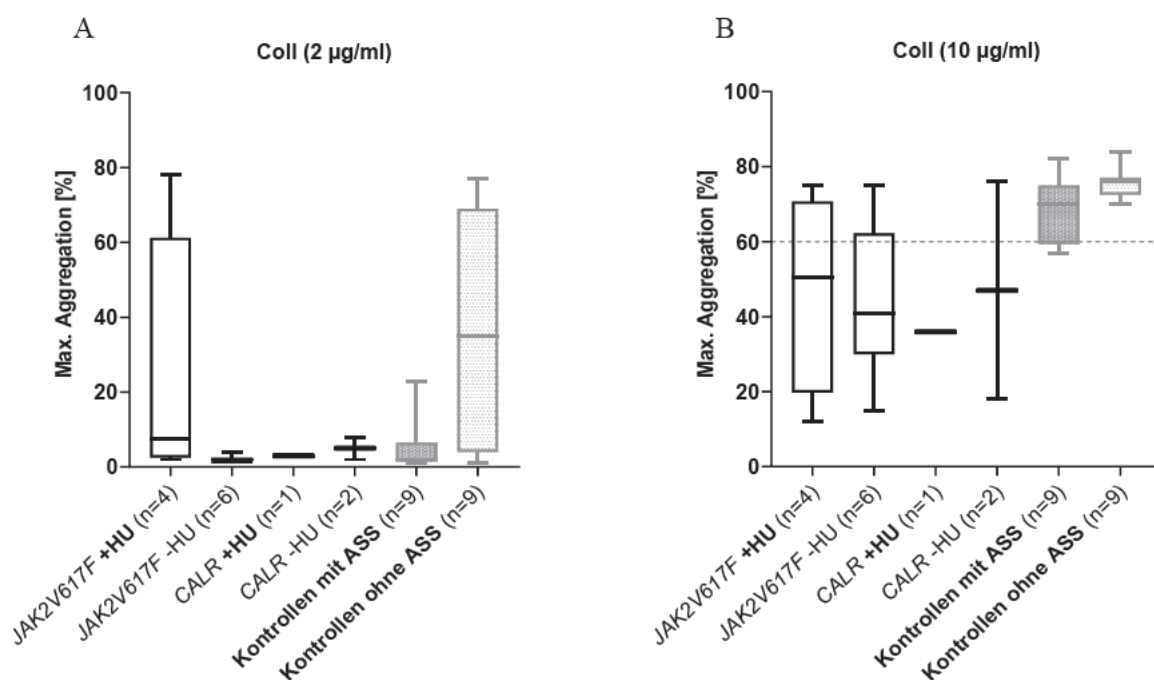
Die Abbildung 4 zeigt die Aggregationsreaktionen der Thrombozyten auf die Gabe von 0,5 mg/dl AA. In der Grafik A sind die Ergebnisse auf die Gabe von AA der einzigen zwei Patienten (P4, P9) dargestellt, die keine ASS-Therapie erhielten. Bei diesen Patienten wird die Umwandlung des Agonisten AA zu TxA<sub>2</sub> nicht durch ASS gehemmt, sodass durch die gegebene AA ungehindert TxA<sub>2</sub> gebildet und die Thrombozyten aktiviert werden können. Da das Patientenkollektiv n < 3 war, konnte hier keine statistische Analyse durchgeführt werden. Der JAK2V617F-positive Patient mit HU-Therapie (P4) überstieg den Cut-Off-Wert von  $\geq 60\%$  und hatte eine tendenziell höhere Aggregation (87 %) erreicht als die zu vergleichende Kontrollgruppe ohne ASS-Therapie (Median: 69 %), wohingegen der JAK2V617F-positive Patient ohne HU-Therapie (P9) eine tendenziell geringere Aggregation (50 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS erreichte und prozentual unterhalb des vorher definierten Cut-Off-Werts lag.

## ERGEBNISSE

In Grafik B sind die Patienten mit einer ASS-Therapie dargestellt. Vergleichend dazu wurden auch die Kontrollprobandengruppen ohne ASS und mit ASS in die Grafik einbezogen. Vergleicht man die Grafik A mit Grafik B, so fällt auf, dass die Aggregationswerte in Grafik B deutlich niedriger ausfielen. Mit Ausnahme der Kontrollgruppe ohne ASS lagen die Medianwerte aller Gruppen deutlich unterhalb des Cut-off-Werts. Die Thrombozyten der Gruppen „JAK2V617F +HU“ und „CALR +HU“ reagierten sogar gar nicht auf die Zugabe von AA (max. Aggregation = 0 %). Auffällig ist, dass jeweils in der Gruppe „JAK2V617F –HU“ (P7) und auch „CALR –HU“ (P12) ein Patient war, dessen Thrombozyten physiologisch (Aggregation lag, wie die der „Kontrollen ohne ASS“, oberhalb des Cut-Off-Werts) reagierten, als ob die Patienten kein ASS eingenommen hätten. Hier stellt sich einerseits die Frage nach der Patienten-Adhärenz und der korrekten Einnahme von ASS nach Therapievereinbarung und andererseits die Frage, ob vielleicht für diese Patienten sogar eine höhere ASS-Gabe notwendig gewesen wäre (vgl. Kapitel 2.1.7 Therapie).

Vergleicht man die beiden Kontrollgruppen in Grafik B miteinander, so ergibt sich eine statistische Auffälligkeit ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney test), denn die „Kontrollen mit ASS“ wiesen mit einem Medianwert von 0 % deutlich niedrigere Aggregationswerte auf als die „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 69 %). Ebenfalls zeigten die „JAK2V617F +HU“ Patienten ( $p < 0,0001$ , Unpaired t-test) und „JAK2V617F –HU“ Patienten ( $p = 0,0025$ , Mann-Whitney test) jeweils unter ASS-Therapie statistisch auffällig verminderte Aggregationswerte im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“.

4.2.1.1.2 KOLLAGEN-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE AGGREGATION



**Abbildung 5: Kollagen-induzierte thrombozytäre Aggregation bei Zugabe von 2 µg/ml (A) und 10 µg/ml (B).**

Darstellung der maximalen thrombozytären Aggregation in % der jeweiligen Gruppe. Durchführung der Versuche im Chrono-Log-Aggregometer unter Verwendung von PRP plus Chrono-Lume Lumineszenz-Reagenz und Zugabe von 2 µg/ml (A) sowie 10 µg/ml (B) Kollagen. **A)** Aggregationsantworten der JAK2V617F - wie auch CALR-positiven Patientengruppen (jeweils mit und ohne HU-Therapie) als auch der Kontrollgruppen mit/ohne ASS-Therapie nach Zugabe von 2 µg/ml Kollagen. **B)** Aggregationsantworten der JAK2V617F - wie auch CALR-positiven Patientengruppen (jeweils mit und ohne HU-Therapie) als auch der Kontrollgruppen mit/ohne ASS-Therapie nach Zugabe von 10 µg/ml Kollagen; inkl. Darstellung des Cut-Off-Wertes von ≥ 60 % als gestrichelte Linie.

(ASS = Acetylsalicylsäure, Coll = Kollagen, JAK2V617F = eine Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, n = Anzahl.)

Die Abbildung 5 stellt die Aggregationsreaktionen der Thrombozyten auf die Gabe von zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Kollagen dar. Aufgrund des geringen Patientenbestands wurde in dieser und den folgenden Abbildungen auf die Berücksichtigung der ASS-Therapie der ET-Patienten verzichtet und sich nur auf die Differenzierung der Gruppen nach Mutationstyp und HU-Therapie konzentriert.

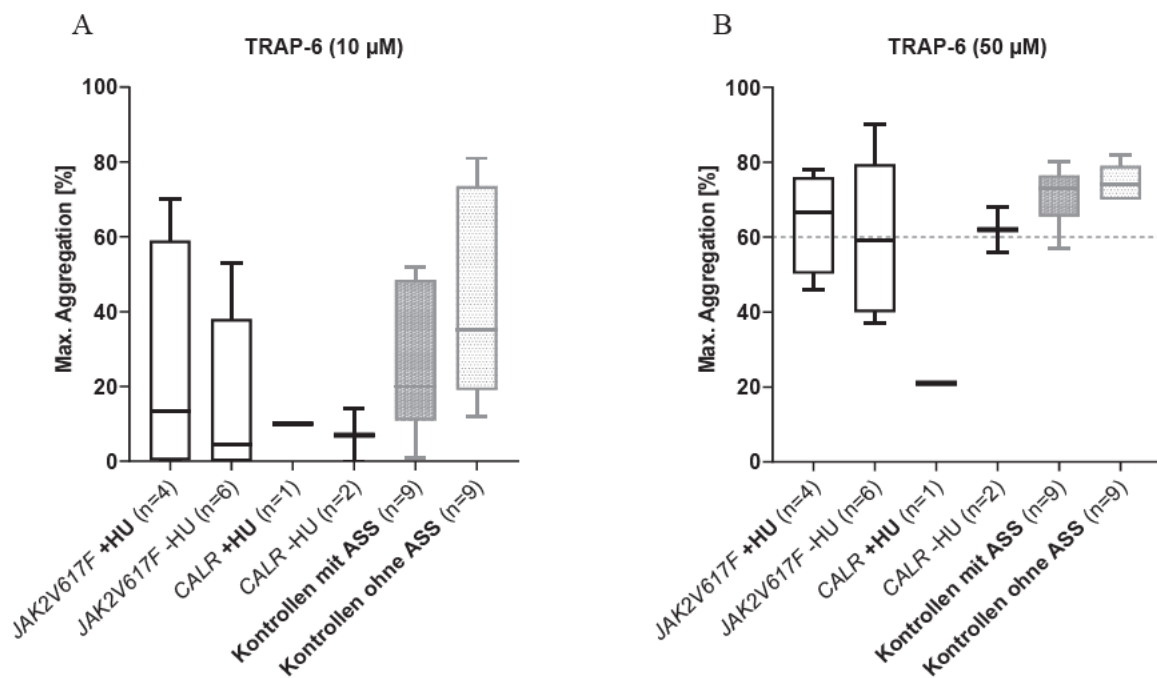
Grafik A stellt die Ergebnisse nach Zugabe einer intermediären Kollagenkonzentration von 2 µg/ml dar, wobei deutlich zu erkennen ist, dass das Aggregationsverhalten der Thrombozyten durch diesen Agonisten im Vergleich zur höheren Konzentration von 10 µg/ml in Grafik B, mit den Medianwerten in allen dargestellten Gruppen sehr viel geringer ausfällt. Die Thrombozyten der „Kontrollen mit ASS“ verhielten sich ähnlich in der geringen Aggregationsantwort zu allen anderen Patientengruppen (die mehrheitlich auch unter ASS-Therapie standen; n = 11). Im statistischen Gruppenvergleich zeigte sich auch hier kein hinreichender statistischer Unterschied. Der Medianwert der „Kontrollen ohne ASS“ lag

## ERGEBNISSE

hingegen bei 35 % und damit viel höher als der Medianwert der *JAK2V617F*-positiven Patienten ohne HU-Therapie mit einem Wert von 2 %. In der Analyse war ausschließlich dieser Unterschied in den Gruppenvergleichen statistisch auffällig ( $p = 0,0248$ , Unpaired t-test).

In Grafik B sind die Ergebnisse nach Zugabe einer hohen Kollagenkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  dargestellt. Nur die Kontrollgruppen überstiegen den bei dieser höheren Agonistenkonzentration erwarteten Cut-Off-Wert von 60 %, wobei die „Kontrollen ohne ASS“ den höchsten Medianwert von 76 % Aggregation erreichte. Im Gegensatz dazu wiesen die „*CALR*-positiven Patienten mit HU“ einen sehr niedrigen Medianwert von nur 36 % auf, wobei die restlichen Patientengruppen im Vergleich dazu tendenziell leicht höhere Aggregationsmedianwerte zeigten. In der statistischen Auswertung zeigten die „*JAK2V617F*-positiven Patienten mit HU“ eine statistisch auffällig niedrigere Aggregation im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ ( $p = 0,0465$ , Unpaired t-test) und den „Kontrollen ohne ASS“ ( $p = 0,0069$ , Unpaired t-test). Die „*JAK2V617F*-positiven Patienten ohne HU“ zeigten dazu eine statistisch noch auffällig niedrigere Aggregation im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ ( $p = 0,0079$ , Unpaired t-test) sowie „ohne ASS“ ( $p = 0,0006$ , Unpaired t-test). Auch im Vergleich der Kontrollgruppen untereinander fiel nach Zugabe von 10  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen ein statistisch nennenswerter Unterschied auf ( $p = 0,031$ , Unpaired t-test) zwischen den geringeren Aggregationswerten der „Kontrollen mit ASS“ und den höheren Werten der „Kontrollen ohne ASS“.

4.2.1.1.3 TRAP-6-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE AGGREGATION



**Abbildung 6: TRAP-6-induzierte thrombozytäre Aggregation bei Zugabe von 10 µM (A) und 50 µM (B).**

Darstellung der maximalen thrombozytären Aggregation in % der jeweiligen Gruppe. Durchführung der Versuche im Chrono-Log-Aggregometer unter Verwendung von PRP plus Chrono-Lume Lumineszenz-Reagenz und Zugabe von 10 µM (A) und 50 µM (B) TRAP-6. **A)** Aggregationsantworten der *JAK2V617F* - wie auch *CALR*-positiven Patientengruppen (jeweils mit und ohne HU-Therapie) als auch der Kontrollen mit/ohne ASS-Therapie nach Zugabe von 10 µM TRAP-6. **B)** Aggregationsantworten der *JAK2V617F* - wie auch *CALR*-positiven Patientengruppen (jeweils mit und ohne HU-Therapie) als auch der Kontrollen mit/ohne ASS-Therapie nach Zugabe von 50 µM TRAP-6; inkl. Darstellung des Cut-Off-Wertes von  $\geq 60\%$  als gestrichelte Linie.

(ASS = Acetylsalicylsäure, TRAP-6 = Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid-6, *JAK2V617F* = eine Januskinase-2-Mutation, *CALR* = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, n = Anzahl)

Die Abbildung 6 stellt die Aggregationsreaktionen der Thrombozyten auf die Gabe von zwei unterschiedlichen Konzentrationen von TRAP-6 dar. Grafik A stellt die Ergebnisse nach Zugabe einer intermediären TRAP-6-Konzentration von 10 µM dar, wobei auch hier deutlich zu erkennen ist, dass das Aggregationsverhalten aller dargestellter Gruppen durch die niedrigere Agonistenkonzentration im Vergleich zur höheren in Grafik B sehr viel geringer ausfällt. Nach Zugabe von 10 µM reagierten die „Kontrollen mit und ohne ASS“ beide im Median mit höheren Aggregationswerten als die Patientengruppen. Im statistischen Vergleich fiel aber nur zwischen den „Kontrollen ohne ASS“ und den „*JAK2V617F*-positiven Patienten ohne HU“ ein relevanter Unterschied auf ( $p = 0,039$ , Mann-Whitney test).

In Grafik B sind die Ergebnisse nach Zugabe einer hohen TRAP-6-Konzentration von 50 µM dargestellt. Dabei erreichten die „*JAK2V617F*-positiven Patienten mit HU“ (Median: 66,5 %), die „*CALR*-positiven Patienten ohne HU“ (Median: 62 %) und die „Kontrollgruppe mit ASS“

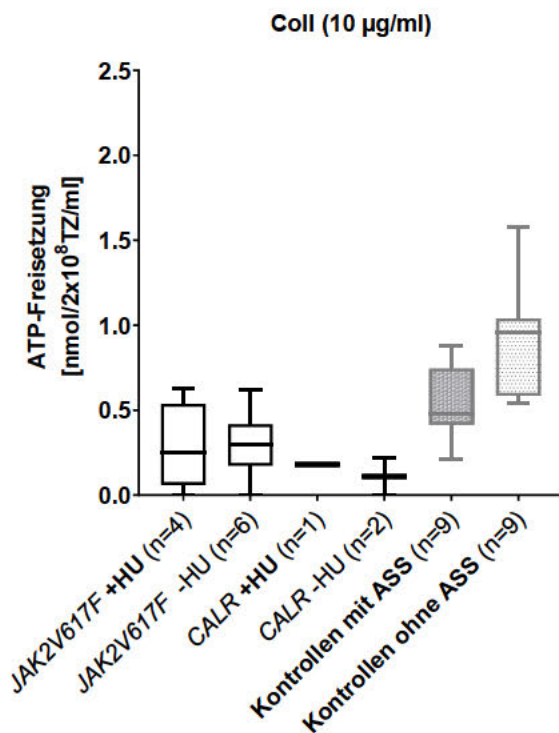
## ERGEBNISSE

(Median: 73 %) und die „Kontrollgruppe ohne ASS“ (Median: 74 %) normale Aggregationsmedianwerte oberhalb des vorher definierten und eigentlich erwarteten Cut-Off-Werts von  $\geq 60$  %. Die Aggregationswerte der „JAK2V617F-positiven Patienten ohne HU“ lagen im Median (59 %) nur dezent unterhalb der Cut-Off-Grenze, wohingegen die Thrombozyten der „CALR-positiven Patienten mit HU“ trotz der hohen TRAP-6-Konzentration am wenigsten aggregierten mit einem Medianwert von nur 21 %. Die Unterschiede der Aggregationswerte zwischen den unterschiedlichen Patienten- und Kontrollprobandengruppen waren für keine der Analysen mithilfe des T-Tests statistisch auffällig ( $p \geq 0,05$ ).

### **4.2.1.2 Messung der Agonisten-induzierten thrombozytären ATP-Freisetzung mittels Lumi-Aggregometrie**

Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass bei einer ausreichenden Aggregation von über 60 % auch die ADP- und ATP-Sekretion aus den  $\delta$ -Granula der Thrombozyten adäquat funktioniert und somit auswertbar ist. Um eine maximale Aggregation zu erzielen und die aus den  $\delta$ -Granula sezernierte ADP-Menge dann berechnen zu können, hatte man die Versuchsreihe mit Kollagen 10  $\mu\text{g/ml}$  plus Kreatinphosphat plus Kreatinphosphokinase (Coll10 + CP + CPK) erstellt. Bei ausreichender Aggregation hätten somit über die sezernierte ADP-Menge und die Erstellung der ADP/ATP-Ratio Rückschlüsse auf eine sekretionsabhängige Störung oder einen Defekt der  $\delta$ -Granula gezogen werden können (siehe Kapitel 3.10.3). Zu diesem Thema erfolgten genauere Untersuchungen in den Dissertationen von Dr. med. [REDACTED] [REDACTED] und Dr. med. [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] (ehemalige Medizindoktorandinnen der AG Jurk im CTH, Universitätsmedizin Mainz). In dieser Arbeit fielen jedoch die Aggregationsantworten auf den vielversprechenden Agonisten Kollagen in Kombination mit CP und CPK noch viel geringer aus (Mittelwert: 25,85 %) als bei den Versuchen nur mit Kollagen 10  $\mu\text{g/ml}$  (Mittelwert: 43 %). Möglicherweise haben sich die Substanzen gegenseitig beeinflusst und in der Lumi-Aggregometrie behindert, sodass keine adäquaten und auswertbaren Ergebnisse entstanden sind. Die quantitative Ermittlung der ADP-Freisetzung aus den  $\delta$ -Granula konnte letztendlich nicht durchgeführt werden. Diesbezüglich wurde entschieden, ausschließlich Grafiken zu den Ergebnissen der ATP-Freisetzung nach Zugabe der höchsten Agonistenkonzentrationen – 10  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen sowie 50  $\mu\text{M}$  TRAP-6 - zu erstellen; selbst wenn längst nicht alle Patientengruppen mit ihren Aggregationsmedianwerten über dem Cut-Off-Wert von  $\geq 60$  % lagen.

4.2.1.2.1 KOLLAGEN-INDUZIERTE ATP-FREISETZUNG



**Abbildung 7: Kollagen-induzierte ATP-Freisetzung**

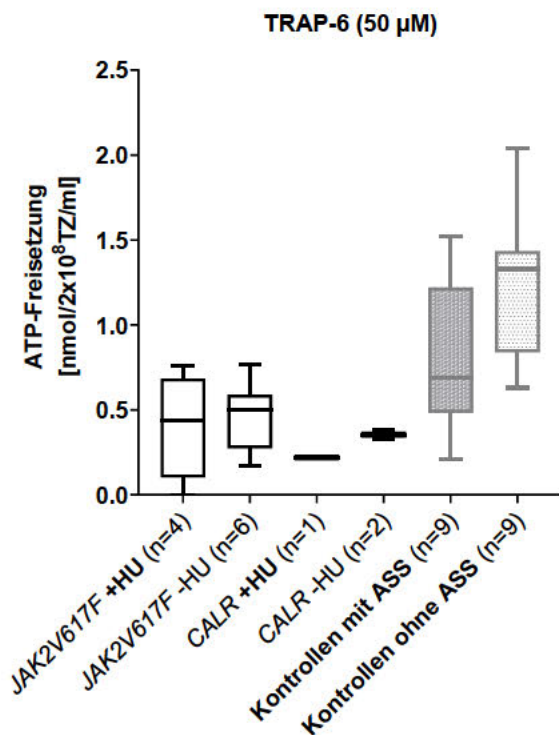
Darstellung der thrombozytären ATP-Freisetzung (in nmol/2x10<sup>8</sup> Thrombozyten/ml) der JAK2V617F- wie auch CALR-positiven Patientengruppen (jeweils mit und ohne HU-Therapie) als auch der Kontrollen mit/ohne ASS-Therapie. Durchführung der Versuche im Chrono-Log-Aggregometer unter Verwendung von PRP plus Chrono-Lume Lumineszenz-Reagenz und Zugabe von 10 µg/ml Kollagen. (ASS = Acetylsalicylsäure, ATP = Adenosintri-phosphat, CALR = Calreticulin-Mutation, Coll = Kollagen, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, JAK2V617F = eine Januskinase-2-Mutation, TZ = Thrombozyten, n = Anzahl)

Die Abbildung 7 zeigt die ATP-Freisetzung der Thrombozyten von den Patienten- wie auch Kontrollprobanden als Reaktion auf die Zugabe von 10 µg/ml Kollagen. Im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“ fiel die ATP-Freisetzung in allen anderen dargestellten Gruppen geringer aus. Vergleicht man die beiden Kontrollgruppen miteinander, so sezernierten die „Kontrollen mit ASS“ mit ihrem Median von 0,48 nmol/2x10<sup>8</sup> Thrombozyten/ml gerade mal nur halb so viel an ATP wie die „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 0,96 nmol/2x10<sup>8</sup>).

In der statistischen Auswertung sezernierten die Thrombozyten der „JAK2V617F-positiven Patienten mit HU“ (p = 0,0077, Unpaired t-test), „JAK2V617F-positiven Patienten ohne HU“ (p = 0,0018, Unpaired t-test) sowie die „Kontrollen mit ASS“ (p = 0,0149, Unpaired t-test) sogar statistisch auffällig geringere Mengen an ATP im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“.

Im Median zeigte sich bei den „CALR-positiven Patienten (+/- HU)“ eine tendenziell geringere ATP-Freisetzung im Vergleich den „JAK2V617F-positiven Patienten (+/- HU)“.

4.2.1.2.2 TRAP-6-INDUZIERTE ATP-FREISETZUNG



**Abbildung 8: TRAP-6-induzierte ATP-Freisetzung**

Darstellung der thrombozytären ATP-Freisetzung (in nmol/2x10<sup>8</sup> Thrombozyten/ml) der JAK2V617F- wie auch CALR-positiven Patientengruppen (jeweils mit und ohne HU-Therapie) als auch der Kontrollen mit/ohne ASS-Therapie. Durchführung der Versuche im Chrono-Log-Aggregometer unter Verwendung von PRP plus Chrono-Lume Lumineszenz-Reagenz und Zugabe von 50 µM TRAP-6. (ASS = Acetylsalicylsäure, ATP = Adenosintri-phosphat, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, JAK2V617F = eine Januskinase-2-Mutation, TRAP-6 = Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid-6, TZ = Thrombozyten, n = Anzahl.)

Die Abbildung 8 zeigt die ATP-Freisetzung der Thrombozyten von den Patienten- wie auch Kontrollgruppen als Reaktion auf die Zugabe von 50 µM TRAP-6. Im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“ fiel die ATP-Freisetzung in allen anderen dargestellten Gruppen deutlich geringer aus. In der statistischen Auswertung sezernierten die Thrombozyten der „JAK2V617F-positiven Patienten mit HU“ (p = 0,0051, Unpaired t-test), „JAK2V617F-positiven Patienten ohne HU“ (0,0012, Unpaired t-test) sowie die „Kontrollen mit ASS“ (p = 0,0409 Unpaired t-test) sogar statistisch auffällig geringere Mengen an ATP im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“.

Die „Kontrollen mit ASS“ (mit gesunden Thrombozyten und Granulafunktion) zeigten im Vergleich zu den anderen Patientengruppen (die größtenteils auch ASS einnahmen) aber keinen signifikanten Unterschied in der ATP-Freisetzung.

Im Median zeigte sich bei den „CALR-positiven Patienten (+/- HU)“ eine tendenziell geringere ATP-Freisetzung im Vergleich den „JAK2V617F-positiven Patienten (+/- HU)“.

#### **4.2.1.3 Messung der plasmatischen und thrombozytären Thrombingenerierung *in vitro* mittels CAT**

Die plasmatische Thrombingenerierung konnte mithilfe der Verwendung von Plättchen-freiem Plasma (PFP) reproduziert werden, wohingegen für die Messung der thrombozytären Thrombingenerierung konsequenterweise Thrombozyten vorhanden sein müssen und wir daher Plättchen-reiches-Plasma (PRP) für diese Versuchsreihen verwendeten (weiteres zum Versuchsprinzip findet sich in Kapitel 3.11.2).

Die jeweiligen Messergebnisse wurden in den Unterkapiteln in die wichtigsten Thrombinoskop-Parameter aufgeteilt („Lag time“, „Time to peak“, „Thrombin peak“ und ETP), um die verschiedenen Versuchsreihen mit ihren Ergebnissen anhand dieser Parameter vergleichen zu können.

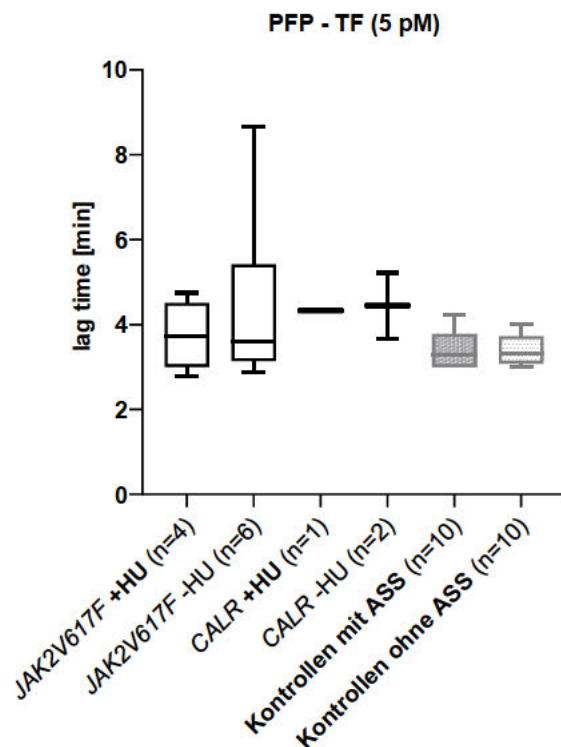
In den folgenden Unterkapiteln wird daher immer zuerst auf die Messung eines bestimmten Parameters im PFP (plasmatische Thrombingenerierung) nach Zugabe von TF (dient als Triggersubstanz für die physiologische Gerinnungsreaktion) eingegangen und darauffolgend auf die dazugehörige gleiche Messung im PRP (zelluläre/thrombozytäre Thrombingenerierung), die allerdings ergänzend noch mit den weiteren Triggersubstanzen Thrombin und Convulxin sowie einmal ohne jegliche Triggersubstanzen (basal) durchgeführt wurde.

Falls sich statistische Auffälligkeiten ( $p < 0,05$ ) bei den Gruppenvergleichen – der „JAK2V617F-positiven Patienten +/-HU“ mit den „Kontrollen mit/ohne ASS“ sowie den Kontrollen untereinander – darstellen ließen, sind die dazugehörigen p-Werte im Fließtext erwähnt. Die kompletten statistischen Auswertungen durch die Statistiksoftware GraphPad Prism 8.3.1 mit p-Werten und deskriptiver Statistik (Minimum, 25 % Perzentile, Median, 75 % Perzentile und Maximum) finden sich im Anhang.

## ERGEBNISSE

### 4.2.1.3.1 „LAG TIME“ IN PFP NACH ZUGABE VON TF

Die „Lag time“ beschreibt die Zeit (in Minuten), die bis zum Beginn der Thrombingenerierung vergeht, daher spricht man auch häufig von der sogenannten Verzögerungszeit.



#### Abbildung 9: „Lag time“ in PFP nach Zugabe von TF.

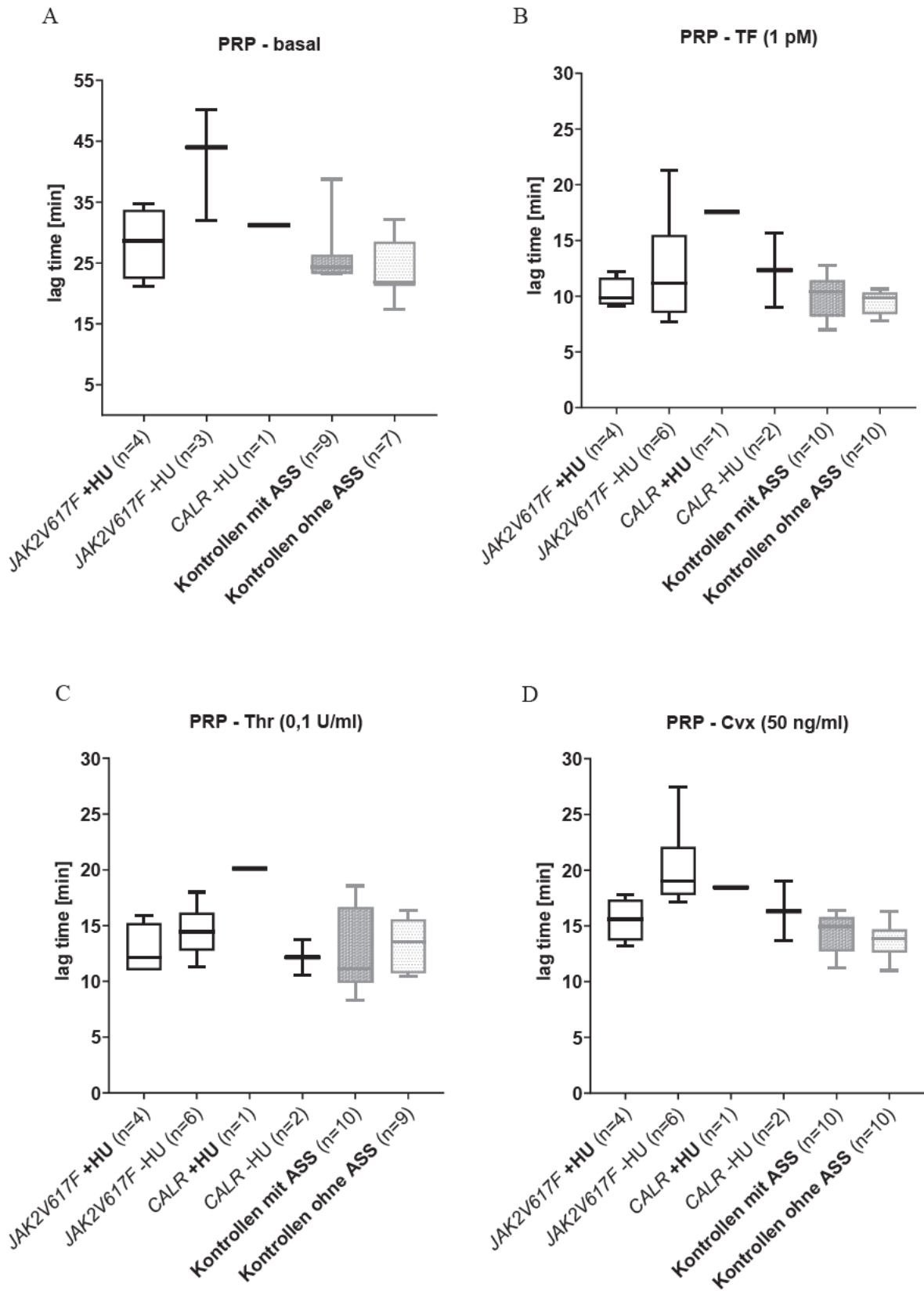
Darstellung der „Lag time“ (in Minuten) der plasmatischen Thrombingenerierung in PFP. Durchführung der Versuche im CAT unter Verwendung von PFP und Zugabe von PPP-Reagenz, welches als Endkonzentration 5 pM TF und 4 µM anionische Phospholipide enthielt.

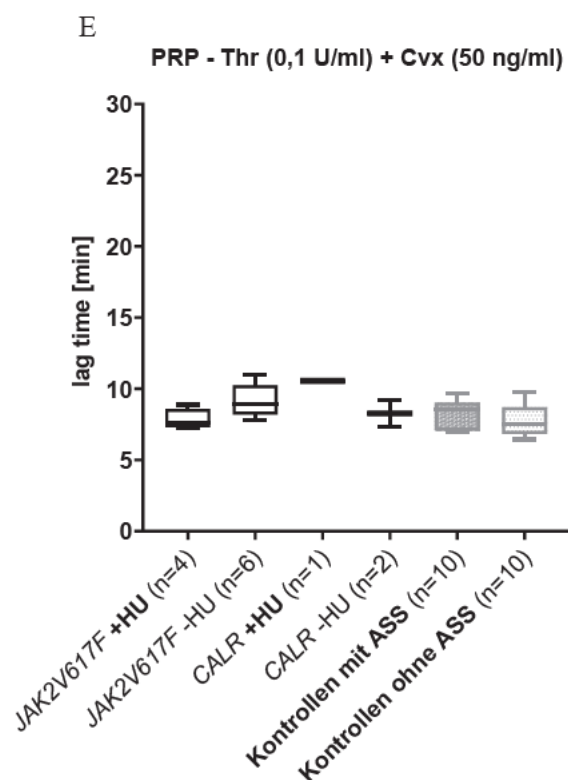
(PFP = Thrombozyten-freies Plasma, TF = tissue factor, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl)

Abbildung 9 stellt die „Lag time“ in PFP nach Zugabe des Triggers TF für alle Patienten- und Kontrollprobanden dar. Vergleicht man die „Kontrollen mit ASS“ (Median: 3,275 min) und die „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 3,32 min) mit den „JAK2V617F“- sowie „CALR-positiven Patientengruppen“, so haben alle Patientengruppen im Median tendenziell recht ähnliche, aber durchaus insgesamt etwas verlängerte Verzögerungszeiten reproduziert. Den höchsten Medianwert von 4,445 Minuten hat man in der „CALR-positiven Patientengruppe ohne HU“ gemessen. Ein einziger „JAK2V617F-positiver Patient ohne HU“ benötigte allerdings eine im Vergleich noch viel längere „Lag time“ von 8,67 Minuten, bis die Thrombingenerierung begann. In der statistischen Analyse ergaben sich jedoch keine statistisch relevanten Unterschiede.

ERGEBNISSE

4.2.1.3.2 „LAG TIME“ IN PRP BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF, THROMBIN, CONVULXIN UND THROMBIN + CONVULXIN





**Abbildung 10: „Lag time“ in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).**

Darstellung der „Lag time“ (in Minuten) der thrombozytären Thrombingenerierung in PRP. Durchführung der Versuche im CAT unter Verwendung von PRP basal (A) und Zugabe von PRP-Reagenz (welches als Endkonzentration 1 pM TF als Triggersubstanz enthielt) (B), 0,1 U/ml Thrombin (C), 50 ng/ml Convulxin (D) und 0,1 U/ml Thrombin + 50 ng/ml Convulxin (E).

(PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = tissue factor, Thr = Thrombin, Cvx = Convulxin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, pM = Pikomolar)

In Abbildung 10 sind die Messergebnisse der „Lag time“ in PRP aller JAK2V617F- und CALR-positiven Patientengruppen sowie auch der Kontrollen mit und ohne ASS-Therapie grafisch dargestellt. In Grafik A wurde dem PRP nur Tyrodepuffer hinzugegeben, also keinerlei Triggersubstanz, um die basale Thrombingenerierung messen zu können. Bei den Messungen der basalen Thrombingenerierung sind des Öfteren ganze Patientenwerte herausgefallen, da das Thrombogramm keine verwertbaren Ergebnisse reproduzieren konnte (Werte lagen bei -1). Daher besteht das Patientenkollektiv beispielsweise bei dieser Messung nur aus 8 ET-Patienten (n = 8). Tendenziell benötigten die Patientengruppen im Median mehr Zeit bis zum Start der Thrombingenerierung als die Kontrollgruppen. Es ergaben sich statistische Unterschiede in der verlängerten „Lag time“ der „JAK2V617F-positiven Patienten ohne HU“ (Median: 44 min) zu der kürzeren „Lag time“ der „Kontrollen mit ASS“ (Median: 24,33 min; p = 0,0182, Mann-Whitney test) wie auch zu den „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 21,83 min; p = 0,0035, Unpaired t-test).

## ERGEBNISSE

Grafik B veranschaulicht die „Lag time“ in PRP nach Zugabe von 1 pM des physiologischen Gerinnungsaktivators TF („tissue factor“, Gewebefaktor). Der statistische Vergleich der „Lag time“ der „JAK2V617F-positiven Patienten +/-HU“ mit jeweils den „Kontrollen mit/ohne ASS“ sowie den Kontrollen untereinander ergab keinen hinreichenden Unterschied ( $p \geq 0,05$ , Unpaired t-test).

Bei dem direkten Vergleich der Grafiken A und B fällt auf, dass durch die Gabe des Gewebefaktors (TF) die „Lag time“ in allen Gruppen verkürzt wurde. Hierzu wurden aber keine statistischen Tests durchgeführt.

Grafik C zeigt die „Lag time“ in PRP nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin. Auch hier ergaben sich in den statistischen Tests zwischen den „JAK2V617F-positiven Patienten +/-HU“ und den „Kontrollen mit/ohne ASS“ sowie den Kontrollen untereinander keine relevanten Unterschiede in der „Lag time“ ( $p \geq 0,05$ , Unpaired t-test). Allerdings zeigte der einzige „CALR-positive Patient mit HU“ die längste „Lag time“ mit einem Median von 20,11 Minuten im Vergleich zu allen anderen dargestellten Patienten- wie auch Kontrollprobandengruppen.

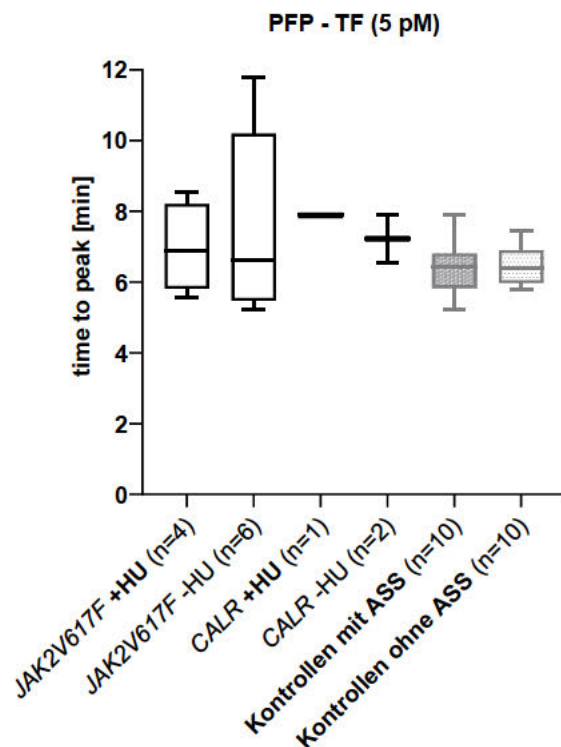
In Grafik D ist die „Lag time“ in PRP nach Zugabe von 50 ng/ml Convulxin dargestellt. In der Auswertung des Parameters zwischen den Gruppen ergab sich eine statistisch auffällig verlängerte „Lag time“ in der „JAK2V617F-positiven Patientengruppe ohne HU“ (Median: 19 min) im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ (Median: 14,95 min,  $p = 0,0002$ , Mann-Whitney test) und auch zu den „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 13,84 min,  $p = 0,0002$ , Mann-Whitney test).

Grafik E veranschaulicht die „Lag time“ in PRP nach simultaner Gabe von 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin, für alle Patienten- sowie Kontrollgruppen. Die vorher angenommene Hypothese, dass hier zwei Trigger zu einer viel höheren Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten führen würde, hat sich in dieser Versuchskonstellation mit einer deutlich kürzeren „Lag time“, und damit einer frühzeitiger einsetzenden Thrombingenerierung, in allen dargestellten Gruppen im Gegensatz zu den Ergebnissen in Grafik A-D, bestätigt. Jedoch zeigten alle Gruppen in Grafik E einen recht ähnlichen Medianwert. Ausschließlich die Thrombozyten der „JAK2V617F-positiven Patientengruppe ohne HU“ reagierten langsamer, mit einer statistisch nennenswert verlängerten „Lag time“ im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“ ( $p = 0,0214$ , Unpaired t-test).

## ERGEBNISSE

### 4.2.1.3.3 „TIME TO PEAK“ IN PFP NACH ZUGABE VON TF

Die Zeit in Minuten, die bis zum Erreichen des höchsten Thrombinwertes im gesamten Versuchsverlauf („Thrombin peak“) vergeht, bezeichnet man als „Time to peak“.



**Abbildung 11: „Time to peak“ in PFP nach Zugabe von TF.**

Darstellung der „Time to peak“ (in Minuten) der plasmatischen Thrombingenerierung in PFP. Durchführung der Versuche im CAT unter Verwendung von PFP und Zugabe von PPP-Reagenz, welches als Endkonzentration 5 pM TF und 4 µM anionische Phospholipide enthält.

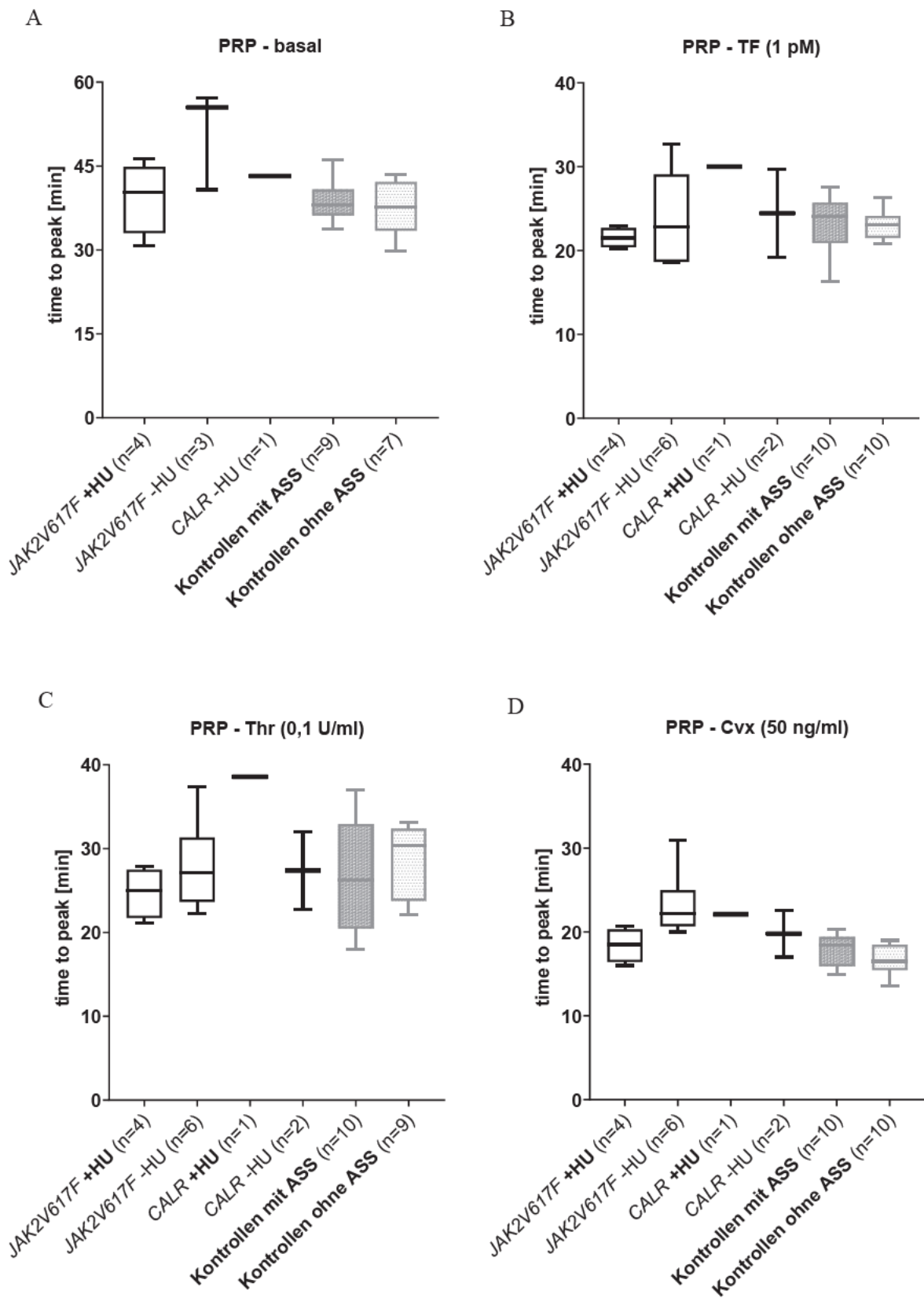
(PFP = Thrombozyten-freies Plasma, TF = tissue factor, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, pM = Pikomolar)

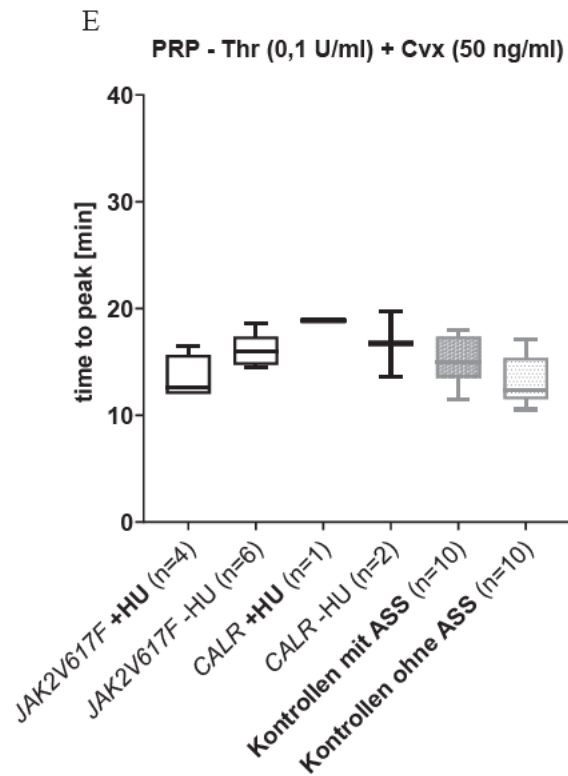
Abbildung 11 stellt die „Time to peak“ in PFP nach Zugabe des Triggers TF für alle Patienten- und Kontrollprobandengruppen dar. Vergleicht man die „Kontrollen mit ASS“ (Median: 6,445 min) und die „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 6,385 min) mit den „JAK2V617F“- sowie „CALR“-positiven Patientengruppen, so haben alle Patientengruppen im Median tendenziell recht ähnliche, aber durchaus insgesamt etwas verlängerte Zeiten („Time to peak“) bis zum Erreichen des „Thrombin peaks“ benötigt. Den höchsten Medianwert von 7,89 Minuten hat man in der „CALR“-positiven Patientengruppe mit HU“ gemessen.

Die Unterschiede der „Time to peak“ zwischen den „JAK2V617F“-positiven Patientengruppen“ und den „Kontrollen mit ASS“ sowie den „Kontrollen ohne ASS“ und den Kontrollen untereinander waren für keine der Analysen statistisch auffällig ( $p \geq 0,05$ , Unpaired t-test).

ERGEBNISSE

4.2.1.3.4 „TIME TO PEAK“ IN PRP BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF, THROMBIN, CONVULXIN UND THROMBIN + CONVULXIN





**Abbildung 12: „Time to peak“ in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).**

Darstellung der „Time to peak“ (in Minuten) der thrombozytären Thrombingenerierung in PRP. Durchführung der Versuche im CAT unter Verwendung von PRP basal (A) und Zugabe von PRP-Reagenz (welches als Endkonzentration 1 pM TF als Triggersubstanz enthielt) (B), 0,1 U/ml Thrombin (C), 50 ng/ml Convulxin (D) und 0,1 U/ml Thrombin + 50 ng/ml Convulxin (E). (PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = tissue factor, Thr = Thrombin, Cvx = Convulxin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, pM = Pikomolar)

In Abbildung 12 sind die Messergebnisse der „Time to peak“ in PRP aller JAK2V617F- und CALR-positiven Patientengruppen, sowie auch der Kontrollen mit und ohne ASS-Therapie grafisch dargestellt. Grafik A veranschaulicht die basale Thrombingenerierung, da dem PRP kein zusätzlicher Trigger der Thrombingenerierung zugefügt wurde. Im Vergleich zu allen anderen Grafiken B–E haben die dargestellten Gruppen in Grafik A ohne Triggerzugabe viel mehr Zeit benötigt, um den „Thrombin peak“ zu erreichen. Die kürzeste „Time to peak“ erreichten noch die „Kontrollen ohne ASS“ mit einem Median von 37,67 Minuten. Jedoch lag diese immer noch teils weit oberhalb der Zeiten, die die Gruppen in den Grafiken B-E erreichten (Ausnahme: Grafik C. Dort reproduzierte die „CALR-positive Patientengruppe +HU“ trotz Thrombin als Trigger einen Medianwert von 38,56 min für die „Time to peak“). Die längste Zeit von 57,11 Minuten bis zum Erreichen des „Thrombin peaks“ brauchte ein Patient (P5) in der „JAK2V617F-positiven Patientengruppe +HU“. In der statistischen Auswertung ergab sich ein relevanter Unterschied in den verlängerten Zeiten der „JAK2V617F-positiven Patientengruppe –U“ im Vergleich zu den kürzeren Zeiten der

## ERGEBNISSE

„Kontrollen mit ASS“ ( $p = 0,0052$ , Unpaired t-test) sowie der „Kontrollen ohne ASS“ ( $p = 0,0132$ , Unpaired t-test).

Grafik B stellt die „Time to peak“ in PRP nach Zugabe von 1 pM TF dar. Eine, im Vergleich zu allen anderen dargestellten Patienten- und Kontrollgruppen, tendenziell erhöhte „Time to peak“ zeigte der „CALR-positive Patient +HU“ mit einem Median von 30 Minuten. In der statistischen Analyse der „JAK2V617F-positiven Patientengruppen +/-HU“ und der „Kontrollen mit/ohne ASS“ miteinander und den Kontrollen untereinander, ergaben sich keine relevanten Unterschiede in der gemessenen „Time to peak“.

In Grafik C ist die „Time to peak“ in PRP nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin veranschaulicht. Der statistische Vergleich der „Time to peak“ der „JAK2V617F-positiven Patienten +/-HU“ mit jeweils den „Kontrollen mit/ohne ASS“ sowie den Kontrollen untereinander ergab keinen hinreichenden Unterschied ( $p \geq 0,05$ , Unpaired t-test).

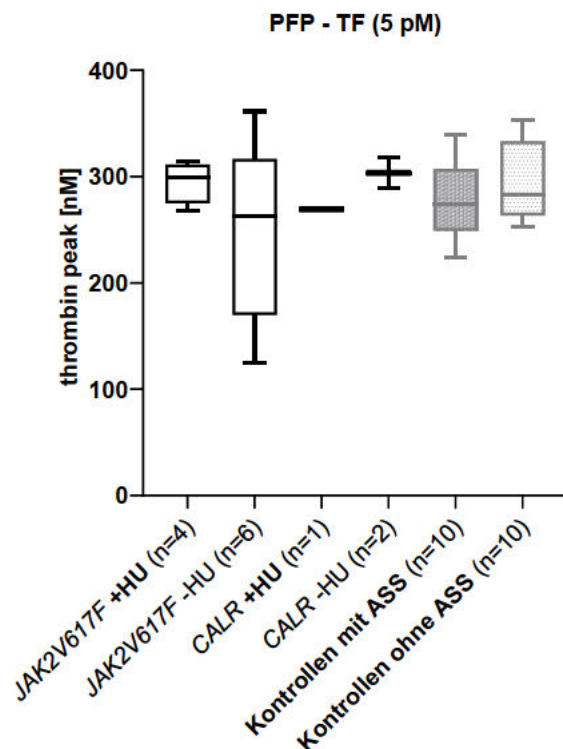
Grafik D zeigt die „Time to peak“ in PRP nach Zugabe von 50 ng/ml Convulxin. Hier haben alle Patientengruppen im Median tendenziell eine geringfügig längere Zeit bis zum Erreichen des „Thrombin peaks“ benötigt im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ (Median: 18,45 min) als auch den „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 16,45 min). Im statistischen Vergleich ergab sich ein relevanter Unterschied in der verlängerten „Time to peak“ der „JAK2V617F-positiven Patientengruppe ohne HU“ im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ ( $p = 0,0005$ , Mann-Whitney test) und den „Kontrollen ohne ASS“ ( $p = 0,0002$ , Mann-Whitney test).

Grafik E veranschaulicht die „Time to peak“ in PRP nach simultaner Gabe von 0,1 U/ml Thrombin sowie 50 ng/ml Convulxin, für alle Patienten- sowie Kontrollprobandengruppen. Vergleicht man die Medianwerte von Grafik E mit allen anderen aus Grafik A-D, so haben die Gruppen in Grafik E im Schnitt durchaus weniger Zeit benötigt, um den „Thrombin peak“ zu erreichen. Es ergab sich ein statistisch relevanter Unterschied in der längeren „Time to peak“ der „JAK2V617F-positiven Patientengruppe ohne HU“ und der kürzeren „Time to peak“ der „Kontrollen ohne ASS“ ( $p = 0,0103$ , Unpaired t-test). Die „CALR-positiven Patienten +HU“ (Median: 18,89 min) und die „CALR-positiven Patienten -HU“ (Median: 16,73 min) reproduzierten im Vergleich zu beiden „JAK2V617F-positiven Patientengruppen“ im Median tendenziell verlängerte „Time to peak“-Werte, was für eine langsamere Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten sprechen würde.

## ERGEBNISSE

### 4.2.1.3.5 „THROMBIN PEAK“ IN PFP NACH ZUGABE VON TF

Der „Thrombin peak“ (in nM) beschreibt die höchste Konzentration an Thrombin, die im Verlauf des Versuchs gemessen werden konnte.



#### Abbildung 13: „Thrombin peak“ in PFP nach Zugabe von TF.

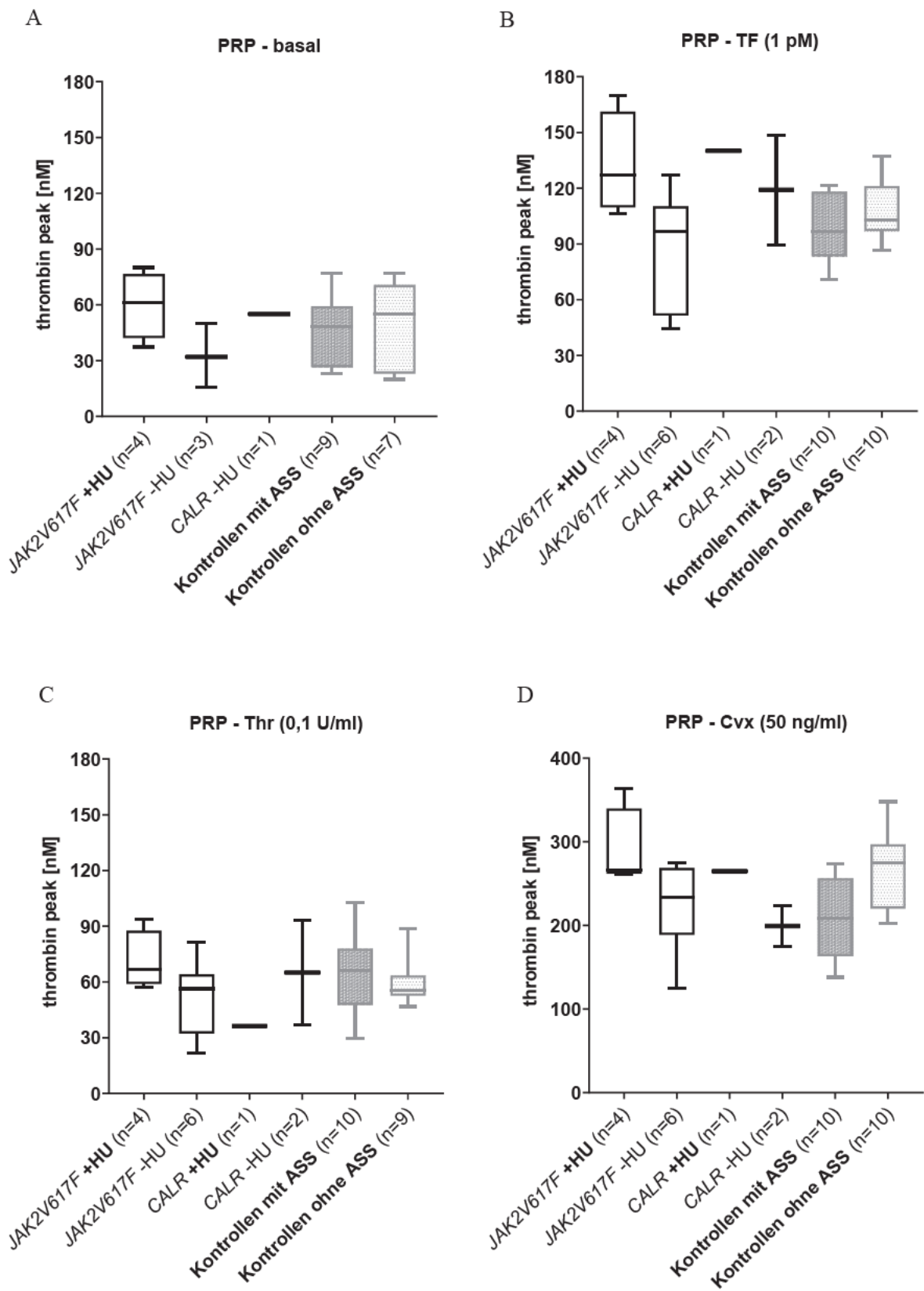
Darstellung des „Thrombin peak“ (in nM) der plasmatischen Thrombingenerierung in PFP. Durchführung der Versuche im CAT unter Verwendung von PFP und Zugabe von PPP-Reagenz, welches als Endkonzentration 5 pM TF und 4  $\mu$ M anionische Phospholipide enthielt.

(PFP = Thrombozyten-freies Plasma, TF = tissue factor, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, nM = Nanomolar)

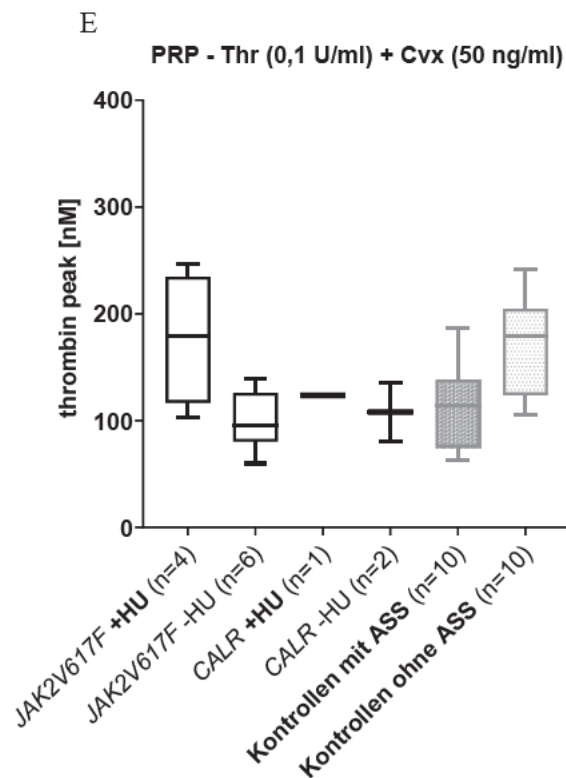
Abbildung 13 stellt den „Thrombin peak“ in PFP nach Zugabe des Triggers TF für alle Patienten- und Kontrollprobandengruppen dar. Die Unterschiede des „Thrombin peaks“ zwischen jeweils den „JAK2V617F-positiven Patientengruppen“ und den „Kontrollen mit ASS“ sowie den „Kontrollen ohne ASS“ und den Kontrollen untereinander waren für keine der Analysen statistisch auffällig ( $p \geq 0,05$ , Unpaired t-test).

ERGEBNISSE

4.2.1.3.6 „THROMBIN PEAK“ IN PRP BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF, THROMBIN, CONVULXIN UND THROMBIN + CONVULXIN



## ERGEBNISSE



**Abbildung 14: „Thrombin peak“ in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).**

Darstellung des „Thrombin peaks“ (in nM) der thrombozytären Thrombingenerierung in PRP. Durchführung der Versuche im CAT unter Verwendung von PRP basal (A) und Zugabe von PRP-Reagenz (welches als Endkonzentration 1 pM TF als Triggersubstanz enthielt) (B), 0,1 U/ml Thrombin (C), 50 ng/ml Convulxin (D) und 0,1 U/ml Thrombin + 50 ng/ml Convulxin (E). (PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = tissue factor, Thr = Thrombin, Cvx = Convulxin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, nM = Nanomolar, pM = Pikomolar)

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der erreichten „Thrombin peaks“ in PRP für die jeweiligen Gruppen zusammengestellt. Grafik A zeigt dabei die Werte für die basale Thrombingenerierung. Die „JAK2V617F-positive Patientengruppe +HU“ erreichte im Vergleich zu allen anderen dargestellten Gruppen den höchsten „Thrombin peak“ im Median von 61,52 nM. Wohingegen die „JAK2V617F-positive Patientengruppe -HU“ den niedrigsten „Thrombin peak“ im Median von nur 32 nM zeigte. Der „CALR-positive Patient -HU“ erreichte einen „Thrombin peak“ im Median von 55,06 nM, der sich noch am ehesten im Bereich der beiden Kontrollgruppen „Kontrollen mit ASS“ (Median: 48,11 nM) und „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 55,33 nM) befand. Der statistische Vergleich des „Thrombin peaks“ der „JAK2V617F-positiven Patienten +/-HU“ mit jeweils den „Kontrollen mit/ohne ASS“ sowie den Kontrollen untereinander ergab keinen hinreichenden statistischen Unterschied ( $p \geq 0,05$ , Unpaired t-test).

Grafik B zeigt den „Thrombin peak“ der thrombozytären Thrombingenerierung in PRP aller dargestellten Gruppen nach Zugabe von 1 pM des physiologischen Gerinnungstriggers TF.

## ERGEBNISSE

Die größte Verteilungsbreite der Werte wies dabei die „JAK2V617F-positive Patientengruppe –HU“ auf (Range: 82,75 nM) mit dem niedrigsten erreichten „Thrombin peak“ von 44,57 nM (P9) im Vergleich zu allen anderen in der Grafik B dargestellten Gruppen. Den höchsten „Thrombin peak“ mit 170,1 nM erreichte allerdings ein Patient (P1) in der „JAK2V617F-positiven Patientengruppe +HU“. Die Patientengruppen zeigten auch tendenziell eher höhere Werte des „Thrombin peaks“ als die beiden „Kontrollen mit ASS“ (Median: 96,58 nM) und „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 102,9 nM). Den höchsten Medianwert von 140,3 nM erreichte der „CALR-positive Patient +HU“. In der statistischen Auswertung ergaben sich aber in den Werten des „Thrombin peaks“ der „JAK2V617F-positiven Patienten +/-HU“ mit jeweils den „Kontrollen mit/ohne ASS“ sowie den Kontrollen untereinander keine hinreichenden Unterschiede ( $p \geq 0,05$ , Unpaired t-test).

Grafik C stellt die Werte des „Thrombin peaks“ nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin für alle Patienten- sowie Kontrollprobandengruppen dar. Insgesamt wurden hier nach Thrombin-Zugabe die geringsten Medianwerte erreicht im Vergleich zu den anderen Agonistengaben (Grafik B, D, E). In der statistischen Analyse ergaben sich weder statistische Auffälligkeiten zwischen den „JAK2V617F-positiven Patientengruppen“ jeweils im Vergleich zu den beiden „Kontrollen mit/ ohne ASS“, noch zwischen den „Kontrollen mit ASS“ und den „Kontrollen ohne ASS“ untereinander.

In Grafik D sind die Werte für den „Thrombin peak“ aller dargestellten Gruppen nach Zugabe von 50 ng/ml Convulxin dargestellt. Es fällt auf, dass alle Gruppen im Vergleich zu ihren Ergebnissen in den anderen Grafiken A-C und E den höchsten „Thrombin peak“ in dieser Grafik D mit dem Agonisten Convulxin erreichten. Selbst bei der gemeinsamen Gabe von Thrombin und Convulxin in Grafik E wurden geringere „Thrombin peaks“ reproduziert. Die „Kontrollen ohne ASS“ erreichten den höchsten Wert im Median von 275 nM, dicht gefolgt von der „JAK2V617F-positiven Patientengruppe +HU“ (Median: 266,2 nM). Die „Kontrollen mit ASS“ lagen mit ihrem Medianwert von 208,6 nM allerdings tendenziell im unteren Bereich aller anderen dargestellten Medianwerte. Einen nur noch niedrigeren Wert zeigte die „CALR-positive Patientengruppe –HU“ (Median: 199,2 nM), wohingegen alle anderen Patientengruppen tendenziell eine höhere Thrombinkonzentration im Verlauf des Versuchszeitraums generierten. Der einzige statistische Unterschied ergab sich zwischen dem höheren „Thrombin peak“ der „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 275 nM) zu dem deutlich geringeren Wert von 208,6 nM der „Kontrollen mit ASS“ ( $p = 0,0108$ , Unpaired t-test). Dies weist auf eine ASS-Sensitivität der Convulxin-induzierten Thrombinamplifizierung auf der Thrombozytenoberfläche hin.

Grafik E zeigt den „Thrombin peak“ in PRP nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin, für alle Patienten- sowie Kontrollprobandengruppen. Trotz simultaner Gabe zweier Gerinnungstrigger fielen die Ergebnisse des generierten „Thrombin peaks“ für alle

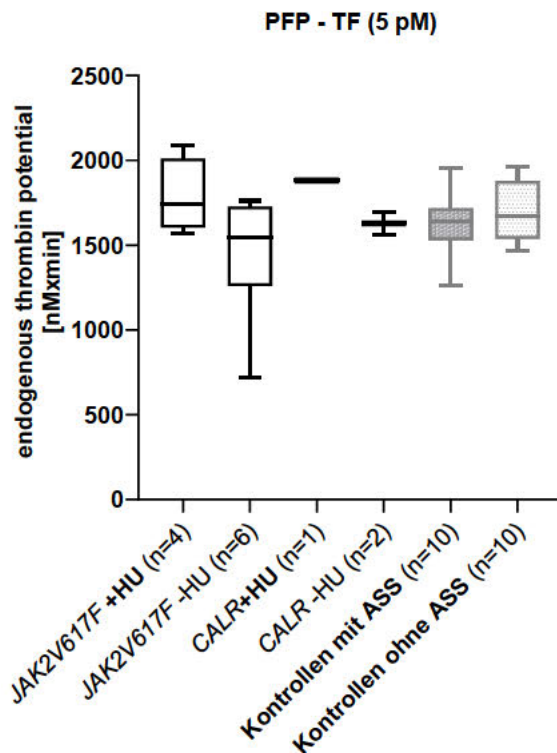
## ERGEBNISSE

dargestellten Gruppen geringer aus als die Werte in Grafik D nach Zugabe nur eines Triggers, Convulxin. Vergleicht man in Grafik E die „JAK2V617F-positiven Patientengruppen +/-HU“ mit den „Kontrollen mit/ohne ASS“ sowie die Kontrollen untereinander, zeigten die „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 179 nM) einen statistisch auffällig erhöhten „Thrombin peak“ im Gegensatz zu den „Kontrollen mit ASS“ (Median: 114,5 nM,  $p = 0,007$ , Unpaired t-test) wie auch zu den „JAK2V617F-positiven Patienten -HU“ (Median: 95,21 nM,  $p = 0,0045$ , Unpaired t-test). Auch die „JAK2V617F-positiven Patienten +HU“ erreichten einen statistisch auffällig erhöhten „Thrombin peak“ im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ ( $p = 0,034$ , Unpaired t-test).

## ERGEBNISSE

### 4.2.1.3.7 „ETP“ IN PFP NACH ZUGABE VON TF

Das „endogene Thrombinpotential“ (in nM x min) ist die über den gesamten Versuchszeitraum gemessene Gesamtkonzentration an generiertem Thrombin.



#### **Abbildung 15: „Endogenes Thrombinpotential“ (ETP) in PFP nach Zugabe von TF.**

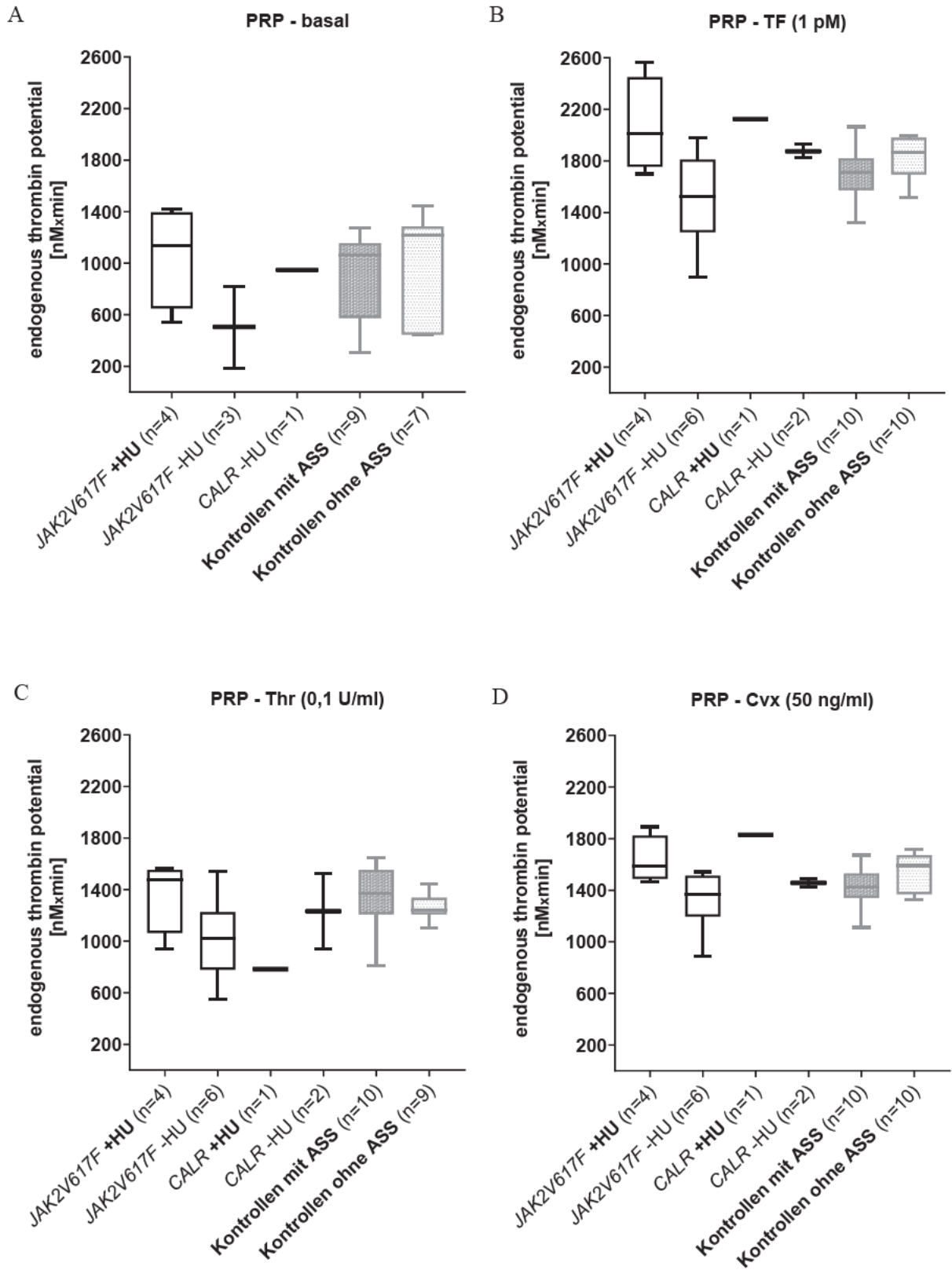
Darstellung des ETP (in nM x min) der plasmatischen Thrombingenerierung in PFP. Durchführung der Versuche im CAT unter Verwendung von PFP und Zugabe von PPP-Reagenz, welches als Endkonzentration 5 pM TF und 4  $\mu$ M anionische Phospholipide enthielt.

(PFP = Thrombozyten-freies Plasma, TF = tissue factor, *JAK2V617F* = Januskinase-2-Mutation, *CALR* = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, nM = Nanomolar, pM = Pikomolar)

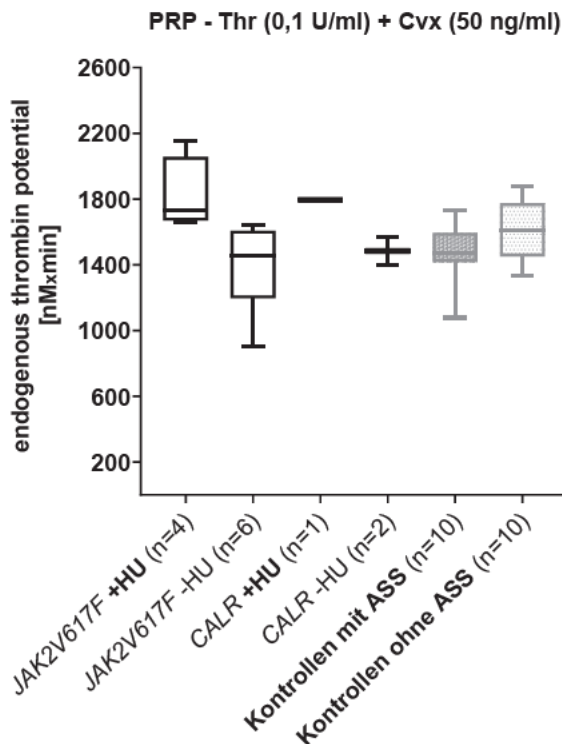
Abbildung 15 zeigt das „endogene Thrombinpotential“ in PFP nach Zugabe der Triggersubstanz TF. Insgesamt wurden in allen dargestellten Gruppen, Patienten- wie auch Kontrollprobandengruppen, im Median vergleichsweise ähnliche Gesamthrombinkonzentrationen (ETP) erreicht. Die geringen Unterschiede des ETP, verglichen zwischen den „*JAK2V617F*-positiven Patientengruppen“ und den „Kontrollen mit ASS“ und „Kontrollen ohne ASS“ jeweils untereinander und miteinander, waren für keine der Analysen statistisch auffällig ( $p \geq 0,05$ ).

ERGEBNISSE

4.2.1.3.8 „ETP“ IN PRP BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF, THROMBIN, CONVULXIN UND THROMBIN + CONVULXIN



E



**Abbildung 16: ETP in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).**

Thrombingenerierung in PRP. Durchführung der Versuche im CAT unter Verwendung von PRP basal (A) und Zugabe von PRP-Reagenz (welches als Endkonzentration 1 pM TF als Triggersubstanz enthielt) (B), 0,1 U/ml Thrombin (C), 50 ng/ml Convulxin (D) und 0,1 U/ml Thrombin + 50 ng/ml Convulxin (E). (ETP = endogenes Thrombinpotential, PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = tissue factor, Thr = Thrombin, Cvx = Convulxin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, nM = Nanomolar, pM = Pikomolar)

In Abbildung 16 sind die Messergebnisse des „endogenen Thrombinpotentials“ (ETP) in PRP aller JAK2V617F- und CALR-positiven Patientengruppen sowie der Kontrollen mit und ohne ASS-Therapie grafisch dargestellt. Grafik A zeigt das ETP der basalen Thrombingenerierung, also ohne Zugabe jeglicher Triggersubstanzen. Die „JAK2V617F-positiven Patienten +HU“ liegen mit ihrem erreichten ETP im Median von 1136 nMxmin genau zwischen den Werten der „Kontrollen mit ASS“ (1062 nMxmin) und der „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 1216 nMxmin). Im Gegensatz dazu generierten die „JAK2V617F-positiven Patienten -HU“ im gesamten Versuchsverlauf eine sehr viel geringere Gesamt-Thrombinkonzentration mit einem ETP-Medianwert von nur 504,6 nMxmin im Vergleich zu den beiden Kontrollprobandengruppen. Hier ergaben sich allerdings jeweils noch keine statistisch nennenswerten Unterschiede in der Auswertung ( $p \geq 0,05$ ).

Grafik B veranschaulicht das ETP in PRP nach Zugabe von 1 pM TF. Im Vergleich zu der basalen Thrombingenerierung in Grafik A reagierten die Thrombozyten der Patienten in Grafik B nach Zugabe des physiologischen Gerinnungstriggers mit einem nun deutlich gesteigerten

## ERGEBNISSE

ETP. Der „*CALR*-positive Patient +HU“ (P11, ETP = 2125 nMxmin) und die „*CALR*-positive Patientengruppe –HU“ (ETP = 1875 nMxmin) erreichten hier nach Zugabe von TF ihr höchstes ETP verglichen mit ihren Werten in den anderen Grafiken A und C–E. In Grafik B ergaben sich nun statistische Auffälligkeiten zwischen dem weitaus höheren ETP der „*JAK2V617F*-positiven Patienten +HU“ (Median: 2010 nMxmin) im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ (Median: 1710 nMxmin,  $p = 0,0364$ , Unpaired t-test) sowie zwischen dem niedrigeren ETP der „*JAK2V617F*-positiven Patienten –HU“ (Median: 1525 nMxmin) verglichen mit den „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 1864 nMxmin;  $p = 0,0320$ , Unpaired t-test).

In Grafik C wird das ETP in PRP nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin dargestellt. In der Auswertung kristallisierte sich ein statistisch auffällig vermindertes ETP der „*JAK2V617F*-positiven Patientengruppe –HU“ (Median: 1020 nMxmin) im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ (Median: 1371 nMxmin;  $p = 0,0447$  nMxmin) sowie den „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 1245 nMxmin;  $p = 0,0497$ , Unpaired t-test) heraus. Der „*CALR*-positive Patient +HU“ generierte sogar tendenziell ein noch niedrigeres ETP im Median von 782,7 nMxmin im Vergleich zu allen anderen dargestellten Gruppen sowie sein niedrigstes ETP im Vergleich zu seinen Werten bei der basalen Thrombingenerierung in Grafik A sowie bei Zugabe aller anderen Agonisten in Grafik B, D und E.

Grafik D zeigt das ETP in PRP nach Zugabe von 50 ng/ml Convulxin aller dargestellten Gruppen. Die Auswertungen des Parameters ergaben in der „*JAK2V617F*-positiven Patientengruppe –HU“ ein ETP im Median von 1368 nMxmin, welches statistisch auffällig niedriger war im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 1591 nMxmin;  $p = 0,0431$ , Unpaired t-test). Vergleicht man die Patientengruppen aufgeteilt in ihre Therapie, so fällt auf, dass der „*CALR*-positive Patient +HU“ ein im Median von 1828 nMxmin tendenziell höheres ETP im Vergleich zu der „*JAK2V617F*-positiven Patientengruppe +HU“ reproduzierte. Auch die „*CALR*-positive Patientengruppe –HU“ (Median: 1457 nMxmin) erreichte ein tendenziell höheres ETP im Vergleich zu der „*JAK2V617F*-positiven Patientengruppe –HU“ (Median: 1368 nMxmin).

Grafik E zeigt das ETP in PRP nach simultaner Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin für alle dargestellten Gruppen. Das ETP der „*JAK2V617F*-positiven Patientengruppe +HU“ war im Median von 1733 nMxmin statistisch nennenswert erhöht im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ (Median: 1473 nMxmin;  $p = 0,0092$ , Unpaired t-test). Alle Patientengruppen unter HU-Therapie erlangten tendenziell ähnliche ETP-Medianwerte, genauso wie alle Patientengruppen ohne eine HU-Therapie, wobei diese Patienten wiederum ein vergleichsweise geringeres ETP zeigten im Vergleich zu den Patienten mit einer HU-Therapie.

## ERGEBNISSE

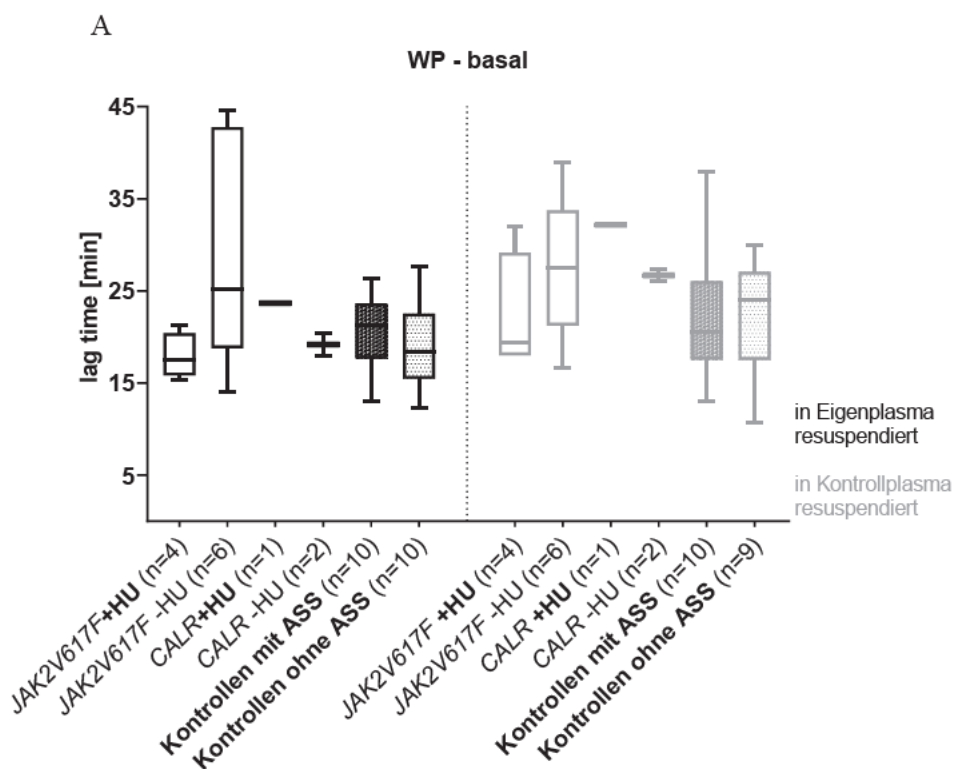
### 4.2.1.4 Messung der Thrombingenerierung isolierter Thrombozyten mittels CAT

Für diese Versuchsreihe wurden die Thrombozyten der ET-Patienten wie auch der Kontrollprobandengruppen isoliert und anschließend jeweils in Eigenplasma (EP) sowie in einem Kontrollplasma (KP)\* resuspendiert, sodass der Fokus der Messungen auf dem Einfluss des Plasmas auf die thrombozytäre Thrombingenerierung lag.

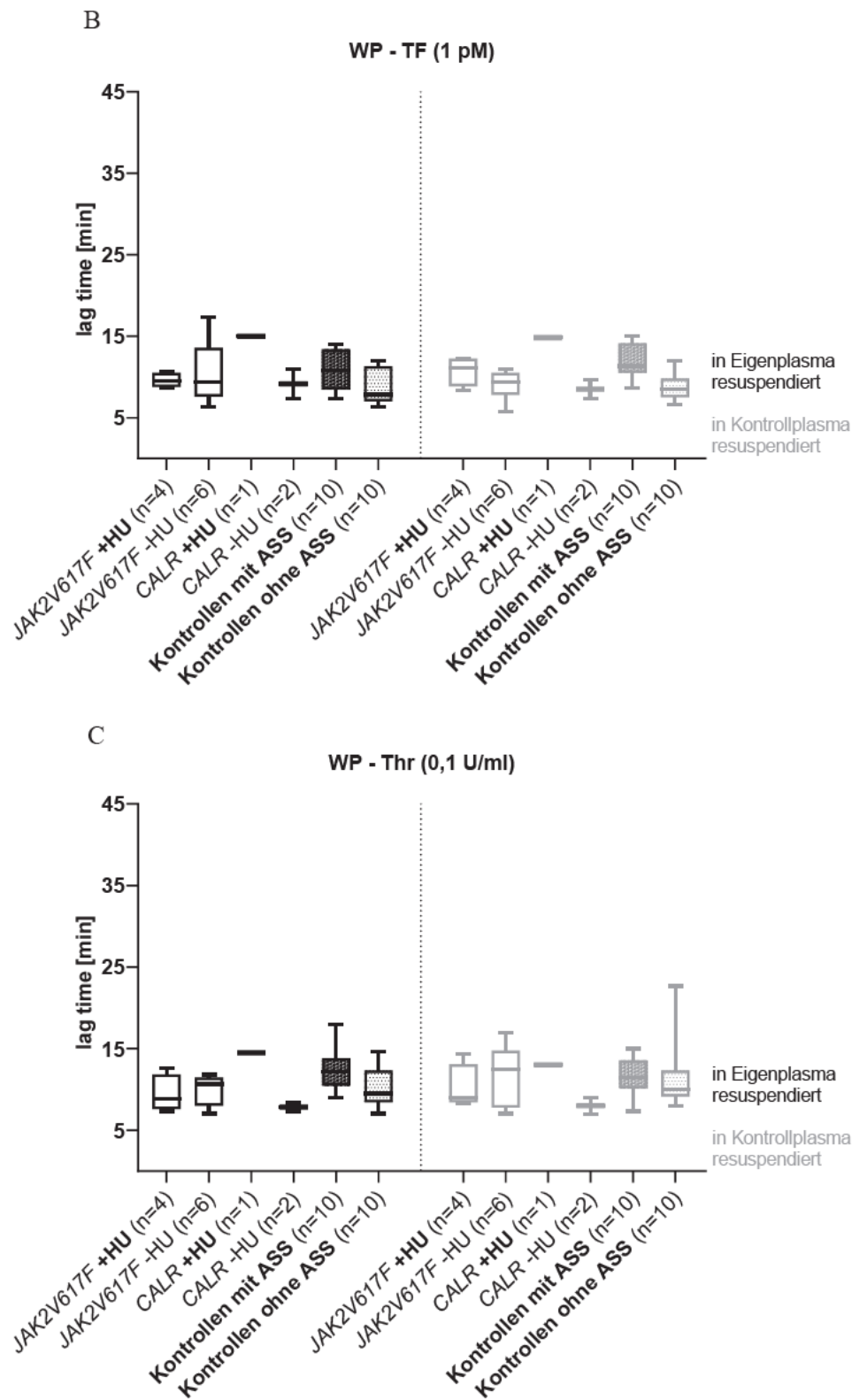
Es wurden statistische Gruppenvergleichstests durchgeführt zwischen den „JAK2V617F-positiven Patienten +/-HU“ und den „Kontrollen mit/ohne ASS“ sowie zwischen den „Kontrollen mit/ohne ASS“ untereinander, jeweils in EP wie auch in KP. Außerdem prüften wir die Ergebnisse der isolierten Thrombozyten der „JAK2V617F-positiven Patienten +/-HU“ und der „Kontrollen mit/ohne ASS“ im EP im Vergleich zu den Ergebnissen im KP auf statistische Auffälligkeiten mittels T-Test oder Mann-Whitney-Test. Ließen sich statistische Auffälligkeiten ( $p < 0,05$ ) bei den Gruppenvergleichen darstellen, sind die dazugehörigen p-Werte im Fließtext erwähnt. Die kompletten statistischen Auswertungen durch die Statistiksoftware GraphPad Prism 8.3.1 mit p-Werten und deskriptiver Statistik (Minimum, 25 % Perzentile, Median, 75 % Perzentile und Maximum) finden sich in Tabellen im Anhang.

\* Es handelte sich hierbei nicht um das PFP der Kontrollprobandengruppe, sondern um ein standardisiertes Kontrollplasma aus dem Labor.

#### 4.2.1.4.1 „LAG TIME“ ISOLIERTER THROMBOZYTEN IN EIGEN- UND KONTROLLPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN



ERGEBNISSE



**Abbildung 17: „Lag time“ isolierter Thrombozyten resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

(WP = Washed platelets (isolierte Thrombozyten), TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, pM = Pikomolar; gestrichelte Linie: trennt die Messergebnisse der in Eigenplasma (schwarz, links) resuspendierten Thrombozyten von denen in Kontrollplasma (grau, rechts) resuspendierten)

## ERGEBNISSE

In Abbildung 17 wird die „Lag time“ der isolierten Thrombozyten aller Patienten- wie auch Kontrollprobandengruppen grafisch veranschaulicht. Die Thrombozyten wurden jeweils in Eigenplasma (EP) (schwarz hinterlegt, linke Grafikhälfte) wie auch in einem Kontrollplasma (KP) (grau hinterlegt, rechte Grafikhälfte) resuspendiert. Grafik A zeigt die basale „Lag time“ bis zum Beginn der Thrombingenerierung ohne Zusatz jeglicher Triggersubstanzen.

Die Thrombozyten der jeweiligen Kontrollgruppen zeigten keine statistisch auffällig unterschiedliche „Lag time“ unter basalen Bedingungen im EP jeweils im Vergleich zum KP.

In EP gemessen wiesen die Thrombozyten der „JAK2V617F –HU“ Gruppe eine statistisch auffällig verlängerte „Lag time“ im Median von 25,17 Minuten im Gegensatz zu den „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 18,42 min;  $p = 0,0423$ , Unpaired t-test) auf.

Der „CALR-positive Patient +HU“ benötigte insgesamt die längste Zeit bis zum Start der Thrombingenerierung mit einem Medianwert von 32,17 min im KP.

Im Median zeigte die Mehrheit der dargestellten Gruppen im KP eine tendenziell verlängerte „Lag time“ im Vergleich zum EP.

Grafik B veranschaulicht die „Lag time“ der dargestellten Gruppen jeweils in EP wie auch in KP nach Zugabe von 1 pM TF. Im Vergleich zu Grafik A haben nun alle Gruppen eine tendenziell kürzere „Lag time“ erreicht, die Thrombozyten begannen demnach in allen Gruppen viel schneller mit der Thrombingenerierung nach Zugabe des physiologischen Thrombozyten-Agonisten TF.

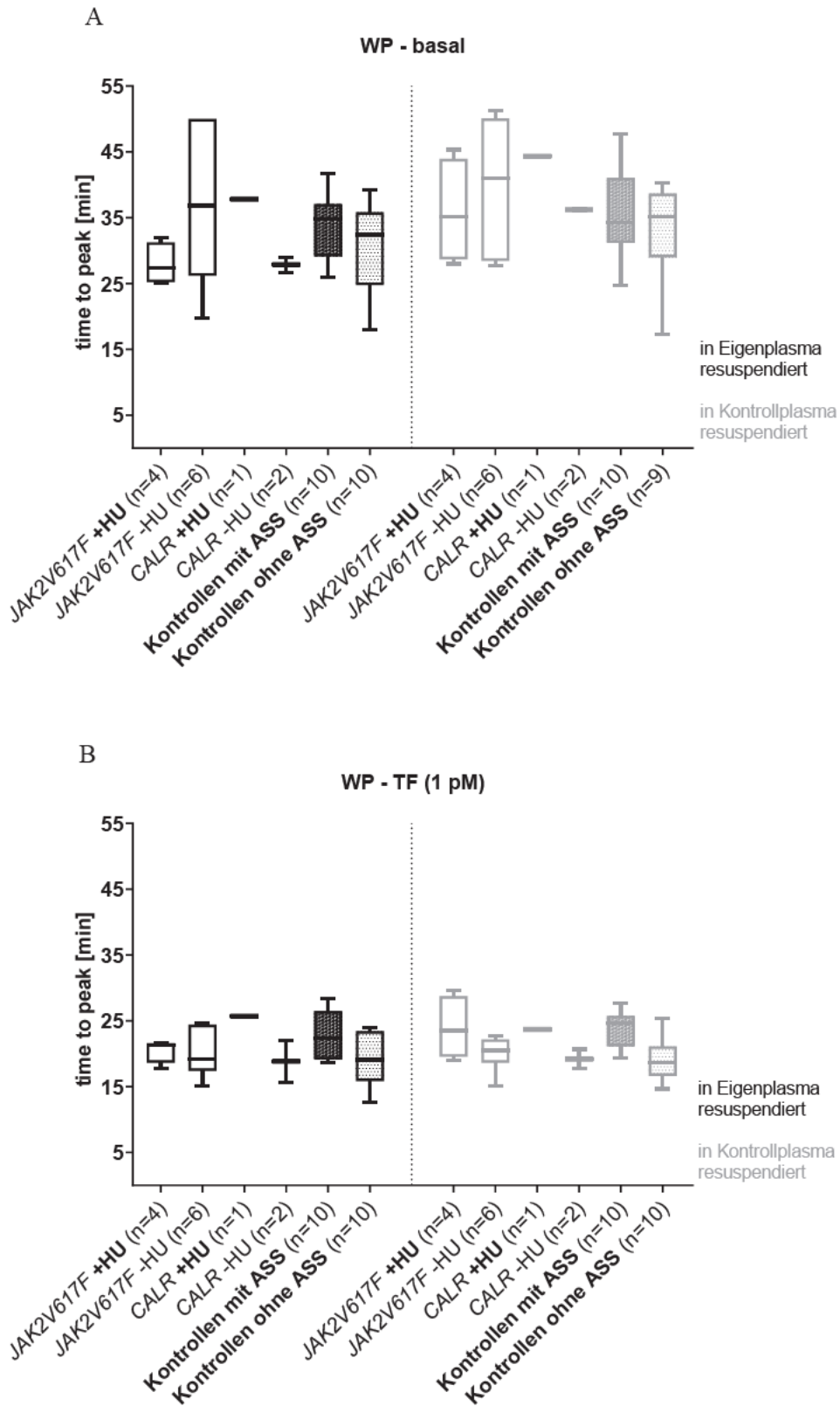
Innerhalb der Gruppen im KP ergab sich ein statistisch relevanter Unterschied zwischen der verlängerten „Lag time“ der „Kontrollen mit ASS“ (Median: 11,34 min) und den kürzeren Zeiten der „JAK2V617F –HU“ Gruppe (Median: 9,335 min;  $p = 0,0160$ , Unpaired t-test) sowie der „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 8,5 min;  $p = 0,0017$ , Unpaired t-test). Auch nach TF-Zugabe (wie basal) hat der „CALR-positive Patient +HU“ im Vergleich zu den Medianwerten aller anderen Gruppen die längste Zeit bis zum Start der Thrombingenerierung im KP (14,83 min), aber auch im EP (15 min), benötigt.

In Grafik C wird die „Lag time“ nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin dargestellt. In der Analyse des Parameters ergaben sich in keinen Gruppenvergleichen statistische Auffälligkeiten.

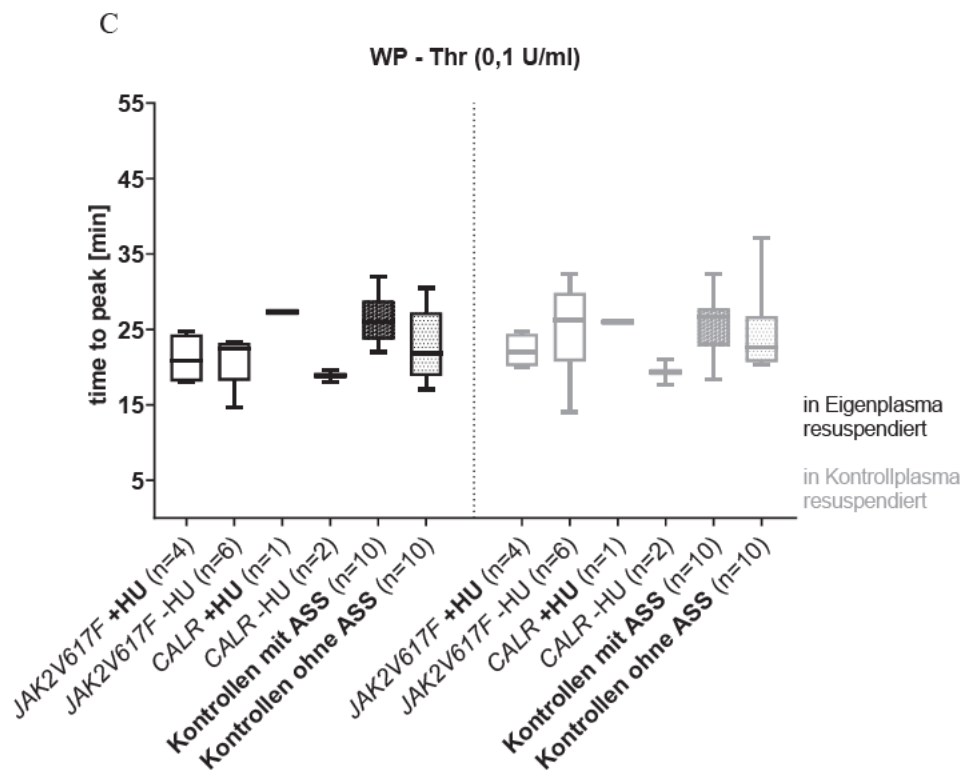
In der Analyse fielen weder unter basalen Messbedingungen noch nach Zugabe von TF oder Thrombin statistisch relevante Unterschiede zwischen den „Lag time“ Werten im EP und KP jeweils der „JAK2V617F –HU“ sowie der „JAK2V617F +HU“ Gruppe auf.

ERGEBNISSE

4.2.1.4.2 „TIME TO PEAK“ ISOLIERTER THROMBOZYTEN IN EIGEN- UND KONTROLLPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN



## ERGEBNISSE



**Abbildung 18:** „Time to peak“ isolierter Thrombozyten resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).

(WP = „Washed platelets“ (isolierte Thrombozyten), TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, pM = Pikomolar)

In Abbildung 18 ist die „Time to peak“ der isolierten Thrombozyten von allen dargestellten Gruppen in EP bzw. KP (entspricht NICHT dem Plasma der Kontrollprobandengruppen) abgebildet. Grafik A zeigt dabei die „Time to peak“ der basalen Thrombinbildung, also die Zeit, welche ohne Zusatz von Triggersubstanzen benötigt wurde, um die höchste Thrombinkonzentration im Versuchsverlauf („Thrombin peak“) zu erreichen. Die Thrombozyten der „Kontrollen mit/ohne ASS“ erreichten den „Thrombin peak“ im Vergleich untereinander tendenziell ähnlich schnell (im Durchschnitt nach 34 min) im EP wie auch im KP. Damit waren sie im EP schneller als die Thrombozyten der „JAK2V617F -HU“ Gruppe (Median: 36,84 min) wie auch der „CALR +HU“ Gruppe (Median: 37,83 min). Allerdings noch schneller als die Kontrollen waren die Thrombozyten der „JAK2V617F +HU“ Gruppe in EP mit einem Median von 27,34 min. Hier ergab sich ein statistisch relevanter Unterschied zu den „Kontrollen mit ASS“ in EP von  $p = 0,0449$  (Unpaired t-test). Fast genauso schnell wie die Gruppe „JAK2V617F +HU“ war die „CALR -HU“ Gruppe mit 27,87 min. Im Gegensatz dazu benötigten im KP alle Patientengruppen eine längere „Time to peak“ im Vergleich zu den „Kontrollen mit/ohne ASS“ in EP und KP. So ergab sich noch eine statistische Auffälligkeit im Median zwischen der kürzeren „Time to peak“ der „Kontrollen ohne ASS“ in

## ERGEBNISSE

EP (Median: 32,42 min) und der verlängerten Zeit, die die „JAK2V617F -HU“ Gruppe im KP (Median: 41 min;  $p = 0,0430$ , Unpaired t-test) benötigte.

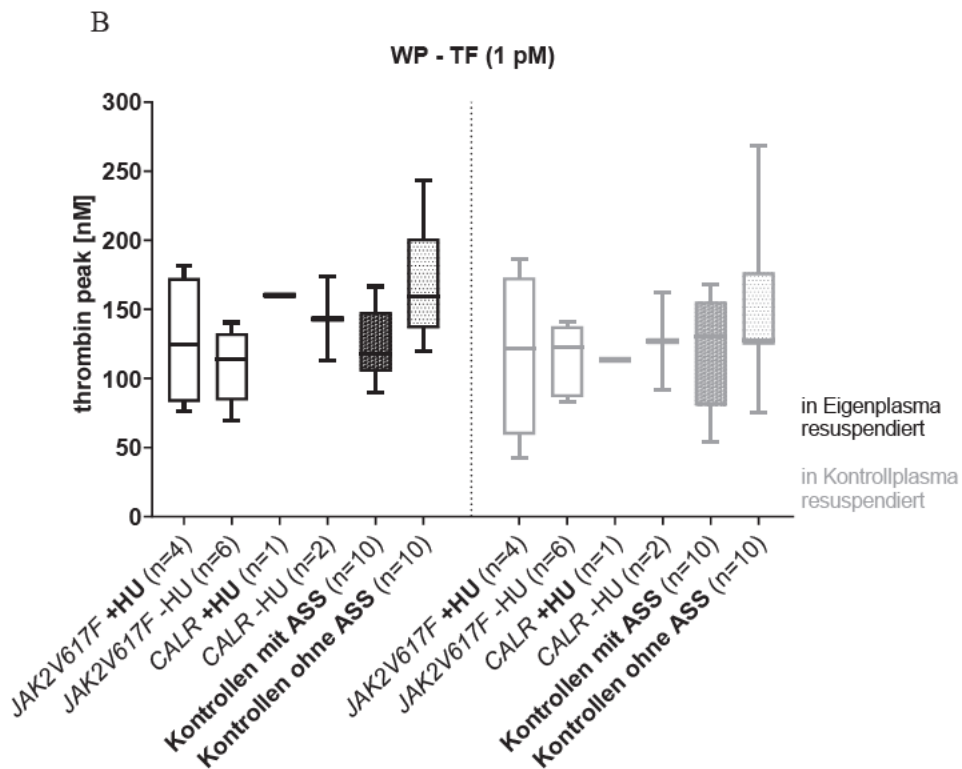
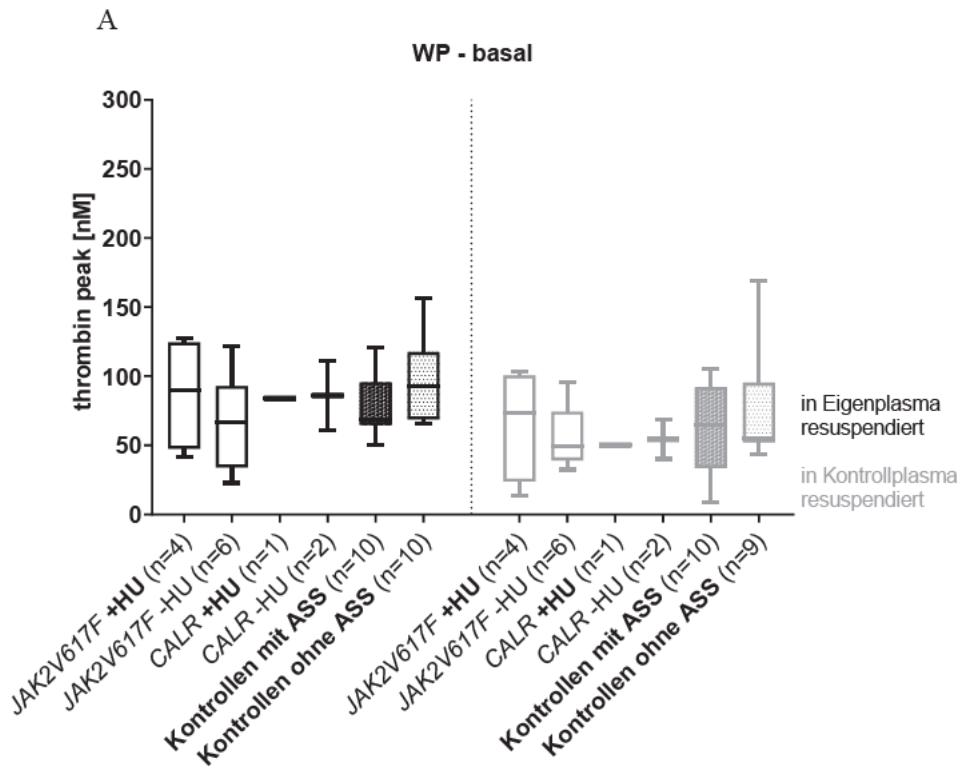
Grafik B zeigt die „Time to peak“ der isolierten Thrombozyten aller dargestellten Gruppen in EP und KP resuspendiert, nach Zugabe von 1 pM des physiologischen Gerinnungsaktivators TF. Die Auswertung ergab statistisch auffällig verlängerte Zeiten bis zum Erreichen des „Thrombin peaks“ bei den „Kontrollen mit ASS“ in KP (Median: 24,67 min) im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“ in KP (Median: 18,67 min;  $p = 0,0022$ , Unpaired t-test), wie auch im Vergleich zu der Patientengruppe „JAK2V617F -HU“ in KP (Median: 20,5 min;  $p = 0,0188$ , Unpaired t-test) und in EP (Median: 19,17 min;  $p = 0,0368$ , Unpaired t-test). Die „Kontrollen ohne ASS“ in KP benötigten hingegen eine statistisch auffällig kürzere „Time to peak“ im Median von 18,67 Minuten im Vergleich zu der „JAK2V617F +HU“ Gruppe in KP (Median: 23,5 min;  $p = 0,0456$ , Unpaired t-test) und wie bereits oben erwähnt im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ in KP.

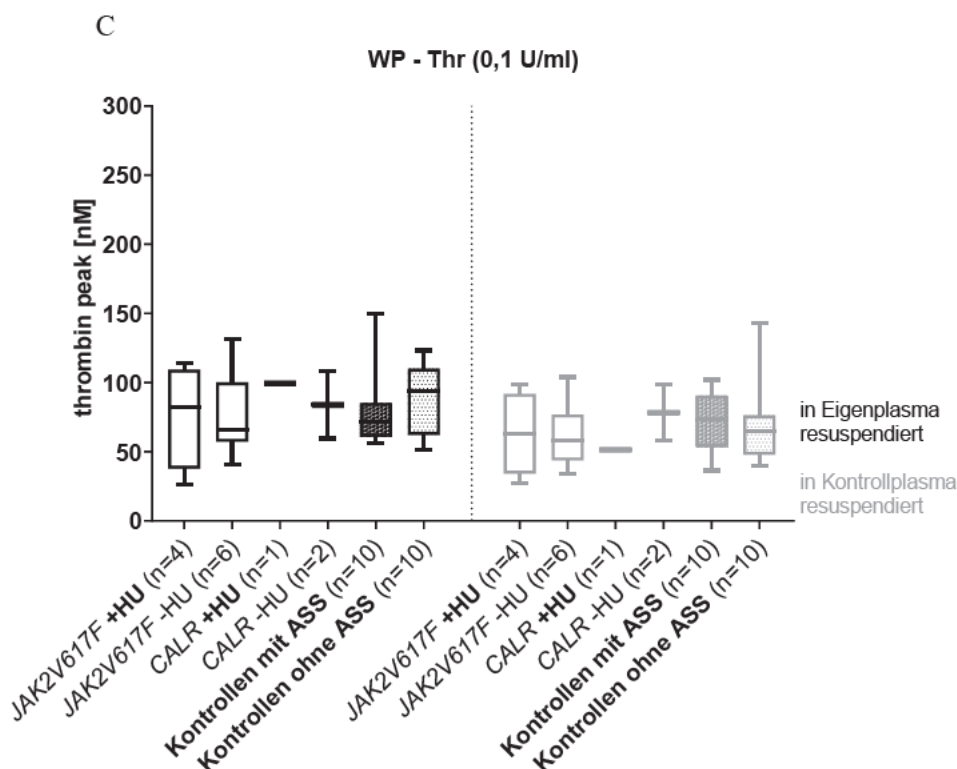
Grafik C stellt die „Time to peak“ aller Patienten- und Kontrollprobandengruppen in EP sowie KP nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin dar. Die Thrombozyten der „Kontrollen mit ASS“ in EP resuspendiert (Median: 26 min) waren statistisch auffällig langsamer in der Thrombingenerierung bzw. dem Erreichen des „Thrombin peaks“ im Vergleich zu den Thrombozyten der Patientengruppen „JAK2V617F -HU“ in EP (Median: 22,5 min;  $p = 0,0084$ , Mann-Whitney test), „JAK2V617F +HU“ in EP (Median: 20,86 min;  $p = 0,0185$ , Unpaired t-test) und der gleichen „JAK2V617F +HU“ Gruppe in KP (Median: 22 min;  $p = 0,0378$ , Unpaired t-test). Zudem zeigte die „JAK2V617F -HU“ Gruppe in EP (Median: 22,5 min) eine statistisch relevant kürzere „Time to peak“ im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ in KP (Median: 26,67 min;  $p = 0,0341$ , Mann-Whitney test). Die Thrombozyten der „CALR -HU“ Gruppe erreichten den „Thrombin-Peak“ tendenziell am schnellsten, sowohl im EP (Median: 18,86 Minuten) als auch im KP (Median: 19,35 Minuten). Hier konnten aufgrund der zu geringen Patientenzahl ( $n < 3$ ) aber keine statistischen Tests durchgeführt werden. Am langsamsten war im EP der „CALR-positive Patient +HU“ mit einer „Time to peak“ von 27,33 Minuten; und im KP die „Kontrollen mit ASS“ im Median von 26,67 Minuten.

In der Analyse fielen weder unter basalen Messbedingungen noch nach Zugabe von TF oder Thrombin statistisch relevante Unterschiede im Median zwischen den jeweiligen „Time to peak“ Werten im EP und KP der „JAK2V617F -HU“ sowie der „JAK2V617F +HU“ Gruppe auf.

ERGEBNISSE

4.2.1.4.3 „THROMBIN PEAK“ ISOLIERTER THROMBOZYTEN IN EIGEN- UND KONTROLLPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN





**Abbildung 19:** „Thrombin peak“ isolierter Thrombozyten resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).

(WP = „Washed platelets“ (isolierte Thrombozyten), TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, nM = Nanomolar)

Die Abbildung 19 veranschaulicht die höchste Thrombingenerierung von allen gemessenen Versuchszeitpunkten, den „Thrombin peak“, der primär isolierten Thrombozyten aller Patienten- und Kontrollprobandengruppen. In der linken Grafikhälfte sind wieder die Ergebnisse aller Gruppen in EP gezeigt und rechts die Ergebnisse derselben Gruppen in KP.

Grafik A zeigt dabei die bei der basalen Thrombingenerierung erreichten „Thrombin peaks“ ohne Zusatz von Gerinnungstriggern. Es ergab sich ein statistisch relevanter Unterschied zwischen dem höchsten „Thrombin peak“ der „Kontrollen ohne ASS“ in EP (Median: 92,72 nM) und dem niedrigsten „Thrombin peak“ der „JAK2V617F -HU“ Gruppe in KP (Median: 49,72 nM;  $p = 0,0116$ , Unpaired t-test) von allen dargestellten Gruppen in EP wie auch im KP.

Generell haben die Thrombozyten aller Patientengruppen wie auch der Kontrollen im EP im Median tendenziell einen höheren „Thrombin peak“ generieren können als im KP. Dieses Phänomen setzte sich auch nach Zugabe von TF (Grafik B) und Thrombin (Grafik C) in den meisten Fällen fort. Ausnahmen zeigen sich in der Grafik B im KP nach Zugabe von TF, in

## ERGEBNISSE

dem die „JAK2V617F -HU“ Gruppe (Median: 122,5 nM) sowie die „Kontrollen mit ASS“ (Median: 130,5 nM) beide tendenziell höhere „Thrombin peaks“ erreichten als im EP. Da erreichte die „JAK2V617F -HU“ Gruppe nur einen Median von 114,3 nM und die „Kontrollen mit ASS“ einen Median von 118,1 nM. Außerdem haben in Grafik C die „Kontrollen mit ASS“ auch im KP (Median: 73,6 nM) einen höheren „Thrombin peak“ erreichen können als im EP (Median: 71,94 nM).

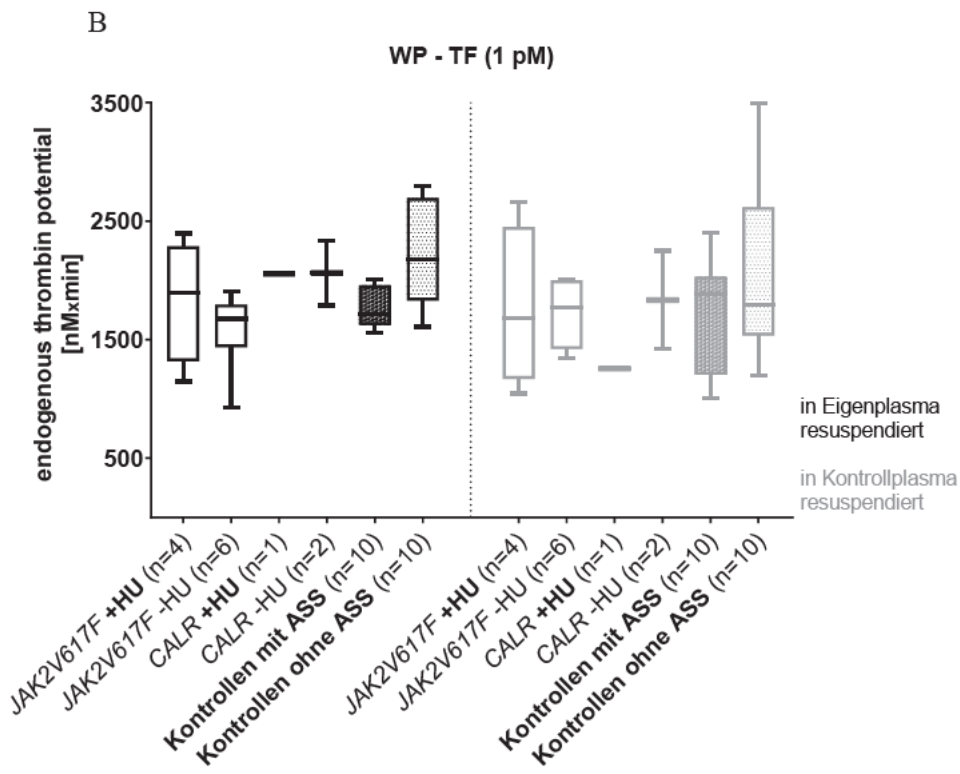
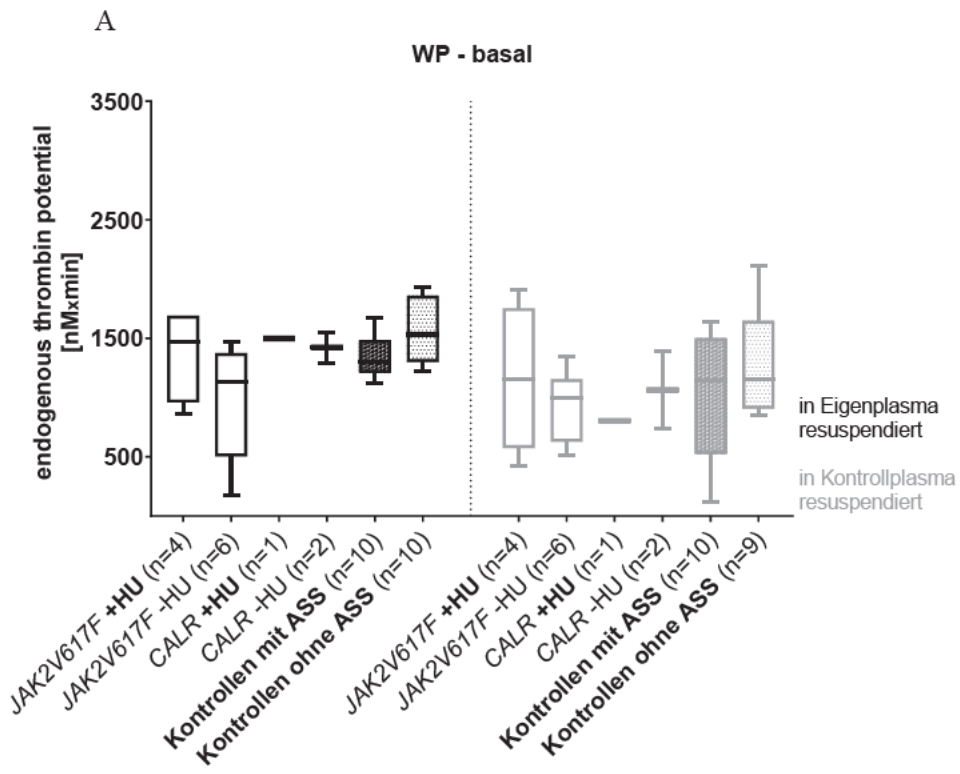
In Grafik B haben die Thrombozyten des „CALR +HU“-Patienten (P11) im EP mit 160,1 nM den höchsten „Thrombin peak“ erreicht. Da allerdings  $n = 1$ , konnten mit dieser Gruppe keine statistischen Vergleichstests durchgeführt werden. Bei den anderen Gruppen ergaben sich aber in der Auswertung statistische Auffälligkeiten zwischen dem am zweithöchsten erreichten „Thrombin peak“ der „Kontrollen ohne ASS“ in EP (Median: 159,2 nM) und den niedrigeren „Thrombin peaks“ der „Kontrollen mit ASS“ in EP (Median: 118,1 nM;  $p = 0,0088$ , Unpaired t-test) und der „JAK2V617F -HU“ Gruppe in EP (Median: 114,3 nM;  $p = 0,0082$ , Unpaired t-test) sowie in KP (Median: 122,5 nM;  $p = 0,0145$ , Unpaired t-test).

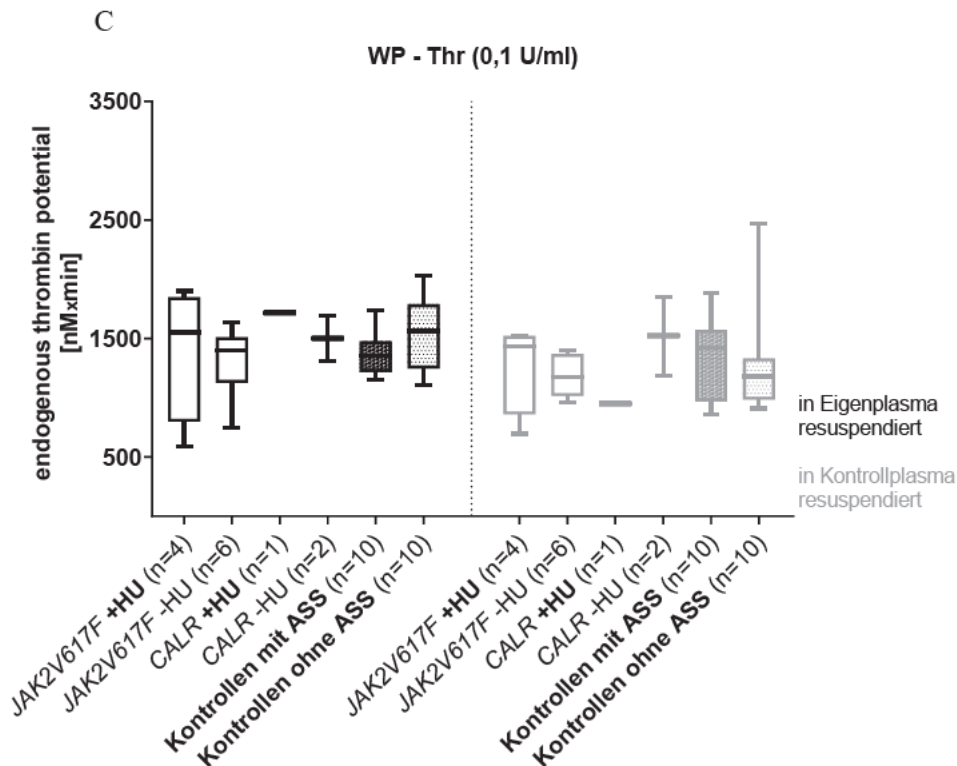
In Grafik C sind die „Thrombin peaks“ nach Zugabe von 0,1 U/ml des physiologischen Thrombozytenagonisten Thrombin dargestellt. In der Analyse ergaben sich keine statistischen Auffälligkeiten. Es fällt jedoch auf, dass durchweg alle Patienten- und Kontrollprobandengruppen in EP wie auch KP nach Zugabe von Thrombin (Grafik C) weitaus geringere „Thrombin peaks“ zeigten als nach Zugabe von TF (Grafik B). Für solch eine Gegenüberstellung wurden jedoch keine statistischen Vergleichstests durchgeführt.

In der Analyse fielen weder unter basalen Messbedingungen, noch nach Zugabe von TF oder Thrombin statistisch relevante Unterschiede zwischen den jeweiligen „Thrombin peak“ Werten im EP und KP der „JAK2V617F -HU“ sowie der „JAK2V617F +HU“ Gruppe auf.

ERGEBNISSE

4.2.1.4.4 „ETP“ ISOLierter THROMBOZyTEN IN EIGEN- UND KONTROLLPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN





**Abbildung 20: ETP isolierter Thrombozyten resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

(ETP = „Endogeneous thrombin potential“, WP = „Washed platelets“ (isolierte Thrombozyten), TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, min = Minuten, nM = Nanomolar)

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse des „endogenen Thrombinpotentials“ (ETP) aller Patientengruppen in EP und KP dargestellt und auch wieder vergleichend die Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS in die Grafiken A-C mit aufgenommen worden.

Grafik A veranschaulicht das ETP der basalen Thrombingenerierung aller dargestellten Gruppen, d. h. ohne Zugabe jeglicher Thrombozytenagonisten. Im Gegensatz zu den Thrombozyten der „Kontrollen ohne ASS“ resuspendiert in EP (Median: 1531 nMxmin) haben die der „JAK2V617F –HU“ Patienten in EP (Median: 1133 nMxmin;  $p = 0,0085$ , Unpaired t-test) sowie in KP (Median: 997,5 nMxmin;  $p = 0,0008$ , Unpaired t-test) nur ein statistisch auffällig geringeres ETP erzeugen können. Zudem ergab sich noch ein statistisch relevanter Unterschied zwischen dem geringeren ETP der eben genannten „JAK2V617F –HU“ Gruppe in KP und dem höher generierten ETP der „Kontrollen mit ASS“ in EP (Median: 1302 nMxmin,  $p = 0,0049$ , Unpaired t-test).

Grafik B zeigt die Messergebnisse des ETP nach Zugabe von 1 pM des physiologischen Thrombozytenaktivators TF. Relevante Unterschiede des gemessenen ETP gab es nur zwischen den „Kontrollen ohne ASS“ in EP (mit dem höchsten generierten „TP im Median von 2181 nMxmin) und den „JAK2V617F –HU“ Patienten im EP (Median: 1676 nMxmin;

## ERGEBNISSE

$p = 0,0075$ , Mann-Whitney test) sowie auch im KP (Median: 1772 nMxmin;  $p = 0,0221$ , Unpaired t-test). Vergleicht man zudem die Medianwerte aus Grafik A mit Grafik B, so erkennt man, dass alle dargestellten Gruppen durchweg in EP wie auch in KP nach Zugabe von TF (Abbildung 20, Grafik B) jeweils ein höheres ETP generieren konnten als während der basalen Messung (Abbildung 20, Grafik A).

Grafik C veranschaulicht das ETP aller Gruppen nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin. Hier haben alle Patienten- und Kontrollprobandengruppen zwar im Vergleich zur basalen Messung in Grafik A höhere ETP-Medianwerte generiert, jedoch im Vergleich zur Messung nach TF-Gabe (Abbildung 20, Grafik B) wieder tendenziell niedrigere ETP-Medianwerte reproduziert. Die statistische Analyse der Ergebnisse untereinander in Grafik C ergab einen relevanten Unterschied zwischen dem erhöhten ETP der „Kontrollen ohne ASS“ in EP (Median: 1564 nMxmin) und dem geringeren ETP der gleichen Gruppe im KP (Median: 1181 nMxmin,  $p = 0,0288$ , Mann-Whitney test) sowie der „JAK2V617 –HU“ Patientengruppe in KP (Median: 1179 nMxmin;  $p = 0,0288$ , Unpaired t-test).

In der Analyse fielen weder unter basalen Messbedingungen, noch nach Zugabe von TF oder Thrombin statistisch relevante Unterschiede zwischen den jeweiligen ETP-Werten im EP und KP der „JAK2V617F –HU“ sowie der „JAK2V617F +HU“ Gruppe auf.

### **4.2.1.5 Messung der Thrombingenerierung mononukleärer Zellen *in vitro* mittels CAT**

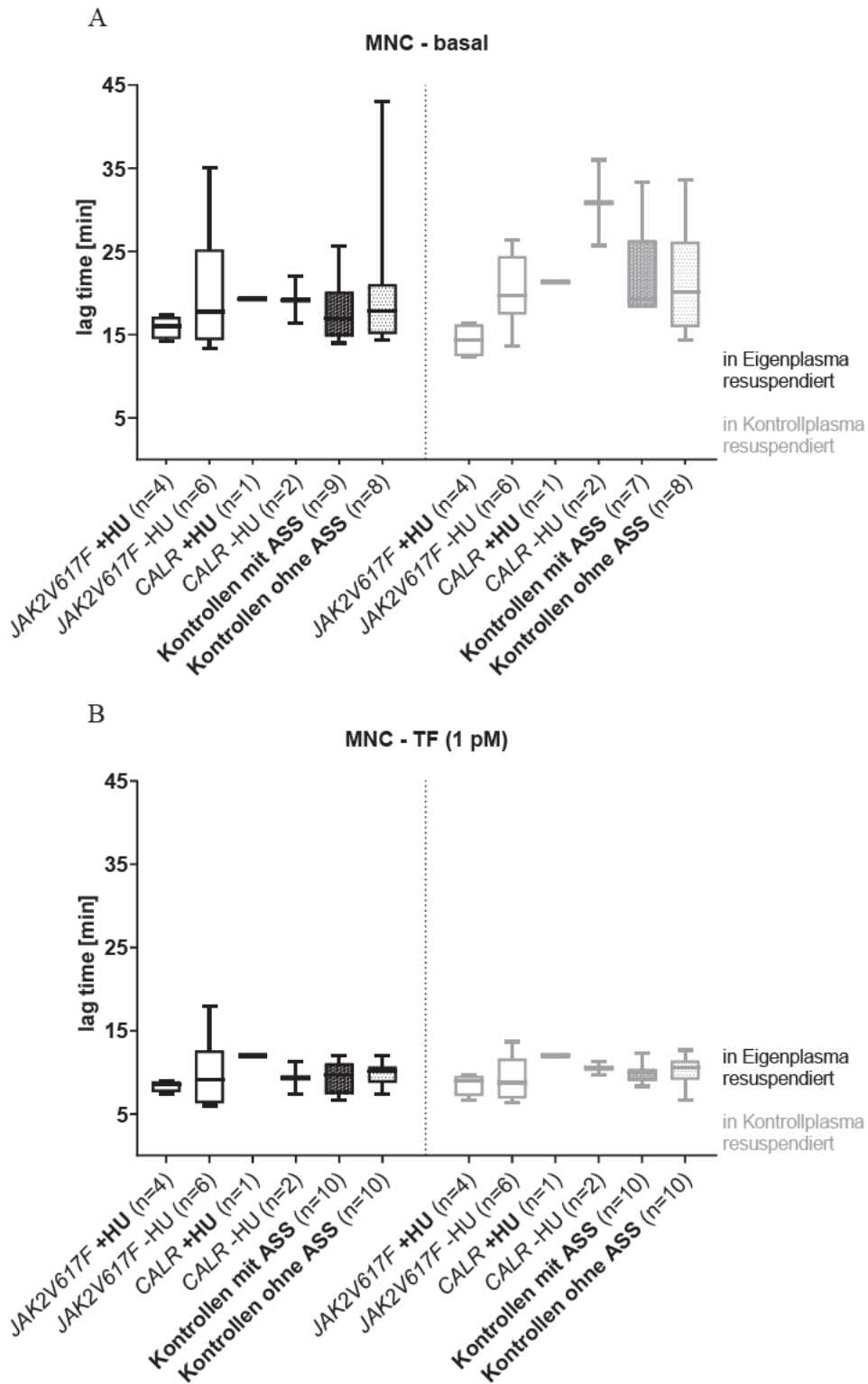
Für diese Versuchsreihe wurden die mononukleären Zellen (MNC) der ET-Patienten wie auch der Kontrollprobandengruppen extrahiert (siehe Kapitel 3.9). Innerhalb der MNC-Fraktion stellen die Monozyten den primären Zelltyp dar, welcher das Thrombin generiert. Die MNC wurden auf eine definierte Konzentration jeweils mit Eigenplasma (PFP) und mit Kontrollplasma (PFP; nicht von der Kontrollprobandengruppe, sondern ein standardisiertes Kontrollplasma aus dem Labor) verdünnt. Diese Versuchsreihe wurde durchgeführt, um den unterschiedlichen Einfluss von MNC auf die TG plasmaabhängig bei den ET-Gruppen zu untersuchen und mit der korrespondierenden TG auf Thrombozyten zu vergleichen.

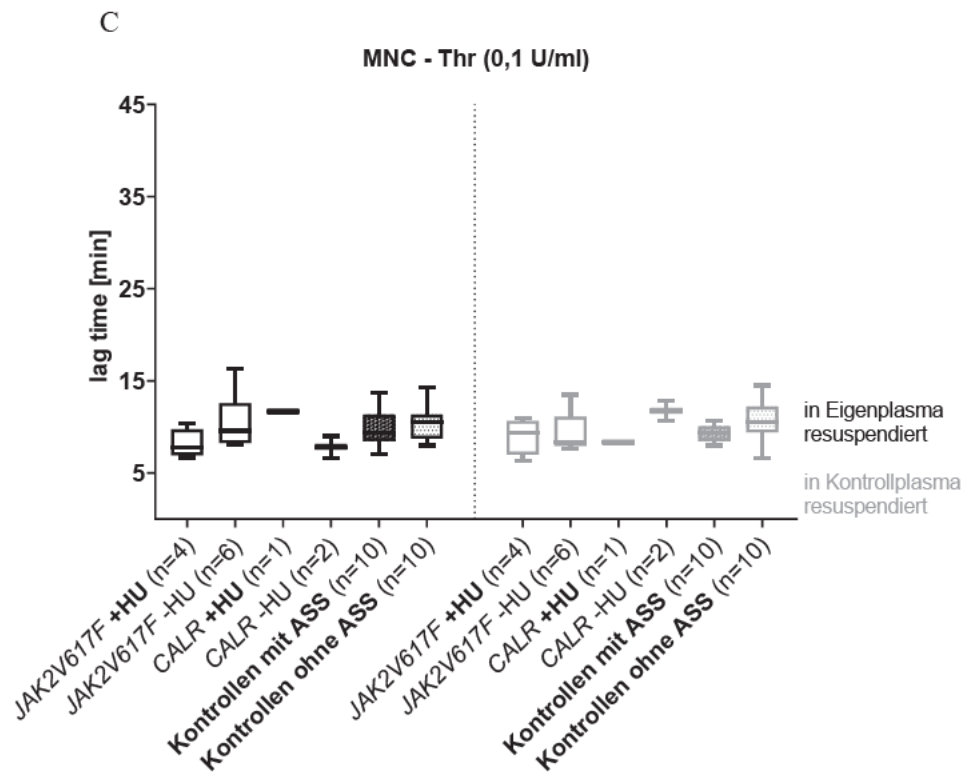
Es wurden statistische Gruppenvergleichstests durchgeführt zwischen den „JAK2V617F-positiven Patienten +/-HU“ und den „Kontrollen mit/ohne ASS“ sowie zwischen den „Kontrollen mit/ohne ASS“ untereinander, jeweils in Eigenplasma (EP) wie auch in Kontrollplasma (KP). Außerdem prüften wir die Ergebnisse der „JAK2V617F-positiven Patienten +/-HU“ und der „Kontrollen mit/ohne ASS“ im EP im Vergleich zu den Ergebnissen im KP auf statistische Auffälligkeiten mittels T-Test oder Mann-Whitney-Test. Ließen sich statistische Auffälligkeiten ( $p < 0,05$ ) bei den Gruppenvergleichen darstellen, sind die dazugehörigen p-Werte im Fließtext erwähnt. Die kompletten statistischen Auswertungen

## ERGEBNISSE

durch die Statistiksoftware GraphPad Prism 8.3.1 mit p-Werten und deskriptiver Statistik (Minimum, 25 % Perzentile, Median, 75 % Perzentile und Maximum) finden sich in Tabellen im Anhang.

### 4.2.1.5.1 „LAG TIME“ DER MNC IN EIGEN- UND KONTROLLPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN





**Abbildung 21:** „Lag time“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).

(MNC = „mononukleäre Zellen“, TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, pM = Pikomolar)

Die Abbildung 21 stellt die Messergebnisse der „Lag time“ (Verzögerungszeit bis zum Beginn der Thrombingenerierung) der „mononukleären Zellen“ (MNC) aller Patienten- und Kontrollprobandengruppen dar, die jeweils in EP und KP gemessen wurde. Grafik A veranschaulicht dabei rein die basale Messung der Thrombingenerierung ohne Zusatz von Triggersubstanzen. Im EP haben die MNC des „CALR +HU“ Patienten (P11) die längste „Lag time“ von 19,33 Minuten benötigt, dicht gefolgt von der „Lag time“ der „CALR –HU“ Gruppe mit einem Medianwert von 19,19 min. Am schnellsten waren jedoch die MNC der „JAK2V617F-positiven Patienten +HU“ mit einer „Lag time“ im Median von nur 16,03 min. Die MNC der „Kontrollen mit ASS“ (Median: 17 min) und der „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 17,84 min) hatten nur geringfügig längere Zeiten gezeigt. Im EP ergaben sich bei den statistischen Gruppenvergleichen demnach auch keine nennenswerten Unterschiede und die Patientengruppen lagen mit ihren Medianwerten noch innerhalb der Box-Plots beider Kontrollgruppen. Im KP jedoch benötigten die MNC der „CALR-positiven Patienten –HU“ eine deutlich längere „Lag time“ von 30,86 min im Median. Und auch die MNC des „CALR-positiven Patienten +HU“ benötigten hier mehr Zeit (21,33 min) im Vergleich zu ihrem Ergebnis im EP, lagen jedoch immer noch innerhalb der Box-Plots der Kontrollen im KP. Auch die MNC der

## ERGEBNISSE

beiden „Kontrollen mit und ohne ASS“ sowie der „JAK2V617F-positiven Patienten –HU“ reproduzierten im KP tendenziell ähnliche, aber leicht verlängerte „Lag time“ Medianwerte im Vergleich zu den Ergebnissen im EP. Nur die MNC der „JAK2V617F-positiven Patienten +HU“ (Median: 14,36 min) konnten im KP eine kürzere „Lag time“ erreichen, die auch kürzer als die der Kontrollen (Box-Plot-Bereich) war. In den statistischen Auswertungen ergaben sich somit auffällige Unterschiede in der verlängerten „Lag time“ der „Kontrollen mit ASS“ im KP (Median: 19,33 min) zu ihren kürzeren Zeiten im EP (Median: 17 min;  $p = 0,0306$ , Mann-Whitney test) sowie zu den kürzeren Zeiten der „JAK2V617F-positiven Patienten +HU“ im KP (Median: 14,36 min;  $p = 0,0061$ , Mann-Whitney test) und im EP (Median: 16,03 min;  $p = 0,0061$ , Mann-Whitney test).

Grafik B zeigt die „Lag time“ der MNC in EP und KP, gemessen nach Zugabe von 1 pM TF. Alle dargestellten Gruppen zeigten im Schnitt vergleichbare „Lag time“-Medianwerte und auch kaum Unterschiede im Vergleich der Ergebnisse in EP und KP. Als einzige Gruppe sind die MNC der „JAK2V617F-positiven Patienten +HU“ in EP herausgestochen, mit einer statistisch auffällig kürzeren „Lag time“ im Median von 8,6 Minuten im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ im KP mit einem Median von 10 Minuten ( $p = 0,0227$ , Unpaired t-test).

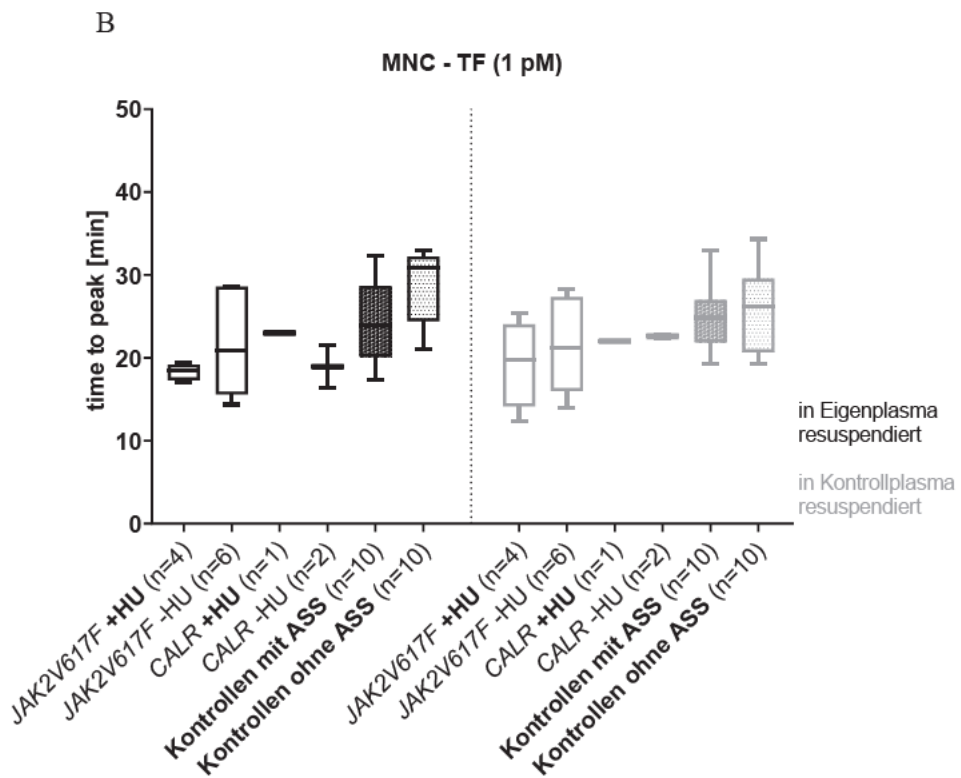
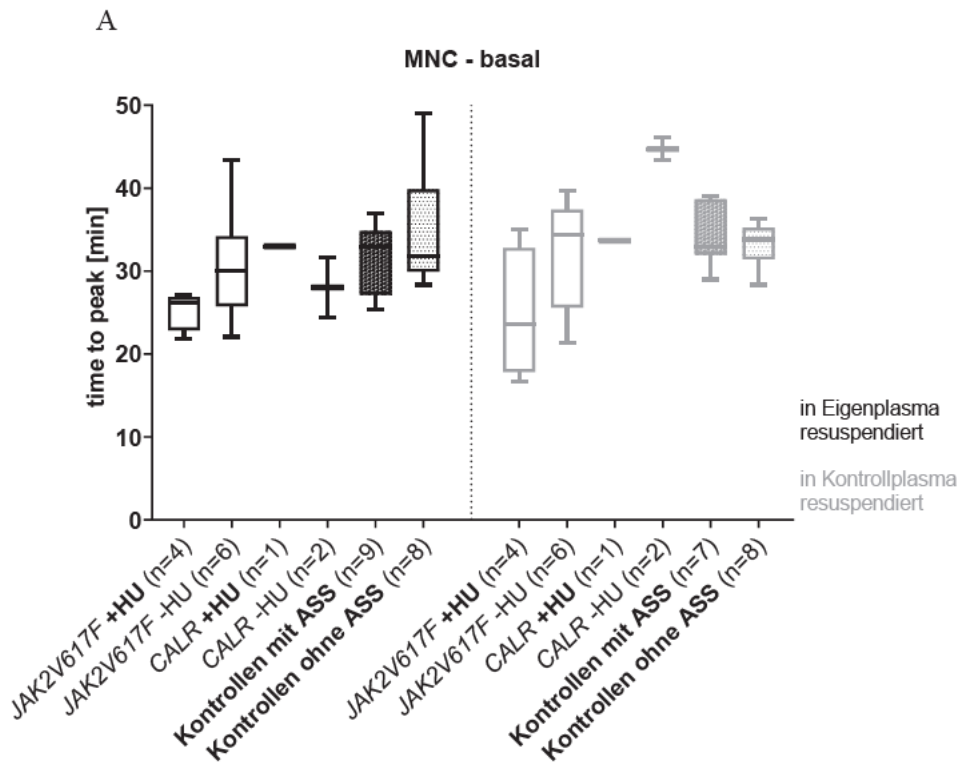
Grafik C zeigt die „Lag time“ nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin. Die Unterschiede der Verzögerungszeiten zwischen den einzelnen Patienten- und Kontrollprobandengruppen waren für keine der Analysen statistisch auffällig ( $p \geq 0,05$ ). Die „Kontrollen mit ASS“ und die „Kontrollen ohne ASS“ haben sogar jeweils ihre im EP erreichten Medianwerte auch im KP erreichen können.

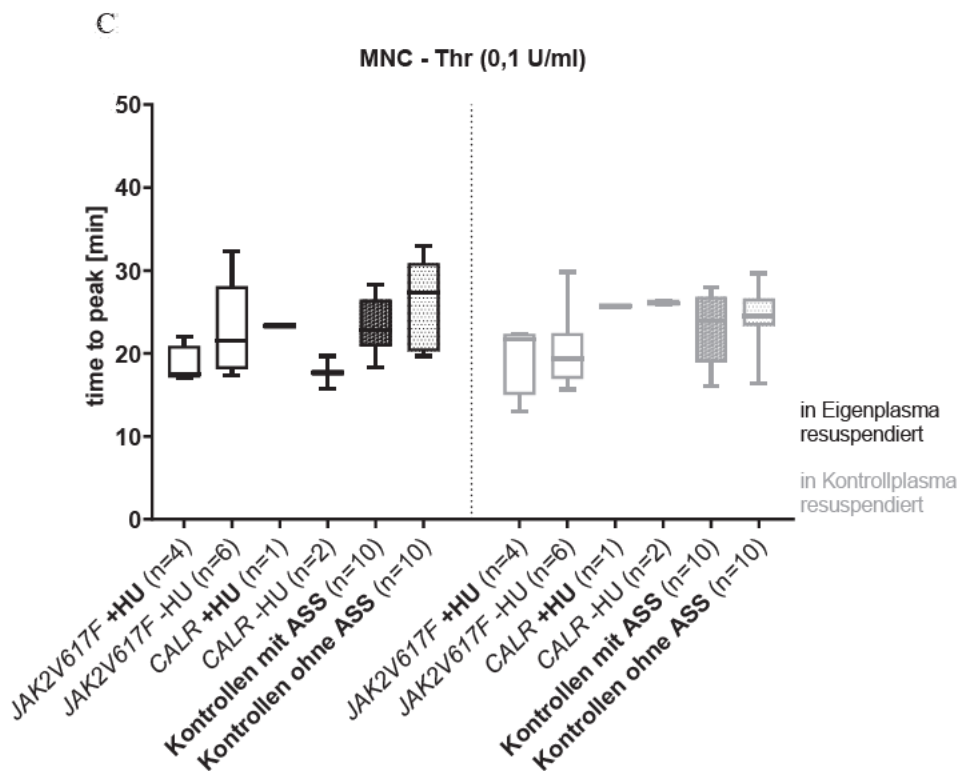
Auffällig war außerdem, dass in allen Grafiken A–C zum einen die MNC der „JAK2V617F +HU“ Patienten im EP eine tendenziell kürzere „Lag time“ zeigten als die „JAK2V617F –HU“ Patienten. Im KP änderte sich dieses Verhältnis bei TF- und Thrombin-Zugabe. Zum anderen zeigten die MNC der „CALR -HU“ Patienten tendenziell eine kürzere „Lag time“ als der „CALR +HU“ Patient (P11). Im KP änderte sich dieses Verhältnis bei der basalen Messung und nach Thrombin-Zugabe.

In der Analyse fielen weder unter basalen Messbedingungen noch nach Zugabe von TF oder Thrombin statistisch relevante Unterschiede zwischen den „Lag time“ Werten im EP und KP jeweils der „JAK2V617F –HU“ sowie der „JAK2V617F +HU“ Gruppe auf.

ERGEBNISSE

4.2.1.5.2 „TIME TO PEAK“ DER MNC IN EIGEN- UND KONTROLLPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN





**Abbildung 22: „Time to peak“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

(MNC = „mononukleäre Zellen“, TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, pM = Pikomolar)

In Abbildung 22 werden die Messergebnisse der „Time to peak“ der MNC von allen Patienten- und Kontrollgruppen, gemessen jeweils in EP und KP, dargestellt. Grafik A zeigt die „Time to peak“ der basalen Thrombingenerierung, ohne Zusatz von Gerinnungstriggern. Es ergaben sich mehrere statistisch auffällige Unterschiede.

Im EP generierten die MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe die kürzeste Zeit im Median von 26,17 Minuten im Vergleich zu den anderen dargestellten Gruppen im EP. Es ergab sich zudem ein relevanter Unterschied zu den verlängerten Zeiten der „Kontrollen mit ASS“ im EP (Median: 33 min;  $p = 0,0214$ , Unpaired t-test) sowie im KP (Median: 33 min;  $p = 0,0022$ , Unpaired t-test) und auch zu den „Kontrollen ohne ASS“ im EP (Median: 31,84 min;  $p = 0,0248$ , Unpaired t-test) sowie im KP (Median: 33,83 min;  $p = 0,0005$ , Unpaired t-test).

Noch kürzere Zeiten als die „JAK2V617F +HU“ Gruppe im EP generierten die MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im KP mit nur 23,67 Minuten im Median. Diese Zeit war statistisch verkürzt im Vergleich zu den „Time to peak“ Werten der „Kontrollen ohne ASS“ im KP ( $p = 0,0174$ , Unpaired t-test) und im EP ( $p = 0,0445$ , Unpaired t-test) sowie der „Kontrollen mit ASS“ im KP ( $p = 0,0216$ ; Unpaired t-test).

## ERGEBNISSE

Die längste „Time to peak“ mit 44,72 Minuten im Median, im Vergleich zu allen anderen dargestellten Gruppen, generierten die MNC der „CALR –HU“ Gruppe im KP. Da  $n < 3$  wurden mit dieser Gruppe aber keine statistischen Tests durchgeführt.

Grafik B stellt die „Time to peak“ nach Zugabe von 1 pM des physiologischen Gerinnungstriggers TF grafisch dar. Bei der Auswertung des Parameters generierten die MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im EP die geringste „Time to peak“ im Median von 18,42 Minuten. Diese war statistisch nennenswert kürzer als die Zeiten der „Kontrollen mit ASS“ im EP (Median: 24 min;  $p = 0,0348$ , Unpaired t-test) sowie im KP (Median: 24,84 min;  $p = 0,006$ , Unpaired t-test) und auch kürzer als die der „Kontrollen ohne ASS“ im EP (Median: 30,92 min;  $p = 0,0007$ , Unpaired t-test) sowie im KP (Median: 26,17 min;  $p = 0,009$ , Unpaired t-test). Geringfügig mehr Zeit als im EP benötigten die „JAK2V617F-positiven Patienten +HU“ jedoch im KP (Median: 19,84 min). Auch da ergaben sich statistisch nennenswerte Unterschiede zu den verlängerten Zeiten der MNC der „Kontrollen mit ASS“ im KP ( $p = 0,0467$ , Unpaired t-test) und der „Kontrollen ohne ASS“ im KP ( $p = 0,042$ , Unpaired t-test) sowie im EP ( $p = 0,0053$ , Unpaired t-test). Nur tendenziell geringfügig längere Medianzeiten im Vergleich zu der „JAK2V617F +HU“ Gruppe in KP benötigte die „JAK2V617F –HU“ Gruppe in KP. So erreichten auch hier sowohl die MNC der „JAK2V617F –HU“ Gruppe im EP (Median: 20,92 min;  $p = 0,0157$ , Unpaired t-test) als auch im KP (Median: 21,2 min;  $p = 0,0126$ , Unpaired t-test) kürzere Zeiten im Gegensatz zu den „Kontrollen ohne ASS“ im EP (Median: 30,92 min). Abschließend kann man feststellen, dass die MNC aller Patientengruppen, ob in EP oder KP gemessen, im Median durchweg kürzere „Time to peak“-Werte zeigten als die Kontrollprobandengruppen. Dies spräche für reaktionsfähigere MNC von ET-Patienten im Vergleich zu denen gesunder Kontrollprobanden.

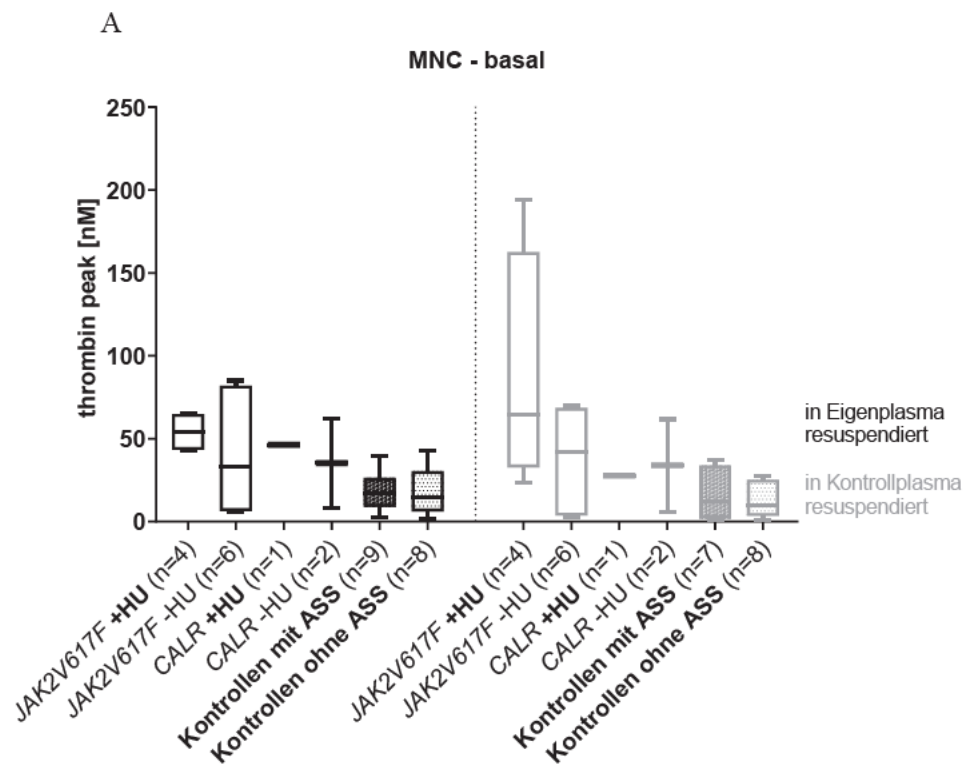
In Grafik C ist die „Time to peak“ aller Gruppen nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin in Boxplots dargestellt. Im EP benötigten hier die MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im Median die kürzeste Zeit von 17,52 Minuten, um den „Thrombin peak“ zu erreichen, auch im Vergleich zu allen Gruppenmessungen im KP. In der statistischen Analyse fielen im EP gemessene nennenswerte Unterschiede zwischen der kürzesten „Time to peak“ der „JAK2V617F +HU“ Gruppe und den „Kontrollen mit ASS“ (Median: 22,84 min;  $p = 0,013$ , Mann-Whitney test) sowie den „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 27,33 min;  $p = 0,014$ , Mann-Whitney test) auf. Auch die MNC der „Kontrollen ohne ASS“ im KP (Median: 24,5 min;  $p = 0,021$ , Mann-Whitney test) wiesen eine statistisch auffällig verlängerte „Time to peak“ im Gegensatz zu denen der „JAK2V617F +HU“ Gruppe in EP auf. Etwas mehr Zeit, im Vergleich zu den Messungen im EP, benötigten die „JAK2V617F +HU“ MNC dann aber im KP mit einem Medianwert von 21,67 min. Dies war jedoch immer noch statistisch auffällig kürzer als die Zeiten der „Kontrollen ohne ASS“ im KP ( $p = 0,013$ , Mann-Whitney test). Die MNC der „JAK2V617F –HU“ Gruppe im

## ERGEBNISSE

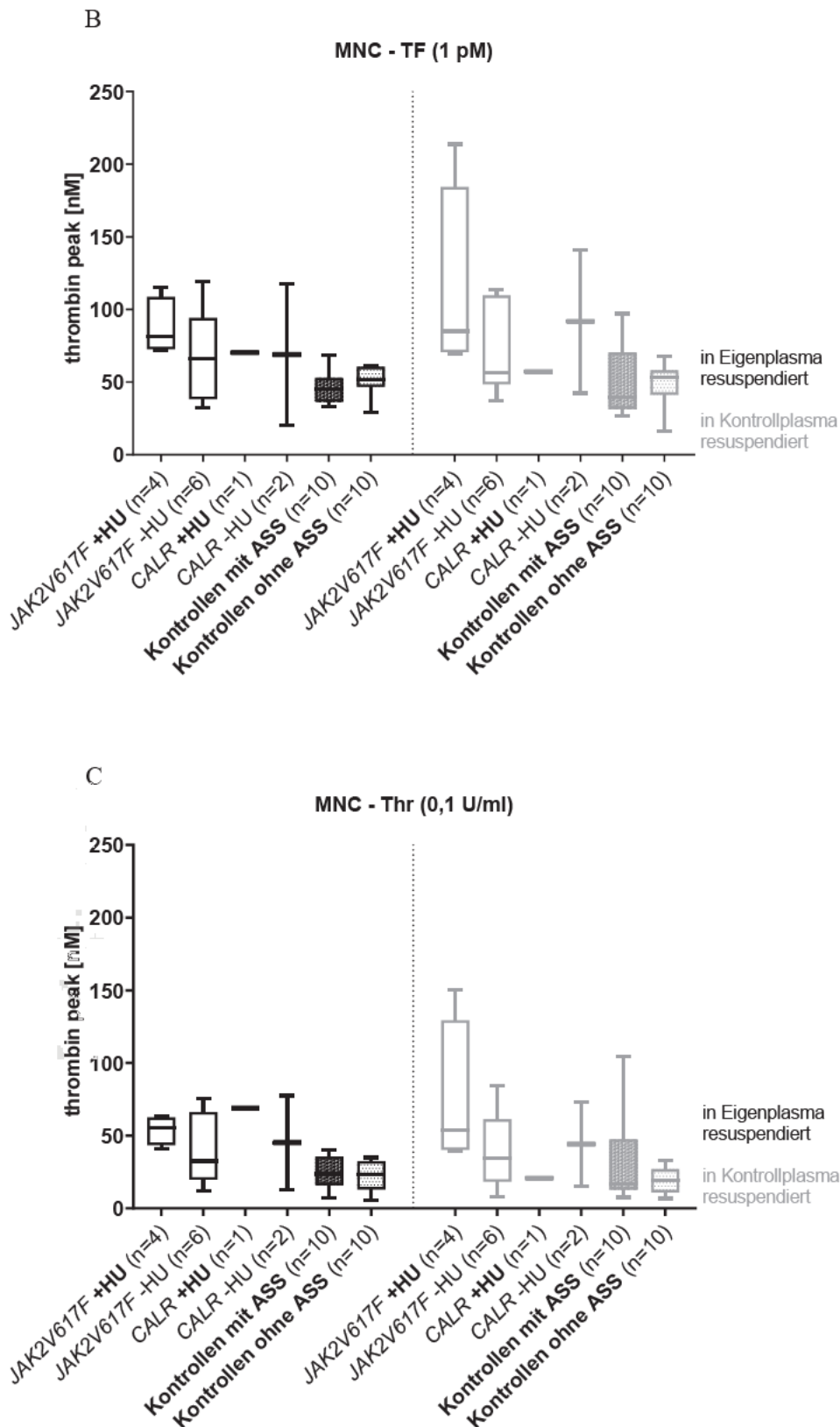
KP (Median: 19,37 min) wiesen eine statistisch auffällig kürzere „Time to peak“ im Vergleich zu denen der „Kontrollen ohne ASS“ im EP ( $p = 0,0174$ , Mann-Whitney test) auf.

In der Analyse fielen weder unter basalen Messbedingungen noch nach Zugabe von TF oder Thrombin statistisch relevante Unterschiede zwischen den jeweiligen „Time to peak“ Werten im EP und KP der „JAK2V617F -HU“ sowie der „JAK2V617F +HU“ Gruppe auf.

### 4.2.1.5.3 „THROMBIN PEAK“ DER MNC IN EIGEN- UND KONTROLLPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN



## ERGEBNISSE



**Abbildung 23: „Thrombin peak“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

(MNC = „mononukleäre Zellen“, TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, nM = Nanomolar)

## ERGEBNISSE

Die Abbildung 23 zeigt die höchste Thrombingenerierung der MNC von allen gemessenen Versuchszeitpunkten, den sogenannten „Thrombin peak“, aller Patienten- und Kontrollprobandengruppen jeweils im EP wie auch im KP.

In Grafik A wird die basale Thrombingenerierung der MNC aller Gruppen in EP wie auch in KP dargestellt. Die MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im KP erreichten den höchsten Thrombinwert von allen Gruppen, im KP wie auch im EP. Mit einem Median von 64,5 nM zeigte sich hier ein statistisch auffällig höherer „Thrombin peak“ verglichen zum einen zu den „Kontrollen mit ASS“ im KP (Median: 12,56 nM;  $p = 0,0362$ , Unpaired t-test) sowie im EP (Median: 16,86 nM;  $p = 0,0157$ , Unpaired t-test) als auch zum anderen zu den „Kontrollen ohne ASS“ im KP (Median: 10,08 nM;  $p = 0,0163$ , Unpaired t-test) sowie im EP (Median: 14,62 nM;  $p = 0,0243$ , Unpaired t-test). Einen etwas geringeren „Thrombin peak“ als im KP generierten die MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im EP und erreichten damit noch den höchsten Medianwert von 54,26 nM im Vergleich zu allen anderen Gruppen im EP. Hierzu ergaben sich wieder statistisch auffällige Unterschiede zu den „Kontrollen mit ASS“ im EP ( $p = 0,0003$ , Unpaired t-test) sowie im KP ( $p = 0,0033$ , Unpaired t-test), wie auch zu den „Kontrollen ohne ASS“ im EP ( $p = 0,0015$ , Unpaired t-test) sowie im KP ( $p = 0,0001$ , Unpaired t-test). Letztere Gruppe spiegelte den größten Unterschied in ihrem „Thrombin peak“ im Vergleich zu dem der „JAK2V617F +HU“ Gruppe in EP wider.

Grafik B zeigt die Messergebnisse des „Thrombin peaks“ aller dargestellten Gruppen nach Zugabe von 1 pM TF. Nach Zugabe des Gerinnungstriggers TF haben alle Patienten- und Kontrollprobandengruppen verhältnismäßig höhere Thrombinhöchstwerte erreichen können (vergleichend zu Grafik A). Auch hier hat die statistische Auswertung mehrere Auffälligkeiten präsentieren können. Die MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im KP erreichten den höchsten Thrombinmedianwert aller Gruppen, im KP wie auch im EP. Innerhalb der besagten „JAK2V617F +HU“ Gruppe befand sich auch ein absoluter „Ausreißer“-Patient (P3), dessen MNC nach TF-Zugabe sogar ein „Thrombin peak“ von 213 nM generierten (basal: 194 nM; nach Thrombin-Gabe: 150 nM). Mit einem Median von 85,02 nM zeigte sich bei der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im KP ein statistisch auffällig höherer „Thrombin peak“ verglichen zum einen zu den „Kontrollen mit ASS“ im EP (Median: 44,95 nM;  $p = 0,0081$ , Unpaired t-test) sowie im KP (Median: 39,41 nM;  $p = 0,0218$ , Unpaired t-test) als auch zum anderen zu den „Kontrollen ohne ASS“ in EP (Median: 51,83 nM;  $p = 0,011$ , Unpaired t-test) sowie im KP (Median: 53,22 nM;  $p = 0,011$ , Unpaired t-test). Im Vergleich zu den Messungen im KP generierten die MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im EP zwar einen etwas geringeren „Thrombin peak“, der aber trotzdem noch den höchsten Medianwert von 81,77 nM im Vergleich zu allen anderen Gruppen im EP darstellte. Hierzu ergaben sich wieder statistisch auffällige Unterschiede zu den „Kontrollen mit ASS“ im EP ( $p = 0,0004$ , Unpaired t-test) sowie

## ERGEBNISSE

im KP ( $p = 0,0203$ , Unpaired t-test), wie auch zu den „Kontrollen ohne ASS“ im EP ( $p = 0,0005$ , Unpaired t-test) sowie im KP ( $p = 0,0018$ , Unpaired t-test).

Die „JAK2V617F –HU“ Gruppe generierte im EP wie auch im KP zwar jeweils einen tendenziell geringeren „Thrombin peak“ als die „JAK2V617F +HU“ Gruppe, trotzdem kristallisierte sich noch ein statistisch auffälliger Unterschied zwischen dem erhöhten „Thrombin peak“ der „JAK2V617F –HU“ Gruppe im KP (Median: 56,58 nM) im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ im EP (Median: 44,95 nM;  $p = 0,0479$ , Unpaired t-test) heraus.

Grafik C zeigt die Ergebnisse des „Thrombin peaks“ nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin. Im EP erreichten die MNC des „CALR +HU“ Patienten (P11) mit einem Wert von 68,82 nM den höchsten „Thrombin peak“ von allen dargestellten Gruppe. Den zweithöchsten Wert im EP erreichten die MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe. Mit einem Median von 55,8 nM zeigte sich hier ein statistisch auffällig höherer „Thrombin peak“ verglichen zum einen zu den „Kontrollen mit ASS“ im EP (Median: 23,62 nM;  $p = 0,0005$ , Unpaired t-test) als auch zum anderen zu den „Kontrollen ohne ASS“ im EP (Median: 23,54 nM;  $p = 0,0002$ , Unpaired t-test). Den größten statistisch relevanten Unterschied fand sich im Vergleich der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im EP mit den „Kontrollen ohne ASS“ im KP (Median: 19,22 nM) mit einem p-Wert von  $< 0,0001$  (Unpaired t-test).

Einen nur geringfügig geringeren „Thrombin peak“, im Vergleich zu den Messungen im EP, generierten die MNC der „JAK2V617F +HU“ im KP und reproduzierten den höchsten Medianwert von 54 nM im Vergleich zu allen anderen Gruppen im KP. Hierzu ergaben sich wieder statistisch auffällige Unterschiede zu den „Kontrollen mit ASS“ im EP ( $p = 0,0098$ , Unpaired t-test) wie auch zu den „Kontrollen ohne ASS“ im EP ( $p = 0,0078$ , Unpaired t-test) sowie im KP ( $p = 0,0048$ , Unpaired t-test).

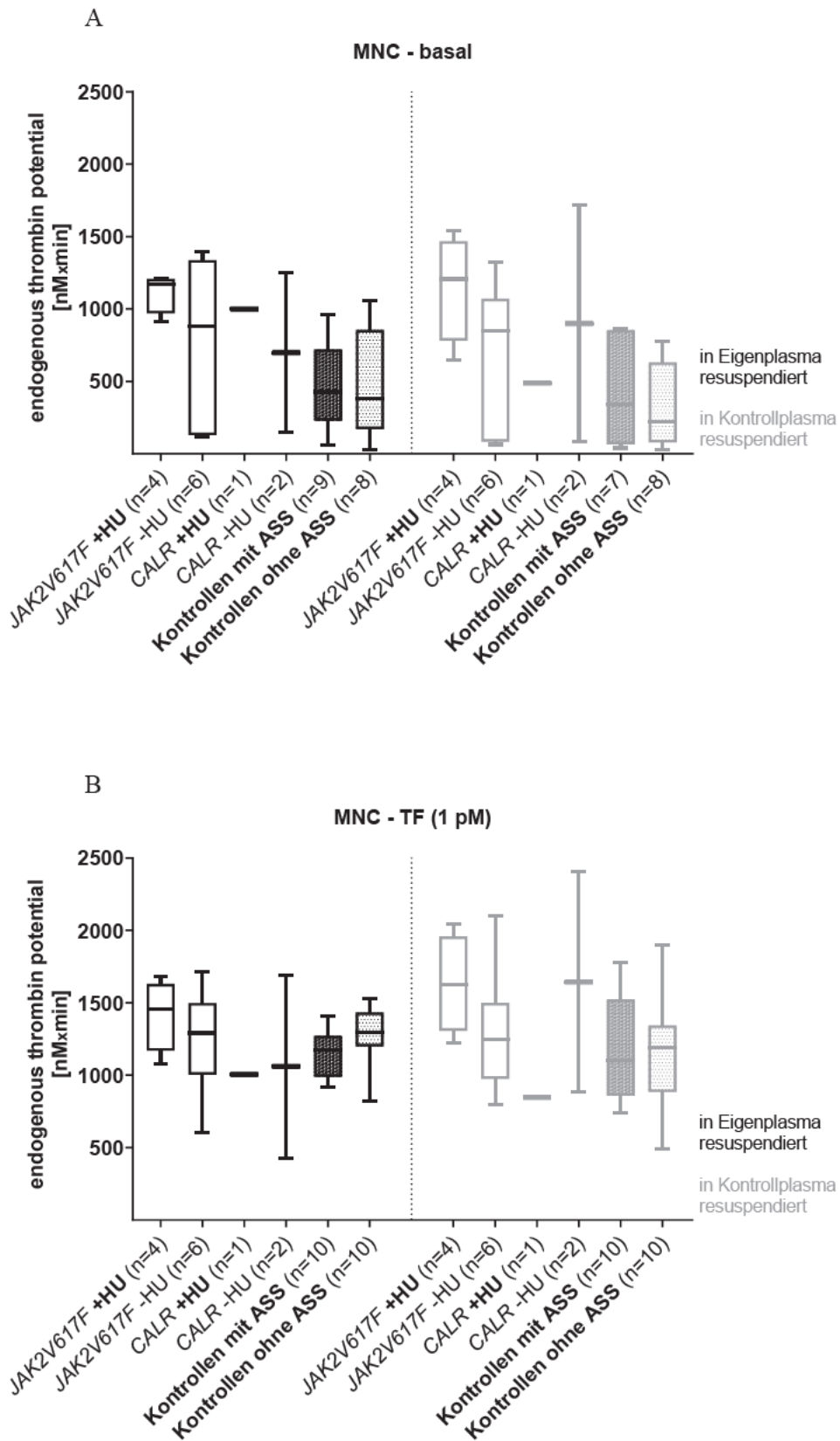
Außerdem generierte die „JAK2V617F –HU“ Gruppe im KP einen höheren Wert im Median von 34,2 nM als im EP (Median: 32,43 nM). Statistisch gab es einen auffälligen Unterschied zwischen diesem erhöhten „Thrombin peak“ der „JAK2V617F –HU“ Gruppe im KP ( $p = 0,0443$ , Unpaired t-test) als auch im EP ( $p = 0,0293$ , Unpaired t-test) im Vergleich zu dem kleineren „Thrombin peak“ der „Kontrollen ohne ASS“ im KP.

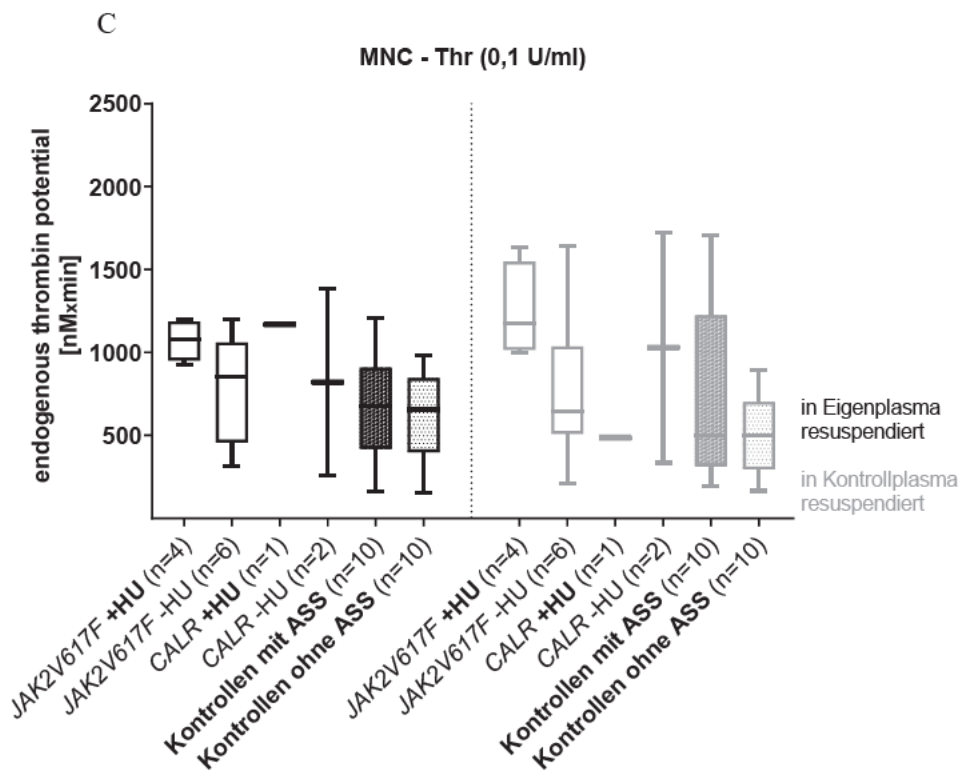
Insgesamt fällt auf, dass bei der basalen Thrombingenerierung (Grafik A) wie auch nach Zugabe von TF (Grafik B) oder Thrombin (Grafik C) durchweg alle Patientengruppen im EP wie auch im KP, im Vergleich jeweils zu den „Kontrollen mit und ohne ASS“ tendenziell höhere Thrombin-Höchstwerte erreichen konnten.

In der Analyse fielen jedoch weder unter basalen Messbedingungen, noch nach Zugabe von TF oder Thrombin statistisch relevante Unterschiede zwischen den jeweiligen „Thrombin peak“ Werten im EP und KP der „JAK2V617F –HU“ sowie der „JAK2V617F +HU“ Gruppe auf.

ERGEBNISSE

4.2.1.5.4 „ETP“ DER MNC IN EIGEN- UND KONTROLLPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN





**Abbildung 24: ETP mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigen- und Kontrollplasma; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

(ETP = „Endogeneous thrombin potential“, MNC = „mononukleäre Zellen“, TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, min = Minuten, nM = Nanomolar)

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der „endogenen Thrombinpotentiale“ (ETP) der MNC von allen Patienten- und Kontrollprobandengruppen dargestellt, jeweils in EP und KP gemessen.

Grafik A zeigt die erreichten ETP während der basalen Thrombingenerierung der MNC ohne Zusatz von Triggersubstanzen. Die MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im KP erreichten das höchste ETP von allen Gruppen, im KP wie auch im EP. Mit einem Median von 1207 nM zeigte sich ein statistisch auffällig höheres ETP verglichen mit den „Kontrollen mit ASS“ im EP (Median: 426,8 nMxmin;  $p = 0,0054$ , Unpaired t-test) sowie im KP (Median: 340,7 nMxmin;  $p = 0,0128$ , Unpaired t-test) als auch verglichen mit den „Kontrollen ohne ASS“ im EP (Median: 381,3 nMxmin;  $p = 0,0134$ , Unpaired t-test) sowie im KP (Median: 220,7 nMxmin;  $p = 0,0019$ , Unpaired t-test).

Die „JAK2V617F +HU“ Gruppe generierte jedoch im EP ein geringfügig geringeres ETP im Vergleich zu den Messungen im KP, und trotzdem erreichten sie im EP noch den höchsten Medianwert von 1172 nMxmin im Vergleich zu allen anderen Gruppen im EP. Hierzu ergaben sich wieder statistisch auffällige Unterschiede zu den „Kontrollen mit ASS“ im EP ( $p = 0,0025$ , Unpaired t-test) sowie im KP ( $p = 0,007$ , Unpaired t-test), wie auch zu den „Kontrollen ohne ASS“ im EP ( $p = 0,0081$ , Unpaired t-test) sowie im KP ( $p = 0,0006$ , Unpaired t-test). Es fällt abermals auf, dass die Patientengruppen bei allen Messungen tendenziell höhere ETPs

## ERGEBNISSE

reproduzierten als die Kontrollprobandengruppen. Wohingegen beide Kontrollprobandengruppen jeweils im EP höhere Werte erreichen konnten als im KP. Außerdem haben im EP wie auch im KP immer die „Kontrollen mit ASS“ ein höheres ETP erreicht als die „Kontrollen ohne ASS“ im jeweiligen Plasma. Diese Unterschiede zeigten sich aber nicht auf einem statistisch relevanten Niveau.

Grafik B zeigt das erreichte ETP aller dargestellten Gruppen nach Zugabe von 1 pM TF. Das höchste ETP erreichten die MNC der „*CALR*-positiven Patienten –HU“ im KP mit einem Medianwert von 1643 nMxmin, dicht gefolgt von den Medianwerten der MNC der „*JAK2V617F*-positiven Patienten +HU“ im KP (Median: 1623 nMxmin). Der direkte Vergleich letztgenannter Gruppe mit den kleineren ETP-Werten der MNC der „Kontrollen mit ASS“ (Median: 1174 nMxmin;  $p = 0,0036$ , Unpaired t-test) sowie den „Kontrollen ohne ASS“ (Median: 1297 nMxmin;  $p = 0,0331$ , Unpaired t-test) jeweils im EP wies statistisch relevante Unterschiede auf. Bei der „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe wurde im EP ein tendenziell kleineres ETP gemessen als im KP. Trotzdem ergab sich hier noch ein statistisch auffällig höheres ETP verglichen mit den Ergebnissen der MNC der „Kontrollen mit ASS“ im EP ( $p = 0,0373$ , Unpaired t-test).

Grafik C veranschaulicht das ETP nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin. Nach Zugabe dieses Gerinnungstriggers generierte, im Vergleich zu allen anderen Gruppen, die „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe im KP das höchste ETP mit einem Medianwert von 1175 nMxmin. Die statistische Analyse zeigte ein auffällig erhöhtes ETP dieser Gruppe im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“ im KP (Median: 498,7 nMxmin;  $p = 0,0003$ , Unpaired t-test) sowie im EP (Median: 657 nMxmin;  $p = 0,0026$ , Unpaired t-test) und im Vergleich zu den „Kontrollen mit ASS“ im EP (Median: 677,8 nMxmin;  $p = 0,0073$ , Unpaired t-test).

Im EP zeigte die „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe (Median: 1079 nMxmin) ein tendenziell geringeres ETP im Vergleich zu ihren Ergebnissen im KP. Die MNC des „*CALR*-positiven Patienten +HU“ überholten im EP auch die „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe mit seinem ETP-Medianwert von 1169 nMxmin. In der statistischen Auswertung erreichte die „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe im EP aber immer noch ein statistisch auffällig erhöhtes ETP verglichen mit den „Kontrollen mit ASS“ ( $p = 0,0251$ , Unpaired t-test) sowie den „Kontrollen ohne ASS“ ( $p = 0,0095$ , Unpaired t-test) jeweils im EP und verglichen mit den „Kontrollen ohne ASS“ im KP ( $p = 0,0008$ , Unpaired t-test).

Auch nach Zugabe von Thrombin (Abbildung 24, Grafik C) erreichten die Patientengruppen höhere ETP-Medianwerte als die Kontrollprobandengruppen. Eine Ausnahme stellten die MNC des „*CALR* +HU“ Patienten dar, welche im KP ein nur geringfügig kleineres ETP (486,5 nMxmin) generierten als die MNC der „Kontrollen mit/ohne ASS“ im EP wie KP. Die Kontrollen untereinander wiesen unabhängig von der ASS-Einnahme jeweils im EP und auch im KP ein tendenziell vergleichbares ETP auf.

## ERGEBNISSE

Außerdem erreichten fast alle dargestellten Gruppen nach Zugabe von TF (Grafik B) teils deutlich höhere ETP-Medianwerte als nach Zugabe von Thrombin (Grafik C) (Ausnahme bildeten die MNC des „CALR-positiven Patienten +HU“ im EP).

In der Analyse fielen weder unter basalen Messbedingungen, noch nach Zugabe von TF oder Thrombin statistisch relevante Unterschiede zwischen den jeweiligen ETP-Werten im EP und KP der „JAK2V617F –HU“ sowie der „JAK2V617F +HU“ Gruppe auf.

## **4.2.2 Intraindividuelle Vergleiche der Thrombozytenfunktion im 1. Follow-up zum Ersteinschluss**

In diesem zweiten Teil der Ergebnisauswertung wurden die Ergebnisse der ET-Patienten zum Zeitpunkt des 1. Follow-ups (1. FU) und des Ersteinschlusses (EE) miteinander verglichen. Die Untersuchungen und Ergebnisse des EE wurden in einer gesonderten Dissertationsarbeit von Frau Dr. med. Alexandra Berkes (geb. Walter) (ehemalige Doktorandin der AG von Frau Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Jurk, CTH, Universitätsmedizin Mainz) behandelt und die Rohdaten für den intraindividuellen Vergleich der Patienten in dieser Dissertation wurden freundlicherweise von ihr zur Verfügung gestellt. Aus den Rohdaten wurden mithilfe der Software Graphpad Prism vergleichende Verlaufs-Punktdiagramme erstellt, in denen jeweils pro Patient die Werte vom EE mit denen vom 1. FU als Punkt (EE) bzw. Quadrat (1. FU) angegeben und mit einer Linie verbunden wurden. Jedem Patienten wurde eine bestimmte Farbe zugeordnet; die Farblegende befindet sich jeweils in der Grafikkbeschreibung. Sie orientiert sich an der Farblegende der Dissertation von Frau Dr. med. [REDACTED] (ehemalige Doktorandin der AG von Frau Dr. Kerstin Jurk, CTH, Universitätsmedizin Mainz). Dadurch wird eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Patienten und den unterschiedlichen Experimenten für etwaige folgende Auswertungsarbeiten erzielt. Um eine Referenz für die Werte zu erhalten, wurden jeweils die Mittelwerte der Ergebnisse der „Kontrollen mit ASS“ und der „Kontrollen ohne ASS“ in die Grafiken als gestrichelte Linie mit aufgenommen.

In dieser intraindividuellen Vergleichsauswertung werden zuerst die neun Patienten (P1–P8, P11) behandelt, die weder eine therapeutische noch eine krankheitsprozessartige Veränderung zwischen dem EE und dem 1. FU hatten. Danach wird sich auf die restlichen vier (P9, P10, P12, P13) der 13 ET-Patienten konzentriert, die einen Wechsel der zytoreduktiven Therapie bzw. zwei davon sogar einen Krankheitsprozess zur Post-ET-Myelofibrose (P9, P13) hatten. Dabei wechselten P9 und P10 ihre Therapie von Hydroxyurea auf Anagrelid, P12 wechselte auf pegyliertes Interferon- $\alpha$  und bei P13 wurde hingegen die zytoreduktive Therapie komplett abgesetzt.

Für die intraindividuellen Vergleiche wurden keine statistischen Tests durchgeführt.

### **4.2.2.1 Intraindividueller Vergleich der Thrombozytenfunktion von ET-Patienten OHNE klinische und therapeutische Veränderungen vom EE zum 1. FU**

In diesem Kapitel wird sich auf die jeweiligen Ergebnisse von den neun (P1–P8, P11) der insgesamt 13 ET-Patienten konzentriert, die keinen therapeutischen Wechsel oder klinische Veränderung zwischen der Untersuchung im EE und dem 1. FU hatten. Für diese

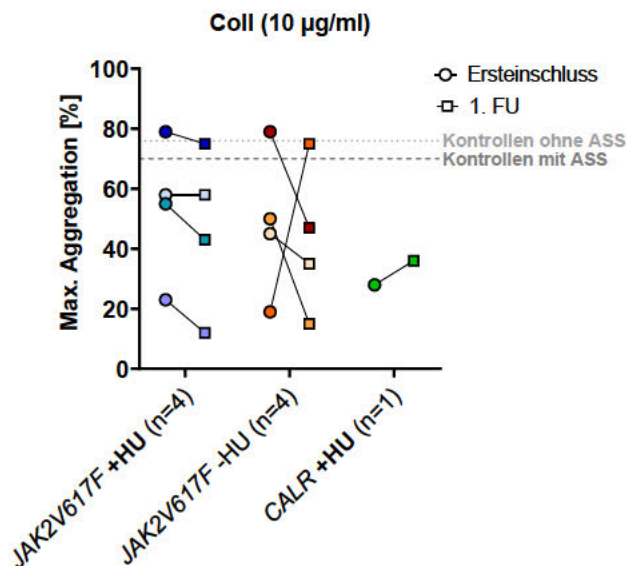
## ERGEBNISSE

Auswertungen wurden die Patienten ebenfalls in Gruppen eingeteilt, die sich nach der jeweiligen Mutation sowie Therapie orientierten.

Vermerk: Aus strukturellen Gründen wurde der Patient P8 der „JAK2V617F –HU“ Gruppe zugeordnet, obwohl er im 1. FU kurzzeitig einen Therapiewechsel auf Hydroxyurea hatte, denn diese Umstellung auf HU ereignete sich ausschließlich zum Zeitpunkt eines Wiederholungsversuches zur Messung der MNC.

### 4.2.2.1.1 INTRAINDIVIDUELLE VERGLEICHE DER AGONISTEN-INDUZIERTEN THROMBOZYTÄREN AGGREGATION

#### 4.2.2.1.1.1 INTRAINDIVIDUELLER VERGLEICH DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN THROMBOZYTÄREN AGGREGATION



**Abbildung 25: Vergleich der Kollagen-induzierten thrombozytären Aggregation im EE und 1. FU**

Vergleichende Darstellung der thrombozytären Aggregation, nach Zugabe von 10 µg/ml Kollagen, der ET-Patienten ohne klinische und therapeutische Veränderungen mit JAK2V617F +HU, JAK2V617F -HU und CALR +HU, jeweils zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses und des 1. Follow-ups. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, Coll = Kollagen, JAK2V617F = eine Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = mit Hydroxyurea, -HU = ohne Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure). Farblegende:

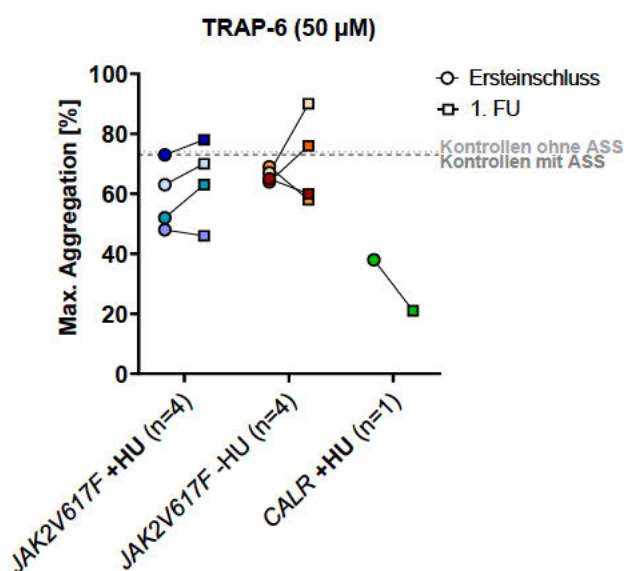
ET-Patienten im EE:  
P1: ●, P2: ●, P3: ●, P4: ●, P5: ●, P6: ●, P7: ●, P8: ●, P11: ●  
ET-Patienten im 1.FU:  
P1: ■, P2: ■, P3: ■, P4: ■, P5: ■, P6: ■, P7: ■, P8: ■, P11: ■

In Abbildung 25 werden die Aggregationsantworten der ET-Patienten auf die Stimulation ihrer Thrombozyten mit 10 µg/ml Kollagen zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses und des 1. Follow-ups gegenübergestellt. Im direkten Vergleich fällt bei den Patienten eine mehrheitliche Senkung der prozentualen Aggregation im 1. FU auf. Während im EE nur die

## ERGEBNISSE

Patienten P4 und P8 mit ihrer Aggregationsleistung noch leicht oberhalb der beiden Referenzkontrollen lagen, zeigte sich im 1. FU bei P4 eine Normalisierung in den Referenzbereich zwischen den Kontrollen mit und ohne ASS. P8 hingegen wies eine nahezu halbierte Aggregationsleistung auf und unterschritt damit beide Kontrollwerte deutlich. P2 zeigte tendenziell ähnliche Ergebnisse im 1. FU im Vergleich zum EE. Ausnahmen waren die Patienten P7 und P11, die mit einer Steigerung der maximalen Aggregation reagierten, wobei P7 (*JAK2V617F* –HU) fast eine Vervielfachung der Aggregation im 1. FU zeigte, sogar bis in den Referenzbereich, und damit eine Aggregation zeigte, wie man sie nur von gesunden Probanden erwartet hätte.

### 4.2.2.1.1.2 INTRAINDIVIDUELLER VERGLEICH DER TRAP-6-INDUZIERTEN THROMBOZYTÄREN AGGREGATION



#### Abbildung 26: Vergleich der TRAP-6-induzierten thrombozytären Aggregation im EE und 1. FU

Vergleichende Darstellung der thrombozytären Aggregation, nach Zugabe von 50 µM TRAP-6, der ET-Patienten ohne klinische und therapeutische Veränderungen mit *JAK2V617F* +HU, *JAK2V617F* -HU und *CALR* +HU, jeweils zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses und des 1. Follow-ups. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, TRAP-6 = Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid-6, *JAK2V617F* = eine Januskinase-2-Mutation, *CALR* = Calreticulin-Mutation, +HU = mit Hydroxyurea, -HU = ohne Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure). Farblegende:

ET-Patienten im EE:

P1: ●, P2: ●, P3: ●, P4: ●, P5: ●, P6: ●, P7: ●, P8: ●, P11: ●

ET-Patienten im 1.FU:

P1: ■, P2: ■, P3: ■, P4: ■, P5: ■, P6: ■, P7: ■, P8: ■, P11: ■

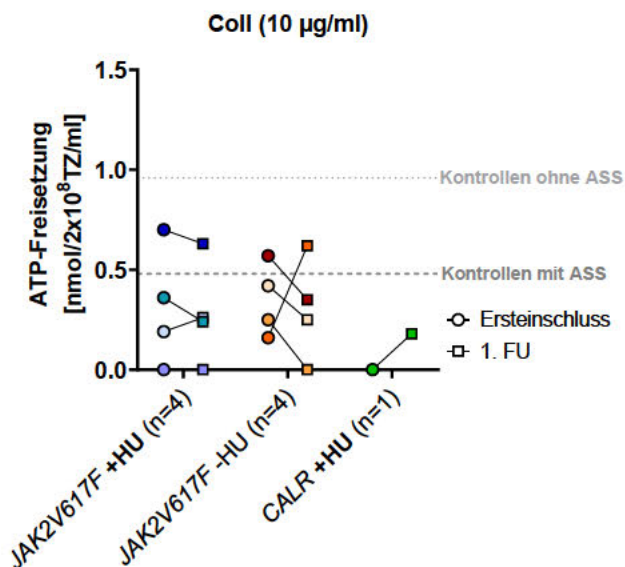
Erfolgte eine Aktivierung der Thrombozyten mit einer hohen TRAP-6 Konzentration von 50 µM, resultierten die Aggregationsantworten im 1. FU eher in einem heterogeneren Bild. Vier Patienten (P1, P5, P8, P11) fielen mit der Aggregation im 1. FU, wohingegen fünf Patienten

## ERGEBNISSE

(P4, P2, P3, P6, P7) ihre Aggregationsleistung steigern konnten und dabei P4, P6 und P7 sogar die Kontrollreferenzen überstiegen.

### 4.2.2.1.2 INTRAINDIVIDUELLE VERGLEICHE DER AGONISTEN-INDUZIERTEN THROMBOZYTÄREN ATP-FREISETZUNG

#### 4.2.2.1.2.1 INTRAINDIVIDUELLER VERGLEICH DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ATP-FREISETZUNG



#### Abbildung 27: Vergleich der Kollagen-induzierten ATP-Freisetzung im EE und 1. FU

Vergleichende Darstellung der thrombozytären ATP-Freisetzung, nach Zugabe von 10 µg/ml Kollagen, der ET-Patienten ohne klinische und therapeutische Veränderungen mit JAK2V617F +HU, JAK2V617F -HU und CALR +HU, jeweils zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses und des 1. Follow-ups. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, ATP = Adenosintriphosphat, Coll = Kollagen, JAK2V617F = eine Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = mit Hydroxyurea, -HU = ohne Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, TZ = Thrombozyten). Farblegende:

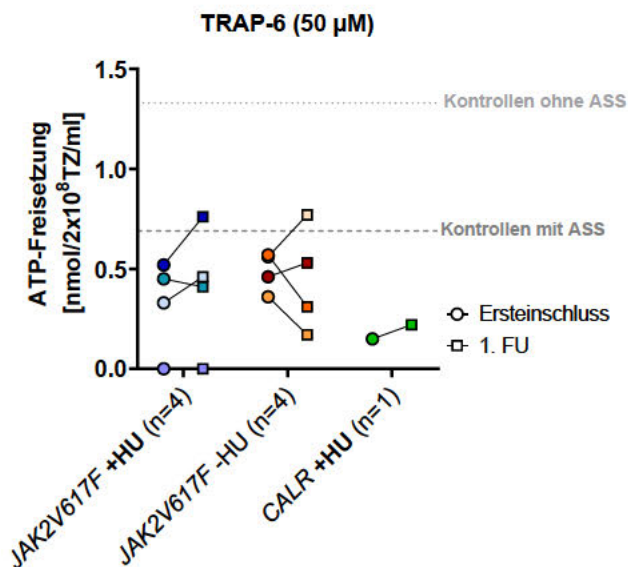
ET-Patienten im EE:  
P1: ●, P2: ●, P3: ●, P4: ●, P5: ●, P6: ●, P7: ●, P8: ●, P11: ●  
ET-Patienten im 1. FU:  
P1: ■, P2: ■, P3: ■, P4: ■, P5: ■, P6: ■, P7: ■, P8: ■, P11: ■

Die ATP-Freisetzung nach *in vitro* Gabe von 10 µg/ml Kollagen zeigte erneut ein uneinheitliches Bild unter den Patienten. Insgesamt setzten die Thrombozyten der Patienten unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt mehrheitlich geringere ATP-Mengen frei als die Kontrollreferenzen. Nur P4 blieb mit seinen Ergebnissen im EE und 1. FU innerhalb des Kontrollbereichs, genau zwischen dem Mittelwert der „Kontrollen mit ASS“ und der „Kontrollen ohne ASS“. Zeigten die Thrombozyten des Patienten P8 im EE noch eine Kontrollprobanden-ähnliche ATP-Freisetzung, so fiel sie im 1. FU unterhalb des Referenzbereichs. Ein Sonderfall bildeten die Thrombozyten des P1, die weder im EE noch im 1. FU messbare ATP-Mengen ausschütteten. Auch P11 generierte im EE kein ATP, jedoch

## ERGEBNISSE

gelang es diesem „*CALR*-positiven Patienten mit HU-Therapie“ im 1. FU durchaus, eine gewisse Menge an ATP freizusetzen. Konträr dazu reagierte P5 im 1. FU mit einer genau entgegengesetzten Tendenz, sodass dieser im 1. FU überhaupt kein ATP mehr freisetzte. Indessen erreichten die Thrombozyten des Patienten P7 im 1. FU die größte Steigung der ATP-Freisetzung im Vergleich zu allen anderen Patienten und positionierten sich mit seinen Ergebnissen genau zwischen die der Kontrollprobandengruppen.

### 4.2.2.1.2.2 INTRAINDIVIDUELLER VERGLEICH DER TRAP-6-INDUZIERTEN ATP-FREISETZUNG



#### Abbildung 28: Vergleich der TRAP-6-induzierten ATP-Freisetzung im EE und 1. FU

Vergleichende Darstellung der thrombozytären ATP-Freisetzung, nach Zugabe von 50 µM TRAP-6, der ET-Patienten ohne klinische und therapeutische Veränderungen mit *JAK2V617F* +HU, *JAK2V617F* -HU und *CALR* +HU, jeweils zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses und des 1. Follow-ups. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, ATP = Adenosin triphosphat, TRAP-6 = Thrombin-Rezeptor-Aktivatort-Peptid-6, *JAK2V617F* = eine Januskinase-2-Mutation, *CALR* = Calreticulin-Mutation, +HU = mit Hydroxyurea, -HU = ohne Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, TZ = Thrombozyten).

Farblegende:

ET-Patienten im EE:

P1: ●, P2: ●, P3: ●, P4: ●, P5: ●, P6: ●, P7: ●, P8: ●, P11: ●

ET-Patienten im 1.FU:

P1: □, P2: □, P3: □, P4: □, P5: □, P6: □, P7: □, P8: □, P11: □

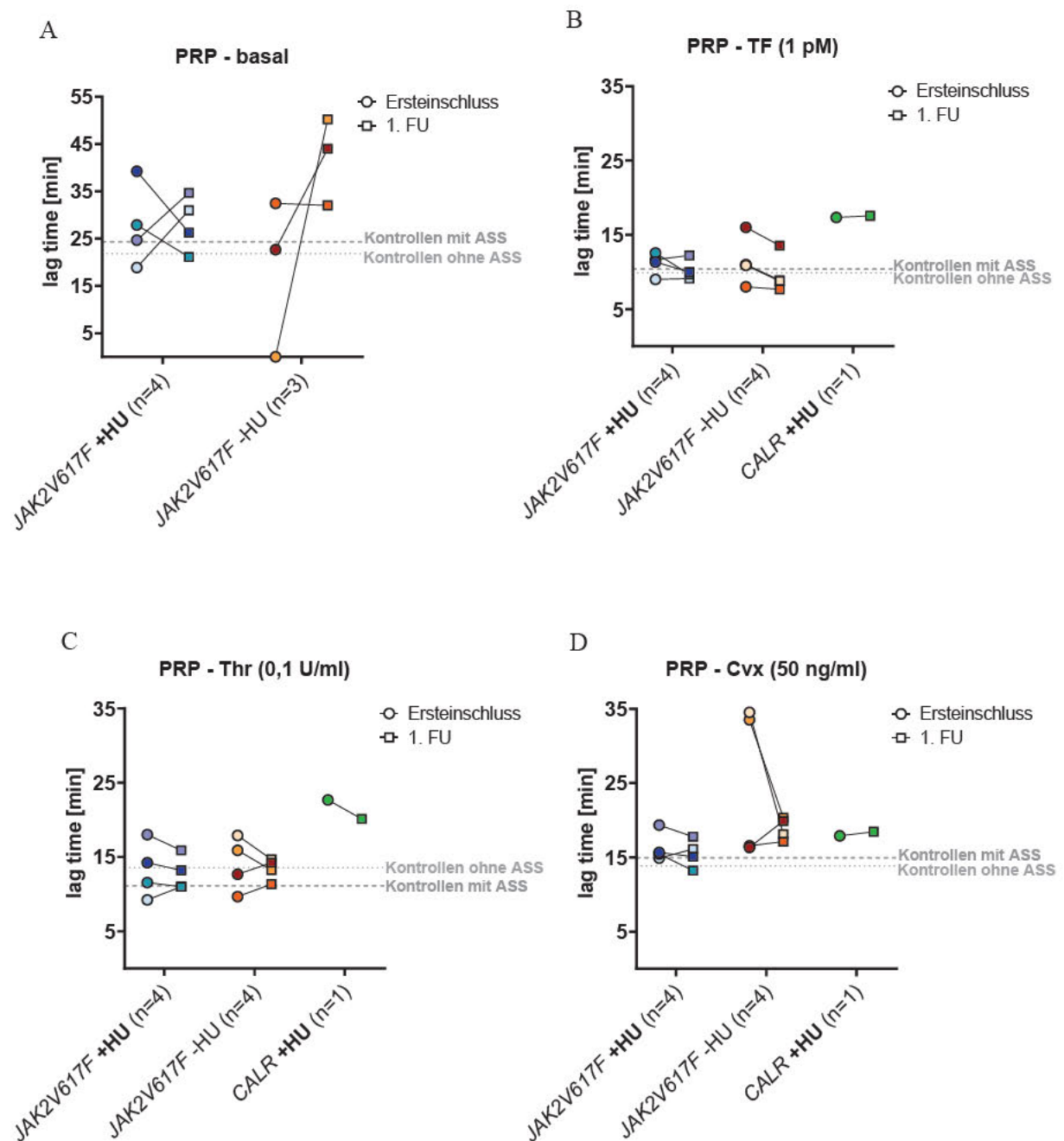
Auch nach TRAP-6 Gabe blieb die ATP-Freisetzung der Patienten im EE sowie im 1. FU mehrheitlich unterhalb der Kontrollen. Ausnahmen bildeten P4 und P6, die beide im 1. FU die „Kontrollen mit ASS“ überschritten und im Kontrollbereich landeten. Trotz abermaligem Unterschreiten der Kontrollreferenzen fand bei P2, P8 und P11 eine dezente Steigerung der ATP-Freisetzung im 1. FU statt. In der Minderheit befanden sich die Patienten P3, P5 und P7, die alle mit einer dezenten Senkung der ATP-Freisetzung im 1. FU reagierten. Ein Einzelfall bildete P1, bei dem sich nach Aktivierung mit TRAP-6 wie auch nach Zugabe von Kollagen

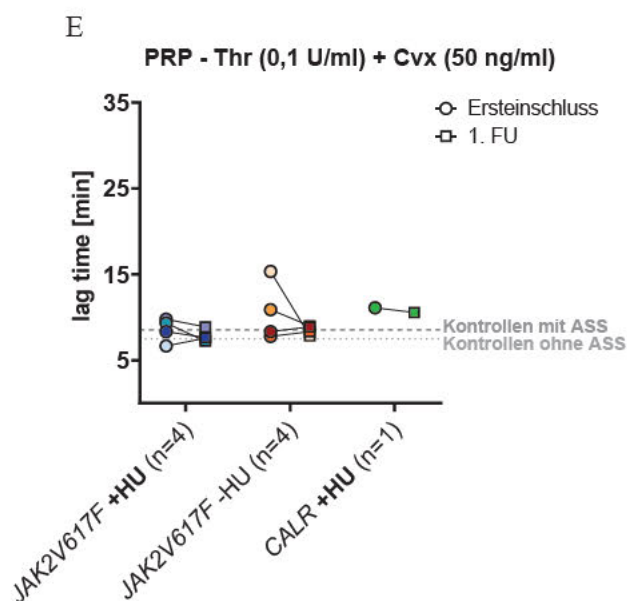
## ERGEBNISSE

(siehe Abbildung 27) erneut überhaupt keine Veränderung auftrat, denn auch im 1. FU setzte er keine messbaren ATP-Mengen frei.

### 4.2.2.1.3 INTRAINDIVIDUELLE VERGLEICHE DER THROMBOZYTÄREN THROMBINGENERIERUNG IN PRP

#### 4.2.2.1.3.1 „LAG TIME“ IN PRP BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF, THROMBIN, CONVULXIN UND THROMBIN + CONVULXIN IM EE UND 1. FU





**Abbildung 29: Vergleich der „Lag time“ vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E)**

Vergleichende Darstellung der „Lag time“ (in Minuten) der thrombozytären Thrombingenerierung in PRP von ET-Patienten OHNE klinische und therapeutische Veränderungen vom Zeitpunkt des EE zum 1. FU. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = tissue factor, Thr = Thrombin, Cvx = Convulxin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar). Farblegend:

ET-Patienten im EE:

P1: ●, P2: ○, P3: ●, P4: ●, P5: ○, P6: ○, P7: ●, P8: ●, P11: ●

ET-Patienten im 1.FU:

P1: ■, P2: ■, P3: ■, P4: ■, P5: ■, P6: ■, P7: ■, P8: ■, P11: ■

Bei Betrachtung der basalen Thrombingenerierung (Abbildung 29, Grafik A) erreichten die Thrombozyten der Patientengruppen im 1. FU eine „Lag time“, die größtenteils tendenziell verlängert gegenüber denen beider Kontrollprobandengruppen war. Die größte Differenz zeigte sich bei P5, dessen Thrombozyten im EE überhaupt nicht reagierten („Lag time“: 0 min, „Thrombin peak“: 0 nM, ETP: 0 nMxmin) und im 1. FU zumindest geringe Reaktionen zeigten anhand einer sehr verlängerten „Lag time“ von 50,22 Minuten („Thrombin peak“: 15,82 nM, ETP: 182,15 nMxmin).

Bei Zugabe des physiologischen Gerinnungsfaktors TF (Abbildung 29, Grafik B) waren die Ergebnisse vom EE zum 1. FU recht identisch, wobei das PRP der Patienten P5 und P6 fast identische Werte im EE wie auch im 1. FU zeigte (daher liegen sie in der Grafik genau übereinander).

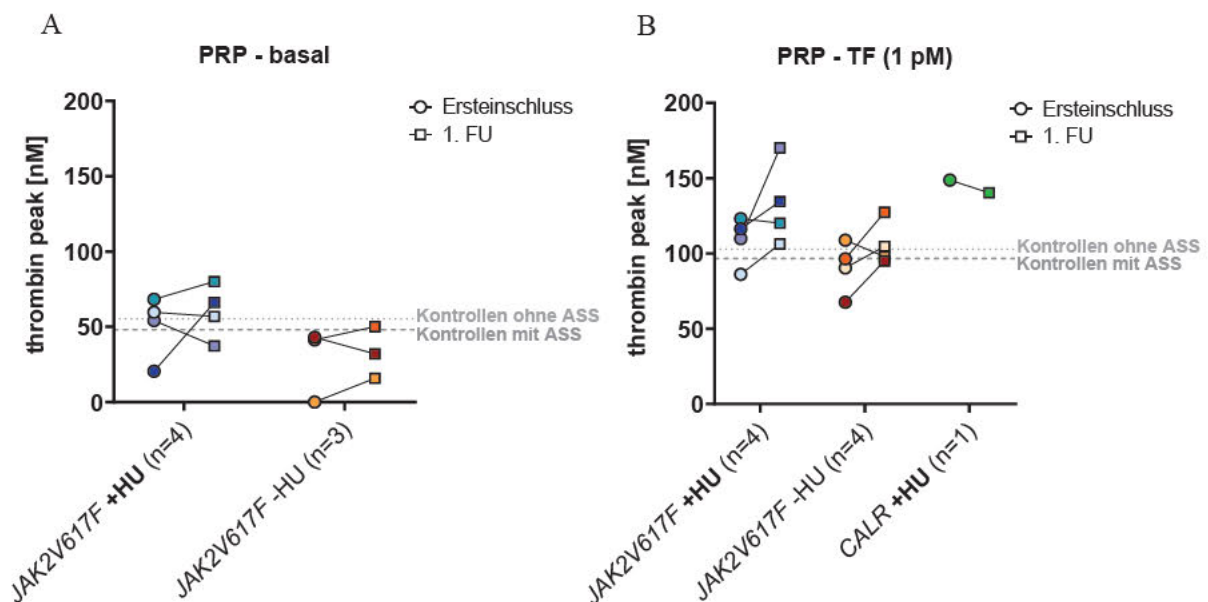
In ähnlicher Weise reagierten die Patienten nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin (Abbildung 29, Grafik C), denn auch hier taten sich nur geringfügige Veränderungen vom EE zum 1. FU auf. Sechs (P1, P3–P6, P11) von neun Patienten zeigten eine dezent sinkende Tendenz der „Lag time“ zum 1. FU, die restlichen drei Patienten (P2, P7, P8) zeigten eine im gleichen Maße

## ERGEBNISSE

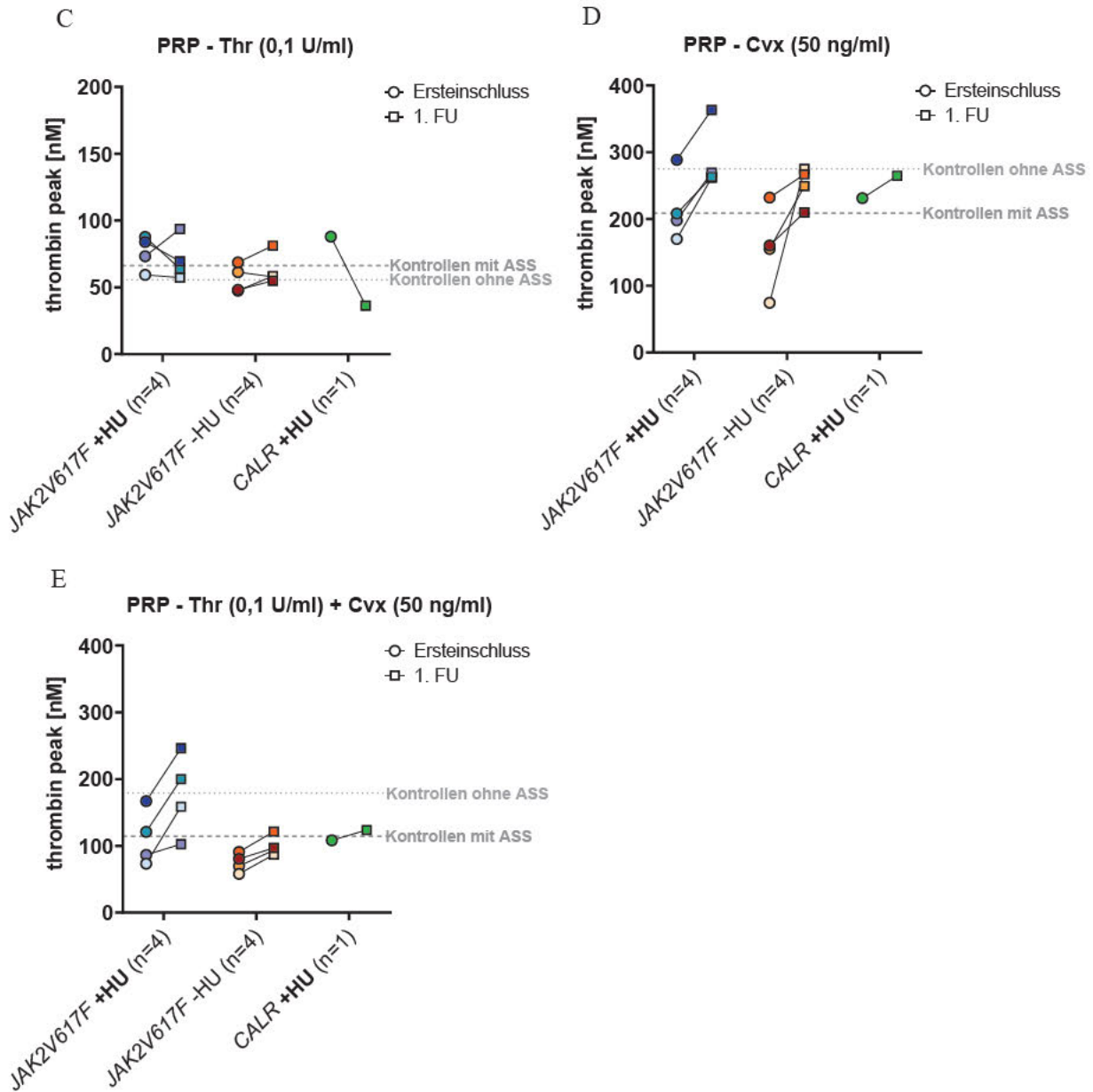
dezent steigende „Lag time“ im 1. FU. Hierbei konnten die Plasmen der *JAK2V617F*-mutierten Patientengruppen therapieunabhängig im EE und 1. FU größtenteils kontrollähnliche Ergebnisse erzielen, teilweise zeigten sie aber auch dezent verlängerte Zeiten. Das PRP des *CALR*-mutierten Patienten mit HU- und ASS-Therapie (P11) zeigte jedoch im EE deutlich die längste „Lag time“, was sich auch im 1. FU kaum veränderte.

Vergleichbares konnte nach Zugabe von Convulxin (Abbildung 29, Grafik D) und der Kombination aus Thrombin + Convulxin (Abbildung 29, Grafik E) beobachtet werden. Ausnahmen zeigten die Plasmen von P5 und P6, die beide im 1. FU nach Zugabe von Convulxin eine auffällig kürzere „Lag time“ reproduzierten als im EE. Das PRP des Patienten P6 zeigte auch nach simultaner Zugabe von Convulxin + Thrombin im 1. FU eine sehr viel kürzere „Lag time“ verglichen mit dem EE.

### 4.2.2.1.3.2 „THROMBIN PEAK“ IN PRP BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF, THROMBIN, CONVULXIN UND THROMBIN + CONVULXIN IM EE UND 1. FU



ERGEBNISSE



**Abbildung 30: Vergleich des „Thrombin peak“ vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).**

Vergleichende Darstellung des „Thrombin peak“ (in nM) der thrombozytären Thrombingenerierung in PRP von ET-Patienten OHNE klinische und therapeutische Veränderungen vom Zeitpunkt des EE zum 1. FU. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = tissue factor, Thr = Thrombin, Cvx = Convulxin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, nM = Nanomolar). Farblegende:

ET-Patienten im EE:  
 P1: ●, P2: ●, P3: ●, P4: ●, P5: ●, P6: ●, P7: ●, P8: ●, P11: ●

ET-Patienten im 1.FU:  
 P1: ■, P2: ■, P3: ■, P4: ■, P5: ■, P6: ■, P7: ■, P8: ■, P11: ■

Der Vergleich der basalen Thrombingenerierung (Abbildung 30, Grafik A) gibt ein heterogenes Bild an relativ geringen Steigungen (P3, P4, P5, P7) und Senkungen (P1, P2, P8) des „Thrombin peaks“ zum Zeitpunkt des 1. FU gegenüber dem EE ab. Wobei das PRP des Patienten P4 im EE noch einen der niedrigsten „Thrombin peaks“ generierte und im 1. FU

## ERGEBNISSE

dann sogar dezent oberhalb der Kontrollreferenzwerte lag. Insgesamt liegt die „JAK2V617F +HU“ Gruppe mit ihren Werten mehrheitlich auf Höhe bzw. tendenziell höher als die der „Kontrollen mit“ und „ohne ASS“ und die „JAK2V617F –HU“ Gruppe eher auf Höhe bzw. deutlich unterhalb der Werte der beiden Kontrollen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse nach Zugabe von TF in Abbildung 30, Grafik B, kristallisiert sich bei den Thrombozyten der *JAK2V617F*-mutierten Gruppen therapieunabhängig eine Erhöhung des „Thrombin peaks“ im 1. FU heraus, der entweder dann den Kontrollbereich erreichte oder weit höher als der Mittelwert der Kontroll-Thrombozyten lag. Das PRP des *CALR*-Patienten (P11) zeigte recht vergleichbare „Thrombin peaks“ im EE und 1. FU. Es fällt auf, dass im Vergleich zur basalen Thrombingenerierung (Abbildung 30, Grafik A) nach Stimulation mit TF (Abbildung 30, Grafik B) ausnahmslos alle Patientengruppen sowie Kontrollprobandengruppen einen höheren „Thrombin peak“ zeigten, im EE genauso wie im 1. FU.

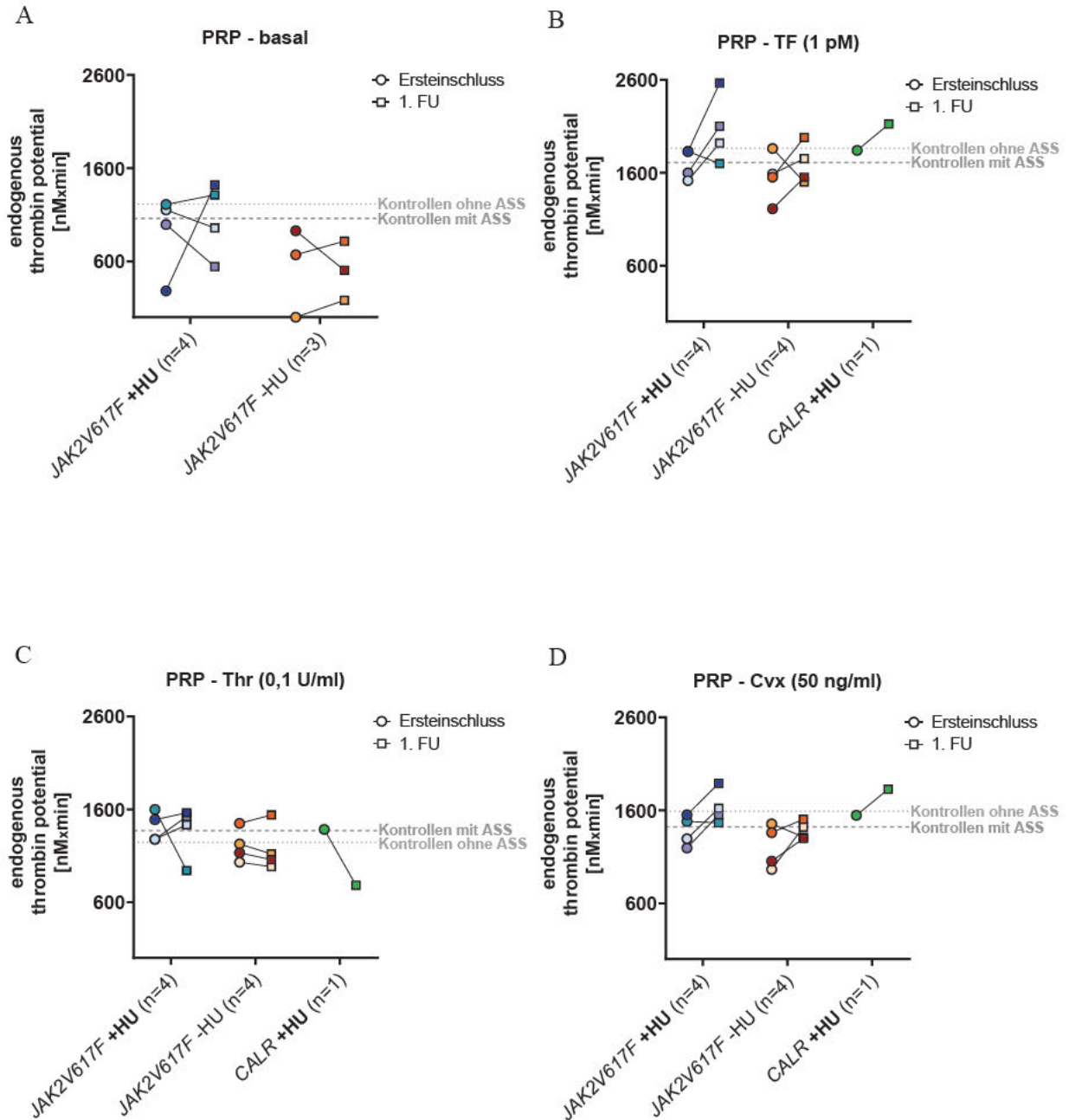
Im Vergleich zur TF-Gabe führte die Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin (Abbildung 30, Grafik C) zu insgesamt niedrigeren „Thrombin peak“-Werten, wobei die Ergebnisse der Patienten hier im EE sowie im 1. FU dabei im oder nahe dem Kontrollbereich lagen. Einen Sonderfall zeigte P11 (*CALR*), dessen „Thrombin peak“ im 1. FU weit unterhalb der Referenz-Kontrollwerte lag und er damit den niedrigsten Wert generierte im Vergleich zu den *JAK2V617F*-positiven Patienten.

Nach Stimulation der Thrombozyten mit Convulxin (Abbildung 30, Grafik D) sowie mit der Kombination aus Convulxin + Thrombin (Abbildung 30, Grafik E) ergab sich ein analoges Bild, in dem im 1. FU alle Patientengruppen einen größeren „Thrombin peak“ im Vergleich zum EE zeigten, dementsprechend eine Zunahme der Thrombozytenreaktivität stattfand. Dabei erreichten im 1. FU die meisten Patientenplasmen nach Zugabe von Convulxin (Abbildung 30, Grafik D) den Kontrollreferenzbereich, wobei als einziges das PRP des Patienten P4 schon im EE Werte oberhalb der Kontrollen zeigte und auch im 1. FU einen noch höheren „Thrombin peak“ generierte. Nach simultaner Stimulation mit Convulxin und Thrombin erreichten nur die Thrombozyten der Patienten P2, P7 und P11 mit ihrem generierten „Thrombin peak“ direkt den Kontrollbereich, wohingegen der „Thrombin peak“ der Patientenplasmen von P3 und P4 im EE schon im Kontrollbereich lag und diesen im 1. FU sogar überstieg.

Außerdem ist zu erkennen, dass in Grafik E (Abbildung 30) trotz Zugabe der Kombination aus Convulxin + Thrombin die „Thrombin peak“-Werte im Schnitt tendenziell niedriger waren als nach alleiniger Gabe von Convulxin (Abbildung 30, Grafik D).

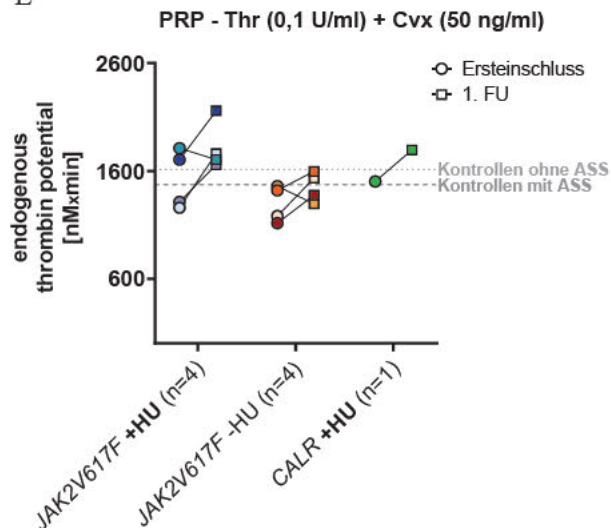
# ERGEBNISSE

## 4.2.2.1.3.3 „ETP“ IN PRP BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF, THROMBIN, CONVULXIN UND THROMBIN + CONVULXIN IM EE UND 1. FU



## ERGEBNISSE

E



**Abbildung 31: Vergleich des ETP vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).**

Vergleichende Darstellung des „endogenen Thrombinpotentials“ (in nM x min) der thrombozytären Thrombingenerierung in PRP von ET-Patienten OHNE klinische und therapeutische Veränderungen vom Zeitpunkt des EE zum 1. FU. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, ETP = endogenes Thrombinpotential, PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = tissue factor, Thr = Thrombin, Cvx = Convulxin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, nM = Nanomolar, pM = Pikomolar). Farblegende:

ET-Patienten im EE:

P1: ●, P2: ○, P3: ●, P4: ●, P5: ●, P6: ○, P7: ●, P8: ●, P11: ●

ET-Patienten im 1.FU:

P1: ■, P2: ■, P3: ■, P4: ■, P5: ■, P6: ■, P7: ■, P8: ■, P11: ■

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Patientengruppen lagen die ETP-Werte der „JAK2V617F -HU“ Thrombozyten sowohl bei der basalen Thrombingenerierung (Abbildung 31, Grafik A) als auch nach Zugabe verschiedener Thrombozyten-Agonisten (Abbildung 31, Grafik B–E) zum Zeitpunkt des EE und des 1. FU insgesamt etwa auf dem Niveau oder tendenziell leicht unterhalb der Werte der „JAK2V617F +HU“ Gruppe.

Beim Vergleich der Ergebnisse während der basalen Thrombingenerierung (Abbildung 31, Grafik A) zwischen EE und 1. FU fallen keine einheitlichen Tendenzen auf. Alle „JAK2V617F -HU“ Patienten haben im 1. FU immer noch ein sehr viel geringeres ETP generiert als die Kontrollprobanden, und von den „JAK2V617F +HU“ Patienten überstiegen die Werte von P3 und P4 im 1. FU als einzige den Kontrollreferenzbereich, wohingegen die P1 und P2 im 1. FU ein niedrigeres ETP generierten und damit wieder unterhalb des Kontrollreferenzbereichs lagen, obwohl sie im EE nahe bzw. im Referenzbereich lagen.

Erfolgte eine Stimulation der Thrombozyten mit TF (Abbildung 31, Grafik B), Convulxin (Abbildung 31, Grafik D) oder der Kombination aus Thrombin + Convulxin (Abbildung 31, Grafik E), zeigten sich die generierten Thrombinmengen über den gesamten Versuchsverlauf ( $\triangleq$  ETP) im 1. FU als mehrheitlich höher im Gegensatz zum EE und das unabhängig vom Agonisten und der Patientengruppe. Dabei bewegten sich die Werte der Patientengruppen in

## ERGEBNISSE

allen Grafiken immer recht nahe um den Bereich der Kontrollen mit und ohne ASS-Therapie. Die Ausnahme bildete die Aktivierung allein mit Thrombin (Abbildung 31, Grafik C), wodurch sich im 1. FU bei den Patienten-ETPs eine eher ähnliche bis sinkende Tendenz im Vergleich zum EE zeigt. Die Thrombozyten des „CALR +HU“ Patienten (P11) haben nur hier, nach Thrombingabe, ein vergleichsweise niedrigeres ETP generiert als nach der Stimulation mit anderen Agonisten.

Allein die Werte der Patienten P3 und P5 zeigten unabhängig vom Agonisten eine durchweg sinkende Tendenz der ETP-Werte im 1. FU; ausschließlich während der basalen Thrombingenerierung konnten ihre Thrombozyten im 1. FU ein höheres ETP generieren als im EE.

Die Thrombozyten des Patienten P4 erreichten wiederum in allen Versuchen im 1. FU eines der höchsten (Abbildung 31, Grafik C) bzw. das höchste ETP (Abbildung 31, Grafik A, B, D, E) im Vergleich zu allen anderen angegebenen Werten.

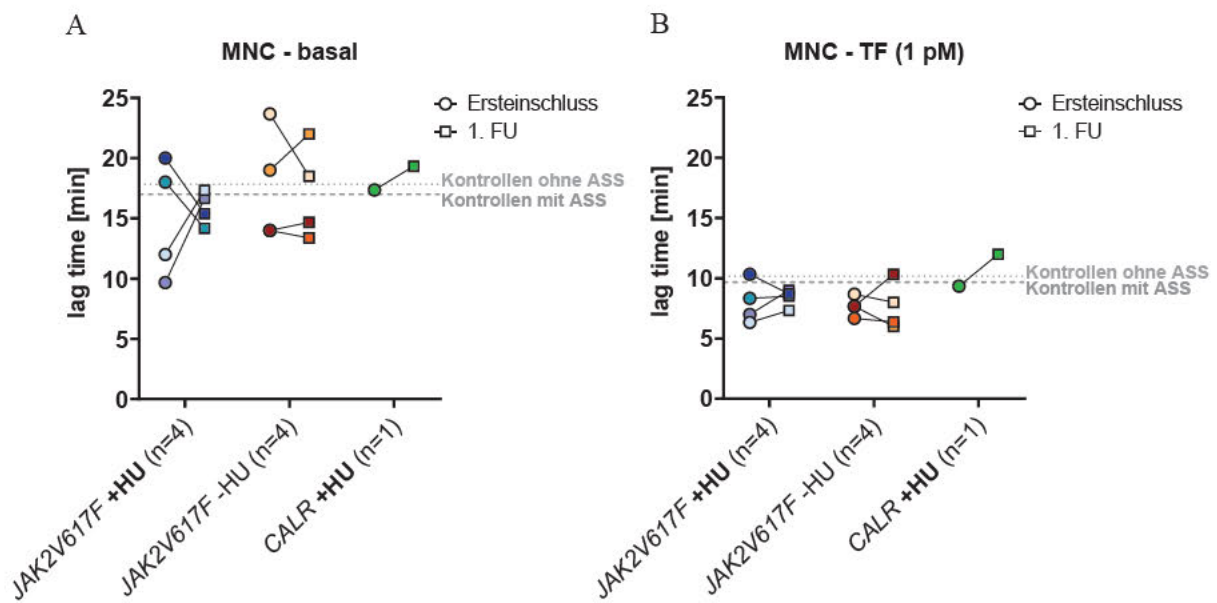
## ERGEBNISSE

### 4.2.2.1.4 INTRAINDIVIDUELLE VERGLEICHE DER THROMBINGENERIERUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN (RESUSPENDIERT IN EIGENPLASMA)

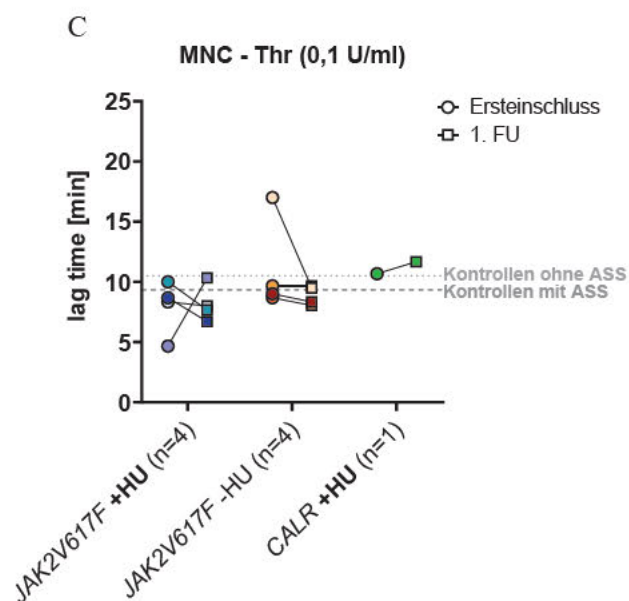
In diesem Kapitel wurden ausschließlich die Messungen der monozytären TG im autologen Plasma von ET-Patienten ohne klinische oder therapeutische Veränderungen vom EE und 1. FU miteinander verglichen. Die Messungen im Kontrollplasma wurden nicht verglichen, da keine Gewährleistung für die Verwendung desselben Kontrollplasmas im EE sowie im 1. FU bestand. Es wurden auch nur die Mittelwerte der Kontrollprobandengruppen aus den Messungen im autologen Plasma verwendet.

Vermerk: Aus strukturellen Gründen wurde P8 auch in diesem Kapitel der „JAK2V617F –HU“ Gruppe zugeordnet, obwohl er im 1. FU kurzzeitig einen Therapiewechsel auf Hydroxyurea hatte. So wurde er ausschließlich zum Zeitpunkt eines Wiederholungsversuches zur Messung der MNC mit Hydroxyurea behandelt.

#### 4.2.2.1.4.1 „LAG TIME“ DER MNC IN EIGENPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN IM EE UND 1. FU



## ERGEBNISSE



**Abbildung 32: Vergleich der „Lag time“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

Vergleich der ET-Patienten OHNE klinische und therapeutische Veränderungen. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS in Eigenplasma als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, MNC = „mononukleäre Zellen“, TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, pM = Pikomolar). Farblegende:

ET-Patienten im EE:

P1: ●, P2: ●, P3: ●, P4: ●, P5: ●, P6: ●, P7: ●, P8: ●, P11: ●

ET-Patienten im 1.FU:

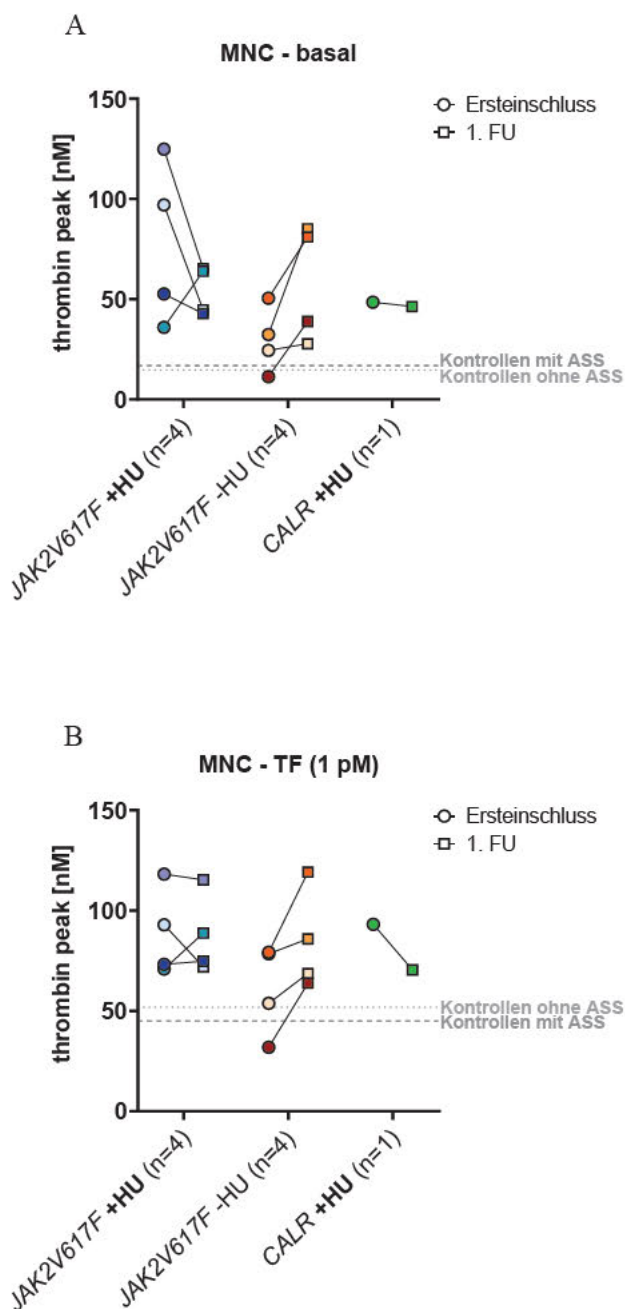
P1: ■, P2: ■, P3: ■, P4: ■, P5: ■, P6: ■, P7: ■, P8: ■, P11: ■

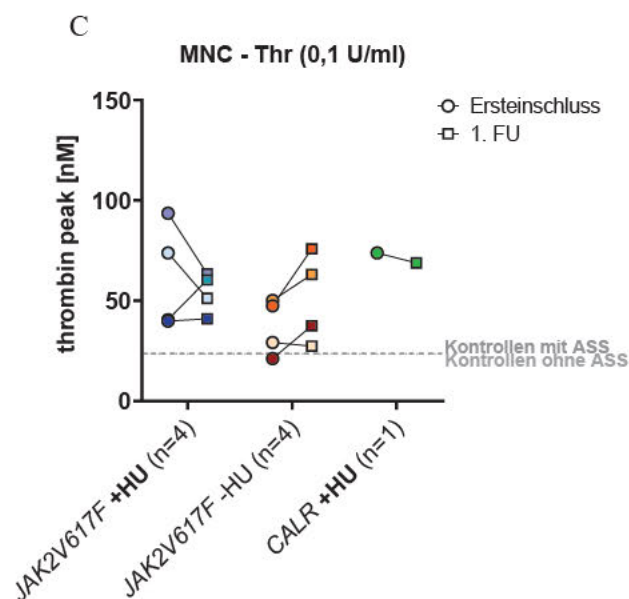
Bei Betrachtung der basalen Thrombingenerierung in Abbildung 32, Grafik A, spiegelte sich die größte Varianz der Ergebnisse innerhalb der Patientengruppen im Vergleich zu den Ergebnissen nach TF- (Abbildung 32, Grafik B) oder Thrombin-Zugabe (Abbildung 32, Grafik C) wider. Streuten die Verzögerungszeiten der MNC der „JAK2V617F +HU“ Gruppe im EE noch recht breit unterhalb und leicht oberhalb der Kontrollen, so liefen sie alle auf kontrollähnliche und sogar kürzere „Lag time“-Werte im 1. FU hinaus. Innerhalb der „JAK2V617F -HU“ Gruppe verhielten sich die MNC von P5 und P6 im 1. FU weiterhin mit einer pathologisch verlängerten „Lag time“ im Vergleich zu beiden „Kontrollen mit/ohne ASS“, wobei sich die Werte von P6 im 1. FU durchaus dem Kontrollreferenzbereich sehr näherten. Im Gegensatz dazu generierten die MNC des P7 und P8 weiterhin verhältnismäßig zu kurze Verzögerungszeiten, sie starteten also im Vergleich zu den Kontrollen zu früh mit der Thrombingenerierung. Der einzige „CALR +HU“ Patient (P11) verhielt sich mit seinen MNC sowohl bei der basalen Thrombinmessung als auch nach Zugabe der Triggersubstanzen TF (Abbildung 32, Grafik B) und Thrombin (Abbildung 32, Grafik C) mit einer dezent langsameren „Lag time“ im 1. FU verglichen zum EE, sodass die Werte den Kontrollbereich im 1. FU in allen Versuchsreihen (Abbildung 32, Grafik A–C) verließen und leicht überschritten.

## ERGEBNISSE

Nach Zugabe von TF (Abbildung 32, Grafik B) sowie Thrombin (Abbildung 32, Grafik C) ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Die MNC der Mehrheit der Patienten zeigten im EE sowie im 1. FU teils ähnliche und meistens sogar kürzere „Lag time“-Werte als beide Kontrollgruppen. Eine Ausnahme bildeten die MNCs der Patienten P11 und P6: P11 zeigte - wie bereits erwähnt - im 1. FU durchgehend verlängerte ‚Lag time‘-Werte, unabhängig von der verwendeten Triggersubstanz. P6 hingegen wies als einziger Patient im EE nach Thrombin-Gabe (Abbildung 32, Grafik C) eine stark verlängerte ‚Lag time‘ auf, lag im 1. FU jedoch wieder im Kontrollbereich.

### 4.2.2.1.4.2 „THROMBIN PEAK“ DER MNC IN EIGENPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN IM EE UND 1. FU





**Abbildung 33: Vergleich des „Thrombin peaks“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

Vergleich der ET-Patienten OHNE klinische und therapeutische Veränderungen. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS in Eigenplasma als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, MNC = „mononukleäre Zellen“, TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, nM = Nanomolar). Farblegende:

ET-Patienten im EE:

P1: ●, P2: ●, P3: ●, P4: ●, P5: ●, P6: ●, P7: ●, P8: ●, P11: ●

ET-Patienten im 1.FU:

P1: □, P2: □, P3: □, P4: □, P5: □, P6: □, P7: □, P8: □, P11: □

Bei intraindividuellem Gegenüberstellen (EE und 1. FU) der Thrombingenerierung von Patienten-MNC – basal gemessen (Abbildung 33, Grafik A) sowie nach Zugabe von TF (Abbildung 33, Grafik B) und Thrombin (Abbildung 33, Grafik C) – stellte sich heraus, dass die generierten Thrombinhöchstwerte aller Patienten im Vergleich zu den „Kontrollen mit/ohne ASS“ pathologisch erhöht waren. Den Sonderfall zeichneten die MNC des „JAK2V617F -HU Patienten“ P8 ab, welche im EE mit ihren „Thrombin peaks“ nahe der Kontrollmittelwerte und dann im 1. FU bei allen Messungen (Abbildung 33, Grafik A–C) weit oberhalb der Kontrollgruppen lagen.

Innerhalb der „JAK2V617F +HU“ Gruppe zeigte sich im 1. FU bei allen Messungen (Abbildung 33, Grafik A-C) ein inhomogenes Muster aus Senkungen und Steigungen des „Thrombin peaks“, wobei bei P1 und P2 der „Thrombin peak“ im 1. FU im Vergleich zum EE kleiner wurde in Richtung der Kontrollmittelwerte, bei P4 sich als ähnlich oder auch tendenziell kleiner zeigte und einzig bei P3 eine Erhöhung des „Thrombin peaks“ ins Pathologische zu verzeichnen war.

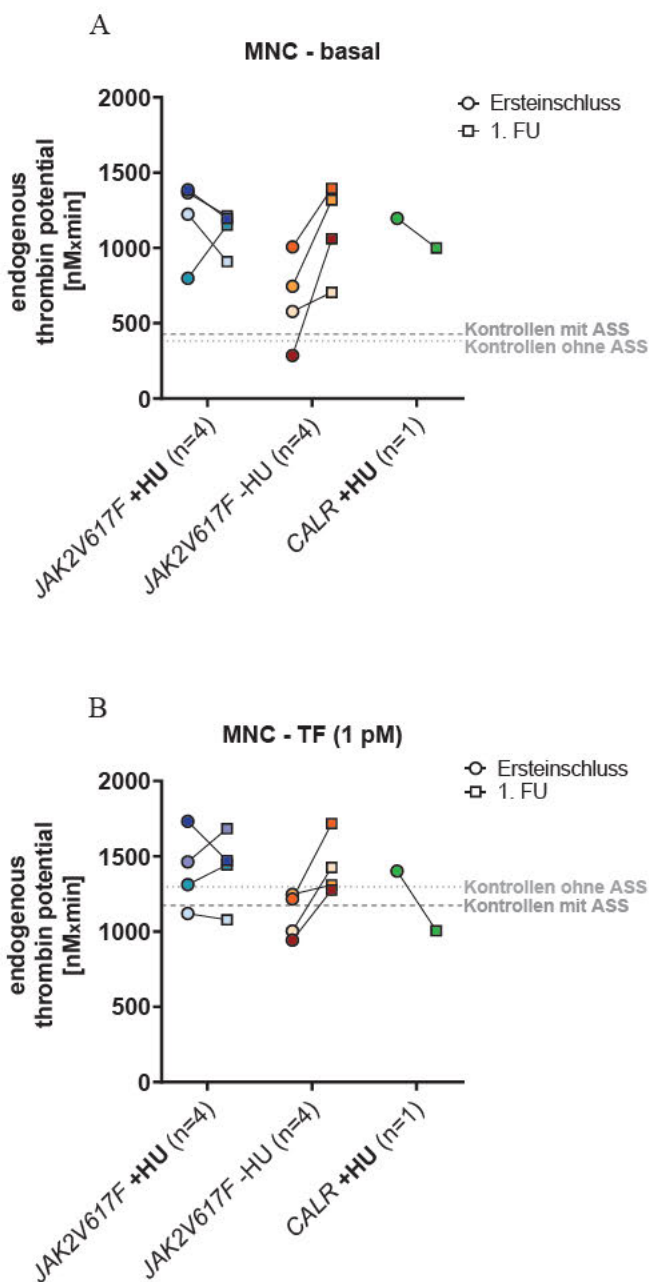
Hingegen hoben sich die „JAK2V617F -HU“ Patienten mit ähnlichen bzw. größtenteils stark gestiegenen Thrombinhöchstwerten im 1. FU verglichen zum EE – in der basalen

## ERGEBNISSE

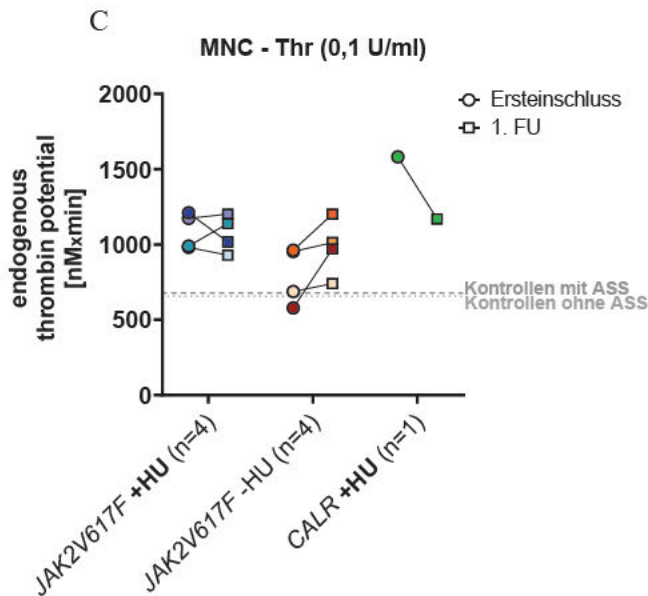
Thrombinmessung wie auch nach Aktivierung mit TF oder Thrombin (Abbildung 33, Grafik A-C) – von den anderen Patientengruppen ab und verzeichneten dadurch eine insgesamt Steigung der TG ins Pathologische im Verlauf der Therapie eines Jahres.

Die MNC des bisher nicht erwähnten „CALR +HU“ Patienten P11 generierten im 1. FU basal sowie nach Zugabe von TF und Thrombin überall einen kleineren „Thrombin peak“ gegenüber des EE, jedoch lag er damit trotzdem noch weit oberhalb der Werte der beiden Kontrollprobandengruppen.

### 4.2.2.1.4.3 „ETP“ DER MNC IN EIGENPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN IM EE UND 1. FU



## ERGEBNISSE



**Abbildung 34: Vergleich des ETPs mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

Vergleich der ET-Patienten OHNE klinische und therapeutische Veränderungen. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS in Eigenplasma als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, ETP = „endogene thrombin potential“, MNC = „mononukleäre Zellen“, TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, min = Minuten, nM = Nanomolar). Farblegende:

ET-Patienten im EE:  
 P1: ●, P2: ●, P3: ●, P4: ●, P5: ●, P6: ●, P7: ●, P8: ●, P11: ●

ET-Patienten im 1.FU:  
 P1: □, P2: □, P3: □, P4: □, P5: □, P6: □, P7: □, P8: □, P11: □

In den Ergebnissen des ETP aller Patientengruppen spiegelte sich ein ähnliches Szenario wie beim vorher besprochenen Vergleich der „Thrombin peaks“ (Kapitel 4.2.2.1.4.2) wider. Auch hier lagen die ETP-Werte im 1. FU fast vollständig im Bereich bzw. größtenteils oberhalb der beiden Kontrollen mit/ ohne ASS und in der „JAK2V617F -HU“ Gruppe zeichnete sich im 1. FU bei allen Patienten (P5–8) eine ETP-Erhöhung ab. Eine der Ausnahmen bildete wieder P8, der im EE bei allen Messungen (Abbildung 34, Grafik A–C) noch ein vergleichsweise geringeres ETP zeigte und allerdings im 1. FU nach TF- Zugabe (Abbildung 34, Grafik B) den Kontrollbereich erreichte bzw. nach Thrombin-Zugabe (Abbildung 34, Grafik C) sowie in der basalen Thrombinmessung (Abbildung 34, Grafik A) die Kontrollwerte weit überstieg. Weitere Ausnahmen traten bei den Messungen nach Aktivierung mit TF (Abbildung 34, Grafik B) auf, bei denen das generierte ETP der MNC des P6 im EE noch unterhalb der Kontrollen lag, im 1. FU allerdings den Kontrollbereich sogar überstieg, sowie das ETP des P11, welches im 1. FU den Kontrollreferenzbereich dann unterschritt und den niedrigsten Wert hatte im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Resümierend kristallisierte sich bei P11 im 1. FU eine geringere Reaktivität der MNC heraus. Im Vergleich zum EE benötigten die MNC eine längere „Lag time“, bis sie mit der Thrombingenerierung gestartet sind (Abbildung 32, Grafik A–C). Die MNC zeigten auch einen

## ERGEBNISSE

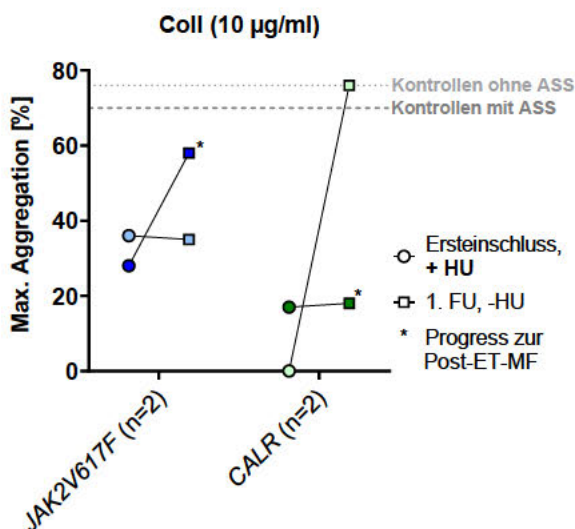
vergleichsweise niedrigeren „Thrombin peak“ (Abbildung 33, Grafik A–C) wie auch ein kleineres ETP (Abbildung 34, Grafik A–C) im 1. FU.

### 4.2.2.2 Intraindividuelle Vergleich der Thrombozytenfunktion von ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen vom EE zum 1. FU

Vier (P9, P10, P12, P13) unserer 13 ET-Patienten hatten im Verlauf vom EE zum 1. FU eine Änderung ihrer zytoreduktiven Therapie. Dabei wechselten P9 und P10 von Hydroxyurea auf Anagrelid, P12 von Hydroxyurea auf pegyliertes Interferon- $\alpha$  und P13 setzte hingegen die zytoreduktive Therapie komplett ab. Zudem zeigten P9 sowie P13 einen Krankheitsprozess zur Post-ET-Myelofibrose. Aufgrund dieser Veränderungen wurden die Patienten in diesem gesonderten Teil ausgewertet.

#### 4.2.2.2.1 INTRAINDIVIDUELLE VERGLEICHE DER AGONISTEN-INDUZIERTEN THROMBOZYTÄREN AGGREGATION

##### 4.2.2.2.1.1 INTRAINDIVIDUELLER VERGLEICH DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN THROMBOZYTÄREN AGGREGATION



**Abbildung 35: Vergleich der Kollagen-induzierten thrombozytären Aggregation im EE und 1. FU**

Vergleichende Darstellung der thrombozytären Aggregation, nach Zugabe von 10 µg/ml Kollagen, der ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen mit JAK2V617F +HU, JAK2V617F -HU und CALR +HU, jeweils zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses und des 1. Follow-ups. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, Coll = Kollagen, JAK2V617F = eine Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = mit Hydroxyurea, -HU = ohne Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, Post-ET-MF = Post-essentielle-Thrombozythämie-Myelofibrose). Farblgende:

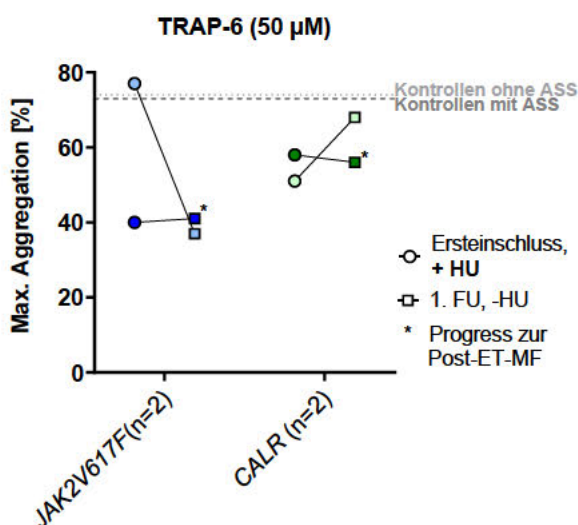
ET-Patienten im EE:  
P9: ●, P10: ●, P12: ●, P13: ●  
ET-Patienten im 1.FU:  
P9: ■, P10: ■, P12: ■, P13: ■

## ERGEBNISSE

In Abbildung 35 wurden die Aggregationsantworten der ET-Patienten mit einem Therapiewechsel sowie teilweise einem Krankheitsprozess zur Post-ET-Myelofibrose (P9, P13) auf die Zugabe von 10 µg/ml Kollagen zum Zeitpunkt des EE und des 1. FU gegenübergestellt. Insgesamt lagen fast alle Patienten mit ihren Aggregationswerten unterhalb des Kontrollbereichs. Die Ausnahme bildete P12, dessen Thrombozyten ihre maximale Aggregation im 1. FU um fast 80 % steigern konnten (EE: 0 %) und damit das Aggregationsniveau der „Kontrollen ohne ASS“ erreichten.

Innerhalb der zwei dargestellten Patientengruppen (*JAK2V617F*, *CALR*) fällt ein uneinheitliches Verhalten auf. Bei 50 % der Patienten zeigte sich eine deutlich höhere Aggregation im 1. FU im Vergleich zum EE (P9, P12). Die andere Hälfte der Patienten (P10, P13) zeigte tendenziell unveränderte Werte im 1. FU. Auch die Patienten mit einem Krankheitsprozess verhielten sich unterschiedlich im Verlauf vom EE zum 1. FU, denn P9 (*JAK2V617F*-positiv) stieg tatsächlich um ein Vielfaches in seiner Aggregationsleistung, wohingegen P13 (*CALR*-positiv) keine Veränderung zeigte.

### 4.2.2.2.1.2 INTRAINDIVIDUELLER VERGLEICH DER TRAP-6-INDUZIERTEN THROMBOZYTÄREN AGGREGATION



#### Abbildung 36: Vergleich der TRAP-6-induzierten thrombozytären Aggregation im EE und 1. FU

Vergleichende Darstellung der thrombozytären Aggregation, nach Zugabe von 50 µM TRAP-6, der ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen mit *JAK2V617F* +HU, *JAK2V617F* -HU und *CALR* +HU, jeweils zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses und des 1. Follow-ups. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, TRAP-6 = Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid-6, *JAK2V617F* = eine Januskinase-2-Mutation, *CALR* = Calreticulin-Mutation, +HU = mit Hydroxyurea, -HU = ohne Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, Post-ET-MF = Post - essentielle Thrombozythämie - Myelofibrose). Farblegende:

ET-Patienten im EE:  
P9: ●, P10: ○, P12: ○, P13: ●  
ET-Patienten im 1.FU:  
P9: ■, P10: □, P12: □, P13: ■

## ERGEBNISSE

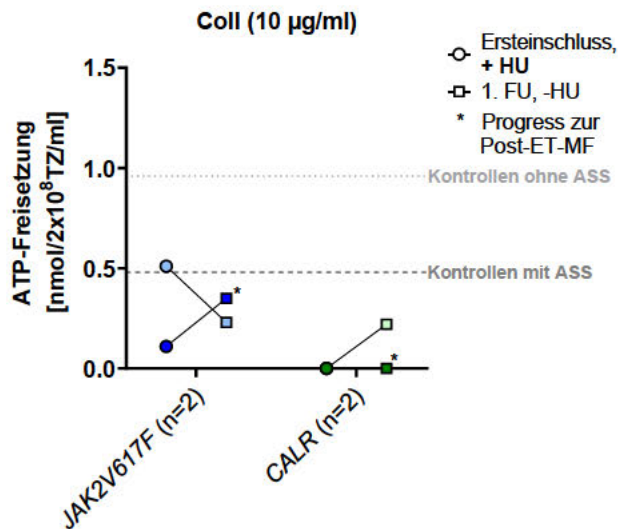
Beim Vergleich der Aggregationsreaktionen der Thrombozyten auf die unterschiedlichen Thrombozytenagonisten Kollagen (siehe Abbildung 35) und TRAP-6 (siehe Abbildung 36), haben die Thrombozyten nach TRAP-6-Induktion (50  $\mu\text{M}$ ) durchschnittlich aggregationsfreudiger reagiert als nach Stimulation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen. Trotzdem lagen wieder fast alle Aggregationsantworten der Patientengruppen unterhalb der Kontrollreferenzen. Die Ausnahme bildeten die Thrombozyten von P10 im EE nach Zugabe von TRAP-6, welche hier im Vergleich zu den anderen Patiententhrombozyten kontrollähnliche Aggregationsergebnisse reproduzierten, jedoch im 1. FU eine sturzartige Senkung der max. Aggregation auf nur noch die Hälfte zeigten und damit das Niveau erreichten, wie sie sich nach Zugabe von 10  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen (siehe Abbildung 35) im EE sowie im 1. FU schon verhalten haben. Dies entsprach der größten Aggregations-Senkung auch im Vergleich zu den ET-Patienten, die keinen Therapiewechsel (siehe Abbildung 26) hatten.

Die einzige offensichtliche Verbesserung der Aggregationsleistung im 1. FU nach TRAP-6 Zugabe zeigte auch hier wieder P12, der das Niveau der „Kontrollen mit ASS“ beinahe erreichte.

## ERGEBNISSE

### 4.2.2.2.2 INTRAINDIVIDUELLE VERGLEICHE DER AGONISTEN-INDUZIERTEN THROMBOZYTÄREN ATP-FREISETZUNG

#### 4.2.2.2.2.1 INTRAINDIVIDUELLER VERGLEICH DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ATP-FREISETZUNG



#### Abbildung 37: Vergleich der Kollagen-induzierten ATP-Freisetzung im EE und 1. FU

Vergleichende Darstellung der thrombozytären ATP-Freisetzung, nach Zugabe von 10 µg/ml Kollagen, der ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen mit JAK2V617F +HU, JAK2V617F -HU und CALR +HU, jeweils zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses und des 1. Follow-ups. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

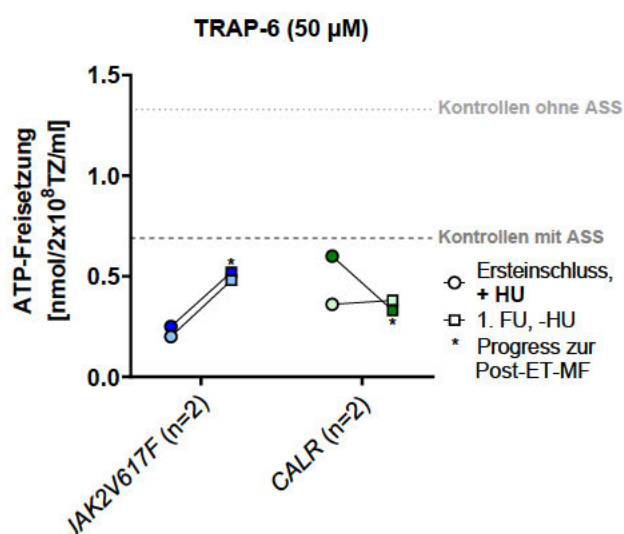
(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, ATP = Adenosintriphosphat, Coll = Kollagen, JAK2V617F = eine Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = mit Hydroxyurea, -HU = ohne Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, TZ = Thrombozyten, Post-ET-MF = Post-essentielle-Thrombozythämie-Myelofibrose). Farblegende:

ET-Patienten im EE:  
P9: ●, P10: ○, P12: ○, P13: ●  
ET-Patienten im 1.FU:  
P9: ■, P10: □, P12: □, P13: ■

Bei Betrachtung der ATP-Freisetzung nach *in vitro* Gabe von 10 µg/ml Kollagen, stellte sich im 1. FU ein uneinheitliches Ergebnis aus Steigungen (P9, P12), Senkungen (P10) sowie gleichbleibend keiner messbaren (P13) thrombozytären ATP-Freisetzung der Patienten im Vergleich zum EE dar.

Insgesamt setzten die Thrombozyten unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt mehrheitlich durchschnittlich geringere ATP-Mengen frei als die Kontrollreferenzen. Ausschließlich P10 war mit seinen Ergebnissen im EE innerhalb des Kontrollbereichs, am nächsten noch an dem Mittelwert der „Kontrollen mit ASS“.

4.2.2.2.2 INTRAINDIVIDUELLER VERGLEICH DER TRAP-6-INDUZIERTEN ATP-FREISETZUNG



**Abbildung 38: Vergleich der TRAP-6-induzierten ATP-Freisetzung im EE und 1. FU**

Vergleichende Darstellung der thrombozytären ATP-Freisetzung, nach Zugabe von 50 µM TRAP-6, der ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen mit JAK2V617F +HU, JAK2V617F -HU und CALR +HU, jeweils zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses und des 1. Follow-ups. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, ATP = Adenosintriphosphat, TRAP-6 = Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid-6, JAK2V617F = eine Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = mit Hydroxyurea, -HU = ohne Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, TZ = Thrombozyten, Post-ET-MF = Post-essentielle-Thrombozythämie-Myelofibrose). Farblegende:

ET-Patienten im EE:  
 P9: ●, P10: ○, P12: ○, P13: ●  
 ET-Patienten im 1.FU:  
 P9: ■, P10: ■, P12: ■, P13: ■

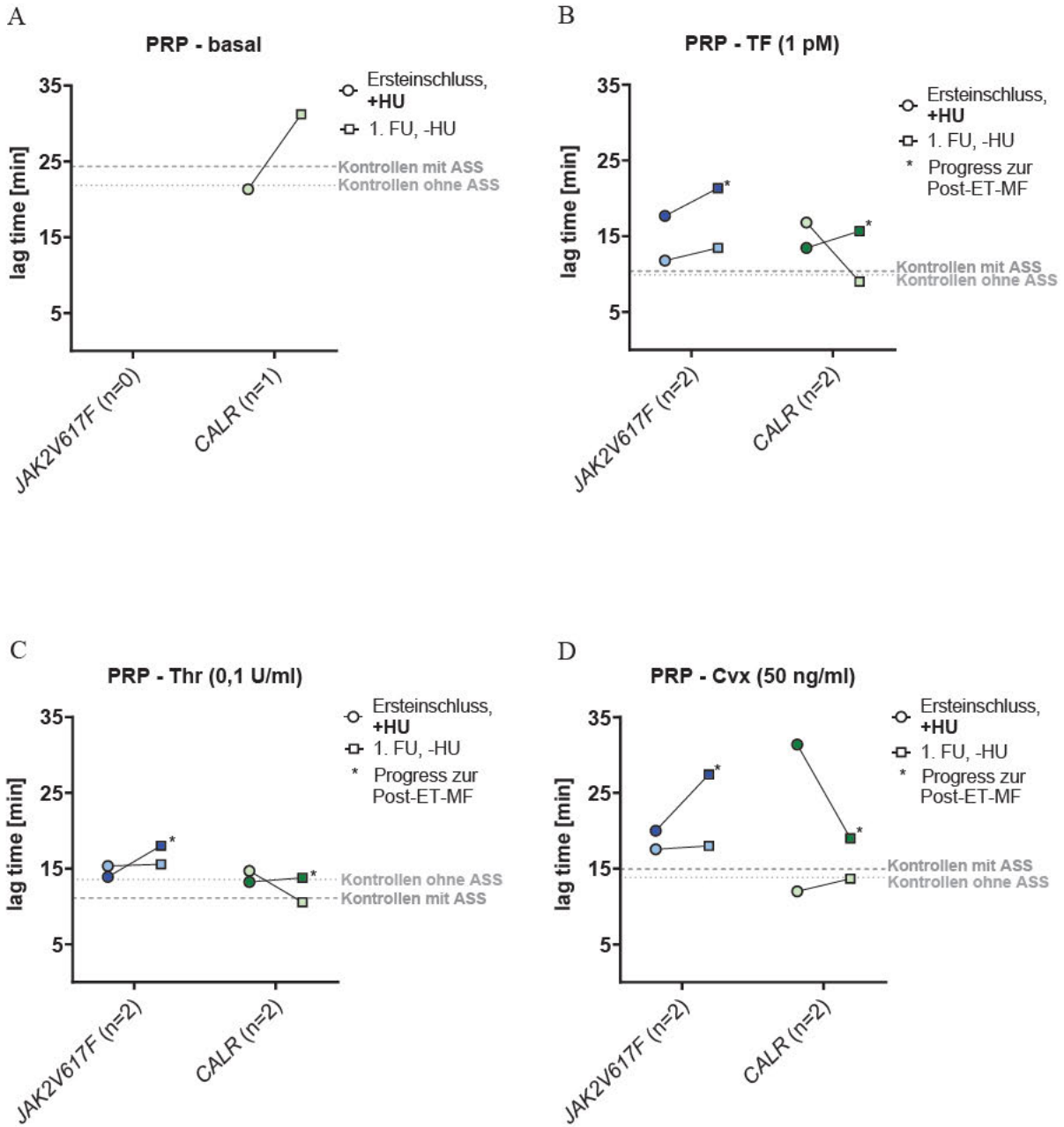
Auch nach TRAP-6 Gabe blieben die ATP-Werte der Patiententhrombozyten im EE sowie im 1. FU mehrheitlich unterhalb beider „Kontrollen mit/ohne ASS“. Trotz konsequentem Unterschreiten der Kontrollreferenzen fand bei P9 und P10 eine Steigung der ATP-Freisetzung im 1. FU statt. Bei den Thrombozyten von P10 steht die im 1. FU gesteigerte ATP-Freisetzung nach TRAP-6-Zugabe (siehe Abbildung 38) im Widerspruch sowohl zur deutlich reduzierten Aggregation nach TRAP-6-Zugabe im 1. FU ( vgl. Abbildung 36) als auch zur sinkenden ATP-Freisetzung nach Kollagen-Zugabe im selben Zeitraum (vgl. Abbildung 37).

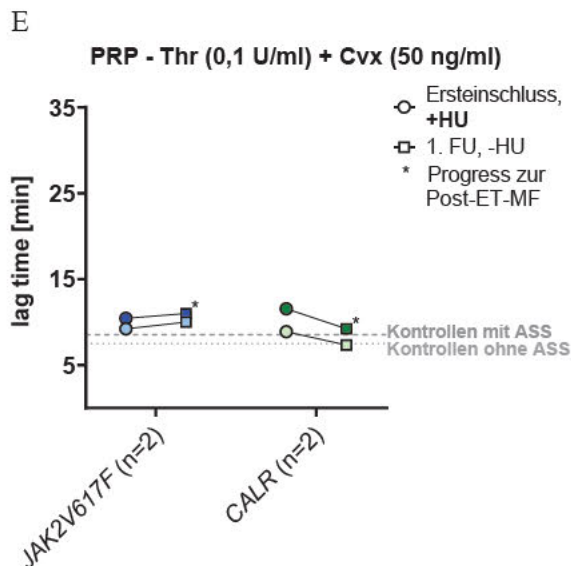
Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Patient P13 nach TRAP-6-Gabe im 1. FU eine noch ausgeprägtere pathologische Veränderung in Form einer deutlich verringerten thrombozytären ATP-Freisetzung im Vergleich zum EE. Wie bereits beschrieben, setzten seine Thrombozyten nach Kollagen-Gabe keinerlei ATP frei (vgl. Abbildung 37). Vergleichend blieben die Aggregationsantworten nach Zugabe von Kollagen und TRAP-6 (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 36) hingegen in beiden Zeitpunkten auch tendenziell konstant pathologisch niedrig.

# ERGEBNISSE

## 4.2.2.2.3 INTRAINDIVIDUELLE VERGLEICHE DER THROMBOZYTÄREN THROMBINGENERIERUNG IN PRP

### 4.2.2.2.3.1 „LAG TIME“ IN PRP BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF, THROMBIN, CONVULXIN UND THROMBIN + CONVULXIN IM EE UND 1. FU





**Abbildung 39: Vergleich der „Lag time“ vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E)**

Vergleichende Darstellung der „Lag time“ (in Minuten) der thrombozytären Thrombingenerierung in PRP von ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen vom Zeitpunkt des EE zum 1. FU. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = tissue factor, Thr = Thrombin, Cvx = Convulxin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, Post-ET-MF = Post-essentielle-Thrombozythämie-Myelofibrose).

Farblegende:

ET-Patienten im EE:  
 P9: ●, P10: ○, P12: ○, P13: ●  
 ET-Patienten im 1.FU:  
 P9: ■, P10: □, P12: □, P13: ■

Bei der Messung des Parameters „Lag time“ während der basalen Thrombingenerierung (Abbildung 39, Grafik A) konnten für die Patienten P9, P10 und P13 im 1. FU keine Daten erhoben werden, weshalb sich ein Vergleich zum EE erübrigte. Die Thrombozyten des Patienten P12 (CALR-positiver Patient ohne Progress) wiederum zeigten im 1. FU basal eine deutliche Verzögerung und damit eine pathologisch lange „Lag time“ im Gegensatz zum EE. Sobald allerdings ein Thrombozyten-Agonist hinzugegeben wurde, verkürzten sich die generierten Verzögerungszeiten der Thrombozyten von P12 mehrheitlich im 1. FU, sodass sie durchweg einen kontrollähnlichen und damit physiologischen Wert erlangten.

Wird das Augenmerk explizit auf die Patienten mit einem erfolgten Krankheitsprozess (P9\*, P13\*) gerichtet, so zeigte sich im 1. FU unabhängig des Agonisten eine längere „Lag time“ im Vergleich zu den Patienten ohne Krankheitsprozess (P10, P12) und den Kontrollgruppen. Besonders bei P9 zeigte sich eine Agonisten-unabhängige pathologische Verlängerung der „Lag time“, wobei nach Zugabe von 50 ng/ml Convulxin (Abbildung 39, Grafik D) die Thrombozyten mit 27,44 Minuten vergleichsweise die längste Zeit benötigten, um die Thrombingenerierung zu starten. Die Thrombozyten des Patienten P13 konnten zwar auch eine pathologische Verlängerung der „Lag time“ nach TF-Zugabe (Abbildung 39, Grafik B)

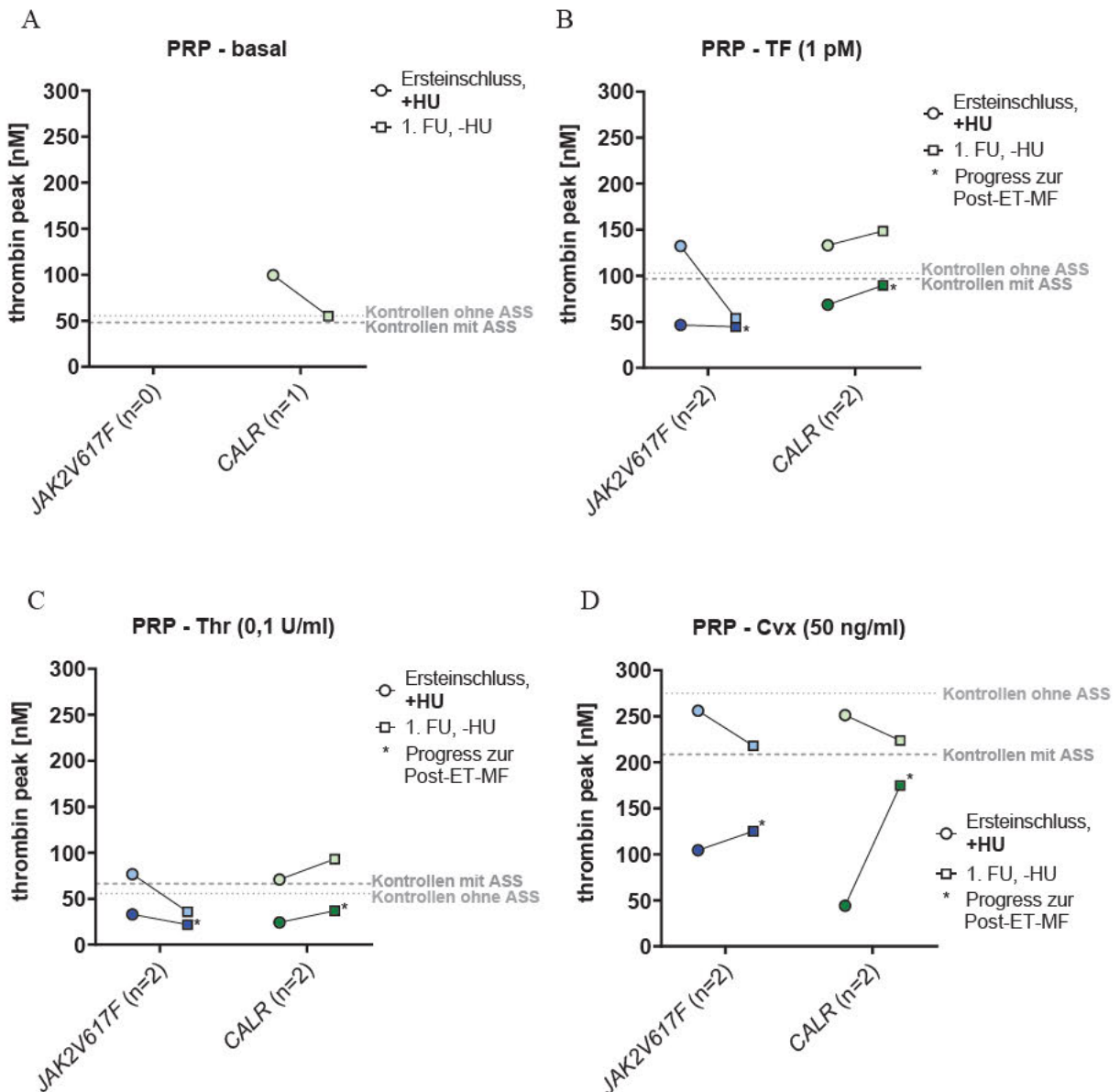
## ERGEBNISSE

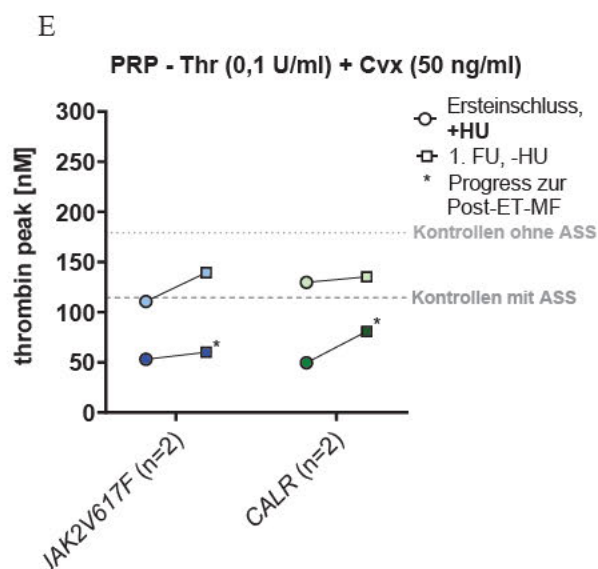
verzeichnen, allerdings verbesserten sich die Werte im 1. FU nach Zugabe der Kombination aus Thrombin + Convulxin (Abbildung 39, Grafik E) leicht und nach der alleinigen Zugabe von Convulxin (Abbildung 39, Grafik D) deutlich stärker.

Insgesamt befanden sich die Verzögerungszeiten aller Patienten nach Thrombin- und auch nach kombinierter Thrombin-Convulxin-Gabe zu beiden Zeitpunkten auf Höhe bzw. tendenziell nur dezent oberhalb der „Lag time“ der beiden „Kontrollen mit/ohne ASS“.

Hier fällt auch eine ähnliche Verhaltensweise der Patienten ohne Therapiewechsel – geschweige denn ohne Krankheitsprozess – auf, denn die Thrombozyten aller Patienten (P1–P13) zeigten vor allem im 1. FU in der absoluten Mehrheit entweder kontrollähnliche oder pathologisch verlängerte Verzögerungszeiten.

### 4.2.2.2.3.2 „THROMBIN PEAK“ IN PRP BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF, THROMBIN, CONVULXIN UND THROMBIN + CONVULXIN IM EE UND 1. FU





**Abbildung 40: Vergleich des „Thrombin peak“ vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).**

Vergleichende Darstellung des „Thrombin peaks“ (in nM) der thrombozytären Thrombingenerierung in PRP von ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen vom Zeitpunkt des EE zum 1. FU. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = tissue factor, Thr = Thrombin, Cvx = Convulxin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, nM = Nanomolar, Post-ET-MF = Post-essentielle-Thrombozythämie-Myelofibrose). Farblegende:

ET-Patienten im EE:  
 P9: ●, P10: ○, P12: ○, P13: ●  
 ET-Patienten im 1.FU:  
 P9: ■, P10: □, P12: □, P13: ■

Beim Vergleich des gemessenen „Thrombin peaks“ im EE sowie 1. FU sind Auffälligkeiten aufgetreten. Denn die Thrombozyten der zwei Patienten mit einer entwickelten Post-ET-Myelofibrose (P9\*, P13\*) generierten im EE sowie im 1. FU, unabhängig vom Thrombozyten-Agonisten, immer niedrigere „Thrombin peaks“ als die zwei anderen Patienten P10 und P12 sowie die Kontrollreferenzen. Dabei verbesserten sich die Werte des P9 im 1. FU kaum und blieben pathologisch. Die Thrombozyten des Patienten P13 hingegen reproduzierten trotz Krankheitsprogress v. a. nach Convulxin-Stimulation (Abbildung 40, Grafik D) im 1. FU einen etwa dreimal so hohen „Thrombin peak“ wie im EE, sodass er in allen Messungen (Abbildung 40, Grafik B–E) beinahe den Kontrollreferenzbereich erreichte.

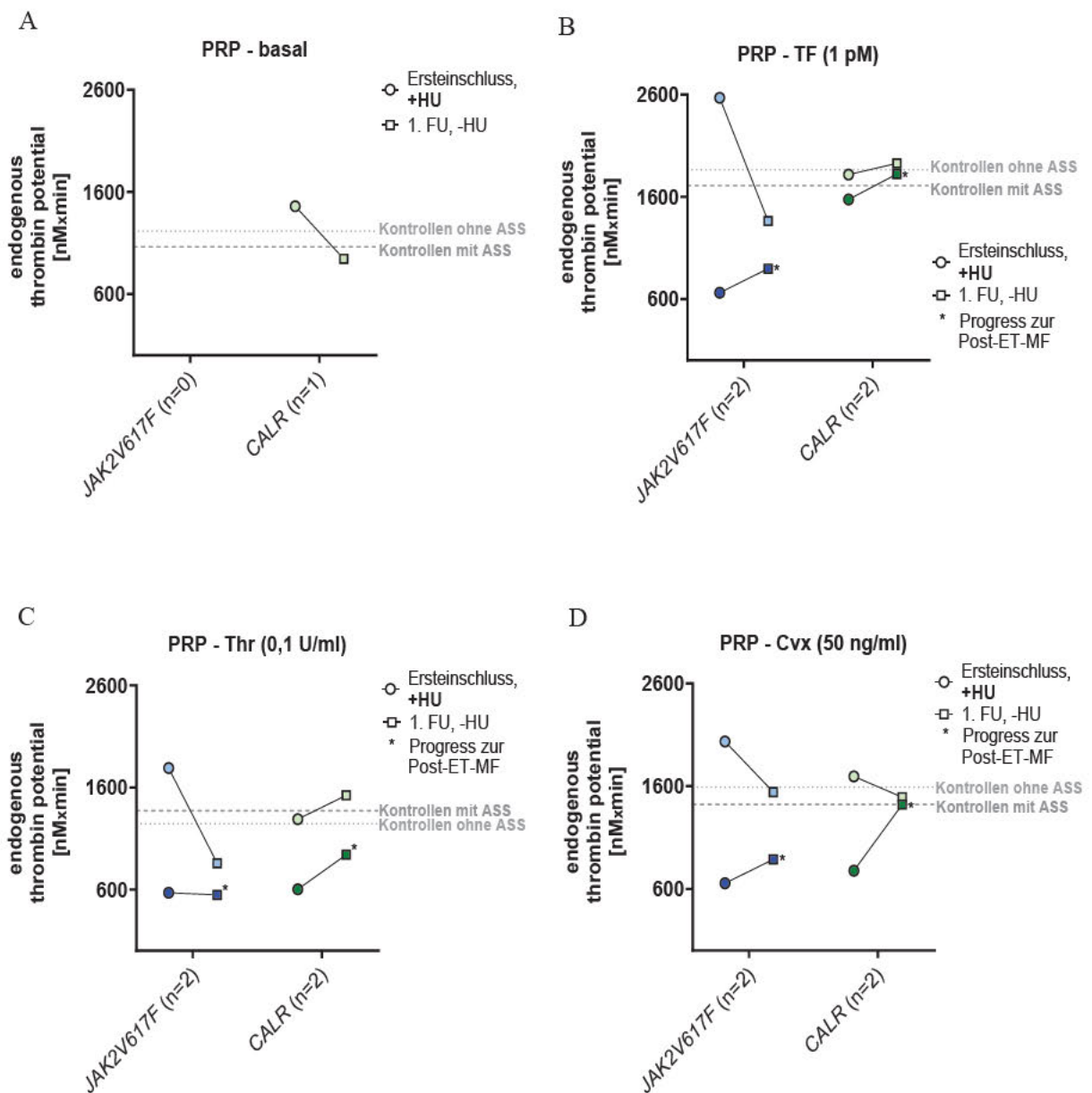
Die Patienten ohne Krankheitsprozess P10 und P12 zeigten in ihren Ergebnissen im 1. FU divergente Tendenzen im Vergleich zum EE. Generierten die Thrombozyten des Patienten P12 in der basalen Messung (Abbildung 40, Grafik A) sowie nach Convulxin-Zugabe (Abbildung 40, Grafik D) einen kleineren „Thrombin peak“ (der sich im Kontrollbereich befand), so erreichten sie nach TF-Gabe (Abbildung 40, Grafik B; oberhalb der Kontrollmittelwerte), Thrombin-Gabe (Abbildung 40, Grafik C; oberhalb der Kontrollmittelwerte) sowie nach

## ERGEBNISSE

simultaner Thrombin-Convulxin-Gabe (Abbildung 40, Grafik E; im Kontrollbereich) einen ähnlichen bzw. tendenziell höheren „Thrombin peak“.

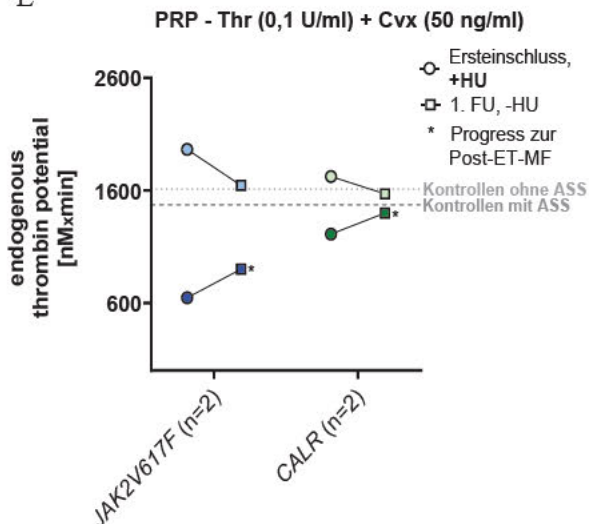
Die Thrombozyten des Patienten P10 wiederum zeigten nur nach simultaner Gabe von Thrombin + Convulxin (Abbildung 40, Grafik E) einen höheren „Thrombin peak“, denn nach Gabe der anderen Agonisten (Abbildung 40, Grafik B-D) wies der thrombozytär generierte „Thrombin peak“ im 1. FU überall eine fallende Tendenz auf.

### 4.2.2.2.3.3 „ETP“ IN PRP BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF, THROMBIN, CONVULXIN UND THROMBIN + CONVULXIN IM EE UND 1. FU



## ERGEBNISSE

E



**Abbildung 41: Vergleich des ETP vom EE und 1. FU in PRP basal (A) und nach Zugabe von TF (B), Thrombin (C), Convulxin (D) und Thrombin + Convulxin (E).**

Vergleichende Darstellung des „endogenen Thrombinpotentials“ (in nM x min) der thrombozytären Thrombingenerierung in PRP von ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen vom Zeitpunkt des EE zum 1. FU. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, ETP = endogenes Thrombinpotential, PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = tissue factor, Thr = Thrombin, Cvx = Convulxin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, nM = Nanomolar, pM = Pikomolar, Post-ET-MF = Post-essentielle-Thrombozythämie -Myelofibrose). Farblgende:

ET-Patienten im EE:  
P9: ●, P10: ●, P12: ●, P13: ●  
ET-Patienten im 1.FU:  
P9: ■, P10: ■, P12: ■, P13: ■

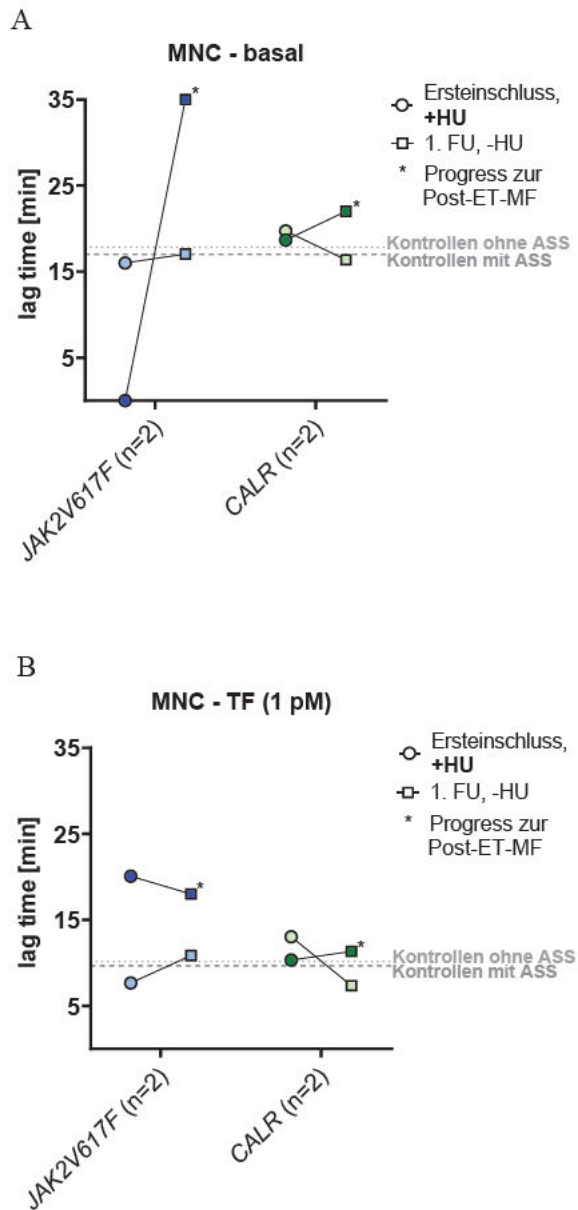
Bei Gegenüberstellung der erzeugten „Thrombin peaks“ (Abbildung 40) sowie ETPs (Abbildung 41) aller dargestellten vier ET-Patienten mit einem Therapiewechsel, fallen gleiche Tendenzen auf. Wer einen erhöhten „Thrombin peak“ im 1. FU im Gegensatz zum EE bilden konnte, der erzeugte auch ein höheres ETP und umgekehrt. Trotzdem gab es eine Ausnahme bei simultaner Gabe von Thrombin + Convulxin (Abbildung 41, Grafik E), denn P12 erreichte zwar einen erhöhten kontrollähnlichen „Thrombin peak“ im 1. FU (vgl. Abbildung 40, Grafik E), jedoch verhielt sich das generierte ETP (vgl. Abbildung 41, Grafik E) konträr dazu und sank, erlangte dadurch aber trotzdem kontrollähnliche Werte. Wiederum lagen die Werte der Progress-Patienten (P9\*, P13\*) unterhalb der Werte der anderen beiden Patienten P10 und P12 und auch größtenteils wieder pathologisch unterhalb des Kontrollreferenzbereichs. Wobei die Thrombozyten des Progress-Patienten P13 dieses Mal auch nach TF-Zugabe (Abbildung 41, Grafik B), Convulxin-Zugabe (Abbildung 41, Grafik D) sowie simultaner Zugabe von Thrombin + Convulxin (Abbildung 41, Grafik E) ein kontrollähnliches ETP erreichen konnten. Von den „Nicht-Progress-Patienten“ lagen die ETP-Werte von P10 nur nach Convulxin- und nach simultaner Thrombin-Convulxin-Gabe im 1. FU im Kontrollbereich. Demgegenüber bewegten sich die Werte des P12 im EE sowie im 1. FU recht nahe bzw. im Bereich der Kontrollen.

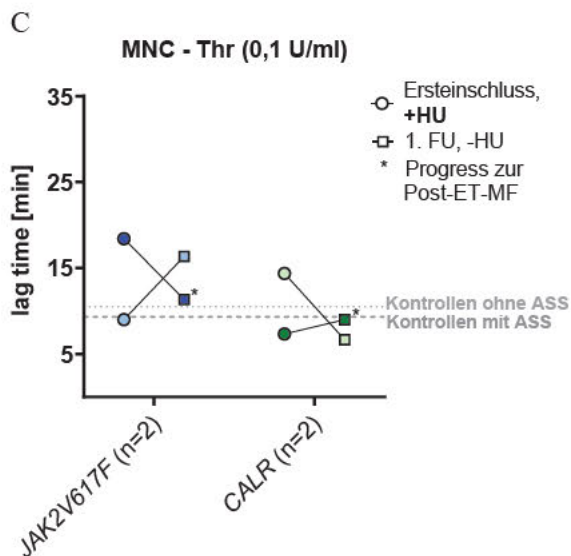
## ERGEBNISSE

### 4.2.2.2.4 INTRAINDIVIDUELLE VERGLEICHE DER THROMBINGENERIERUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN (RESUSPENDIERT IN EIGENPLASMA)

In diesem Kapitel wurden die Messergebnisse der monozytären TG im autologen Plasma von ET-Patienten MIT klinischen oder therapeutischen Veränderungen (P9\*, P10, P12, P13\*) vom EE und 1. FU miteinander verglichen.

#### 4.2.2.2.4.1 „LAG TIME“ DER MNC IN EIGENPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN IM EE UND 1. FU





**Abbildung 42: Vergleich der „Lag time“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

Vergleich der ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS in Eigenplasma als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, MNC = „mononukleäre Zellen“, TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten, pM = Pikomolar, Post-ET-MF = Post-essentielle-Thrombozythämie-Myelofibrose). Farblegende:

ET-Patienten im EE:  
P9: ●, P10: ●, P12: ●, P13: ●  
ET-Patienten im 1.FU:  
P9: ■, P10: ■, P12: ■, P13: ■

Der Vergleich der basalen Thrombingenerierung (Abbildung 42, Grafik A) der MNC zeigte ein gemischtes Bild an Verlängerungen (P9, P10, P13) und Verkürzungen (P12) der „Lag time“ zum Zeitpunkt des 1. FU gegenüber dem EE. Hervorstechend waren die Ergebnisse des Patienten P9, dessen MNC im EE ausschließlich während der basalen Thrombingenerierung keinerlei Reaktionen zeigten („Lag time“: 0 min, „Thrombin peak“: 0 nM, ETP: 0 nMxmin), jedoch im 1. FU (nach Umstellung von Hydroxyurea auf Anagrelid sowie nach der Entwicklung einer Post-ET-Myelofibrose) die längste „Lag time“ im Vergleich zu den anderen Therapiewechselern (P10, P12, P13) genauso wie zu den Patienten ohne einen Therapiewechsel (P1–P8, P11) zeigte.

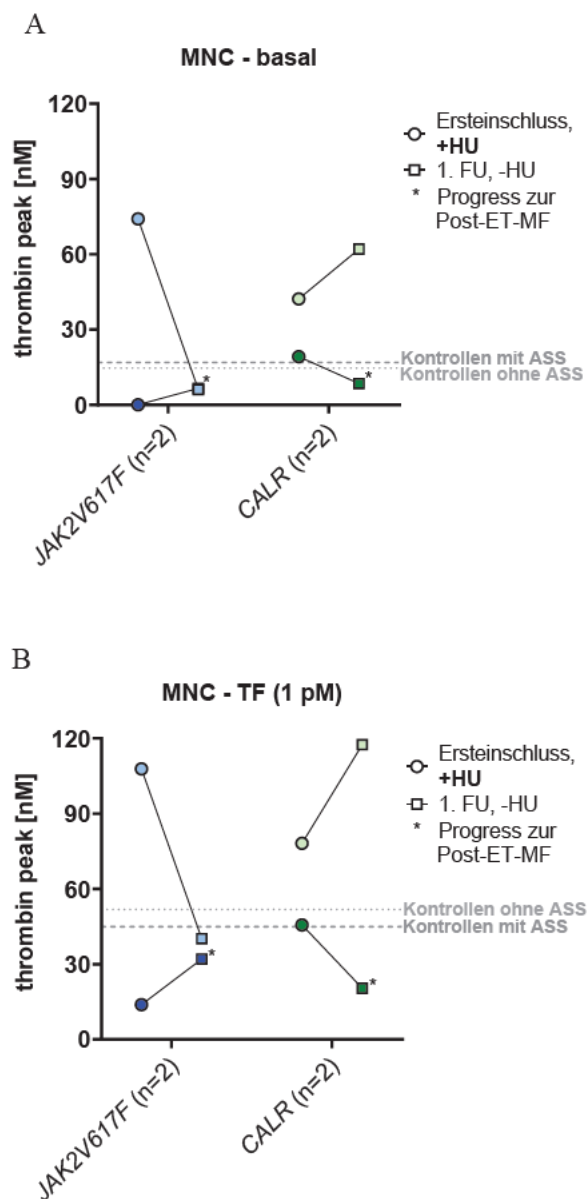
Auch die MNC des zweiten Patienten mit einem Krankheitsprozess, P13, zeigten – unabhängig von der basalen Thrombinmessung (Abbildung 42, Grafik A) oder Agonistenzugabe (Abbildung 42, Grafik B–C) – im 1. FU im Vergleich zum EE (bei dem sie kontrollähnliche Werte erreichten) geringfügig verlängerte „Lag time“-Werte.

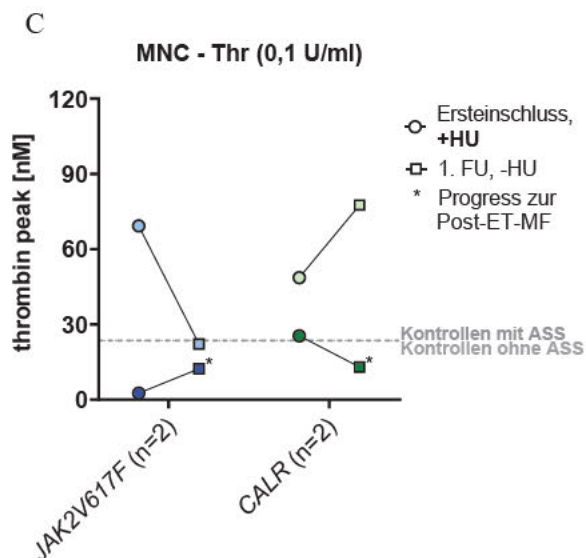
## ERGEBNISSE

Die beiden anderen Patienten ohne Krankheitsprozess, P10 und P12, zeigten hingegen im EE sowie im 1. FU Verzögerungszeiten, die denen der Kontrollen sehr nah kamen bzw. sogar entsprachen.

An und für sich befanden sich die „Lag time“ Werte der *CALR*-positiven Patienten (P12, P13) bei allen Messungen (Abbildung 42, Grafik A–C) größtenteils nahe oder im Bereich der Kontrollreferenzen. Demgegenüber zeigten die MNC der „*JAK2V617F*-Gruppe“ (P9, P10) eine etwas größere Streuung aller Werte im EE und 1. FU um den Kontrollbereich herum.

### 4.2.2.2.4.2 „THROMBIN PEAK“ DER MNC IN EIGENPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN IM EE UND 1. FU





**Abbildung 43: Vergleich des „Thrombin peaks“ mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

Vergleich der ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS in Eigenplasma als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, MNC = „mononukleäre Zellen“, TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, *JAK2V617F* = Januskinase-2-Mutation, *CALR* = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, nM = Nanomolar, Post-ET-MF = Post-essentielle-Thrombozythämie-Myelofibrose). Farblegende:

ET-Patienten im EE:  
 P9: ●, P10: ○, P12: ○, P13: ●  
 ET-Patienten im 1.FU:  
 P9: ■, P10: □, P12: □, P13: ■

In Abbildung 43 werden die von den MNC der Patienten P9, P10, P12 und P13 generierten Werte für den „Thrombin peak“ während drei unterschiedlicher Messungen im EE sowie im 1. FU in einem Verlaufs-Punktendiagramm dargestellt.

Innerhalb der zwei dargestellten Mutationsgruppen (*JAK2V617F*, *CALR*) herrschte zwar in allen Messungen im 1. FU ein entgegengesetztes Verhalten von Steigungen oder Senkungen des „Thrombin peaks“, jedoch bewegten sich die Werte je nach Gruppe immer in die gleiche Richtung bezogen auf den Kontrollreferenzbereich.

So erreichten die MNC der „*JAK2V617F*-Gruppe“ sowohl in der basalen Thrombinmessung (Abbildung 43, Grafik A) als auch nach Zugabe von TF (Abbildung 43, Grafik B) oder Thrombin (Abbildung 43, Grafik C) immer geringfügig kleinere, jedoch durchaus kontrollähnliche „Thrombin peaks“ im 1. FU. Wohingegen die MNC der „*CALR* Gruppe“ im 1. FU eine Tendenz weg vom Kontrollbereich zeigten. Dabei wies der Patient P12 (ohne Krankheitsprogress) sogar in allen Messungen einen pathologisch hohen „Thrombin peak“ auf und im Gegensatz dazu verschlechterte sich der Patient P13 (Progress zur Post-ET-Myelofibrose) in die andere

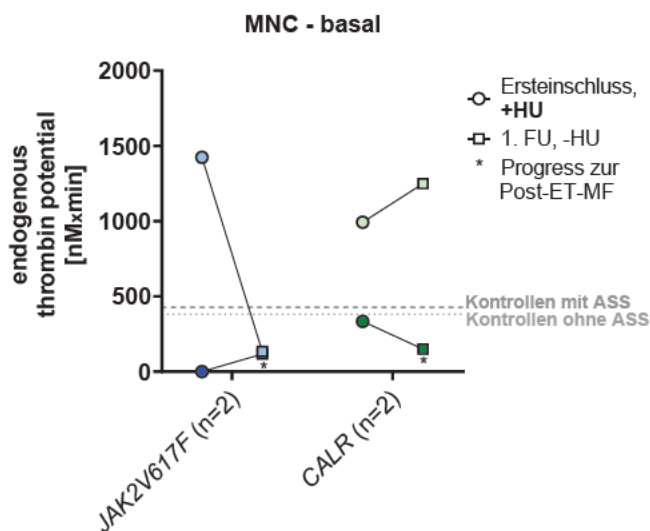
## ERGEBNISSE

Richtung, sodass er in allen Messungen einen, im Vergleich zu den Kontrollen pathologisch verminderten „Thrombin peak“ generierte.

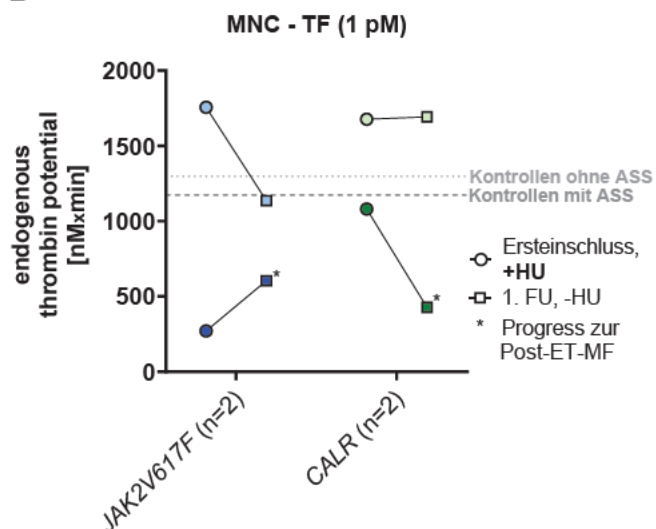
Auffällig war zudem, dass bei allen Patienten OHNE Therapieänderung im Verlauf (P1–P8, P11; vgl. Kapitel 4.2.2.1.4.2, Abbildung 33) die monozytären „Thrombin-Peak“-Werte in sämtlichen Messungen – sowohl basal als auch nach Zugabe von TF und Thrombin – spätestens im 1. FU oberhalb des Kontrollbereichs lagen. Bei den Patienten MIT Therapieänderung befanden sich diese Werte hingegen größtenteils unterhalb des Kontrollbereichs, mit Ausnahme von P12, dessen Werte ein ähnliches Muster wie bei den Patienten OHNE Therapieänderung zeigten.

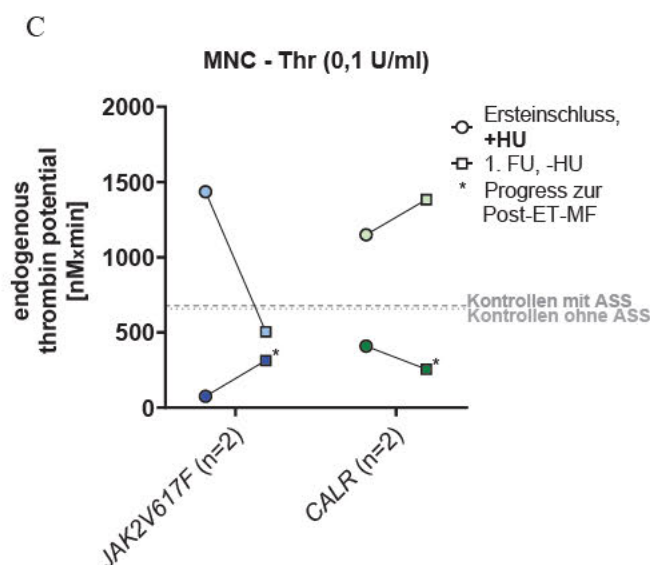
### 4.2.2.2.4.3 „ETP“ DER MNC IN EIGENPLASMA BASAL SOWIE NACH ZUGABE VON TF UND THROMBIN IM EE UND 1. FU

A



B





**Abbildung 44: Vergleich des ETPs mononukleärer Zellen resuspendiert in Eigenplasma vom EE und 1. FU; basal gemessen (A) und nach Zugabe von 1 pM TF (B) und 0,1 U/ml Thrombin (C).**

Vergleich der ET-Patienten MIT klinischen und therapeutischen Veränderungen. Als Referenz wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Kontrollen mit und ohne ASS in Eigenplasma als gestrichelte Linien angegeben.

(EE = Ersteinschluss, FU = Follow-up, ETP = „Endogene thrombin potential“, MNC = „mononukleäre Zellen“, TF = tissue factor (Gewebefaktor), Thr = Thrombin, JAK2V617F = Januskinase-2-Mutation, CALR = Calreticulin-Mutation, +HU = unter Hydroxyurea-Therapie, -HU = ohne Hydroxyurea-Therapie, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, pM = Pikomolar, min = Minuten, nM = Nanomolar, Post-ET-MF = Post-essentielle-Thrombozythämie-Myelofibrose). Farblegende:

ET-Patienten im EE:  
 P9: ●, P10: ○, P12: ○, P13: ●  
 ET-Patienten im 1.FU:  
 P9: ■, P10: □, P12: □, P13: ■

Bei den Messungen des von den MNC generierten ETPs fielen pro Patient die gleichen Ab- und Aufwärtsbewegungen wie bei den jeweiligen Werten der „Thrombin peaks“ auf. Auch hier waren die Ergebnisse von P9 und P13 (beide mit einem durchgemachten Krankheitsprozess) in allen Messungen (Abbildung 44, Grafik A–C) pathologisch niedrig, obwohl das ETP von P9 im Verlauf eine steigende Tendenz zeigte, hierbei aber weiterhin einen pathologisch großen Abstand noch zu den Kontrollmittelwerten aufwies.

Die MNC des P12 verhielten sich zum 1. FU wie die MNC der Patienten OHNE Therapieänderung und generierten während der basalen Messung und auch nach TF- oder Thrombin-Gabe ein noch pathologisch höheres ETP als im EE.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 DESKRIPTIVE DATENANALYSE

Von den zum 1. Follow-up (1. FU) untersuchten 13 Patienten mit essentieller Thrombozythämie (ET) wiesen zehn eine *JAK2V617F*- und drei eine *CALR*-Mutation auf. Die Verteilung der *CALR*-Mutation unter den Patienten entsprach in etwa denen von Marin Oyarzun *et al.* (11) angegebenen Werten (20 – 30 %), wobei die *JAK2V617F*-Mutation in unserer Studie mit 77 % vergleichsweise überproportional häufig vorkam. Marin Oyarzun *et al.* gaben ein Häufigkeitsaufkommen der *JAK2V617F*-Mutation bei an ET Erkrankten von nur 50 - 60 % an. Im Ersteinschluss (EE) und 1. FU nahmen die Mehrheit der Patienten Aspirin® (ASS) ein (Ausnahmen bei beiden Untersuchungszeitpunkten: P4 und P9). Außerdem wurden im 1. FU fünf Patienten [vier *JAK2V617F*- (P1 - P4) und ein *CALR*-positiver Patient (P11)] mit dem zytoreduktiven Medikament Hydroxyurea (HU) therapiert. Bei zwei Patienten kam es im 1. FU zu einem Therapiewechsel auf Anagrelid (P10) bzw. pegyliertes Interferon- $\alpha$  (pegINF $\alpha$ ) (P12), da sich unter der HU-Therapie keratotische Veränderungen und anhaltender Juckreiz zeigten. Zudem wechselte P9 von HU auf Anagrelid. **Möglicherweise lag bei P9 eine HU-Resistenz vor**, denn nach Wechsel der Therapie auf Anagrelid kurz nach dem EE konnte im 1. FU eine deutliche Senkung der Thrombozytenkonzentration von P9 erreicht werden. Ein weiterer Patient (P13) setzte HU ab ohne Ergänzung einer neuen zytoreduktiven Therapie, da eine fallende Thrombozytenkonzentration auffiel und eine Post-ET-Myelofibrose (Post-ET-MF) nachgewiesen wurde. Hier kommt der **Verdacht auf, dass HU ursächlich für die fibrotische Transformation zur Post-ET-MF sein könnte**. Dass HU zwar möglicherweise zu einer leukämischen Transformation führe, zeigten beispielsweise schon E. Liozon *et al.* (140) 1997 mit ihrer Studie, in der 58 ET-Patienten über einen Zeitraum von 14 Jahren beobachtet wurden und 3 Patienten davon unter HU-Therapie eine leukämische Transformation entwickelten (AML MO, t-RAEB, CMML). Eine fibrotische Transformation wurde hier hingegen nicht beobachtet. In weiteren Beobachtungsstudien gab es zudem auch keinen Hinweis mehr auf eine Kausalität zwischen HU-Therapie und einer leukämischen Transformation bei Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien (29). Dass eine Behandlung mit HU jedenfalls keinen präventiven Effekt auf die Entwicklung einer Myelofibrose habe, geschweige denn eine erhöhte *JAK2V617F*-Allellast (welche prädiktiv für die Entwicklung einer Post-ET-MF wäre) reduzieren könne, stellten Shuichi Shirane *et al.* 2015 klar.

Insgesamt zeigten zwei unserer Patienten (P9: *JAK2V617F*; P13: *CALR*) im 1. FU einen Progress zur **Post-ET-MF**, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (141). Da beide Patienten unterschiedliche Mutationen aufwiesen, scheint dieser Progress eher **mutationsunabhängig** zu erfolgen. Auch Elisa Rumi und Mario Cazzola (4) beschrieben 2017 in ihrem Review, dass sowohl die *JAK2V617F*- als auch die *CALR*-Mutationen mit einem erhöhten Progressionsrisiko einhergehen würden.

## DISKUSSION

Klinisch wurde bei keinem der Patienten im FU-Jahr eine neu aufgetretene Blutung oder ein thrombotisches Ereignis nachgewiesen. Dahingegen wiesen im EE die *JAK2V617F*-mutierten Patienten eine Thromboseanamnese auf. Dies würde die Ergebnisse von Coucelo *et al.* (110) bekräftigen, welche eine Assoziation zwischen *JAK2V617F*-Mutationsstatus und einem erhöhten Thromboserisiko zeigten.

Sieben Patienten wiesen klinisch ein erworbenes vWS auf, welches nur bei P5 auch laborchemisch nachgewiesen werden konnte. Beim Großteil der Patienten sank die Thrombozytenkonzentration zum 1. FU. Die Ausnahmen bildeten P1, P4 und P11. Trotz jeweils zytoreduktiver Therapie stieg deren Thrombozytenkonzentration sogar im Verlauf an. P5 zeigte im EE sowie weiterhin im 1. FU eine extreme Thrombozytose, wurde allerdings auch keiner zytoreduktiven Therapie unterzogen. Im Gegensatz dazu spiegelte sich bei P9 und P10 durch den Wechsel auf Anagrelid, wie auch bei P12 durch den Wechsel auf pegyliertes Interferon- $\alpha$  ein Therapieerfolg mit einer mehr als 50-prozentigen Abnahme der Thrombozytenkonzentration wider, was die Wirksamkeit der Zweitlinien- bzw. Off-Label-Use Therapie bestätigen würde. Generell zeigten die Patienten, die einem Wechsel (P9, P10, P12) bzw. Abbruch (P13) der zytoreduktiven Therapie unterzogen wurden, tatsächlich die größten Abnahmen ihrer Thrombozytenkonzentrationen im Vergleich zu allen anderen Patienten mit oder ohne HU. Hierunter fielen auch die Post-ET-MF-Patienten (P9, P13), wobei P9 sogar mit einer 71-prozentigen Abnahme den größten Abfall der Thrombozytenkonzentration verzeichnen konnte. Die Patienten P2, P3 und P4, welche im 1. FU weiterhin mit HU therapiert wurden, zeigten hingegen kaum Veränderungen, lagen allerdings mit ihren Thrombozytenkonzentrationen spätestens im 1. FU im Referenzbereich. P1 und P11 waren demgegenüber die einzigen Patienten, die mit einer leichten (P11) bis stärkeren (P1) Erhöhung der Thrombozytenkonzentration bei Einnahme von HU vom EE zum 1. FU reagierten.

Zudem sei zu erwähnen, dass die Patientin P10 zwar in ihren Laborwerten im 1. FU keine besonderen Auffälligkeiten zeigte (mit Ausnahme des Erfolgs durch den Therapiewechsel bezüglich der auf einen kontrollähnlichen Wert verminderte Thrombozytenkonzentration), ihr jedoch ein invasives Mammakarzinom diagnostiziert wurde, weshalb die Patientin zusätzlich unter einer Hormontherapie (Letrozol/Aromatasehemmer) stand. Das könnten natürlich zusätzliche Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion haben, was in der folgenden Diskussion der explorativen Datenanalyse berücksichtigt wurde.

Außerdem zeigten die *JAK2V617F*-positiven Patienten mehrheitlich höhere (und damit physiologische) Hämatokrit- und Hämoglobinwerte als die *JAK2V617F*-negativen (in unserem Fall *CALR*-positiven) Patienten (in Anlehnung der Referenzwerte von Sysmex KX-21N bzw. R. Herklotz *et al.*, Tabelle 3 (142)). Dies wurde bereits von E. Antonioli *et al.* 2005 (143) beobachtet. Eine klinische Relevanz scheint dies jedoch nicht zu haben.

## 5.2 EXPLORATIVE DATENANALYSE

### 5.2.1 Thrombozytäre Aggregation und ATP-Sekretion von Patienten mit ET

Die Lichttransmissions-Aggregometrie (LTA) ist die am weitesten verbreitete Methode zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion. Sie misst die Lichttransmission durch eine Thrombozytensuspension bei fortschreitender Aggregation (116). Außerdem ist sie kombinierbar mit einer Echtzeitüberwachung der ATP-Sekretion in einem Lumi-Aggregometer durch Zugabe eines Luciferin-Luciferase-Reagenz (116). Weitere Vorteile sind die relative Einfachheit und die Möglichkeit, die Reaktionen auf einzelne Agonisten zu prüfen. Als nachteilig erscheinen die zeitintensive Durchführung und Operator-abhängige Variabilität im Vergleich zu Point-of-Care-Tests (128). Die Interpretation der Aggregationsergebnisse ist außerdem aufgrund der Rückkopplungseffekte redundanter Thrombozytenaktivierungswege komplex (128). Dies gilt allerdings für alle Tests der Thrombozytenfunktion (128). Zu Messabweichungen im Lumi-Aggregometer kann es außerdem durch präanalytische Variablen wie der Blutentnahme (Venenpunktion, Kanülengröße, Staubbedingungen, Röhrchentyp, Antikoagulanz) oder der PRP-Aufbereitung (Zentrifugationsbedingungen, Restzahl von Erythrozyten im PRP, Rührgeschwindigkeit etc.) kommen (89). Auch analytische (Lipämie, Bilirubin, Hämoglobin (89)) oder patientenbezogene Variablen (Medikamenteneinnahme, Nüchternheit) beeinflussen das Messergebnis (139). Mehrere dieser Fehlerquellen konnten zur heutigen Zeit schon durch die Etablierung der Standardisierung von Aggregations- und Sekretionsassays minimiert werden (144). Unsere Arbeitsgruppe achtete zudem genauestens auf standardisierte Blutentnahmen, Vermeidung mechanischer und Scherkraft-abhängiger Belastung, Vermeidung von Temperaturschwankungen (nur Zimmertemperatur) und auf eine schnelle Verarbeitung der Blutproben.

Es ist bekannt, dass Thrombozyten von ET-Erkrankten Funktionsstörungen aufweisen können (145, 146). Beispielsweise berichteten Theodore H. Spaet *et al.* schon 1969, dass in ihrer Studie die ET-Patienten charakteristische Anomalien aufwiesen. Hierbei fielen eine fehlende Aggregation auf Epinephrin-Gabe bzw. eine verminderte Aggregation auf ADP-Gabe sowie möglicherweise auch eine reduzierte ADP-Aktivität der Thrombozyten auf (146). Mit unseren Messungen verfolgten wir das Ziel, herauszufinden, ob die Thrombozyten unserer ET-Patienten im Verlauf einen überreaktiven und damit hyperfunktionalen Charakter mit der Tendenz zu thrombotischen Erkrankungen oder eher einen hypofunktionalen Charakter mit erhöhter Neigung zu Blutungsdiathesen aufweisen.

Im Folgenden werden zunächst die Messergebnisse der thrombozytären Aggregation sowie ATP-Sekretion der ET-Patienten (im Verlauf und teilweise individuell beleuchtet) diskutiert.

### 5.2.1.1 Effekt der Aspirin-Therapie auf die Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation bei Patienten mit ET im 1. FU

Den nicht zu vernachlässigenden inhibierenden Effekt von ASS auf Thrombozyten konnten wir mithilfe der Lumi-Agregometrie und der Verwendung der Arachidonsäure (Aa) als Thrombozytenagonist darstellen. Die Aa wirkt indirekt über die Stimulierung der thrombozytären Bildung von TXA<sub>2</sub> aktivierend auf Thrombozyten. Da die Mehrheit unserer Patienten (n=11) zum Untersuchungszeitpunkt im 1. FU ASS einnahmen, muss der ASS-Effekt in den Ergebnissen berücksichtigt werden. Leider konnten wir in den anderen Versuchen keine zusätzliche Aufteilung der Patienten nach der ASS-Therapie verwirklichen, da aufgrund des zu kleinen Patientenkollektivs die statistischen Vergleichstests nicht möglich gewesen wären.

Auf die Gabe von Aa repräsentierten die Thrombozyten im PRP der „Kontrollen mit“ und „ohne ASS“ ein erwartetes und statistisch auffällig unterschiedliches Ergebnis ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney test): Die Thrombozyten der „Kontrollen ohne ASS“ reagierten mit einer Aggregation von 69 % (Median), wohingegen die der „Kontrollen mit ASS“ 0 % (Median) Aggregation zeigten. Dieses Phänomen kann eindeutig auf die Wirkung von ASS zurückgeführt werden. ASS hemmt das Enzym COX1 irreversibel (durch Acetylierung eines einzelnen Serinrests an Position 529 in der COX1(147-149)), die den ersten Schritt der TXA<sub>2</sub>-Synthese aus Arachidonsäure katalysiert. Da die Thrombozyten kernlos sind, können sie keine neuen Cyclooxygenasen synthetisieren (150), weshalb die durch TXA<sub>2</sub> vermittelte Thrombozytenaktivierung mit nachfolgender Aggregation konsekutiv abnimmt.

Die Thrombozyten der Patienten ohne ASS-Einnahme (P4: JAK2V617F +HU, P9: JAK2V617F -HU [+Anagrelid]) zeigten überraschenderweise eine verminderte bzw. gesteigerte Aa-induzierte Aggregation im Vergleich zu den Kontrollprobanden.

Die Thrombozyten des **P9** (JAK2V617F –HU [+Anagrelid], ohne ASS) ohne HU-Einfluss reagierten mit einer deutlich niedrigeren Aggregationsneigung (max. Aggregation: 50 %) als die „Kontrollen ohne ASS“ (max. Aggregation im Median: 69 %). Dies würde eine geringere Thrombozytenreaktivität/-sensitivität von JAK2V617F-positiven Patienten *in vitro* auf Aa im Gegensatz zu „Kontrollen ohne ASS“ implizieren. Für dieses Ergebnis könnte es mehrere Erklärungen geben:

1.) Da der entscheidende Unterschied von P9 (JAK2V617F –HU [+Anagrelid]) zu den „Kontrollen ohne ASS“ seine Anagrelid-Therapie war, könnte das Ergebnis auf eine reaktionsmindernde Wirkung von Anagrelid auf Thrombozyten hinweisen. Solch ein Phänomen in diesem Ausmaß konnte in keiner bekannten Studie bestätigt werden. Anagrelid ist zwar vorerst als thrombozytenaggregationshemmendes Medikament bekannt geworden (151, 152), jedoch in sehr viel höherer Dosierung als es zur Thrombozytenreduktion bei der Erkrankung ET erforderlich wäre (153). Aufgrund der niedrigen Dosierung bei den

## DISKUSSION

ET-Patienten ist ein deutlich aggregationshemmender Effekt durch Anagrelid eher unwahrscheinlich.

2.) Eine weitere und plausiblere Erklärung wäre das 2006 von Jan J. Michiels (154) *et al.* deklarierte Konzept. Es besagt, dass die Thrombozyten von ET-Patienten *in vivo* hyperreaktiv wären. Dadurch komme es leichter zu einer spontanen Aktivierung der Thrombozyten durch erhöhte Scherkräfte, die Thrombozytengranula würden freigesetzt werden, es komme zur Aggregation und wieder Disaggregation, sodass die Thrombozyten letztlich als „ausgebrannte“ Thrombozyten mit einem sekundären Speicherpooldefekt mit einer geringeren Reaktionsfähigkeit in *ex vivo* Analysen auffallen würden.

Im Gegensatz zu P9 (*JAK2V617F* –HU [+Anagrelid], ohne ASS) zeigten die Thrombozyten von **P4** (*JAK2V617F* +HU, ohne ASS) mit HU-Einfluss eine viel höhere Reaktivität (max. Aggregation 87 %) als die „Kontrollen ohne ASS“. Der Unterschied zwischen den Aggregationsergebnissen der Patienten P4 und P9 dürfte erwartungsgemäß nicht so groß sein, da beide unter einer zytoreduktiven Therapie standen. Das zytoreduktive Medikament HU müsste im Falle von P4 die Thrombozytenzahl und damit theoretisch auch insgesamt die Reaktivität, also die Aggregationsergebnisse der ET-Patienten senken. Bisher existieren nur ambivalente Ergebnisse bezüglich der direkten Wirkung von HU auf die Thrombozytenfunktion (11). Zum Beispiel haben N. Maugeri *et al.* 2006 herausgefunden, dass HU zu einer Inhibierung der CD62P-vermittelten thrombozytären Aggregatbildung *in vitro* führe und auf Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregate wirke (155). Im Gegensatz dazu konnten beispielsweise Falanga *et al.* 2000 oder Coucelo *et al.* 2014 keinen Unterschied der thrombozytären Aktivierung bei mit HU therapierten Patienten im Vergleich zu Patienten ohne HU-Therapie feststellen (110, 156). Möglicherweise gehört P4 aber auch zu den bereits in vorangegangenen Studien identifizierten etwa 40% der MPN-Patienten mit einer erhöhten TXA<sub>2</sub>-Generierung in Korrelation mit einem Lipoxxygenasemangel, welche eine erhöhte Reaktivität auf Aa erklären könnte (110, 157).

Bei Betrachtung des Aggregationsverhaltens der Patienten mit ASS-Therapie (n=11) nach Gabe der Arachidonsäure dürften faktisch alle Patienten und Kontrollprobanden unter ASS-Einfluss keinerlei Reaktion zeigen, da durch die ASS-Einnahme der thrombozytäre TXA<sub>2</sub>-Signalweg gehemmt wird. Zwei Patienten (P7: *JAK2V617F*, P12: *CALR*) wiesen dennoch eine Aggregationsneigung auf, die der Ergebnisse der „Kontrollen ohne ASS“ entsprachen, sodass in diesen Fällen entweder gar kein ASS eingenommen (fragliche Compliance) oder ASS zu gering dosiert wurde bzw. eine ASS-Resistenz vorliegen könnte. Anetta Undas *et al.* sprechen in ihrem Review von einer ASS-Resistenz, wenn entweder eine unzureichende Hemmung der Thromboxan-Synthese vorliege oder Thromboxan-unabhängige Thrombozytenstimulatoren vorhanden seien (147). Bianca Rocca *et al.* (158) wiesen auch darauf hin, dass sich bei dem erhöhten Thrombozytenumsatz in ET-Patienten eine Verkürzung

## DISKUSSION

des ASS-Gabe-Intervalls auf 12 Stunden rechtfertigen ließe, um einen größeren Anteil der beschleunigt gebildeten Thrombozyten erfassen und hemmen zu können.

Die Thrombozyten aller anderen Patienten unter ASS-Therapie zeigten erwartungsgemäß keine Aggregation auf die Gabe von Aa. Der TXA<sub>2</sub>-Signalweg entfiel hier demnach mit seinem Feedback-Mechanismus in der Verstärkung der Thrombozytenaktivierung (60, 159), sodass die Thrombozytenfunktion aller Patienten unter ASS-Therapie in den folgenden Versuchen dadurch zusätzlich eingeschränkt und die Ergebnisse durch ASS-Einfluss als zumindest abgeschwächt zu interpretieren sind.

### 5.2.1.2 Gestörte Kollagen-induzierte Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET im 1. FU

Die Thrombozyten-Aggregation wurde mit zwei verschiedenen Kollagenkonzentrationen getestet, 2 µg/ml und 10 µg/ml. Zusammenfassend wurde eine stark verminderte Thrombozyten-Aggregation der ET-Patienten mit 2 µg/ml Kollagen beobachtet. Jedoch haben hier die Thrombozyten der „Kontrollen mit ASS“ eine ähnlich niedrige Aggregation gezeigt wie die der Patientengruppen, die im Median bei nahe 0 % Aggregation lagen. Die „Kontrollen ohne ASS“ erreichten im Median zwar deutlich höhere Werte von 40 %, erreichten dennoch nicht den erwarteten Cut-Off-Wert von 60 % (siehe 4.2.1.1). **Erst bei der höheren Kollagenkonzentration von 10 µg/ml präsentierten ausnahmslos alle Patienten- und Kontrollgruppen höhere Aggregationswerte, wobei** nur die beiden Kontrollgruppen im Median deutlich den Cut-Off-Wert überstiegen und hingegen **die Patiententhrombozyten vergleichsweise eine geringere Aggregation zeigten** mit nur einer maximalen Aggregationsleistung im Median zwischen 36 % und 50,5 %. Beim Vergleich der Kontrollen untereinander zeigten die Thrombozyten der „Kontrollen mit ASS“ eine statistisch auffällig geringere max. Aggregation als die der „Kontrollen ohne ASS“. Die Ergebnisse lassen folgende Erkenntnisse zu:

1.) Es ist bekannt, dass der Agonist ADP, der aus den δ-Granula aktivierter Thrombozyten freigesetzt wird, eine wichtige Rolle als Feedback-Agonist bei der Kollagen-induzierten Thrombozytenaktivierung spielt. Eine Erklärung von Dawood *et al.* hierfür wäre beispielsweise der bei ET-Patienten häufig vorkommende „**δ-Speicherpool-Mangel**“ (delta storage pool deficiency, δ-SPD) (128). Dadurch kann der wichtige Feedback-Mechanismus der normalerweise sezernierten Granulainhalte, v.a. ADP, für die Aggregationsleistungen wegfallen. Auch A. Aliotta *et al.* beschrieben eine im Zusammenhang mit einem δ-SPD beeinträchtigte Aggregation auf niedrig dosiertes Kollagen (160).

2.) Da der überwiegende Anteil der Patienten unter ASS-Therapie stand und die Thrombozyten der „Kontrollen mit ASS“ patientenähnlich gering auf niedrige Kollagenkonzentrationen reagierten bzw. bei hohen Kollagenkonzentrationen eine geringere Aggregation zeigten als die „Kontrollen ohne ASS“, liegt die Vermutung nahe, **dass die**

**ASS-Therapie und die damit verbundene Hemmung des TXA2-Signalweges auch die Wirkung des Kollagensignalweges mit abzuschwächen scheint.** Beispielsweise wies Larry D Brace 2007 darauf hin, dass TXA2 für die *in vitro* Aggregation und Sekretion zumindest als Reaktion auf die Gabe von u.a. niedrig dosiertem Kollagen (1 µg/ml) erforderlich sei (150). Die Reaktionen auf hoch dosiertes Kollagen (5 µg/ml) bei mit ASS therapierten Patienten blieben laut Larry D Brace unbeeinflusst. Ähnliche Erkenntnisse konnten Ban B. Dawood *et al.* (128) in ihrer 5-jährigen Studie zur Detektion erblicher Thrombozytenfunktionsstörungen mithilfe verschiedener Thrombozytenagonisten und der Lumi-Aggregometrie erlangen. Auch ihre Ergebnisse sagten aus, dass bei einem TXA2-Signalwegsdefekt (wie er u.a. durch eine ASS-Therapie pharmakologisch erzeugt wird) andere Agonisten in niedriger Dosierung nur eine reduzierte Aggregation und ATP-Sekretion auslösen konnten. Diese Ergebnisse sprechen für die positive Feedback-Rolle von TXA2 (128). Außerdem schreiben Brian Estevez *et al.* in ihrem Review, dass Kollagen normalerweise die Freisetzung von TXA2 bzw. ADP induziert (159). Kollagen bedingt also die Freisetzung sekundärer Agonisten, die dann die Kollagen-induzierte Aktivierung verstärken und vervollständigen. Wenn die TXA2-Bildung durch die ASS-Therapie also wegfällt, ist die Gesamtreaktion der betroffenen Thrombozyten auf Kollagen konsekutiv verringert.

3.) Um auch die Thrombinrezeptor (PAR-1)-vermittelte Aggregation zu untersuchen, wurde das PAR-1 aktivierende Peptid TRAP-6 eingesetzt. Beim Vergleich der Aggregationsergebnisse nach Gabe der niedrig dosierten Agonisten TRAP-6 und Kollagen, fiel nur eine dezent höhere thrombozytäre Aggregationsfähigkeit nach Gabe von 10 µM TRAP-6 im Vergleich zu 2 µg/ml Kollagen auf. Demgegenüber reproduzierte die Mehrheit der Patienten nach Gabe von 50 µM TRAP-6 auffällig höhere Aggregationsmedianwerte, die sogar den Cut-Off-Wert von 60 % erreichten (jedoch nicht die Kontrollmedianwerte), als nach Gabe von 10 µg/ml Kollagen. Bei niedrigeren TRAP-6 Konzentrationen scheint der Einfluss von ADP und TXA2 demnach größer zu sein, als bei hohen TRAP-6 Konzentrationen. **Prinzipiell scheint der PAR-1 Signalweg, im Gegensatz zum Kollagen-Signalweg, aber nicht beeinträchtigt zu sein. Daher scheint vielmehr die PAR-1-vermittelte Thrombozytenaktivierung relevant für einen möglichen hyperaktiven Thrombozyten-Phänotyp bei der ET zu sein.**

**In bisherigen Studien wurde eine Hyporeaktion von ET-Thrombozyten auch auf hoch dosiertes Kollagen noch nicht beschrieben.** Nur im Zusammenhang anderer MPNs oder MDSs wurde eine gestörte Aggregation auf hoch dosiertes Kollagen beschrieben. Beispielsweise detektierten Sylvia Bellucci *et al.* bei einem MDS- sowie CLL-Patienten eine beeinträchtigte Kollagen-induzierte Thrombozytenaktivität, welche im Zusammenhang mit einem Defekt im GPVI-Kollagenrezeptor gekoppelten Signalweg stand (161). Es könnten demnach auch bei der ET mögliche Kollagensignalwege defekt sein; primär der GP-VI-vermittelte Weg oder aber die Rezeptoren GP-VI bzw. Integrin α2β1 könnten vermindert

## DISKUSSION

auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert sein. Dies wurde in einem anderen Forschungsprojekt in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jurk mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Ein für den gestörten Kollagensignalweg ursächlichen GPVI-Defekt bei ET-Thrombozyten konnte in meiner Arbeit mit meinen Methoden nicht bestätigt werden. Zwar zeigten sich die Kollagen-induzierten Aggregations- und ATP-Sekretionsleistungen der meisten ET-Patienten als beeinträchtigt, jedoch waren die Thrombingenerierungs-Reaktionen in den CAT-Messungen auf den Agonisten Convulxin, welcher ausschließlich den GPVI-Rezeptor (161, 162) stimuliert, größtenteils nicht entsprechend auffällig.

Eine Besonderheit zeigte der Patient **P4** (*JAK2V617F* Mutation, ohne ASS-Therapie), bei dessen Thrombozyten die niedrige Kollagenkonzentration sogar unverhältnismäßig hohe Aggregationswerte von 78 % provozierte (die Ergebnisse nach Gabe von 10 µg/ml waren allerdings fast identisch). Das ist sogar mehr als die „Kontrollen ohne ASS“ im Median erreichten (35 %) und könnte für einen reaktiveren Zustand von Thrombozyten bei der ET sprechen.

Die Kontrollthrombozyten zeigten auf die niedrige TRAP-6-Konzentration eine ähnliche Reaktion wie auf die niedrige Kollagenkonzentration. Vergleichbar verhielt es sich mit den jeweils höheren Konzentrationen. Die Thrombozyten der „Kontrollen mit ASS“ zeigten in beiden Fällen im Median wieder eine dezent geringere Aggregationsleistung als die der „Kontrollen ohne ASS“. Diese geringere Aggregationsleistung der Kontrollthrombozyten unter ASS-Therapie bestätigten schon Lit-Fui Lau *et al.* (95) in ihrem Paper von 1994. Es besagt, dass TRAP-6 als synthetisches Peptid in Abwesenheit von sekundären Mediatoren wie TXA2 (durch den hemmenden ASS-Einfluss) keine vollständige Aggregation auslösen könne.

### **5.2.1.3 Gestörte thrombozytäre ATP-Freisetzung von Patienten mit ET im 1. FU**

Beim Vergleich der Kontrollgruppen untereinander fiel eine einheitliche Tendenz auf. Ob nach Zugabe von hochdosiertem Kollagen (10 µg/ml) oder TRAP-6 (50 µM), die Thrombozyten der „Kontrollen mit ASS“ zeigten im Median eine geringere Reaktion (wie auch in den Ergebnissen der maximalen Aggregation) bzw. setzten kleinere Mengen an ATP frei als die der „Kontrollen ohne ASS“. Dies spricht abermals für eine ASS-Sensitivität des Kollagensignalweges und auch des PAR1-Signalweges, der durch TRAP-6 initiiert wird. Selbst die hohe Kollagendosis von 10 µg/ml kann die durch ASS beeinflussten Thrombozyten nicht mehr vollständig aktivieren und zur adäquaten Granula- bzw. ATP-Freisetzung führen. Dies spricht für eine Kopplung bzw. einen Feedback-Mechanismus von TXA2 (dessen Bildung durch ASS gehemmt wird) und dem thrombozytären Kollagensignalweg, was letztlich die Granula-Freisetzung auslöst.

## DISKUSSION

Die insgesamt gering ausfallenden Reaktionen der Thrombozyten der „Kontrollen mit ASS“ auf TRAP-6 decken sich, wie bereits oben erwähnt, mit den Erkenntnissen von Lit-Fui Lau *et al.* (95). Sie besagen, dass in Abwesenheit von sekundären thrombozytären Mediatoren – wie in diesem Fall TXA<sub>2</sub> (pharmakologische Reduktion durch die ASS-Therapie) – TRAP-6 keine vollständige Aktivierung und Signaltransduktion auslösen könne. Demnach fielen in unseren Versuchen die ATP-Freisetzung (hier statistisch signifikant auffällig,  $p = 0,0409$ , Unpaired T-test) wie auch die Aggregation nach TRAP-6-Gabe bei den „Kontrollen mit ASS“ im Median tendenziell geringer aus als bei den „Kontrollen ohne ASS“.

Bei Betrachtung der ATP-Freisetzung von Patiententhrombozyten nach Zugabe einer hohen Kollagendosis (10 µg/ml) und TRAP-6-Dosis (50 µM) setzten die *JAK2V617F*-Patienten +/- HU statistisch nennenswert niedrigere ATP-Mengen frei (genauso wie die „Kontrollen mit ASS“) als die „Kontrollen ohne ASS“. Die *CALR*-Patienten +/- HU zeigten tendenziell ähnliche Ergebnisse wie die *JAK2V617F*-positiven Patienten, wenn nicht sogar tendenziell leicht niedrigere Werte.

Höher konzentriertes TRAP-6 (50 µM) erzeugte jedoch in allen Gruppen eine durchschnittlich höhere ATP-Freisetzung als hoch konzentriertes Kollagen (10 µM). Alle Patientengruppen zusammengenommen haben durchschnittlich (bei Vernachlässigung der zwei Ausreißer P4 und P7 in den *JAK2V617F*-Gruppen nach 10 µg/ml Kollagengabe) nach Gabe von 50 µM TRAP-6 eine mehr als doppelt so große Menge an ATP im Median freigesetzt als nach 10 µg/ml Kollagen. Auch das spricht dafür, dass bei ET-Patienten die PAR-1-vermittelte Thrombozytenaktivierung relevanter für den hyperaktiven Thrombozyten-Phänotyp bei der ET zu sein scheint **und hochkonzentriertes Kollagen sich nicht als Agonist zur Ermittlung der thrombozytären ADP-Sekretion eignet (weil hierbei keine ausreichende Aggregation von >60 % erzielt werden konnte).**

Durch die gleichzeitige Bestimmung der Aggregation und der ATP-Freisetzung nach Zugabe des in unseren Versuchsergebnissen potentesten Agonisten TRAP-6, (welcher in hoher Konzentration auch respektable, beinahe kontrollähnliche Aggregationen bei den ET-Thrombozyten auslöste), konnten Rückschlüsse auf einen möglichen  $\delta$ -SPD gezogen werden. In unseren Ergebnissen setzten alle Patientengruppen im Median tendenziell geringere ATP-Mengen frei im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Hierbei setzten sogar die *JAK2V617F*-positiven Patiententhrombozyten (+/- HU) statistisch auffällig niedrigere ATP-Mengen frei als die Thrombozyten der „Kontrollen ohne ASS“, jedoch nicht als die der „Kontrollen mit ASS“, die aufgrund der übereinstimmenden ASS-Medikation die passendere Vergleichsgruppe wäre. Hierdurch kann zwar kein direkter Schluss auf einen  $\delta$ -SPD gezogen werden, die Tendenzen weisen jedoch durchaus auf einen möglichen **thrombozytären  $\delta$ -SPD oder einen generellen Sekretionsdefekt in beiden Mutationsgruppen hin.** Wichtige ergänzende Methoden zur Detektion eines quantitativen  $\delta$ -Granula-Mangels wäre

## DISKUSSION

beispielsweise die Evaluierung mittels Whole Mount Elektronenmikroskopie (Goldstandard) und zur Detektion qualitativer Defekte (also eines Mangels an Inhaltsstoffen (ATP/ADP, Serotonin) der  $\delta$ -Granula) ein durchflusszytometrischer Assay unter Verwendung von Mepacrine. Diese beiden Methoden wurden von Frau Dr. med. [REDACTED] in der AG Jurk mit dem gleichen Patientenkollektiv durchgeführt. Zur Bewertung eines möglichen quantitativen GPVI-Rezeptordefektes untersuchte hingegen parallel Frau Anna Walther die Thrombozytenoberflächenexpression des GPVI-Rezeptors unserer gemeinsamen ET-Patienten im 1. FU.

### **5.2.1.4 Auffälligkeiten im thrombozytären Aggregations- und ATP-Freisetzungsverhalten von ET-Patienten im Verlauf vom EE zum 1. FU**

Im einjährigen Verlauf der ET-Krankheit unserer Patienten von der Erstuntersuchung zum 1. FU konnten zwar die Thrombozytenkonzentrationen bei der Mehrheit der Patienten (mit und ohne Therapiewechsel/klinischer Veränderung) nach einem Jahr in den Kontrollbereich gesenkt werden, **jedoch konnten keine deutlichen Veränderungen in der thrombozytären Aggregation und ATP-Freisetzung nach einem Jahr im Vergleich zum EE beobachtet werden. Die Ergebnisse lagen jeweils im 1. FU agonistenunabhängig weiterhin größtenteils unterhalb der Kontrollreferenzen.** Dies würde zum einen das Modell (Jan J. Michiels *et al.*(154)) der *in vitro* „ausgebrannten“ Thrombozyten nach *in vivo* Voraktivierung bei ET-Patienten unterstützen oder zum anderen die Hypothese bestätigen, dass viele ET-Patienten einen thrombozytären  $\delta$ -SPD vorweisen.

Grundsätzlich zeigten die Thrombozyten der Patienten, die in der Zeit **keine klinische oder therapeutische Veränderung** hatten, in ihrer Fähigkeit zur Aggregation und ATP-Sekretion im 1. FU nach Zugabe einer hohen Kollagenkonzentration (10  $\mu$ g/ml) mehrheitlich sinkende Tendenzen, nach Zugabe einer hohen TRAP-6-Konzentration (50  $\mu$ M) hingegen größtenteils steigende Tendenzen. Wobei auch hier manche Patienten zwar eine erhöhte Aggregation verzeichnen konnten, dafür aber weniger ATP sezernierten und umgekehrt. In beiden Versuchen lagen die Ergebnisse der Patienten im 1. FU trotz einjähriger gleichbleibender Therapie weiterhin persistierend mehrheitlich unterhalb der Kontrollreferenzen, wobei es für *JAK2V617F*-positive Patienten keinen statistisch auffälligen Unterschied mehr nach Stimulation mit hoher TRAP-6 Konzentration im Vergleich zu den Kontrollgruppen gab.

**P4** (*JAK2V617F*, kein ASS) war der einzige Patient, dessen Thrombozyten nach Gabe der hochdosierten Agonistenkonzentrationen recht konsequent im EE (meistens) und im 1. FU (immer) kontrollähnliche Ergebnisse in der Aggregation sowie ATP-Freisetzung erzielen konnten und damit größtenteils auch höhere Thrombozyten-Reaktivitäten als die meisten anderen Patienten zeigte. Die klinischen Parameter des P4 spiegelten im Großen und Ganzen

## DISKUSSION

jedoch nicht diese kontrollähnliche, größtenteils sogar erhöhte Thrombozytenaktivität bei der primären Hämostase wider. Der Patient zeigte nämlich weder anamnestisch Thrombosen oder MZS, noch eine erhöhte Thrombozytenkonzentration im EE oder 1. FU. Stattdessen zeigten sich vielmehr Besonderheiten in Parametern, die für eine erhöhte Blutungsneigung sprechen müssten, wie ein anamnestisches Blutungsereignis (Divertikelblutung 2006), eine verminderte Erythrozytenkonzentration sowie ein zu niedriger Hämatokritwert (34,7 %, einziger *JAK2V617F*-positiver Patient mit zu niedrigem Hkt-Wert) im 1. FU. P4 war allerdings einer der wenigen Patienten, der neben der HU-Therapie im EE und 1. FU, kein ASS einnahm. Dies würde in geringem Maße durchaus die höhere thrombozytäre Aggregations- und ATP-Sekretionsleistung erklären, jedoch nicht, dass diese teils sogar höher als die der „Kontrollen ohne ASS“ (Median) war. Zudem lässt sich hier die Vermutung einer Remission unter HU-Therapie aufstellen, deren Auftreten bereits von Ricksten *et al.* (163) beschrieben wurde. Explizit beschrieb die Arbeitsgruppe eine Senkung der *JAK2*-Allellast unter HU-Therapie. Was dieses Phänomen genau für die Reaktivität der Thrombozyten bzgl. Aggregations- und ATP-Freisetzungsfähigkeit bei ET-Patienten schlussfolgernd bedeuten könnte, wurde nicht beschrieben.

Eine weitere Ausnahme unter den Patienten stellte **P1** dar, der weder nach Kollagen- noch nach TRAP-6-Zugabe eine thrombozytäre ATP-Sekretion im EE und 1. FU zeigte. Seine Thrombozyten aggregierten bei Agonistenzugabe auch nur vermindert (max. Aggregation unter 50 %) mit jeweils sinkender Tendenz im 1. FU. Da hier keinerlei ATP-Sekretion stattfand, liegt die Vermutung eines  $\delta$ -SPD nahe. Normalerweise hätte jedoch wenigstens eine geringe Menge an ATP gemessen werden müssen, da trotz möglichem  $\delta$ -SPD auch ein zytosolischer ATP-Pool vorhanden ist. Schlussfolgernd müssten hier die Ergebnisse reevaluiert werden.

Die vier Patienten, bei denen sich im Ein-Jahres-Follow-up eine **klinische bzw. therapeutische Veränderung** ergab, lagen im 1. FU mit ihren Ergebnissen der thrombozytären Aggregation und ATP-Sekretion nach Kollagen- wie auch TRAP-6-Zugabe ebenso mehrheitlich immer noch unterhalb der Kontrollreferenzen, mit uneinheitlichen sinkenden oder steigenden Tendenzen im Vergleich zum EE.

Eine Ausnahme stellte Patient **P12** dar, der als einziger Patient einen Therapiewechsel von HU auf pegINF $\alpha$  erhielt. Bei ihm stieg die Thrombozytenaggregation im 1. FU nach Zugabe von 10  $\mu$ g/ml Kollagen relativ um etwa 80 % im Vergleich zum Ausgangswert an und erreichte damit das Kontrollreferenzniveau. Auch nach hochdosierter TRAP-6 Zugabe zeigten die Thrombozyten von P12 eine Aggregationssteigerung, jedoch nicht bis in den Referenzbereich. Der Patient nahm von 2006 bis 2017 HU ein, wurde aber bereits 2016 in die Studie aufgenommen. Seine erste Untersuchung für den EE war folglich unter HU Therapie. Die FU Untersuchung erfolgte erst Ende 2017, sodass der Patient bereits ca. 7 Monate vorher seinen Wechsel von HU auf pegINF $\alpha$  hatte. Auch die Thrombozytenkonzentration von P12 fiel zum 1. FU drastisch. **Die Ergebnisse sprechen eindeutig für ein besseres Ansprechen durch**

## DISKUSSION

**den Therapiewechsel, wodurch auch die Thrombozytenfunktion augenscheinlich verbessert wurde.**

Da unsere Patientin **P10** neben dem Wechsel der Therapie von HU auf Anagrelid im Laufe des 1. FU-Jahres noch ein invasives Mamma-Karzinom entwickelte – das mit Aromatasehemmern (Letrozol) adjuvant behandelt wurde – wären Veränderungen im Hämostase-System vom EE zum 1. FU wahrscheinlich. Karzinome (und eine Antihormontherapie wie Letrozol (164)) bergen ein erhöhtes Thromboserisiko. Denn bei gut 15 % der onkologischen Patienten liegen hämostatische Abnormalitäten und bei fast 100 % eine subklinische Gerinnungsaktivierung vor (165-167). Auffällig war bei P10 nach Gabe von 50 µM TRAP-6 die deutliche Verminderung der Aggregationsfähigkeit im 1. FU von 77 % auf 37 % sowie die hingegen deutliche Steigerung der ATP-Freisetzung im 1. FU um über das Doppelte, wobei die Ergebnisse weiterhin deutlich unterhalb der Kontrollreferenzen lagen. Trotz einer Karzinomentwicklung liegt demnach bei P10 keine Entwicklungstendenz der Thrombozyten zur prothrombotischen Funktion vor.

Die Thrombozyten der Patienten mit einem **Krankheitsprozess zur Post-ET-Myelofibrose** (**P9**: *JAK2V617F*; **P13**: *CALR*) zeigten in der Aggregation nach TRAP-6 Zugabe im 1. FU keine nennenswerte Veränderung zum EE. Ein 2. und 3. FU zur Verlaufsbeobachtung wäre für diese Patienten sinnvoll.

**Zusammenfassend konnte mittels Lumi-Aggregometrie ein tendenziell überwiegend persistierend hypofunktionelles Thrombozytenprofil bei unseren ET-Patienten ein Jahr nach dem EE festgestellt werden.** Innerhalb diesen Zeitraums traten hierdurch jedoch keine vermehrten Blutungsdiathesen auf.

## 5.2.2 Dysfunktionen in der Thrombingerierung von Patienten mit ET

Die Erkrankung ET geht häufig mit einer gestörten Gerinnung einher, die sich in thrombotischen oder hämorrhagischen Komplikationen äußern kann (1). Dafür sind verschiedene und noch besser zu erforschende Funktionsstörungen der Thrombozyten verantwortlich. Aber auch andere Blutzellen scheinen bei der ET in ihrer Funktion verändert zu sein, u.a. die Monozyten, die die Hauptquelle des intravaskulären Gewebefaktors (tissue factor, TF) (67, 108) darstellen und damit entscheidend an der Thrombingerierung als Teil der Hämostase beteiligt sind.

Thrombin steht als Gerinnungsenzym im Mittelpunkt des aktuell gültigen Hämostasemodells von Dougald M. Monroe und Maureane Hoffman: das Modell der zellbasierten Thrombingerierung (64). Die quantitative Bestimmung der Thrombingerierung in der ET hat in den letzten Jahren an Bedeutung zugenommen. Sie etablierte sich laut Romeo-Gabriel Mihaila als ein geeigneter Biomarker zur Thromboserisiko-Ermittlung in philadelphia-negativen MPN, da sie die Balance zwischen pro- und antikoagulant Faktoren besser als die herkömmlichen Risikofaktoren (z.B. Alter >60 Jahre, *JAK2V617F* Mutation, Thromboseanamnese, Leukozytose, kardiovaskuläre Risikofaktoren) repräsentiere (133). Für angeborene oder erworbene Neigungen zu venösen Thrombosen oder Blutungen gilt: Je höher die Thrombinbildung, desto größer ist das Thromboserisiko und je geringer die Thrombinbildung, desto größer ist das Blutungsrisiko, aber desto kleiner auch das Thromboserisiko. Für arterielle Thrombosen sind diese Gesetzmäßigkeiten weniger eindeutig (168).

Da die klinische Bedeutung des thrombozytären Thrombingerierungspotentials bei ET-Patienten bisher unzureichend bekannt ist, wurde im Rahmen dieser Dissertation die *in vitro* Thrombingerierung (anhand verschiedener Parameter) von ET-Patienten mit einer *JAK2V617F*- oder einer *CALR*-Mutation im 1. FU analysiert und vergleichend gesunden Kontrollprobanden gegenübergestellt.

Mithilfe der CAT wurde die plasmatisch induzierte (mit PFP) sowie die Thrombozyten- und Monozyten-induzierte Thrombingerierung bestimmt. Die CAT kann anhand verschiedener Parameter einen sehr guten Überblick über die Thrombingerierungskapazität des untersuchten Blutes geben. Für die Messungen verwendeten wir zum einen PFP und PRP, zum anderen isolierte Thrombozyten sowie extrahierte MNC jeweils resuspendiert in autologem PFP und gepooltem PFP von gesunden Kontrollen. Die Messungen in PFP dienten der Aufdeckung von Störungen plasmatischer Gerinnungsfaktoren und könnten zudem den Einfluss antikoagulierender Medikamente aufdecken. Die Messungen in PRP sollten die nahezu physiologische Thrombozyten-abhängige Thrombingerierung darstellen. Mit der gesonderten Messung der Thrombingerierung isolierter Thrombozyten zielte man darauf ab,

## DISKUSSION

den Einfluss des Patientenplasmas (durch den Vergleich in Kontrollplasma) auf die Thrombingenerierung der ET-Patienten zu evaluieren. Zusätzlich wurde die Thrombingenerierung extrahierter MNC gemessen, um eine der wichtigsten TF-präsentierenden Zellen (sprich die Monozyten) im Geschehen der gesamten Koagulation zu untersuchen und deren möglicherweise gestörte Funktion bei ET-Patienten zu evaluieren. Als Gerinnungstrigger wurden TF, Thrombin und Convulxin verwendet. TF ist physiologisch der entscheidende Faktor, der den Gerinnungsprozess initiiert (17). Thrombin wirkt mit seinem Feedbackmechanismus potenzierend auf seine eigene Produktion und die Hämostase (57, 76). Es aktiviert den Faktor V, VIII, XI und Protein C (134, 169) und zeigt damit pro- und antikoagulante Funktionen, die insgesamt der Regulierung der Gerinnungskaskaden dienen (170, 171). Convulxin bindet mit hoher Affinität in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  an den thrombozytären GPVI-Kollagenrezeptor, woraufhin es zur Thrombozyten-Aggregation kommt (98). Außerdem wurde eine Messung ohne Zugabe von Gerinnungstriggern durchgeführt, um einen Eindruck von der basalen Thrombingenerierung in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in hoher Konzentration erhalten zu können.

Die Thrombingenerierungskapazität konnten wir mithilfe der CAT anhand von verschiedenen Parametern evaluieren:

„Lag time“: Die Verzögerungszeit bis zum Beginn der Thrombingenerierung in Minuten. Initiierungsphase der Blutgerinnung (172)

„Time to peak“: Die Zeit bis zum Erreichen des Thrombinpeaks in Minuten

„Thrombin peak“: Die im Verlauf der Messung maximal gemessene Thrombinkonzentration in nM

ETP: Endogenes Thrombinpotential. Die generierte Thrombinkonzentration über den gesamten gemessenen Zeitraum in nM x min

Hierbei gilt der Parameter „Thrombin peak“ als am sensitivsten und das ETP am stabilsten gegenüber Schwankungen der Thrombingenerierung (168). Die „Lag time“ ist im Prinzip mit der Blutungszeit gleichzusetzen und entspricht der Verzögerungszeit bis zum Beginn des „Thrombin bursts“, bei dem direkt schon zu Beginn des Anstiegs der Kurve ein Blutgerinnsel entsteht (168). Die „Lag time“ spiegelt allerdings demnach nicht den wichtigsten Part der Gerinnung wider, denn der größte Teil des Thrombins entsteht erst danach und Thrombin hat weitaus mehr Funktionen als nur die Fibrinbildung (168). Mithilfe der „Lag time“ können gut Rückschlüsse auf eine mögliche Voraktivierung der Thrombozyten gezogen werden. Viele Studien weisen darauf hin, dass Thrombozyten im Blut von MPN-Patienten (insbesondere von *JAK2V617F*-positiven Patienten) in einem aktivierten und demnach prokoagulantem Zustand zirkulieren (80). Mittels der hier genutzten Methoden können jedoch nur Ableitungen, aber

## DISKUSSION

keine spezifischen Aussagen über einen prokoagulanten Zustand der Thrombozyten gezogen werden. Als Mitglied unserer Arbeitsgruppe (AG Jurk, CTH Mainz) hat Frau Anna Walther hierzu umfassendere Untersuchungen mittels FACS durchgeführt, um den Aktivitätszustand der Thrombozyten anhand der auf ihrer Oberfläche exprimierten negativ-geladenen Phospholipid-Komplexe zu evaluieren.

### 5.2.2.1 Die plasmatische Thrombingenerierung der ET-Patienten

Da PPP nicht komplett frei von Thrombozyten ist, wurde PFP eingesetzt, um unterschiedliche Einflüsse von prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Faktoren auf die plasmatische Thrombingenerierung *in vitro* von Patienten und Kontrollen besser beurteilen zu können. Da die Messungen im PPP erfahrungsgemäß gut geeignet sind, um Störungen von Gerinnungsfaktoren (außer Faktor XIII) und die Wirkung von Antikoagulantien aufzudecken (129), erhofften wir uns bei Verwendung von PFP statt PPP eine insgesamt noch bessere Bewertbarkeit diesbezüglich.

Thrombotische Komplikationen in der ET sind teilweise den Funktionsstörungen von natürlichen Antikoagulantien geschuldet (173). In Studien wie beispielsweise der von Katarzyna Ziolkowska *et al.* (173) zeichnete sich in ET-Patienten ein quantitativer Mangel an Protein C (v.a. bei *JAK2V617F*-positiven ET-Patienten) und Protein S ab, welcher zu einer Koagulopathie mit Thrombophilie führt. Außerdem trat ein Überschuss an „Tissue Factor Pathway Inhibitor“ (TFPI) auf, was auf einen möglichen Kompensationsmechanismus der (durch TF ausgelösten) prothrombotischen Aktivität in ET-Patienten hinweisen könnte (173). Widersprüchlich hierzu sind die Ergebnisse von Marchetti *et al.* von 2008, welche hingegen ein reduziertes Aufkommen von TFPI vor allem in *JAK2V617F*-positiven ET-Patienten nachwiesen (174).

#### 5.2.2.1.1 KONTROLLÄHNLICHE THROMBINGENERIERUNG IM PLÄTTCHEN-FREIEN PLASMA DER ET-PATIENTEN IM 1. FU

Nach Zugabe von PPP-Reagenz (5 pM TF und 4 µM Phospholipiden) wurden die Thrombingenerierungswerte in PFP der verschiedenen Patienten- und Kontrollgruppen gemessen. **Es wurden keine statistisch nennenswerten Unterschiede in den Median-Werten für "Lag time" und "Time to peak" zwischen den Patienten- und Kontrollgruppen festgestellt.** Die *JAK2V617F*-positiven Patienten hatten ähnliche Werte wie die Kontrollgruppen, während die *CALR*-positiven Patienten tendenziell etwas längere Zeiten benötigten als die *JAK2V617F*-mutierten Gruppen und die Kontrollgruppen mit und ohne ASS in PFP.

**Ebenfalls wurden keine statistisch nennenswerten Unterschiede in den Median-Werten für „Thrombin Peak“ und ETP zwischen Patienten- und Kontrollgruppen festgestellt.**

## DISKUSSION

Von den *JAK2V617F*-positiven Patienten verhielten sich diejenigen ohne eine HU-Therapie kontrollähnlich, wohingegen die mit einer HU Therapie tendenziell (nicht statistisch auffällig) höhere Werte für beide Parameter zeigten. **Man könnte vermuten, dass die HU-Therapie die plasmatische Thrombingenerierung bei *JAK2V617F*-Patienten tendenziell erhöhen kann.** Marina Marchetti *et al.* (172) fassten jedoch auch zusammen, dass die HU-Therapie sich nicht signifikant auf den „Thrombin peak“ und das ETP der plasmatischen TG bei ET-Patienten auswirken würde. Die *CALR*-positiven Gruppen wiesen eine entgegengesetzte Tendenz in den zwei Parametern „Thrombin peak“ und ETP auf. Erreichte das Plasma des „*CALR* +HU“ (P11) Patienten zwar einen geringeren, aber kontrollähnlichen (genauso wie die „*JAK2V617F* –HU“ Gruppe), „Thrombin peak“ als die „*CALR* –HU“ Gruppe (wiesen vergleichbare Werte wie „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe auf), so konnte es trotzdem ein tendenziell höheres ETP als die „*CALR* –HU“ Gruppe (wie die „*JAK2V617F* –HU“ Gruppe mit kontrollähnlichem ETP) erzielen.

Insgesamt fiel beim Ergebnisvergleich der plasmatischen TG-Kurve der „Kontrollen mit“ und „ohne ASS“ in den vier Parametern kaum ein Unterschied auf. ASS inhibiert das Enzym COX1 der Thrombozyten. Diese sind im PFP aber nicht vorhanden, weshalb es hier keinen therapeutischen Effekt von ASS im PFP geben kann. Auch die Patientengruppen haben zusammenfassend keinen statistisch nennenswerten Unterschied in ihrer plasmatischen TG im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen gezeigt. Weder Mutationstyp noch die ASS-Therapie beeinflussten augenscheinlich die TG-Parameter. Man könnte daraus schließen, dass bei den ET-Patienten keine qualitativen oder quantitativen Mängel an löslichen Gerinnungsfaktoren (z.B. Prothrombin und Faktor V) bzw. höhere Konzentration bestimmter Inhibitoren (z.B. TFPI) vorliegen und dass die Komplikationen der ET schlussfolgernd vielmehr auf den zellulären Teil der TG zurückzuführen sind.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von Marina Panova-Noeva *et al.* 2011. Deren und die Methoden dieser Arbeit sind gut vergleichbar, da auch Panova-Noeva *et al.* mittels CAT die TG in PFP – getriggert durch TF (1 pM)- und Phospholipid (4 µM)- Zugabe – gemessen haben. Die Forschergruppe fanden keinen statistisch signifikanten Unterschied in den TG-Parametern „Lag time“ und „Thrombin peak“ zwischen ET-Patienten (unabhängig der HU-Therapie oder des *JAK2V617F*-Mutationsstatus) und gesunden Kontrollen.

Demgegenüber gab es jedoch auch Studien mit gegenteiligen Ergebnissen, wie beispielsweise die von Marina Marchetti *et al.* 2014 (172). Zum einen sagen diese aus, dass das PFP von ET-Patienten eine höhere TG zeige als das der Kontrollen. Dies sei mitunter damit assoziiert, dass bei ET-Patienten im PFP erhöhte Level von FVIIa/Antithrombin-Komplexen (gilt als indirekter Marker für die TF-Exposition und Hemmung *in vivo*), Mikropartikel und Mikropartikel-assoziierten TF-Antigenen vorhanden seien (133, 172). Zum anderen fanden Marina Marchetti *et al.* heraus, dass bei ET-Patienten (v.a. mit

## DISKUSSION

JAK2-Mutation) reduzierte Mengen an Prothrombin, Gerinnungsfaktor V, freies Protein S und TFPI vorliegen würden (174), was konsequenterweise auch zu einer beeinträchtigten plasmatischen TG der ET-Patienten beitragen könnte.

### 5.2.2.2 Die thrombozytäre Thrombingenerierung der ET-Patienten in PRP

#### 5.2.2.2.1 TENDENZIELL VERLÄNGERTE ZEITPARAMETER BEI DER TG VON PATIENTENTHROMBOZYTEN IN PRP IM 1. FU

Bei primärer Ergebnisbetrachtung der Parameter „Lag time“ und „Time to peak“ fielen beim Vergleich der „Kontrollen mit ASS“ und „Kontrollen ohne ASS“ ähnliche Tendenzen auf. Die Thrombozyten der „Kontrollen mit ASS“ zeigten basal sowie nach Agonistengabe insgesamt bei beiden Parametern häufiger längere Zeiten als die „Kontrollen ohne ASS“. Die Ausnahme waren die Ergebnisse **nach Zugabe von Thrombin**. Interessanterweise generierten hier die Thrombozyten der „Kontrollen mit ASS“ eine **kürzere „Lag time“ sowie eine kürzere „Time to peak“ als die „Kontrollen ohne ASS“**, obwohl ihr TXA2-Feedback-Mechanismus durch ASS inhibiert sein müsste. Auf dieses Phänomen wird bei der Evaluation der Parameter „Thrombin peak“ und ETP noch näher eingegangen.

Unter basalen Bedingungen zeigten alle Patientengruppen eine tendenziell verlängerte „Lag time“ und „Time to peak“ gegenüber den Kontrollen. Hierbei waren diese Parameter bei der „JAK2V617F –HU“ Gruppe im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (mit/ohne ASS) schon statistisch auffällig. Patiententhrombozyten, die ohne Triggerzugabe *in vitro* schnell Thrombin generieren, also in einem voraktivierten bzw. prokoagulantem Status vorliegen, kann man hier schlussfolgernd nicht erkennen. Man könnte allerdings besonders bei der „JAK2V617F –HU“ Gruppe wieder die Theorie der „ausgebrannten“ (*in vivo* voraktivierten) Thrombozyten von Jan J. Michiels *et al.* (154) als Erklärung für die geringere TG *in vitro* gegenüber den Kontrollthrombozyten aufstellen.

Obwohl die Agonistenzugaben (TF, Thr, Cvx, Thr+Cvx) bei allen Gruppen die beiden Zeitparameter der TG-Kurven im PRP im Vergleich zur basalen Messung deutlich verkürzten, zeigten die **Patientengruppen immer noch größtenteils tendenziell längere „Lag time“- und „Time to peak“-Werte als die Kontrollgruppen**. Statistisch auffällig war dieser Unterschied zu den Kontrollen wieder bei der „JAK2V617F –HU“ Gruppe nach Convulxin-Gabe sowie teilweise bei der kombinierten Thrombin-Convulxin-Gabe (hier nur statistisch auffällig verlängert gegenüber den „Kontrollen ohne ASS“). Weshalb gerade die Thrombozyten der „JAK2V617F –HU“ Patienten (5 von 6 unter ASS-Therapie) nach Convulxin-Gabe statistisch auffällig verlängerte Zeitparameter als beide Kontrollgruppen und auch tendenziell verlängerte Zeiten gegenüber der „JAK2V617F +HU“ Gruppe zeigten, ist unklar. Laut Marina Marchetti *et al.* müssten hier eher umgekehrt die mit HU behandelten JAK2V617F-Patienten therapiebedingt beeinflusste Zeitparameter zeigen (172). Andererseits

## DISKUSSION

könnte eine Hyporeaktion auf Convulxin den hier im Lumi-Aggregometer-Verfahren evaluierten **Hinweis auf einen Kollagensignalweg- bzw. Kollagenrezeptordefekt bei ET-Patienten untermauern**. Denn auch Convulxin aktiviert die Thrombozyten über den GPVI-Kollagenrezeptor (98). Gianmarco Podda *et al.* (162) beschrieben in ihrem Review, dass eine vollständige Reaktion auf Kollagen, die zu einer Thrombozytenaggregation führe, die Interaktion beider Kollagenrezeptoren GPIa/IIa (Integrin  $\alpha 2\beta 1$ ) und GPVI erfordere.

### 5.2.2.2 AUFFÄLLIGKEITEN BEI DEN PARAMETERN „THROMBIN PEAK“ UND ETP IN PRP

Die „Kontrollen mit ASS“ zeigten im PRP entsprechend der verlängerten „Lag time“ und „Time to Peak“ auch einen niedrigeren „Thrombin peak“ und ein niedrigeres ETP basal sowie nach Agonistengabe (Ausnahme: Thrombingabe) im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“. Hierbei war der „Thrombin peak“ nach Convulxin- wie auch nach kombinierter Convulxin-Thrombin-Gabe bei den „Kontrollen mit ASS“ sogar statistisch auffällig niedriger. Dies weist auf eine **ASS-Sensitivität der Convulxin-induzierten Thrombinamplifizierung** auf der Thrombozytenoberfläche hin. Ähnliche Ergebnisse könnten dann bei der Mehrheit der Patienten erwartet werden, da die meisten auch unter ASS-Therapie standen. Allerdings zeigte lediglich die „JAK2V617F –HU“ Gruppe nach Convulxin-Gabe ein statistisch auffällig geringeres ETP bzw. nach kombinierter Thrombin-Convulxin-Gabe einen statistisch auffällig geringeren „Thrombin peak“ im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“.

**Ausnahmen im Kontrollgruppenvergleich bildeten wieder die Ergebnisse nach Zugabe von Thrombin. Insgesamt zeigten die „Kontrollen mit ASS“ in PRP eine höhere Thrombin-getriggerte thrombozytäre TG als die „Kontrollen ohne ASS“.**

Diese Ergebnisse lassen sich nicht vereinbaren mit den folgend beschriebenen Studienergebnissen: Zum einen beschrieben P.A. Kyrle *et al.* schon 1987, dass ASS schon in niedriger Dosierung (30mg/Tag) nach einwöchiger Einnahme zu einer Senkung der Thrombingenerierung führen würde (147, 175). Außerdem berichteten Raul Altmann *et al.* von einer verlängerten „Lag time“ und „Time to peak“ nach ASS-Einnahme, wohingegen die Parameter „Thrombin peak“ und ETP unbeeinflusst blieben (176, 177). Zum anderen konnten Marina Panova-Noeva *et al.* in ihrer großen Studie 2018 (Teil der Gutenberg-Gesundheitsstudie) keine Assoziation zwischen ASS-Einnahme und der thrombozytären TG feststellen (170). Ein gegenteiliger Effekt von ASS – insbesondere eine Erhöhung der Thrombozytenaggregation nach Gabe von Thrombin – wurde in keiner nach entsprechender Literaturrecherche identifizierten Studien explizit untersucht oder nachgewiesen und bedarf daher weiterer wissenschaftlicher Prüfung. Man kann jedoch die Hypothese aufstellen – welche bereits in der Dissertation von Frau Dr. med. Alexandra Berkes (geb. Walter) (AG Jurk, CTH Mainz) erläutert wurde –, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen den Ergebnissen von Mareike Döhrmann *et al.* (86) und den von Anetta Undas (147)

## DISKUSSION

in ihrem Review zusammengefassten Fakten existieren könnte. Die Erkenntnisse der Forschergruppen sind, dass ASS Proteine acetylieren kann ((147)), u.a. auch Fibrinogen und Fibrin ((178)), die im acetylierten Zustand noch besser an CD36 binden können (147). CD36 wird auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert und ist ein guter Rezeptor besonders für Liganden wie Fibrin und Moleküle mit schadensassoziierten molekularen Mustern (DAMPs) (86). Diese Ligandenkomplexe mit CD36 können nun thrombin-getriggert vermehrt Gerinnungsfaktoren rekrutieren, die auf der Thrombozytenoberfläche Tenase- und Prothrombinasekomplexe bilden, wodurch die Thrombozyten wiederum verstärkt aktiviert werden und Thrombin generieren (86). Da CD36 als ein wichtiger Verstärker der speziell thrombin-induzierten thrombozytären TG fungiert (86), könnte das vermehrte Aufkommen von fehlgefalteten Proteinen oder veränderten Molekülen – z.B. durch ASS-vermittelte Acetylierungen – die CD36-Aktivität erhöhen und damit einen prokoagulanten Zustand auslösen, der zu einer erhöhten TG führen würde. **Somit könnte man bei einer ASS-Therapie möglicherweise eine verstärkte CD36-vermittelte Aktivität feststellen und folglich auf eine erhöhte thrombin-getriggerte TG, wie wir sie bei unseren „Kontrollen mit ASS“ im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“ sehen konnten. Außerdem könnte die Inaktivierung von Antithrombin durch Acetylierung (179) durch ASS möglicherweise auch zu einer erhöhten thrombin-induzierten TG führen (147).**

Ein Gegenargument liefert das Paper von Hua VM *et al.* (180). In diesem wird beschrieben, dass ASS die Thrombozyten für die Blockade von Cyclophilin D sensibilisiert und dadurch den Grad der Hemmung der TG erhöht. Würde man dieser Logik folgen, müssten jedoch die Thrombozyten der Patienten oder Kontrollen unter ASS-Therapie auch Thrombin getriggert eine niedrigere TG zeigen als Patienten und Kontrollen ohne eine ASS-Therapie.

Die Patientengruppen zeigten in den Parametern „Thrombin peak“ und ETP unter basalen Bedingungen sowie nach Agonistengabe pauschal keine so klare Tendenz gegenüber den Kontrollen wie bei den verlängerten Zeitparametern „Lag time“ und „Time to peak“. Beispielsweise waren die ETP-Werte der Patientengruppen nach TF-, Convulxin- und kombinierter Convulxin-Thrombin-Zugabe tendenziell eher ähnlich bzw. oberhalb der der Kontrollen. Basal und nach Thrombin-Zugabe hingegen lagen die ETP-Werte tendenziell größtenteils eher ähnlich bzw. unterhalb der Kontrollen. **Isoliert betrachtet zeigte die „JAK2V617F +HU“ Gruppe im PRP deutlich eine größtenteils tendenziell (teils auch statistisch auffällig) höhere thrombozytäre TG als die Kontrollgruppen.** Statistisch auffällig war hier das TF- sowie Convulxin-Thrombin-induzierte größere ETP der „JAK2V617F +HU“ Gruppe gegenüber den „Kontrollen mit ASS“. Hingegen zeigte die „JAK2V617F –HU“ Gruppe ein statistisch auffällig geringeres TF- sowie Convulxin-induziertes thrombozytäres ETP gegenüber den „Kontrollen ohne ASS“ und ein statistisch geringeres Thrombin-induziertes thrombozytäres ETP gegenüber beiden Kontrollgruppen. **In meinen Ergebnissen im PRP konnte ich im Gegensatz zu Marina Panova-Noeva *et al.* 2011 (181)**

**keine klare Tendenz eines erhöhten TG-Potenzials von ET-Patienten (v.a. der JAK2V617F-mutierten ohne HU) unter basalen Bedingungen oder nach TF-Gabe im Vergleich zu den Kontrollen bestätigen.**

#### 5.2.2.2.3 AUFFÄLLIGKEITEN IN DER THROMBOZYTÄREN TG VON ET-PATIENTEN IM VERLAUF VOM EE ZUM 1. FU

Grundsätzlich zeigten die Thrombozyten der **Patienten, die in der Zeit vom EE zum 1. FU keine klinische oder therapeutische Veränderung hatten, nach diesem einen Jahr ein mehrheitlich höheres TG-Potenzial („Thrombin peak“ und ETP) im Vergleich zum EE.**

Die „Lag time“ zeigte sich insgesamt bei den Patientenplasmen mutations-, therapie- und agonistenunabhängig größtenteils unverändert oder tendenziell kürzer im 1. FU verglichen zum EE und lag dabei überwiegend auf Kontrollebene oder immer noch tendenziell darüber (verlängert). Allein unter basalen Bedingungen bot sich ein entgegengesetztes Bild mit den größten intraindividuellen Unterschieden in der „Lag time“ zwischen EE und 1. FU. Die meisten Patientenplasmen zeigten hier eine insgesamt verlängerte Zeit gegenüber ihren Werten im EE und den Kontrollgruppenwerten.

Die Parameter „Thrombin peak“ und ETP zeigten basal ein eher gemischtes Bild, wobei sich der „Thrombin peak“ der Patientengruppen überwiegend nur gering zum 1. FU veränderte. Die Ausnahme bildete hier das Plasma des Patienten **P4 (JAK2V617F +HU)**, das den größten Anstieg des TG-Potenzials („Thrombin peak“ und ETP) vom EE zum 1. FU unter basalen Bedingungen verzeichnen konnte und dabei im 1. FU oberhalb des Kontrollbereichs lag.

Nach TF-Gabe und v.a. nach Convulxin- und kombinierter Convulxin-Thrombin-Gabe zeigten die **JAK2V617F-Gruppen** therapieunabhängig im 1. FU ein viel höheres TG-Potenzial als im EE. Dabei lagen die Werte der „**JAK2V617F +HU**“ Gruppe meistens teils innerhalb, teils auch oberhalb des Kontrollbereiches und die **JAK2V617F -HU**“ Gruppe insgesamt tendenziell eher etwas niedriger. Die Thrombingabe verursachte bei den **JAK2V617F-positiven** Plasmen im 1. FU keine so großen Veränderungen. Demgegenüber zeigte das PRP des Patienten **P11 (CALR +HU)** nach Thrombingabe im 1. FU ein sehr viel geringeres TG-Potenzial als im EE und bei den anderen Agonisten jedoch meistens ein höheres TG-Potenzial; hierbei gehörte das generierte ETP im 1. FU zu den höchsten im Vergleich zu denen der anderen Patienten und lag oberhalb der beiden Kontrollgruppenwerte. Im Gegensatz dazu zeigten das PRP der Patienten **P3 (JAK2V617F +HU) und P5 (JAK2V617F -HU)** agonistenunabhängig im ETP mehrheitlich sinkende Tendenzen im 1. FU (außer basal). Im Parameter „Thrombin peak“ verzeichneten sie aber tendenziell mehrheitlich eine Steigung basal und nach Agonistengabe (Ausnahme: TF- und Cvx-Gabe). Die Thrombozyten des Patienten **P4 (JAK2V617F +HU)** zeigten mehrheitlich eine steigende Tendenz im generierten „Thrombin peak“ (außer nach Thrombingabe) und ETP basal und auch agonistenunabhängig im 1. FU bis teils weit oberhalb der Kontrollgruppenwerte und sind damit kongruent zu den ebenfalls erhöhten Ergebnissen im

## DISKUSSION

Chronolog. Eine mögliche Remission unter HU bei P4 (*JAK2V617F* +HU) erscheint zunehmend wahrscheinlich.

**Zusammengefasst konnte ich bei allen Patientengruppen ohne klinischer oder therapeutischer Veränderung besonders nach Agonistengabe größtenteils eine Tendenz zur insgesamt erhöhten Thrombozytenfunktion – unabhängig von Mutation, Therapie und Thrombozytenkonzentration – vom EE zum 1.FU beobachten, wobei vor allem die „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe häufig ein noch höheres TG-Potential zeigte als die Kontrollen.**

Vier unserer **Patienten zeigten im Ein-Jahres-FU eine klinische bzw. therapeutische Veränderung**. Dabei hatten alle eine Veränderung in ihrer Therapie, wobei P9 (*JAK2V617F*) und P10 (*JAK2V617F*) von HU auf Anagrelid wechselten, P12 (*CALR*) von HU auf pegyliertes Interferon- $\alpha$  und P13 (*CALR*) hingegen die zytoreduktive Therapie komplett absetzte. P9 (*JAK2V617F*) und P13 (*CALR*) entwickelten zusätzlich zum 1. FU noch eine klinische Veränderung in Form einer Post-ET-Myelofibrose. Obwohl **alle vier Patienten den größten Abfall der Thrombozytenkonzentrationen im Vergleich zu den Patienten ohne klinischer oder therapeutischer Veränderungen erzielten**, spiegelten sich keine vergleichbaren eindeutigen Änderungen in den Thrombozytenfunktionen in PRP im CAT wider. Die Patienten zeigten nämlich unterschiedliche Tendenzen in der Entwicklung der thrombozytären TG vom EE zum 1. FU. Die Thrombozyten von Patient **P12 (*CALR*)** zeigten unter basalen Bedingungen die größten Unterschiede. Die "Lag time" war im 1. FU deutlich verlängert im Vergleich zum EE und zu den Kontrollgruppen. Obwohl die Werte von "Thrombin peak" und ETP im 1. FU kongruent dazu gesunken waren, ähnelten sie den Werten der Kontrollgruppen stark. Die Agonisten-induzierte TG zeigte bei P12 (*CALR*) **größtenteils keine bedeutenden Veränderungen vom EE bis zum 1. FU**. Die Therapieänderung hatte wahrscheinlich bei P12 (*CALR*) keine wesentlichen Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion, da die Werte sowohl im EE als auch im 1. FU relativ nah an den Kontrollreferenzwerten lagen.

Unser zweiter Patient mit einer Therapieänderung, aber keiner klinischen Veränderung, war **P10 (*JAK2V617F*)**. Das PRP von P10 (*JAK2V617F*) zeigte hauptsächlich im generierten ETP größere Unterschiede vom EE zum 1. FU als das des P12 (*CALR*). Das ETP von P10 (*JAK2V617F*) war im EE pathologisch erhöht und zeigte im 1. FU eine klar sinkende Tendenz, sodass die ETP-Werte zwar nach Convulxin- und kombinierter Thrombin-Convulxin-Gabe kontrollähnlich waren, jedoch nach TF- und alleiniger Thrombingabe schon unterhalb der Kontrollen lagen. **Die thrombozyten-abhängige TG bei P10 (*JAK2V617F*) wurde also durch Anagrelid durchaus erfolgreich gesenkt, möglicherweise übermäßig**. Bei der Diskussion der Ergebnisse von P10 (*JAK2V617F*) im Lumi-Aggregometrie-Verfahren (siehe 5.2.1.4) wurde darauf eingegangen, dass die ATP-Sekretion im 1. FU um über das Doppelte gestiegen ist (jedoch unterhalb der Kontrollen

## DISKUSSION

blieb) und dadurch auch die Amplifikationsphase bei der TG-Kurve im 1. FU schlussfolgernd schneller und damit kürzer sein könnte als im EE. Die „Lag time“-Werte von P10 (*JAK2V617F*) haben sich jedoch zum 1. FU nicht verändert. Außerdem stellten wir die Vermutung auf, dass unsere Patientin P10 (*JAK2V617F*) mit einem Mammakarzinom im 1. FU eine erhöhte bzw. veränderte TG zeigen müsste, weil beispielsweise bereits Romeo-Gabriel Mihaila (133) beschrieben hatte, dass Krebspatienten thrombotische Risikofaktoren wie erhöhte Mengen an löslichem TF und Mikropartikeln aufweisen würden und Marina Panova-Noeva (182) eine Thrombozyten-assoziierte Hyperkoagulabilität bei Personen mit aktiver Krebserkrankung mittels TG-Assay nachgewiesen hatten. Vor diesem Hintergrund ließen jedoch nur die ETP-Werte im EE auf einen hyperreaktiven bzw. hyperkoagulanten Charakter der Thrombozyten von P10 (*JAK2V617F*) schließen. Denn im 1. FU spiegelte weder die plasmatische noch die thrombozytäre TG von P10 (*JAK2V617F*) einen hyperkoagulanten Charakter der Thrombozyten wider.

Auffällig war, dass die **Patienten mit einem erfolgten Krankheitsprozess (P9, P13)** innerhalb ihrer Mutationsgruppe spätestens im 1. FU die kleineren TG-Potenziale generierten (im Vergleich zu den Patienten, die nur eine Therapieänderung hatten) und paradoxerweise trotzdem hier eine verbessernde Tendenz hauptsächlich in den Parametern „Thrombin peak“ und ETP (agonistenunabhängig) präsentierten. Hierbei konnte nur P13 (*CALR*) im 1. FU teilweise kontrollähnliche ETPs (nach TF-, Cvx- und Thr+Cvx-Gabe) erzielen. **Möglicherweise lässt sich die verbesserte (sich den Kontrollgruppen annähernde) thrombozyten-abhängige TG allein auf die Therapieänderung und hauptsächlich das Absetzen der HU-Therapie zurückführen, weil eine Myelofibrose hingegen – laut Alvarez-Larran *et al.* – eine Verschlechterung der Thrombozytenfunktion mit sich bringen müsste.** Generell zeigte P9 (*JAK2V617F*) trotz leichter Erhöhung des thrombozytären TG-Potenzials im 1. FU nach Agonistengabe das geringste thrombozytäre TG-Potenzial (agonistenunabhängig) im Vergleich zu allen anderen ET-Patienten (wie bereits oben erwähnt) und auch P13 (*CALR*) generierte im EE und 1. FU insgesamt ein kleineres thrombozytäres TG-Potenzial als die Kontrollen und insgesamt auch die kleineren Werte innerhalb der *CALR*-Gruppe mit Therapiewechsel. Die Erkenntnisse von Alvarez-Larran *et al.* (183) könnte man hier also trotz der Verbesserung im 1. FU als mögliche Bestätigung ihrer insgesamt verminderten TG-Potenziale heranziehen. Die Forscher beschrieben eine geringere Thrombozytenaktivierung bei Myelofibrose-Erkrankten, verwendeten allerdings andere Methoden, die zu diesem Ergebnis führten. Zum einen verwendeten sie enzymatische Immunosorbent-Assays (R&D Systems, Abingdon, UK), mithilfe derer sie die Plasmaspiegel der löslichen Thrombozytenaktivierungsmarker sP-Selektin und sCD40L maßen. Zum anderen detektierten sie die P-Selektin Expression auf der Thrombozytenoberfläche mittels Durchflusszytometrie (FACS). Dass P13 (*CALR*), obwohl an einer Post-ET-MF erkrankt, im 1. FU keine so geringe thrombozytäre TG zeigte wie P9

(JAK2V617F, ebenfalls Post-ET-MF) oder andere ET-Patienten ohne Myelofibrose, passt nicht in das erwartete Muster und bedarf weiterer Untersuchungen.

### 5.2.2.3 Plasmatauschversuch mit isolierten Thrombozyten im 1. FU

Meine Arbeitsgruppe führte erstmalig einen Plasmatauschversuch mit gewaschenen bzw. isolierten Thrombozyten zunächst in autologem Plasma (Eigenplasma, EP) und dann in Kontrollplasma (KP) durch. Das Ziel war, den Einfluss des plasmatischen Anteils auf die zelluläre Thrombingenerierung während der sekundären Hämostase bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie zu evaluieren und damit die Rolle des zellfreien Plasmas (platelet-free plasma, PFP) bei möglichen thrombotischen oder hämorrhagischen Komplikationen der Erkrankung besser beurteilen zu können. Laut Dielis *et al.* ergäben sich wesentliche Einflüsse auf die TG aus veränderten Konzentrationen relevanter Proteine wie Gerinnungsfaktoren oder Hemmstoffe im Blutplasma sowie aus qualitativen Veränderungen in der Proteinaktivität. Durch die Plasmatauschversuche kann man indirekt Schlüsse auf diese möglicherweise veränderten Konzentrationen ziehen, also auf vermehrte pro- oder antikoagulante Substanzen im Blutplasma der ET-Patienten.

Bisher existiert zwar Literatur zu den Messungen in autologem PFP, jedoch kaum Messungen in Kontrollplasma (KP) in Anwesenheit gewaschener Thrombozyten. Damit wird die Grundlage für darauf aufbauende verbesserte Methoden und Versuche geschaffen. Primär werden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen (im 1. FU) im EP mit denen im KP verglichen, um den Einfluss des plasmatischen Anteils auf die Thrombingenerierung der gewaschenen Gruppenthrombozyten zu untersuchen. Hierbei konnten jedoch aufgrund der geringen Patientenzahl nur mit den JAK2V617F-Gruppen sowie den Kontrollgruppen statistische Vergleichstests zwischen EP und KP durchgeführt werden. **Diese Vergleichstests zwischen den Ergebnissen der JAK2V617F-Gruppen jeweils im EP zu KP fielen allesamt statistisch unauffällig aus, weshalb im Folgenden lediglich von Tendenzen gesprochen wird. Ausschließlich die Thrombozyten der "Kontrollen ohne ASS" zeigten einen statistisch auffälligen Unterschied zwischen den thrombin-induzierten ETPs in EP im Vergleich zum KP.**

Ein intraindividuellem Vergleich vom EE zum 1. FU wurde bei den Messungen der TG isolierter Thrombozyten in EP und KP nicht vorgenommen, da isolierte Thrombozyten meist mit dem nativen Phänotyp von Thrombozyten im PRP nicht vergleichbar sind. Außerdem konnte nicht sichergestellt werden, dass im EE und 1. FU das gleiche KP verwendet wurde.

#### 5.2.2.3.1 „LAG TIME“ UND „TIME TO PEAK“

Bei den basalen Messungen ohne Zugabe von Triggersubstanzen fiel auf, dass die meisten Gruppen im EP eine tendenziell kürzere „Lag time“ sowie „Time to peak“ generierten als im KP. Nur die „Kontrollen mit ASS“ zeigten kaum Unterschiede im Plasmatausch.

## DISKUSSION

Die Gabe der Thrombozytenagonisten TF und Thrombin verkürzte bei allen Patienten- und Kontrollgruppen die „Lag time“ und „Time to peak“ im Vergleich zur basalen Messung, wobei die Medianwerte aller Gruppen im autologen Plasma im Vergleich zum KP dann jeweils auf einem sehr ähnlichen Niveau lagen und somit keinen hinreichenden Unterschied zeigten im Plasmavergleich. **Zusammengefasst wurde also nach Agonistenzugabe während der Initiierungsphase der thrombozytären TG aller Patienten- und Kontrollgruppen im Plasmatausch weder statistische Auffälligkeiten noch eindeutige Tendenzen aufgedeckt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das autologe Plasma der ET-Patienten zumindest während der Initiierungsphase keinen Einfluss auf die thrombozytäre TG hat.**

Insgesamt zeigten die „Kontrollen ohne ASS“ plasmaunabhängig größtenteils kürzere Zeiten („Lag time“ und „Time to peak“) als die „Kontrollen mit ASS“. Statistisch auffällig war dieser Unterschied bei beiden Zeitparametern im KP nach Gabe von TF. Diese verminderte Funktion der mit ASS therapierten Thrombozyten entspricht auch den Ergebnissen gemessen in der Lumi-Aggregometrie und in der CAT mit PRP (Ausnahme: nach Thrombingabe) und spricht für eine regelrechte durch ASS irreversibel inhibierte thrombozytäre COX1, wodurch schlussfolgernd auch plasmaunabhängig bei den mit ASS therapierten Kontrollprobanden ein geringeres Thrombingenerierungspotenzial vorliegt. Wie bereits erwähnt, waren jedoch die Ergebnisse der Zeitparameter der jeweiligen Kontrollgruppen im direkten Plasmavergleich (EP zu KP) nicht statistisch auffällig.

Es wurde deutlich, dass die „JAK2V617F +HU“ Gruppe basal und nach Agonistengabe größtenteils plasmaunabhängig tendenziell (teils auch statistisch auffällig) kürzere Zeitparameter zeigte als die „Kontrollen mit ASS“ und damit immer zwischen den beiden Kontrollmedianwerten lag. Die „JAK2V617F –HU“ Gruppe zeigte nach Agonistengabe größtenteils dieselben Tendenzen (teils statistisch auffällig) zu den „Kontrollen mit ASS“.

Die „CALR –HU“ Patiententhrombozyten zeigten auch nach Agonistengabe plasmaunabhängig tendenziell kürzere Zeitparameter als die „Kontrollen mit ASS“ und sogar ähnliche oder kürzere als die „Kontrollen ohne ASS“. Dahingegen zeigten die Thrombozyten des „CALR +HU“ (P11) Patienten größtenteils und plasmaunabhängig längere Zeitparameter als die der „Kontrollen mit“ und „ohne ASS“. Hier stellt sich die Frage, weshalb der „CALR +HU“ (P11) Patient tendenziell im Vergleich so verlängerte Zeitparameter in der thrombozytären TG zeigte. An der Mutation konnte es nicht liegen, da die „CALR –HU“ Gruppe häufig sogar tendenziell noch kürzere Zeiten als die JAK2V617F-Gruppen generierte. Dementsprechend lag es entweder an der Kombination aus CALR-Mutation und HU-Therapie oder individuell an dem Patienten. P11 zeigte in der deskriptiven Analyse keine auffälligen Abweichungen (Thrombozytenkonzentration zwischen 400-500  $\times 10^9/l$ , Hb < 10g/dl, ausschließlich MZS). Auffällig war jedoch, dass er als einziger Patient mit einer dualen

## DISKUSSION

zytoreduktiven Therapie (HU + Anagrelid) behandelt wurde. Möglicherweise war diese Kombinationstherapie ursächlich für die verlängerte Initiierungsphase.

### 5.2.2.3.2 „THROMBIN PEAK“ UND ETP

**Die meisten Gruppen generierten in ihrem autologen Plasma basal und agonistenunabhängig tendenziell deutlich höhere „Thrombin peak“- sowie ETP-Werte als im KP. Die hierzu passende Tendenz zu verkürzten Zeitparametern im EP im Vergleich zum KP (vor allem basal) legt nahe, dass das EP insgesamt ein günstigeres Umfeld für die Thrombozyten bietet, um eine effektive Thrombingenerierungskapazität sicherzustellen.** Zum einen könnten die auf der Thrombozyten-Oberfläche schon gebundenen Gerinnungsfaktoren im KP eine verminderte Funktionsfähigkeit aufweisen, zum anderen binden eventuell die im KP vorhandenen Gerinnungsfaktoren schwächer an den allogenen (körperfremden) Thrombozyten. Möglicherweise liegt es auch an individuellen „Erkennungsmerkmalen“, die nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ grundsätzlich idealer im autologen System harmonieren und funktionieren. **Unsere Ergebnisse deuten jedoch nicht darauf hin, dass es im EP der ET-Patienten vermehrt anti- oder prokoagulante Substanzen gibt. Dies unterstreicht umso mehr, dass die Ursachen für die Komplikationen bei ET hauptsächlich in Thrombozytendysfunktionen und nicht in Dysfunktionen bzw. Veränderungen von Plasmakomponenten liegen.**

Die höhere Reaktivität, die sich schon bei den verkürzten Zeitparametern („Lag time“ und „Time to peak“) der „Kontrollen ohne ASS“ gegenüber den „Kontrollen mit ASS“ andeutete, bestätigte sich auch teilweise in den erhöhten Parametern „Thrombin peak“ und ETP, wobei sich hier eine Plasmaabhängigkeit zeigte. Denn die Thrombozyten der „Kontrollen ohne ASS“ zeigten im EP tendenziell (teils statistisch auffällig) höhere Werte (basal, TF-, Thr-Gabe) im „Thrombin peak“ und ETP als die „Kontrollen mit ASS“, jedoch spiegelte sich im KP bei beiden Parametern in allen Messbedingungen (basal, TF-, Thr-Gabe) eine umgekehrte Tendenz wider. Im KP waren demnach die Ergebnisse der „Kontrollen mit ASS“ tendenziell höher (aber nicht statistisch auffällig) als die der „Kontrollen ohne ASS“. Weshalb sich diese Ergebnisse auf diese Weise konstruierten, ist unklar. Deshalb bedarf es in diesem Fall Wiederholungstests mit einem größeren Kontrollgruppenkollektiv.

Vergleicht man versuchsübergreifend die Ergebnisse der Kontrollgruppen im Plasmatauschversuch im autologen Plasma mit denen im PRP, zeigte sich unerwarteter Weise eine Diskrepanz trotz der eigentlich identischen Versuchsbestandteile. Im Plasmatauschversuch zeigten nämlich die „Kontrollen ohne ASS“ im EP ausnahmslos (basal, TF-, Thr-Gabe) eine höhere Thrombozyten-abhängige TG als die „Kontrollen mit ASS“. Im PRP wiederum zeigten die „Kontrollen mit ASS“ nach Thr-Gabe größtenteils eine höhere

## DISKUSSION

Thrombozyten-abhängige TG als die „Kontrollen ohne ASS“. Die Gründe hierfür sind ebenfalls unklar.

Die *JAK2V617F*-mutierten Gruppen lagen im Plasmatauschversuch mit den „Thrombin peak“- und ETP- Medianwerten, genauso wie die *CALR*-mutierten Gruppen größtenteils und plasmaunabhängig noch innerhalb der Boxplots der „Kontrollen mit“ und „ohne ASS“.

Unsere Ergebnisse unter basalen Messbedingungen finden hier nur teilweise Übereinstimmung mit denen der Arbeitsgruppe Panova Noevas *et al.* 2011 (181). Sie resuspendierten isolierte Thrombozyten von an ET Erkrankten in gepooltem Normalplasma (Kontrollplasma, KP) und maßen mittels CAT u.a. die Parameter „Lag time“ und „Thrombin peak“ unter basalen Bedingungen. Die „Lag time“ der Thrombingenerierung im KP basal unterschied sich hier nicht bei Patienten- und Kontrollthrombozyten. In unseren Ergebnissen gab es unter basalen Bedingungen übereinstimmend ebenso keine statistischen Auffälligkeiten. Der generierte „Thrombin peak“ der isolierten ET-Patiententhrombozyten von Panova Noeva *et al.* hingegen war im KP basal signifikant höher als der der Kontrollen. In unseren Ergebnissen zeigte sich jedoch unter basalen Bedingungen im KP kein solcher Unterschied. (Im KP konnte einzig nach TF-Gabe die „*JAK2V617F* –HU“ Gruppe eine statistisch auffällig kürzere „Lag time“ (und „Time to peak“) als die „Kontrollen mit ASS“ generieren. Die „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe generierte eine längere „Time to peak“ als die „Kontrollen ohne ASS“ im KP.)

Beim Plasmatausch blieben die Tendenzen beim „Thrombin peak“ und ETP der einzelnen Patientengruppen untereinander größtenteils erhalten. Die Ausnahme zeigten die Thrombozyten des „*CALR* +HU“ Patienten (P11), welche im KP tendenziell deutlich niedrigere Werte zeigten als die „*JAK2V617F* +/-HU“-Patienten, die „*CALR* –HU“ Patienten sowie die „Kontrollen mit ASS“. Im EP konnte er hingegen von allen Patientengruppen meistens tendenziell die höchsten „Thrombin peak“ und ETP-Werte erreichen. Außerdem zeigten die isolierten Thrombozyten des „*CALR* +HU“ Patienten (neben den „Kontrollen ohne ASS“) damit auch im Gegensatz zu allen anderen Gruppen in den „Thrombin peak“- und ETP-Messungen immer den tendenziell größten Unterschied zwischen den höheren Werten im EP und den niedrigeren im KP. Um das Phänomen besser interpretieren zu können, bedarf es einer größeren Patientenzahl von „*CALR* +HU“ Patienten.

**Schlussfolgernd zeigten unsere Ergebnisse, dass das autologe Blutplasma der ET-Patienten deren thrombozyten-abhängige TG nicht pathologisch verändert.** Die TG zeigte sich zwar tendenziell im EP bei den meisten Gruppen höher als im KP, jedoch lagen die Patientengruppen mit ihren Ergebnissen der thrombozytären TG größtenteils dann auch physiologisch im Kontrollbereich. **Das Blutplasma der ET-Patienten scheint unseren Daten**

**nach zu urteilen also keinen Einfluss auf die thrombotischen oder hämorrhagischen Komplikationen der Erkrankung ET zu haben.**

#### **5.2.2.4 Plasmatauschversuch mit isolierten MNC**

In der Pathophysiologie der essentiellen Thrombozythämie (ET) (wie auch der anderen philadelphia-negativen myeloproliferativen Neoplasien Polycythaemia vera und primäre Myelofibrose) sind chronische Entzündungsprozesse wesentlich beteiligt. Diese Prozesse stehen in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung von vorzeitiger Atherosklerose, der Initiierung der klonalen Evolution bzw. deren Katalysierung von frühen Krankheitsstadien bis hin zur myelofibrotischen oder leukämischen Transformation, und dem Risiko für Zweitmalignomen bei Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien (MPN) (184). Bei den chronischen Entzündungsprozessen spielt die Aktivierung von Leukozyten (einschließlich der peripheren Blutmonozyten und neutrophilen Granulozyten), Erythrozyten, Endothelzellen und Thrombozyten eine entscheidende Rolle. Ihre Interaktionen untereinander bilden ein stark proadhäsives und prothrombotisches Milieu im Blutkreislauf, das Patienten mit MPN für venöse, arterielle und mikrovaskuläre Thrombosen und Verschlusskrankheiten prädisponiert. (11, 185-187)

Monozyten stellen den primären Zelltyp in der MNC-Fraktion dar und können Thrombin über den Prothrombinasekomplex via TF und FVIIa generieren. Im Rahmen dieser Dissertation wurde erstmals die Thrombingenerierung isolierter Monozyten (mononukleäre Zellen, MNC) von ET-Patienten sowohl im autologen Plasma als auch im Plasma von Kontrollprobanden untersucht. Bereits Coucelo *et al.* beschrieben 2013 (110) vor allem bei ET-Patienten mit Thromboseanamnese ein vermehrtes Aufkommen aktivierter Monozyten (mittels CD11b-Oberflächenexpression). Monozyten sind zudem die Zellen mit dem größten TF-Depot (67, 108) und eine vermehrte TF-Expression von Monozyten bei ET-Patienten wurde bereits durch Studien belegt (16). TF initiiert auf Monozyten die Bildung von Thrombin, das wiederum die Aktivierung und Retraktion von Thrombozyten auslöst (107). Deshalb liegt die Vermutung sehr nahe, dass Monozyten einen großen Einfluss auf die Hämostase haben und damit auf die Thromboseneigung der ET-Patienten. Erstmals 2017 untersuchten Peshkova *et al.* (107) die durch TF vermittelten Auswirkungen aktivierter Monozyten auf die Retraktion von Blutgerinnseln. Ihre Ergebnisse deuteten darauf hin, dass aktivierte Entzündungszellen den lokalen Blutfluss in obstruktiven Gefäßen stark modulieren können, indem sie die Größe eines an der Entzündungsstelle gebildeten Thrombus verändern, was letztlich erhebliche hämodynamische und pathogene Folgen haben kann.

Zudem ist bekannt, dass ET-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen höhere Thrombozyten-Neutrophilen- und Thrombozyten-Monozyten-Komplexe aufweisen (16), welche wiederum eine erhöhte Thrombingenerierung bedingen können. Die Untersuchung solcher Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate im peripheren Blut der ET-Patienten wurde

## DISKUSSION

parallel von der mit uns kooperierenden Arbeitsgruppe von Prof. ████████ an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Es wurde ein Plasmatauschversuch mit Monozyten durchgeführt, um zum einen die Funktion der Monozyten von ET-Patienten bezüglich der Thrombingenerierung im Eigenplasma im Verlauf des 1. FU zu ermitteln und zum anderen, ob eher die Monozyten und/oder das Plasma der ET-Patienten zu einer veränderten Thrombingenerierung beiträgt (Plasmatauschversuche mit Plasma von gesunden Kontrollprobanden). Man entschied sich zudem für diese Versuchsanordnung, um Parallelen zwischen thrombingenerierenden Thrombozyten und thrombingenerierenden Monozyten zu identifizieren und möglicherweise eine veränderte Thrombingenerierungskapazität in beiden Zelltypen von ET-Patienten zu detektieren. Aufgrund der geringen Patientenzahl konnten wir auch in dieser Versuchskonstellation nur mit den *JAK2V617F*-Gruppen, nicht mit den *CALR*-Gruppen, statistische Vergleichstests zwischen EP und KP durchführen.

### 5.2.2.4.1 EINFLUSS DES BLUTPLASMAS AUF DIE TG DER MNC

Die Tests der jeweiligen *JAK2V617F*-Gruppe zwischen EP und KP fielen allesamt statistisch unauffällig aus. Beim Vergleich der Kontrollgruppenergebnisse im EP zum KP fielen lediglich die „Kontrollen mit ASS“ mit einer statistisch auffällig kürzeren "Lag time" im EP im Vergleich zum KP unter basalen Bedingungen auf. **Daraus lässt sich schließen, dass das umgebende Plasma keine entscheidende Rolle für die Thrombinbildung der MNC bei den ET-Patienten zu spielen scheint.** Im Folgenden wird trotzdem ausführlicher auf die Ergebnisse im Plasmatauschversuch eingegangen, um auch Tendenzen im Verhalten der MNC bei den unterschiedlichen Parametern zu beschreiben:

#### 5.2.2.4.1.1 „LAG TIME“ UND „TIME TO PEAK“

Die MNC aller Patienten- und Kontrollgruppen zeigten im Plasmatauschversuch bei der Thrombingenerierung genauso keine eindeutige Differenz zwischen EP und KP in den Zeitparametern „Lag time“ und „Time to peak“ wie es bei den eben beschriebenen isolierten Thrombozyten beobachtet wurde. Nur unter basalen Bedingungen gab es noch die größten Unterschiede in der „Lag time“ aller Patienten- und Kontrollgruppen zwischen den kürzeren Messwerten im EP und den tendenziell längeren im KP. Statistisch auffällig war dieser Unterschied lediglich bei den „Kontrollen mit ASS“.

Konträr zur thrombozytären TG zeigten sich bei der monozytären TG der „Kontrollen mit ASS“ größtenteils (plasma- und agonistenunabhängig) kürzere Zeitparameter als bei den „Kontrollen ohne ASS“. **Hier stellt sich die Frage, ob die ASS Therapie einen aktivierenden Einfluss auf die Initiierungsphase der monozytären TG hat.**

## DISKUSSION

Die MNC der *JAK2V617F*-Gruppen zeigten im Median plasmaunabhängig tendenziell ähnliche und kürzere Zeitparameter als die beiden Kontrollgruppen. Hierbei zeigten die MNC der „*JAK2V617F* +HU“ Patienten größtenteils sogar plasmaunabhängig statistisch auffällig kürzere „Time to peak“-Werte als die im jeweiligen Plasma gemessenen Werte der „Kontrollen mit ASS“ und „Kontrollen ohne ASS“.

Die MNC der *CALR*-Patienten zeigten hingegen plasmaübergreifend variable Ergebnisse in den Zeitparametern gegenüber den Kontrollgruppen. Insgesamt konnten sie jedoch im EP verhältnismäßig agonistenunabhängig die kürzeren Zeiten generieren als im KP jeweils im Vergleich zu den Kontrollboxplots.

### 5.2.2.4.1.2. „THROMBIN PEAK“ UND ETP

Im Plasmatauschversuch der MNC wurden keine deutlichen Unterschiede in den Parametern „Thrombin peak“ und ETP der *JAK2V617F*-positiven Patientengruppen zwischen EP und KP beobachtet. Ausschließlich der „*CALR* +HU“ Patient (P11) konnte im EP tendenziell deutlich höhere „Thrombin peak“- und ETP-Werte erzielen als im KP. Die „*CALR* –HU“ Gruppe erreichte hingegen im KP nach TF-Gabe einen deutlich höheren „Thrombin peak“ und basal, nach TF- und Thrombin-Gabe jeweils auch ein tendenziell deutlich höheres ETP.

Die „Kontrollen mit ASS“ zeigten basal plasmaunabhängig tendenziell ähnliche bis sogar leicht höhere „Thrombin peak“- sowie ETP-Werte wie die „Kontrollen ohne ASS“. **Das unterstützt die bereits bei den Zeitparametern beschriebene Hypothese des möglichen aktivierenden Einflusses der ASS-Therapie auf die monozytäre TG.** Nach Agonistengabe zeichnete sich demgegenüber jedoch eine umgekehrte Tendenz ab.

**Beide Kontrollgruppen konnten im EP ein tendenziell (nicht statistisch auffällig) höheres ETP generieren als im KP.**

Beim Vergleich der Patienten- mit den Kontrollgruppen fiel auf, dass die meisten Patientenmonozyten im EP basal und agonistenunabhängig im Median höhere „Thrombin peaks“ und ETPs als beide Kontrollgruppen (häufig sogar statistisch auffällig) generierten, die sich auch meistens nicht mehr innerhalb der Kontrollboxplots befanden. Lediglich nach TF-Gabe zeigten die *CALR*-positiven Gruppen im EP tendenziell niedrigere ETP-Medianwerte als die Kontrollgruppen. Sie lagen jedoch noch innerhalb des Boxplots der „Kontrollen mit ASS“. Auch der Plasmatausch mit KP änderte größtenteils nichts an dem Verhältnis der Patienten- zu den Kontrollergebnissen.

Im EP generierten also die Monozyten der „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe agonistenunabhängig statistisch relevant kürzere „Time to peak“ Werte sowie statistisch relevant höhere „Thrombin peaks“ und meistens ebenso höhere ETPs als beide Kontrollgruppen und **weisen hiermit auf eine verkürzte Initiierungsphase bzw. höhere Amplifikationsphase der monozytären TG von *JAK2V617F*-mutierten ET-Patienten unter HU-Therapie hin. Ursachen hierfür könnte**

**selbstverständlich die Mutation an sich sein, welche mit einem erhöhten proinflammatorischen und prothrombotischen Phänotyp (188) einhergeht und damit auch möglicherweise konsekutiv mit reaktionsfreudigeren, das heißt schneller und stärker Thrombin-generierenden Monozyten.**

Gegenüberstellend dazu zeigten die in dieser Dissertation eingeschlossenen ET-Patienten im PRP eine thrombozytären TG mit tendenziell verlängerter Initiierungsphase im Vergleich zu den Kontrollen. Die Amplifikationsphase bzw. das TG-Potenzial („Thrombin peak“ und ETP) war lediglich bei der „JAK2V617F +HU“ Gruppe gegenüber den Kontrollen erhöht. **Das würde für tendenziell eher träge Thrombin-generierende Thrombozyten bei ET-Patienten sprechen, zumindest *in vitro*.** Hier könnte wieder die Theorie von Jan J. Michiels *et al.* (154) greifen, dass die Thrombozyten der ET-Patienten zwar *in vivo* überreaktiv bzw. voraktiviert sind, *in vitro* jedoch folglich „erschöpfter“ sind und damit eine geringere TG-Kapazität zeigen als die der Kontrollen. Monozyten haben im Gegensatz zu Thrombozyten einen Zellkern und können wichtige proinflammatorische Substrate nachbilden, sodass sie trotz eines möglicherweise überreaktiven Charakters *in vivo* (aufgrund der chronischen Inflammation bei ET-Patienten) auch *in vitro* eine höhere Aktivität bei ET-Patienten zeigen könnten.

### 5.2.2.4.2 DIE WICHTIGSTEN AUFFÄLLIGKEITEN DER MONOZYTÄREN TG IM AUTOLOGEN PLASMA IM 1. FU

Bei der Initiierungsphase der monozytären TG war lediglich beim Parameter „Time to peak“ statistisch relevant auffällig, dass die die „JAK2V617F +HU“ Gruppe agonistenunabhängig kürzere Zeiten als beide Kontrollgruppen zeigte.

Die *CALR*-Gruppen zeigten im EP eine tendenziell längere Initiierungsphase der TG als die *JAK2V617F*-mutierten Patienten. Sie benötigten also mehr Zeit, um Thrombin zu generieren. Ob hier womöglich auf Störungen der Initiierungsphase der sekundären Hämostase geschlossen werden kann, wird erst durch die Durchführung der Experimente mit einer höheren Anzahl an *CALR*-mutierten Patienten sowie statistischen Vergleichstests möglich.

Bei der Amplifikationsphase („Thrombin peak“ und ETP) generierten die Monozyten der meisten ET-Patienten höhere Thrombinmengen als die Kontrollgruppen. Lediglich die TF-induzierte monozytäre TG der *CALR*-Gruppen zeigte tendenziell niedrigere Medianwerte als die Kontrollgruppen, die sich allerdings noch innerhalb des Boxplots der „Kontrollen mit ASS“ befanden.

**Aus diesen Ergebnissen könnte man ableiten, dass Monozyten von ET-Patienten in einem aktivierten bzw. prokoagulantem Zustand vorliegen aufgrund der meist kürzeren und damit schnelleren Initiierungsphase und einem meist höheren TG-Potential auch während der basalen Messungen ohne zusätzliche Trigger im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden.** Bereits mehrere Autoren beschrieben einen aktivierten Zustand von

## DISKUSSION

Monozyten im Blutkreislauf von ET-Patienten (16, 110, 189). Das bestätigt den bei ET-Patienten bereits beschriebenen chronischen Inflammationscharakter (11). **Unsere Ergebnisse stützen demnach die Hypothese, dass bei ET-Patienten (v.a. mit JAK2V617F-Mutation) auch die Monozyten einen wichtigen Beitrag zur Pathogenese der ET leisten, indem sie u.a. zu einer gesteigerten TG beitragen und damit elementar die sekundäre Hämostase bzw. den prothrombotischen Phänotyp der Erkrankung fördern.**

**Außerdem fiel auf, dass zumindest im EP mutationsunabhängig die Monozyten aller Patientengruppen MIT HU-Therapie eine höhere TG zeigten als die Patientengruppen ohne HU-Therapie.** Statistische Tests haben wir hierzu nicht durchgeführt. Man konnte jedoch auch größtenteils bei der thrombozytären TG (PRP) dieses Phänomen der gesteigerten TG („Thrombin peak“ und ETP) bei MIT HU therapierten JAK2V617F- und CALR-Patienten im Gegensatz zu den jeweils ohne HU therapierten entsprechenden Patientengruppen beobachten. Unserer Kenntnis nach gibt es in der aktuellen Literatur keine Hinweise darauf, dass HU die monozytäre bzw. thrombozytäre TG steigern könnte. Die Ergebnisse in PRP widersprechen auch den Ergebnissen von Panova-Noeva *et al.* 2011 (181) und Armando Tripodi A. *et al.* 2013 (190) wie bereits im Kapitel 5.2.2.2 erläutert wurde. Womöglich senkt HU die Voraktivierung der Monozyten bzw. Thrombozyten von ET-Patienten *in vivo* und sorgt somit für eine höhere TG-Kapazität *in vitro*. Da unsere Patienten möglicherweise nicht adäquat auf eine HU-Behandlung ansprechen (HU teils widersprüchliche Effekte zeigte), könnten hingegen die neuen JAK2-Inhibitoren eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Leukozyten- und Thrombozytenaktivierung spielen und dadurch das Thromboserisiko bei den ET-Patienten verringern.

#### 5.2.2.4.3 INTRAINDIVIDUELLE AUFFÄLLIGKEITEN DER MONOZYTÄREN TG IM VERLAUF VOM EE ZUM 1. FU

Im Folgenden wird auf die Besonderheiten der monozytären TG der Patienten eingegangen, welche keine klinischen oder therapeutischen Veränderungen im Verlauf vom EE zum 1. FU hatten (P1-P8, P11):

Die Monozyten der „JAK2V617F +HU“ Gruppe zeigten im Verlauf keine einheitliche Tendenz, außer dass sie im 1. FU größtenteils weiterhin ein pathologisch erhöhtes TG-Potential („Thrombin peak“ und ETP) wie im EE generierten. Bei der thrombozytären TG stach Patient **P4** (JAK2V617F +HU) heraus mit einem deutlich hyperreaktiven Charakter gegenüber den anderen Patienten. Dies konnte man hingegen bei der monozytären TG von P4 im Vergleich zu den anderen Patientenmonozyten nicht feststellen. Im Verlauf generierten dessen Monozyten sogar ein tendenziell geringeres ETP im 1. FU als im EE, was jedoch weiterhin hoch pathologisch war.

Die Monozyten der „JAK2V617F –HU“ Gruppe zeigten größtenteils auch schon im EE pathologisch erhöhte TG-Potentiale (v.a. ETPs), welche im Verlauf noch weiter anstiegen. Lediglich die Ergebnisse des **P8** (JAK2V617F –HU) lagen im EE hauptsächlich beim Parameter „Thrombin peak“ noch nahe der Kontrollmittelwerte und stiegen erst im 1. FU ins Pathologische.

Die Monozyten des „CALR +HU“ Patienten **P11** zeigten im Ein-Jahres-FU eine tendenziell schwächere Aktivität als zum Zeitpunkt des EE, welche sich jedoch weiterhin als pathologisch hoch erwies. Die Initiierungsphase („Lag time“) war im 1. FU etwas länger und das TG-Potential („Thrombin peak“ und ETP) war insgesamt kleiner als im EE. P11 erhielt sowohl im EE als auch im 1. FU als einziger Patient eine duale zytoreduktive Therapie mit HU und Anagrelid, welche augenscheinlich intraindividuell keinen ausreichenden Benefit zeigte, weder auf die Monozytenfunktion noch auf die Thrombozytenfunktion (siehe 5.2.2.2.3).

**Insgesamt konnte man bei den Patienten ohne eine klinische oder therapeutische Veränderung im Verlauf eine Tendenz zur weiteren pathologischen Erhöhung der monozytären TG erkennen, wobei hauptsächlich die „JAK2V617F –HU“ Gruppe nochmals eine deutliche Steigerung des monozytären TG-Potentials aufzeigte.**

Nachstehend werden die intraindividuellen Auffälligkeiten der monozytären TG der Patienten MIT einer klinischen bzw. therapeutischen Veränderung im Verlauf vom EE zum 1. FU erläutert:

Vier unserer Patienten hatten im Ein-Jahres-FU eine klinische bzw. therapeutische Veränderung. Dabei hatten alle einen Therapiewechsel, wobei P9 (JAK2V617F) und P10 (JAK2V617F) von HU auf Anagrelid wechselten, P12 (CALR) von HU auf pegyliertes

## DISKUSSION

Interferon- $\alpha$  und P13 (*CALR*) setzte hingegen die zytoreduktive Therapie komplett ab. P9 (*JAK2V617F*) und P13 (*CALR*) entwickelten zusätzlich im Verlauf eine Post-ET-Myelofibrose.

Die Verzögerungszeiten („Lag time“, „Time to peak“) der monozytären TG der Patienten mit einer klinischen oder therapeutischen Veränderung ergaben im Verlauf keine klaren Tendenzen, weder innerhalb der Mutationsgruppen, noch zwischen den Patienten mit einem Krankheitsprozess (P9, P13) im Vergleich zu denen ohne einen (P10, P12).

Bei den monozytären TG-Potentialen („Thrombin peak“, ETP) der Patienten gab es hingegen eindeutige Tendenzen. Es fiel auf, dass die *CALR*-mutierte Patientengruppe insgesamt im Verlauf zum 1. FU pathologischere TG-Potentiale aufwies (P12 pathologisch hoch, P13 pathologisch niedrig im Vergleich zu den Kontrollgruppen) und die *JAK2V617F*-mutierte Patientengruppe insgesamt im Verlauf verbesserte TG-Potentiale zeigte, welche sich denen der Kontrollen annäherten (P9 aber weiterhin pathologisch niedrig, P10 meistens nahe der Kontrollwerte gesunken). **P9 und P10 wechselten beide die Therapie von HU auf Anagrelid, wodurch im Verlauf auch die monozytäre TG verbessert werden konnte.**

Die Patienten mit einem Krankheitsprozess (Post-ET-Myelofibrose), P9 (*JAK2V617F*) und P13 (*CALR*), zeigten im 1. FU beide pathologisch geringe monozytäre TG-Potentiale, wobei sich die monozytären TG bei **P9** insgesamt im Verlauf gesteigert hat trotz Krankheitsprozess. **P13** hingegen hatte im EE kontrollähnliche Werte aufgewiesen, welche im Verlauf durch Absetzen der zytoreduktiven Therapie und/oder Krankheitsprozess im 1. FU deutlich pathologisch sanken.

Die TG-Potentiale der Patienten mit einer therapeutischen/klinischen Veränderung wiesen größtenteils (spätestens im 1. FU) insgesamt Werte unterhalb des Kontrollbereichs auf. Die Ausnahme war der Patient **P12**, welcher schon im EE pathologisch hohe monozytäre TG-Potentiale zeigte, und im 1. FU nach dem Therapiewechsel von HU auf pegyliertes Interferon- $\alpha$  (pegINF $\alpha$ ) noch viel höhere Werte hatte. Damit zeigte P12 ein ähnliches Verhalten wie die Patienten ohne einen Therapiewechsel. **Die Wirksamkeit von pegINF $\alpha$  erscheint bei Patient P12, insbesondere in Bezug auf die monozytäre TG, begrenzt zu sein.**

**Zusammenfassend zeigten die Thrombozyten der Patienten im Verlauf vom EE zum 1. FU größtenteils eher die Tendenz zu einer physiologischeren (also den Kontrollgruppen annähernden) thrombozytären TG.**

**Auch die Monozyten der *JAK2V617F*-Patientengruppe mit einer klinischen/therapeutischen Veränderung zeigten größtenteils die Tendenz zur insgesamt physiologischeren (also den Kontrollgruppen annähernden) monozytären TG im Verlauf des 1. FU.**

Die Monozyten der Patienten ohne einen Therapiewechsel (v.a. „*JAK2V617F* –HU“) zeigten hingegen im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine Erhöhung der monozytären TG im Verlauf des 1. FU. Daher besteht hier die Möglichkeit einer inflammatorischen Progression der ET-Erkrankung.

### **5.2.2.5 Parallelen zwischen den jeweils thrombingenerierenden Thrombozyten (PRP) und Monozyten im 1. FU**

Zusammengefasst zeigten die Thrombozyten der „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe im PRP größtenteils ein tendenziell höheres TG-Potential als die der Kontrollgruppen. Statistisch auffällig erhöht war lediglich das TF- sowie CVX-Thr-induzierte ETP gegenüber den „Kontrollen mit ASS“. Auch die Monozyten der „*JAK2V617F* +HU“ Gruppe konnten im EP sogar agonistenunabhängig statistisch relevant kürzere „Time to peak“ Werte sowie statistisch relevant höhere „Thrombin peaks“ und meistens ebenso höhere ETPs als beide Kontrollgruppen generieren. **Dies weist auf ein höheres TG-Potential von Thrombozyten und auch Monozyten von *JAK2V617F*-mutierten ET-Patienten unter HU-Therapie (im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen) hin und würde das in Studien bereits bestätigte erhöhte Thromboserisiko von ET-Patienten mit einer *JAK2V617F*-Mutation (110) bestätigen.** Eine HU-Therapie hingegen wirkt normalerweise antithrombotisch vor allem über die Reduktion der Leukozytenzahl (110, 191). Eine thrombosesteigernde Wirkung von HU wurde bisher nicht beschrieben.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Dissertation untersucht klinische und molekulare Aspekte der essentiellen Thrombozythämie (ET) mit Schwerpunkt auf den Auswirkungen von Mutationen (*JAK2V617F*, *CALR*) und zytoreduktiver Therapie auf die thrombozytäre Funktion im Verlauf des ersten Jahres nach Ersteinschluss (EE). Analysiert wurden thrombozytäre Aggregation und ATP-Freisetzung mittels Lumi-Aggregometrie sowie thrombozytäre Thrombingenerierung (TG) und die TG von mononukleären Zellen (MNC) mittels „Calibrated Automated Thrombography“ (CAT) bei 13 ET-Patienten (77 % *JAK2V617F*-Mutation, 23 % *CALR*-Mutationen) im 1. Follow-up (1. FU) im Vergleich zum EE. Als Kontrollgruppe dienten zehn gesunde Probanden, deren Blut vor und nach einer 3-tägigen Acetylsalicylsäure (ASS)-Einnahme mit je 100 mg/Tag analysiert wurde. Die Daten des EE wurden von Frau Dr. med. Alexandra Berkes (geb. Walter) bereitgestellt. Im 1. FU wurden 84,6 % der Patienten mit ASS behandelt, 38,5 % erhielten zudem Hydroxyurea (HU). Zwei Patienten wechselten von HU auf Anagrelid, ein Patient auf pegyliertes Interferon- $\alpha$  (pegINF $\alpha$ ) als alternative Zweitlinien-Medikamente. Im 1. FU traten bei den 13 untersuchten ET-Patienten weder neue Blutungen noch thrombotische Ereignisse auf, zwei Patienten entwickelten eine Post-ET-Myelofibrose unabhängig vom Mutationstyp.

Die Analyse der thrombozytären Aggregation und ATP-Freisetzung im 1. FU zeigte ein überwiegend hyporeaktives Muster auf den Agonisten Arachidonsäure sowohl bei den ET-Patienten mit als auch ohne ASS-Therapie. Ein Patient (*JAK2V617F*, +HU, -ASS) zeigte eine deutlich höhere Aggregationsfähigkeit auf Arachidonsäure *in vitro* im Vergleich zu den „Kontrollen ohne ASS“. Bei zwei Patienten mit jeweils einer *JAK2V617F*-Mutation und *CALR*-Mutation wurde trotz ASS-Einnahme eine referenzähnliche Aggregation beobachtet, was auf eine mögliche ASS-Resistenz bzw. -Insensitivität oder „Incompliance“ bzgl. der Medikamenteneinnahme hinweist. Bei den meisten ET-Patienten wurde eine gestörte Thrombozytenaggregation mit niedriger Kollagen- und TRAP-6- (Thrombinrezeptor PAR-1 Agonistpeptid) Konzentration vergleichbar mit den „Kontrollen mit ASS“ beobachtet, was auf die überwiegende Einnahme von ASS zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu führte eine hohe Kollagenkonzentration (10  $\mu\text{g/ml}$ ) zu einer Referenzaggregation der Thrombozyten bei „Kontrollen mit ASS“, wohingegen der überwiegende Anteil der ET-Patienten eine verminderte maximale Thrombozytenaggregation unter dem Cut-Off von 60 % aufwies, die nicht durch die ASS-Einnahme bei den ET-Patienten erklärbar ist. Hingegen führte eine hohe TRAP-6-Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) bei der Mehrheit der ET-Patienten zu einer referenzvergleichbaren maximalen Aggregation mit einem Median über 60 % wie bei den beiden Kontrollgruppen. Die zur Aggregation simultan detektierte thrombozytäre ATP-Freisetzung zeigte im Median, induziert durch hohe Kollagen- und TRAP-6-Konzentrationen, eine Verminderung im Vergleich zu den Kontrollgruppen, welche für die *JAK2V617F*-positiven Patienten therapieunabhängig im Vergleich zu den „Kontrollen ohne

## ZUSAMMENFASSUNG

ASS“ sogar statistisch auffällig war. Diese Ergebnisse könnten auf einen mutationsunabhängigen  $\delta$ -Storage-Pool-Defekt (intrinsisch oder sekundär *in vitro* ausgelöst durch eine bereits aktivierungsbedingte Ausschüttung der  $\delta$ -Granula *in vivo*) oder auf eine  $\delta$ -Granula-Freisetzungstörung bei ET-Patienten hinweisen. Weitere spezialisierte Tests wie „Whole Mount“ Elektronenmikroskopie und Durchflusszytometrie, die in einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit im Rahmen dieser Studie durchgeführt wurde, könnten Granuladefekte bzgl. Quantität und Qualität detaillierter untersuchen. Obwohl im Verlauf eines Jahres bei 69 % der ET-Patienten die Thrombozytenkonzentrationen gesunken und bei 46 % dann im Normalbereich lagen, zeigten sich keine deutlichen Veränderungen in der thrombozytären Agonisten-induzierten Aggregation und ATP-Freisetzung, die weiterhin größtenteils unterhalb der Kontrollreferenzen lagen.

Die thrombozytäre Thrombingenerierung im 1. FU ergab für basal (ohne Trigger) und für alle untersuchten Trigger (1 pM Tissue-Faktor, 0,1 U/ml Thrombin, 50 ng/ml Convulxin, 0.1 U/ml Thrombin + 50 ng/ml Convulxin) und alle ET-Gruppen tendenziell verlängerte Zeitparameter („Lag time“, „Time to peak“) im plättchenreichen Plasma, die beide für die „JAK2V617F –HU“-Gruppe unter basalen Bedingungen und nach Convulxingabe statistisch auffällig waren. Bei den Parametern „Thrombin peak“ und endogenes Thrombinpotential (ETP) wurden für die „JAK2V617F +HU“-Gruppe tendenziell und partiell statistisch auffällig höhere Werte im Vergleich zu „Kontrollen mit ASS“ (basal, Tissue-Faktor, Convulxin, Convulxin + Thrombin) und für die „JAK2V617F –HU“-Gruppe tendenziell und partiell statistisch auffällig geringere Werte im Vergleich zu „Kontrollen ohne ASS“ („Thrombin Peak“: Convulxin + Thrombin; ETP: Tissue-Faktor, Convulxin, Thrombin) beobachtet. Um den Einfluss von Plasmafaktoren auf die thrombozytäre TG bei den ET-Patienten zu untersuchen, wurden Plasmatauschversuche an isolierten Thrombozyten mit Eigenplasma (EP) und Plasma von Kontrollprobanden (KP) durchgeführt. Es zeigten sich keine statistisch auffälligen Unterschiede bei den TG-Parametern für die Patientengruppen zwischen EP und KP. Ebenso ergaben sich für die TG im plättchen-freien Plasma (PFP) induziert durch Tissue-Faktor (5 pM) keine statistisch nennenswerten Unterschiede bezüglich „Lag time“, „Time to peak“, „Thrombin peak“ und ETP zwischen den ET-Patienten und den Kontrollgruppen, unabhängig von Mutationstyp oder ASS-Therapie. Nur JAK2V617F-positive Patienten unter HU zeigten tendenziell höhere Werte für „Thrombin Peak“ und ETP im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Ergebnisse der Plasmatausch- und PFP-Versuche zur TG deuten auf eher nicht relevante Unterschiede von pro- und anti-koagulatorischen Plasmafaktoren bei der TG zwischen den ET-Patienten- und Kontrollgruppen hin und unterstützen die Hypothese, dass überwiegend die Thrombozytenfunktion und nicht die Plasmafaktoren bei der ET die thrombozytäre TG bestimmt, die bei JAK2V617F–positiven Patienten ohne HU-Therapie *in vitro* sekundär erschöpft und mit HU-Therapie *in vitro* prothrombotisch zu sein scheint. Da die GPVI-vermittelte thrombozytäre TG induziert durch

## ZUSAMMENFASSUNG

Convulxin bei der Mehrheit der ET-Patienten ähnlich oder sogar höher ausfiel im Vergleich zu den Kontrollgruppen, scheint im Gegensatz zur GPVI-vermittelten Aggregation die GPVI-vermittelte TG in Gegenwart einer hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht intrinsisch beeinträchtigt zu sein. Im Jahresverlauf zeigte sich nur bei ET-Patienten ohne klinische oder therapeutische Veränderungen größtenteils eine Tendenz zu gesteigerten thrombozytären Funktionen, unabhängig von Mutation oder Therapie. Hierbei zeigte vor allem die „JAK2V617F +HU“ Gruppe häufig noch höhere TG-Potentiale als die Kontrollgruppen.

Da chronische Entzündungsprozesse mit aktivierten peripheren Blutmonozyten die Pathogenese der ET mitbestimmen, wurde in dieser Dissertation erstmals die Gerinnungskapazität *in vitro* von isolierten Monozyten innerhalb der mononukleären Zellfraktion (MNC) als TG in Plasmatauschversuchen im EP und KP basal und Tissue-Faktor (TF)- bzw. Thrombin-getriggert untersucht. Die MNC im EP und KP von JAK2V617F-positiven ET-Patienten zeigten insbesondere basal und TF getriggert eine verkürzte „Lag time“ und „Time to peak“ im Vergleich zu den Kontrollgruppen, wobei die „JAK2V617F +HU“-Gruppe statistisch auffällige Werte zeigte und tendenziell kürzere Zeitparameter aufwies als die „JAK2V617F -HU“-Gruppe. Entsprechend erreichten die MNC der JAK2V617F-positiven ET-Patienten basal wie auch nach Zugabe von TF oder Thrombin sowohl im EP als auch KP statistisch auffallend erhöhte „Thrombin Peak“- und ETP-Werte im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen, wobei auch hier wieder die „JAK2V617F +HU“-Gruppe statistisch auffällige Werte zeigte und tendenziell eine höhere Thrombinbildung aufwies als die „JAK2V617F -HU“-Gruppe. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass monozytäre Zellen von ET-Patienten, insbesondere mit JAK2V617F-Mutation *in vitro* eine erhöhte Thrombinbildungskapazität mit einem erhöhten prokoagulantem Zustand *in vivo* aufweisen. Die intraindividuelle Analyse der TG monozytärer Zellen (MNC) bei ET-Patienten ohne klinische oder therapeutische Veränderungen zeigte im Verlauf vom EE zum 1. FU bei der „JAK2V617F -HU“-Gruppe eine weitere Erhöhung der monozytären TG-Potentiale („Thrombin peak“, ETP), was auf eine inflammatorische Progression der Erkrankung hindeuten könnte. Die „JAK2V617F +HU“-Gruppe wies überwiegend weiterhin pathologisch erhöhte Werte der monozytären TG auf. Zwei JAK2V617F-positive Patienten mit Therapieumstellung von HU auf Anagrelid zeigten im Verlauf eine Annäherung der monozytären TG-Potentiale an die Kontrollwerte. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass Tests zur Thrombozyten-Aggregation, -ATP-Freisetzung sowie Thrombinbildungskapazität von Thrombozyten und monozytären Zellen in der MNC-Fraktion *in vitro* sinnvoll sind, um den pro-thrombotischen Zustand bei den individuell unterschiedlichen Verläufen der ET besser beurteilen zu können. Ob diese Tests auch sinnvoll eingesetzt werden können für eine Risikostratifizierung und Anpassung des Behandlungskonzepts, müssen zukünftige prospektive Studien mit höherer Patientenzahl pro Gruppe und mit längerem Follow-up zeigen.

**7 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Herold G. Innere Medizin. Berlin, Germany: Gerd Herold; 2020.
2. Kindler T, Jurk K. Research protocol for the project "Platelet and Leukocyte Dysfunction in Essential Thrombocythemia". Version 1.0- 1. Juli 2016
3. Tefferi A, Vannucchi AM, Barbui T. Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J.* 2018;8(1):2.
4. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017;129(6):680-92.
5. Ayalew Tefferi M. UpToDate [Internet] Aug 13, 2020. [17.09.2020]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-and-clinical-manifestations-of-essential-thrombocythemia#H1272969501>.
6. Meier B, Burton JH. Myeloproliferative Disorders. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017;31(6):1029-44.
7. Ferreira Cristina S, Polo B, Lacerda JF. Somatic Mutations in Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Semin Hematol.* 2018;55(4):215-22.
8. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. *JAMA Oncology.* 2015;1(1):97-105.
9. Petrides PE. Primäre Thrombozythämie: Diagnose und Therapie. *Med Klin (Munich).* 2006;101(8):624-34.
10. Hirschbühl K, Claus R. BCR-ABL1-negative myeloproliferative Neoplasien (MPN). *TumorDiagnostik & Therapie.* 2020;41(04):235-9.
11. Marin Oyarzún CP, Heller PG. Platelets as Mediators of Thromboinflammation in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Frontiers in Immunology.* 2019;10(1373).
12. Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017;2017(1):470-9.
13. Falchi L, Kantarjian HM, Verstovsek S. Assessing the thrombotic risk of patients with essential thrombocythemia in the genomic era. *Leukemia.* 2017;31(9):1845-54.
14. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology.* 2019;94(1):133-43.
15. Babon JJ, Lucet IS, Murphy JM, Nicola NA, Varghese LN. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem J.* 2014;462(1):1-13.
16. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica.* 2006;91(2):169-75.
17. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol.* 2007;35(5):702-11.
18. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol.* 2011;29(23):3179-84.
19. Hauschner H, Bokstad Horev M, Misgav M, Nagar M, Seligsohn U, Rosenberg N, et al. Platelets from Calreticulin mutated essential thrombocythemia patients are less reactive than JAK2 V617F mutated platelets. *Am J Hematol.* 2019.

## LITERATURVERZEICHNIS

20. Ashorobi D GPETET, ET) [Updated 2020 Jun 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539709/>.
21. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
22. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization–essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012;120(26):5128-33.
23. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood*. 2011;117(22):5857-9.
24. Panayiotis DZ. Effect of JAK2 V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: measuring the uncertain. *Haematologica*. 2008;93(9):1412-4.
25. Leitlinien der DGHO\_Essentielle (oder primäre) Thrombozythämie (ET) [Internet]. [cited 04.11.2020]. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/essentielle-oder-primare-thrombozythaemie-et/@@guideline/html/index.html>.
26. Radsak M, Theobald M. BP\_Essentielle Thrombozythämie (ET) (D25940). III. Medizinische Klinik & Leukämie-/Lymphom Centrum (LLC)/Standards (STD): Universitätsmedizin Mainz; 30.09.2020.
27. Barbui T, Vannucchi AM, Buxhofer-Ausch V, De Stefano V, Betti S, Rambaldi A, et al. Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia. *Blood cancer journal*. 2015;5(11):e369-e.
28. Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(22):2168-81.
29. Tefferi A, Pardanani A. Essential Thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2019;381(22):2135-44.
30. López Rubio M, Argüello Marina M. The Current Role of Hydroxyurea in the Treatment of Sickle Cell Anemia. *J Clin Med*. 2024;13(21).
31. Campbell PJ, MacLean C, Beer PA, Buck G, Wheatley K, Kiladjan JJ, et al. Correlation of blood counts with vascular complications in essential thrombocythemia: analysis of the prospective PT1 cohort. *Blood*. 2012;120(7):1409-11.
32. Rumi E, Cazzola M. How I treat essential thrombocythemia. *Blood*. 2016;128(20):2403-14.
33. Yetiskul E, Nisar A, Khan S, Qaqish F, Khan D, Bershadskiy A. A Case of acute Myocardial Infarction in a Patient with Essential Thrombocythaemia Treated with Anagrelide. *Eur J Case Rep Intern Med*. 2024;11(3):004340.
34. Zhang P, Xu H, Zhao X, Qi Z, Yao Y, Zhao Q, et al. Anagrelide alleviates myocardial ischaemia–reperfusion injury by inhibiting reticulated platelets. *Medical Hypotheses*. 2023;181:111193.
35. Geliert DB. Rote-Hand-Brief zu Xagrid® (Wirkstoff Anagrelidhydrochlorid): Schwerwiegende kardiovaskuläre unerwünschte Ereignisse. 2013.
36. Bewersdorf JP, Giri S, Wang R, Podoltsev N, Williams RT, Tallman MS, et al. Interferon alpha therapy in essential thrombocythemia and polycythemia vera-a systematic review and meta-analysis. *Leukemia*. 2021;35(6):1643-60.

37. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(16):2507-13; quiz 615.
38. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*. 2021;96(1):145-62.
39. Passamonti F, Mora B, Barraco D, Maffioli M. Post-ET and Post-PV Myelofibrosis: Updates on a Distinct Prognosis from Primary Myelofibrosis. *Curr Hematol Malig Rep*. 2018;13(3):173-82.
40. Jurk K, Kehrel B. Die Rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose, Immunabwehr und Entzündung. *Deutsche Medizinische Wochenschrift - DEUT MED WOCHENSCHR*. 2008;133:1130-5.
41. Quach ME, Chen W, Li R. Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. *Blood*. 2018;131(14):1512-21.
42. Löffler.Petrides.Heinrich. "Biochemie und Pathobiochemie": Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2007.
43. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 4., vollständig überarbeitete Auflage ed: Thieme, Stuttgart; 2012.
44. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007;317(5845):1767-70.
45. van der Meijden P, Heemskerk J. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*. 2018;16:1.
46. Jurk K, Kehrel BE. Pathophysiologie und Biochemie der Thrombozyten. *Der Internist*. 2010;51(9):1086-94.
47. Jurk K. Platelet granules – secretory and secretive. *Hamostaseologie*. 2017;37(03):208-10.
48. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1687-93.
49. Gawaz MP. Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung; 31 Tabellen/ Meinrad Gawaz. Stuttgart; New York: Thieme; 1999.
50. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31(4):381-92.
51. Flaumenhaft R. Platelet secretion. In: Gresele P, KNS, Lopez J.A., Page C.P., editors. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders*. Springer International Publishing; Cham, Switzerland: 2017. pp. 353–366.
52. Jurk K, Kehrel B. Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase. *Hämostaseologie*. 2005;25:39-49.
53. Brambilla M, Becchetti A, Rovati GE, Cosentino N, Conti M, Canzano P, et al. Cell Surface Platelet Tissue Factor Expression: Regulation by P2Y(12) and Link to Residual Platelet Reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2023;43(10):2042-57.
54. Estevez B, Kim K, Delaney MK, Stojanovic-Terpo A, Shen B, Ruan C, et al. Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood*. 2016;127(5):626-36.
55. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thromb Res*. 2012;129(3):250-6.

## LITERATURVERZEICHNIS

56. Jurk K. Analysis of platelet function and dysfunction. *Hamostaseologie*. 2015;35(1):60-72.
57. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93(1):327-58.
58. May F, Hagedorn I, Pleines I, Bender M, Vögtle T, Eble J, et al. CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood*. 2009;114(16):3464-72.
59. Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res*. 2007;120 Suppl 1(Suppl 1):S5-9.
60. Rassow J. *Biochemie : 67 Tabellen. Duale Reihe. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed.* Stuttgart2012.
61. Li X, Wang Q. Platelet-Derived Microparticles and Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023;24(12).
62. Spakova T, Janockova J, Rosocha J. Characterization and Therapeutic Use of Extracellular Vesicles Derived from Platelets. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18).
63. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(9):1381-9.
64. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(1):41-8.
65. Pötzsch, Madlener. *Hämostaseologie. Grundlagen, Diagnostik und Therapie: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 2010.*
66. Wiiger M, Prydz H. The changing faces of tissue factor biology - A personal tribute to the understanding of the "extrinsic coagulation activation". *Thrombosis and haemostasis*. 2007;98:38-42.
67. Shantsila E, Lip GY. The role of monocytes in thrombotic disorders. Insights from tissue factor, monocyte-platelet aggregates and novel mechanisms. *Thromb Haemost*. 2009;102(5):916-24.
68. Hoffman M. Platelet-dependent action of high-dose factor VIIa. *Blood*. 2002;100:364a-6.
69. Munnix IC, Kuijpers MJ, Auger J, Thomassen CM, Panizzi P, van Zandvoort MA, et al. Segregation of platelet aggregatory and procoagulant microdomains in thrombus formation: regulation by transient integrin activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2484-90.
70. Stief T. Fibrinmonomere, lösliche. In: Gressner A.M., Arndt T. (eds) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg.: Springer Reference Medizin; 2019.
71. Gresele P, Kleiman N, Lopez J, Page C. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update2017.
72. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1800-14.
73. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*. 2006;99(12):1293-304.
74. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(12):6642-6.
75. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 1998;394(6694):690-4.
76. Dörmann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood*. 2000;96(7):2469-78.

## LITERATURVERZEICHNIS

77. al ADMe. Platelets 3rd Edition. Netherlands: Amsterdam : Academic Press; 2013.
78. Rasso J. Biochemie : 660 Abbildungen, 50 Tabellen. Duale Reihe. 2., aktualisierte Aufl. ed. Stuttgart2008.
79. Ariëns RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood*. 2002;100(3):743-54.
80. Panova-Noeva M, Marchetti M, Russo L, Tartari CJ, Leuzzi A, Finazzi G, et al. ADP-induced platelet aggregation and thrombin generation are increased in Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. *Thromb Res*. 2013;132(1):88-93.
81. Mumford AD, Frelinger AL, 3rd, Gachet C, Gresele P, Noris P, Harrison P, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost*. 2015;114(1):14-25.
82. Shattil SJ, Brass LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem*. 1987;262(3):992-1000.
83. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:781857.
84. Dorsam RT, Tuluc M, Kunapuli SP. Role of protease-activated and ADP receptor subtypes in thrombin generation on human platelets. *J Thromb Haemost*. 2004;2(5):804-12.
85. van der Meijden PE, Feijge MA, Giesen PL, Huijberts M, van Raak LP, Heemskerk JW. Platelet P2Y12 receptors enhance signalling towards procoagulant activity and thrombin generation. A study with healthy subjects and patients at thrombotic risk. *Thromb Haemost*. 2005;93(6):1128-36.
86. Döhrmann M, Makhoul S, Gross K, Krause M, Pillitteri D, von Auer C, et al. CD36-fibrin interaction propagates FXI-dependent thrombin generation of human platelets. *The FASEB Journal*. 2020;34(7):9337-57.
87. Fijnheer R, Boomgaard MN, van den Eertwegh AJ, Homburg CH, Gouwerok CW, Veldman HA, et al. Stored platelets release nucleotides as inhibitors of platelet function. *Thromb Haemost*. 1992;68(5):595-9.
88. Fritsma GA. Platelet Function Testing: Aggregometry and Lumiaggregometry. American Society for Clinical Laboratory Science. 2007;20(1):32-7.
89. DiaSys\_Deutschland\_Vertriebs-GmbH. Arachidonsäure - Reagenz für die Aggregation. Gebrauchsanleitung [Internet]. Stand: 2016-11-24\_abgerufen am 19.02.2021. Available from: <https://www.diasys-deutschland.de/produkte/reagenzien/gerinnungsdiagnostika/reagent-details/140-arachidonsaeure/reagent.show>.
90. Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, et al. Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood*. 1998;91(2):491-9.
91. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res*. 2004;114(4):221-33.
92. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Muzykantov VR, Idelson GL, Rukosuev VS. Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Coll Relat Res*. 1985;5(4):355-68.
93. de Witt SM, Swieringa F, Cavill R, Lamers MME, van Kruchten R, Mastenbroek T, et al. Identification of platelet function defects by multi-parameter assessment of thrombus formation. *Nature Communications*. 2014;5(1):4257.

## LITERATURVERZEICHNIS

94. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991;64(6):1057-68.
95. Lau LF, Pumiglia K, Côté YP, Feinstein MB. Thrombin-receptor agonist peptides, in contrast to thrombin itself, are not full agonists for activation and signal transduction in human platelets in the absence of platelet-derived secondary mediators. *Biochem J*. 1994;303 ( Pt 2)(Pt 2):391-400.
96. Prado-Franceschi J, Brazil OV. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*. 1981;19(6):875-87.
97. Francischetti IM, Saliou B, Leduc M, Carlini CR, Hatmi M, Randon J, et al. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. *Toxicon*. 1997;35(8):1217-28.
98. Polgár J, Clemetson J, Kehrel B, Wiedemann M, Magnenat E, Wells T, et al. Platelet Activation and Signal Transduction by Convulxin, a C-type Lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical Rattlesnake) Venom via the p62/GPVI Collagen Receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:13576-83.
99. Francischetti IMB, Ghazaleh FA, Reis RAM, Carlini CR, Guimarães JA. Convulxin Induces Platelet Activation by a Tyrosine-Kinase-Dependent Pathway and Stimulates Tyrosine Phosphorylation of Platelet Proteins, Including PLC $\gamma$ 2, Independently of Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998;353(2):239-50.
100. Howard MA, Firkin BG. Ristocetin--a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh*. 1971;26(2):362-9.
101. Papi M, Maulucci G, De Spirito M, Missori M, Arcovito G, Lancellotti S, et al. Ristocetin-induced self-aggregation of von Willebrand factor. *Eur Biophys J*. 2010;39(12):1597-603.
102. Frontroth JP, Favalaro EJ. Ristocetin-Induced Platelet Aggregation (RIPA) and RIPA Mixing Studies. *Methods Mol Biol*. 2017;1646:473-94.
103. Kleiveland CR. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*. Springer International Publishing; 2015. p. 161-7.
104. López-Expósito I. Innate and Adaptive Immune Cells: General Introduction. In: Verhoeckx K CP, López-Expósito I, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models [Internet]*. Cham (CH): Springer; 2015. Part III. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500173/?report=classic>.
105. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):34-45.
106. Swystun LL, Liaw PC. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood*. 2016;128(6):753-62.
107. Peshkova AD, Le Minh G, Tutwiler V, Andrianova IA, Weisel JW, Litvinov RI. Activated Monocytes Enhance Platelet-Driven Contraction of Blood Clots via Tissue Factor Expression. *Scientific Reports*. 2017;7(1):5149.
108. Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood*. 2005;105(7):2764-70.
109. Osterud B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998;9 Suppl 1:S9-14.
110. Coucelo M, Caetano G, Sevivas T, Almeida Santos S, Fidalgo T, Bento C, et al. JAK2V617F allele burden is associated with thrombotic mechanisms activation in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients. *Int J Hematol*. 2014;99(1):32-40.

## LITERATURVERZEICHNIS

111. Singbartl K, Forlow SB, Ley K. Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *Faseb j.* 2001;15(13):2337-44.
112. Simon DI, Ezratty AM, Francis SA, Rennke H, Loscalzo J. Fibrin(ogen) is internalized and degraded by activated human monocytoïd cells via Mac-1 (CD11b/CD18): a nonplasmin fibrinolytic pathway. *Blood.* 1993;82(8):2414-22.
113. Bar-Shavit R, Kahn A, Wilner G, Fenton J. Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin. *Science.* 1983;220(4598):728-31.
114. Naldini A, Sower L, Bocci V, Meyers B, Carney DH. Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation. *J Cell Physiol.* 1998;177(1):76-84.
115. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962;194:927-9.
116. CORP C-L. Instruction manual for the chrono-log® model 700 whole blood Lumi-aggregometry, Document #700IM1, Revision 8.7. July 2018.
117. BORN GV. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *The Journal of physiology.* 1962;162(Suppl):67P. 1962.
118. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:133-48.
119. BORN GV, CROSS MJ. THE AGGREGATION OF BLOOD PLATELETS. *J Physiol.* 1963;168:178-95.
120. Holmsen H, Holmsen I, Bernhardsen A. Microdetermination of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate in plasma with firefly luciferase system. *Anal Biochem.* 1966;17(3):456-73.
121. Kronick PL, Jimenez SA. Simultaneous aggregation and release from platelets monitored continuously in plasma. *Thrombosis Research.* 1976;9(6):553-63.
122. Lundin A, Rickardsson A, Thore A. Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Anal Biochem.* 1976;75(2):611-20.
123. Feinman RD, Lubowsky J, Charo I, Zabinski MP. The lumi-aggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets. *J Lab Clin Med.* 1977;90(1):125-9.
124. Ramakrishnan V, DeGuzman F, Bao M, Hall SW, Leung LL, Phillips DR. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1823-8.
125. Holmsen H, Dangelmaier CA. [16] Measurement of secretion of adenine nucleotides. *Methods in Enzymology.* 169: Academic Press; 1989. p. 195-205.
126. Holmsen H, Weiss HJ. Further evidence for a deficient storage pool of adenine nucleotides in platelets from some patients with thrombocytopathia--"storage pool disease". *Blood.* 1972;39(2):197-209.
127. Weiss HJ, Witte LD, Kaplan KL, Lages BA, Chernoff A, Nossel HL, et al. Heterogeneity in storage pool deficiency: studies on granule-bound substances in 18 patients including variants deficient in alpha-granules, platelet factor 4, beta-thromboglobulin, and platelet-derived growth factor. *Blood.* 1979;54(6):1296-319.
128. Dawood BB, Lowe GC, Lordkipanidzé M, Bem D, Daly ME, Makris M, et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood.* 2012;120(25):5041-9.
129. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(1):4-15.

130. De Smedt E, Al Dieri R, Spronk HM, Hamulyak K, ten Cate H, Hemker HC. The technique of measuring thrombin generation with fluorogenic substrates: 1. Necessity of adequate calibration. *Thromb Haemost.* 2008;100(2):343-9.
131. Peter Giesen M, PHD. The Thrombogram Guide\_Outline of the method to measure thrombin generation using the Calibrated Automated Thrombogram assay: Thrombinoscope bv\_company of Stago Group; May 2012.
132. Haemochrom Diagnostica GmbH. Thrombin generation, *Biochemistry* 2021 [updated 04.08.2021; cited 2021 04.08.]. Available from: <https://www.haemochrom.de/en/produkte/general-haemostasis/thrombin-generation>.
133. Mihaila RG. Thrombin generation - a potentially useful biomarker of thrombotic risk in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2017;161(1):50-3.
134. Hemker HC, Kremers R. Data management in thrombin generation. *Thromb Res.* 2013;131(1):3-11.
135. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoort R, Béguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost.* 2000;83(4):589-91.
136. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32(5-6):249-53.
137. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost.* 2006;96(5):553-61.
138. Franchini M, Mannucci PM. Acquired von Willebrand syndrome: focused for hematologists. *Haematologica.* 2020;105(8):2032-7.
139. Althaus K, Zieger B, Bakchoul T, Jurk K. Standardization of Light Transmission Aggregometry for Diagnosis of Platelet Disorders: An Inter-Laboratory External Quality Assessment. *Thromb Haemost.* 2019;119(7):1154-61.
140. Liozon E, Brigaudeau C, Trimoreau F, Desangles F, Fermeaux V, Praloran V, et al. Is treatment with hydroxyurea leukemogenic in patients with essential thrombocythemia? An analysis of three new cases of leukaemic transformation and review of the literature. *Hematol Cell Ther.* 1997;39(1):11-8.
141. Shirane S, Araki M, Morishita S, Edahiro Y, Sunami Y, Hironaka Y, et al. Consequences of the JAK2V617F allele burden for the prediction of transformation into myelofibrosis from polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Int J Hematol.* 2015;101(2):148-53.
142. Herklotz, Lüthi, Ottiger, Huber. Referenzbereiche in der Hämatologie. *Therapeutische Umschau.* 2006;63(1):5-24.
143. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia.* 2005;19(10):1847-9.
144. Hayward CP, Pai M, Liu Y, Moffat KA, Seecharan J, Webert KE, et al. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J Thromb Haemost.* 2009;7(4):676-84.
145. Finazzi G, Budde U, Michiels JJ. Bleeding time and platelet function in essential thrombocythemia and other myeloproliferative syndromes. *Leuk Lymphoma.* 1996;22 Suppl 1:71-8.
146. Spaet TH, Lejnieks I, Gaynor E, Goldstein ML. Defective Platelets in Essential Thrombocythemia. *Archives of Internal Medicine.* 1969;124(2):135-41.

147. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood*. 2007;109(6):2285-92.
148. Frishman WH LR, Klein MD, Roganovic M (2003): Antiplatelet and antithrombotic drugs. In: Fr-ishman WH, Sonnenblick EH, Sica DA, eds. *Cardiovascular Pharmaceutics*. New York, NY: McGraw Hill: 259-299.
149. Shimokawa T, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthase. The aspirin acetylation region. *J Biol Chem*. 1992;267(17):12387-92.
150. Brace LD. Qualitative platelet disorders. *Clin Lab Sci*. 2007;20(1):48-55.
151. Courtwright WE; Buchanan JO. Fleming JS TR. The effect of multiple oral doses of anagrelide on ADP and collagen-induced platelet aggregation in normal male subjects: *American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics* 33: 220; 1983.
152. Tang SS, Frojmovic MM. Inhibition of platelet function by antithrombotic agents which selectively inhibit low-Km cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase. *J Lab Clin Med*. 1980;95(2):241-57.
153. Tefferi A, Silverstein MN, Petitt RM, Mesa RA, Solberg LA. Anagrelide as a New Platelet-Lowering Agent in Essential Thrombocythemia: Mechanism of Action, Efficacy, Toxicity, Current Indications. *Semin Thromb Hemost*. 1997;23(04):379-83.
154. Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, Finazzi G, Budde U, van Vliet HHDM. The Paradox of Platelet Activation and Impaired Function: Platelet-von Willebrand Factor Interactions, and the Etiology of Thrombotic and Hemorrhagic Manifestations in Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32(06):589-604.
155. MAUGERI N, GIORDANO G, PETRILLI MP, FRATICELLI V, DE GAETANO G, CERLETTI C, et al. Inhibition of tissue factor expression by hydroxyurea in polymorphonuclear leukocytes from patients with myeloproliferative disorders: a new effect for an old drug? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4(12):2593-8.
156. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2000;96(13):4261-6.
157. Schafer AI. Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood*. 1984;64(1):1-12.
158. Rocca B, Tosoletto A, Betti S, Soldati D, Petrucci G, Rossi E, et al. A randomized double-blind trial of 3 aspirin regimens to optimize antiplatelet therapy in essential thrombocythemia. *Blood*. 2020;136(2):171-82.
159. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(2):162-77.
160. Aliotta A, Bertaggia Calderara D, Zermatten MG, Marchetti M, Alberio L. Thrombocytopenias: Not Just Aggregation Defects-The Clinical Relevance of Procoagulant Platelets. *J Clin Med*. 2021;10(5).
161. Bellucci S, Huisse MG, Boval B, Hainaud P, Robert A, Fauvel-Lafève F, et al. Defective collagen-induced platelet activation in two patients with malignant haemopathies is related to a defect in the GPVI-coupled signalling pathway. *Thromb Haemost*. 2005;93(1):130-8.
162. Podda G, Femia EA, Pugliano M, Cattaneo M. Congenital defects of platelet function. *Platelets*. 2012;23(7):552-63.
163. Ricksten A, Palmqvist L, Johansson P, Andreasson B. Rapid decline of JAK2V617F levels during hydroxyurea treatment in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008;93(8):1260-1.

164. Zentiva Pharma GmbH. Fachinformation\_1. Bezeichnung des Arzneimittels\_Letrozol Winthrop® 2,5 mg Filmtabletten [updated Oktober 2019; cited 2021 10.08.]. Available from: [https://www.zentiva.de/-/media/files/zentivade/produkte/letrozol-winthrop-25-mg-filmtabletten/\\_de\\_fi\\_letrozol\\_winthrop\\_25mg.pdf](https://www.zentiva.de/-/media/files/zentivade/produkte/letrozol-winthrop-25-mg-filmtabletten/_de_fi_letrozol_winthrop_25mg.pdf).
165. Mannucci PM, Vaglini M, Maniezzo M, Magni E, Mari D, Cascinelli N. Hemostatic alterations are unrelated to the stage of tumor in untreated malignant melanoma and breast carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1985;21(6):681-5.
166. Levine M, Hirsh J. The diagnosis and treatment of thrombosis in the cancer patient. *Semin Oncol.* 1990;17(2):160-71.
167. Luzzatto G, Schafer AI. The prethrombotic state in cancer. *Semin Oncol.* 1990;17(2):147-59.
168. Al Dieri R, De Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: What have we learned? *Blood Reviews.* 2012;26(5):197-203.
169. Dahlbäck B. Blood coagulation. *The Lancet.* 2000;355(9215):1627-32.
170. Panova-Noeva M, Schulz A, Spronk HM, Beicht A, Laubert-Reh D, van Oerle R, et al. Clinical Determinants of Thrombin Generation Measured in Presence and Absence of Platelets—Results from the Gutenberg Health Study. *Thromb Haemost.* 2018;118(05):873-82.
171. Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood.* 2005;106(8):2605-12.
172. Marchetti M, Tartari CJ, Russo L, Panova-Noeva M, Leuzzi A, Rambaldi A, et al. Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with essential thrombocythemia. *American Journal of Hematology.* 2014;89(1):68-73.
173. Ziolkowska K, Boinska J, Gadomska G, Wieczór R, Rość D. Inhibitors of the blood coagulation process in patients with essential thrombocythemia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2020;31(3):219-24.
174. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HMH, van Oerle R, Balducci D, Barbui T, et al. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 2008;112(10):4061-8.
175. Kyrle PA, Westwick J, Scully MF, Kakkar VV, Lewis GP. Investigation of the interaction of blood platelets with the coagulation system at the site of plug formation in vivo in man--effect of low-dose aspirin. *Thromb Haemost.* 1987;57(1):62-6.
176. ALTMAN R, SCAZZIOTA A, DE LOURDES HERRERA M, GONZALEZ C. Recombinant factor VIIa reverses the inhibitory effect of aspirin or aspirin plus clopidogrel on in vitro thrombin generation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2006;4(9):2022-7.
177. Altman R, Scazziota AS, Herrera MdL, Gonzalez C. Thrombin generation by activated factor VII on platelet activated by different agonists. Extending the cell-based model of hemostasis. *Thrombosis Journal.* 2006;4(1):5.
178. Bjornsson TD, Schneider DE, Berger H, Jr. Aspirin acetylates fibrinogen and enhances fibrinolysis. Fibrinolytic effect is independent of changes in plasminogen activator levels. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;250(1):154-61.
179. Villanueva GB, Allen N. Acetylation of antithrombin III by aspirin. *Semin Thromb Hemost.* 1986;12(3):213-5.
180. Hua VM, Abeynaike L, Glaros E, Campbell H, Pasalic L, Hogg PJ, et al. Necrotic platelets provide a procoagulant surface during thrombosis. *Blood.* 2015;126(26):2852-62.

181. Panova-Noeva M, Marchetti M, Spronk HM, Russo L, Diani E, Finazzi G, et al. Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *American Journal of Hematology*. 2011;86(4):337-42.
182. Panova-Noeva M, van der Meijden PEJ, Ten Cate H. Clinical Applications, Pitfalls, and Uncertainties of Thrombin Generation in the Presence of Platelets. *J Clin Med*. 2019;9(1).
183. Alvarez-Larrán A, Arellano-Rodrigo E, Reverter JC, Domingo A, Villamor N, Colomer D, et al. Increased platelet, leukocyte, and coagulation activation in primary myelofibrosis. *Annals of Hematology*. 2008;87(4):269-76.
184. Hasselbalch HC. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer? *Blood*. 2012;119(14):3219-25.
185. Bhuria V, Baldauf CK, Schraven B, Fischer T. Thromboinflammation in Myeloproliferative Neoplasms (MPN)—A Puzzle Still to Be Solved. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(6):3206.
186. Lussana F, Rambaldi A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J Autoimmun*. 2017;85:58-63.
187. Hasselbalch HC, Elvers M, Schafer AI. The pathobiology of thrombosis, microvascular disease, and hemorrhage in the myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2021;137(16):2152-60.
188. Reeves BN, Beckman JD. Novel Pathophysiological Mechanisms of Thrombosis in Myeloproliferative Neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*. 2021;16(3):304-13.
189. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2005;33(5):523-30.
190. Tripodi A, Chantarangkul V, Gianniello F, Clerici M, Lemma L, Padovan L, et al. Global coagulation in myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*. 2013;92(12):1633-9.
191. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R, et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;109(6):2446-52.

## 8 ANHANG

### 8.1 TABELLEN: MINIMA, MEDIANE, MAXIMA, PERZENTILE, RANGES

#### 8.1.1 Agonisten-induzierte thrombozytäre Aggregation (mittels Chronolog)

Legende: *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, TRAP-6 = Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6, mg = Milligramm,  $\mu\text{M}$  = Mikromolar,  $\mu\text{g}$  = Mikrogramm, ml = Milliliter

Arachidonsäure (0,5 mg/ml)						
Gruppe	<i>JAK2</i> +HU	<i>JAK2</i> -HU	<i>CALR</i> +HU	<i>CALR</i> -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	3	5	1	2	9	9
Aggregation [%]						
Minimum	0	0	0	0	0	64
25 % Percentile	0	0	0	0	0	66
Median	0	0	0	30,5	0	69
75 % Percentile	0	33	0	61	0,5	74
Maximum	0	65	0	61	3	79
Range	0	65	0	61	3	15
Mean	0	13,2	0	30,5	0,4444	70,44
Std. Deviation	0	28,96	0	43,13	1,014	4,902
Std. Error of Mean	0	12,95	0	30,5	0,3379	1,634

Kollagen (2 $\mu\text{g}$ /ml)						
Gruppe	<i>JAK2</i> +HU	<i>JAK2</i> -HU	<i>CALR</i> +HU	<i>CALR</i> -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	9	9
Aggregation [%]						
Minimum	2	1	3	2	1	1
25 % Percentile	2,5	1	3	2	1,5	4
Median	7,5	2	3	5	2	35
75 % Percentile	61,25	2,5	3	8	6,5	69
Maximum	78	4	3	8	23	77
Range	76	3	0	6	22	76

ANHANG

Mean	23,75	2	3	5	5,222	35,89
Std. Deviation	36,37	1,095	0	4,243	7,207	32,29
Std. Error of Mean	18,19	0,4472	0	3	2,402	10,76

<b>Kollagen (10µg/ml)</b>						
<b>Gruppe</b>	<i>JAK2</i> <b>+HU</b>	<i>JAK2</i> <b>-HU</b>	<i>CALR</i> <b>+HU</b>	<i>CALR</i> <b>-HU</b>	Kontrollen <b>+ ASS</b>	Kontrollen <b>- ASS</b>
<b>n</b>	4	6	1	2	9	9
<b>Aggregation [%]</b>						
Minimum	12	15	36	18	57	70
25 % Percentile	19,75	30	36	18	59,5	72,5
Median	50,5	41	36	47	70	76
75 % Percentile	70,75	62,25	36	76	75	77
Maximum	75	75	36	76	82	84
Range	63	60	0	58	25	14
Mean	47	44,17	36	47	68,22	75,67
Std. Deviation	26,75	20,83	0	41,01	8,526	4,062
Std. Error of Mean	13,37	8,503	0	29	2,842	1,354

<b>TRAP-6 (10µM)</b>						
<b>Gruppe</b>	<i>JAK2</i> <b>+HU</b>	<i>JAK2</i> <b>-HU</b>	<i>CALR</i> <b>+HU</b>	<i>CALR</i> <b>-HU</b>	Kontrollen <b>+ ASS</b>	Kontrollen <b>- ASS</b>
<b>n</b>	4	6	1	2	9	9
<b>Aggregation [%]</b>						
Minimum	0	0	10	0	1	12
25 % Percentile	0,25	0	10	0	11	19
Median	13,5	4,5	10	7	20	35
75 % Percentile	59	38	10	14	48,5	73,5
Maximum	70	53	10	14	52	81
Range	70	53	0	14	51	69
Mean	24,25	15,83	10	7	28,33	43,56
Std. Deviation	32,79	22,18	0	9,899	20,06	27,35
Std. Error of Mean	16,39	9,053	0	7	6,687	9,115

<b>TRAP-6 (50µM)</b>						
----------------------	--	--	--	--	--	--

ANHANG

<b>Gruppe</b>	<i>JAK2</i> <b>+HU</b>	<i>JAK2</i> <b>-HU</b>	<i>CALR</i> <b>+HU</b>	<i>CALR</i> <b>-HU</b>	Kontrollen <b>+ ASS</b>	Kontrollen <b>- ASS</b>
<b>n</b>	4	6	1	2	9	9
<b>Aggregation [%]</b>						
Minimum	46	37	21	56	57	70
25 % Percentile	50,25	40	21	56	65,5	70
Median	66,5	59	21	62	73	74
75 % Percentile	76	79,5	21	68	76,5	79
Maximum	78	90	21	68	80	82
Range	32	53	0	12	23	12
Mean	64,25	60,33	21	62	71,22	74,44
Std. Deviation	13,62	20,25	0	8,485	7,276	4,72
Std. Error of Mean	6,811	8,265	0	6	2,425	1,573

## 8.1.2 Agonisten-induzierte thrombozytäre ATP-Freisetzung (mittels Chronolog)

Legende: *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, TRAP-6 = Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6,  $\mu\text{M}$  = Mikromolar,  $\mu\text{g}$  = Mikrogramm, ml = Milliliter, ATP = Adenosintriphosphat, nmol = Nanomol, TZ = Thrombozyten

Kollagen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )						
Gruppe	<i>JAK2</i> +HU	<i>JAK2</i> -HU	<i>CALR</i> +HU	<i>CALR</i> -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	9	9
ATP-Freisetzung [nmol/2x10 <sup>8</sup> TZ/ml]						
Minimum	0	0	0,18	0	0,21	0,54
25 % Percentile	0,06	0,1725	0,18	0	0,415	0,585
Median	0,25	0,3	0,18	0,11	0,48	0,96
75 % Percentile	0,5375	0,4175	0,18	0,22	0,745	1,04
Maximum	0,63	0,62	0,18	0,22	0,88	1,58
Range	0,63	0,62	0	0,22	0,67	1,04
Mean	0,2825	0,3	0,18	0,11	0,5367	0,8933
Std. Deviation	0,26	0,2024	0	0,1556	0,2112	0,3303
Std. Error of Mean	0,13	0,08262	0	0,11	0,07042	0,1101

TRAP-6 (50 $\mu\text{M}$ )						
Gruppe	<i>JAK2</i> +HU	<i>JAK2</i> -HU	<i>CALR</i> +HU	<i>CALR</i> -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	9	9
ATP-Freisetzung [nmol/2x10 <sup>8</sup> TZ/ml]						
Minimum	0	0,17	0,22	0,33	0,21	0,63
25 % Percentile	0,1025	0,275	0,22	0,33	0,485	0,84
Median	0,435	0,5	0,22	0,355	0,69	1,33
75 % Percentile	0,685	0,59	0,22	0,38	1,22	1,435
Maximum	0,76	0,77	0,22	0,38	1,52	2,04
Range	0,76	0,6	0	0,05	1,31	1,41
Mean	0,4075	0,4633	0,22	0,355	0,8	1,254
Std. Deviation	0,3126	0,2057	0	0,03536	0,4335	0,4337
Std. Error of Mean	0,1563	0,08397	0	0,025	0,1445	0,1446

### 8.1.3 Plasmatische Thrombingenerierung (mittels CAT)

Legende: PFP = Thrombozyten-freies Plasma, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, min = Minuten, ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, nM = Nanomolar, ETP = endogenes Thrombin Potential

PFP mit 5 pM TF						
Gruppe	<i>JAK2</i> +HU	<i>JAK2</i> -HU	<i>CALR</i> +HU	<i>CALR</i> -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10
Lag time [min]						
Minimum	2,78	2,89	4,33	3,67	3	3
25 % Percentile	3,003	3,138	4,33	3,67	3	3,083
Median	3,725	3,615	4,33	4,445	3,275	3,32
75 % Percentile	4,508	5,415	4,33	5,22	3,78	3,725
Maximum	4,75	8,67	4,33	5,22	4,22	4
Range	1,97	5,78	0	1,55	1,22	1
Mean	3,745	4,39	4,33	4,445	3,378	3,407
Std. Deviation	0,8058	2,152	0	1,096	0,4264	0,3583
Std. Error of Mean	0,4029	0,8784	0	0,775	0,1348	0,1133
ttPeak [min]						
Minimum	5,56	5,22	7,89	6,56	5,22	5,78
25 % Percentile	5,81	5,475	7,89	6,56	5,835	5,973
Median	6,89	6,61	7,89	7,225	6,445	6,385
75 % Percentile	8,21	10,2	7,89	7,89	6,81	6,903
Maximum	8,54	11,78	7,89	7,89	7,89	7,44
Range	2,98	6,56	0	1,33	2,67	1,66
Mean	6,97	7,575	7,89	7,225	6,416	6,451
Std. Deviation	1,249	2,592	0	0,9405	0,7987	0,5392
Std. Error of Mean	0,6247	1,058	0	0,665	0,2526	0,1705
Thrombin Peak [nM]						
Minimum	267,5	124,8	269,3	288,8	224,3	252,6
25 % Percentile	274,7	169,8	269,3	288,8	249	263,3
Median	299,7	262,5	269,3	303,4	273,5	282,5
75 % Percentile	311,4	316,7	269,3	318,1	307,3	333,2

ANHANG

Maximum	314,2	361,3	269,3	318,1	339,9	353,6
Range	46,64	236,5	0	29,3	115,6	100,9
Mean	295,3	249,6	269,3	303,4	277,1	293,3
Std. Deviation	19,9	84,06	0	20,72	35,39	37,85
Std. Error of Mean	9,95	34,32	0	14,65	11,19	11,97
<b>ETP [nMxmin]</b>						
Minimum	1569	721,4	1881	1560	1259	1467
25 % Percentile	1603	1259	1881	1560	1529	1537
Median	1740	1548	1881	1629	1637	1675
75 % Percentile	2011	1729	1881	1698	1719	1879
Maximum	2090	1762	1881	1698	1957	1964
Range	521,2	1041	0	137,9	697,6	497
Mean	1785	1456	1881	1629	1622	1695
Std. Deviation	220,7	380,1	0	97,51	187,6	181
Std. Error of Mean	110,3	155,2	0	68,95	59,31	57,23

### 8.1.4 Thrombozytäre Thrombingenerierung (mittels CAT)

Legende: PFP = Thrombozyten-freies Plasma, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, min = Minuten, ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, nM = Nanomolar, ETP = endogenes Thrombin Potential, PRP = Plättchen-reiches Plasma, U = Units, ml = Milliliter, ng = Nanogramm

<b>PRP basal</b>					
<b>Gruppe</b>	<b>JAK2 +HU</b>	<b>JAK2 -HU</b>	<b>CALR -HU</b>	<b>Kontrollen + ASS</b>	<b>Kontrollen - ASS</b>
<b>n</b>	4	3	1	9	7
<b>Lag time [min]</b>					
Minimum	21,11	32	31,22	23,22	17,44
25 % Percentile	22,41	32	31,22	23,28	21,22
Median	28,65	44	31,22	24,33	21,83
75 % Percentile	33,75	50,22	31,22	26,34	28,5
Maximum	34,67	50,22	31,22	38,78	32,11
Range	13,56	18,22	0	15,56	14,67

## ANHANG

Mean	28,27	42,07	31,22	26,04	24,1
Std. Deviation	5,876	9,262	0	4,946	5,042
Std. Error of Mean	2,938	5,347	0	1,649	1,906
<b>ttPeak [min]</b>					
Minimum	30,67	40,78	43,22	33,67	29,89
25 % Percentile	33	40,78	43,22	36,17	33,44
Median	40,24	55,5	43,22	38,11	37,67
75 % Percentile	44,87	57,11	43,22	40,84	42,17
Maximum	46,33	57,11	43,22	46,11	43,56
Range	15,66	16,33	0	12,44	13,67
Mean	39,37	51,13	43,22	38,82	37,7
Std. Deviation	6,475	8,999	0	3,661	4,819
Std. Error of Mean	3,237	5,196	0	1,22	1,821
<b>Thrombin Peak [nM]</b>					
Minimum	37,32	15,82	55,06	23,23	19,93
25 % Percentile	42,21	15,82	55,06	26,57	22,99
Median	61,52	32	55,06	48,11	55,33
75 % Percentile	76,59	50,16	55,06	59,27	70,67
Maximum	80,07	50,16	55,06	76,78	77,23
Range	42,75	34,34	0	53,55	57,3
Mean	60,11	32,66	55,06	46,17	50,83
Std. Deviation	17,93	17,18	0	18,32	21,96
Std. Error of Mean	8,967	9,919	0	6,107	8,298
<b>ETP [nMxmin]</b>					
Minimum	544,8	182,2	945,4	305,4	442,1
25 % Percentile	648,1	182,2	945,4	576,1	444
Median	1136	504,6	945,4	1062	1216
75 % Percentile	1394	817,2	945,4	1156	1285
Maximum	1421	817,2	945,4	1272	1444
Range	875,8	635	0	966,4	1002
Mean	1059	501,3	945,4	906,6	1021
Std. Deviation	396	317,5	0	335,4	408,5
Std. Error of Mean	198	183,3	0	111,8	154,4

<b>PRP mit 1 pM TF</b>						
<b>Gruppe</b>	<b>JAK2 +HU</b>	<b>JAK2 -HU</b>	<b>CALR +HU</b>	<b>CALR -HU</b>	<b>Kontrollen + ASS</b>	<b>Kontrollen - ASS</b>
<b>n</b>	4	6	1	2	10	10
<b>Lag time [min]</b>						
Minimum	9,11	7,67	17,56	9	7	7,78
25 % Percentile	9,25	8,503	17,56	9	8,198	8,393
Median	9,83	11,17	17,56	12,34	10,39	9,89
75 % Percentile	11,66	15,5	17,56	15,67	11,44	10,33
Maximum	12,22	21,33	17,56	15,67	12,78	10,66
Range	3,11	13,66	0	6,67	5,78	2,88
Mean	10,25	12,28	17,56	12,34	10,02	9,532
Std. Deviation	1,364	5,097	0	4,716	1,948	1,072
Std. Error of Mean	0,6822	2,081	0	3,335	0,6159	0,3389
<b>ttPeak [min]</b>						
Minimum	20,22	18,56	30	19,22	16,33	20,78
25 % Percentile	20,39	18,64	30	19,22	20,89	21,5
Median	21,5	22,78	30	24,45	24,11	23,06
75 % Percentile	22,7	29,09	30	29,67	25,72	24,11
Maximum	22,89	32,67	30	29,67	27,56	26,36
Range	2,67	14,11	0	10,45	11,23	5,58
Mean	21,53	23,89	30	24,45	23,15	23,02
Std. Deviation	1,199	5,713	0	7,389	3,391	1,652
Std. Error of Mean	0,5994	2,332	0	5,225	1,072	0,5223
<b>Thrombin Peak [nM]</b>						
Minimum	106,3	44,57	140,3	89,55	71,02	86,85
25 % Percentile	109,7	51,48	140,3	89,55	83,43	96,9
Median	127,3	96,5	140,3	119,1	96,58	102,9
75 % Percentile	161,2	110,3	140,3	148,7	118,1	121,2
Maximum	170,1	127,3	140,3	148,7	121,6	137,2
Range	63,85	82,75	0	59,1	50,55	50,35
Mean	132,7	87,22	140,3	119,1	99,61	107,5
Std. Deviation	27,45	31,7	0	41,79	18,33	16,14
Std. Error of Mean	13,72	12,94	0	29,55	5,797	5,104

## ANHANG

<b>ETP [nMxmin]</b>						
Minimum	1699	896,4	2125	1822	1318	1519
25 % Percentile	1754	1246	2125	1822	1574	1694
Median	2010	1525	2125	1875	1710	1864
75 % Percentile	2450	1810	2125	1928	1819	1981
Maximum	2566	1980	2125	1928	2065	1994
Range	867,4	1084	0	105,4	747,2	475,3
Mean	2071	1507	2125	1875	1700	1823
Std. Deviation	368,6	368,9	0	74,53	222,2	165,9
Std. Error of Mean	184,3	150,6	0	52,7	70,26	52,45

<b>PRP mit 0,1 U/ml Thrombin</b>						
<b>Gruppe</b>	<b>JAK2 +HU</b>	<b>JAK2 -HU</b>	<b>CALR +HU</b>	<b>CALR -HU</b>	<b>Kontrollen + ASS</b>	<b>Kontrollen - ASS</b>
<b>n</b>	4	6	1	2	10	9
<b>Lag time [min]</b>						
Minimum	11	11,33	20,11	10,56	8,33	10,43
25 % Percentile	11	12,75	20,11	10,56	9,86	10,72
Median	12,11	14,45	20,11	12,17	11,11	13,56
75 % Percentile	15,22	16,17	20,11	13,78	16,64	15,56
Maximum	15,89	18	20,11	13,78	18,56	16,33
Range	4,89	6,67	0	3,22	10,23	5,9
Mean	12,78	14,5	20,11	12,17	12,48	13,26
Std. Deviation	2,323	2,244	0	2,277	3,554	2,385
Std. Error of Mean	1,162	0,9159	0	1,61	1,124	0,7951
<b>ttPeak [min]</b>						
Minimum	21,11	22,22	38,56	22,78	18	22,11
25 % Percentile	21,72	23,64	38,56	22,78	20,48	23,78
Median	24,95	27,17	38,56	27,39	26,23	30,33
75 % Percentile	27,5	31,33	38,56	32	32,92	32,39
Maximum	27,89	37,33	38,56	32	37	33,11
Range	6,78	15,11	0	9,22	19	11
Mean	24,73	27,89	38,56	27,39	26,44	28,67
Std. Deviation	3,003	5,269	0	6,52	6,685	4,33

ANHANG

Std. Error of Mean	1,501	2,151	0	4,61	2,114	1,443
<b>Thrombin Peak [nM]</b>						
Minimum	57,27	21,88	36,28	36,99	29,7	46,76
25 % Percentile	58,92	32,28	36,28	36,99	47,68	52,62
Median	66,7	56,39	36,28	65,09	66,23	55,69
75 % Percentile	87,63	64,11	36,28	93,19	77,93	63,5
Maximum	93,66	81,16	36,28	93,19	102,8	88,55
Range	36,39	59,28	0	56,2	73,12	41,79
Mean	71,08	51,67	36,28	65,09	64,16	59,4
Std. Deviation	15,86	20,52	0	39,74	21,64	12,27
Std. Error of Mean	7,932	8,378	0	28,1	6,842	4,089
<b>ETP [nMxmin]</b>						
Minimum	940,9	547,4	782,7	940,7	812	1099
25 % Percentile	1064	779,2	782,7	940,7	1210	1207
Median	1478	1020	782,7	1232	1371	1245
75 % Percentile	1553	1225	782,7	1523	1554	1337
Maximum	1563	1539	782,7	1523	1644	1442
Range	621,8	991,6	0	582,2	832,1	343,2
Mean	1365	1017	782,7	1232	1332	1265
Std. Deviation	287,9	326,3	0	411,7	245,1	99,8
Std. Error of Mean	144	133,2	0	291,1	77,51	33,27

<b>PRP mit 50ng/ml Convulxin</b>						
<b>Gruppe</b>	<i>JAK2</i> <b>+HU</b>	<i>JAK2</i> <b>-HU</b>	<i>CALR</i> <b>+HU</b>	<i>CALR</i> <b>-HU</b>	Kontrollen <b>+ ASS</b>	Kontrollen <b>- ASS</b>
<b>n</b>	4	6	1	2	10	10
<b>Lag time [min]</b>						
Minimum	13,22	17,11	18,44	13,67	11,22	11
25 % Percentile	13,69	17,78	18,44	13,67	12,72	12,61
Median	15,61	19	18,44	16,34	14,95	13,84
75 % Percentile	17,36	22,11	18,44	19	15,8	14,7
Maximum	17,78	27,44	18,44	19	16,44	16,33
Range	4,56	10,33	0	5,33	5,22	5,33
Mean	15,55	20,15	18,44	16,34	14,38	13,68

## ANHANG

Std. Deviation	1,908	3,775	0	3,769	1,781	1,51
Std. Error of Mean	0,9538	1,541	0	2,665	0,5633	0,4775
<b>ttPeak [min]</b>						
Minimum	16	20	22,11	17	14,89	13,56
25 % Percentile	16,42	20,67	22,11	17	15,92	15,45
Median	18,5	22,23	22,11	19,78	18,45	16,5
75 % Percentile	20,34	24,97	22,11	22,56	19,42	18,48
Maximum	20,67	30,89	22,11	22,56	20,34	19
Range	4,67	10,89	0	5,56	5,45	5,44
Mean	18,42	23,21	22,11	19,78	17,92	16,78
Std. Deviation	2,027	3,938	0	3,932	1,939	1,794
Std. Error of Mean	1,013	1,608	0	2,78	0,6131	0,5672
<b>Thrombin Peak [nM]</b>						
Minimum	261,6	125,1	264,7	174,8	138	202
25 % Percentile	261,9	188,6	264,7	174,8	163,2	220
Median	266,2	233,5	264,7	199,2	208,6	275
75 % Percentile	339,9	268,8	264,7	223,7	256,4	297
Maximum	363,4	275	264,7	223,7	273,9	348,1
Range	101,7	149,9	0	48,91	135,9	146,1
Mean	289,3	223,9	264,7	199,2	208,3	268,6
Std. Deviation	49,47	54,9	0	34,58	47,41	47,49
Std. Error of Mean	24,73	22,41	0	24,46	14,99	15,02
<b>ETP [nMxmin]</b>						
Minimum	1466	887,4	1828	1421	1112	1324
25 % Percentile	1488	1195	1828	1421	1340	1370
Median	1587	1368	1828	1457	1422	1591
75 % Percentile	1824	1513	1828	1493	1530	1670
Maximum	1891	1542	1828	1493	1672	1720
Range	424,9	654,9	0	71,79	560	396,4
Mean	1633	1328	1828	1457	1422	1542
Std. Deviation	183,6	236,9	0	50,76	159,4	152,1
Std. Error of Mean	91,82	96,73	0	35,9	50,4	48,09

<b>PRP mit 0,1 U/ml Thrombin und 50ng/ml Convulxin</b>						
<b>Gruppe</b>	<b>JAK2 +HU</b>	<b>JAK2 -HU</b>	<b>CALR +HU</b>	<b>CALR -HU</b>	<b>Kontrollen + ASS</b>	<b>Kontrollen - ASS</b>
<b>n</b>	4	6	1	2	10	10
<b>Lag time [min]</b>						
Minimum	7,22	7,83	10,56	7,33	7	6,44
25 % Percentile	7,305	8,205	10,56	7,33	7,083	6,835
Median	7,605	8,945	10,56	8,275	8,54	7,49
75 % Percentile	8,58	10,25	10,56	9,22	9,028	8,698
Maximum	8,89	11	10,56	9,22	9,67	9,77
Range	1,67	3,17	0	1,89	2,67	3,33
Mean	7,83	9,175	10,56	8,275	8,219	7,72
Std. Deviation	0,7305	1,153	0	1,336	1,009	1,05
Std. Error of Mean	0,3653	0,4707	0	0,945	0,319	0,3321
<b>ttPeak [min]</b>						
Minimum	11,99	14,5	18,89	13,67	11,44	10,56
25 % Percentile	11,99	14,71	18,89	13,67	13,53	11,5
Median	12,67	16	18,89	16,73	15	12,39
75 % Percentile	15,66	17,39	18,89	19,78	17,39	15,39
Maximum	16,44	18,56	18,89	19,78	17,97	17,12
Range	4,45	4,06	0	6,11	6,53	6,56
Mean	13,44	16,14	18,89	16,73	15,15	13,13
Std. Deviation	2,097	1,497	0	4,32	2,186	2,184
Std. Error of Mean	1,048	0,611	0	3,055	0,6914	0,6907
<b>Thrombin Peak [nM]</b>						
Minimum	102,6	59,98	123,7	80,79	63,19	105,1
25 % Percentile	116,6	80,27	123,7	80,79	74,86	124
Median	179,3	95,21	123,7	108	114,5	179
75 % Percentile	234,8	126	123,7	135,2	138,5	204,7
Maximum	246,4	139,4	123,7	135,2	186,5	241,4
Range	143,8	79,43	0	54,43	123,3	136,3
Mean	176,9	99,72	123,7	108	112,2	170,6
Std. Deviation	61,15	27,7	0	38,49	39,22	46,26
Std. Error of Mean	30,58	11,31	0	27,22	12,4	14,63

ANHANG

<b>ETP [nMxmin]</b>						
Minimum	1658	901,2	1795	1398	1078	1334
25 % Percentile	1670	1196	1795	1398	1418	1451
Median	1733	1454	1795	1484	1473	1613
75 % Percentile	2058	1608	1795	1570	1595	1775
Maximum	2157	1643	1795	1570	1729	1879
Range	498,9	742,3	0	171,5	651,6	545,2
Mean	1820	1391	1795	1484	1471	1608
Std. Deviation	228,5	274	0	121,3	175,3	187,9
Std. Error of Mean	114,2	111,8	0	85,75	55,44	59,41

### 8.1.5 Thrombingenerierung der isolierten Thrombozyten (mittels CAT)

Legende: *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, min = Minuten, ttPeak = "time to peak", nM = Nanomolar, ETP = endogenes Thrombin Potential, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, U = Units, ml = Milliliter

Isolierte Thrombozyten, basal												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	<i>JAK2</i> +HU	<i>JAK2</i> -HU	<i>CALR</i> +HU	<i>CALR</i> -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	<i>JAK2</i> +HU	<i>JAK2</i> -HU	<i>CALR</i> +HU	<i>CALR</i> -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	9
<b>Lag time [min]</b>												
Minimum	15,33	14,05	23,67	18	13	12,33	18	16,67	32,17	26	13	10,67
25 % Percentile	15,83	18,76	23,67	18	17,67	15,46	18,01	21,22	32,17	26	17,58	17,5
Median	17,52	25,17	23,67	19,19	21,34	18,42	19,36	27,5	32,17	26,7	20,5	24
75 % Percentile	20,43	42,8	23,67	20,38	23,67	22,54	29,17	33,75	32,17	27,4	26,08	27,09
Maximum	21,33	44,67	23,67	20,38	26,33	27,67	32	39	32,17	27,4	38	30
Range	6	30,62	0	2,38	13,33	15,34	14	22,33	0	1,4	25	19,33
Mean	17,93	28,59	23,67	19,19	20,57	19,04	22,18	27,57	32,17	26,7	22,53	22,21
Std. Deviation	2,499	12,35	0	1,683	3,984	4,692	6,664	8,16	0	0,9899	8,022	6,13
Std. Error of Mean	1,249	5,04	0	1,19	1,26	1,484	3,332	3,331	0	0,7	2,537	2,043

Isolierte Thrombozyten, basal												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	9
<b>ttPeak [min]</b>												
Minimum	25,06	19,73	37,83	26,73	26	18	28	27,75	44,33	36	24,67	17,33
25 % Percentile	25,21	26,18	37,83	26,73	29,17	24,77	28,69	28,44	44,33	36	31,17	29
Median	27,34	36,84	37,83	27,87	34,84	32,42	35,21	41	44,33	36,21	34,34	35,09
75 % Percentile	31,25	50	37,83	29	37,08	35,83	43,92	50,09	44,33	36,42	41,09	38,67
Maximum	32	50	37,83	29	41,67	39,17	45,33	51,33	44,33	36,42	47,67	40,33
Range	6,94	30,27	0	2,27	15,67	21,17	17,33	23,58	0	0,42	23	23
Mean	27,93	36,96	37,83	27,87	33,97	30,44	35,94	39,9	44,33	36,21	35,63	33,05
Std. Deviation	3,217	12,22	0	1,605	4,92	6,872	8,004	10,24	0	0,297	7,132	7,397
Std. Error of Mean	1,609	4,987	0	1,135	1,556	2,173	4,002	4,181	0	0,21	2,255	2,466

Isolierte Thrombozyten, basal												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	9
<b>Thrombin Peak [nM]</b>												
Minimum	41,47	22,83	83,78	60,96	50,55	65,47	13,63	32,44	50,1	40,29	8,51	43,97
25 % Percentile	47,57	34,03	83,78	60,96	64,79	68,84	23,8	39,16	50,1	40,29	33,69	52,03
Median	90,23	66,64	83,78	86,06	68,6	92,72	73,62	49,72	50,1	54,43	64,74	55,28
75 % Percentile	124,5	93,05	83,78	111,2	95,64	117,5	100,6	74,38	50,1	68,57	92,08	95,28
Maximum	127,8	121,7	83,78	111,2	121,1	156,7	103,2	95,57	50,1	68,57	105,7	168,9
Range	86,3	98,82	0	50,2	70,54	91,2	89,57	63,13	0	28,28	97,18	124,9
Mean	87,43	66,51	83,78	86,06	77,09	99,22	66,02	56,03	50,1	54,43	60,89	76,78
Std. Deviation	40,6	35,17	0	35,5	21,75	31,79	40,78	22,59	0	20	33,73	39,73
Std. Error of Mean	20,3	14,36	0	25,1	6,877	10,05	20,39	9,222	0	14,14	10,67	13,24

Isolierte Thrombozyten, basal												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	9
<b>ETP [nMxmin]</b>												
Minimum	860,6	174,9	1498	1290	1117	1219	425,2	511,2	803,9	736,3	119,8	852,4
25 % Percentile	958,9	503	1498	1290	1209	1301	575,2	628,1	803,9	736,3	526,5	906,2
Median	1472	1133	1498	1422	1302	1531	1153	997,5	803,9	1064	1139	1152
75 % Percentile	1691	1374	1498	1553	1485	1859	1753	1155	803,9	1391	1501	1648
Maximum	1691	1467	1498	1553	1671	1935	1910	1344	803,9	1391	1637	2111
Range	830	1292	0	262,7	553,7	715,4	1485	832,4	0	654,7	1517	1259
Mean	1374	977,4	1498	1422	1339	1551	1160	934,8	803,9	1064	1034	1270
Std. Deviation	399,4	489,9	0	185,7	187	268,5	615,3	302,7	0	462,9	531,6	460,4
Std. Error of Mean	199,7	200	0	131,3	59,12	84,89	307,6	123,6	0	327,3	168,1	153,5

Isolierte Thrombozyten mit 1 pM TF												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>Lag time [min]</b>												
Minimum	8,7	6,37	15	7,34	7,33	6,33	8,37	5,7	14,83	7,34	8,67	6,67
25 % Percentile	8,775	7,593	15	7,34	8,503	7	8,86	7,8	14,83	7,34	10,5	7,503
Median	9,5	9,33	15	9,17	10,83	7,85	11,17	9,335	14,83	8,505	11,34	8,5
75 % Percentile	10,5	13,58	15	11	13,42	11,33	12,25	10,5	14,83	9,67	14,17	9,835
Maximum	10,67	17,33	15	11	14	12	12,33	11	14,83	9,67	15	12
Range	1,97	10,96	0	3,66	6,67	5,67	3,96	5,3	0	2,33	6,33	5,33
Mean	9,593	10,45	15	9,17	10,67	8,836	10,76	9,033	14,83	8,505	11,97	8,805
Std. Deviation	0,9082	3,95	0	2,588	2,459	2,135	1,817	1,898	0	1,648	2,168	1,632
Std. Error of Mean	0,4541	1,613	0	1,83	0,7777	0,6752	0,9083	0,7748	0	1,165	0,6854	0,516

Isolierte Thrombozyten mit 1 pM TF												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>ttPeak [min]</b>												
Minimum	17,71	15,06	25,67	15,7	18,67	12,67	19,05	15,06	23,67	17,7	19,33	14,67
25 % Percentile	18,62	17,39	25,67	15,7	19,17	15,85	19,54	18,64	23,67	17,7	21,17	16,62
Median	21,33	19,17	25,67	18,85	22,34	19,09	23,5	20,5	23,67	19,19	24,67	18,67
75 % Percentile	21,59	24,42	25,67	22	26,5	23,42	28,75	22,17	23,67	20,67	25,75	21,13
Maximum	21,67	24,67	25,67	22	28,33	24	29,67	22,67	23,67	20,67	27,67	25,33
Range	3,96	9,61	0	6,3	9,66	11,33	10,62	7,61	0	2,97	8,34	10,66
Mean	20,51	20,1	25,67	18,85	22,87	19,34	23,93	20,09	23,67	19,19	23,83	19,14
Std. Deviation	1,874	3,745	0	4,455	3,527	3,943	4,818	2,702	0	2,1	2,742	3,136
Std. Error of Mean	0,9368	1,529	0	3,15	1,115	1,247	2,409	1,103	0	1,485	0,867	0,9918

Isolierte Thrombozyten mit 1 pM TF												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>Thrombin Peak [nM]</b>												
Minimum	76,38	69,45	160,1	112,8	90,3	119,5	42,34	83,38	113,5	91,95	53,75	75,64
25 % Percentile	82,96	84,17	160,1	112,8	105	136,3	59,29	86,49	113,5	91,95	80,5	124,5
Median	124,8	114,3	160,1	143,2	118,1	159,2	122	122,5	113,5	127,1	130,5	127,4
75 % Percentile	172,7	132,7	160,1	173,7	148,1	201,3	173	137,8	113,5	162,2	155,7	176,8
Maximum	181,3	140,6	160,1	173,7	166,6	243	186,1	141,2	113,5	162,2	168,3	268,3
Range	104,9	71,11	0	60,94	76,28	123,6	143,8	57,78	0	70,25	114,6	192,7
Mean	126,8	109,6	160,1	143,2	123,8	169,7	118,1	115,6	113,5	127,1	121,6	148
Std. Deviation	46,53	26,45	0	43,09	24,75	42,83	59,65	25,43	0	49,67	40,25	52,56
Std. Error of Mean	23,26	10,8	0	30,47	7,826	13,54	29,83	10,38	0	35,13	12,73	16,62

Isolierte Thrombozyten mit 1 pM TF												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>ETP [nMxmin]</b>												
Minimum	1147	929,3	2056	1789	1561	1609	1045	1340	1257	1418	1003	1193
25 % Percentile	1317	1435	2056	1789	1623	1830	1169	1420	1257	1418	1204	1533
Median	1891	1676	2056	2062	1720	2181	1686	1772	1257	1834	1882	1797
75 % Percentile	2286	1797	2056	2335	1958	2697	2452	2002	1257	2251	2030	2618
Maximum	2396	1907	2056	2335	2004	2800	2658	2002	1257	2251	2407	3494
Range	1249	977,8	0	546,4	442,8	1190	1613	662,1	0	833,4	1404	2302
Mean	1832	1592	2056	2062	1774	2247	1769	1723	1257	1834	1718	2010
Std. Deviation	517,2	341,1	0	386,4	168	436,5	676,1	304,8	0	589,3	490,1	695,5
Std. Error of Mean	258,6	139,3	0	273,2	53,12	138	338	124,4	0	416,7	155	219,9

Isolierte Thrombozyten mit 0,1 U/ml Thrombin												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>Lag time [min]</b>												
Minimum	7,33	7,04	14,5	7,33	9	7,04	8,33	7,04	13	7,01	7,33	8
25 % Percentile	7,59	8,008	14,5	7,33	10,5	8,42	8,423	7,76	13	7,01	10,17	9,128
Median	8,85	10,67	14,5	7,835	12,17	9,5	9,015	12,42	13	8,005	11,5	10
75 % Percentile	11,84	11,46	14,5	8,34	13,84	12,34	13,08	14,75	13	9	13,58	12,33
Maximum	12,67	11,83	14,5	8,34	18	14,67	14,33	17	13	9	15	22,67
Range	5,34	4,79	0	1,01	9	7,63	6	9,96	0	1,99	7,67	14,67
Mean	9,425	9,977	14,5	7,835	12,47	10,24	10,17	11,81	13	8,005	11,7	11,56
Std. Deviation	2,312	1,885	0	0,7142	2,539	2,577	2,802	3,738	0	1,407	2,343	4,216
Std. Error of Mean	1,156	0,7697	0	0,505	0,8029	0,8148	1,401	1,526	0	0,995	0,741	1,333

Isolierte Thrombozyten mit 0,1 U/ml Thrombin												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>ttPeak [min]</b>												
Minimum	18	14,72	27,33	18,04	22	17,06	20,05	14,05	26	17,7	18,33	20,33
25 % Percentile	18,1	18,18	27,33	18,04	23,67	18,83	20,12	20,76	26	17,7	22,83	20,67
Median	20,86	22,5	27,33	18,86	26	21,84	22	26,25	26	19,35	26,67	22,67
75 % Percentile	24,34	23,21	27,33	19,67	28,83	27,25	24,42	29,83	26	21	27,83	26,75
Maximum	24,67	23,33	27,33	19,67	32	30,5	24,67	32,33	26	21	32,33	37,17
Range	6,67	8,61	0	1,63	10	13,44	4,62	18,28	0	3,3	14	16,84
Mean	21,1	20,93	27,33	18,86	26,33	22,94	22,18	25,15	26	19,35	25,87	24,42
Std. Deviation	3,402	3,386	0	1,153	3,2	4,81	2,337	6,277	0	2,333	3,891	5,179
Std. Error of Mean	1,701	1,382	0	0,815	1,012	1,521	1,168	2,562	0	1,65	1,23	1,638

Isolierte Thrombozyten mit 0,1 U/ml Thrombin												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>Thrombin Peak [nM]</b>												
Minimum	26,67	41,12	99,42	59,69	56,36	51,71	27,52	34,24	51,42	58,04	36,43	40,2
25 % Percentile	37,79	57,22	99,42	59,69	61,04	62,15	34,27	43,74	51,42	58,04	53,69	47,89
Median	82,53	65,82	99,42	83,85	71,94	93,98	63,16	57,95	51,42	78,27	73,6	65,16
75 % Percentile	109,4	100,1	99,42	108	85,38	110,2	91,84	76,94	51,42	98,49	90,68	76,38
Maximum	114,5	131,7	99,42	108	150,2	123,3	98,52	104	51,42	98,49	102	143,5
Range	87,86	90,62	0	48,31	93,83	71,56	71	69,75	0	40,45	65,58	103,3
Mean	76,56	76,12	99,42	83,85	78,39	87,96	63,09	61,49	51,42	78,27	71,96	69,07
Std. Deviation	37,69	31,29	0	34,16	27,43	26,53	29,83	23,79	0	28,6	21,45	29,43
Std. Error of Mean	18,84	12,77	0	24,16	8,673	8,391	14,92	9,712	0	20,23	6,782	9,306

Isolierte Thrombozyten mit 0,1 U/ml Thrombin												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>ETP [nMxmin]</b>												
Minimum	593,3	743,8	1718	1312	1151	1103	695,4	957,1	949,9	1191	862,3	910,5
25 % Percentile	797,9	1125	1718	1312	1219	1246	859,9	1015	949,9	1191	970,6	984,2
Median	1551	1399	1718	1501	1353	1564	1431	1179	949,9	1523	1424	1181
75 % Percentile	1847	1509	1718	1690	1477	1790	1522	1370	949,9	1855	1572	1331
Maximum	1900	1638	1718	1690	1738	2031	1526	1396	949,9	1855	1884	2465
Range	1306	894,7	0	378,6	586,7	927,5	831	439,1	0	664,5	1021	1554
Mean	1399	1316	1718	1501	1382	1543	1271	1184	949,9	1523	1355	1277
Std. Deviation	572,9	309,6	0	267,7	179,1	326,6	391,3	188,1	0	469,9	328,8	458,7
Std. Error of Mean	286,5	126,4	0	189,3	56,64	103,3	195,6	76,79	0	332,3	104	145

### 8.1.6 Thrombingenerierung der mononukleären Zellen (mittels CAT)

Legende: MNC = mononukleäre Zellen, *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, min = Minuten, ttPeak = "time to peak", nM = Nanomolar, ETP = endogenes Thrombin Potential, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, U = Units, ml = Milliliter

MNC, basal													
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA						
Gruppe	<i>JAK2</i> +HU	<i>JAK2</i> -HU	<i>CALR</i> +HU	<i>CALR</i> -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	<i>JAK2</i> +HU	<i>JAK2</i> -HU	<i>CALR</i> +HU	<i>CALR</i> -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	
n	4	6	1	2	9	8	4	6	1	2	7	8	
<b>Lag time [min]</b>													
Minimum	14,17	13,38	19,33	16,37	14	14,33	12,33	13,69	21,33	25,72	18,33	14,33	
25 % Percentile	14,47	14,35	19,33	16,37	14,84	15,08	12,42	17,43	21,33	25,72	18,33	15,92	
Median	16,03	17,77	19,33	19,19	17	17,84	14,36	19,7	21,33	30,86	19,33	20,17	
75 % Percentile	17,17	25,25	19,33	22	20,17	21,08	16,26	24,46	21,33	36	26,33	26,18	
Maximum	17,33	35	19,33	22	25,67	43	16,33	26,33	21,33	36	33,33	33,67	
Range	3,16	21,62	0	5,63	11,67	28,67	4	12,64	0	10,28	15	19,34	
Mean	15,89	20,1	19,33	19,19	17,74	20,62	14,34	20,32	21,33	30,86	22,09	21,51	
Std. Deviation	1,402	7,903	0	3,981	3,851	9,433	2,135	4,422	0	7,269	5,688	6,439	
Std. Error of Mean	0,7012	3,226	0	2,815	1,284	3,335	1,068	1,805	0	5,14	2,15	2,277	

MNC, basal												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	9	8	4	6	1	2	7	8
<b>ttPeak [min]</b>												
Minimum	21,83	22,07	33	24,39	25,33	28,33	16,67	21,37	33,67	43,33	29	28,33
25 % Percentile	22,87	25,77	33	24,39	27,17	29,92	17,84	25,59	33,67	43,33	32	31,42
Median	26,17	30,03	33	28,03	33	31,84	23,67	34,38	33,67	44,72	33	33,83
75 % Percentile	26,88	34,21	33	31,67	34,83	39,87	32,81	37,42	33,67	46,11	38,67	35,24
Maximum	27,06	43,33	33	31,67	37	49	35,08	39,67	33,67	46,11	39	36,33
Range	5,23	21,26	0	7,28	11,67	20,67	18,41	18,3	0	2,78	10	8
Mean	25,31	30,61	33	28,03	31,37	34,98	24,77	32,25	33,67	44,72	34,33	33,18
Std. Deviation	2,359	7,065	0	5,148	4,172	6,988	7,858	6,888	0	1,966	3,811	2,612
Std. Error of Mean	1,179	2,884	0	3,64	1,391	2,471	3,929	2,812	0	1,39	1,441	0,9236

MNC, basal												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	9	8	4	6	1	2	7	8
<b>Thrombin Peak [nM]</b>												
Minimum	42,76	6,07	46,36	8,47	2,49	1,71	23,28	2,63	27,8	6,11	1,39	1,15
25 % Percentile	43,23	6,445	46,36	8,47	9,035	6,115	32,66	3,643	27,8	6,11	2,18	3,45
Median	54,26	33,32	46,36	35,27	16,86	14,62	64,5	41,99	27,8	33,94	12,56	10,08
75 % Percentile	64,89	82,07	46,36	62,07	26,44	30,59	162,6	68,66	27,8	61,77	33,9	25,26
Maximum	65,23	85,05	46,36	62,07	39,27	42,91	194	69,79	27,8	61,77	37,46	27,79
Range	22,47	78,98	0	53,6	36,78	41,2	170,7	67,16	0	55,66	36,07	26,64
Mean	54,13	40,9	46,36	35,27	17,89	17,74	86,57	38,11	27,8	33,94	17,49	12,89
Std. Deviation	12,07	35,02	0	37,9	11,76	14,36	74,27	31,13	0	39,36	15,96	10,99
Std. Error of Mean	6,035	14,3	0	26,8	3,919	5,077	37,14	12,71	0	27,83	6,031	3,887

MNC, basal												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	9	8	4	6	1	2	7	8
<b>ETP [nMxmin]</b>												
Minimum	909,4	117	998,7	149,5	58,58	25,97	650,8	64,39	489	87,11	40,2	31,37
25 % Percentile	969,8	129,5	998,7	149,5	230,2	169,8	782	83,69	489	87,11	66,14	78,23
Median	1172	882,4	998,7	698,9	426,8	381,3	1207	845,6	489	900,6	340,7	220,7
75 % Percentile	1207	1337	998,7	1248	720,3	855,5	1468	1070	489	1714	853,6	630,6
Maximum	1212	1395	998,7	1248	959,2	1056	1544	1321	489	1714	864,4	773,3
Range	302,3	1278	0	1099	900,6	1030	892,9	1257	0	1627	824,2	742
Mean	1116	788	998,7	698,9	471,5	471,9	1152	692,2	489	900,6	428,7	328,5
Std. Deviation	140,4	567,2	0	777	310,6	370,8	370,9	509,3	0	1150	373,4	296,9
Std. Error of Mean	70,19	231,5	0	549,4	103,5	131,1	185,5	207,9	0	813,5	141,1	105

MNC mit 1 pM TF												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>Lag time [min]</b>												
Minimum	7,33	6	12	7,34	6,67	7,33	6,67	6,37	12	9,68	8,33	6,67
25 % Percentile	7,623	6,278	12	7,34	7,42	8,75	7,17	6,843	12	9,68	9	9,08
Median	8,6	9,165	12	9,335	9,665	10,17	9,02	8,755	12	10,51	10	10,52
75 % Percentile	8,925	12,64	12	11,33	11,08	10,67	9,595	11,67	12	11,33	10,42	11,42
Maximum	9	18	12	11,33	12	12,05	9,67	13,67	12	11,33	12,33	12,67
Range	1,67	12	0	3,99	5,33	4,72	3	7,3	0	1,65	4	6
Mean	8,383	9,925	12	9,335	9,4	9,822	8,595	9,258	12	10,51	9,966	10,17
Std. Deviation	0,7311	4,427	0	2,821	1,895	1,39	1,35	2,7	0	1,167	1,105	1,746
Std. Error of Mean	0,3656	1,807	0	1,995	0,5994	0,4394	0,675	1,102	0	0,825	0,3493	0,5522

MNC mit 1 pM TF												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>ttPeak [min]</b>												
Minimum	17	14,39	23	16,37	17,33	21	12,33	14	22	22,38	19,33	19,33
25 % Percentile	17,29	15,6	23	16,37	20,17	24,42	14,17	16,03	22	22,38	21,92	20,67
Median	18,42	20,92	23	18,94	24	30,92	19,84	21,2	22	22,61	24,84	26,17
75 % Percentile	19,2	28,58	23	21,5	28,67	32,24	24,04	27,33	22	22,83	27	29,56
Maximum	19,38	28,67	23	21,5	32,33	33	25,39	28,33	22	22,83	33	34,33
Range	2,38	14,28	0	5,13	15	12	13,06	14,33	0	0,45	13,67	15
Mean	18,31	21,58	23	18,94	24,57	28,79	19,35	21,41	22	22,61	24,97	26,01
Std. Deviation	1,002	6,061	0	3,627	5,102	4,453	5,363	5,865	0	0,3182	3,857	4,8
Std. Error of Mean	0,5008	2,474	0	2,565	1,614	1,408	2,682	2,394	0	0,225	1,22	1,518

MNC mit 1 pM TF												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>Thrombin Peak [nM]</b>												
Minimum	71,87	32,05	70,41	20,45	33,42	29,22	69,35	37,08	57,12	42,38	26,85	16,12
25 % Percentile	72,6	38,17	70,41	20,45	36,6	46,67	70,61	48,41	57,12	42,38	31,6	41,21
Median	81,77	66,25	70,41	68,96	44,95	51,83	85,02	56,58	57,12	91,65	39,41	53,22
75 % Percentile	108,6	94,17	70,41	117,5	53,02	60,54	184,2	109,6	57,12	140,9	70,41	58,12
Maximum	115,2	119,2	70,41	117,5	68,3	61,37	213,8	113,4	57,12	140,9	97,16	67,43
Range	43,36	87,11	0	97,02	34,88	32,15	144,4	76,32	0	98,53	70,31	51,31
Mean	87,66	68,29	70,41	68,96	46,75	51,07	113,3	70,7	57,12	91,65	51,15	48,49
Std. Deviation	19,8	31,68	0	68,6	11,98	9,881	67,94	31,99	0	69,67	24,07	15,32
Std. Error of Mean	9,899	12,93	0	48,51	3,787	3,124	33,97	13,06	0	49,27	7,613	4,845

MNC mit 1 pM TF													
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA						
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10	
<b>ETP [nMxmin]</b>													
Minimum	1078	604,2	1006	427,1	917,3	823,1	1227	798,3	847,5	883	741,4	492,7	
25 % Percentile	1169	1003	1006	427,1	989,1	1198	1307	975,7	847,5	883	859,9	883,7	
Median	1457	1292	1006	1060	1174	1297	1623	1244	847,5	1643	1104	1191	
75 % Percentile	1630	1499	1006	1692	1273	1433	1958	1500	847,5	2403	1524	1344	
Maximum	1683	1717	1006	1692	1406	1528	2044	2102	847,5	2403	1775	1900	
Range	604,8	1113	0	1265	488,5	705,2	817,4	1304	0	1520	1033	1408	
Mean	1419	1245	1006	1060	1155	1282	1629	1287	847,5	1643	1193	1171	
Std. Deviation	251,1	369,6	0	894,5	165	201,8	339,4	440,7	0	1075	366,6	391,7	
Std. Error of Mean	125,5	150,9	0	632,5	52,19	63,81	169,7	179,9	0	760	115,9	123,9	

MNC mit 0,1 U/ml Thrombin												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>Lag time [min]</b>												
Minimum	6,7	8,04	11,67	6,67	7	8	6,33	7,68	8,33	10,68	8	6,67
25 % Percentile	6,943	8,258	11,67	6,67	8,503	8,75	7,005	7,92	8,33	10,68	8,503	9,42
Median	7,835	9,585	11,67	7,835	9,335	10,5	9,35	8,355	8,33	11,76	9,335	10,5
75 % Percentile	9,748	12,59	11,67	9	11,33	11,34	10,67	11,12	8,33	12,83	10,08	12,2
Maximum	10,33	16,36	11,67	9	13,67	14,33	11	13,5	8,33	12,83	10,67	14,5
Range	3,63	8,32	0	2,33	6,67	6,33	4,67	5,82	0	2,15	2,67	7,83
Mean	8,175	10,54	11,67	7,835	9,8	10,4	9,008	9,37	8,33	11,76	9,268	10,66
Std. Deviation	1,539	3,081	0	1,648	1,932	1,879	1,965	2,235	0	1,52	0,9402	2,268
Std. Error of Mean	0,7695	1,258	0	1,165	0,611	0,5943	0,9823	0,9123	0	1,075	0,2973	0,7173

MNC mit 0,1 U/ml Thrombin												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>ttPeak [min]</b>												
Minimum	17	17,39	23,33	15,7	18,33	19,67	13	15,67	25,67	25,83	16	16,33
25 % Percentile	17,08	18,1	23,33	15,7	20,83	20,25	15	16,95	25,67	25,83	18,92	23,33
Median	17,52	21,5	23,33	17,69	22,84	27,33	21,67	19,37	25,67	26,11	24	24,5
75 % Percentile	20,93	28,1	23,33	19,67	26,5	30,9	22,38	22,46	25,67	26,39	26,84	26,6
Maximum	22	32,39	23,33	19,67	28,33	33	22,39	29,83	25,67	26,39	28	29,67
Range	5	15	0	3,97	10	13,33	9,39	14,16	0	0,56	12	13,34
Mean	18,51	22,96	23,33	17,69	23,4	26,56	19,68	20,27	25,67	26,11	23,03	24,56
Std. Deviation	2,345	5,695	0	2,807	3,142	5,034	4,499	4,953	0	0,396	4,235	3,506
Std. Error of Mean	1,172	2,325	0	1,985	0,9935	1,592	2,25	2,022	0	0,28	1,339	1,109

MNC mit 0,1 U/ml Thrombin												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10		6	1	2	10	10
<b>Thrombin Peak [nM]</b>												
Minimum	41,05	12,3	68,82	13,01	6,86	5,49	39,48	8,17	20,62	15,1	7,69	6,77
25 % Percentile	43,59	19,7	68,82	13,01	15,95	12,95	40,2	18,31	20,62	15,1	12,83	11,04
Median	55,8	32,43	68,82	45,31	23,62	23,54	54	34,2	20,62	44,09	16,92	19,22
75 % Percentile	62,62	66,28	68,82	77,6	35,61	32,46	129,4	61,33	20,62	73,08	47,59	26,98
Maximum	63,36	75,87	68,82	77,6	40	35	150,7	84,74	20,62	73,08	104,4	32,8
Range	22,31	63,57	0	64,59	33,14	29,51	111,2	76,57	0	57,98	96,74	26,03
Mean	54	39,71	68,82	45,31	24,46	22,68	74,54	39,42	20,62	44,09	30,53	19,33
Std. Deviation	10,06	24,78	0	45,67	10,58	10,12	52,09	27,22	0	41	30,07	8,384
Std. Error of Mean	5,032	10,12	0	32,3	3,345	3,199	26,05	11,11	0	28,99	9,509	2,651

MNC mit 0,1 U/ml Thrombin												
	EIGENPLASMA						KONTROLLPLASMA					
Gruppe	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS	JAK2 +HU	JAK2 -HU	CALR +HU	CALR -HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	4	6	1	2	10	10	4	6	1	2	10	10
<b>ETP [nMxmin]</b>												
Minimum	929,4	314,2	1169	256	162,1	152,8	1001	212,3	486,5	334,7	194,5	166,4
25 % Percentile	951,4	457	1169	256	419,7	398,2	1014	508,5	486,5	334,7	314,5	294,6
Median	1079	856,2	1169	819,4	677,8	657	1175	641,4	486,5	1028	497,2	498,7
75 % Percentile	1187	1060	1169	1383	907,6	846,5	1548	1036	486,5	1721	1223	702,2
Maximum	1202	1202	1169	1383	1210	981,4	1632	1640	486,5	1721	1705	891,4
Range	272,7	887,7	0	1127	1048	828,7	631,2	1428	0	1387	1511	725
Mean	1072	790,9	1169	819,4	667,8	628,9	1246	762,8	486,5	1028	686,9	515,6
Std. Deviation	122,3	335,4	0	796,8	308,1	271,9	287,8	475,7	0	980,5	513,3	234,8
Std. Error of Mean	61,13	136,9	0	563,4	97,42	85,98	143,9	194,2	0	693,3	162,3	74,24

## 8.2 TABELLEN: P-WERTE

### 8.2.1 Agonisten-induzierte thrombozytäre Aggregation (mittels Lumi-Aggregometrie)

Auswertung mittels t-Test oder Mann-Whitney-Test. Signifikante Unterschiede bestehen bei  $p < 0,05$ .

Legende: JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, TRAP-6 = Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6

Lumiaggregometrie - Aggregation			
<b>Arachidonsäure</b>	<b>mit ASS: JAK2V617F +HU</b>	<b>mit ASS: JAK2V617F -HU</b>	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,7955 (Mann-Whitney test)	0,4006 (Mann-Whitney test)	<0,0001 (Mann-Whitney test)
Kontrollen ohne ASS	<0,0001 (Unpaired t test)	0,0025 (Mann-Whitney test)	-
JAK2V617F -HU	0,4643 (Mann-Whitney test)	-	-
<b>Kollagen (2 µg/ml)</b>	<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,1608 (Mann-Whitney test)	0,4082 (Mann-Whitney test)	0,0712 (Mann-Whitney test)
Kontrollen ohne ASS	0,9077 (Mann-Whitney test)	0,0248 (Unpaired t test)	-
JAK2V617F -HU	0,0714 (Mann-Whitney test)	-	-
<b>Kollagen (10 µg/ml)</b>	<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,0465 (Unpaired t test)	0,0079 (Unpaired t test)	0,031 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,0069 (Unpaired t test)	0,0006 (Unpaired t test)	-
JAK2V617F -HU	0,8548 (Unpaired t test)	-	-
<b>TRAP-6 (10 µM)</b>	<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,7841 (Unpaired t test)	0,2362 (Mann-Whitney test)	0,1969 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,2905 (Unpaired t test)	0,0390 (Mann-Whitney test)	-
JAK2V617F -HU	0,7905 (Mann-Whitney test)	-	-
<b>TRAP-6 (50 µM)</b>	<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,2447 (Unpaired t test)	0,1580 (Unpaired t test)	0,2815 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,0622 (Unpaired t test)	0,0616 (Unpaired t test)	-
JAK2V617F -HU	0,7454 (Unpaired t test)	-	-

## 8.2.2 Agonisten-induzierte thrombozytäre ATP-Freisetzung (mittels Lumi-Aggregometrie)

Auswertung mittels t-Test oder Mann-Whitney-Test. Signifikante Unterschiede bestehen bei  $p < 0,05$ .

Legende: *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, TRAP-6 = Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6, ATP = Adenosinriphosphat

Lumiaggregometrie - ATP-Freisetzung			
<b>Kollagen (10 µg/ml)</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,0876 (Unpaired t test)	0,0500 (Unpaired t test)	0,0149 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,0077 (Unpaired t test)	0,0018 (Unpaired t test)	-
<i>JAK2V617F</i> -HU	0,9074 (Unpaired t test)	-	-
<b>TRAP-6 (50 µM)</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,1343 (Unpaired t test)	0,1021 (Unpaired t test)	0,0409 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,0051 (Unpaired t test)	0,0012 (Unpaired t test)	-
<i>JAK2V617F</i> -HU	0,7394 (Unpaired t test)	-	-

## 8.2.3 Plasmatische Thrombingenerierung (mittels CAT)

Auswertung mittels t-Test oder Mann-Whitney-Test. Signifikante Unterschiede bestehen bei  $p < 0,05$ .

Legende: PFP = Thrombozyten-freies Plasma, *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor

PFP mit TF (5 pM)			
<b>lag time</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,2785 (Unpaired t test)	0,3757 (Mann-Whitney test)	0,871 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,2832 (Unpaired t test)	0,4088 (Mann-Whitney test)	-
<i>JAK2V617F</i> -HU	0,9429 (Mann-Whitney test)	-	-
<b>time to peak</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,3349 (Unpaired t test)	0,2019 (Unpaired t test)	0,9098 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,2827 (Unpaired t test)	0,1974 (Unpaired t test)	-
<i>JAK2V617F</i> -HU	0,6796 (Unpaired t test)	-	-
<b>thrombin peak</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,3592 (Unpaired t test)	0,3722 (Unpaired t test)	0,3355 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,9246 (Unpaired t test)	0,1715 (Unpaired t test)	-
<i>JAK2V617F</i> -HU	0,3260 (Unpaired t test)	-	-
<b>endogenous thrombin potential</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,1862 (Unpaired t test)	0,4923 (Mann-Whitney test)	0,3855 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,4449 (Unpaired t test)	0,2198 (Mann-Whitney test)	-
<i>JAK2V617F</i> -HU	0,1714 (Mann-Whitney test)	-	-

## 8.2.4 Thrombozytäre Thrombingenerierung (mittels CAT)

Auswertung mittels t-Test oder Mann-Whitney-Test. Signifikante Unterschiede bestehen bei  $p < 0,05$ .

Legende: PRP = Plättchen-reiches Plasma, *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, pM = Pikomolar, U = Units, ml = Milliliter, ng = Nanogramm

PRP basal			
<b>lag time</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,4797 (Mann-Whitney test)	0,0182 (Mann-Whitney test)	0,3922 (Mann-Whitney test)
Kontrollen ohne ASS	0,2436 (Unpaired t test)	0,0035 (Unpaired t test)	-
<b>time to peak</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,8448 (Unpaired t test)	0,0052 (Unpaired t test)	0,6057 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,6349 (Unpaired t test)	0,0132 (Unpaired t test)	-
<b>thrombin peak</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,2293 (Unpaired t test)	0,2890 (Unpaired t test)	0,6505 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,4927 (Unpaired t test)	0,2425 (Unpaired t test)	-
<b>endogenous thrombin potential</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,4862 (Unpaired t test)	0,0969 (Unpaired t test)	0,2991 (Mann-Whitney test)
Kontrollen ohne ASS	0,7879 (Mann-Whitney test)	0,1833 (Mann-Whitney test)	-

PRP mit TF (1 pM)			
<b>lag time</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,8383 (Unpaired t test)	0,2227 (Unpaired t test)	0,4939 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,3145 (Unpaired t test)	0,1150 (Unpaired t test)	-
<b>time to peak</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,3779 (Unpaired t test)	0,7478 (Unpaired t test)	0,9105 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,1309 (Unpaired t test)	0,6507 (Unpaired t test)	-
<b>thrombin peak</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,0205 (Unpaired t test)	0,3341 (Unpaired t test)	0,3186 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,0503 (Unpaired t test)	0,1086 (Unpaired t test)	-
<b>endogenous thrombin potential</b>	<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,0364 (Unpaired t test)	0,2082 (Unpaired t test)	0,1765 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,0982 (Unpaired t test)	0,0320 (Unpaired t test)	-

PRP mit Thrombin (0,1 U/ml)			
<b>lag time</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,8836 (Unpaired t test)	0,2354 (Unpaired t test)	0,5892 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,7409 (Unpaired t test)	0,3306 (Unpaired t test)	-
<b>time to peak</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,6366 (Unpaired t test)	0,6591 (Unpaired t test)	0,4072 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,1304 (Unpaired t test)	0,7588 (Unpaired t test)	-
<b>thrombin peak</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,5758 (Unpaired t test)	0,2739 (Unpaired t test)	0,7197 (Mann-Whitney test)
Kontrollen ohne ASS	0,0755 (Mann-Whitney test)	0,6889 (Mann-Whitney test)	-
<b>endogenous thrombin potential</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,8334 (Unpaired t test)	0,0447 (Unpaired t test)	0,451 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,3546 (Unpaired t test)	0,0497 (Unpaired t test)	-

PRP mit Convulxin (50 ng/ml)			
<b>lag time</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,2971 (Unpaired t test)	0,0002 (Mann-Whitney test)	0,3524 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,0739 (Unpaired t test)	0,0002 (Mann-Whitney test)	-
<b>time to peak</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,679 (Unpaired t test)	0,0005 (Mann-Whitney test)	0,1876 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,1618 (Unpaired t test)	0,0002 (Mann-Whitney test)	-
<b>thrombin peak</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,0539 (Mann-Whitney test)	0,5563 (Unpaired t test)	0,0108 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,7333 (Mann-Whitney test)	0,1072 (Unpaired t test)	-
<b>endogenous thrombin potential</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,0523 (Unpaired t test)	0,3575 (Unpaired t test)	0,0996 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,3608 (Unpaired t test)	0,0431 (Unpaired t test)	-

PRP mit Thrombin (0,1 U/ml) und Convulxin (50 ng/ml)			
<b>lag time</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,5007 (Unpaired t test)	0,1034 (Unpaired t test)	0,2928 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,8527 (Unpaired t test)	0,0214 (Unpaired t test)	-
<b>time to peak</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,206 (Unpaired t test)	0,3474 (Unpaired t test)	0,0536 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,8150 (Unpaired t test)	0,0103 (Unpaired t test)	-
<b>thrombin peak</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,034 (Unpaired t test)	0,5069 (Unpaired t test)	0,007 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,8361 (Unpaired t test)	0,0045 (Unpaired t test)	-
<b>endogenous thrombin potential</b>	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	Kontrollen ohne ASS
Kontrollen mit ASS	0,0092 (Unpaired t test)	0,4805 (Unpaired t test)	0,111 (Unpaired t test)
Kontrollen ohne ASS	0,0960 (Unpaired t test)	0,0799 (Unpaired t test)	-

## 8.2.5 Thrombingenerierung isolierter Thrombozyten (mittels CAT)

Auswertung mittels t-Test oder Mann-Whitney-Test. Signifikante Unterschiede bestehen bei  $p < 0,05$ .

Legende: *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, pM = Pikomolar, U = Units, ml = Milliliter

isolierte Thrombozyten, basal			
		in Eigenplasma	in Kontrollplasma
<b>lag time</b>		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,4426 (Unpaired t test)	0,2194 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,4967 (Unpaired t test)	0,9241 (Unpaired t test)
<b>time to peak</b>		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,2036 (Unpaired t test)	0,4368 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,5503 (Unpaired t test)	0,4485 (Unpaired t test)
<b>thrombin peak</b>		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,0859 (Unpaired t test)	0,0653 (Mann-Whitney test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,2178 (Unpaired t test)	0,6038 (Mann-Whitney test)
<b>endogenous thrombin potential</b>		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,0552 (Unpaired t test)	0,0947 (Mann-Whitney test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,1042 (Unpaired t test)	0,5490 (Mann-Whitney test)

isolierte Thrombozyten, basal			
		in Kontrollplasma	
<b>lag time</b>		<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU
in Eigenplasma	<i>JAK2V617F</i> +HU	0,2 (Mann-Whitney test)	
	<i>JAK2V617F</i> -HU		0.8689 (Unpaired t test)
<b>time to peak</b>		<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU
in Eigenplasma	<i>JAK2V617F</i> +HU	0.1129 (Unpaired t test)	
	<i>JAK2V617F</i> -HU		0.6602 (Unpaired t test)
<b>thrombin peak</b>		<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU
in Eigenplasma	<i>JAK2V617F</i> +HU	0.4849 (Unpaired t test)	
	<i>JAK2V617F</i> -HU		0.5529 (Unpaired t test)
<b>endogenous thrombin potential</b>		<i>JAK2V617F</i> +HU	<i>JAK2V617F</i> -HU
in Eigenplasma	<i>JAK2V617F</i> +HU	0.5814 (Unpaired t test)	
	<i>JAK2V617F</i> -HU		0.8600 (Unpaired t test)

isolierte Thrombozyten, basal					
		in Eigenplasma		in Kontrollplasma	
lag time		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,247 (Unpaired t test)	0,0737 (Unpaired t test)	0,8691 (Mann-Whitney test)	0,0356 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,6657 (Unpaired t test)	0,0423 (Unpaired t test)	0,3736 (Mann-Whitney test)	0,0179 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,2916 (Unpaired t test)	0,2505 (Unpaired t test)	0,9181 (Mann-Whitney test)	0,2469 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,2123 (Unpaired t test)	0,2036 (Unpaired t test)	0,8252 (Mann-Whitney test)	0,1692 (Unpaired t test)
time to peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0449 (Unpaired t test)	0,4969 (Unpaired t test)	0,5796 (Unpaired t test)	0,1367 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,5048 (Unpaired t test)	0,1894 (Unpaired t test)	0,2196 (Unpaired t test)	0,0430 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0640 (Unpaired t test)	0,7867 (Unpaired t test)	0,9460 (Unpaired t test)	0,3404 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,2189 (Unpaired t test)	0,4510 (Unpaired t test)	0,5383 (Unpaired t test)	0,1544 (Unpaired t test)
thrombin peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,5400 (Unpaired t test)	0,4653 (Unpaired t test)	0,5128 (Unpaired t test)	0,0855 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,5706 (Unpaired t test)	0,0758 (Unpaired t test)	0,1273 (Unpaired t test)	0,0116 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,2312 (Unpaired t test)	0,7554 (Unpaired t test)	0,8117 (Unpaired t test)	0,7601 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,7105 (Mann-Whitney test)	0,7756 (Mann-Whitney test)	>0,9999 (Mann-Whitney test)	0,1810 (Mann-Whitney test)
endogenous thrombin potential		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,8235 (Unpaired t test)	0,0514 (Unpaired t test)	0,4012 (Unpaired t test)	0,0049 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,3471 (Unpaired t test)	0,0085 (Unpaired t test)	0,1121 (Unpaired t test)	0,0008 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,2749 (Unpaired t test)	0,8344 (Unpaired t test)	0,7073 (Unpaired t test)	0,6838 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,7105 (Mann-Whitney test)	0,5287 (Mann-Whitney test)	0,9399 (Mann-Whitney test)	0,2238 (Mann-Whitney test)

isolierte Thrombozyten mit TF (1 pM)			
		in Eigenplasma	in Kontrollplasma
lag time		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,0925 (Unpaired t test)	0,9713 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,2252 (Unpaired t test)	0,0017 (Unpaired t test)
time to peak		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,0493 (Unpaired t test)	0,9010 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,5019 (Unpaired t test)	0,0022 (Unpaired t test)
thrombin peak		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,0088 (Unpaired t test)	0,3242 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,8849 (Unpaired t test)	0,2227 (Unpaired t test)
endogenous thrombin potential		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,005 (Unpaired t test)	0,3736 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,7369 (Unpaired t test)	0,2922 (Unpaired t test)

isolierte Thrombozyten mit TF (1 pM)			
		in Kontrollplasma	
lag time		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.2950 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU		0.4474 (Unpaired t test)
time to peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.6286 (Mann-Whitney test)	
	JAK2V617F -HU		0.9993 (Unpaired t test)
thrombin peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.8254 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU		0.6965 (Unpaired t test)
endogenous thrombin potential		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.8880 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU		0.6991 (Mann-Whitney test)

ANHANG

isolierte Thrombozyten mit TF (1 pM)					
		in Eigenplasma		in Kontrollplasma	
lag time		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,4210 (Unpaired t test)	0,8930 (Unpaired t test)	0,9478 (Unpaired t test)	0,1863 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,5146 (Unpaired t test)	0,3024 (Unpaired t test)	0,1409 (Unpaired t test)	0,8550 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0597 (Unpaired t test)	0,3325 (Unpaired t test)	0,3459 (Unpaired t test)	0,0160 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,3875 (Unpaired t test)	0,2580 (Unpaired t test)	0,0730 (Unpaired t test)	0,8022 (Unpaired t test)
time to peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,2288 (Mann-Whitney test)	0,1589 (Unpaired t test)	0,6521 (Unpaired t test)	0,1214 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,9201 (Mann-Whitney test)	0,7115 (Unpaired t test)	0,0881 (Unpaired t test)	0,6873 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0949 (Mann-Whitney test)	0,0368 (Unpaired t test)	0,9625 (Unpaired t test)	0,0188 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,1718 (Mann-Whitney test)	0,5910 (Unpaired t test)	0,0456 (Unpaired t test)	0,5463 (Unpaired t test)
thrombin peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,873 (Unpaired t test)	0,2984 (Unpaired t test)	0,7990 (Unpaired t test)	0,5386 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,1234 (Unpaired t test)	0,0082 (Unpaired t test)	0,0916 (Unpaired t test)	0,0145 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,8358 (Unpaired t test)	0,5299 (Unpaired t test)	0,9006 (Unpaired t test)	0,7518 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,4969 (Unpaired t test)	0,1208 (Unpaired t test)	0,3713 (Unpaired t test)	0,1834 (Unpaired t test)
endogenous thrombin potential		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,7478 (Unpaired t test)	0,3676 (Mann-Whitney test)	0,9828 (Unpaired t test)	0,6685 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,1514 (Unpaired t test)	0,0075 (Mann-Whitney test)	0,1373 (Unpaired t test)	0,0221 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,7058 (Unpaired t test)	0,3676 (Mann-Whitney test)	0,8761 (Unpaired t test)	0,9834 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,6540 (Unpaired t test)	0,3132 (Mann-Whitney test)	0,5666 (Unpaired t test)	0,3592 (Unpaired t test)

isolierte Thrombozyten mit Thrombin (0,1 U/ml)			
		in Eigenplasma	in Kontrollplasma
lag time		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,0671 (Unpaired t test)	0,4459 (Mann-Whitney test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,4911 (Unpaired t test)	0,3614 (Mann-Whitney test)
time to peak		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,0797 (Unpaired t test)	0,3619 (Mann-Whitney test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,7723 (Unpaired t test)	0,1959 (Mann-Whitney test)
thrombin peak		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,4359 (Mann-Whitney test)	0,1230 (Mann-Whitney test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	>0,9999 (Mann-Whitney test)	0,4813 (Mann-Whitney test)
endogenous thrombin potential		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,1887 (Unpaired t test)	0,0288 (Mann-Whitney test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,8232 (Unpaired t test)	0,4359 (Mann-Whitney test)

isolierte Thrombozyten mit Thrombin (0,1 U/ml)			
		in Kontrollplasma	
lag time		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.7429 (Mann-Whitney test)	
	JAK2V617F -HU		0.3078 (Unpaired t test)
time to peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.6179 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU		0.1450 (Mann-Whitney test)
thrombin peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.5954 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU		0.3836 (Unpaired t test)
endogenous thrombin potential		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.7248 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU		0.3927 (Unpaired t test)

ANHANG

isolierte Thrombozyten mit Thrombin (0,1 U/ml)					
		in Eigenplasma		in Kontrollplasma	
<b>lag time</b>		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0607 (Unpaired t test)	0,0572 (Unpaired t test)	0,1489 (Mann-Whitney test)	0,6817 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,5945 (Unpaired t test)	0,8328 (Unpaired t test)	0,7582 (Mann-Whitney test)	0,3331 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,1257 (Unpaired t test)	0,1502 (Unpaired t test)	0,2537 (Mann-Whitney test)	0,9406 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,2887 (Mann-Whitney test)	0,6932 (Mann-Whitney test)	0,4356 (Mann-Whitney test)	0,6541 (Mann-Whitney test)
<b>time to peak</b>		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0185 (Unpaired t test)	0,0084 (Mann-Whitney test)	0,0378 (Unpaired t test)	0,6211 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,5014 (Unpaired t test)	0,4754 (Mann-Whitney test)	0,7716 (Unpaired t test)	0,4403 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0540 (Unpaired t test)	0,0341 (Mann-Whitney test)	0,1063 (Unpaired t test)	0,7797 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,2507 (Mann-Whitney test)	0,2982 (Mann-Whitney test)	0,3247 (Mann-Whitney test)	0,4436 (Mann-Whitney test)
<b>thrombin peak</b>		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,7333 (Mann-Whitney test)	0,9578 (Mann-Whitney test)	0,4535 (Mann-Whitney test)	0,1806 (Mann-Whitney test)
	Kontrollen ohne ASS	0,5290 (Unpaired t test)	0,4316 (Unpaired t test)	0,1508 (Unpaired t test)	0,0649 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,7737 (Unpaired t test)	0,7561 (Unpaired t test)	0,5409 (Unpaired t test)	0,3791 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,6354 (Mann-Whitney test)	0,7925 (Mann-Whitney test)	0,9451 (Mann-Whitney test)	0,6354 (Mann-Whitney test)
<b>endogenous thrombin potential</b>		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,9327 (Unpaired t test)	0,5962 (Unpaired t test)	0,4655 (Unpaired t test)	0,0544 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,5559 (Unpaired t test)	0,1929 (Unpaired t test)	0,2056 (Unpaired t test)	0,0288 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,8587 (Unpaired t test)	0,8192 (Unpaired t test)	0,6865 (Unpaired t test)	0,2676 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,4535 (Mann-Whitney test)	0,3132 (Mann-Whitney test)	0,6354 (Mann-Whitney test)	0,7925 (Mann-Whitney test)

## 8.2.6 Thrombingenerierung mononukleärer Zellen (mittels CAT)

Auswertung mittels t-Test oder Mann-Whitney-Test. Signifikante Unterschiede bestehen bei  $p < 0,05$ .

Legende: MNC = mononukleäre Zellen, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, pM = Pikomlar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, U = Units, ml = Milliliter

		<b>MNC, basal</b>	
		in Eigenplasma	in Kontrollplasma
<b>lag time</b>		Kontrollen <b>mit ASS</b>	
			Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,6561 (Mann-Whitney test)	0,6289 (Mann-Whitney test)
in Kontrollplasma	Kontrollen <b>mit ASS</b>	0,0306 (Mann-Whitney test)	0,9764 (Mann-Whitney test)
<b>time to peak</b>		Kontrollen <b>mit ASS</b>	
			Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,2093 (Unpaired t test)	0,5058 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen <b>mit ASS</b>	0,1655 (Unpaired t test)	0,5000 (Unpaired t test)
<b>thrombin peak</b>		Kontrollen <b>mit ASS</b>	
			Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,9810 (Unpaired t test)	0,4613 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen <b>mit ASS</b>	0,9550 (Unpaired t test)	0,5222 (Unpaired t test)
<b>endogenous thrombin potential</b>		Kontrollen <b>mit ASS</b>	
			Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,9979 (Unpaired t test)	0,4076 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen <b>mit ASS</b>	0,8059 (Unpaired t test)	0,5725 (Unpaired t test)

		<b>MNC, basal</b>	
		in Kontrollplasma	
<b>lag time</b>		<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>
in Eigenplasma	<b>JAK2V617F +HU</b>	0.2719 (Unpaired t test)	
	<b>JAK2V617F -HU</b>		0.9530 (Unpaired t test)
<b>time to peak</b>		<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>
in Eigenplasma	<b>JAK2V617F +HU</b>	0.9005 (Unpaired t test)	
	<b>JAK2V617F -HU</b>		0.6925 (Unpaired t test)
<b>thrombin peak</b>		<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>
in Eigenplasma	<b>JAK2V617F +HU</b>	0.4216 (Unpaired t test)	
	<b>JAK2V617F -HU</b>		0.8869 (Unpaired t test)
<b>endogenous thrombin potential</b>		<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>
in Eigenplasma	<b>JAK2V617F +HU</b>	0.8626 (Unpaired t test)	
	<b>JAK2V617F -HU</b>		0.7646 (Unpaired t test)

ANHANG

		MNC, basal			
		in Eigenplasma		in Kontrollplasma	
lag time		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,3790 (Unpaired t test)	0,4515 (Unpaired t test)	0,1313 (Unpaired t test)	0,2518 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,4606 (Mann-Whitney test)	0,9497 (Mann-Whitney test)	0,2141 (Mann-Whitney test)	0,6620 (Mann-Whitney test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0061 (Mann-Whitney test)	0,3450 (Mann-Whitney test)	0,0061 (Mann-Whitney test)	0,8636 (Mann-Whitney test)
	Kontrollen ohne ASS	0,1226 (Unpaired t test)	0,7188 (Unpaired t test)	0,0598 (Unpaired t test)	0,7058 (Unpaired t test)
<b>time to peak</b>		<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>	<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0214 (Unpaired t test)	0,7951 (Unpaired t test)	0,0682 (Unpaired t test)	0,7623 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0248 (Unpaired t test)	0,2711 (Unpaired t test)	0,0445 (Unpaired t test)	0,4802 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0022 (Unpaired t test)	0,2511 (Unpaired t test)	0,0216 (Unpaired t test)	0,5035 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0005 (Unpaired t test)	0,3575 (Unpaired t test)	0,0174 (Unpaired t test)	0,7293 (Unpaired t test)
<b>thrombin peak</b>		<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>	<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0003 (Unpaired t test)	0,0871 (Unpaired t test)	0,0157 (Unpaired t test)	0,0963 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0015 (Unpaired t test)	0,1135 (Unpaired t test)	0,0243 (Unpaired t test)	0,1253 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0033 (Unpaired t test)	0,1392 (Unpaired t test)	0,0362 (Unpaired t test)	0,1520 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0001 (Unpaired t test)	0,0526 (Unpaired t test)	0,0163 (Unpaired t test)	0,0532 (Unpaired t test)
<b>endogenous thrombin potential</b>		<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>	<b>JAK2V617F +HU</b>	<b>JAK2V617F -HU</b>
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0025 (Unpaired t test)	0,1838 (Unpaired t test)	0,0054 (Unpaired t test)	0,3127 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0081 (Unpaired t test)	0,2301 (Unpaired t test)	0,0134 (Unpaired t test)	0,3656 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0070 (Unpaired t test)	0,1980 (Unpaired t test)	0,0128 (Unpaired t test)	0,3051 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0006 (Unpaired t test)	0,0716 (Unpaired t test)	0,0019 (Unpaired t test)	0,1175 (Unpaired t test)

ANHANG

		MNC mit TF (1 pM)	
		in Eigenplasma	in Kontrollplasma
lag time		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,5772 (Unpaired t test)	0,6269 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,4252 (Unpaired t test)	0,7573 (Unpaired t test)
time to peak		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,0639 (Unpaired t test)	0,1953 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,8451 (Unpaired t test)	0,5995 (Unpaired t test)
thrombin peak		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,3901 (Unpaired t test)	0,6594 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,6107 (Unpaired t test)	0,7711 (Unpaired t test)
endogenous thrombin potential		Kontrollen mit ASS	Kontrollen ohne ASS
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,1409 (Unpaired t test)	0,4349 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,7681 (Unpaired t test)	0,8965 (Unpaired t test)

		MNC mit TF (1 pM)	
		in Kontrollplasma	
lag time		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.7912 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU		0.7593 (Unpaired t test)
time to peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.7155 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU		0.9616 (Unpaired t test)
thrombin peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.4962 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU		0.8986 (Unpaired t test)
endogenous thrombin potential		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.3579 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU		0.8600 (Unpaired t test)

		MNC mit TF (1 pM)			
		in Eigenplasma		in Kontrollplasma	
lag time		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,3266 (Unpaired t test)	0,7439 (Unpaired t test)	0,4581 (Unpaired t test)	0,9033 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0770 (Unpaired t test)	0,9456 (Unpaired t test)	0,1587 (Unpaired t test)	0,5866 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0227 (Unpaired t test)	0,9777 (Unpaired t test)	0,0712 (Unpaired t test)	0,4689 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0758 (Unpaired t test)	0,8758 (Unpaired t test)	0,1337 (Unpaired t test)	0,4220 (Unpaired t test)
time to peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0348 (Unpaired t test)	0,3071 (Unpaired t test)	0,1136 (Unpaired t test)	0,2749 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0007 (Unpaired t test)	0,0157 (Unpaired t test)	0,0053 (Unpaired t test)	0,0126 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0060 (Unpaired t test)	0,1895 (Unpaired t test)	0,0467 (Unpaired t test)	0,1622 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0090 (Unpaired t test)	0,1266 (Unpaired t test)	0,0420 (Unpaired t test)	0,1089 (Unpaired t test)
thrombin peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0004 (Unpaired t test)	0,0695 (Unpaired t test)	0,0081 (Unpaired t test)	0,0479 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0005 (Unpaired t test)	0,1264 (Unpaired t test)	0,0110 (Unpaired t test)	0,0876 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0203 (Unpaired t test)	0,2398 (Unpaired t test)	0,0218 (Unpaired t test)	0,1853 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0018 (Unpaired t test)	0,1113 (Unpaired t test)	0,0110 (Unpaired t test)	0,0792 (Unpaired t test)
endogenous thrombin potential		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0373 (Unpaired t test)	0,5127 (Unpaired t test)	0,0036 (Unpaired t test)	0,4010 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,3043 (Unpaired t test)	0,7939 (Unpaired t test)	0,0331 (Unpaired t test)	0,9762 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,2861 (Unpaired t test)	0,7912 (Unpaired t test)	0,0634 (Unpaired t test)	0,6526 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,2693 (Unpaired t test)	0,7159 (Unpaired t test)	0,0639 (Unpaired t test)	0,5919 (Unpaired t test)

MNC mit Thrombin (0,1 U/ml)					
		in Eigenplasma		in Kontrollplasma	
lag time		Kontrollen mit ASS		Kontrollen ohne ASS	
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,4876 (Unpaired t test)		0,7898 (Unpaired t test)	
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,4438 (Unpaired t test)		0,0907 (Unpaired t test)	
time to peak		Kontrollen mit ASS		Kontrollen ohne ASS	
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,1095 (Unpaired t test)		0,3160 (Unpaired t test)	
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,8287 (Unpaired t test)		0,3922 (Unpaired t test)	
thrombin peak		Kontrollen mit ASS		Kontrollen ohne ASS	
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,7051 (Unpaired t test)		0,4313 (Unpaired t test)	
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,6305 (Mann-Whitney test)		0,8534 (Mann-Whitney test)	
endogenous thrombin potential		Kontrollen mit ASS		Kontrollen ohne ASS	
in Eigenplasma	Kontrollen ohne ASS	0,7683 (Unpaired t test)		0,3316 (Unpaired t test)	
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,8534 (Mann-Whitney test)		0,7959 (Mann-Whitney test)	

MNC mit Thrombin (0,1 U/ml)			
		in Kontrollplasma	
lag time		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.5295 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU	0.4695 (Unpaired t test)	
time to peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.4857 (Mann-Whitney test)	
	JAK2V617F -HU	0.3095 (Mann-Whitney test)	
thrombin peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.4683 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU	0.9848 (Unpaired t test)	
endogenous thrombin potential		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	JAK2V617F +HU	0.3091 (Unpaired t test)	
	JAK2V617F -HU	0.9082 (Unpaired t test)	

MNC mit Thrombin (0,1 U/ml)					
		in Eigenplasma		in Kontrollplasma	
lag time		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,1616 (Unpaired t test)	0,5619 (Unpaired t test)	0,5031 (Unpaired t test)	0,6901 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0583 (Unpaired t test)	0,9145 (Unpaired t test)	0,2381 (Unpaired t test)	0,3369 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,1250 (Unpaired t test)	0,2367 (Unpaired t test)	0,7360 (Unpaired t test)	0,8993 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0702 (Unpaired t test)	0,9311 (Unpaired t test)	0,2286 (Unpaired t test)	0,2884 (Unpaired t test)
time to peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0130 (Mann-Whitney test)	0,8449 (Unpaired t test)	0,1179 (Mann-Whitney test)	0,0682 (Mann-Whitney test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0140 (Mann-Whitney test)	0,2085 (Unpaired t test)	0,1419 (Mann-Whitney test)	0,0174 (Mann-Whitney test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0759 (Mann-Whitney test)	0,9780 (Unpaired t test)	0,3037 (Mann-Whitney test)	0,3132 (Mann-Whitney test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0210 (Mann-Whitney test)	0,4959 (Unpaired t test)	0,0130 (Mann-Whitney test)	0,0880 (Mann-Whitney test)
thrombin peak		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0005 (Unpaired t test)	0,1054 (Unpaired t test)	0,0098 (Unpaired t test)	0,1366 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0002 (Unpaired t test)	0,0710 (Unpaired t test)	0,0078 (Unpaired t test)	0,0962 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,0759 (Mann-Whitney test)	0,2635 (Mann-Whitney test)	0,0759 (Mann-Whitney test)	0,3676 (Mann-Whitney test)
	Kontrollen ohne ASS	<0,0001 (Unpaired t test)	0,0293 (Unpaired t test)	0,0048 (Unpaired t test)	0,0443 (Unpaired t test)
endogenous thrombin potential		JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU	JAK2V617F +HU	JAK2V617F -HU
in Eigenplasma	Kontrollen mit ASS	0,0281 (Unpaired t test)	0,4658 (Unpaired t test)	0,0073 (Unpaired t test)	0,6325 (Unpaired t test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0095 (Unpaired t test)	0,3073 (Unpaired t test)	0,0026 (Unpaired t test)	0,4810 (Unpaired t test)
in Kontrollplasma	Kontrollen mit ASS	0,3037 (Mann-Whitney test)	0,6354 (Mann-Whitney test)	0,1059 (Mann-Whitney test)	0,3676 (Mann-Whitney test)
	Kontrollen ohne ASS	0,0008 (Unpaired t test)	0,0729 (Unpaired t test)	0,0003 (Unpaired t test)	0,1819 (Unpaired t test)





