

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

Untersuchungen zur Thrombozyten-Aggregation und zellulären Thrombingewinnung
bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie

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

Alexandra Walter
aus Wurzen

Mainz, 2021

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

Für All meine Lieben

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XII
1 Einleitung und Ziel der Arbeit	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Essentielle Thrombozythämie	2
2.1.1 Klassifikation und Diagnose.....	2
2.1.2 Pathogenese	3
2.1.2.1 Januskinase 2	3
2.1.2.2 Myeloproliferativer Leukämie Rezeptor.....	4
2.1.2.3 Calreticulin	5
2.1.2.4 Dreifach Negativ.....	6
2.1.3 Klinische Ausprägung.....	6
2.1.3.1 Komplikationen.....	6
2.1.3.1.1 Thromboembolische Ereignisse.....	7
2.1.3.1.2 Blutungen	7
2.1.3.2 Erkrankungstransformation.....	8
2.1.4 Prognose und Risikostratifizierung	9
2.1.4.1 Prognosemodelle	9
2.1.4.2 Risikostratifizierung	10
2.1.5 Risikoadaptierte Therapie.....	11
2.2 Hämostase.....	12
2.2.1 Thrombozyten	13
2.2.2 Primäre Hämostase.....	13
2.2.3 Sekundäre Hämostase	14
2.2.4 Triggersubstanzen der Hämostase.....	15
2.2.4.1 Adenosindi- und -triphosphat	15
2.2.4.2 Arachidonsäure	16
2.2.4.2 Kollagen	17
2.2.4.3 Convulxin	18
2.2.4.4 Thrombin	18
2.2.4.5 Thrombin Rezeptor Aktivierendes Peptid.....	19
2.3 Mononukleäre Zellen	20
3 Material und Methoden.....	22

3.1 Materialien	22
3.1.1 Geräte	22
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.3 Reagenzien	24
3.1.4 Software	27
3.2 Studie	27
3.2.1 Studiendesign.....	27
3.2.2 Fallzahl.....	27
3.2.3 Genehmigung.....	28
3.2.4 Rekrutierung.....	28
3.2.5 Ein- und Ausschlusskriterien	28
3.2.6 Kontrollprobanden	28
3.3 Methoden.....	29
3.3.1 Venöse Blutentnahme	29
3.3.2 Gewinnung von Plättchen-reichem, Plättchen-armen und Plättchen-freiem Plasma	29
3.3.4 Gewinnung von gewaschenen Plättchen	29
3.3.4 Gewinnung von Mononukleären Zellen.....	30
3.3.5 Lumiaggregometrie.....	30
3.3.5.1 Allgemeines Versuchsprinzip.....	30
3.3.5.2 Versuchsaufbau	31
3.3.5.3 Auswertung der Aggregation und ATP-Freisetzung	33
3.3.6 „Calibrated Automated Thrombography“(CAT)	34
3.3.6.1 Allgemeines Versuchsprinzip.....	34
3.3.6.2 Versuch zur Thrombingenerierung in PFP und PRP	35
3.3.6.3 Versuch zur Thrombingenerierung von MNC und WP	36
3.3.6.4 Auswertung der Thrombingenerierung.....	37
4 Ergebnisse	39
4.1 Statistische Analyse.....	39
4.2 Deskriptive Statistik.....	39
4.2.1 Patientencharakteristika	39
4.2.2 Probandencharakteristika	42
4.3 Explorative Datenanalyse	43
4.3.1 Agonisten-induzierte thrombozytäre Aggregation	43
4.3.1.1 Arachidonsäure-induzierte thrombozytäre Aggregation	43
4.3.1.2 TRAP-6-induzierte thrombozytäre Aggregation	44
4.3.1.3 Kollagen-induzierte thrombozytäre Aggregation	47

4.3.2 Agonisten-induzierte thrombozytäre ADP- und ATP-Freisetzung.....	49
4.3.2.1 Thrombozytäre ATP-Freisetzung unter TRAP-6-Stimulation.....	49
4.3.2.2 Thrombozytäre ATP-Freisetzung unter Kollagen-Stimulation	51
4.3.2.3 Thrombozytäre ADP-Freisetzung unter Kollagen-Stimulation	52
4.3.3 Messung der plasmatischen und thrombozytären Thrombingenerierung	54
4.3.3.1 “Lag Time”	54
4.3.3.2 “ttPeak”	58
4.3.3.3 “Thrombin Peak”	62
4.3.3.4 “ETP”	66
4.3.4 Messung der Thrombingenerierung von isolierten Thrombozyten.....	70
4.3.4.1 “Lag Time”	70
4.3.4.2 “ttPeak”	74
4.3.4.3 “Thrombin Peak”	78
4.3.4.4 “ETP”	82
4.3.5 Messung der Thrombingenerierung von mononukleären Zellen	86
4.3.5.1 “Lag Time”	86
4.3.5.2 “ttPeak”	90
4.3.5.3 “Thrombin Peak”	93
4.3.5.4 “ETP”	97
5 Diskussion.....	101
5.1 Differenzierte Thrombozyten-Aggregabilität bei ET-Patienten zeigt Hypo- und Hyperaggregabilität.....	101
5.1.1 Arachidonsäure-induzierte Aggregation von Thrombozyten bei ET-Patienten	102
5.1.2 TRAP-induzierte Aggregation von Thrombozyten bei ET-Patienten.....	105
5.1.3 Kollagen-induzierte Aggregation von Thrombozyten bei ET-Patienten	111
5.1.4 Delta-Storage Pool Deficiency in der ET.....	115
5.2 Differenzierte Thrombingenerierung der Thrombozyten von ET-Patienten.....	117
5.2.1 Differenzierte Thrombingenerierung der Thrombozyten von ET-Patienten im PRP in Abhängigkeit vom Trigger (TF, Thrombin, Convulxin).....	118
5.2.2 Einfluss des Blutplasmas und seiner Bestandteile auf die Zell-abhängige Thrombingenerierung in der ET.....	128
5.2.2.1 Thrombingenerierung im PFP.....	129
5.2.2.2 Vergleich der Thrombingenerierung der Thrombozyten von ET-Patienten im autologen Plasma und Kontrollplasma unter basalen Bedingungen und in Abhängigkeit der Trigger TF und Thrombin	130
5.3 Thrombingenerierung durch Mononukleäre Zellen (MNC) in der ET	135
5.3.1 Differenzierte Thrombingenerierung der Mononukleären Zellen von ET-Patienten unter basalen Bedingungen und nach Verwendung von TF und Thrombin.....	135

5.3.2 Einfluss des Blutplasmas und seiner Bestandteile auf die Thrombingenerierung der mononukleären Zellen von ET-Patienten durch Verwendung von autologem Plasma und Kontrollplasma	136
6 Zusammenfassung.....	142
7 Literaturverzeichnis	146
8 Anhang.....	156
8.1 Tabellen: Mediane, Minima und Maxima, Perzentile, Ranges	156
8.1.1 Agonisten-induzierte Thrombozytäre Aggregation mittels Chronolog.....	156
8.1.2 Agonisten-induzierte Thrombozytäre ADP- und ATP-Freisetzung mittels Chronolog	158
8.1.3 Plasmatischen und Thrombozytäre Thrombingenerierung mittels CAT.....	159
8.1.4 Thrombingenerierung der isolierten Thrombozyten mittels CAT	165
8.1.5 Thrombingenerierung der Mononukleären Zellen mittels CAT	170
8.2 Tabellen: p-Werte	175
8.2.1 Agonisten-induzierte Thrombozytäre Aggregation mittels Chronolog.....	175
8.2.2 Agonisten-induzierte Thrombozytäre ADP- und ATP-Freisetzung mittels Chronolog	177
8.2.3 Plasmatischen und Thrombozytären Thrombingenerierung mittels CAT.....	178
8.2.4 Thrombingenerierung der isolierten Thrombozyten mittels CAT	182
8.2.5 Thrombingenerierung der Mononukleären Zellen mittels CAT	189
8.3 Tabellen zum Vergleich der Parameter der primären (Chronolog) und sekundären Hämostase (CAT)	196

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AS	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium, Kalzium
CaCl ₂	Calciumchlorid, Kalziumchlorid
CALR	Calreticulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	“calibrated automated Thrombography”, kalibrierte automatische Thrombografie
CGS	Citrate-Glucose-Sodium, Citrat-Glukose-Natrium
COX	Cyclooxygenase
CP	“Creatinphosphat”, Kreatinphosphat
CPK	„Creatinphosphatkinase“, Kreatinphosphatkinase

DAG	Diazylglyzerol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
δ-SPD	„delta storage pool disease“, delta Speicherpool Erkrankung
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET	essentielle Thrombozythämie
ETP	endogenes Thrombin Potential
FcR	Fc-Rezeptor
FERM	„four-point-one ezrin radixin moesin“
G	Gauge
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GP	Glykoprotein
GTPase	Guanintriphosphatase
HBSS	“Hank’s balanced Salt Solution”
HCl	Salzsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HU	Hydroxyurea
IFN-α	Interferon-α
IL	Interleukin
INR	“International Normalized Ratio”
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat

IPSET	International Prognostic Score for ET, internationaler Prognose Score für ET
ITAM	“immunoreceptor tyrosine-based activation motif”
JAK2	Januskinase 2
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LOX	Lipooxygenase
M	Molar
max.	maximal
min.	minimal
min	Minuten
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MNC	“mononuclear Cells”, mononukleäre Zellen
mol	Mol
MP	Mikropartikel
MPL	myeloproliferativer Leukämie Rezeptor
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat

NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
NSAID	Nichtsteroidale Antirheumatika
PAR	Protease-aktivierender Rezeptor
PBS	„phosphate buffered solution“, phosphatgepufferte Salzlösung
PFP	“platelet-free plasma“, Plättchen-freies Plasma
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-disphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB/Akt	Proteinkinase B/Akt
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pM	Pikomolar
PMF	primäre Myelofibrose
PPP	“platelet-poor plasma“, Plättchen-armes Plasma
PPP-Reagenz	“platelet-poor-plasma-reagent“, Plättchen-armes-Plasma-Reagenz
PRP	“platelet-rich plasma“, Plättchen-reiches Plasma
PRP-Reagenz	“platelet-rich-plasma-reagent“, Plättchen-reiches-Plasma-Reagenz
PV	Polyzythämia vera
rpm	“revolutions per minute“, Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur

Sek	Sekunde
SH2	Src Homologie 2
STAT	„Signal Transducers and Activators of Transcription“, Signalübermittler und Aktivator der Transkription
TF	„Tissue Factor“, Gewebefaktor
TFPI	“tissue factor pathway inhibitor“, Gewebefaktor Signalweg Inhibitor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TP	Thromboxan-Rezeptor
TPO	Thrombopoetin
TRAP	Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid
TSP-1	Thrombospondin-1
TxA ₂	Thromboxan A2
TYK2	Thyrosinkinase 2
U	“Units“, Einheiten
vWF	von-Willebrand Faktor
vWS	von-Willebrand Syndrom
WHO	„World Health Organisation“, Weltgesundheitsorganisation
WP	„washed platelets“, gewaschene Plättchen, isolierte Thrombozyten
WT	Wildtyp
x g	Zentrifugalbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Auswertungsgrafik des Lumiaggregometers	33
Abbildung 2: Parameter des Thrombogramms	38
Abbildung 3: Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET nach Zugabe von Arachidonsäure (0,5 mg/ml), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme.....	44
Abbildung 4: Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET nach Zugabe von TRAP-6 (10 μ M), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme	45
Abbildung 5: Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET nach Zugabe von TRAP-6 (50 μ M), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme	47
Abbildung 6: Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET nach Zugabe von Kollagen (2 μ g/ml), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme	48
Abbildung 7: Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET nach Zugabe von Kollagen (10 μ g/ml), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme	49
Abbildung 8: thrombozytäre ATP-Freisetzung bei Patienten mit ET nach Zugabe von TRAP-6 (50 μ M), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme	51
Abbildung 9: thrombozytäre ATP-Freisetzung bei Patienten mit ET nach Zugabe von Kollagen (10 μ g/ml), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme	52
Abbildung 10: thrombozytäre ADP-Freisetzung bei Patienten mit ET nach Zugabe von Kollagen (10 μ g/ml), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme.....	54
Abbildung 11: „Lag time“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF und anionischen Phospholipiden	55
Abbildung 12: „Lag time“ im PRP, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml), D) unter Zugabe von Convulxin (50 ng/ml), E) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) und Convulxin (50 ng/ml)	58
Abbildung 13: „ttPeak“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF und anionischen Phospholipiden	59
Abbildung 14: „ttPeak“ im PRP, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml), D) unter Zugabe von Convulxin (50 ng/ml), E) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) und Convulxin (50 ng/ml)	62
Abbildung 15: „Thrombin Peak“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF und anionischen Phospholipiden.....	63
Abbildung 16: „Thrombin Peak“ im PRP, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml), D) unter Zugabe von Convulxin (50 ng/ml), E) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) und Convulxin (50 ng/ml)..	66
Abbildung 17: „ETP“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF und anionischen Phospholipiden..	67

Abbildung 18: „ETP“ im PRP, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml), D) unter Zugabe von Convulxin (50 ng/ml), E) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) und Convulxin (50 ng/ml)	70
Abbildung 19: „Lag time“ der isolierten Thrombozyten in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, A) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml).....	74
Abbildung 20: „ttPeak“ der isolierte Thrombozyten in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, A) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml).....	78
Abbildung 21: „Thrombin Peak“ der isolierten Thrombozyten in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, A) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml).....	82
Abbildung 22: „ETP“ der isolierten Thrombozyten in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, A) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml)	86
Abbildung 23: „Lag time“ der mononukleären Zellen in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, A) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml).....	90
Abbildung 24: „ttPeak“ der mononukleären Zellen in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml)	93
Abbildung 25: „Thrombin Peak“ der mononukleären Zellen in Elgen- oder Kontrollplasma resuspendiert, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml)	97
Abbildung 26: „ETP“ der mononukleären Zellen in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml)	100

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: WHO Kriterien für die Diagnose essentielle Thrombozythämie	2
Tabelle 2: konventioneller Score (Europäisches LeukämieNet)	9
Tabelle 3: IPSET	10
Tabelle 4: IPSET-Thrombose	10
Tabelle 5: Risikogruppen nach dem modifizierten praxis-relevanten IPSET-Thrombose Score	10
Tabelle 6: verwendete Geräte	22
Tabelle 7: verwendete Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 8: verwendete Puffer, Reagenzien mit deren Konzentration und/oder Zusammensetzung	24
Tabelle 9: Verwendete Software-Programme	27
Tabelle 10: Agonisten des Lumiaggregometerversuchs	32
Tabelle 11: Parameter der Lumiaggregometrie	33
Tabelle 12: Versuchsreihen im CAT für PFP und PRP	36
Tabelle 13: Versuchsreihen im CAT für MNC und WP	37
Tabelle 14: Parameter des Thrombogramms	38
Tabelle 15: demografische und klinische Charakteristika der ET-Patienten nach Mutation und zytoreduktiver Therapie	40
Tabelle 16: Blutparameter der ET-Patienten nach Mutation und zytoreduktiver Therapie	41
Tabelle 17: demografische Charakteristika und Blutparameter der Kontrollprobanden	42
Tabelle 18: Zusammenfassung der medianen Aggregationswerte in der Lumiaggregometrie mittels Chronolog	102
Tabelle 19: Zusammenfassung der medianen Arachidonsäure-induzierten Aggregationswerte in der Lumiaggregometrie mittels Chronolog	105
Tabelle 20: Zusammenfassung der medianen TRAP-6-induzierten Aggregationswerte in der Lumiaggregometrie mittels Chronolog	111
Tabelle 21: Zusammenfassung der medianen Kollagen-induzierten Aggregationswerte in der Lumiaggregometrie mittels Chronolog	115
Tabelle 22: Vergleich der medianen Parameter der Thrombozyten im PRP mittels CAT unter basalen Bedingungen	120
Tabelle 23: Vergleich der medianen Parameter der Thrombozyten im PRP mittels CAT unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden	122
Tabelle 24: Vergleich der medianen Parameter der Thrombozyten im PRP mittels CAT unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin	124
Tabelle 25: Vergleich der medianen Parameter der Thrombozyten im PRP mittels CAT unter Zugabe von 50 ng/ml Convulxin	126

Tabelle 26: Vergleich der medianen Parameter der Thrombozyten im PRP mittels CAT unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin	128
Tabelle 27: Vergleich der medianen Parameter der isolierten Thrombozyten in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter basalen Bedingungen.....	131
Tabelle 28: Vergleich der medianen Parameter der isolierten Thrombozyten in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden.....	132
Tabelle 29: Vergleich der medianen Parameter der isolierten Thrombozyten in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin	133
Tabelle 30: Vergleich der medianen Parameter der MNC in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter basalen Bedingungen	137
Tabelle 31: Vergleich der medianen Parameter der MNC in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden.....	138
Tabelle 32: Vergleich der medianen Parameter der MNC in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin.....	139

1 EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Die essentielle Thrombozythämie (ET) zählt zu den Philadelphia-negativen klassischen Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) und zeigt sich durch eine erhöhte Thrombozytenkonzentration im Blut ($\geq 450 \times 10^9/l$), die durch klonale Myeloproliferation der Megakaryozyten entsteht (1-3). Als Ursache der klonalen Expansion konnten die im 21. Jahrhundert entdeckten Genmutationen der *Januskinase 2 (JAK2)*, des *myeloproliferativen Leukämie Rezeptors (MPL)* und des *Calreticulins (CALR)* ausgemacht werden (4). Obwohl die Überlebenswahrscheinlichkeit von ET-Patienten der jeweiligen europäischen Geschlechter- und Alterspopulation ähnelt, bestimmen thromboembolische und hämorrhagische Komplikationen die Morbidität und Mortalität (2, 5). Zur Abschätzung des Risikos für Komplikationen wurden verschiedene Prognosemodelle erstellt (6-8). Ziel der Forschung ist es jedoch die Mechanismen und Ursachen für die Entstehung der Thrombosen und Blutungen zu finden, um so die Prophylaxe und Therapie zu verbessern. Die Hypothese, dass die hohe Thrombozytenkonzentration hierfür verantwortlich sei, wurde bald schon verworfen (9). Vielmehr geht man von einem multifaktoriellen Geschehen aus (9). Verschiedene Studien identifizierten Abnormalitäten der Thrombozytenstruktur und – funktion bei ET-Patienten (10). Außerdem wurde der Einfluss von Immunzellen, wie Leukozyten (Neutrophile Granulozyten und Monozyten) (11-13), Plasmabestandteile (Mikropartikel) (14-18) und Endothelzellen (19) auf die Hämostase in der ET untersucht und eine mögliche Beteiligung an der Entstehung von Komplikationen gezeigt. Verstanden hat man das gemischte Spektrum aus thromboembolischen und hämorrhagischen Komplikationen der ET-Patienten jedoch noch nicht.

Ziel dieser Dissertation ist daher die Erforschung der thrombozytären Aggregation in Verbindung mit der Sekretion von den amplifizierenden Thrombozytenagonisten ADP und ATP aus den δ -Granula, sowie der Thrombinbildungskapazität von Thrombozyten und mononukleären Zellen (MNC) von ET-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden *in vitro*. Zudem soll der Einfluss von Plasmabestandteilen in Plasmatauschversuchen auf die Thrombinbildung von Thrombozyten und MNC untersucht werden. Die Ergebnisse sollen zum Verständnis der Pathophysiologie bei der ET beitragen und eventuell neue Ansätze zur individuellen Risikoeinschätzung entsprechend des Mutationstypes aufzeigen.

2 LITERATURDISKUSSION

2.1 ESSENTIELLE THROMBOZYTHÄMIE

Die essentielle Thrombozythämie (ET) gehört zu den Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) und ist durch eine erhöhte Thrombozytenkonzentration im Blut ($\geq 450 \times 10^9/l$) gekennzeichnet (1). Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei etwa 0,38 (2) bis 2,5 pro 100.000 Einwohner jährlich (20). Im Allgemeinen zählen die MPN's zu den seltenen Krebsarten mit einer niedrigen Inzidenz (6 von 100.000 Personen pro Jahr) (2). Die ET ist dabei eine Erkrankung des mittleren bis fortgeschrittenen Alters mit einem medianen Alter von 68 Jahren (2).

2.1.1 KLASSIFIKATION UND DIAGNOSE

Neben der ET zählen auch die Polyzythämia vera (PV) und die primäre Myelofibrose (PMF) zu den MPN's (3). Diese Erkrankungen haben gemeinsam, dass sie aus einer klonalen Myeloproliferation der Stammzellen hervorgehen und ähnliche Mutationsmuster aufweisen (3). Wegen ihrer überschneidenden Charakterzüge werden sie in einer Gruppe, der Kategorie der Philadelphia-negativen klassischen MPN's, zusammengefasst (2).

Aber auch andere Ursachen können zu einer erhöhten Thrombozytenkonzentration führen. Dazu zählen Infektionen, Malignitäten, chronische Entzündungen, Gewebedefekte, Hämolysen, Medikamente, Eisenmangelanämien und nach Splenektomie. Zusammengefasst bezeichnet man diese sekundären Thrombozytosen als reaktive Thrombozytosen (21).

Die Unterscheidung ist prognostisch und therapeutisch entscheidend. Daher wurden durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die in Tabelle 1 aufgeführten Kriterien festgelegt. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Knochenmarksbiopsie. (1)

Mit ihr kann die Diagnose ET morphologisch gesichert und differentialdiagnostisch andere myeloide Neoplasien, wie vor allem die präfibrotische PMF, abgegrenzt werden (3).

Tabelle 1: WHO Kriterien für die Diagnose essentielle Thrombozythämie (1)

Hauptkriterien
1. Thrombozytenkonzentration $\geq 450 \times 10^9/l$
2. Knochenmarksbiopsie: - vor allem Proliferation der Megakaryozytenlinie mit angestiegener Zahl an vergrößerten, reifen Megakaryozyten mit hyperlobulierten Nuclei - kein signifikanter Anstieg oder Linksverschiebung der neutrophilen Granulopoese oder Erythropoese - sehr geringe Vermehrung von Retikulinfasern (Grad 1)

3. keine Übereinstimmung mit den WHO Kriterien für BCR-ABL1 ⁺ Chronisch Myeloische Leukämie, Polyzythämia vera, primäre Myelofibrose, myelodysplastisches Syndrom oder anderen myeloiden Neoplasien
4. Vorhandensein einer JAK2 , CALR oder MPL Mutation
Nebenkriterium
Vorhandensein eines klonalen Markers oder Abwesenheit eines Beweises für eine reaktive Thrombozytose
Für die Diagnose einer ET werden alle 4 Hauptkriterien oder die ersten 3 Hauptkriterien und das Nebenkriterium benötigt.

2.1.2 PATHOGENESE

MPN's entstehen aus einer einzelnen somatisch mutierten hämatopoetischen Stammzelle, die klonal expandiert. Dabei kommt es bei der ET zu einer Hyperplasie der Megakaryozyten, deren Ursache die Aktivierung des Zytokin/Rezeptor/JAK2 Signalweges und dessen nachgeschalteten Signale ist. (4)

Bisher wurden drei wesentliche Mutationen entdeckt, die zur ET führen können. Dazu zählen die Genmutationen der *Januskinase 2* (*JAK2*), von *Calreticulin* (*CALR*) und dem *myeloproliferativen Leukämie Rezeptor* (*MPL*). (3, 4)

Die Hauptmutationen (*JAK2* V617F, *JAK2* Exon 12 Mutation, *MPL* W515L/K und *CALR* Mutation) führen zur oben genannten Aktivierung und damit zur Proliferation der Stammzelle (4).

2.1.2.1 JANUSKINASE 2

Die Januskinase 2 (*JAK2*) ist Teil der JAK Familie (4, 22). Die Mitglieder dieser Familie sind Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, deren Funktion mit Zytokinen assoziiert ist (22, 23).

Durch Bindung an hämatopoetische Zytokinrezeptoren stellen sie den katalytischen Teil dieser Rezeptoren dar. Außerdem ist die Bindung von JAKs an die Rezeptoren wichtig, damit diese zur Zelloberfläche transportiert werden. *JAK2* binden an homodimere Rezeptoren, wie dem EPO-Rezeptor (Erythropoetin), TPO-Rezeptor (Thrombopoetin) und G-CSF Rezeptor (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor). (4)

JAKs haben 2 Kinasedomänen, eine katalytisch aktive am C Terminus und eine katalytisch inaktive Pseudokinase (4, 22). Die Aufgaben der Pseudokinase beinhaltet die Inhibition der Kinasedomäne zum Schutz vor Selbstaktivierung und die Förderung der Zytokin-abhängigen Aktivierung (4). Am N-Terminus der JAKs befindet sich eine FERM-ähnliche Domäne („four-point-one ezrin radixin moesin“) und eine SH2-ähnliche Domäne (Src Homologie 2) (4, 22). Dabei ist die nichtkovalente Bindung an die Zytokinrezeptoren abhängig von der FERM Domäne (4).

Binden Zytokine an den Rezeptor, so kommt es zur Konformationsänderung. Diese wiederum aktiviert die gebundenen JAKs durch Transphosphorylierung. Aktivierte JAKs phosphorylieren daraufhin die Rezeptoren und ermöglichen damit anderen Signalmolekülen die Bindung. Dazu zählen die STAT's („Signal Transducers and Activators of Transcription“, Signalübermittler und Aktivator der Transkription), welche nach Homodimerisierung oder Heterodimerisierung zum Nucleus gelangen und dort die Transkription regulieren. (4, 22, 23)

Dieser JAK-STAT-Signalweg ist wichtig für die Hämatopoese (23).

Im Jahr 2005 wurde die somatische Mutation im Exon 14 des *JAK2* Gens gefunden. Dabei hat sich durch die Mutation die Base Guanin zu Thymin im Nucleotid 1849 verändert. Die Folge ist der Austausch der Aminosäure Valin zu Phenylalanin im Codon 617. Daraus ergibt sich die Bezeichnung *JAK2 V617F*. (4)

Diese Mutation ist bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie mit 50 bis 60% am häufigsten. Dagegen ist die Mutation im Exon 12 von *JAK2* eher selten (3, 4).

Die Aktivierung von *JAK2* durch die Mutation *V617F* ist noch nicht komplett verstanden. Aber anscheinend ist die, durch die Mutation verursachte, Konformationsänderung der C Helix in der Pseudokinasedomäne daran beteiligt (4).

Es gibt verschiedene Ansätze, wie sich das aktivierte *JAK2 V617F* auswirkt. Am Ende stimuliert es die Expansion der erythrozytären, megakaryozytären und/oder granulozytären Abstammungslinien (23).

Diese Mutation im *JAK2 Gen* ist eine der häufigsten Mutationen bei der klonalen Hämatopoese unbestimmten Potenzials welche mit dem Altern assoziiert ist. Jedoch hat sie auch eine niedrige Penetranz um eine MPN zu verursachen. Dies lässt auf andere Co-Faktoren zur Ausprägung der Erkrankung schließen. Da im Alter die hämatopoetischen Stammzellen langsam ihre Funktion verlieren, ist dies zum Beispiel ein möglicher intrinsischer Grund zur vermehrten Alters-assozierten Ausbildung der Erkrankung. (4)

Im Vergleich zu ET-Patienten mit anderen Mutationsstatus, ist für Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation das Erreichen eines höheren Alters, ein höherer Hämoglobinspiegel, eine Leukozytose und eine niedrigere Thrombozytenkonzentration charakteristisch (3).

2.1.2.2 MYELOPROLIFERATIVER LEUKÄMIE REZEPTOR

Der myeloproliferative Leukämie Rezeptor (MPL) ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor Rezeptor. Er zählt zu der Typ 1 Zytokinrezeptorfamilie und findet sich in hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryozytenvorläufern und Thrombozyten. MPL enthält auf der zytosolischen Seite essentielle Bindungsstellen für *JAK2*. Der primäre Ligand des Rezeptors ist Thrombopoetin (TPO). (24)

Bindet dieser Ligand am Rezeptor, so kommt es zur Aktivierung und damit zur Homodimerisation des Rezeptors. Dies aktiviert *TYK2* (Tyrosinkinase 2), sowie *JAK2* und damit auch den Signalweg der *STATs*. Diese sind Aktivatoren der Transkription und induzieren

die Proliferation der Megakaryozyten und steigern damit die Thrombozytenproduktion (4, 24). JAK2 ist für diese Signalübertragung und damit für die Proliferationsinduktion durch MPL unverzichtbar. (4)

ET-Patienten weisen nur in 2% (4) bis 4% (3) der Fälle eine Mutation von *MPL* auf.

Dabei gibt es zwei Hauptmutationstypen im Exon 10 des *MPL* Gens, die mit MPN's assoziiert sind. Die häufigste Mutation betrifft die Basencodierung für die Aminosäure Tryptophan W515. Die Aminosäure kann dadurch gegen verschiedene andere ausgetauscht werden. Die markantesten sind *MPL W515L* und *MPL W515K*. *MPL W515* schützt den Rezeptor vor Selbstaktivierung. Mutationen in dieser Position führen zur spontanen Aktivierung von MPL ohne Bindung von TPO. Seltener ist die Mutation *MPL S505N*. Die betroffene Aminosäure liegt in der Transmembranen Domäne zur Stabilisierung des Rezeptors, wenn dieser als aktives Dimer vorliegt. Eine Mutation von S505N führt jedoch schon vorher zur Bildung eines stabilen aktiven Dimers und damit auch zur Aktivierung von JAK2. (4)

Patienten mit einer Mutation von *MPL* sind ältere, weibliche Personen mit einem niedrigeren Hämoglobinlevel und einer höheren Thrombozytenkonzentration im Vergleich zu anderen ET-Patienten mit anderen Mutationsstatus (3).

2.1.2.3 CALRETICULIN

Calreticulin (CALR) ist ein multifunktionales Ca^{2+} -bindendes Chaperon, welches vor allem im Endoplasmatischen Retikulum (ER) vorkommt (3). Dort führt es die Qualitätskontrolle der Proteine nach N-Glykosylierung durch und dient der Ca^{2+} -Speicherung (4).

Erst 2013 wurden die Frameshiftmutationen des *CALR*-Gens im Exon 9 entdeckt. Dabei sind bisher nur die +1 Frameshifts als Pathogen zu sehen. Der Frameshift führt zu einem neuen C-Terminus ohne das sogenannte KDEL-Motiv, welches wichtig für die Proteinzurückhaltung im endoplasmatischen Retikulum ist. Außerdem trägt die neue Aminosäuresequenz positive Ladungen. Jedoch sind die negativen Ladungen des Wildtyp-Calreticulins (WT CALR) nötig für die Ca^{2+} -Bindung. (4)

Das WT CALR bindet den MPL-Rezeptor im ER und kontrolliert dort dessen Qualität. Daraufhin verbleibt das WT CALR im ER, während der Rezeptor an die Zelloberfläche transportiert wird. Dort wird der Rezeptor durch Bindung von Thrombopoetin (TPO) aktiviert. (4)

Der CALR Mutant bindet ebenfalls den MPL-Rezeptor im ER, aber durch den neuen C-Terminus wird diese Bindung beeinflusst und CALR bleibt am MPL gebunden. So gelangt CALR zusammen mit dem Rezeptor an die Zelloberfläche. Die Aktivierung von MPL ist nun abhängig vom neuen C-Terminus. Vor allem der STAT-Signalweg wird aktiviert, während die Extrazellulären Signal-regulierenden Kinasen und der PI3K Signalweg kaum aktiviert werden. Beim WT CALR werden alle 3 Wege aktiviert. Das MPL mit mutierten CALR kann kaum durch TPO aktiviert werden. (4)

CALR Mutanten werden auch durch Sekretion freigesetzt und können so eventuell die Zytokinsekretion von Monozyten anstoßen (4). Zur onkogenen Transformation von CALR wird der mutierte C Terminus sowie MPL benötigt (4).

Es werden zwei häufige Mutationen des *CALR*-Gens unterschieden. Beim Typ 1 handelt es sich um eine Deletion (52-bp Deletion). Dadurch werden fast alle Wildtyp Sequenzen von Exon 9 und Ca^{2+} -Bindungsstellen verloren. Beim Typ 2 kommt es zur Insertion (5-bp Insertion). Es ähnelt der Wildtyp-Sequenz noch sehr und hat auch noch 50% der negativen Ladungen erhalten. (4)

Die Häufigkeit der Mutation wird von 15% (3) bis 25 % (4) angegeben. Typ 1 kommt dabei in etwa 55% der Fälle vor und Typ 2 bei ca. 35% (4).

Charakteristisch für Patienten mit *CALR*-Mutation ist ein jüngeres Alter, männliches Geschlecht, höhere Thrombozytenkonzentration, niedrigerer Hämoglobinspiegel, niedrigere Leukozytenkonzentrationen und ein niedrigeres Thromboserisiko im Vergleich zu anderen ET-Patienten mit anderen Mutationsstatus (3).

2.1.2.4 DREIFACH NEGATIV

Ist ein ET-Patient negativ auf die häufigsten Mutationen wie *JAK2 V617F*, *CALR* Mutationen, *MPL W515L*, *MPL W515K* und *MPL S505N* getestet wurden, so spricht man von dreifach negativ (4). Bis zu 20% der ET-Patienten sind dies wahrscheinlich (3). Einige Patienten mit einem dreifach negativen Status weisen aktivierende Mutationen von *MPL* außerhalb vom Exon 10 auf (2, 4). Diese nicht-typischen Mutationen könnten somatisch erworben oder vererbt sein (2). Bei neuen Sequenzierungen wurden aber auch andere DNA-Sequenz-Varianten und Mutationen entdeckt. Bei Patienten der Mayo Klinik in Rochester (Minnesota, USA) waren dabei die häufigsten *TET2* und *ASXL* (3).

2.1.3 KLINISCHE AUSPRÄGUNG

Klinisch sind Patienten mit ET häufig asymptomatisch (25, 26). Sie haben jedoch ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse und Blutungen, sodass es durch Auftreten dieser Komplikationen erst zur Diagnose kommt (5). Ansonsten erfolgt die Diagnose auch häufig zufällig (z.B. bei Blutbildkontrollen) (26). Neben diesen schwerwiegenden Ereignissen können auch vasomotorische Symptome wie Kopfschmerzen, Schwindel, vorübergehende neurologische oder okkuläre Störungen, Tinnitus, atypische Brustbeschwerden, Parästhesien und Erythromelalgien vorkommen. Diese basieren möglicherweise auf abnormalen Thrombozyten-Endothel-Interaktionen in den kleinen Gefäßen (3). Weiterhin kann es zur Splenomegalie kommen (25).

2.1.3.1 KOMPLIKATIONEN

Vor allem Komplikationen bestimmen die Morbidität und Mortalität von MPN's (5). Zu diesen gehören Thrombosen und Blutungen (5). Im nachfolgenden werden diese genauer aufgezeigt.

2.1.3.1.1 THROMBOEMBOLISCHE EREIGNISSE

Thrombotische Komplikationen sind sehr häufig und kommen bei über 30% der MPN's vor. Dabei treten sie bei bis zu 29% vor bzw. zum Diagnosezeitpunkt auf (5). In einer Studie (5) hatten bis zu 2,5% der Patienten sogar tödliche thrombotische Ereignisse.

Die hohe Rate führt auch zu einer erhöhten Mortalität. Nach einem Ereignis erhöht sich auch die Rate für wiederkehrende Thrombosen. Somit ist die Thrombosevorgeschichte, neben einem höheren Alter, ein wichtiger Risikofaktor für thrombotische Komplikationen und führen zur Einstufung in die Hoch-Risikogruppe bei ET. Damit ist diese Komplikation ein Anzeichen für eine schlechtere Prognose, denn das Vorhandensein einer Thrombose ist auch mit einer reduzierten Überlebenszeit assoziiert. Arterielle Thrombosen sind dreimal häufiger als venöse bei MPN's. Jedoch treten venöse Thromboembolien häufiger beim männlichen Geschlecht auf. (3, 5)

Thrombosen treten wesentlich mehr in atypischen Lokalisationen bei MPN's auf als in der Allgemeinbevölkerung. Zu diesen Lokalisationen zählen die Milzvenenthrombose, die zerebrale Sinusvenenthrombose und Obstruktionen des hepatisch venösen Abflusses. Mögliche Ursachen der Ereignisse können Gefäßstörungen, Thrombozytenaktivierung, Endothelschäden und Mikropartikel-induzierte Koagulation sein. Auch die klassischen Risikofaktoren für eine Thrombose, die kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertension und Diabetes mellitus, erhöhen stark das Risiko für MPN Patienten. (3, 5)

Zu den klassischen Risikofaktoren für venöse Thromboembolien zählen große Operationen, Hormone ,wie die orale Kontrazeption, und Schwangerschaft (5). Eine Leukozytose erhöht vor allem das Risiko für myokardiale Infarkte und senkt das Überleben von ET-Patienten stark (5). Auch die Mutationen haben Einfluss auf das Risiko. So erhöht sich das Risiko für arterielle Thrombosen bei einer *JAK2* Mutation, während *CALR* mutierte Patienten ein niedrigeres Risiko für größere Thrombosen aufweisen als Patienten mit *JAK2* Mutation (2, 3, 5).

Erstaunlicherweise ist eine isolierte Thrombozytose nicht mit einem erhöhten Thromboserisiko assoziiert. Im Gegenteil, eine Thrombozytenkonzentration von über $1000 \times 10^9/l$ reduziert sogar das Risiko für große Thrombosen. Diese Patienten erleiden häufiger die im nachfolgenden Kapitel erläuterte Blutungskomplikation. (3, 5)

2.1.3.1.2 BLUTUNGEN

Neben einem erhöhten Risiko für thrombotische Komplikationen ist auch das Blutungsrisiko bei MPN's erhöht. Als initiales Symptom liegt die Prävalenz bei ca. 3% bis 18% bei ET-Patienten. Nach der Diagnose kommt es bei bis zu 4% der MPN Patienten zu hämorrhagischen Komplikationen in der ersten Dekade. Die Gesamtprävalenz für Blutungskomplikationen liegt bei etwa 9% für die ET. Blutungen in der Anamnese erhöhen auch hier das Blutungsrisiko. Neben der Einnahme von Aspirin (ASS), einer Leukozytose und

einer Thrombozytose, erhöhen vor allem große Operationen das Risiko für die Komplikation wesentlich. Für letzteres liegt die Inzidenz pro 100 Patientenjahre der MPN's bei 7,3%. (5)
In Studien wurde auch einer Erhöhung des Blutungsrisikos unter Anagrelidtherapie festgestellt (27, 28).

Die Ursachen für eine Blutung bei MPN Patienten sind multifaktoriell. Es können Veränderungen der primären Hämostase, wie quantitative und qualitative Thrombozytenfunktionsstörungen, Veränderungen des Gefäßendothels, eine Thrombozytopenie oder auch ein erworbenes von-Willebrand Syndrom (vWS) zur Blutung führen. (5)

Dabei wird vor allem bei Vorhandensein eines erworbenen vWS das Risiko verschärft, da große von-Willebrand Multimere durch Bindung an die Thrombozyten die Aktivität des von-Willebrand Faktors reduzieren. Dies ist sehr ausgeprägt bei extremen Thrombozytosen, aber auch bei niedrigeren Thrombozytenkonzentrationen risikoverschärfend. (3, 5)

Bei einer *CALR* Mutation besteht ein signifikant höheres Risiko für große Blutungen, v.a. unter ASS-Therapie im Vergleich zur reinen Observation (5).

2.1.3.2 ERKRANKUNGSTRANSFORMATION

Nicht nur die oben beschriebenen Komplikationen sind mögliche Folgen der Erkrankung.

Die ET kann auch eine Erkrankungstransformation durchlaufen und dann in eine Polyzythämia vera, bei der alle Zelllinien betroffen sind, übergehen (2, 26). Es besteht weiterhin die Möglichkeit für einen Übergang in eine Myelofibrose oder sogar Leukämie (26). Das Risiko für eine Leukämietransformation nach 15 Jahren liegt im Durchschnitt bei 3% (26), während die Rate nach 20 Jahren in einer anderen Publikation mit 5% angegeben wird (3). Die fibrotische Transformationsrate liegt etwas höher (3). Nach 15 Jahren liegt das Risiko für den Übergang in eine Myelofibrose bei etwa 10% (26). Dabei gibt es je nach Mutationsstatus Unterschiede. So ist das Risiko bei *JAK2* V617F Mutation niedriger für eine Post-ET Myelofibrose und es besteht keine Assoziation zu einer leukämischen Transformation (3). Auch bei der *MPL* Mutation ist bisher keine Assoziation zu einer leukämischen Transformation bekannt (3). Patienten mit dreifach negativen Mutationsstatus zeigen jedoch ein erhöhtes Risiko für eine leukämische Transformation gegenüber Patienten mit *CALR*- oder *JAK2*-Mutation (29). Dagegen haben *CALR*-mutierte, vor allem mit Typ 1 Mutation (2), ein höheres Risiko für den Übergang in eine Myelofibrose (26) und es ist sogar wahrscheinlich das die *CALR* Mutation für diese Transformation verantwortlich ist (2).

Zu den Risikofaktoren für eine fibrotische Transformation gehören eine präfibrotische PMF Morphologie, ein fortgeschrittenes Alter und eine Anämie. Auch für die leukämische Transformation spielt ein höheres Alter eine wichtige Rolle. Hinzu kommen ein abnormaler Karyotyp und eine erhöhte Leukozytenkonzentration von $\geq 15 \times 10^9/l$, die das Risiko beeinflussen. Im Gegenzug sind Faktoren, die das Leukämie-freie Überleben mitbestimmen,

eine präfibrotische PMF Morphologie, Thrombosen und extreme Thrombozytosen (Thrombozyten $>1.000 \times 10^9/l$). (3)

2.1.4 PROGNOSE UND RISIKOSTRATIFIZIERUNG

Die Lebenserwartung aller MPN's ist generell reduziert im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung. Jedoch ist die Überlebenswahrscheinlichkeit bei ET-Patienten ähnlich in der jeweiligen europäischen Geschlechter- und Alterspopulation. (2)

Der Mutationsstatus hat dabei keinen Effekt auf das Überleben bei der ET (3, 30).

In einer Studie betrug das mittlere Überleben etwa 20 Jahre. Im Unterschied dazu wurde aber festgestellt, dass Patienten unter 60 Jahre sogar eine mediane Überlebenszeit von 33 Jahren hatten. (30)

Somit ist das Alter wieder ein entscheidender Faktor für die Erkrankung. Weitere Risikofaktoren für das Gesamtüberleben sind außerdem eine präfibrotische PMF Morphologie, Thrombosen in der Vorgeschichte, eine Leukozytose und eine Anämie (3).

2.1.4.1 PROGNOSEMODELLE

Zur Abschätzung möglicher Risiken und damit verbundene Faktoren, die das Überleben beeinflussen, wurden verschiedene Prognosemodelle entwickelt (2).

Der konventionelle Score des europäischen LeukämieNet dient der Abschätzung von vaskulären Komplikationen. Es werden nur zwei Risikogruppen unterschieden. Danach ist eine Entscheidung über eine zytoreduktive Therapie möglich. Die Faktoren sind in Tabelle 2 aufgelistet. Liegt kein Risikofaktor vor, so ist nur ein niedriges Risiko vorhanden und es wird empfohlen, die Patienten zu überwachen oder eine niedrig dosierte ASS-Therapie einzuleiten. Besteht mindestens ein Risikofaktor, so ist der Patient im Hochrisikobereich einzuordnen und es sollte eine zytoreduktive Therapie plus niedrig dosiertes ASS begonnen werden. (2, 6)

Tabelle 2: konventioneller Score (Europäisches LeukämieNet) (6)

konventioneller Score
- Alter ≥ 60 Jahre
- vorhergehende Thrombose oder große Blutung
- Thrombozytenkonzentration $\geq 1500 \times 10^9/l$

Mit Hilfe des IPSET (=International Prognostic Score for ET, internationaler Prognose Score für ET) soll eine Überlebensvorhersage getroffen werden. Dabei werden je nach Risikofaktor Punkte verteilt (siehe Tabelle 3). Ein niedriges Risiko besteht bei 0 Punkten. Bei 1 bis 2 Punkten besteht ein intermediäres Risiko mit einem medianen Überleben von 24,5 Jahren. Werden 3 oder 4 Punkte laut Score vergeben, so hat der Patient ein hohes Risiko und das mediane Überleben liegt bei 13,8 Jahren. (2, 7)

Tabelle 3: IPSET (=International Prognostic Score for ET, internationaler Prognose Score für ET) (7)

IPSET	
-	Alter $\geq$ 60 Jahre (2 Punkte)
-	vorhergehende Thrombose (1 Punkt)
-	Leukozytenkonzentration $> 11 \times 10^9/l$ (1 Punkt)

Weiterhin gibt es den IPSET-Thrombose Score. Dieser berücksichtigt zusätzlich Kardiovaskuläre Risikofaktoren und das Vorhandensein der Mutation JAK2 V617F. JAK2 V617F ist ein starker thrombophiler Faktor. Mit Hilfe dieses Scores wird das Thromboserisiko abgeschätzt. Für die in Tabelle 4 aufgeführten Risikofaktoren werden auch Punkte vergeben. Bis zu einem Punkt besteht ein niedriges Risiko. Man geht davon aus, dass etwa 1,03% der Patienten pro Jahr ein thrombotisches Ereignis erleiden. Bei einem intermediären Risiko mit 2 Punkten sind 2,35% der Patienten pro Jahr von einer Thrombose betroffen. Mit über 3 Punkten besteht ein hohes Risiko. 3,56% dieser Patienten pro Jahr bekommen eine Thrombose. (2, 8)

Tabelle 4: IPSET-Thrombose (8)

IPSET-Thrombose	
-	Alter $\geq$ 60 Jahre (1 Punkte)
-	vorhergehende Thrombose (2 Punkt)
-	Kardiovaskuläre Risikofaktoren (Hypertension, Diabetes mellitus, aktiver Nikotinabusus) (1 Punkt)
-	JAK2 V617F Mutation (2 Punkte)

2.1.4.2 RISIKOSTRATIFIZIERUNG

Seit einer Weile gibt es den modifizierten praxisrelevanten IPSET-Thrombose Score, welcher die Patienten in vier Gruppen einteilt (2, 31). Die vier Risikogruppen sind in Tabelle 5 aufgeschlüsselt.

Tabelle 5: Risikogruppen nach dem modifizierten praxis-relevanten IPSET-Thrombose Score (2, 3, 31)

Risikogruppen	
Risiko	Faktoren
sehr niedriges Risiko	- Alter $\leq$ 60 Jahre - keine Thrombosen - JAK2 Wildtyp

niedriges Risiko	- Alter $\leq$ 60 Jahre - keine Thrombosen - JAK2 Mutation
intermediäres Risiko	- Alter > 60 Jahre - keine Thrombosen - JAK2 Wildtyp
hohes Risiko	- Thrombose oder Alter > 60 Jahre - JAK2 Mutation

Anhand dieser Risikostratifizierung lässt sich die Therapie risikoadaptiert durchführen. Dies wird im nachfolgenden Kapitel näher erläutert.

2.1.5 RISIKOADAPTIERTE THERAPIE

Da Komplikationen die Morbidität und Mortalität von MPNs bestimmen, ist die Identifizierung und Senkung des Risikos für Komplikationen in der Therapie entscheidend (2, 5). Dazu nutzt man die oben beschriebenen Risikogruppen.

Patienten mit niedrigem Risiko werden überwacht oder erhalten niedrig dosiertes ASS. Vor allem für JAK2 V617F positive Patienten hat die ASS-Therapie Vorteile. Sie stellt eine Vorsorge für venöse Thrombosen und für arterielle Thrombosen bei Patienten mit Kardiovaskulären Risikofaktoren dar. Auch ist ASS zur Komplikationsprophylaxe bei Schwangeren, vor allem mit vorliegender JAK2 V617F Mutation, hilfreich. Mikrozirkulationsstörungen (vasomotorische Symptome) werden ebenfalls effektiv mit ASS behandelt. Die zweimalige Einnahme von 100 mg ASS ist möglicherweise besser wirksam als eine einzelne Dosis mit 100 mg pro Tag. (3)

Eine Ausnahme bei niedrigem Risiko stellen Patienten mit extremer Thrombozytose dar. Diese fördert die Entstehung eines erworbenen vWS. (3)

Daher ist eine ASS-Therapie mit Vorsicht einzusetzen, da eine erhöhte Blutungsgefahr besteht (3, 5). Bei einer extremen Thrombozytose (Thrombozytenkonzentration $\geq 1000 \times 10^9/l$) und/oder einem bestehenden erworbenen vWS mit einer vWF-Aktivität < 30% sollte daher ASS vermieden werden (5).

Vielmehr sollte überlegt werden eine zytoreduktive Therapie bei Patienten mit Blutungsrisiko einzuleiten, da diese Medikamente das erworbene vWS und auch Thrombozytosen verbessern können. Somit kann das Blutungsrisiko gesenkt werden. Patienten die wiederkehrende Blutungsereignisse haben, jedoch die Thrombozytenkonzentration keine zytoreduktive Therapie nötig machen würde, können trotz allem von dieser Therapie profitieren. (5)

Beim intermediären Risiko wird keine zytoreduktive Therapie empfohlen. Es sollte hier individuell von Fall zu Fall entschieden werden. (3)

Hochrisikopatienten sollten zusätzlich zum ASS eine zytoreduktive Therapie erhalten. „First line“ Medikament ist dabei Hydroxyurea (HU). Dieses reduziert das Thromboserisiko. HU wird titriert verabreicht bis die Thrombozyten in normaler Konzentration vorliegen. (3)

Besteht eine Intoleranz oder Resistenz gegenüber HU werden als „second line“ Medikamente Interferon- α (IFN- α) oder Anagrelid empfohlen (6).

Tefferi und Barbui empfehlen dabei IFN- α bei jüngeren Patienten (< 65 Jahre) einzusetzen. Außerdem plädieren sie noch zu Busulfan als „second line“ Medikament bei älteren Patienten. (3)

Busulfan erhöht jedoch das Risiko einer leukämischen Transformation und das Entstehen von sekundären Neoplasien. Renso et al. zeigten in ihrer Langzeitstudie aber auch, dass niedrig dosiertes Busulfan eine Option für ältere Patienten darstellt. (32)

Mit Anagrelid steht jedoch ein, laut ANAHYDRET Studie (28), ebenbürtiges Medikament zu HU zur Verfügung. Das europäische LeukämieNet empfiehlt Anagrelid jedoch nur als „second line“ Medikament, da die PT1 Studie von Harrison et al. (27) eine klare Überlegenheit von HU gegenüber Anagrelid zeigte (6).

Bei einer venösen Thrombose kann eine systemische Antikoagulation mit zusätzlicher täglicher ASS-Einnahme bei *JAK2* V617F positiven Patienten bzw. bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren erforderlich sein. Außerdem kann sich die Aufteilung der ASS-Dosis auf die zweimal tägliche Einnahme bei Patienten mit arterieller Thrombose, sowie höheren Alter bzw. *JAK2* V617F positiven Status oder kardiovaskulären Risikofaktoren positiv auswirken. (3)

Auch zu beachten ist die Korrektur einer Leukozytose, denn die Wahrscheinlichkeit einer Thrombose unter zytoreduktiver Behandlung wird durch eine Leukozytose beeinflusst und nicht von der Thrombozytenkonzentration (2, 5). Neben der medikamentösen Therapie ist es auch wichtig die klassischen Risikofaktoren für Thrombosen zu vermeiden und kardiovaskuläre Risikofaktoren zu optimieren (5).

Zusammenfassend sollten Therapien vermieden werden, die nicht evidenzbasiert sind oder sogar die Lebenserwartung verkürzen können. Denn die medikamentöse Therapie erhöht nicht die Überlebenswahrscheinlichkeit oder senkt die Transformationsrate. Sie dient primär der Vermeidung von Komplikationen. (3, 5)

2.2 HÄMOSTASE

Der Begriff der Hämostase setzt sich aus den Wortteilen „Häm-“, für den Eisen-Protoporphyrin-Komplex, der dem Blut seine rötliche Farbe verleiht, und „-stase“, was Stockung, Stauung oder auch Stillstand bedeutet, zusammen. Pschyrembel definiert die Hämostase als einen physiologischen Prozess, der eine Blutung beendet. Dabei kann dieser Vorgang nach seinen beteiligten Faktoren, zellulär und humoral, oder auch zeitlichen Ablauf, primäre und sekundäre Hämostase, eingeteilt werden. (33)

In allen Abschnitten der Hämostase spielen die Thrombozyten eine zentrale Rolle.

2.2.1 THROMBOZYTEN

Als kleinste Blutzellen des Menschen, mit einer Größe von $3,6 \times 0,7 \mu\text{m}$, nehmen die Thrombozyten eine entscheidende zentrale Rolle in der Hämostase ein (34).

Als scheibenförmig, flache und kernlose Abschnürungen werden sie von ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, im Knochenmark abgetrennt und in den Blutkreislauf freigegeben. Etwa $150\text{--}350 \times 10^9/\text{l}$ zirkulierende Thrombozyten haben die Aufgabe, Verletzungen der Gefäßwand zu schließen und so die Integrität des Gefäßsystems wiederherzustellen. (34, 35)

Diese sehr spezialisierten Zellen sind auch an weiteren Prozessen, wie Immunabwehr, Entzündungsmodulation, Wundheilung und Angiogenese beteiligt. Durch ihre vielfältigen Funktionen tragen sie aber auch zu pathologischen Prozessen, wie Thrombosen, Arteriosklerose und hämatogener Metastasierung bei. (34-37)

2.2.2 PRIMÄRE HÄMOSTASE

Im ersten Abschnitt der Hämostase, auch primäre Hämostase genannt, kommt es zu einem ersten Wundverschluss mit Hilfe eines noch instabilen Thrombozytenaggregats. Bei einer Verletzung der Gefäßwand wird das Subendothel freigelegt. Daran binden in kürzester Zeit Thrombozyten. Die primäre Adhäsion soll einen ersten Schutz vor Blutverlust bewirken. Sie erfolgt über eines der subendothelialen Matrixproteine, den von-Willebrand-Faktor (vWF), der am Glykoprotein (GP) $\text{Ib}\alpha$ auf der Thrombozytenoberfläche bindet. Ein wiederholter Kontakt mit multimeren vWF aktiviert den GPIb/V/IX -Komplex und führt zur festeren Verknüpfung. Auch Thrombospondin-1 (TSP-1) ist eines dieser Matrixproteine und kann über $\text{GPIb}\alpha$ zur Adhäsion beitragen. Beide Moleküle vermitteln die Anheftung der Thrombozyten unter großen Scherkräften und bremsen sie so ab. Bei geringen Scherkräften können die Thrombozyten sich auch direkt über GPVI an das freie Kollagen anlagern und adhären. (35, 36)

Eine festere Bindung an das Kollagen erfolgt über das Integrin (Membranprotein) GPIIb/IIIa ($\alpha_2\beta_1$). Dieses wird, neben weiteren Integrinen, bei Kontakt mit dem Subendothel durch ein sogenanntes „Inside-out-Signal“ aktiviert. Über das Integrin GPIIb/IIIa ($\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$) wird Fibrinogen und vWF gebunden. Dazu erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors. Nur diese aktivierte Form des GPIIb/IIIa ermöglicht die Bindung von löslichem Fibrinogen und somit die Vernetzung zwischen unterschiedlichen Thrombozyten (Aggregation). Diese Prozesse führen durch Formwandlung („Shape change“), sowie Pseudopodienbildung zur Ausbreitung der Thrombozyten und damit zur primären Abdichtung der Verletzung. (35-37)

Neben der Adhäsion kommt es bei Aktivierung der Thrombozyten gleichzeitig auch zur Sekretion einer Vielzahl an Stoffen aus den α -Granula, dichten Körperchen („dense bodies“, δ -Granula) und Lysosomen, mittels Exozytose. Zu den Thrombozyten-aktivierenden Agonisten zählen Kollagen, Thrombin und vWF. Aber auch einige der ausgeschütteten

Substanzen führen über autostimulatorische Signalwege zur Aktivierung weiterer Thrombozyten und Verstärkung der bereits initialen Stimulation. Adenosindiphosphat (ADP) aus den „dense bodies“ ist einer dieser Aktivatoren. Es führt, über die Purinrezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ G-Protein-gekoppelt, seine Funktion aus. Auch Thromboxan A₂ (TxA₂) aktiviert und verstärkt die Reaktion der Thrombozyten. Es wird enzymatisch über die Cyclooxygenase-1 (COX-1) aus Arachidonsäure, welche aus dem internen Membransystem freigesetzt wird, gebildet. Seine spezifischen TP-Rezeptoren in der Thrombozytenmembran sind ebenfalls G-Protein-gekoppelt. (35, 36)

Serotonin ist ein weiterer Granulainhalt der „dense bodies“. Es ist ein Vasokonstriktor, Verstärker der Thrombozytenaktivierung und führt zur Freisetzung der α -Granula. Die α -Granula enthalten eine Vielzahl an Stoffen, darunter adhäsive Glykoproteine, Koagulationsfaktoren und mitogene Faktoren, aber auch antithrombotische Substanzen zur Verhinderung einer überschießenden Gerinnung. Bei der Fusion der Granula mit der Plasmamembran gelangen die enthaltenen Membranproteine an die Oberfläche der Thrombozyten und werden dort präsentiert. Dazu gehören P-Selektin (CD62P) und CD40-Ligand. Sie sind Adhäsionsmoleküle und vermitteln die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten und Endothelzellen. (37)

Neben den Granula setzen Thrombozyten auch sogenannte „Mikropartikel“ frei. Diese kleinen zytoplasmahaltigen Membranpartikel werden von stark aktivierten Thrombozyten (Aktivierung über Kollagen plus Thrombin oder durch Komplementfaktoren C5b-9) abgeschnürt und sind sehr prokoagulatorisch, sowie entzündungsmodulierend. Die damit vergrößerte Thrombozytenmembranoberfläche erhöht die Gerinnungsleistung. (35-37)

2.2.3 SEKUNDÄRE HÄMOSTASE

Die sekundäre Hämostase wird häufig auch plasmatische Hämostase genannt. Jedoch berücksichtigt das sogenannte „Zell-basierte Gerinnungsmodell“ die zentrale Rolle der Thrombozyten für diesen Abschnitt der Gerinnung mehr. (38)

Durch Kontakt von Tissue-Faktor-tragenden Zellen, wie Fibroblasten, mit dem Blut wird eine kleine Menge an Thrombin initial gebildet. Dazu lagert sich der aktivierte Gerinnungsfaktor VII an den „Tissue Faktor“ (TF) an und aktiviert über den entstandenen Komplex die Faktoren IX und X. Da jedoch auch ein Inhibitionskomplex aus TFPI („tissue factor pathway inhibitor“, Gewebefaktor Signalweg Inhibitor), Faktor VIIa und Faktor Xa gebildet wird, bleibt die Konzentration von Xa nur gering. So kann nur wenig Thrombin gebildet werden. Die Menge ist damit nur ausreichend, um weitere Thrombozyten zu rekrutieren und zu aktivieren. Außerdem werden durch das Thrombin die Gerinnungsfaktoren XI, VIII und V aktiviert. Mit dieser ersten Thrombinbildung wird der sogenannte „Thrombinburst“ vorbereitet, mit dem, ausreichend Fibrin gebildet wird, um ein stabiles Gerinnsel zu erhalten. (35-37)

Aktivierte Thrombozyten schaffen durch Umlagerung negativer Phospholipide auf ihrer Außenmembran eine prokoagulante Oberfläche. Neben diesen entstandenen, relativ niedrig affinen Bindungsstellen für Gerinnungsproteine, weist die Thrombozytenmembran noch weitere, hochaffine und spezifische Rezeptoren für Gerinnungsfaktoren auf. Sie dienen auch zum Schutz der Faktoren vor Inaktivierung. So können sich die aktivierten Gerinnungsfaktoren koordiniert als Xase- und Prothrombinase-Komplex auf der Oberfläche der Thrombozyten anordnen. In Zusammenarbeit der Komplexe kommt es dann zur explosionsartigen Vermehrung von Thrombin, dem sogenannten „Burst“. Damit wird ausreichend Thrombin gebildet, welches dann Fibrinogen spaltet und somit ein stabiles Fibrinnetz ausbildet. (35-37)

2.2.4 TRIGGERSUBSTANZEN DER HÄMOSTASE

Wie in den vorherigen Kapiteln dargestellt, gibt es einige Stoffe, die die Hämostase beeinflussen. Im nachfolgenden werden einige dieser Triggersubstanzen näher charakterisiert.

2.2.4.1 ADENOSINDI- UND -TRIPHOSPHAT

Adenosindi- (ADP) und -triphosphat (ATP) sind Nucleotide. Sie bestehen aus dem Nucleosid Adenosin, welches mit zwei bzw. drei Phosphorsäuregruppen verestert ist. Eine der wichtigsten Funktion von ATP ist die Energieübertragung. Dabei entsteht wiederum ADP (39). Neben dieser essentiellen Aufgabe regulieren diese Nucleotide aber auch in fast jeder Körperzelle deren Funktion. So auch in den Thrombozyten. Dafür enthält die Thrombozytenmembran spezifische Rezeptoren. Für ADP sind dies P2Y₁ und P2Y₁₂, für ATP vor allem P2X₁. (40)

ADP und ATP sind in großen Mengen in den dichten Granula der Thrombozyten gespeichert und werden bei Aktivierung durch Sekretion freigesetzt (41).

ADP ist nur ein schwacher Agonist für Thrombozyten. Die entscheidende Rolle übernimmt ADP aber durch Verstärkung der Wirkung anderer Agonisten auf die Thrombozyten (40). Dabei wirkt es autokrin sowie parakrin stark aktivierend (41). Über den P2Y₁-Rezeptor führt ADP zur Formänderung („Shape Change“), zum vorübergehenden zytoplasmatischen Ca²⁺-Anstieg und zur schnellen, aber reversiblen, Aggregation. Der Rezeptor ist dabei G_q-gekoppelt und aktiviert die Phospholipase C-β (PLC-β) (40).

Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-disphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und bildet Diazylglyzerol (DAG). IP₃ erhöht infolge die zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration, während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Der erhöhte Ca²⁺-Spiegel ist mitverantwortlich für die Formänderung der Thrombozyten, aber alleine nicht ausreichend. Die PKC wiederum führt zur weiteren Aktivierung des Thrombozyten und ist damit Teil des positiven Feedbacks durch ADP. (41)

Der zweite ADP-Rezeptor ist der P2Y₁₂-Rezeptor, welcher G_i-gekoppelt seine Wirkung entfaltet. Zum einen führt er durch Inhibition der Adenylatzyklase zur Senkung des Spiegels von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches in hoher Konzentration die Aktivierung der Thrombozyten hemmt. Zum anderen aktiviert er die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3K). PI3K produziert Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), welches wiederum Proteinkinase B/Akt (PKB/Akt) und PKC aktiviert. Damit potenziert sich die Thrombozytenaktivierung. Weiterhin wird angenommen, dass die GTPase (Guanintriposphatase) Rap1, welche durch PIP₃ ebenfalls aktiviert wird, Teil des sogenannten „inside-out Signals“ zur Aktivierung der Integrine ist und damit auch das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ aktiviert. Damit verstärkt sich die Aggregation und das Aggregat wird stabilisiert. (40, 41)

Thrombozyten benötigen die Aktivierung beider Rezeptoren, um adäquat auf ADP reagieren zu können. Studien haben gezeigt, dass bei Inhibierung von P2Y₁ der „Shape Change“ sich verringert und die Aggregation stark eingeschränkt ist. Bei Blockierung des P2Y₁₂-Rezeptors wiederum ist die Aggregation auch stark beeinträchtigt, jedoch erfolgt eine normale Formänderung. In beiden Fällen treten verlängerte Blutungszeiten auf. Werden beide Rezeptoren ausgeschaltet, reagieren die Thrombozyten wesentlich vermindert auf andere Agonisten wie Thrombin. Dies zeigt, wie wichtig der positive Feedback-Mechanismus durch ADP ist. (41)

ATP ist der einzige Aktivator des P2X₁, ein ligandengesteuerter Ionenkanal, welcher zu einem rasanten Ca²⁺-Einstrom in den Thrombozyten führt. Dadurch kommt es zur vorübergehenden Formänderung, wobei die gebildeten Pseudopodien kürzer sind als bei Stimulation mit ADP. Allein ist der Rezeptor aber nicht in der Lage die Aggregation herbeizuführen, vielmehr unterstützt er die durch andere Agonisten angestoßenen Prozesse und beschleunigt so vor allem die Aggregation in der Initialphase. Andererseits ist der Ca²⁺-Anstieg durch andere Agonisten reduziert, wenn P2X₁ komplett blockiert wird. ATP stellt damit einen wichtigen sekundären Mediator für die Thrombozytenfunktion dar. (40)

2.2.4.2 ARACHIDONSÄURE

Arachidonsäure (AS) ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure, die zur Gruppe der Omega-6-Fettsäuren gehört. Als Teil vieler biologischer Membranen, ist sie mit Phospholipiden verestert und trägt zur Fluidität und Flexibilität der Membranen bei. Neben dieser wichtigen Funktion, moduliert freie Arachidonsäure die Funktion verschiedener Enzyme, Rezeptoren und Ionenkanäle. Die durch Oxidation entstehenden Metaboliten sind wichtige Mediatoren bei Entzündungsprozessen und der Hämostase. So ist es auch nicht verwunderlich, dass der Anteil an Phospholipidfettsäuren wie AS in Thrombozyten bis zu 25% beträgt. (42)

Durch das Enzym Phospholipase A2 wird Arachidonsäure aus der Zellmembran freigesetzt und anschließend oxidiert. Dies geschieht durch drei verschiedene Oxygenasen: Cyclooxygenase (COX), Lipoxygenase (LOX) und Cytochrom P450. (42)

Einer der entstehenden Metaboliten ist Thromboxan A₂ (TxA₂). Dieser wird spezifisch durch die COX-1 und Thromboxansynthase gebildet. Über den Thromboxan-Rezeptor (TP) in der Thrombozytenmembran erfolgt G_q-gekoppelt die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), worüber IP₃ und DAG gebildet werden. IP₃ initiiert die Ca²⁺-Mobilisation, während DAG die PKC aktiviert und damit Aggregation und Degranulierung fördert. Weiterhin ist der TP-Rezeptor G₁₃-gekoppelt und aktiviert darüber Rho und Rho-Kinase. Diese phosphorylieren die Myosinleichtkettenkinase und führen darüber zur Formänderung des Thrombozyten. TxA₂ wird nach Aktivierung der Thrombozyten gebildet und führt über die TP-Rezeptoren zum positiven Feedback. Es hat dabei, durch seine kurze Halbwertszeit, nur eine lokal begrenzte Wirkung. (41)

2.2.4.2 KOLLAGEN

Kollagen ist ein Makromolekül der extrazellulären Matrix. Diese wird von Bindegewebszellen gebildet, zu denen auch die Endothelzellen der Blutgefäße zählen. Das fibrilläre Kollagen besteht aus mehreren Mikrofibrillen, die wiederum jeweils aus 5 Tripelhelices zusammengesetzt sind. Drei Kollagenhelices bilden dabei je eine Tripelhelix. Diese Struktur, sowie Quervernetzungen der Tripelhelices tragen zur Stabilität des Kollagens und damit des Gewebes bei. (39)

Bei Verletzung eines Blutgefäßes gelangt Kollagen durch Freilegung des Subendothels in Kontakt mit dem Blut und damit auch mit den Thrombozyten (35, 36). Zur Interaktion mit den Thrombozyten sind auf dessen Membran einige Kollagen-Rezeptoren lokalisiert, wie α₂β₁ Integrin (GPIa-IIa) (43), CD36 (GPIV) (44) und GPVI (P62) (45, 46). Die Thrombozytenadhäsion an Kollagen erfolgt dabei über das α₂β₁ Integrin (43).

Nach Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedene Agonisten, kommt es durch ein sogenanntes „inside-out-Signal“ zur Aktivierung des α₁β₂ Integrins. In dieser Form bindet das Integrin hochaffin an lösliches Kollagen, während es inaktiv und damit im ruhenden Thrombozyten, nur wenig bis kein lösliches Kollagen bindet. (47)

Auch der Rezeptor CD36 vermittelt die Adhäsion (44). Studien zeigten jedoch, dass dieser Rezeptor weniger wichtig für die Hämostase ist, da trotz Fehlens von CD36, die Thrombozyten eine normale Aggregation und Sekretion durch Kollagenzugabe aufwiesen (45, 48).

Über GPVI erfolgt neben der Adhäsion auch die Aktivierung der Thrombozyten. Der Rezeptor ist gut untersucht und so weiß man, dass GPVI als dimerer Komplex hochaffin an ungelöstes fibrilläres Kollagen bindet. Der Rezeptor ist mit der dimeren Fc Rezeptor (FcR) γ-Kette verbunden. An der FcR γ-Kette wird über GPVI das ITAM („immunoreceptor tyrosin-based activation motif“) phosphoryliert. Dieses Signal induziert weitere Protein-Phosphorylierungen,

wie zum Beispiel der Phospholipase Cy2 (PLCy2). Über diese Signalwege wird der Thrombozyt aktiviert. GPVI ist ein wichtiger Rezeptor um große Thrombozytenaggregate formen zu können. In seiner Abwesenheit können nur einzelne Zellen adhären und es werden nur sehr kleine Aggregate gebildet. Damit ist GPVI nicht nur für die Aktivierung ein wichtiger Faktor, sondern auch für die Aggregatbildung. (46)

2.2.4.3 CONVULXIN

Convulxin ist ein starker Aktivator der Thrombozytenaggregation (48-51). 1981 wurde das Protein erstmals von J.Prado-Francesci und O.Vital Brazil aus dem Gift der *Crotalus durissus terrificus* Klapperschlange isoliert (52). Das heterodimere Protein, welches aus α - und β -Untereinheiten über Disulfidbrücken eine ringartige Struktur bildet (50, 51), zählt zur Familie der C-Typ Lektine (48). Im Gegensatz zu den meisten, aus Schlangengift isolierten Proteinen dieser Familie, die die Thrombozytenfunktion hemmen, führt Convulxin zur Aggregation dieser (48).

Es bindet dafür hochaffin an einen Kollagen-Rezeptor, das Glykoprotein VI (GPVI) und führt zur Clusterbildung. Darüber hinaus wird die Phospholipase Cy aktiviert und durch Phosphorylierung verschiedene Proteine der Thrombozyten aktiviert. (48, 50, 51)

Es wird nur eine geringe Menge an Convulxin benötigt um die maximale Aggregation zu induzieren (48).

Studien haben aber auch gezeigt, dass Convulxin nicht alle Proteine im gleichen Maße wie Kollagen phosphoryliert und es damit Unterschiede für den zeitlichen Verlauf, sowie der Ausprägung der Signaltransduktion gibt. Dies kann vor allem daran liegen, dass Convulxin nur an GPVI bindet, während Kollagen noch an weiteren Rezeptoren, wie z.B. $\alpha_2\beta_1$ -Integrin wirkt. (50)

Es wurde auch festgestellt, dass Convulxin an anderer Stelle des GPVI bindet als Kollagen (46). Mit Convulxin als Triggersubstanz kann aber ein spezifischer Rezeptor getestet werden und so Defekte detektiert werden (48).

2.2.4.4 THROMBIN

Thrombin ist eine Serinprotease, die Fibrinogen zu Fibrin spaltet und somit zum Aufbau eines stabilen Fibrinaggregats führt. Die inaktive Vorstufe des Thrombins, das Prothrombin, wird in der Leber synthetisiert und in den Blutkreislauf freigegeben. Durch proteolytische Spaltung des Prothrombins an der Membran aktivierter Thrombozyten im Verlauf der Hämostase wird Thrombin gebildet. Dabei erfolgt die Spaltung durch die Prothrombinase, einem Komplex aus den Faktoren Va und Xa. (39)

Neben dieser essentiellen Funktion ist Thrombin auch ein hochpotenter Thrombozytenaktivator. Dafür befinden sich verschiedene Thrombinrezeptoren, die Protease-aktivierenden Rezeptoren (PAR) und GPIIb-III-V, auf der Thrombozytenmembran. PAR sind

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die beiden wichtigsten auf humanen Thrombozyten sind PAR1 und PAR4. PAR1 ist der Hauptthrombinrezeptor und hochaffin. Im Gegenzug ist PAR4 zwar weniger affin für Thrombin, benötigt aber nicht eine zusätzliche Aktivierung von P2Y₁₂, um stabile Aggregate zu formen. Beide Rezeptoren aktivieren über Kopplung an G_{12/13} Rho und Rho-Kinase. Diese führen wiederum über Phosphorylierung und Inhibierung von Myosinleichtkettenphosphates zur Formänderung („Shape Change“) und zur Granulafreisetzung. Außerdem sind PAR1 und PAR4 an G_q gekoppelt. Über die Aktivierung von G_q und Phospholipase C-β (PLC-β) wird Phosphatidylinositol-4,5-disphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) hydrolysiert. IP₃ stimuliert wiederum die Ca²⁺-Mobilisation. PLC-β bildet auch Diazylglyzerol (DAG), welches die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Über PKC werden die Thrombozyten aktiviert. Dabei beeinflusst PKC diesen Prozess direkt über die Affinitätssteigerung des Fibrinogenrezeptors α_{IIb}β₃ und indirekt über die Erhöhung der Degranulation. Calcium (Ca²⁺) ist über seine Mobilisation ein wichtiger sogenannter „Second Messenger“, der die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten vermittelt. PAR1 führt zu einem frühen hohen Peak von Ca²⁺, während PAR4 zu einer verzögerten und verlängerten Ca²⁺-Freisetzung führt. Dabei ist ein hoher intrazellulärer Ca²⁺-Spiegel über eine späte Aktivierung von PKC zur Bildung eines irreversiblen Thrombozytenaggregats nötig. (53)

GPIb-IX-V kann Thrombin hochaffin binden. Dazu sind zwei verschiedene Bindungswege an GPIbα möglich. Über diese Interaktion wird die Anordnung von Faktor XI und Thrombin an GPIbα mitbestimmt und so die Koagulation reguliert. Außerdem können die Thrombozyten aktiviert werden. Dies erfolgt entweder über eine Kofaktorwirkung des Thrombin-GPIbα-Komplexes am Thrombin-aktivierten PAR1 oder direkt über eine Signalweiterleitung durch GPIbα. Intaktes GPIbα ermöglicht jedoch nur eine Aktivierung der Thrombozyten bei niedrigen Thrombinmengen. (54)

2.2.4.5 THROMBIN REZEPTOR AKTIVIERENDES PEPTID

Thrombin generiert bei der Aktivierung seines Rezeptors PAR1 einen neuen N-Terminus. Dieser kann als Ligand den Thrombinrezeptor wiederum selbst aktivieren. Vu et al. zeigte daraufhin, dass ein Peptid, welches die Aminosäuresequenz des neuen N-Terminus enthält, ebenfalls den Rezeptor aktivieren kann. (55)

Dieses Peptid enthält die ersten 6 bis 14 Aminosäuren des neuen N-Terminus mit SFLLRN (56). Es wurde im Verlauf als Thrombin Rezeptor Aktivierendes Peptid (TRAP) bezeichnet und kann PAR1 aktivieren (57).

Darüber führt es zur Aggregation und Sekretion. Studien haben auch gezeigt, dass durch TRAP nicht die volle Aggregation erzeugt werden kann, wenn die ADP-Rezeptoren oder die Thromboxanbildung blockiert werden (durch Antagonisten oder ASS-Gabe). (56)

Die freigesetzten Stoffe der aktivierten Thrombozyten sind somit entscheidend für die volle Wirkung über den PAR1 (54).

Durch Einsatz von TRAP lässt sich somit ein Defekt im PAR1 oder dessen Signalweg detektieren. Jedoch muss auch in Betracht gezogen werden, dass die Thrombozyten vermindert auf zum Beispiel ADP reagieren, wenn die Reaktion auf TRAP-Gabe geringer ist. (57, 58)

2.3 MONONUKLEÄRE ZELLEN

Zu den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (MNC) zählen die Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen), die Monozyten und die dendritischen Zellen (59). Dabei sind 70-90% Lymphozyten, 10-20% Monozyten und nur 1-2% dendritische Zellen (59-61). Sie sind Zellen der Immunabwehr (61), greifen aber auch in die Hämostase ein. Vor allem die Monozyten, Makrophagen und die nicht-mononukleären Neutrophilen beeinflussen durch die Bildung und Freisetzung von Koagulationsfaktoren und fibrinolytischen Faktoren die Hämostase (62).

Unter physiologischen Bedingungen fördern Leukozyten den Blutfluss. Dabei schütten Monozyten antikoagulante Faktoren aus. Dazu zählen der endotheliale Protein C Rezeptor, Thrombomodulin und der Tissue Faktor Signalweg Inhibitor (TFPI). Außerdem regulieren Leukozyten die Thrombusauflösung durch Chemotaxis und Phagozytose. Unter (patho-)physiologischen Bedingungen, wie Entzündung oder Apoptose, kommt es wiederum zur Transformation der Leukozyten, die daraufhin aktivierende und prokoagulante Faktoren bilden und ausschütten. Dazu zählen Zytokine, die die Expression von prokoagulant und adhäsiven Molekülen an Gefäßendothelzellen modulieren und antimikrobiellen Stoffe, die die Thrombozyten und Gerinnungskaskade aktivieren. Leukozyten können zudem mit aktivierten Thrombozyten heterotypische Aggregate formen. Dies geschieht vor allem unter hohen Scherkräften. Ebenso führen proinflammatorische und prokoagulante Stimuli zur Bildung dieser Komplexe. Sie fördern die Entstehung von Thrombosen. (62)

Andersherum können auch aktive Koagulationsfaktoren und Thrombozyten die Leukozytenaktivierung regulieren. Monozyten und Makrophagen besitzen PAR1. Thrombin kann damit bei Neutrophilen und Monozyten die Chemotaxis über PAR1 abhängige und unabhängige Mechanismen induzieren. Außerdem kann Thrombin über PAR1 die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und TNF- α , regulieren. Es besteht damit eine Verzahnung von Hämostase und Entzündung. (62)

Eine wichtige Rolle für die Hämostase spielt der Tissue Faktor (TF) als potenter Initiator der Gerinnung (63). Dabei stellen die Monozyten die größte Quelle für den TF im Blutgefäßsystem dar (62, 63). Aktivierte Monozyten bilden TF und führen darüber zur Thrombinbildung (63). Die TF-tragenden Zellen produzieren jedoch nur kleine Mengen Thrombin, die ausreichen um Thrombozyten zu aktivieren und weitere zu rekrutieren, aber nicht genügend Fibrin bilden, um einen Thrombus zu schaffen (35-37, 64). Bei Entzündung und/oder Apoptose kommt es zu einer gesteigerten TF-Aktivität und TF-induzierten Thrombingenerierung (62, 64). Die erhöhte

Produktion bei aktivierten Monozyten durch inflammatorische Zytokine und oxidierte Lipide (bei Atherosklerose) führt zur Aktivierung des extrinsischen Signalweges der Gerinnung (63, 64). Damit ist der TF auf Monozyten ein entscheidender Faktor für die Thromboseentstehung unter pathologischen Bedingungen, wie Entzündung, Sepsis oder Krebsleiden (63).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 GERÄTE

Tabelle 6: verwendete Geräte

Gerät	Typ	Firma
Automatischer Hämatologie-Analysator	Sysmex KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Hamburg
Kolbenhub-Einkanalpipetten	Eppendorf Research® plus, variabel 0,1-2,5 µl, variabel 0,5-10 µl, variabel 2-20 µl, variabel 10-100 µl, variabel 20-200 µl, variabel 100-1000 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling
Magnetrührer	NeoMag D-6010	neoLab®, Heidelberg
Lumi-Aggregometer	Chrono-Log-Aggregometer, Model 700	Chrono-Log Corporation, USA
pH-Meter	ph/ORP Meter, HI 2211	Hanna instruments Deutschland GmbH, Vöhringen
Präzisionswaage	CPA1003P	Sartorius AG, Göttingen
Thrombinoskop	Fluoroskan Ascent™ FL	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, USA
Vortexmischer	Neo-Vortex D-6012	neoLab®, Heidelberg
Wasserbad mit Einsätzen	ED-AP (042) (5A max. 60°C)	Julabo GmbH, Seelbach
Zentrifuge	Allegra X-30R Centrifuge (Rotoren: SX4400, F2402H)	Beckmann Coulter™, Krefeld

3.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 7: verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Aufziehkanülen	BD Microlance™, 20G x 1½"- Nr.1, 0,9mm x 40mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette® Citrat 10 ml 9NC, mit Antikoagulanzen: 0,106 M Citrat	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Feindosierungsspritzen	Inject®-F, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanüle mit Schlauch	Safety-Multifly®-Kanüle 21G	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Küvetten	Chrono-Log Glasküvetten	Probe & Go Labordiagnostik GmbH, Osburg
Magnetrührstabchen		A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Mikrotiterplatten	PS-Microplate, 96-Wells, U-förmiger Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	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
Polypropylen-Röhrchen mit konischem Boden	Cellstar® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	Cellstar® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polypropylen Röhrchen mit rundem Boden	Röhrchen 14 ml, Zwei-Positionen-Belüftungsstopfen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reagenzröhrchen	PS 5 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Reaktionsgefäße	SafeSeal Gefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Rührstäbchen	Chrono-Log Stir bars	Probe & Go Labordiagnostik GmbH, Osburg
Spritzen	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
Spritzenfilter	Rotilabo®-Spritzenfilter, CA, steril, Porengröße 0,2µm, Ø 25mm	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Transferpipetten	Einmal-Pasteurpipetten mit integriertem Saugball 3,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

3.1.3 REAGENZIEN

Tabelle 8: verwendete Puffer, Reagenzien mit deren Konzentration und/oder Zusammensetzung

Bezeichnung	Konzentration/ Zusammensetzung	Hersteller
10%ige (w/v) Dextranlösung	1ml enthält: 0,1g Dextran, Aqua ad injectabilia	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz, Mainz
6%ige Dextranlösung	6ml 10%ige Dextranlösung, 4ml 0,9% isotonische Natriumchlorid-Lösung, 0,054g NaCl	
Apyrase	500 U/ml	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
Aqua ad injectabilia Braun		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Arachidonsäure Natriumsalz	5 mg/ml in 98% Ethanol gelöst	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt

ATP-Standard (Adenosintriphosphat- Standard)	0,4 µM	Probe & go Labordiagnostik GmbH, Osburg
Chrono-Lume	2 µM/l Luciferin/Luciferase	Probe & go Labordiagnostik GmbH, Osburg
Chrono-Par Collagen	1 mg/ml	Probe & go Labordiagnostik GmbH, Osburg
Citrat	Molare Masse: 294,19 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Convulxin	100µg/ml gelöst in HBSS	Enzo Life Science GmbH, Lörrach
CGS-Puffer, pH 6,5 (Citrate- Glucose-Sodium-Puffer)	120 mM NaCl, 12,9 mM Citrat, 30 mM Glucose	
Creatinphosphat (CP) Dinatriumsalz Tetrahydrat	500mM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
Creatinphosphatkinase (CPK) aus Hasenmuskel	1000U/ml	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
EGTA-Lösung (Ethylenglycol- bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure)	500 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
FluCa-Kit	Fluo-Puffer + Fluo-Substrat	Stago Deutschland GmbH, Düsseldorf
Glukose	Molare Masse: 180,16 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
HBSS (Hank's balanced Salt Solution)	53,3 mM KCl; 4,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 1379,3 mM NaCl; 3,4 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O; 55,6 mM Dextrose	Life Technologies GmbH, Ober-Olm
Hepes (2-(4-(2- Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)- ethansulfonsäure)	Molare Masse: 238,31 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Hepes-Puffer, pH 7,4	145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 10 mM Hepes, 10 mM Glucose	

Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9% (w/v) Infusionslösung	1 ml enthält: 9mg Natriumchlorid, Molare Konzentration: 1 ml enthält: 0,154 mol Na^+ , 0,154 mol Cl^-	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kaliumchlorid (KCl)	Molare Masse: 74,56 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Molare Masse: 203,3 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Molare Masse 58,44 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Molare Masse: 84,01 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Molare Masse: 141,96 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	2 mol/l	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
PBS (phosphate buffered solution, phosphatgepufferte Salzlösung)	10 x konzentrierte Lösung: 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM Phosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
PBS, pH 7,4	10x PBS-Fertigprodukt 1:10 in ddH ₂ O gelöst	
PPP-Reagenz (platelet-poor-plasma-reagent, Plättchen-armes-Plasma-Reagenz)		Stago Deutschland GmbH, Düsseldorf
PRP-Reagenz (platelet-rich-plasma-reagent, Plättchen-reiches-Plasma-Reagenz)		Stago Deutschland GmbH, Düsseldorf
Salzsäure (HCl)	2 mol/l	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Thrombin (Bovine)	100 U/ml in 0,9% NaCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt

Thrombin Kalibrator (Thrombin-Calibrator)		Stago Deutschland GmbH, Düsseldorf
TRAP-6	40 mM in DMSO	Bachem Distribution Service GmbH, Weil am Rhein
Tyrodepuffer, pH 7,4	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO ₃ , 0,42 mM NaH ₂ PO ₄ , 5,5 mM Glucose, 5 mM Hepes	

3.1.4 SOFTWARE

Tabelle 9: Verwendete Software-Programme

Software	Hersteller
Aggrolink8 for Windows, Version 1.2.7	Chrono-Log Corporation, USA
Endnote X7	Thomson Reuters, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, USA
Microsoft Office 2016 für Windows: Word, Excel	Microsoft Corporation, USA
Sysmex-Software; Version 1KXNH 00-10	Sysmex Europe, Hamburg
Thrombinoscope™ Software, Version 5.0.0.742	Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande

3.2 STUDIE

3.2.1 STUDIENDESIGN

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen sind Teil der grundlagenforschungsorientierten „proof-of-concept“ Studie zur Untersuchung der Thrombozyten und Leukozytenfunktion bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie (kurz: ET-Studie). Sie wurde monozentrisch durchgeführt und vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert.

3.2.2 FALLZAHL

In der Zeit von September 2016 bis August 2018 wurden im Rahmen der Studie 22 Patienten eingeschlossen. Davon mussten 3 Patienten im Verlauf wieder ausgeschlossen werden. Als Kontrollgruppe wurden 10 gesunde Probanden rekrutiert.

3.2.3 GENEHMIGUNG

Das Studienprotokoll wurde vor Studienbeginn beim Ethik-Komitee der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz eingereicht und erhielt am 04.08.2016 ein positives Ethikvotum (Studien-Nr: 837.302.12; 25.07.12; FF109/2015).

3.2.4 REKRUTIERUNG

In Zusammenarbeit mit der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mainz wurden Patienten mit ET rekrutiert. Nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung in die Studienteilnahme, wurden die regelmäßigen Terminen der Patienten für den Studieneinschluss und für alle folgenden Blutentnahmen zur Vervollständigung der Untersuchungen genutzt.

3.2.5 EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN

Die im Folgenden genannten Ein- und Ausschlusskriterien wurden für die ET-Patienten definiert.

Einschlusskriterien:

1. bestätigte ET Diagnose nach den WHO Kriterien (1)
2. Alter $\geq$ 18 Jahre
3. bestätigte JAK2 V617F oder CALR Mutation
4. Einwilligung vorhanden

Ausschlusskriterien:

1. Leukozytenkonzentration $\geq$ 20.000/ μ l
2. Patienten mit akutem/subakutem thromboembolischen Ereignis (innerhalb von 6 Wochen ab Einschluss in die Studie)
3. Schwangerschaft
4. ET-Patienten mit cMPL Mutation
5. ET-Patienten unter Anagrelid oder Interferon-alpha Therapie
6. fehlende Einwilligung

3.2.6 KONTROLLPROBANDEN

Als Kontrollgruppe dienten 10 gesunde Probanden. Sie wurden jeweils ohne Acetylsalicylsäure-Einnahme (ASS) oder anderer Thrombozyten-beeinflussenden Medikamente und dann unter 3-tägiger ASS-Einnahme (einmal täglich 100 mg) untersucht. Die Einwilligung erfolgte vor der Blutentnahme.

3.3 METHODEN

3.3.1 VENÖSE BLUTENTNAHME

Die venöse Blutentnahme der Patienten erfolgte durch das Fachpersonal der hämatologischen Ambulanz der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mainz. Die Blutproben wurden direkt im Anschluss entgegengenommen und ein kleines Blutbild mit dem Sysmex Cell Counter erstellt.

Für die venöse Blutentnahme der gesunden Probanden wurde eine Vene in der Ellenbeuge punktiert und im Anschluss ebenfalls ein kleines Blutbild mit dem Sysmex Cell Counter erstellt. Es wurden jeweils 10 ml S-Monovetten® mit Citrat (finale Konzentration: 10,6 mM Na₃Citrat) verwendet.

3.3.2 GEWINNUNG VON PLÄTTCHEN-REICHEM, PLÄTTCHEN-ARMEN UND PLÄTTCHEN-FREIEM PLASMA

Nach Erstellung des Blutbildes erfolgte die erste Zentrifugation der Monovetten für 10 Minuten bei 200 x g und einer minimalen Bremse von 2 bei Raumtemperatur (RT). Der entstandene gelblich trübe Überstand wurde mittels Transferpipette abpipettiert und in einem Reagenzröhrchen als Plättchen-reiche Plasma (PRP, „platelet-rich plasma“) gesammelt.

Nach dem Transfer wurden die Monovetten ein weiteres Mal für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Jedoch mit geänderten Einstellungen (2000 x g, maximale Bremse von 9). Der nun gelblich klare Überstand in den Monovetten, das Plättchen-arme Plasma (PPP, „platelet-poor plasma“) wurde mittels Transferpipette in Reaktionsgefäße (jeweils ca. 1ml pro Reaktionsgefäß) pipettiert.

Um das Plättchen-freie Plasma (PFP, „platelet-free plasma“) zu gewinnen, wurden die mit PPP gefüllten Reaktionsgefäße bei 30.000 x g mit einer maximalen Bremse von 9 für ebenfalls 10 Minuten bei RT noch einmal zentrifugiert.

3.3.4 GEWINNUNG VON GEWASCHENEN PLÄTTCHEN

Gewaschene Plättchen (WP, „washed platelets“) sind von Plasmabestandteilen isolierte Thrombozyten. Zur Gewinnung dieser isolierten Zellen wurde einer 10ml S-Monovette (mit Citrat) mit Patientenblut 40 µl EGTA-Lösung (finale Konzentration: 3 mM) hinzugefügt. Da die WP noch für weitere Experimente genutzt wurden, wurde noch Apyrase (finale Konzentration: 0,2 U/ml) hinzugefügt. Die Monovette wurde dann für 10 Minuten bei 200 x g und Bremse von 2 bei RT zentrifugiert. Das entstandene PRP im Überstand wurde in ein Polypropylen Röhrchen mit rundem Boden überführt und mit CGS-Puffer 1:1 verdünnt. Nach einer Ruhepause von 5 bis 10 Minuten bei RT erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 80 x g und einer Bremse von 1 bei RT. Der Überstand wurde anschließend erneut abpipettiert und in ein neues Polypropylen Röhrchen mit rundem Boden transferiert. Das

Leukozytenpellet wurde verworfen. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 380 x g für 10 Minuten bei RT. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde dann zunächst in 1 ml CGS-Puffer gelöst und anschließend weitere 2 ml zum Waschen hinzugefügt. Nach einer Ruhezeit von 5 bis 10 Minuten erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 380 x g, Bremse von 2 und für 10 Minuten bei RT. Der Überstand wurde wieder abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde abschließend in 500 bis 1000µl Hepes-Puffer, je nach Pelletgröße, aufgelöst und im Sysmex Cell Counter die Konzentration bestimmt.

3.3.4 GEWINNUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN

Mononukleäre Zellen (MNC, „mononuclear cells“) werden aus dem peripheren Vollblut isoliert. Für die Gewinnung wurden 4 ml Citratblut den Monovetten mittels Transferpipette entnommen und auf zwei Reagenzröhrchen verteilt. Pro Reagenzröhrchen wurden 0,5 ml einer 10%igen Dextranlösung bei RT hinzugefügt und mittels Transferpipette vorsichtig vermischt. Die Sedimentation konnte dann für mindestens 45 Minuten bei RT laufen. Nach dieser Zeit konnte der Überstand aus beiden Röhrchen in ein gemeinsames Reagenzröhrchen abpipettiert und vorsichtig mittels Transferpipette vermischt werden. Anschließend wurde der Überstand gleichmäßig auf 2 Polypropylen Röhrchen mit rundem Boden verteilt. Die Röhrchen wurden dann jeweils bis auf ca. 10 ml mit CGS-Puffer aufgefüllt und bei 70 x g und Bremse von 9 für 10 Minute bei RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand wieder abpipettiert und verworfen. Je ein entstandenes Pellet am Boden wurde mit 300µl Patienteneigenem PFP und PFP einer gesunden Kontrolle aufgelöst und jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt. Die beiden Proben wurden dann im Sysmex Cell Counter gemessen, um die Konzentration der MNC zu ermitteln.

3.3.5 LUMIAGGREGOMETRIE

3.3.5.1 ALLGEMEINES VERSUCHSPRINZIP

Die Lumiaggregometrie ist eine Methode zur simultanen Messung der Aggregation von Thrombozyten und ihrer Sekretion der δ -Granula („dense bodies“) (ATP-Freisetzung). Die Aggregation wird dabei durch die von Born 1962 (65, 66) beschriebene Methode mittels optischer Messung der Lichtabsorption im PRP nach Zugabe eines Agonisten bestimmt (67). Als Referenz wird PFP (65, 68) bzw. PPP (67) genutzt und dessen optische Dichte auf 100% festgelegt.

Dies bedeutet, dass das Plasma nicht optisch dicht ist und das Licht frei durchtreten kann. Das PRP dagegen hat die maximale optische Dichte und damit 0% Lichtdurchlässigkeit (Transmission) zu Beginn des Versuchs. (67)

Zur Bestimmung wird zunächst infrarotes Licht ausgestrahlt und auf der anderen Seite der Küvette die Transmission durch ein Photomultiplier gemessen (69). Sobald die Thrombozyten Aggregate formen, gelangt mehr Licht durch die Probe und die Transmission geht gegen 100%

(67, 69). Um die maximale Aggregation zu erzeugen, wird das PRP, mittels Rührstab bei 1000 rpm („revolutions per minute“, Umdrehung pro Minute), gerührt (68). Die dabei entstehenden Interferenzen werden, durch kalibrieren der Grundlinie auf nahezu 0% Transmission, vor Zugabe des Agonisten, ausgeschaltet. Die vollständige Aggregation benötigt 6 bis 10 Minuten. (69)

Die ATP-Freisetzung und damit die δ -Granula-Sekretion der Thrombozyten erfolgt mit Hilfe des Luciferin-Luciferase-Systems, welches sich von Glühwürmchen ableitet (70, 71).

Das freigesetzte ATP reagiert dabei mit Luciferin-Luciferase-Reagenz (Chrono-Lume). Dabei entsteht eine Chemilumineszenz, deren emittiertes Licht durch den Photomultiplier gemessen wird. Die gemessene Emission ist proportional zur freigesetzten ATP-Menge. (67, 69, 71, 72) Vor Beginn der Probenmessungen, muss die vollständige Lumineszenz kalibriert werden. Dies geschieht durch Messung der Emission eines ATP-Standards, mit bekannter ATP-Konzentration, im gleichen PRP wie die anschließenden Messungen. (69, 70)

Damit kann die Software in den folgenden Versuchen die ATP-Menge in nanomol (nmol) pro eingesetzte Thrombozytenkonzentration berechnen.

Auch die ADP-Freisetzung lässt sich mittels eines Luciferin-Luciferase-Systems ermitteln. Jedoch muss ADP zuvor durch Zugabe von Phosphat und Kinase in ATP umgewandelt werden. Holmsen verwendete dafür Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase. (71)

In meinem Versuch wurde dafür Kreatinphosphat und Kreatinphosphatkinase eingesetzt. Die ADP-Menge errechnet sich dann aus der ATP-Konzentration mit Phosphat und Kinase abzüglich der ATP-Konzentration ohne Zugabe von Phosphat und Kinase. Wichtig ist auch die Messung durch Zugabe desselben Agonisten zu beiden Experimenten, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Mit Hilfe der Lumiaggregometrie lässt sich einer der wichtigsten Funktionen der Thrombozyten, die Aggregation messen. Damit kann das Blutungs- und Thromboserisiko bestimmt werden (69) und erbliche Blutungserkrankungen oder auch das von-Willebrand-Syndrom detektiert werden (73).

Aber auch durch die Lumineszenzmessung sind Rückschlüsse auf Speicherpooldefekte und spezifische Defekte der Degranulation der thrombozytären δ -Granula möglich (67, 73).

3.3.5.2 VERSUCHSAUFBAU

Für den Versuch wurde zunächst PRP und PFP nach der in 3.3.2 beschriebenen Methode hergestellt. Die Thrombozytenkonzentration des PRP wurde anschließend im Sysmex Cell Counter bestimmt und die Thrombozytenkonzentration auf 200.000/ μ l mit PFP verdünnt. Als weitere Vorbereitung wurden Verdünnungen von Kollagen (100 μ g/ml) und TRAP-6 (Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6, 2 mM) in Tyrodepuffer angesetzt. Die Arachidonsäure war als Stammlösung vorhanden.

Vor Beginn der Messung wurde das Lumiagreggometer an geschaltet und auf 37°C vorgewärmt. Die Software wurde gestartet und ein neuer Patient angelegt. Die Glasküvetten wurden in die Vorwärmung gesteckt und jeweils ein Rührstab hineingegeben. Lediglich die Küvette für das PFP benötigte keinen Rührstab.

500 µl PFP wurden in eine Glasküvette pipettiert und in dem dafür vorgesehenen Platz im Gerät gesteckt. Zunächst wurde nun der ATP-Standard bestimmt. Dazu wurden 450 µl des verdünnten PRP in eine Glasküvette pipettiert und vorgewärmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl Chrono-Lume und das Programm zur Messung wurde gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten, wurde der ATP-Standard hinzugefügt und der gemessene Ausschlag durch Einstellung des „Gain“ in den Bereich der Lumineszenz von 20% bis 60% gebracht. Nach Erreichen des Zielbereichs wurde der Test gestoppt und gespeichert. Der ATP-Standard war somit für das zu untersuchende Plasma bestimmt und konnte für die Berechnung der folgenden Experimente von der Software verwendet werden.

Für die Versuche mit den jeweiligen Agonisten wurde zunächst 450 µl verdünntes PRP in eine Glasküvette mit Rührstab pipettiert und vorgewärmt. Das entsprechende Programm in der Software wurde ausgewählt. Nach Zugabe von 50 µl Chrono-Lume wurde das Programm gestartet und innerhalb der 2 Minuten Inkubationszeit die Grundlinie („Baseline“) durch Drücken der Baseline-Taste eingestellt. Das Programm wurde nach 2 Minuten gestoppt und zu Beginn des Neustarts wurde das jeweilige Reagenz, wie in Tabelle 10 aufgeführt, hinein pipettiert. Der Startpunkt wurde festgelegt. Die Messung wurde nach 6 bis 7 Minuten beendet und gespeichert.

Zur Bestimmung der ADP-Freisetzung wurde im Kollagen-Programm während der Inkubationszeit zusätzlich 5 µl Kreatinphosphat (CP) und 5 µl Kreatinphosphatkinase (CPK) hinzugefügt. Der restliche Versuchsablauf war identisch zu den anderen Agonisten.

Tabelle 10: Agonisten des Lumiagreggometersversuchs (*TRAP-6 = Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6*)

Agonist	Verdünnung	Applikationsmenge	Endkonzentration
Kollagen	100 µg/ml	10 µl	2 µg/ml
	1 mg/ml (Stammlösung)	5 µl	10 µg/ml
TRAP-6	2 mM	2,5 µl	10 µM
	2 mM	12,5 µl	50 µM
Arachidonsäure	5 mg/ml (Stammlösung)	5 µl	0,5 mg/ml

3.3.5.3 AUSWERTUNG DER AGGREGATION UND ATP-FREISETZUNG

Mit Hilfe der Software Aggrolink8 wird die Transmission und Emission gemessen und grafisch dargestellt. Eine beispielhafte Grafik mit wichtigen Aspekten ist in Abbildung 1 zu sehen. Dabei berechnet das Programm die in Tabelle 11 aufgeführten Parameter für Aggregation und ATP-Freisetzung.

Tabelle 11: Parameter der Lumiaggregometrie

Parameter	Aggregation	ATP-Freisetzung
„Amplitude“	maximales Ausmaß der Aggregation in %	Maximale ATP-Konzentration in nmol
„Slope“	Steigung der Kurve in % pro Minute	
„Lag Time“	Latenzzeit in Minuten	
„Area Under“	Fläche unterhalb der Kurve	

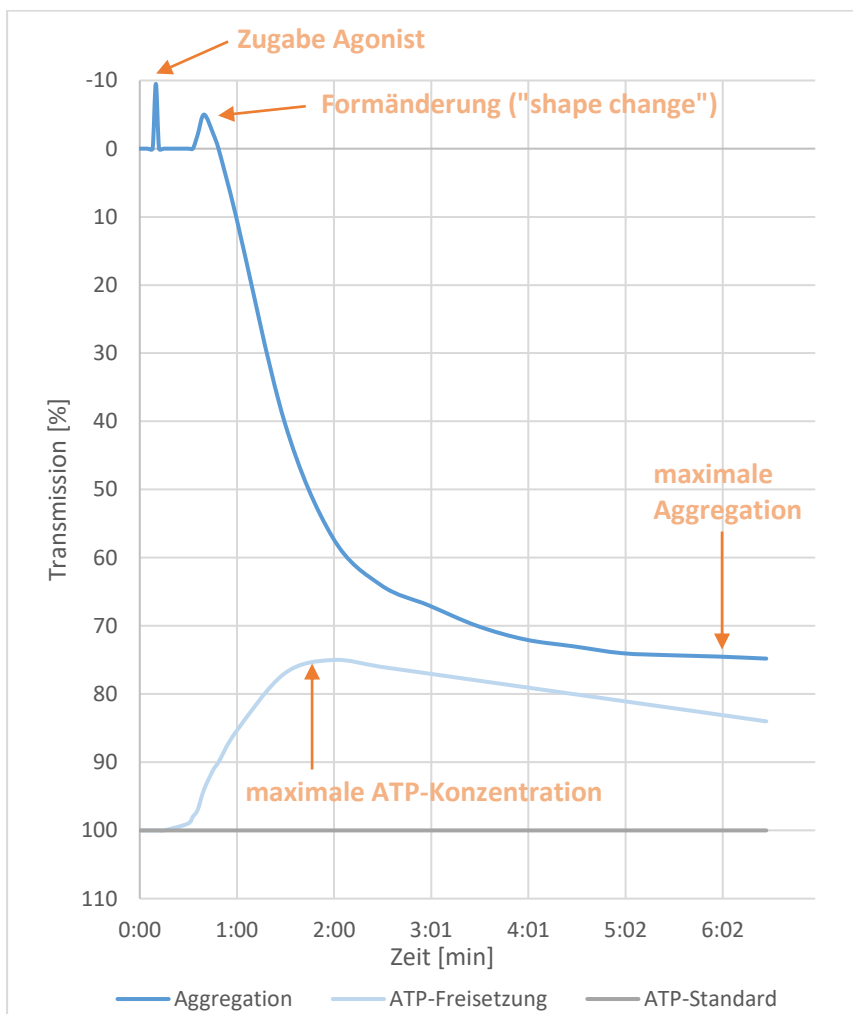


Abbildung 1: Auswertungsgrafik des Lumiaggregometers

Die freigesetzte ADP-Menge wird anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{ADP-Konzentration [nmol]} = \text{ATP}_{\text{mit CK und CPK [nmol]}} - \text{ATP}_{\text{ohne CK und CPK [nmol]}}$$

Die Messung der ATP-Konzentration mit und ohne Kreatinphosphat (CK) und Kreatinphosphatkinase (CPK) erfolgte mit dem Agonisten Kollagen (10 µg/ml). Das so berechenbare ATP/ADP-Ratio stellt das basale und ADP-umgewandelte ATP dar und kann zur Unterscheidung von Speicherpooldefekten und sekretionsbedingten Defekten der δ-Granula genutzt werden. (73)

Für die Auswertung ebenfalls interessant sind, die in der Grafik zum Teil sichtbare primäre und sekundäre Aggregation, sowie die Formänderungen („shape change“) (67, 69).

Je nach verwendeten Agonisten lassen sich daraus ebenfalls Schlüsse ziehen. Thrombin aktiviert die Thrombozyten auf vielfältige Weise. Dadurch wird die volle Sekretion und Aggregation erreicht. Eine reduzierte Sekretion deutet dann auf einen Speicherpooldefekt hin. Sie ist jedoch kaum beeinflusst bei Membrandefekten oder Enzymdefekten. (69)

In diesem Experiment wurde anstelle von Thrombin das Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6 (TRAP-6) verwendet. Dieses aktiviert die Thrombozyten nur über den PAR-1 Rezeptor (73). Kollagen benötigt intakte Membranrezeptoren, G-Protein-Einheiten und einen funktionierenden Eicosanoid-Signalweg um Thrombozyten zu aktivieren. Daher lässt eine reduzierte Aggregation auf Membran- oder Sekretionsdefekte schließen. Außerdem kann der Effekt von ASS oder Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAID) erkannt werden. Arachidonsäure bedient den Eicosanoid-Syntheseweg. Die Aggregation ist reduziert bei einem Defekt in diesem Weg oder bei Einnahme von ASS oder NSAIDs. (69)

3.3.6 „CALIBRATED AUTOMATED THROMBOGRAPHY“(CAT)

3.3.6.1 ALLGEMEINES VERSUCHSPRINZIP

Die kalibrierte automatisierte Thrombographie („Calibrated Automated Thrombography“, CAT) ist eine Methode zur Bestimmung der Thrombingenerierung. Diese, durch Hemker et al. (74) weiterentwickelte Methode detektiert kontinuierlich die Thrombinbildung in PPP und PRP. Dazu wird ein fluorogenes Substrat, Z-Gly-Gly-Arg-AMC, verwendet. Thrombin spaltet von diesem das fluoreszierende AMC (7-amino-4-methylcoumarin) ab. Bei einer Exzitationswellenlänge von 390 nm wird AMC angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm wird das Fluoreszenzsignal detektiert. (74)

Für die Messung werden in jedes Well 80 µl Plasma gegeben. Dazu kommen 20 µl einer Triggersubstanz. Im Gerät selbst wird die 96-Well-Platte bei 37°C gewärmt und zu Beginn der Messung 20 µl FluCa (fluorogenes Substrat in Fluo-Puffer) in jedes Well pipettiert. Anschließend wird die Platte geschüttelt und die Messung gestartet. Diese Prozesse finden automatisch im Gerät statt. Zur Berechnung der Thrombinkonzentration in Echtzeit, wird ein Kalibrator genutzt. Dieser enthält ein α2-Makroglobulin-Thrombin Komplex von dem die Thrombinaktivität bekannt ist. Der Komplex spaltet das Substrat wie Thrombin, wird jedoch

nicht durch Plasmainhibitoren (z.B. Antithrombin) beeinflusst. Da der Kalibrator mit demselben zu untersuchenden Plasma gleichzeitig im Gerät gemessen wird, kann die Thrombingenerierung in Echtzeit berechnet und abgebildet werden. (74)

Die Thrombingenerierung in PRP spiegelt zum größten Teil das physiologische Gerinnungssystem wider. Die Methode wird außerdem zur Untersuchung von Gerinnungserkrankungen (z.B. von-Willebrand-Syndrom), Effekte von Antikoagulantien (orale Antikoagulantien, Heparine) und Thrombozytenaggregationshemmern (z.B. ASS) genutzt. (74-76)

3.3.6.2 VERSUCH ZUR THROMBINGENERIERUNG IN PFP UND PRP

Für den in dieser Arbeit durchgeführten Versuch wurde, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, PRP und PFP gewonnen. Die Thrombozytenkonzentration des PRP wurde anschließend im Sysmex Cell Counter gemessen und auf 150.000 Thrombozyten/ μ l mit PFP verdünnt. Vorbereitend wurden zudem Verdünnungen von Thrombin (0,5 U/ml) und Convulxin (250 ng/ml und 5 μ g/ml) mit Tyrodepuffer hergestellt. PPP-Reagenz und PRP-Reagenz wurden in je 1 ml deionisierten Wasser (Aqua ad injectabilia) gelöst und im Verlauf für mehrere Experimente genutzt. Sie enthalten neben Phospholipiden Tissue Faktor, der als physiologisches Element in den Gefäßwänden vorkommt und somit die physiologische Gerinnungskaskade in Gang bringt (75). Zum Vergleich ist, wie in 3.3.5.1 beschrieben, ein Kalibrator notwendig. Dieser wurde ebenfalls in 1 ml deionisierten Wasser (Aqua ad injectabilia) gelöst und im Verlauf für mehrere Experimente genutzt.

Für den Versuch wurden, nach entsprechender Vorbereitung aller Komponenten, in je 3 Wells pro Versuchsreihe einer 96-Well-Mikrotitrierplatte 80 μ l Plasma (PFP oder verdünntes PRP) pipettiert. Anschließend wurden 20 μ l der Triggersubstanz (siehe Tabelle 12) hinzugegeben. Der Kalibrator wurde in PFP gegeben.

Im Thrombogramm wurden mittels Thrombinoscope Software die Versuchsreihen definiert, die Temperatur auf 37°C festgelegt und das Gerät vorgewärmt. Nach Eingabe der Platte wurde das Experiment gestartet. Dazu verteilte das Gerät automatisiert das sogenannte „FluCa“ auf die vorher definierten Wells. Das FluCa wurde zuvor hergestellt und im Wasserbad auf 37°C gewärmt. Es besteht aus dem fluorogenen Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC und dem Fluo-Puffer, der 17 mM Kalziumchlorid (CaCl_2) enthält.

Nach 60 Minuten wurde die Messung beendet und die kompletten Thrombogramme angezeigt.

Tabelle 12: Versuchsreihen im CAT für PFP und PRP (PFP = Plättchen-freies Plasma, PPP = Plättchen-armes Plasma, PRP = Plättchen-reiches Plasma, TF = „Tissue Factor“ = Gewebefaktor, pM = Pikomolar, µM = Mikromolar, U = Unit, ml = Mililiter, ng = Nanogramm)

Versuchsreihe	1	2	3	4	5	6
Plasma	PFP	PRP	PRP	PRP	PRP	PRP
Reagenz	PPP-Reagenz	PRP-Reagenz	Bovines Thrombin	Convulxin	Bovines Thrombin und Convulxin	Tyrode-puffer
Endkonzentration im Well	5 pM TF, 4 µM Phospholipide	1 pM TF	0,1 U/ml	50 ng/ml	0,1 U/ ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin	

3.3.6.3 VERSUCH ZUR THROMBINGENERIERUNG VON MNC UND WP

Die CAT wurde ebenfalls mit mononukleären Zellen (MNC) und gewaschenen Plättchen (WP) durchgeführt. Dazu wurden die MNC, wie in 3.3.4 beschrieben, hergestellt und nach Messung der Konzentration im Sysmex Cell Counter auf $0,5 \times 10^3$ Zellen/µl verdünnt. Zur Verdünnung wurde PFP vom Patienten und von einer gesunden Person (nicht aus der Kontrollgruppe stammend) verwendet. Die WP wurden, wie in 3.3.3 beschrieben, hergestellt und nach Konzentrationsbestimmung auf 150.000 Zellen/µl verdünnt. Die Verdünnung erfolgte wie bei den MNC mit den beiden verschiedenen PFP's. Die Reagenzien aus 3.3.6.2 wurden auch für diesen Versuch mitgenutzt.

Es erfolgte nun das Einpipettieren von 80 µl in je ein Well pro Zellverdünnung auf eine 96-Well-Mikrotitrierplatte (U-Form). Dazu kamen je 20 µl der in Tabelle 13 aufgeführten Reagenzien. Auch ein Kalibrator mit PFP vom Patienten wurde wieder in 3 Wells pipettiert. Im Thrombogramm wurden die entsprechenden Versuchsreihen definiert und bei 37°C die Platte vorgewärmt. Dann erfolgte die automatische Zugabe von FluCa durch das Gerät. Nach 60 Minuten wurde die Messung beendet und die Graphen/Thrombogramme angezeigt.

Tabelle 13: Versuchsreihen im CAT für MNC und WP (PFP = Plättchen-freies Plasma, PRP = Plättchen-reiches Plasma, MNC = mononukleäre Zellen, TF = „Tissue Factor“ = Gewebefaktor, WP = gewaschene Plättchen = isolierte Thrombozyten, pM = Pikomolar, U = Unit, ml = Mililiter)

Versuchsreihe	1	2	3
Zellverdünnung	MNC mit Patienten-PFP	MNC mit Patienten-PFP	MNC mit Patienten-PFP
	MNC mit Kontroll-PFP	MNC mit Kontroll-PFP	MNC mit Kontroll-PFP
	WP mit Patienten-PFP	WP mit Patienten-PFP	WP mit Patienten-PFP
	WP mit Kontroll-PFP	WP mit Kontroll-PFP	WP mit Kontroll-PFP
Reagenz	Tyrodepuffer	PRP-Reagenz	Bovines Thrombin
Endkonzentration im Well		1 pM TF	0,1 U/ml

3.3.6.4 AUSWERTUNG DER THROMBINGENERIERUNG

Mit Hilfe der Thrombinoscope Software wurde pro Versuchsreihe ein Thrombogramm gemittelt. Aus diesem wurden dann durch die Software verschiedene Werte berechnet, die in Tabelle 14 aufgelistet und in Abbildung 2 visualisiert sind.

Die „lag time“, auch Verzögerungszeit, ist die Zeit in min bis zum Beginn der Thrombinbildung. Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch die Bildung des sekundären Thrombus und ist damit eine Möglichkeit die Gerinnungszeit zu messen (75-77).

Die „time to peak“ ist die Zeit in min bis zum Erreichen des „Thrombin Peaks“ und damit der höchsten Thrombinkonzentration (76).

Der „Thrombin Peak“, beschreibt den Höchstwert der Thrombinbildung in nM. An diesem Punkt sind Thrombinbildung und –zerfall gleich schnell (77).

Das „ETP“, das endogene Thrombin Potential, ist die Fläche unterhalb der Thrombin-Kurve gemessen in nM x min. Es ist proportional zur gebildeten Menge des fluoreszierenden Spaltproduktes durch Thrombin und damit auch zur gebildeten Thrombinmenge über einen bestimmten Zeitraum. (75)

Während die „lag time“ normal sein kann, können vor allem „Thrombin Peak“, „time to peak“ und „ETP“ gestört sein (75).

Tabelle 14: Parameter des Thrombogramms (min = Minute, nM = Nanomolar)

Parameter	Definition	Einheit
„Lag Time“	Zeit bis zum Beginn der Thrombinbildung	min
„Thrombin Peak“	Maximal erreichte Thrombinmenge	nM
„Time to Peak“	Zeit bis zum Erreichen des Thrombin Peaks	min
„ETP“ (endogenes Thrombin Potential)	gebildete Thrombinmenge über den gesamten Messzeitraum	nM x min

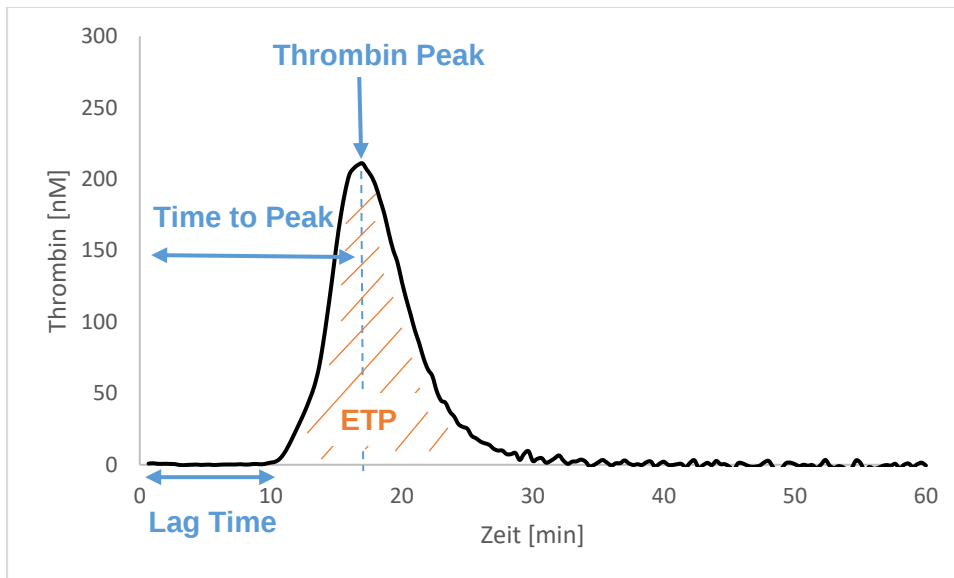


Abbildung 2: Parameter des Thrombogramms

Durch Verwendung verschiedener Triggersubstanzen, können unterschiedliche Aspekte untersucht und beleuchtet werden. Tissue Faktor (TF) ist ein Bestandteil der Gefäßwände und ist somit der physiologische Trigger der Gerinnung (75, 77). Thrombin ist ein sehr potenter Aktivator für Thrombozyten (77), sodass die Thrombingenerierung am Ende von der Thrombozytenfunktion abhängig ist und somit eine Stimulation mit Thrombin Funktionsstörungen der Thrombozyten detektieren kann (75).

Convulxin ist ebenfalls ein starker Thrombozytenaktivator. Es stimuliert die Thrombozyten über den Kollagenrezeptor GPVI und gibt so Auskunft über diesen spezifischen Signalweg des Kollagens. (48)

4 ERGEBNISSE

4.1 STATISTISCHE ANALYSE

Die Stichprobe pro Patientengruppe ist nicht ausreichend groß um Signifikanzwerte zu bestimmen. Jedoch lassen sich jeweils die einzelnen Gruppen mit den jeweiligen Kontrollgruppen vergleichen und ein p-Wert, der eine Tendenz anzeigt und statistische Auffälligkeiten mit $p < 0,05$ aufzeigt, errechnen. Es ist dann jedoch nicht von Signifikanz die Rede, sondern nur von Tendenzen bzw. statistischen Auffälligkeiten, die sich abzeichnen können.

Die Daten wurden mit der Software GraphPad Prism (Version 8) grafisch sowie statistisch ausgewertet. Dazu wurde zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test die Normalverteilung der einzelnen Gruppe überprüft und anschließend bei Normalverteilung für den Vergleich von zwei Gruppen der t-Test bzw. bei nicht normalverteilten Gruppen der Mann-Whitney-Test angewandt.

4.2 DESKRIPTIVE STATISTIK

4.2.1 PATIENTENCHARAKTERISTIKA

Für diese Arbeit wurden Blutproben von 19 ET-Patienten untersucht. Bei 14 Patienten wurde eine *JAK2* V617F Mutation gefunden. 5 Patienten zeigten dagegen eine *CALR*-Mutation, wobei 3 dieser Patienten eine Typ 1 Deletionsmutation und 2 eine Typ 2 Insertionsmutation aufweisen. Die Einteilung der Patienten erfolgte anhand ihrer Mutation und der zytoreduktiven Therapie mit Hydroxyurea (HU). Dabei ergaben sich 4 Gruppen. 6 Patienten mit *JAK2* V617F positiven Status und HU waren bei Studieneinschluss im Mittel 66,5 Jahre alt (Altersspanne von 51 bis 87 Jahre). 8 *JAK2* V617F positive Patienten wurden ohne HU behandelt und waren im Mittel 51,25 Jahre alt (Altersspanne von 30 bis 73 Jahren). Bei den *CALR*-positiven Patienten wurden 4 Personen mit HU behandelt und waren im Mittel 54,75 Jahre alt bei Einschluss (Altersspanne von 42 bis 71 Jahren) und nur ein Patient mit *CALR*-Mutation im Alter von 27 Jahren wurde ohne HU therapiert. Die Verteilung der Geschlechter, sowie die mögliche weitere Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) ist in Tabelle 15 dargestellt. Weiterhin zeigt die Tabelle 15 die Verteilung klinisch relevanter Charakteristika der jeweiligen Gruppen, wie kardiovaskuläre Risikofaktoren, thrombotische Ereignisse, Blutungsereignisse, gerinnungsspezifische Erkrankungen, Mikrovaskuläre Symptome und die Anzahl und Rate der aufgetretenen Splenomegalien.

Tabelle 15: demografische und klinische Charakteristika der ET-Patienten nach Mutation und zytoreduktiver Therapie (*JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, min. = minimal, max. = maximal, n = Anzahl, ASS = Acetylsalicylsäure)

Mutation	JAK2		CALR	
zytoreduktive Therapie	+ HU	- HU	+ HU	- HU
Anzahl, n	6	8	4	1
Geschlecht:				
männlich, n (%)	3 (50)	0	2 (50)	0
weiblich, n (%)	3 (50)	8 (100)	2 (50)	1 (100)
Alter bei Studieneinschluss, Jahre (min. – max.)	66,5 (51 – 87)	51,25 (30 – 73)	54,75 (42 – 71)	27 (27)
Weitere Therapie:				
ASS, n (%)	3 (50)	4 (50)	3 (75)	1 (100)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren (einer oder mehr), n (%)	6 (100)	5 (62,5)	4 (100)	0
arterielle Hypertonie	5 (83)	4 (50)	1 (25)	
Diabetes mellitus	1 (17)	1 (12,5)	0	
Dyslipidämie	2 (33)	1 (12,5)	1 (25)	
Nikotinabusus	1 (17)	3 (37,5)	3 (75)	
aktueller	1 (17)	0	2 (50)	
ehemaliger	0	3 (37,5)	1 (25)	
positive Familienanamnese	0	1 (12,5)	0	
thrombotische Ereignisse (eins oder mehrere), n (%)	2 (33)	3 (37,5)	0	0
arteriell	2 (33)	3 (37,5)		
venös	2 (33)	0		
Blutungsereignisse (eins oder mehrere), n (%)	5 (83)	7 (87,5)	2 (50)	0
Blutungsneigung	3 (50)	3 (37,5)	1 (25)	
Hämatomneigung	2 (33)	5 (62,5)	2 (50)	
Gastrointestinale Blutung	1 (17)	1 (12,5)	0	
Gynäkologische Blutung	0	1 (12,5)	0	
Hirnblutung	0	1 (12,5)	0	

Gerinnungsspezifische Erkrankungen (eins oder mehrere), n (%)	3 (50)	7 (87,5)	2 (50)	0
Erworbenes von Willebrand Syndrom	3 (50)	6 (75)	2 (50)	
Faktor-V-Leiden	0	2 (25)	0	
Protein-S-Mangel	1 (17)	0	0	
Mikrovaskuläre Symptome (eins oder mehrere), n (%)	3 (50)	4 (50)	1 (25)	0
Parästhesien	1 (17)	1 (12,5)	0	
Kopfschmerzen	1 (17)	3 (37,5)	1 (25)	
Visusstörungen	2 (33)	2 (25)	0	
Schwindel	2 (33)	1 (12,5)	1 (25)	
Tinnitus/Hörschwäche	0	1 (12,5)	0	
Splenomegalie (ab geringgradiger Vergrößerung), n (%)	0	4 (50)	1 (25)	

In der folgenden Tabelle 16 sind Mittelwerte, sowie Minimum, Maximum und Range wichtiger Blutparameter der Patientengruppen dargestellt. Nur zwei Patienten wiesen dabei eine extreme Thrombozytose von über 1000×10^3 Thrombozyten pro μl Blut auf.

Tabelle 16: Blutparameter der ET-Patienten nach Mutation und zytoreduktiver Therapie (JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des *Calreticulin*-Gens, min. = minimal, max. = maximal, n = Anzahl, INR = International Normalized Ratio, aPTT= aktivierte Partielle Thromboplastinzeit, sek = Sekunden, mg = Milligramm, dl = Deziliter, g = Gramm, μl = Mikroliter, vWF= von-Willebrand-Faktor)

Mutation	JAK2		CALR	
Therapie	+ HU	- HU	+HU	- HU
Anzahl, n	6	8	4	1
Blutbild:				
Thrombozytenkonzentration, $[\times 10^3/\mu\text{l}]$ (min. – max.)	581,75 (267 – 991)	649,07 (287 – 1157)	637,14 (420 – 1128)	854 (854)
davon $> 1000 \times 10^3/\mu\text{l}$, n (%)	0	1 (12,5)	1 (25)	0
Leukozytenkonzentration, $[\times 10^3/\mu\text{l}]$ (min. – max.)	8,97 (5,0 – 12,9)	7,7 (3,6 – 10,5)	5,71 (3,3 – 7,9)	5,7 (5,7)

Erythrozytenkonzentration, [x10 ⁶ /μl] (min. – max.)	3,95 (3,0 – 4,77)	4,69 (3,75 – 5,76)	3,07 (2,69 – 3,44)	3,88 (3,88)
Hämoglobin, [g/dl] (min. – max.)	12,7 (10,6 – 14,9)	12,71 (10,9 – 14,4)	10,79 (9,5 – 12,5)	10,3 (10,3)
Hämatokrit, [%] (min. – max.)	38,17 (33,3 – 44,2)	38,8 (33,4 – 43,6)	31,11 (27,5 – 35,5)	30,9 (30,9)
Gerinnung:				
Quick, [%] (min. – max.)	82 (35 – 127)	83,67 (32 – 100)	83 (79 – 91)	
INR, (min. – max.)	1,37 (0,9 – 2,1)	1,26 (1,0 – 2,3)	1,125 (1,0 – 1,2)	
aPTT, [sek] (min. – max.)	35,15 (29,6 – 40,7)	33,4 (28,2 – 42,5)	31,7 (29,4 – 35,3)	
Faktor VIII, [%] (min. – max.)	121,67 (86 – 140)	111,45 (79 – 199)	124,7 (91,8 – 155)	
Fibrinogen, [mg/dl] (min. – max.)	368 (301 – 468)	252,67 (197 – 291)	251,33 (184 – 291)	
vWF-Antigen, [%] (min. – max.)	126,67 (71 – 155)	98,5 (59 – 167)	143,75 (93 – 215)	
vWF-Aktivität, [%] (min. – max.)	115,33 (54 – 146)	70,67 (43 – 116)	104,75 (72 – 157)	

4.2.2 PROBANDENCHARAKTERISTIKA

Als Kontrollgruppe dienten 10 gesunde erwachsene Probanden. Die Probanden wurden jeweils ohne Acetylsalicylsäure-Einnahme (ASS) oder anderer Thrombozyten-beeinflussenden Medikamente und unter 3-tägiger ASS-Einnahme (einmal täglich 100 mg) untersucht. Zum Zeitpunkt der ASS-Einnahme betrug das mittlere Alter 38,4 Jahre (Altersspanne von 23 bis 68 Jahre) und bei der Untersuchung ohne ASS-Einnahme 39,2 Jahre (Altersspanne von 24 bis 69 Jahre). Weitere Charakteristika und die Blutparameter sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Tabelle 17: demografische Charakteristika und Blutparameter der Kontrollprobanden (ASS = Acetylsalicylsäure, min. = Minimum, max. = Maximum, n = Anzahl)

	mit ASS	ohne ASS
Geschlecht:		
männlich, n (%)	5 (50)	5 (50)
weiblich, n (%)	5 (50)	5 (50)
Alter, Jahre (Range)	38,4 (23 – 68)	39,2 (24 – 69)
Blutparameter:		

Thrombozytenkonzentration, [$\times 10^3/\mu\text{l}$] (min. – max.)	236,1 (174 – 300)	228,3 (167 – 291)
Leukozytenkonzentration, [$\times 10^3/\mu\text{l}$] (min. – max.)	5,19 (4,0 – 6,5)	4,63 (2,9 – 5,7)
Erythrozytenkonzentration, [$\times 10^6/\mu\text{l}$] (min. – max.)	4,35 (3,64 – 4,65)	4,35 (3,87 – 4,88)
Hämoglobin, [g/dl] (min. – max.)	12,92 (9,3 – 14,2)	12,9 (10,8 – 14,7)
Hämatokrit, [%] (min. – max.)	41,67 (29,3 – 40,8)	37,7 (32,3 – 43,1)

4.3 EXPLORATIVE DATENANALYSE

4.3.1 AGONISTEN-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE AGGREGATION

Zur Evaluierung der Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET wurde ein Cut-Off von $\geq 60\%$ (maximale Aggregation) induziert durch hohe Agonistenkonzentrationen (Arachidonsäure: 0,5 mg/ml; TRAP-6: 50 μM ; Kollagen: 10 mg/ml) als „normal“ gemäß laborinterner Kontrolluntersuchungen und entsprechend nach Zhou und Schmaier (78) und Althaus et al. (79). Für intermediäre Agonistenkonzentrationen (TRAP-6: 10 μM ; Kollagen: 2 $\mu\text{g/ml}$) wurde kein Cut-Off für die maximale Aggregation festgelegt, da die maximale Aggregationsantwort der Thrombozyten interindividuell schwankt (79).

Die Patienten wurden in ihrer jeweiligen Gruppe zusätzlich bezüglich der Einnahme von Acetylsalicylsäure (ASS) unterteilt.

Eine Übersicht über Median, Minimum und Maximum, sowie 25% und 75% Perzentile und p-Werte der jeweiligen Gruppen und Experimente, findet sich im Anhang unter 8.1.1 und 8.2.1.

4.3.1.1 ARACHIDONSÄURE-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE AGGREGATION

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse der Aggregation unter Zugabe von 0,5 mg/ml Arachidonsäure dargestellt. Die Grafik A zeigt dabei die Patientengruppen ohne zusätzliche ASS Therapie im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS-Einnahme. Gut zu sehen ist, dass die Kontrollen ohne ASS eine Aggregation oberhalb des Cut-Offs aufwiesen (Median: 69%). Auch die Thrombozyten des CALR-positiven Patienten reagierten auf Arachidonsäure mit einer Aggregation $>60\%$ (max. Aggregation: 72%). Die Gruppe der JAK2-positiven ohne HU-Therapie hatten im Median ebenfalls eine ausreichende thrombozytäre Aggregation von 65 %. Lediglich die Thrombozyten der JAK2-positiven mit HU-Einnahme reagierten gar nicht bis gut auf den Agonisten und lagen damit im Median unterhalb von 60% der maximalen Aggregation. Die Frage besteht daher, ob einer der Patienten ASS eingenommen hatte, z.B. als Schmerzmedikation, ohne die entsprechende Angabe gemacht zu haben. In der statistischen Analyse zeigten sich tendenzielle Unterschiede beim Vergleich der Kontrollgruppe ohne ASS mit den JAK2-positiven mit HU ($p=0,015$) und ohne HU ($p=0,04$). Auch die Kontrollen mit ASS

im Vergleich zu den *JAK2*-positiven ohne HU wiesen eine statistische Auffälligkeit mit einem p-Wert von 0,001 auf.

In Grafik B sind die Ergebnisse der Patienten mit zusätzlicher ASS-Therapie im Vergleich zu den Kontrollen mit und ohne ASS-Einnahme dargestellt. Die Thrombozyten der Kontrollgruppe mit ASS reagierten dabei gar nicht auf die Arachidonsäure, genau wie bei den Patienten mit *CALR* Mutation mit und ohne HU-Therapie (max. Aggregation: 0%). Bei den Patienten mit *JAK2*-Mutation gab es jeweils in der Gruppe mit und ohne HU-Therapie einen Patienten, dessen Thrombozyten auf den Agonisten reagierten. Bei diesen Patienten stellt sich die Frage der akkuraten Einnahme von ASS („Compliance“). Im statistischen Vergleich fielen hier nur Tendenzen zwischen der Kontrollgruppe ohne ASS und den drei Patientengruppen, mit jeweils einem p-Wert unter 0,05, auf.

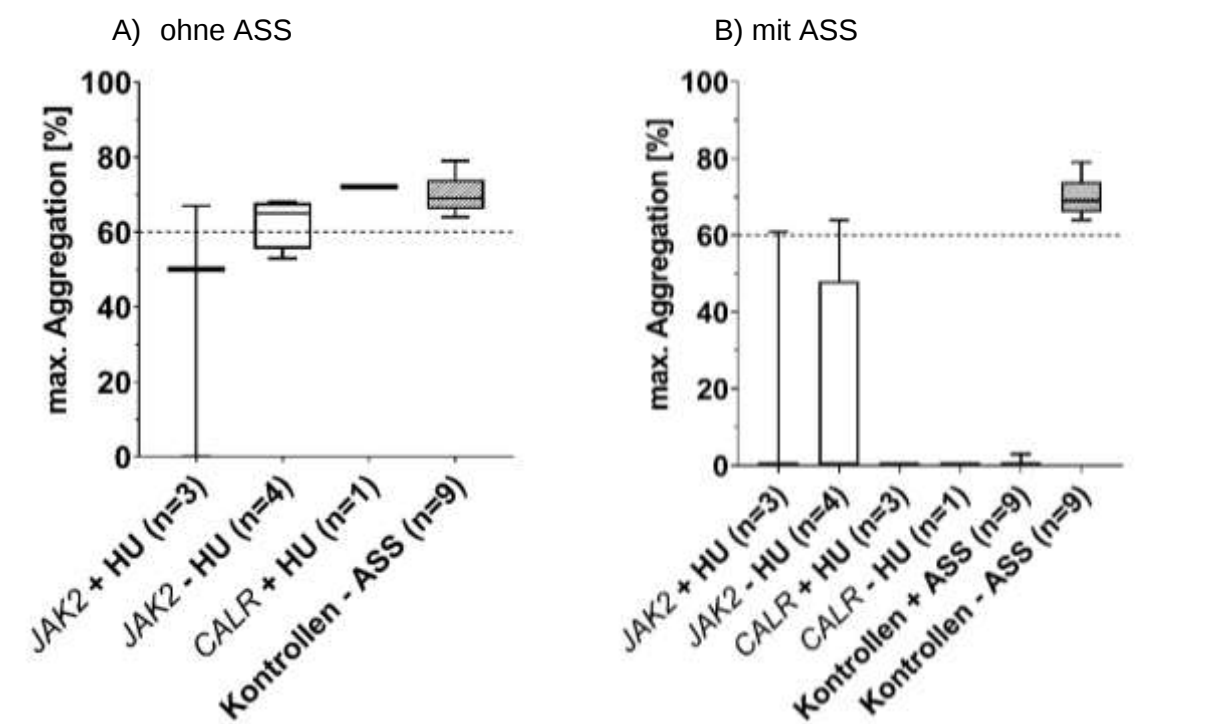


Abbildung 3: Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET nach Zugabe von Arachidonsäure (0,5 mg/ml), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme (ASS = Acetylsalicylsäure, max. = maximal, *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, n = Anzahl)

4.3.1.2 TRAP-6-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE AGGREGATION

Abbildung 4 zeigt die Aggregation unter Zugabe von TRAP-6 mit einer intermediären Konzentration von 10 μ M. In Grafik A sind wieder die Patientengruppen ohne ASS-Therapie im Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS-Einnahme aufgeführt. Die Kontrollgruppe ohne ASS zeigte eine variable maximale Aggregation mit einem Median von 35%. Bei der Gruppe der *JAK2*-positiven ohne HU waren die Aggregationswerte ebenfalls sehr heterogen. Jedoch lag der Median (39%) höher als bei den Kontrollen ohne ASS. Die Thrombozyten der Gruppe der

JAK2-positiven mit HU reagierten dagegen kaum auf die niedrige TRAP-6 Konzentration bis auf einen Patienten. Die Thrombozyten des Patienten mit der *CALR* Mutation und HU-Therapie zeigten wiederum gar keine Reaktion auf den Agonisten. Beim Vergleich der Gruppen fielen keine Tendenzen auf.

Grafik B zeigt die Patienten mit ASS-Therapie im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen. Die Kontrollgruppe mit ASS zeigte eine verminderte thrombozytäre Aggregation im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS-Einnahme. Die Thrombozyten der Gruppe „*JAK2* mit HU“ zeigten keine bis wenig Aggregation. Die Werte der *JAK2*-Gruppe ohne HU waren wieder heterogen verteilt. Jedoch lagen die Aggregationswerte mit einem Median von 31,5% etwas unterhalb vom Median der Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme (Median: 35%), aber oberhalb des Medians der Kontrollgruppe mit ASS (Median: 20%). Die Thrombozyten der *CALR*-Gruppe mit HU aggregierten kaum und der *CALR*-positive Patient ohne HU reagierte mit seinen Thrombozyten gar nicht auf den Agonisten. Auch hier zeigten sich im statistischen Vergleich keine Auffälligkeiten.

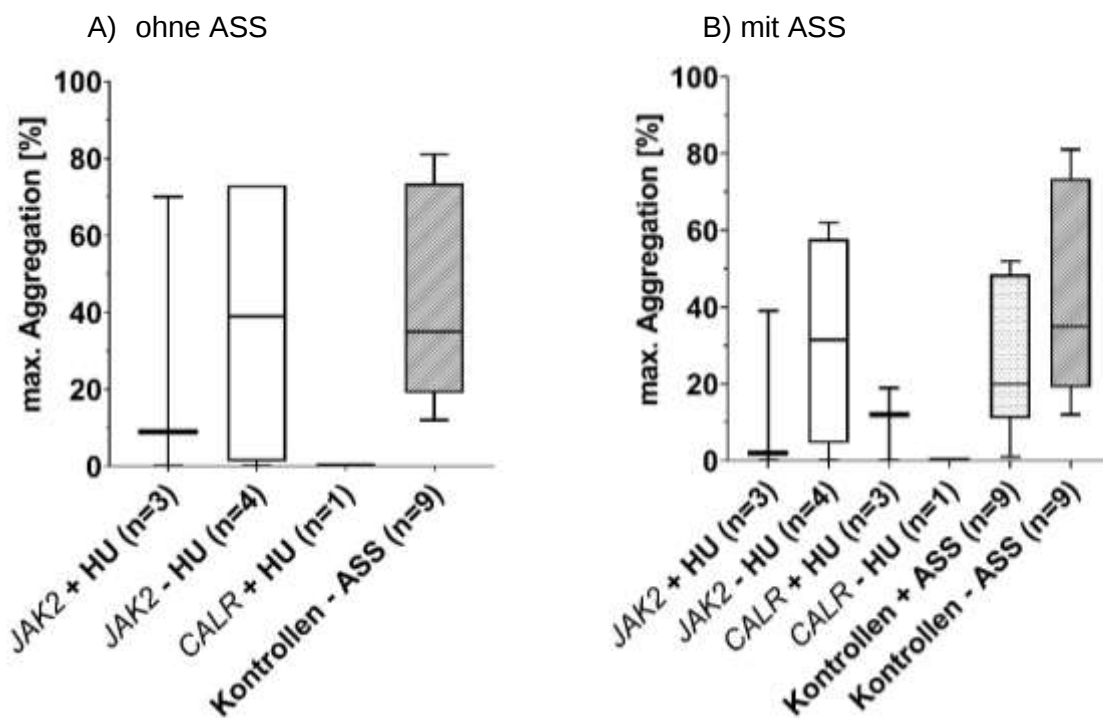


Abbildung 4: Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET nach Zugabe von TRAP-6 (10 µM), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme (TRAP-6 = Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6, ASS = Acetylsalicylsäure, max. = maximal, *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, n = Anzahl)

In Abbildung 5 sind die Aggregationswerte bei Zugabe einer hohen TRAP-6 Konzentration (50 µM) dargestellt. Grafik A zeigt die Patienten ohne ASS-Therapie im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Dabei zeigten die Kontrollen ohne ASS-Einnahme normale Aggregationswerte (deutlich über dem Cut-Off von 60%). Auch die Thrombozyten der *JAK2*-

Gruppe ohne HU-Therapie reagierten auf den Agonisten (Median: 66%). Die Thrombozyten der *JAK2*-positiven mit HU-Einnahme dagegen reagierten bis auf einen Patienten kaum. Auch die Thrombozyten des *CALR*-positive Patienten mit HU aggregierten kaum (max. Aggregation < 60%). Bei der Analyse der Werte zeigten die Vergleiche der Kontrollen ohne ASS mit den *JAK2*-positiven mit HU ($p=0,007$) und ohne HU ($p=0,018$) statistische Auffälligkeiten. Auch der Vergleich von Kontrollen mit ASS und den *JAK2*-positiven mit HU wies eine statistische Tendenz auf ($p=0,034$).

In Grafik B sind die Patienten mit ASS-Therapie im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen dargestellt. Die Kontrollen mit ASS-Einnahme lagen wie die Kontrollen ohne ASS mit ihren Aggregationswerte im Median über dem Cut-Off von 60%. Damit zeigte sich keine relevante TxA_2 -Sensitivität der Aggregierbarkeit von Kontroll-Thrombozyten induziert durch eine hohe TRAP-6 Konzentration. Die Thrombozyten der *JAK2*-Gruppe mit HU reagierten bis auf eine Ausnahme gut (max. Aggregation > 60%). Auch die Thrombozyten der *JAK2*-positiven ohne HU erreichten Werte über 60%. Dagegen war die Thrombozyten-Aggregation in der Gruppe „*CALR* mit HU“ erniedrigt und bei dem Patienten ohne HU kaum vorhanden. Beide Gruppen lagen mit ihren Werten unterhalb des Cut-Off. Bei der statistischen Auswertung war die Gruppe „*CALR* mit HU“ im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS ($p=0,002$) und ohne ASS ($p=0,0001$) auffällig. Ebenfalls eine Tendenz zeigte der Vergleich der Kontrollen ohne ASS mit den *JAK2*-positiven mit HU-Einnahme ($p=0,046$).

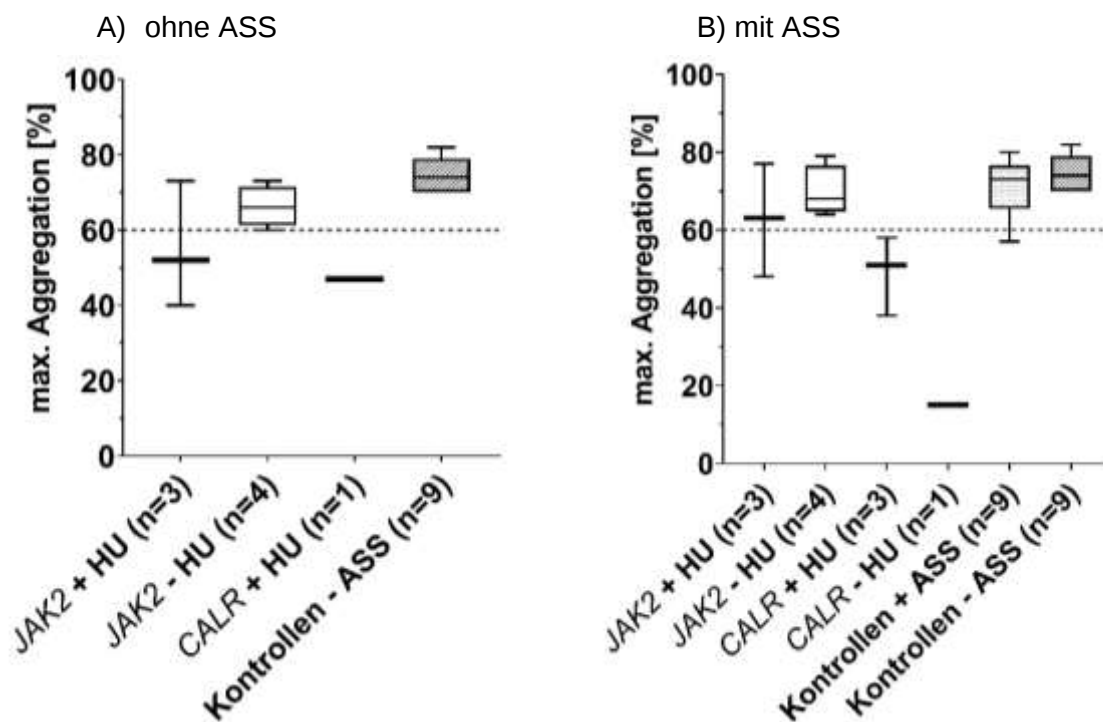


Abbildung 5: Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET nach Zugabe von TRAP-6 (50 μ M), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme (TRAP-6 = Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6, ASS = Acetylsalicylsäure, max. = maximal, JAK2 = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, n = Anzahl)

4.3.1.3 KOLLAGEN-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE AGGREGATION

Abbildung 6 zeigt die Aggregation unter Zugabe von 2 μ g/ml Kollagen. Dabei zeigt Grafik A die Patienten ohne zusätzliche ASS-Therapie im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS-Einnahme. Bei der intermediären Kollagenkonzentration reichten die Aggregationswerte in der Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme von 1% bis 77% und zeigten damit das unterschiedliche interindividuelle Ansprechen der Thrombozyten auf die intermediäre Agonistenkonzentration. Bei der Gruppe „JAK2 mit HU“ und „CALR mit HU“ aggregierten die Thrombozyten kaum. Die Thrombozyten der Gruppe der JAK2-positiven ohne HU reagierten im Median weniger auf den Agonisten (20%) als die Kontroll-Thrombozyten (Median: 35%). Statistisch gab es keine Auffälligkeiten bei den Gruppenvergleichen ($p > 0,05$).

In Grafik B sind die Patienten mit ASS-Therapie im Vergleich zu den Kontrollen zu sehen. Die Kontrollgruppe mit ASS zeigte deutlich niedrige Aggregationswerte (1-23%). Auch die Thrombozyten der Patientengruppen „JAK2 mit HU“, „CALR mit HU“ und „CALR ohne HU“ reagierten nicht auf die intermediäre Konzentration. Bei der Gruppe der JAK2-positiven ohne HU reichte die Reaktion der Thrombozyten von gut (62%) bis kaum vorhanden (1%). Der Median mit 1,5% zeigte jedoch, dass nur wenige Patienten mit ihren Thrombozyten reagierten. Die Analyse der Gruppen miteinander zeigten keine statistischen Tendenzen.

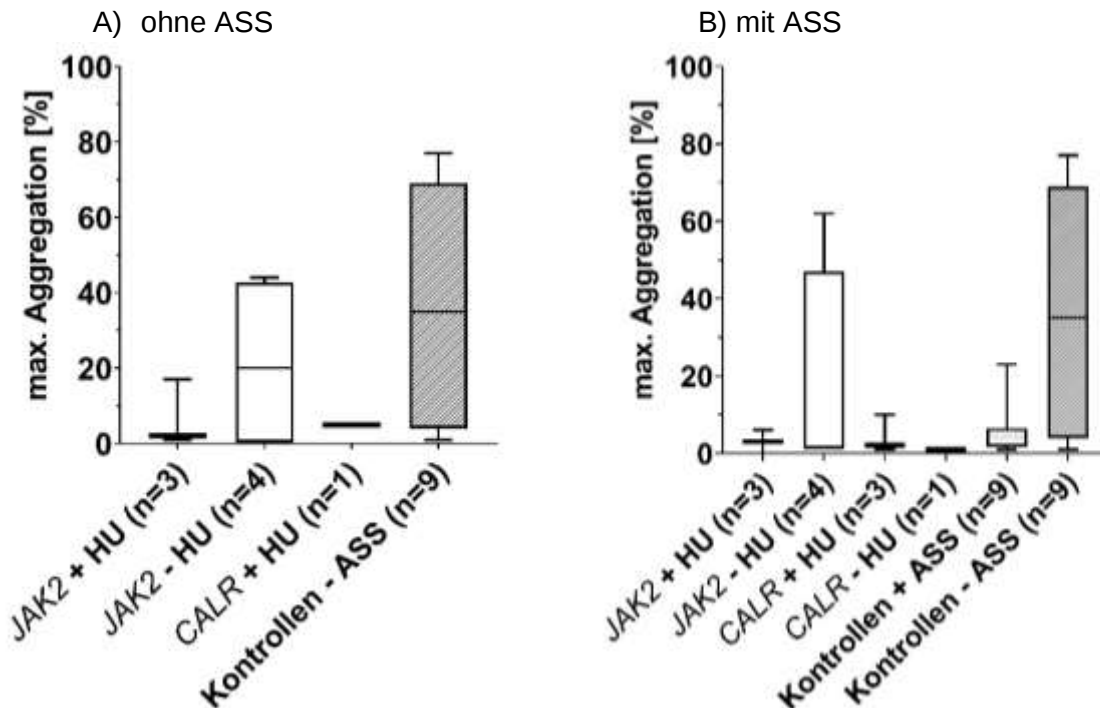


Abbildung 6: Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET nach Zugabe von Kollagen (2 µg/ml), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme (ASS = Acetylsalicylsäure, max. = maximal, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, n = Anzahl)

Abbildung 7 stellt die Ergebnisse der Aggregation mit hoher Kollagen-Konzentration (10 µg/ml) zusammen. Grafik A zeigt dabei die Patienten ohne ASS-Einnahme im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne ASS. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS reagierten auf die hohe Konzentration des Kollagens mit maximalen Aggregationswerten deutlich über den Cut-Off (>60%). Auch die Thrombozyten der Gruppen „JAK2 ohne HU“ und „CALR mit HU“ aggregierten gut, mit Werten oberhalb des Cut-Off. Lediglich die Werte der JAK2-positiven mit HU lagen im Median (55%) unter 60% der Aggregation. Dabei reichten die Aggregationsmaxima von 28% bis 79%. Im statistischen Vergleich war nur eine Tendenz zwischen der Kontrollgruppe ohne ASS und den JAK2-positiven mit HU erkennbar (p=0,022). In Grafik B sind die Patienten mit ASS-Therapie im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen dargestellt. Die Kontrollen mit ASS lagen mit ihren Werten ebenfalls über dem Cut-Off von 60% und zeigten damit, dass bei der hohen Kollagen-Konzentration die Thrombozyten-Aggregation relativ unabhängig von der ASS-Einnahme ist. Dagegen waren die Aggregationswerte der Patientengruppen „JAK2 mit HU“, „CALR mit HU“ und „CALR ohne HU“ deutlich unterhalb von 60%. Der Median der JAK2-positiven ohne HU lag ebenfalls unterhalb des Cut-Off, die Aggregation der Thrombozyten reichte jedoch von 19% bis 78%. Alle

Gruppenvergleiche mit den Kontrollen mit und ohne ASS-Einnahme zeigten dabei statistische Auffälligkeiten mit p-Werten unter 0,05.

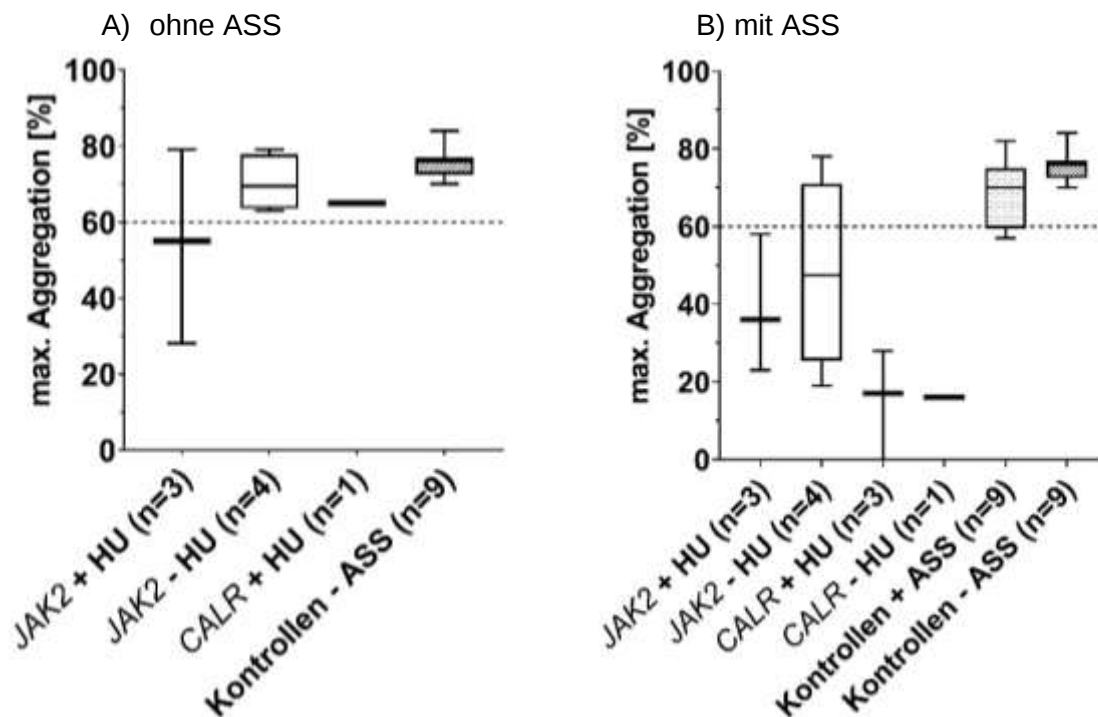


Abbildung 7: Thrombozyten-Aggregation bei Patienten mit ET nach Zugabe von Kollagen (10 µg/ml), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme (ASS = Acetylsalicylsäure, max. = maximal, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, n = Anzahl)

4.3.2 AGONISTEN-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE ADP- UND ATP-FREISETZUNG

Von einer adäquaten Sekretion von ADP und ATP aus den delta-Granula kann nur ausgegangen werden, wenn eine ausreichende Aggregation stattfindet. Daher sind nur Werte von Patienten und Probanden mit einer maximalen Aggregation von $\geq 45\%$ in die Auswertung eingegangen.

Eine Übersicht über Median, Minimum und Maximum, sowie 25% und 75% Perzentile und p-Werte der jeweiligen Gruppen und Experimente, findet sich im Anhang unter 8.1.2 und 8.2.2.

4.3.2.1 THROMBOZYTÄRE ATP-FREISETZUNG UNTER TRAP-6-STIMULATION

Die Abbildung 8 zeigt die ATP-Freisetzung unter Zugabe von 50 µM TRAP-6. In Grafik A sind dabei die Patienten ohne zusätzliche ASS-Therapie im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne ASS aufgeführt. Die Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme erreichte im Median 1,33 nmol/ 2×10^8 Thrombozyten/ml ATP mit Werten von 2,04 bis 0,63 nmol/ 2×10^8 Thrombozyten/ml ATP. Die Gruppe „JAK2 mit HU“ lag mit ihrem Median von 0,485 nmol/ 2×10^8 Thrombozyten/ml ATP deutlich unter diesen Werten. Noch niedriger war die gemessene ATP-Konzentration der Thrombozyten des CALR-positiven Patienten mit HU-Einnahme mit 0,16

nmol/ 2×10^8 Thrombozyten/ml ATP. Die Thrombozyten der JAK2-positiven ohne HU sezernierten ebenfalls weniger ATP, jedoch lagen sie im Median mit 0,575 nmol/ 2×10^8 Thrombozyten/ml ATP höher als alle anderen Patientengruppen. In der Analyse ergab sich beim Vergleich der Kontrollgruppe ohne ASS mit den JAK2-positiven mit HU ein p-Wert von 0,036 und ohne HU ein p-Wert von 0,011 und damit statistische Auffälligkeiten.

In Grafik B sind die Patientengruppen mit ASS-Einnahme im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen dargestellt. Die Kontrollgruppe mit ASS erreichte im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS niedrigere ATP-Konzentrationen mit einem Median von 0,69 nmol/ 2×10^8 Thrombozyten/ml ATP, aber einer Werteverteilung von 1,52 bis 0,21 nmol/ 2×10^8 Thrombozyten/ml ATP. Damit zeigten die Thrombozyten eine relative ASS-Sensitivität bezüglich der TRAP-6-stimulierten delta-Granula Sekretion. Die Thrombozyten der Gruppe „JAK2 mit HU“ sezernierten kaum ATP mit einem Median von 0,2 nmol/ 2×10^8 Thrombozyten/ml ATP. Die thrombozytäre ATP-Freisetzung der JAK2-positiven ohne HU lag im Median bei 0,565 nmol/ 2×10^8 Thrombozyten/ml ATP und die Gruppe „CALR mit HU“ erreichte einen Median von 0,5 nmol/ 2×10^8 Thrombozyten/ml ATP. Damit lagen die beiden zuletzt genannten Gruppen im unteren Bereich der Kontrollgruppe mit ASS. Beim Vergleich der Kontrollen ohne ASS mit den Patientengruppen zeigten sich statistische Auffälligkeiten ($p < 0,05$). Ebenfalls zeigte der Vergleich der Kontrollgruppe mit ASS mit den JAK2-positiven mit HU ($p = 0,039$) eine Tendenz.

Bei allen Patientengruppen mit und ohne ASS-Therapie waren die gemessenen ATP-Konzentrationen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen deutlich erniedrigt. Damit ergibt sich bei einer guten Aggregationsleistung ($\geq 45\%$) eine Störung der delta-Granula, eine sogenannte delta-Storage-Pool-Deficiency. Genauere Untersuchungen hierzu erfolgten in einer weiteren Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von [REDACTED].

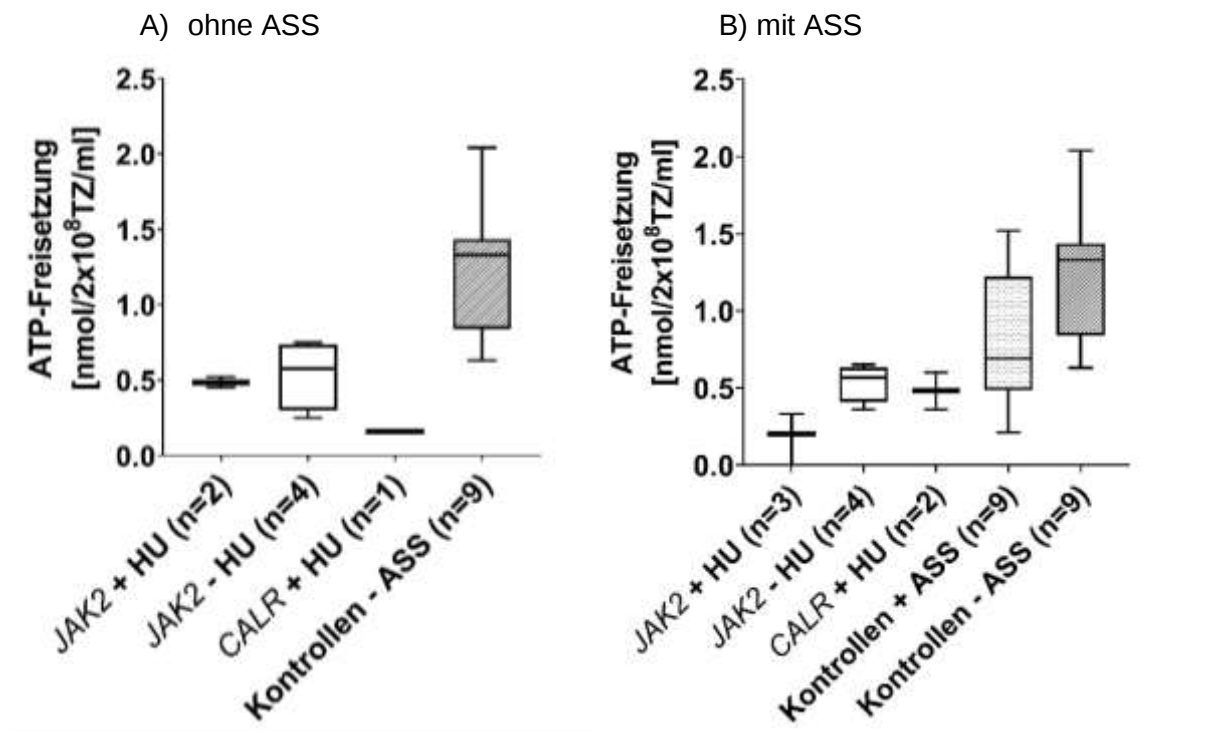


Abbildung 8: thrombozytäre ATP-Freisetzung bei Patienten mit ET nach Zugabe von TRAP-6 (50 μ M), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme (TRAP-6 = Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6, ASS = Acetylsalicylsäure, max. = maximal, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, n = Anzahl, TZ = Thrombozyten, nmol = Nanomol, ml = Mililiter)

4.3.2.2 THROMBOZYTÄRE ATP-FREISETZUNG UNTER KOLLAGEN-STIMULATION

In Abbildung 9 sind die freigesetzten ATP-Mengen bei Zugabe von 10 μ g/ml Kollagen zusammengestellt. Grafik A zeigt dabei die Werte der Patienten ohne ASS-Einnahme im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne ASS. Die ATP-Menge der Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme lag im Median bei 0,96 nmol/2x10⁸Thrombozyten/ml. Die JAK2-positiven mit HU erreichten im Median eine ATP-Konzentration von 0,53 nmol/2x10⁸Thrombozyten/ml ATP. Auch die Thrombozyten der JAK2-positiven ohne HU sezernierten im Median 0,535 nmol/2x10⁸Thrombozyten/ml ATP. Der Patient mit CALR Mutation und mit HU-Therapie setzte thrombozytär dagegen kaum ATP durch Stimulation mit Kollagen frei (0,16 nmol/2x10⁸Thrombozyten/ml ATP). Lediglich der Vergleich der Kontrollgruppe ohne ASS mit den JAK2-positiven ohne HU-Therapie zeigte mit einem p-Wert von 0,032 eine statistische Auffälligkeit.

In Grafik B sind die Patientengruppen mit ASS-Therapie im Vergleich mit den Kontrollgruppen aufgeführt. Die Kontrollgruppe mit ASS lag im Median nur bei 0,48 nmol/2x10⁸Thrombozyten/ml ATP und sezernierte thrombozytär damit gerade mal die Hälfte der ATP-Menge der Kontrollgruppe ohne ASS. Die thrombozytäre ATP-Freisetzung induziert durch eine hohe Kollagen-Konzentration war damit relativ sensitiv für ASS. Ebenfalls niedrig

lag der Median der thrombozytären ATP-Freisetzung der JAK2-positiven ohne HU-Therapie mit 0,42 nmol/2x10⁸Thrombozyten/ml ATP. Deutlich darunter lag die sezernierte ATP-Menge der Thrombozyten der JAK2-positiven mit HU mit einem Median von 0,19 nmol/2x10⁸Thrombozyten/ml ATP. Der Vergleich der Kontrollgruppe ohne ASS mit den JAK2-positiven ohne HU-Therapie zeigte dabei eine Tendenz (p=0,009).

Bei allen Patientengruppen ohne ASS-Therapie waren die gemessenen ATP-Konzentrationen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe deutlich erniedrigt. Damit ergibt sich bei einer guten Aggregationsleistung (≥45%) eine Störung der delta-Granula, eine sogenannte delta-Storage-Pool-Deficiency. Genauere Untersuchungen hierzu erfolgten in einer weiteren Doktorarbeit in der AG [REDACTED]. Dagegen waren die thrombozytär freigesetzten ATP-Mengen bei den Patientengruppen mit ASS im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme ähnlich niedrig. Dies spricht für eine relative ASS-Sensitivität der Thrombozyten bei Verwendung von Kollagen als Agonisten.

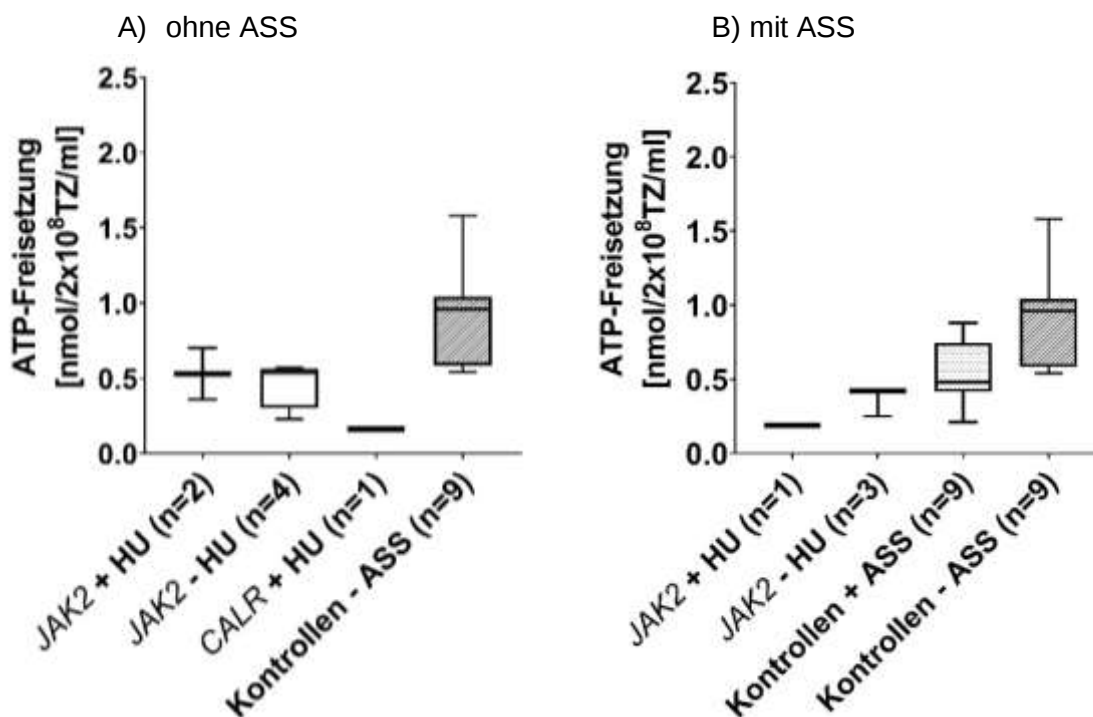


Abbildung 9: thrombozytäre ATP-Freisetzung bei Patienten mit ET nach Zugabe von Kollagen (10 µg/ml), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme (ASS = Acetylsalicylsäure, max. = maximal, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, n = Anzahl, nm = Nanomol, TZ = Thrombozyten, ml = Milliliter)

4.3.2.3 THROMBOZYTÄRE ADP-FREISETZUNG UNTER KOLLAGEN-STIMULATION

Die Abbildung 10 zeigt die ADP-Freisetzung nach Zugabe von 10 µg/ml Kollagen. In Grafik A sind die Patientengruppen ohne ASS-Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme dargestellt. Die Thrombozyten der Kontrollgruppe ohne ASS setzte im Median 1,19 nmol/2x10⁸Thrombozyten/ml ADP frei. Alle drei Patientengruppen lagen mit ihren

thrombozytär freigesetzten ADP-Konzentrationen deutlich unter dem Median der Kontrollgruppe ohne ASS. Die statistische Analyse zeigte für die Vergleiche der Gruppe „JAK2 ohne HU“ mit den Kontrollen mit ASS ($p=0,039$) und ohne ASS ($p=0,003$) tendenzielle Unterschiede.

In Grafik B sind dagegen die Patientengruppen mit ASS-Therapie im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen dargestellt. Im Median setzten die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS $0,55 \text{ nmol}/2 \times 10^8 \text{ Thrombozyten/ml ADP}$ frei. Damit war die freigesetzte ADP-Konzentration um mehr als die Hälfte reduziert im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Somit bestand auch für die thrombozytäre ADP-Freisetzung induziert durch den Agonisten Kollagen eine relative ASS-Sensitivität. Die Thrombozyten der Gruppe „JAK2 mit HU“ setzten mit $0,19 \text{ nmol}/2 \times 10^8 \text{ Thrombozyten/ml ADP}$ kaum ADP frei. Die Gruppe „JAK2 ohne HU“ dagegen erreichte im Median eine thrombozytäre ADP-Konzentration von $0,48 \text{ nmol}/2 \times 10^8 \text{ Thrombozyten/ml ADP}$ und lag damit nur gering unterhalb der Kontrollen mit ASS. Im Vergleich zeigte nur die Gruppe „JAK2 ohne HU“ in Bezug zu den Kontrollen ohne ASS eine statistische Auffälligkeit mit einem p-Wert von 0,025.

Bei allen Patientengruppen ohne ASS-Therapie waren die gemessenen ADP-Konzentrationen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme deutlich erniedrigt. Damit ergibt sich bei einer guten Aggregationsleistung ($\geq 45\%$) eine Störung der delta-Granula, eine sogenannte delta-Storage-Pool-Deficiency. Genauere Untersuchungen hierzu erfolgten in einer weiteren Doktorarbeit der AG [REDACTED]. Dagegen waren die thrombozytär freigesetzten ADP-Mengen bei den Patientengruppen mit ASS im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme ähnlich niedrig. Dies spricht für eine relative ASS-Sensitivität der Thrombozyten-Aggregation bei Verwendung von Kollagen als Agonisten.

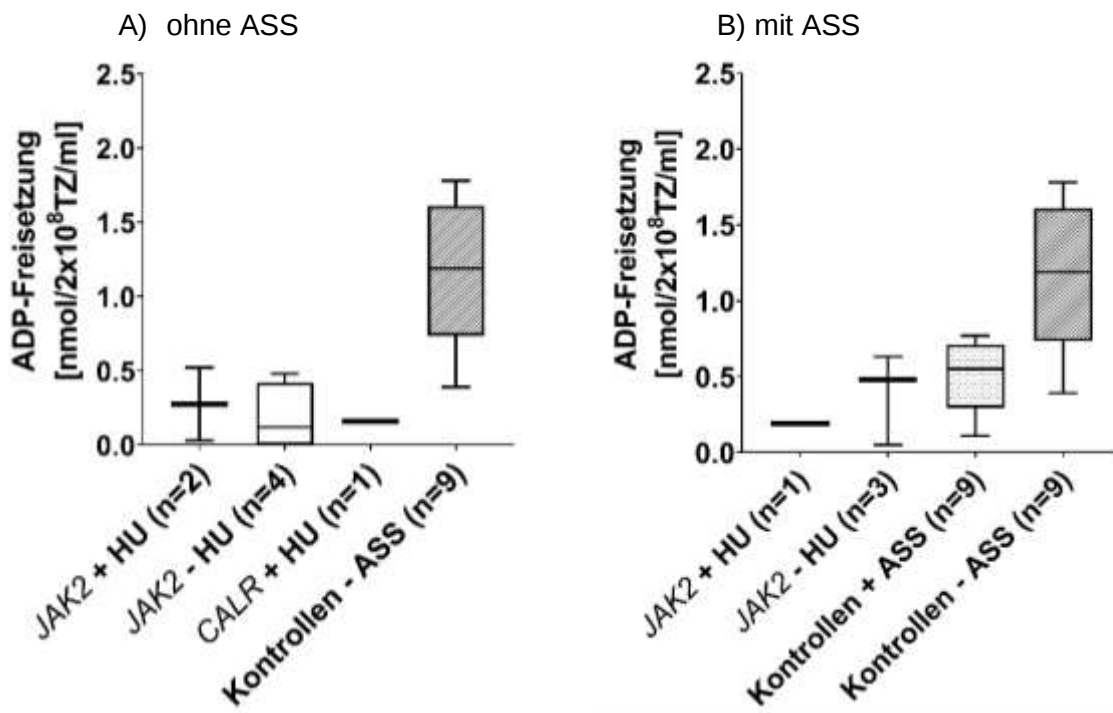


Abbildung 10: thrombozytäre ADP-Freisetzung bei Patienten mit ET nach Zugabe von Kollagen (10 µg/ml), A) ohne ASS-Einnahme, B) mit ASS-Einnahme (ASS = Acetylsalicylsäure, max. = maximal, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, n = Anzahl, nmol = Nanomol, TZ = Thrombozyten, ml = Mililiter)

4.3.3 MESSUNG DER PLASMATISCHEN UND THROMBOZYTÄREN THROMBINGENERIERUNG

Die Messung im Plättchen-freiem Plasma (PFP) bildet die plasmatische Thrombingenerierung ab. Dabei können aber auch zelluläre Mikropartikel involviert sein. Die thrombozytäre Thrombingenerierung wurde dagegen im Plättchen-reichem Plasma (PRP) gemessen.

Eine Übersicht über Median, Minimum und Maximum, sowie 25% und 75% Perzentile und p-Werte der jeweiligen Gruppen und Experimente, findet sich im Anhang unter 8.1.3 und 8.2.3.

4.3.3.1 "LAG TIME"

Die „lag time“, auch Verzögerungszeit genannt, ist die Zeit bis zum Beginn der Thrombinbildung (75-77).

Abbildung 11 zeigt die „lag time“ nach Zugabe von 5 pM TF („tissue factor“, Gewebefaktor) für alle Patienten- sowie Kontrollgruppen mit entsprechender Therapie im PFP in Gegenwart von anionischen Phospholipiden. Es zeigte sich, dass die „lag time“ für alle Gruppen ähnlich einsetzte. Der Median der Kontrollgruppen lag bei 3,28 Minuten (ohne ASS) und bei 3,32 Minuten (mit ASS). Das Plasma der JAK2-positiven Patienten mit HU zeigten mit 3,5 Minuten den geringsten Abstand zu den Kontrollen, wobei das Plasma der CALR-positiven Patienten mit HU-Einnahme mit 4,27 Minuten den größten Abstand aufwiesen. Die Ergebnisse wiesen

keine statistisch tendenziellen Unterschiede zwischen den Patientengruppen und den beiden Kontrollgruppen auf.

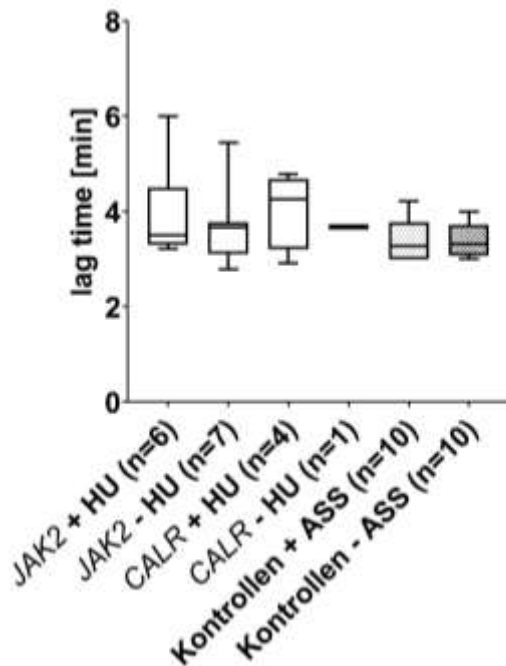


Abbildung 11: „Lag time“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF und anionischen Phospholipiden (PFP = Plättchen-freies Plasma, pM = Pikomolar, TF = „Tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten)

In Abbildung 12 sind die Messungen der „lag time“ im PRP aller Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen dargestellt. Grafik A zeigt dabei die „lag time“ der basalen Thrombingenerierung, das heißt ohne Zugabe eines Thrombozyten-Triggers. Die thrombozytäre Thrombinbildung setzte in der Kontrollgruppe ohne ASS mit einem Median von 21,83 Minuten als erstes ein. Im Vergleich dazu war die „lag time“ in der Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme verlängert (Median: 24,33 min). Auch die Thrombozyten der Patientengruppen reagierten verzögert mit einem Median von 24,67 Minuten in der Gruppe „CALR mit HU“ und 25,17 Minuten in der Gruppe „JAK2 ohne HU“. Die langsamste „lag time“ im Experiment wiesen die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten ohne HU-Einnahme, mit einem Median von 31,84 Minuten, auf. Bei der Messung zeigte sich nur eine auffällige Verlängerung der „lag time“ bei den JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme ($p=0,014$).

Grafik B zeigt die „lag time“ im PRP unter Zugabe von 1 pM Gewebefaktor für die Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Die Thrombozyten der Kontrollen begannen mit der Thrombinbildung im Median ähnlich schnell (mit ASS: 10,39 min, ohne ASS: 9,89 min). Im Vergleich dazu war die thrombozytäre „lag time“ des CALR-positiven Patienten ohne HU-

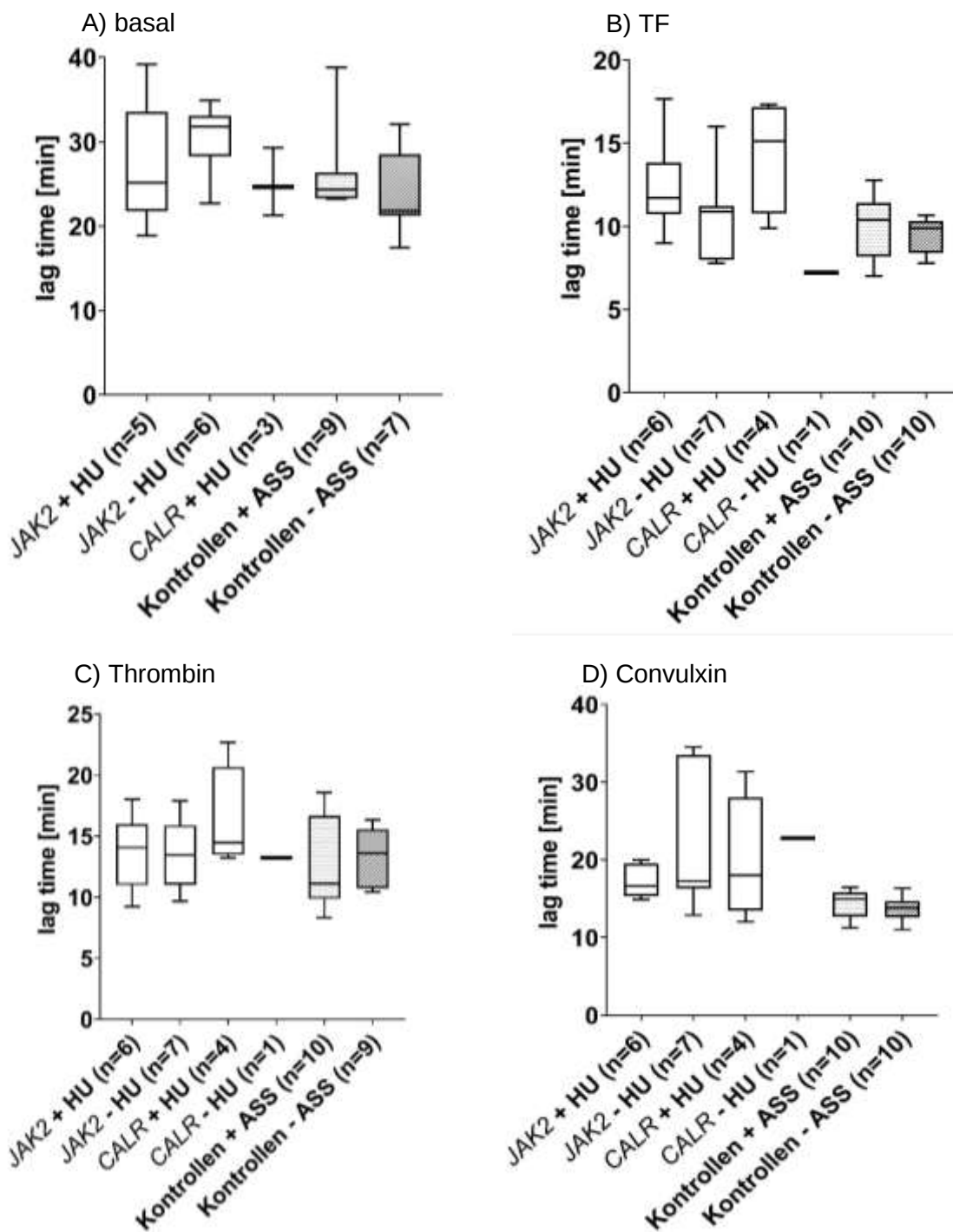
Therapie mit 7,22 Minuten deutlich schneller. Verzögert reagierten die Thrombozyten der *CALR*-positiven Patienten mit HU-Einnahme mit einer medianen „lag time“ von 15,12 Minuten. Die Reaktion der Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patientengruppen setzte nur wenig langsamer ein, als die der Kontrollgruppe mit ASS (mit HU: 11,73 min, ohne HU: 10,95 min). Die Analyse der „lag time“ ergab Unterschiede in der Gruppe der *CALR*-positiven Patienten mit HU-Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ASS ($p=0,01$), sowie ohne ASS ($p=0,001$). Auch bei den *JAK2*-mutierten Patienten mit HU-Einnahme fällt statistisch eine verlängerte „lag time“ im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS auf ($p=0,014$).

In Grafik C sind die Ergebnisse der Messung der „lag time“ im PRP unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin dargestellt. Mit einer medianen „lag time“ von 11,11 Minuten waren die Thrombozyten der Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme am schnellsten mit ihrer Reaktion auf den Agonisten. Im Gegensatz dazu lag die „lag time“-Werte der Kontrollgruppe ohne ASS im Median bei 13,56 Minuten. Die Thrombozyten der Patientengruppen ohne HU-Therapie reagierten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS schneller („*JAK2*-HU“: 13,43 min; „*CALR*-HU“: 13,22 min), während die thrombozytäre „lag time“ der Patientengruppen mit HU-Einnahme verlängert war („*JAK2*+HU“: 14,06 min; „*CALR*+HU“: 14,45 min). Alle Gruppenvergleiche zeigten keine Tendenzen mit einem p -Wert unter 0,05.

Bei Grafik D handelt es sich um die Darstellung der Ergebnisse für die „lag time“ im PRP unter Zugabe von 50 ng/ml Convulxin. Die Kontrollgruppe ohne ASS erreichte mit ihren Thrombozyten eine mediane „lag time“ von 13,84 Minuten. Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS reagierten etwas später mit einem Median von 14,95 Minuten. Beide Kontrollgruppen wiesen eine kürzere „lag time“ auf als die Patientengruppen. Die Thrombozyten der Patienten reagierten verzögert auf den Agonisten mit einem Median von 16,62 Minuten für die *JAK2*-positiven mit HU, 17,26 Minuten für die *JAK2*-positiven ohne HU und 18 Minuten für die *CALR*-positiven mit HU. Am deutlichsten war die thrombozytäre „lag time“ bei dem *CALR*-positiven Patienten ohne HU-Einnahme, mit 22,78 Minuten, verlängert. Bei Verwendung von Convulxin als Agonist fielen statistische Unterschiede auf. Dabei war die „lag time“ bei allen Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen verlängert. Dies betrifft die „*JAK2*+HU“-Gruppe in Bezug auf die Kontrollen mit ASS ($p=0,015$) und ohne ASS ($p=0,002$), sowie die „*JAK2*-HU“-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit ASS ($p=0,01$) und ohne ASS ($p=0,005$). Einzig bei den *CALR*-positiven Patienten mit HU-Einnahme zeigte sich nur eine Tendenz einer verlängerten „lag time“ im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS mit einem p -Wert von 0,032.

Grafik E zeigt die „lag time“ im PRP unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin. Unter diesen Bedingungen erreichten die Thrombozyten der Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme einen Median von 7,49 Minuten. Es folgte die Kontrollgruppe mit ASS (Median: 8,54 Minuten). Die Thrombozyten der Patientengruppen wiesen eine etwas verzögerte „lag time“ auf. Die Gruppe „*JAK2* mit HU“ erreichte eine thrombozytäre „lag time“ von 9,28 Minuten

im Median und lag damit nah an der „lag time“ der Kontrollgruppe mit ASS. Ähnlich schnell reagierten die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten ohne HU (Median: 9,33 min) und die Thrombozyten des Patienten mit CALR-Mutation und ohne HU-Einnahme (9,67 min). Die längsten „lag time“ wiesen die Thrombozyten der CALR-positiven Patienten mit HU auf (Median: 10,11 min). Bei der Messung der „lag time“ zeigte sich eine tendenzielle Verlängerung in der Gruppe der CALR-mutierten Patienten mit HU-Therapie im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS ($p=0,012$), wie auch ohne ASS-Einnahme ($p=0,003$). Auch die JAK2-positiven Patienten ohne HU fallen mit einer verlängerten „lag time“ gegenüber den Kontrollen ohne ASS auf ($p=0,03$).



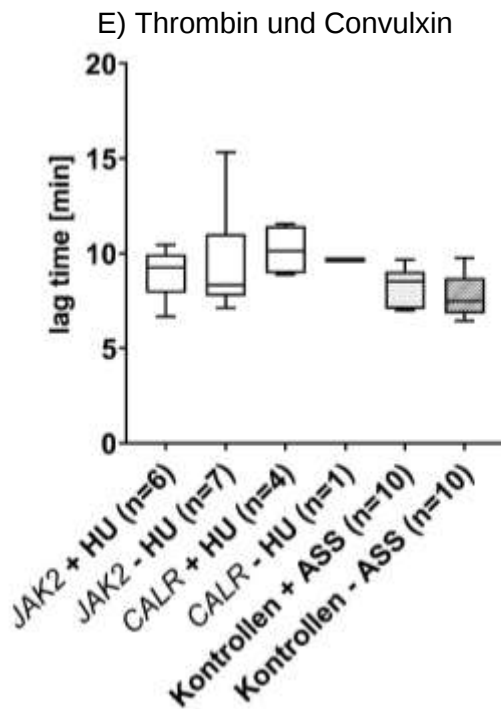


Abbildung 12: „Lag time“ im PRP, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml), D) unter Zugabe von Convulxin (50 ng/ml), E) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) und Convulxin (50 ng/ml) (PRP = Plättchen-reiches Plasma, pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des *JAK2*-Gens, CALR = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten)

4.3.3.2 „TTPEAK“

Die „time to peak“ („ttPeak“) ist die Zeit bis zum Erreichen des „Thrombin Peaks“ und damit der höchsten Thrombinkonzentration (76).

Abbildung 13 zeigt die „ttPeak“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF für die einzelnen Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die plasmatische „ttPeak“ der Kontrollgruppen waren ähnlich mit einem Median von 6,39 Minuten bei den Kontrollen ohne ASS und einem Median von 6,45 Minuten mit ASS-Einnahme. Kurz darauf folgten das Plasma der JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie (Median: 6,56 min) und der JAK2-positiven mit HU sowie das Plasma des CALR-positiven Patienten ohne HU mit jeweils 6,89 Minuten. Am längsten dauerte es den „Peak“ zu erreichen beim Plasma der CALR-positiven Patienten mit HU-Therapie mit einem Median von 7,38 Minuten. Die Gruppenvergleiche zeigten dabei keine statistischen Auffälligkeiten.

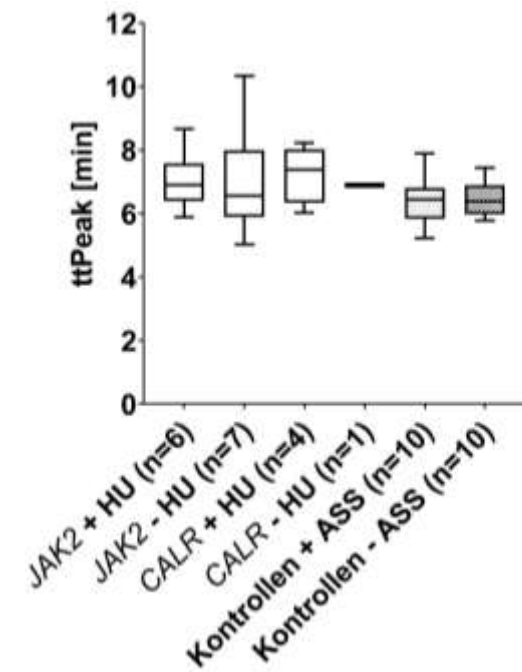


Abbildung 13: „ttPeak“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF und anionischen Phospholipiden („ttPeak“ = „time to Peak“ = Zeit bis zum Peak, PFP = Plättchen-freies Plasma, pM = Pikomolar, TF = „Tissue factor“ = Gewebefaktor, *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten)

In Abbildung 14 sind die „ttPeak“-Werte im PRP dargestellt. Grafik A zeigt dabei die „ttPeak“ der basalen Thrombinbildung der jeweiligen Patienten- und Kontrollgruppen. Die Thrombozyten der Kontrollprobanden ohne ASS erreichten den „Peak“ im Median nach 37,67 Minuten. Nur wenig länger benötigten die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS-Einnahme (Median: 38,11 min). Die Gruppe der *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie wies eine ähnliche „ttPeak“ auf wie die Kontrollgruppe ohne ASS (Median: 37,33 min). Die Thrombozyten der *CALR*-mutierten Patienten mit HU-Einnahme waren nur geringfügig langsamer im Erreichen des „Peaks“ als die Kontrollgruppe mit ASS (Median: 39,17 min). Deutlich verlängert war jedoch die thrombozytäre „ttPeak“ der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie mit einem Median von 42,61 Minuten. Bei der basalen Messung der ttPeak zeigten sich ebenfalls keine Tendenzen beim Vergleich der Patientengruppen gegenüber den Kontrollen.

In Grafik B ist die „ttPeak“ im PRP unter Zugabe von 1 pM TF dargestellt. Die Kontrollen ohne ASS lagen im Median bei 23,06 Minuten und mit ASS bei 24,11 Minuten. Dazwischen lagen mit ähnlichen Werten die beiden *JAK2*-Gruppen (mit HU: 23,28 min, ohne HU: 23,22 min). Bei den *CALR*-positiven Patienten verhielt es sich hingegen sehr gegensätzlich. Die Thrombozyten der Patientengruppe mit HU-Therapie hatten eine verlängerte „ttPeak“ von 28,03 Minuten, wogegen der Patient ohne HU-Einnahme eine deutlich verkürzte thrombozytäre „ttPeak“ von 18,67 Minuten, in Bezug auf die Kontrollgruppen, aufwies. Die

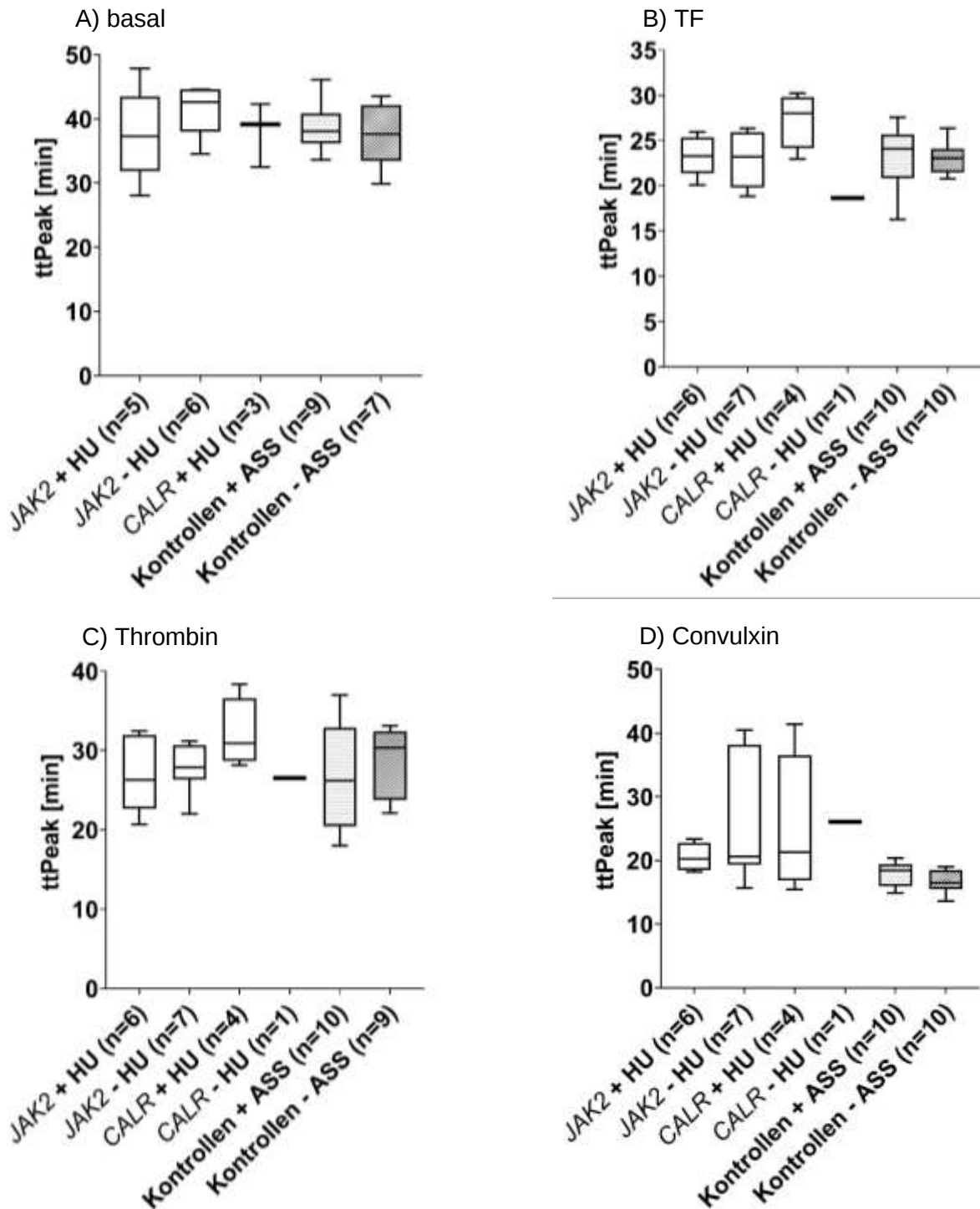
Analyse der „ttPeak“-Werte zeigte eine Verlängerung in der Gruppe der *CALR*-positiven mit HU-Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme ($p=0,005$), jedoch nicht gegenüber den Kontrollen mit ASS. Auch die Auswertung der *JAK2*-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ergaben keine Tendenzen anhand der p -Werte.

Die Grafik C stellt die „ttPeak“ im PRP unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin dar. Hier zeigte sich, dass die Thrombozyten der Kontrollgruppe mit ASS wesentlich schneller den „Peak“ erreichten (Median: 26,23 min) als ohne ASS-Einnahme (Median: 30,72 min). Die medianen „ttPeak“-Werte der Patientengruppen waren jeweils einer Kontrollgruppe ähnlich. So waren die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten mit HU (Median: 26,34 min) und die Thrombozyten des *CALR*-positiven Patienten ohne HU (26,56 min) ähnlich schnell wie die Kontrollen mit ASS. Dagegen hatten die *CALR*-positiven Patienten mit HU ebenfalls eine verlängerte thrombozytäre „ttPeak“ mit einem Median von 30,94 Minuten wie die Kontrollen ohne ASS. Die *JAK2*-positiven Patienten ohne HU lagen mit ihrer thrombozytären „ttPeak“ zwischen den Werten der Patienten-, wie auch Kontrollgruppen, mit einem Median von 27,89 Minuten. Es ergaben sich keinerlei statistischer Unterschiede bei den Gruppenvergleichen.

Grafik D zeigt die „ttPeak“ im PRP unter Zugabe von 50 ng/ml Convulxin. Dabei erreichten die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS den „Thrombin Peak“ am schnellsten (Median: 16,5 min). Dem folgend war die Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme mit einem Median von 18,45 Minuten. Die Thrombozyten der Patientengruppen brauchten jeweils länger („*JAK2*+HU“: 20,22 min, „*JAK2*-HU“: 20,6 min, „*CALR*+HU“: 21,28 min). Die längste „ttPeak“ ergab sich bei den Thrombozyten des Patienten mit *CALR*-Mutation und ohne HU-Therapie mit 26 Minuten. Bei Zugabe von Convulxin zum PRP zeigten sich Unterschiede durch Verlängerung der „ttPeak“ bei den *JAK2*-positiven Patienten mit HU gegenüber beiden Kontrollgruppen (mit ASS: $p=0,027$; ohne ASS: $p=0,002$), sowie bei den *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie gegenüber den beiden Kontrollpopulationen (mit ASS: $p=0,027$; ohne ASS: $p=0,007$). Bei der „*CALR*+HU“-Gruppe war nur der Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme mittels p -Wert auffällig ($p=0,039$).

In Grafik E ist die „ttPeak“ im PRP unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin für die jeweiligen Gruppen dargestellt. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS erreichten den „Thrombin Peak“ am schnellsten (Median: 12,39 min). Verzögert zu diesen folgte die Kontrollgruppe mit ASS (Median: 15 Minuten). Eine, der Kontrollgruppe mit ASS, ähnliche „ttPeak“ ergab sich für die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU mit einem Median von 15,22 Minuten. Alle anderen Gruppen wiesen eine deutlich längere thrombozytäre „ttPeak“ auf, mit einem Median von 17,28 Minuten für die *JAK2*-Gruppe mit HU, einem Median von 17,78 Minuten für die *CALR*-positiven Patienten mit HU und am längsten brauchten die Thrombozyten des *CALR*-mutierten Patienten ohne HU mit 19,44 Minuten. Die Ergebnisse zeigten tendenzielle Unterschiede aller Patientengruppen gegenüber der Kontrollgruppe ohne ASS. So ergab sich ein p -Wert von 0,005 im Vergleich zur Gruppe der *JAK2*-Patienten mit HU

und ein p-Wert von 0,027 beim Vergleich mit den JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie. Die CALR-mutierten Patienten mit HU-Einnahme zeigten sogar einen statistisch auffälligen p-Wert gegenüber beiden Kontrollgruppen durch eine verlängerte „ttPeak“ (mit ASS: $p=0,039$; ohne ASS: $p=0,006$).



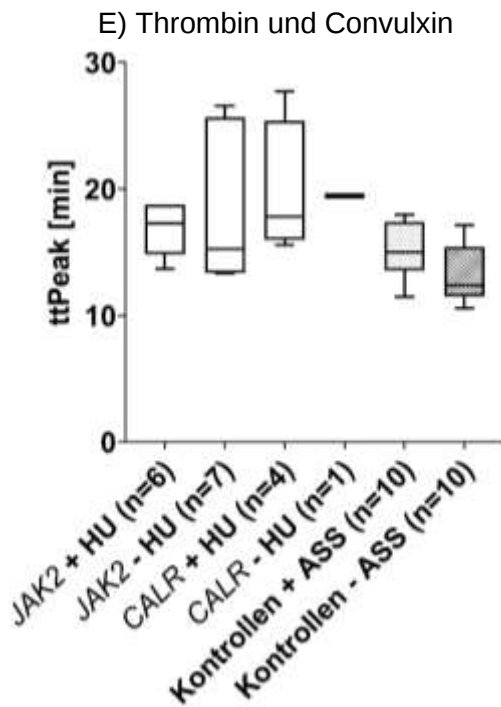


Abbildung 14: „ttPeak“ im PRP, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml), D) unter Zugabe von Convulxin (50 ng/ml), E) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) und Convulxin (50 ng/ml) („ttPeak“ = „time to Peak“ = Zeit bis zum Peak, PRP = Plättchen-reiches Plasma, pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten)

4.3.3.3 „THROMBIN PEAK“

Der „Thrombin Peak“, beschreibt den Höchstwert des generierten Thrombins (77). Er wird in Nanomolar (nM) angegeben.

In Abbildung 15 sind die „Thrombin Peaks“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF für die Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt. Das Plasma der Kontrollgruppen erreichte jeweils einen medianen „Thrombin Peak“ von 282,5 nM ohne ASS-Einnahme und 273,5 nM mit ASS-Einnahme. Den höchsten „Thrombin Peak“ unter den Patientengruppen, wie auch gegenüber den beiden Kontrollgruppen, generierte das Plasma der JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie mit einem Median von 288,9 nM. Unter den Kontrollen mit ähnlichen „Thrombin Peak“-Werten lagen das Plasma der JAK2-positiven und der CALR-positiven Patienten jeweils mit HU-Einnahme („JAK2+HU“: Median von 256 nM; „CALR+HU“: Median von 254 nM). Am niedrigsten war der plasmatisch erzeugte „Thrombin Peak“ des CALR-mutierten Patienten ohne HU-Therapie mit 226,5 nM. Die Auswertung der Werte ergab keine statistischen Auffälligkeiten bei den Gruppenvergleichen.

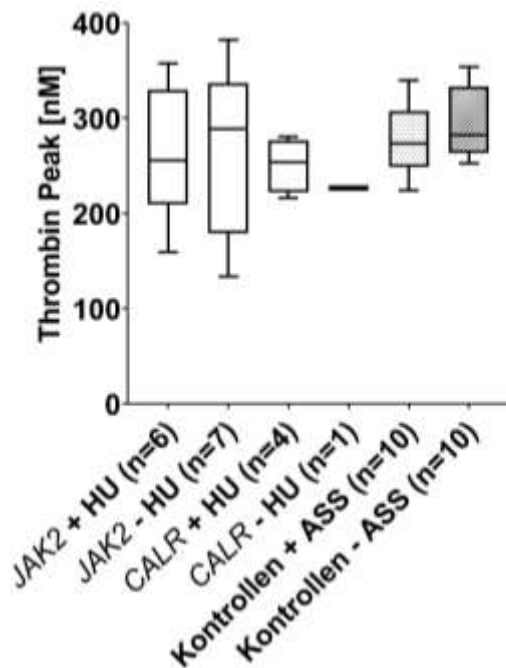


Abbildung 15: „Thrombin Peak“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF und anionischen Phospholipiden (PFP = Plättchen-freies Plasma, pM = Pikomolar, TF = „Tissue factor“ = Gewebefaktor, *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, nM = nanomolar)

In Abbildung 16 ist der „Thrombin Peak“ im PRP für die jeweiligen Gruppen zusammengestellt. Grafik A zeigt dabei die Werte der basalen Thrombinbildung. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS erreichten im Median 55,23 nM Thrombin, während die Kontrollen mit ASS einen thrombozytären „Thrombin Peak“ von 48,11 nM (Median) generierten. Die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie lagen im Median mit ihren produzierten „Thrombin Peak“ von 54,13 nM zwischen den Kontrollen. Dagegen ist der thrombozytäre „Thrombin Peak“ der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU niedriger mit einem Median von 38,78 nM. Den größten „Thrombin Peak“ aller Gruppen, auch im Vergleich zu den Kontrollen, erzeugten die Thrombozyten der *CALR*-positiven Patienten mit HU-Einnahme mit 75,58 nM (Median). Der einzig auffällige „Thrombin Peak“ im Gruppenvergleich war der erniedrigte „Thrombin Peak“ der „*JAK2*-HU“-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS ($p=0,038$). Die restlichen Gruppenvergleiche zeigten keine statistischen Unterschiede anhand des p-Wertes.

In Grafik B werden die „Thrombin Peaks“ im PRP unter Zugabe von 1 pM TF dargestellt. Die Kontrollen erreichten dabei einen thrombozytären „Thrombin Peak“ von 102,9 nM (Median) ohne ASS und 96,58 nM (Median) mit ASS-Einnahme. Darunter lagen die „Thrombin Peak“-Werte der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie mit einem Median von 96,42 nM und der *CALR*-positive Patient ohne HU mit 86,27 nM. Die Thrombozyten der beiden Patientengruppen mit HU-Therapie dagegen erzeugten höhere „Thrombin Peaks“ als die der Kontrollen. Die „*JAK2*+HU“-Gruppe erreichte mit ihren Thrombozyten einen „Thrombin Peak“

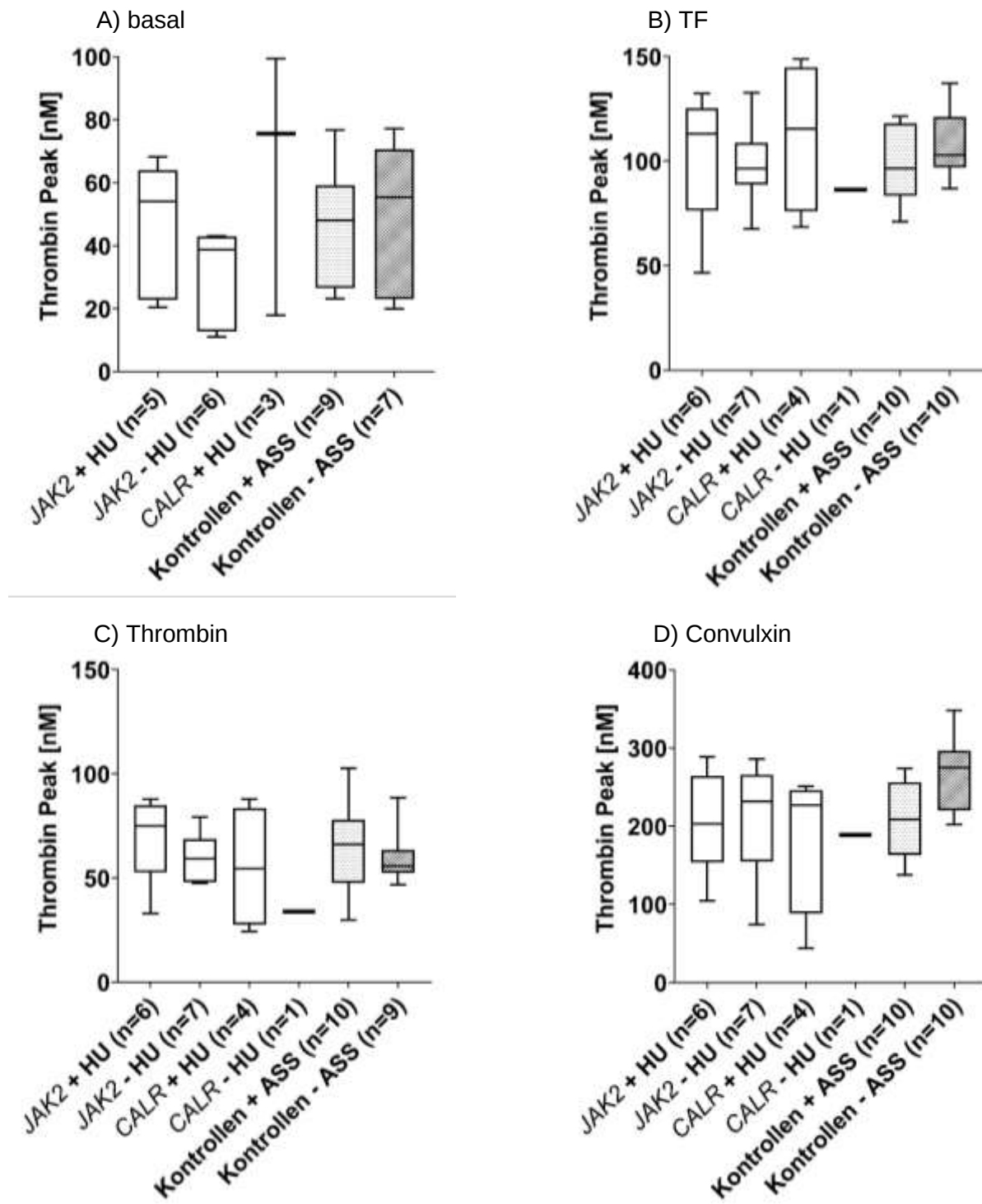
von 113,1 nM im Median und die Thrombozyten der „CALR+HU“-Gruppe im Median 115,6 nM Thrombin. Für die Messungen fielen keine statistischen Tendenzen durch einen p-Wert unter 0,05 in den Gruppenvergleichen auf.

Grafik C zeigt die „Thrombin Peaks“ im PRP unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin. Die Thrombozyten der Kontrollgruppe mit ASS erreichten im Median 66,23 nM Thrombin und die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS einen Median von 55,54 nM Thrombin. Zwischen den Werten der Kontrollen lagen die CALR-positiven Patienten mit HU-Einnahme mit einem medianen thrombozytär erzeugten „Thrombin Peak“ von 54,53 nM und die JAK2-positiven Patienten ohne HU mit einem Median von 59,35 nM Thrombin. Am höchsten war der gebildete „Thrombin Peak“ durch die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten mit HU mit einem Median von 74,95 nM. Am niedrigsten war dagegen der Wert beim CALR-mutierten Patienten ohne HU-Therapie mit 33,93 nM Thrombin. Die Gruppenvergleiche zeigten keine statistischen Auffälligkeiten.

Die Grafik D stellt die „Thrombin Peak“-Ergebnisse im PRP unter Zugabe von 50 ng/ml Convulxin zusammen. Am höchsten lag hier der „Thrombin Peak“ bei der Kontrollgruppe ohne ASS mit einem Median von 275 nM. Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS-Einnahme dagegen erzeugten nur einen medianen „Thrombin Peak“ von 208,6 nM. Es bestand daher eine statistische Auffälligkeit mit $p < 0,05$, welche eine relative ASS-Sensitivität der thrombozytären Thrombinbildung induziert durch Thrombin aufzeigte. Zwischen den medianen Werten der Kontrollgruppen lagen die thrombozytär gebildeten „Thrombin Peaks“ der „JAK2+HU“-Gruppe (Median: 231,9 nM) und der „CALR-HU“-Gruppe (Median: 226,7 nM). Weniger Thrombin als die Kontrollen wurde durch die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten mit HU (Median: 202,9 nM) und des CALR-positiven Patienten ohne HU (189 nM) gebildet. Es konnte ein Unterschied zwischen der „JAK2+HU“-Gruppe und den Kontrollen ohne ASS festgestellt werden ($p = 0,037$). Auch der „Thrombin Peak“-Wert der JAK2-positiven Patienten ohne HU-Einnahme war erniedrigt und zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS eine statistische Tendenz mit einem p-Wert von 0,017.

In Grafik E sind die „Thrombin Peaks“ im PRP unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin dargestellt. Am höchsten lag der thrombozytäre „Thrombin Peak“ bei der Kontrollgruppe ohne ASS mit einem Median von 179 nM. Die Kontrollen mit ASS folgten mit Abstand mit einem medianen thrombozytär erzeugten „Thrombin Peak“ von 114,5 nM. Dieser Abstand war statistisch auffällig ($p < 0,05$) und zeigte eine relative ASS-Sensitivität bezüglich der Thrombin- und Convulxin-stimulierten Thrombinbildung. Weiter unterhalb der Kontrollgruppen lagen die „Thrombin Peak“-Werte der „CALR+HU“-Gruppe mit 102,4 nM (Median), der „JAK2+HU“-Gruppe mit 98,51 nM (Median), sowie der „JAK2-HU“-Gruppe mit 80,95 nM (Median). Den niedrigsten „Thrombin Peak“ erzielten die Thrombozyten des CALR-positiven Patienten ohne HU-Therapie mit 71,85 nM. Die Analyse der „Thrombin Peak“-Werte zeigten bei allen Patientengruppen einen Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe ohne

ASS-Einnahme. Dabei waren die „Thrombin Peaks“ der Patientengruppen deutlich erniedrigt. Der p-Wert der „JAK2+HU“-Gruppe lag bei 0,009 gegenüber den Kontrollen ohne ASS, bei den JAK2-positiven Patienten ohne HU-Einnahme war $p=0,004$ und die CALR-Patienten mit HU-Therapie hatten einen p-Wert von 0,013 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS. Dagegen ergaben sich keine statistischen Unterschiede beim Vergleich der Patienten mit der Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme.



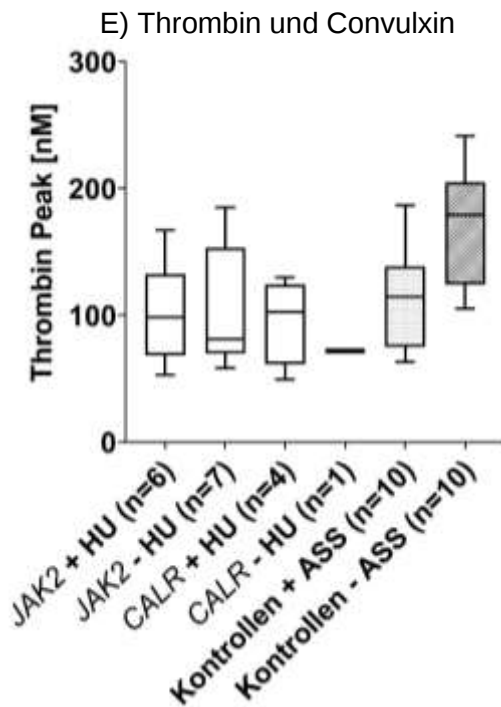


Abbildung 16: „Thrombin Peak“ im PRP, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml), D) unter Zugabe von Convulxin (50 ng/ml), E) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) und Convulxin (50 ng/ml) (PRP = Plättchen-reiches Plasma, pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, nM = Nanomolar)

4.3.3.4 „ETP“

Das „ETP“, das endogene Thrombin Potential, ist die Fläche unterhalb der Thrombin-Kurve und bezeichnet die gebildete Thrombinmenge über einen gewissen Zeitraum. Es ist proportional zur gebildeten Thrombinmenge (75).

Abbildung 17 zeigt das „ETP“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF für die jeweiligen Gruppen. Das Plasma der Kontrollen erreichte die höchsten endogenen Thrombin Potentiale mit einem Median von 1675 nM x min bei den Probanden ohne ASS-Einnahme und einem Median von 1637 nM x min mit ASS-Einnahme. Leicht erniedrigt im Vergleich zu den Kontrollen lagen die Patientengruppen. Das „ETP“ im PFP war für keine der Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen statistisch auffällig.

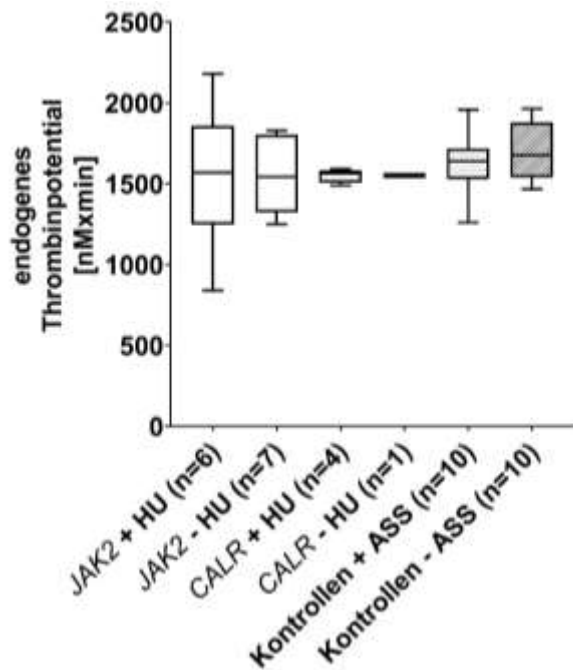


Abbildung 17: „ETP“ im PFP unter Zugabe von 5 pM TF und anionischen Phospholipiden („ETP“ = endogenes Thrombin potential, PFP = Plättchen-freies Plasma, pM = Pikomolar, TF = „Tissue factor“ = Gewebefaktor, *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, nM = Nanomolar, min = Minuten)

In Abbildung 18 sind die „ETP“-Werte im PRP dargestellt. Dabei zeigt Grafik A die „ETP“-Ergebnisse der basalen Thrombinbildung. Die Thrombozyten der Kontrollgruppe ohne ASS erreichte ein medianes „ETP“ von 1216 nM x min und mit ASS 1062 nM x min. Die *JAK2*-positiven Patienten mit HU lagen mit ihrem thrombozytär erzeugten „ETP“ nur wenig unterhalb der Kontrollen mit ASS mit einem Median von 995,9 nM x min. Dagegen fast halbiert war das „ETP“ der Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie mit einem Median von 640,5 nM x min im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme. Nur die „*CALR*+HU“-Gruppe erzeugte mit ihren Thrombozyten ein höheres „ETP“ mit einem Median von 1228 nM x min gegenüber den Kontrollen. Bei der Analyse der Werte fielen erniedrigte Tendenzen in der Gruppe der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie gegenüber den Kontrollen auf (mit ASS: $p=0,027$; ohne ASS: $p=0,0038$). Keine Tendenzen waren dagegen bei den Vergleichen der anderen Patientengruppen mit den Kontrollen anhand der p-Werte zu erkennen.

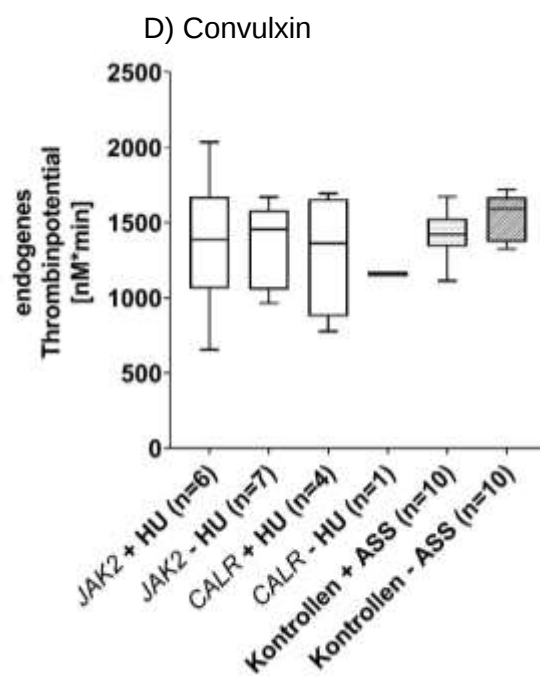
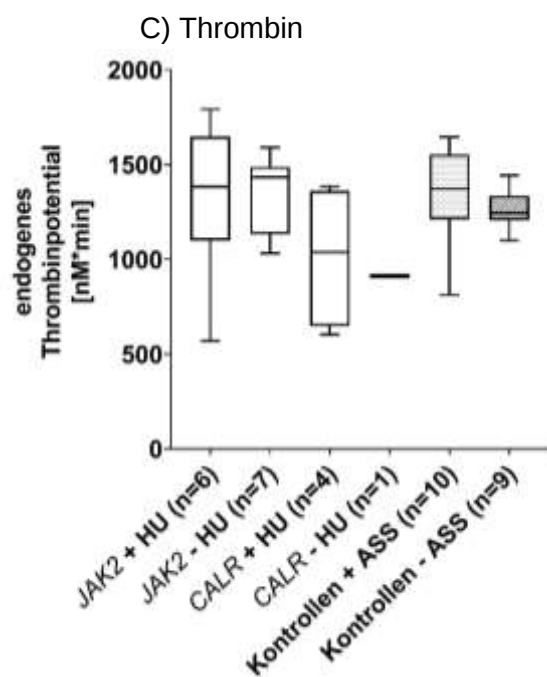
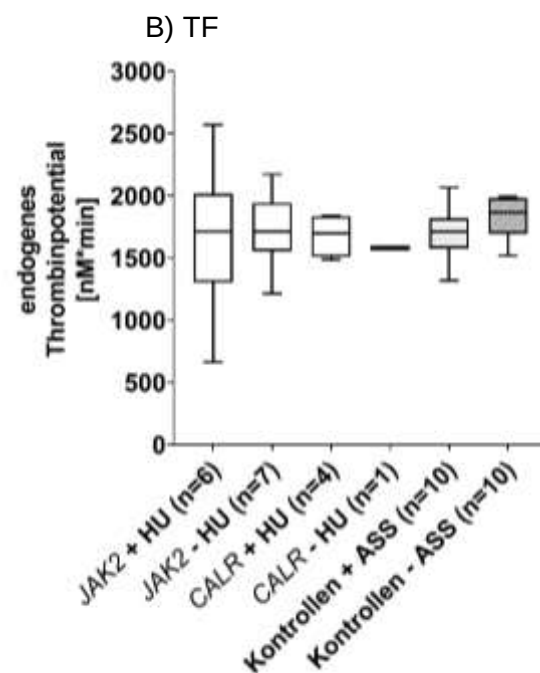
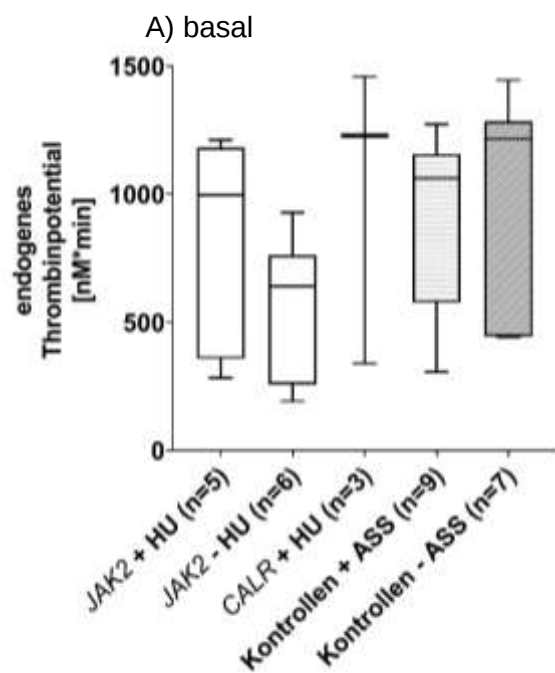
Die Grafik B stellt das „ETP“ im PRP unter Zugabe von TF für Patienten- und Kontrollgruppen dar. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS generierten das höchste „ETP“ mit einem Median von 1864 nM x min. Ähnliche Werte erreichten die Thrombozyten der Kontrollgruppe mit ASS (Median: 1710 nM x min). Auch die *JAK2*-positiven Patienten mit HU (Median: 1713 nM x min) und ohne HU-Einnahme (Median: 1711 nM x min) erzeugten mit ihren

Thrombozyten Werte, die den Kontrollprobanden mit ASS-Einnahme ähnlich waren. Nur wenig darunter lagen die thrombozytär generierten „ETP“-Werte der *CALR*-positiven Patienten mit HU (Median: 1696 nM x min), sowie des *CALR*-mutierten Patienten ohne HU-Therapie (1580 nM x min). Es zeigten sich keine statistischen Auffälligkeiten bei den Gruppenvergleichen.

In Grafik C sind die „ETP“-Ergebnisse im PRP unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin zu sehen. Hier lagen die Kontrollen mit ASS bei 1371 nM x min (Median) und ohne ASS bei 1245 nM x min (Median) thrombozytär erzeugten „ETP“-Werten. Ein höheres „ETP“ generierten die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU mit einem Median von 1433 nM x min. Auch die „*JAK2*+HU“-Gruppe lag mit ihrem thrombozytär gebildeten „ETP“ höher als die Kontrollgruppen (Median: 1383 nM x min). Die beiden „*CALR*“-Gruppen erreichten jeweils mit ihren Thrombozyten ein niedrigeres „ETP“ als die Kontrollen (mit HU: Median von 1037 nM x min, ohne HU: 910,8 nM x min). Auch hier fielen keine statistischen Unterschiede im Gruppenvergleich auf.

Grafik D zeigt das „ETP“ im PRP unter Zugabe von 50 ng/ml Convulxin. Ein hohes „ETP“ erreichten die Thrombozyten der Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme mit einem Median von 1591 nM x min. Darunter lagen die Kontrollen mit ASS mit einem Median von 1422 nM x min. Etwas darunter lag das generierte „ETP“ der Thrombozyten der „*JAK2*+HU“-Gruppe (Median: 1388 nM x min), sowie der „*CALR*+HU“-Gruppe (Median: 1361 nM x min). Die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten dagegen erzeugten ein, im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit ASS, höheres „ETP“ von 1455 nM x min im Median. Am niedrigsten war das „ETP“ der Thrombozyten des *CALR*-positiven Patienten ohne HU-Therapie mit 1160 nM x min). Die Auswertung der Gruppenvergleiche zeigte auch hier keine Tendenzen.

Die Grafik E stellt das „ETP“ im PRP unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin zusammen. Auch hier lag das thrombozytär erzeugte endogene Thrombin Potential am höchsten bei der Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme mit einem Median von 1613 nM x min. Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS erzielten einen Median von 1473 nM x min. Dazwischen lagen die *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie mit ihren thrombozytär gebildeten „ETP“ von 1509 nM x min (Median). Nur wenig unterhalb der ASS-Kontrolle folgten die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU mit einem medianem „ETP“ von 1459 nM x min. Auch die *CALR*-positiven mit HU-Einnahme lagen mit ihren Thrombozyten mit einem Median von 1363 nM x min nur gering unterhalb des „ETP“ der Kontrollgruppe mit ASS. Am niedrigsten war wieder das thrombozytär erzeugte „ETP“ des *CALR*-positiven Patienten ohne HU mit 1134 nM x min. Die Analyse der „ETP“-Werte zeigte jedoch keine statistischen Unterschiede. Alle p-Werte waren größer als 0,05.



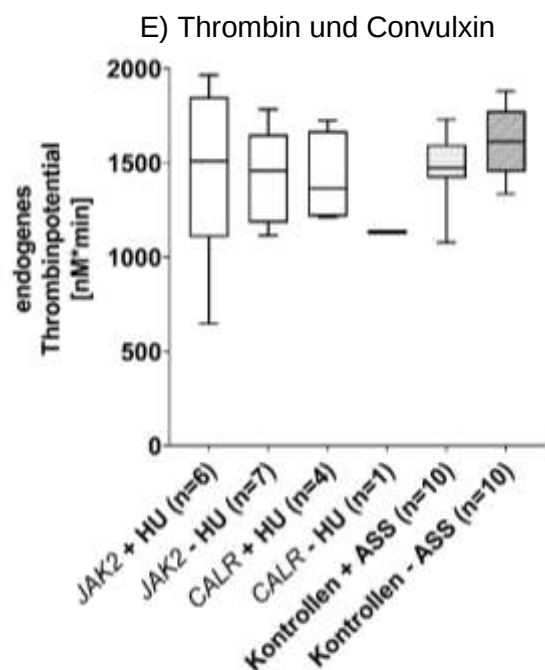


Abbildung 18: „ETP“ im PRP, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml), D) unter Zugabe von Convulxin (50 ng/ml), E) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) und Convulxin (50 ng/ml) („ETP“ = endogenes Thrombin potential, PRP = Plättchen-reiches Plasma, pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, nM = Nanomolar, min = Minuten)

4.3.4 MESSUNG DER THROMBINGENERIERUNG VON ISOLIERTEN THROMBOZYTEN

Eine Übersicht über Median, Minimum und Maximum, sowie 25% und 75% Perzentile und p-Werte der jeweiligen Gruppen und Experimente, findet sich im Anhang unter 8.1.4 und 8.2.4.

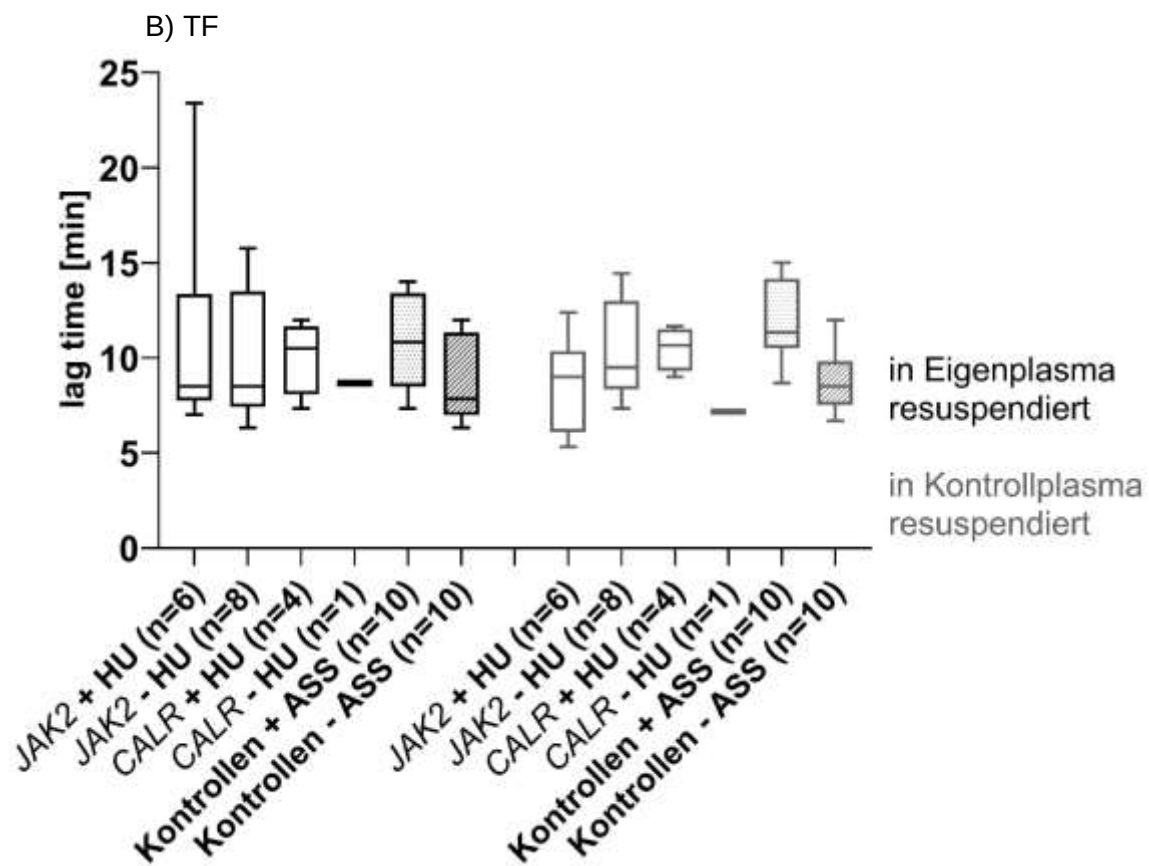
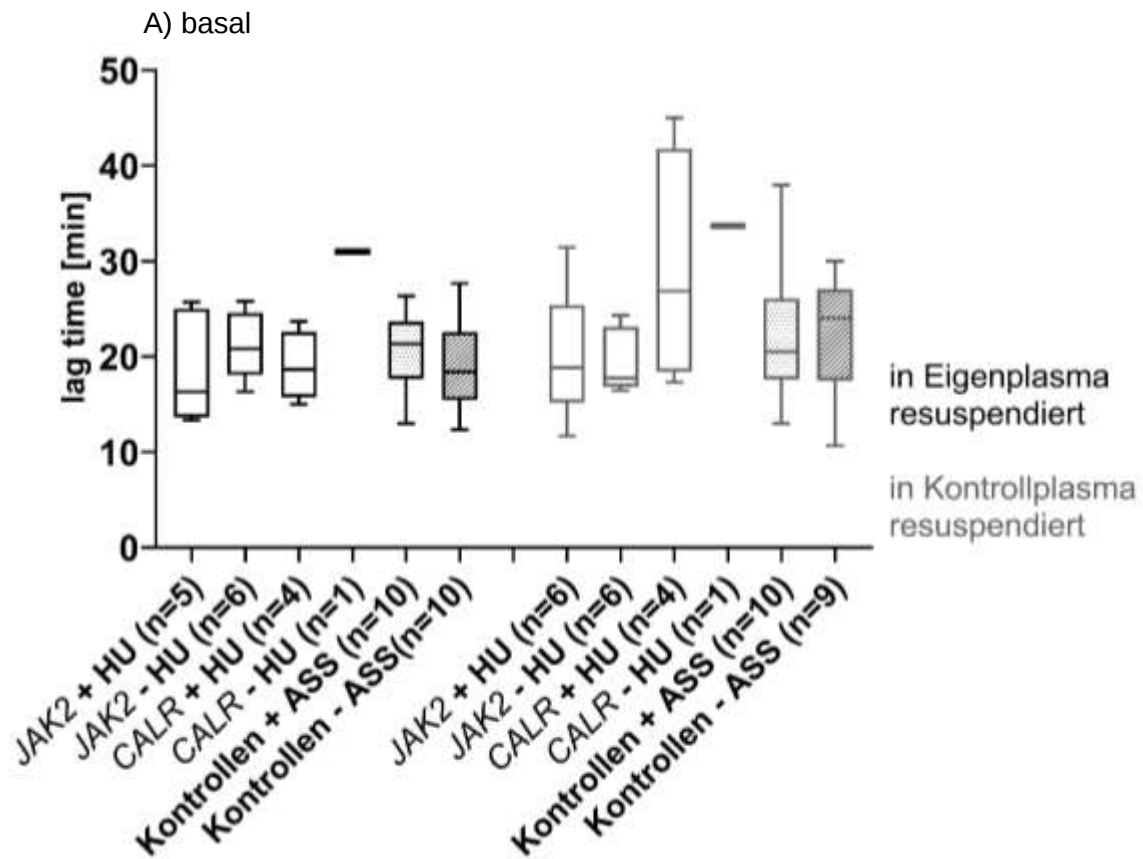
4.3.4.1 „LAG TIME“

Abbildung 19 zeigt die „lag time“ der isolierten Thrombozyten von Patienten und Kontrollen jeweils in Eigenplasma- bzw. im Plasma einer Kontrollperson resuspendiert. Grafik A stellt dabei die „lag time“ der basalen Thrombinbildung dar. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma erreichten eine „lag time“ von 18,42 Minuten (Median). Im Vergleich war die „lag time“ im Kontrollplasma etwas verlängert mit 24 Minuten im Median. Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS waren im Eigenplasma (Median: 21,34 min) und im Kontrollplasma (Median: 20,5 min) etwa gleich schnell. Schneller als die Kontrollen begannen die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten mit HU Thrombin zu bilden mit einer medianen „lag time“ von 16,33 Minuten. Im Kontrollplasma waren sie etwas langsamer mit einem Median von 18,83 Minuten. Ähnlich schnell wie die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS waren die Thrombozyten der „CALR+HU“-Gruppe im Eigenplasma mit einem Median von 18,67 Minuten.

Im Kontrollplasma lag die „lag time“ deutlich höher mit 26,84 Minuten (Median). Entgegengesetzt verhält es sich bei der „JAK2-HU“-Gruppe. Dort war die thrombozytär erreichte „lag time“ im Eigenplasma (Median: 20,83 min) langsamer als im Kontrollplasma (Median: 17,72 min). Am langsamsten waren die Thrombozyten des *CALR*-mutierten Patienten ohne HU-Therapie mit 31 Minuten im Eigenplasma und 33,67 Minuten im Kontrollplasma. Die basale Messung der „lag time“ der isolierten Thrombozyten zeigte nur eine statistische Auffälligkeit bei den *CALR*-positiven Patienten mit HU-Therapie im Kontrollplasma im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma. Die „lag time“ war dabei für die Thrombozyten der Patienten deutlich verlängert und so ergab sich ein p-Wert von 0,042. Die restlichen Gruppenvergleiche blieben ohne erkennbare Tendenz mittels p-Wert.

Grafik B zeigt die „lag time“ unter Zugabe von 1 pM TF. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS hatten dabei eine schnelle „lag time“ sowohl im Eigen- (Median: 7,85 min) als auch im Kontrollplasma (Median: 8,5 min). Die Kontrollen mit ASS-Einnahme lagen mit ihren thrombozytären Reaktionszeit darüber mit einem Median von 10,83 min im Eigenplasma und 11,34 Minuten im Kontrollplasma. Im Eigenplasma hatten „JAK2+HU“-Patienten (Median: 8,5 min), „JAK2-HU“-Patienten (Median: 8,5 min) und der „*CALR*-HU“-Patient (8,67 min) eine ähnliche thrombozytär erzeugte „lag time“ wie die entsprechende Kontrollgruppe ohne ASS. Im Kontrollplasma war die Verzögerungszeit der Thrombozytenreaktion der *JAK2*-positiven Patienten etwas verlängert („JAK2+HU“: Median von 9 min; „JAK2-HU“: Median von 9,5 min). Der *CALR*-positive Patient ohne HU dagegen reagierte mit seinen Thrombozyten schneller im Kontrollplasma mit einer „lag time“ von 7,17 Minuten. Die Thrombozyten der „*CALR*-HU“-Patienten hatten eine langsamere, aber untereinander ähnliche, „lag time“ im Eigenplasma (Median: 10,5 min) sowie im Kontrollplasma (Median: 10,67 min). Auch bei der Auswertung der „lag time“ der isolierten Thrombozyten unter Zugabe von TF zeigte sich nur ein Vergleich auffällig. Die *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie im Kontrollplasma wiesen in diesem Fall eine wesentlich kürzer lag time auf als die Kontrollen mit ASS im Kontrollplasma ($p=0,014$). In Grafik C ist die „lag time“ unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin dargestellt. Die „lag time“ der Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma lag im Median bei 9,5 Minuten und im Kontrollplasma im Median bei 10 Minuten. Unter ASS-Einnahme verlängerte sie sich im Eigenplasma auf 12,17 Minuten (Median) und im Kontrollplasma auf 11,5 Minuten (Median). Die „JAK2+HU“-Gruppe lag mit ihrer thrombozytär erzeugten „lag time“ im Eigenplasma (Median: 11,67 min) und auch im Kontrollplasma (Median: 11,5 min) höher gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe ohne ASS. Auch die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU hatten eine längere „lag time“ im Eigenplasma (Median: 10,67 min), gegenüber den Kontrollprobanden ohne ASS. Sie waren aber schneller im Kontrollplasma (Median: 9,67 min). Die Thrombozyten der *CALR*-positiven Patienten waren im Eigenplasma schneller („*CALR*+HU“: Median von 8,5 min; „*CALR*-HU“: 8,67 min) als im Kontrollplasma („*CALR*+HU“: Median von 9,67 min; „*CALR*-HU“: 10,67 min). Bei der Analyse der „lag time“ der isolierten

Thrombozyten unter Zugabe von Thrombin waren vor allem die Thrombozyten der *CALR*-positiven Patienten mit HU im Eigenplasma auffällig. Ihre „lag time“ war deutlich verkürzt im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS im Eigen- ($p=0,011$) und Kontrollplasma ($p=0,022$), sowie gegenüber den Kontrollen ohne ASS im Kontrollplasma ($p=0,034$). Die anderen Gruppenvergleiche wiesen keine Tendenzen auf.



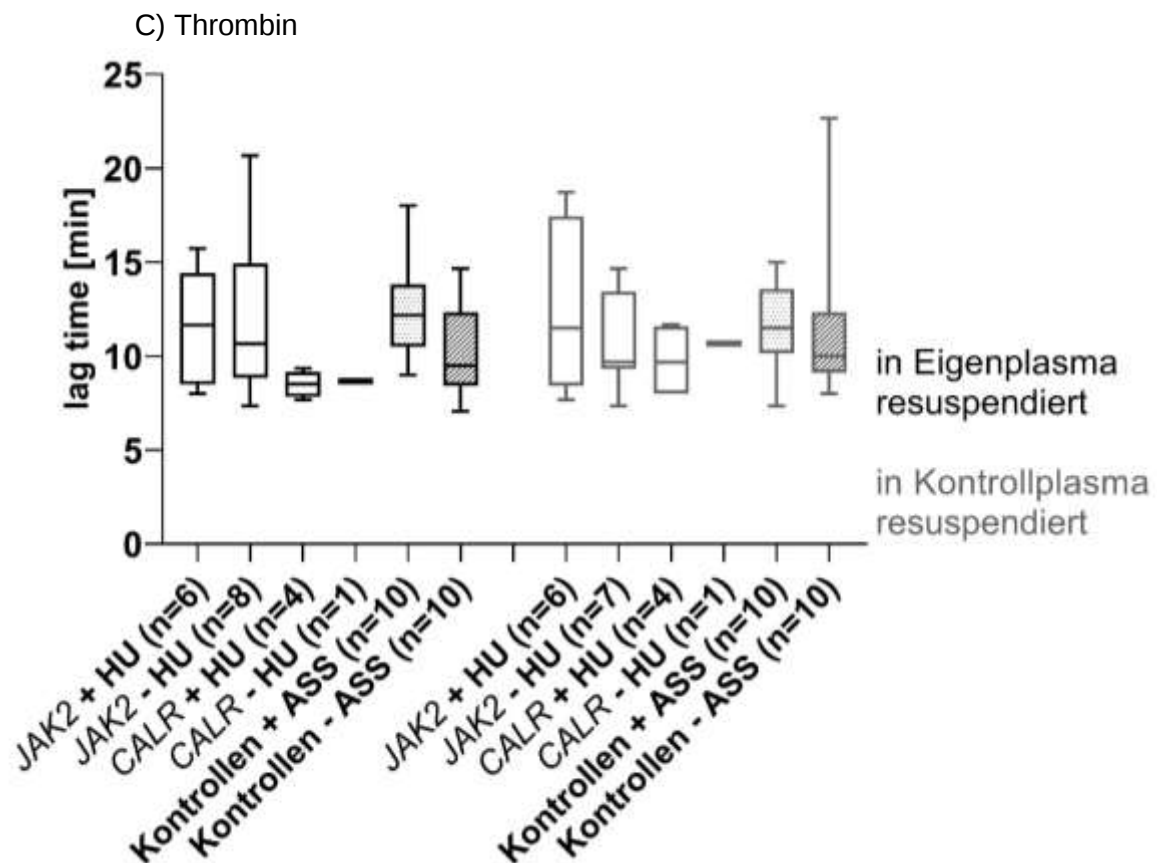


Abbildung 19: „Lag time“ der isolierten Thrombozyten in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, A) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) (pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten)

4.3.4.2 „TTPEAK“

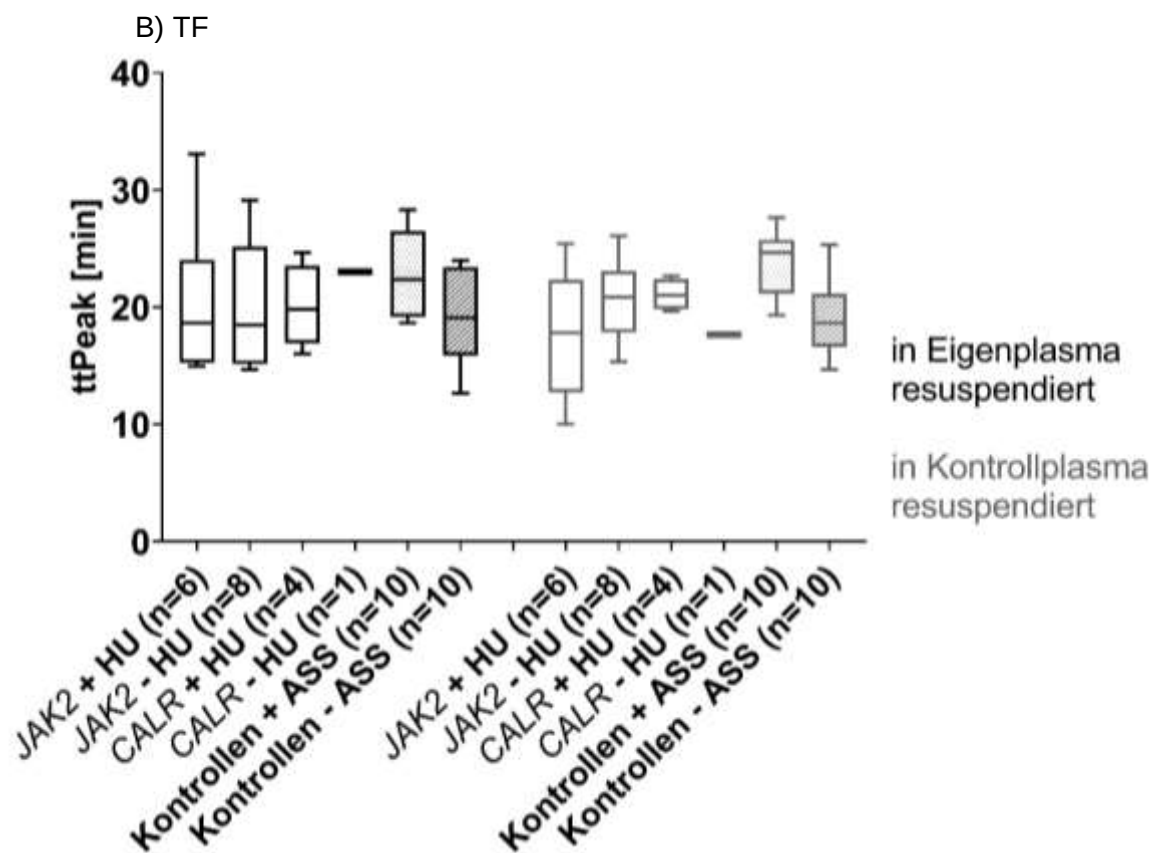
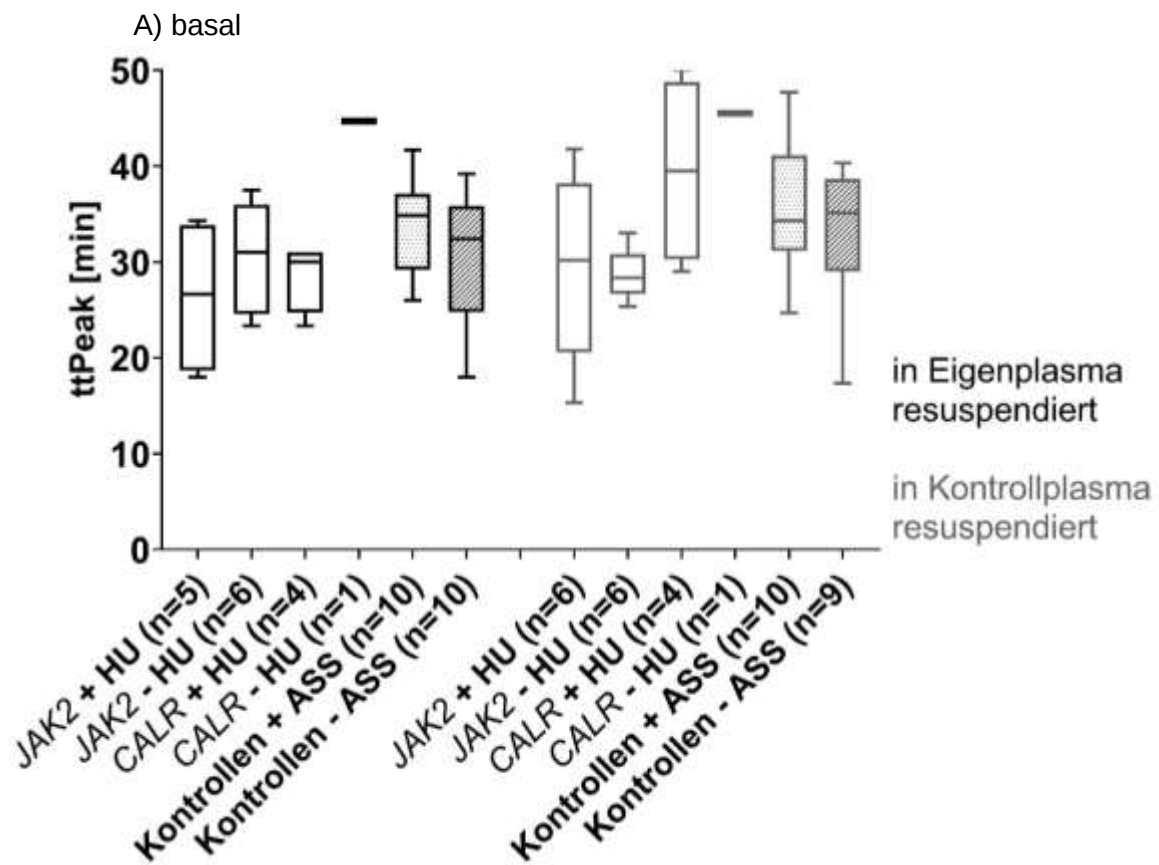
Die Abbildung 20 zeigt die „ttPeak“ der isolierten Thrombozyten resuspendiert in Eigen- bzw. Kontrollplasma. Grafik A stellt dabei die „ttPeak“ der basalen Thrombinbildung dar. Die Thrombozyten der Kontrollen im Eigenplasma ohne ASS erreichten eine ttPeak von 32,42 Minuten (Median). Im Kontrollplasma lag sie höher mit 35,09 Minuten im Median. Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS hatten ähnliche mediane „ttPeak“-Werte von 34,84 Minuten im Eigenplasma und 34,34 Minuten im Kontrollplasma. Die Thrombozyten der „JAK2+HU“-Gruppe sind im Eigenplasma am schnellsten im Erreichen des „Thrombin Peaks“ mit einem Median von 26,67 Minuten. Im Kontrollplasma war die „ttPeak“ immer noch schneller als bei den Kontrollen, aber im Vergleich zum Eigenplasma der Patientengruppe war sie langsamer mit einem Median von 30,17 Minuten. Bei den „JAK2-positiven Patienten ohne HU war die „ttPeak“ der Thrombozyten ebenfalls schneller als bei den Kontrollen mit 31 Minuten (Median). Im Kontrollplasma verkürzte sie sich sogar noch weiter auf 28,34 Minuten (Median). Die Thrombozyten der „CALR+HU“-Patienten hatten im Eigenplasma eine mediane „ttPeak“

von 30 Minuten. Im Kontrollplasma verlängerte diese sich jedoch deutlich auf 39,5 Minuten (Median). Der *CALR*-mutierte Patient hatte eine deutlich verlängerte thrombozytäre „ttPeak“ im Eigen- (44,67 min), wie auch im Kontrollplasma (45,5 min). Die „ttPeak“-Werte der isolierten Thrombozyten ohne Verwendung eines Agonisten zeigte in der Gruppe „*JAK2*+HU“ im Eigenplasma eine verkürzte Zeit bis zum „Thrombin Peak“ gegenüber den Kontrollen mit ASS-Einnahme im Eigen- ($p=0,034$), wie auch im Kontrollplasma ($p=0,036$). Bei den Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU zeigte sich dagegen eine auffällig verlängerte „ttPeak“ im Kontrollplasma im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS im Eigen- ($p=0,031$) und Kontrollplasma ($p=0,04$). Ansonsten waren keine Tendenzen erkennbar.

Grafik B zeigt die „ttPeak“ unter Zugabe von 1 pM TF. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS lagen im Median im Eigenplasma bei einer medianen „ttPeak“ von 19,09 Minuten und im Kontrollplasma bei 18,67 Minuten. Etwas verlängert war die „ttPeak“ bei den Thrombozyten der Kontrollen mit ASS-Einnahme auf Median 22,34 Minuten im Eigenplasma und 24,67 Minuten im Kontrollplasma. Eine ähnliche „ttPeak“, wie die Kontrollgruppe ohne ASS, erreichten die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie im Eigenplasma (Median: 18,67 min). Im Kontrollplasma waren sie sogar noch etwas schneller mit 17,84 Minuten (Median). Auch die „*JAK2*-HU“-Patienten lagen im Eigenplasma mit ihrer thrombozytär erzeugten „ttPeak“ nah an der entsprechenden Kontrollgruppe ohne ASS mit 18,5 Minuten (Median). Im Kontrollplasma verlängerte sich diese auf 20,83 Minuten (Median). Die *CALR*-positiven Patienten mit HU-Einnahme hatten nur eine leicht verlängerte thrombozytäre „ttPeak“ von 19,84 Minuten (Median) im Eigenplasma und 21 Minuten (Median) im Kontrollplasma. Dagegen war die „ttPeak“ der Thrombozyten des *CALR*-positiven Patienten ohne HU-Therapie im Eigenplasma verlängert, im Vergleich zu den restlichen Patientengruppen sowie der Kontrollgruppe ohne ASS, auf 23 Minuten und im Kontrollplasma deutlich verkürzt auf 17,67 Minuten. Die Analyse der „ttPeak“ der isolierten Thrombozyten ergab eine schnellere „ttPeak“ der Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten mit HU im Kontrollplasma gegenüber den Kontrollen mit ASS im Eigen- ($p=0,035$) und Kontrollplasma ($p=0,009$). Auch die „*CALR*+HU“-Gruppe im Kontrollplasma wies eine schnellere thrombozytäre „ttPeak“ auf, als die Kontrollen mit ASS im Kontrollplasma ($p=0,045$). Weitere statistischen Unterschiede waren nicht zu finden.

In Grafik C sind die „ttPeak“-Werte unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin zusammengestellt. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS lagen im Median im Eigenplasma bei 21,84 Minuten und im Kontrollplasma bei 22,67 Minuten. Unter ASS-Einnahme verlängerte sich die thrombozytär generierte „ttPeak“ der Kontrollen auf 26 Minuten (Median) im Eigenplasma und auf 26,67 Minuten (Median) im Kontrollplasma. Die Patienten mit *JAK2*-Mutation und HU-Therapie erreichten mit ihren Thrombozyten den „Thrombin Peak“ nach einer längeren Zeit von 23,17 Minuten (Median) im Eigenplasma und 23,84 Minuten (Median) im Kontrollplasma. Auch die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU hatten eine längere mediane

„ttPeak“ von 24,56 Minuten im Eigenplasma, aber eine kürzere im Kontrollplasma mit einem Median von 22,33 Minuten. Auch der *CALR*-mutierte Patient ohne HU hatte im Eigenplasma eine verlängerte thrombozytäre „ttPeak“ von 31 Minuten. Diese verkürzte sich jedoch im Kontrollplasma (24,67 min). Nur die „*CALR*+HU“-Gruppe lag im Median unterhalb der Kontrollen mit 19,83 Minuten im Eigenplasma und 21,33 Minuten im Kontrollplasma. Im Vergleich der „ttPeak“ der isolierten Thrombozyten fiel die kürzere „ttPeak“ der *CALR*-mutierten Patienten mit HU-Einnahme im Eigenplasma gegenüber den Kontrollen mit und ohne ASS-Einnahme mit einem p-Wert unter 0,05 auf. Ausnahme bildet der Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma. Die restlichen Gruppenvergleiche zeigten keine statistischen Unterschiede.



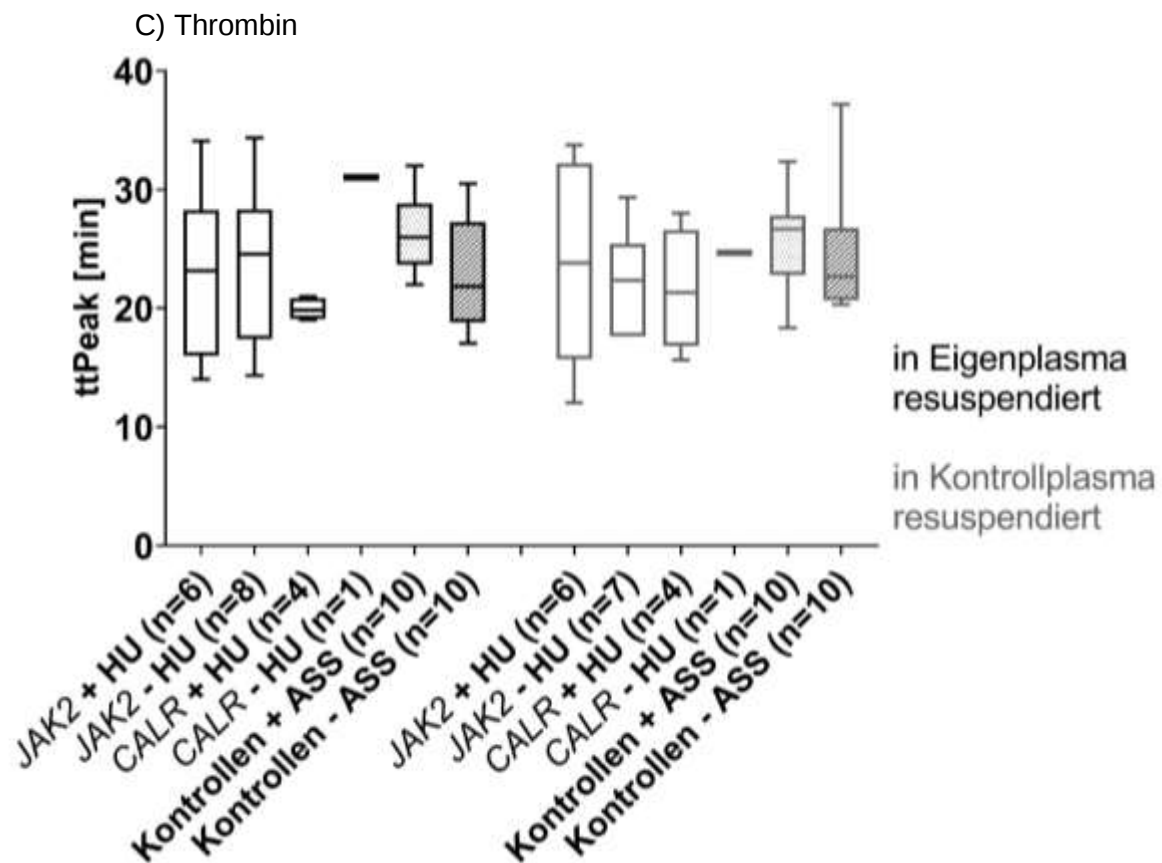


Abbildung 20: „ttPeak“ der isolierte Thrombozyten in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, A) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) („ttPeak“ = „time to Peak“ = Zeit bis zum Peak, pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten)

4.3.4.3 „THROMBIN PEAK“

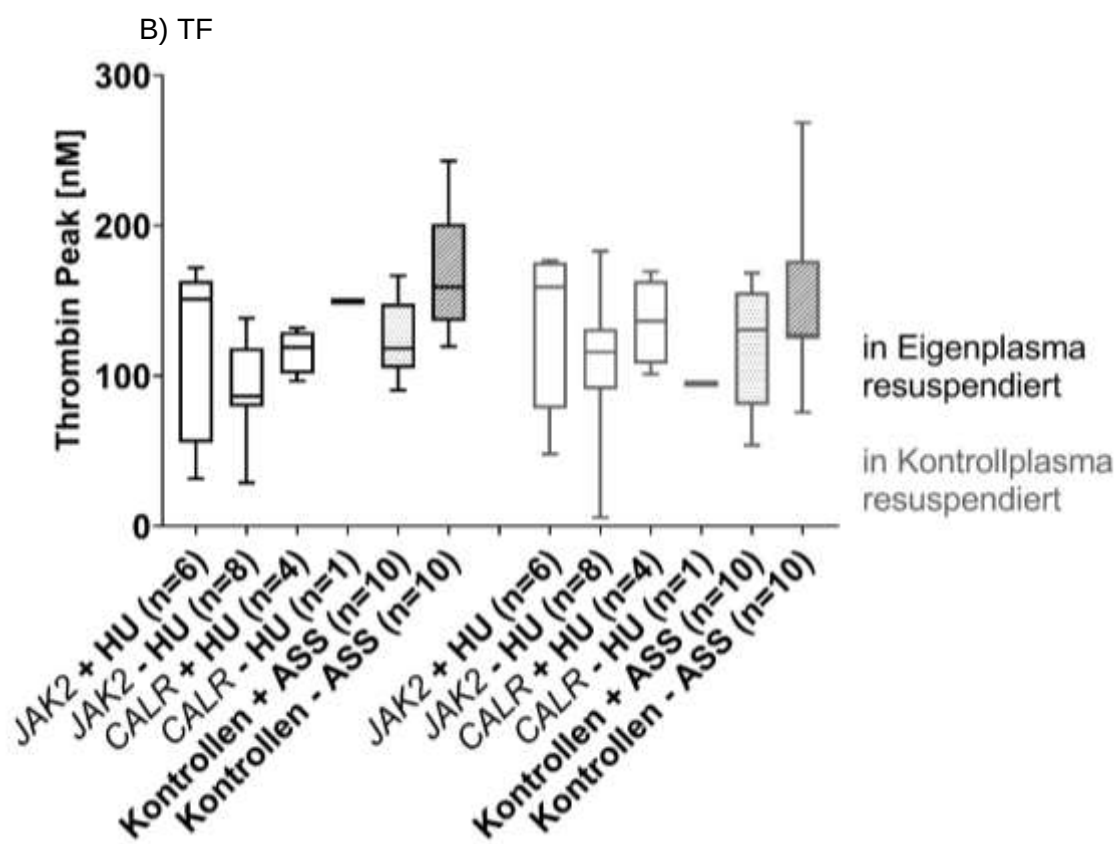
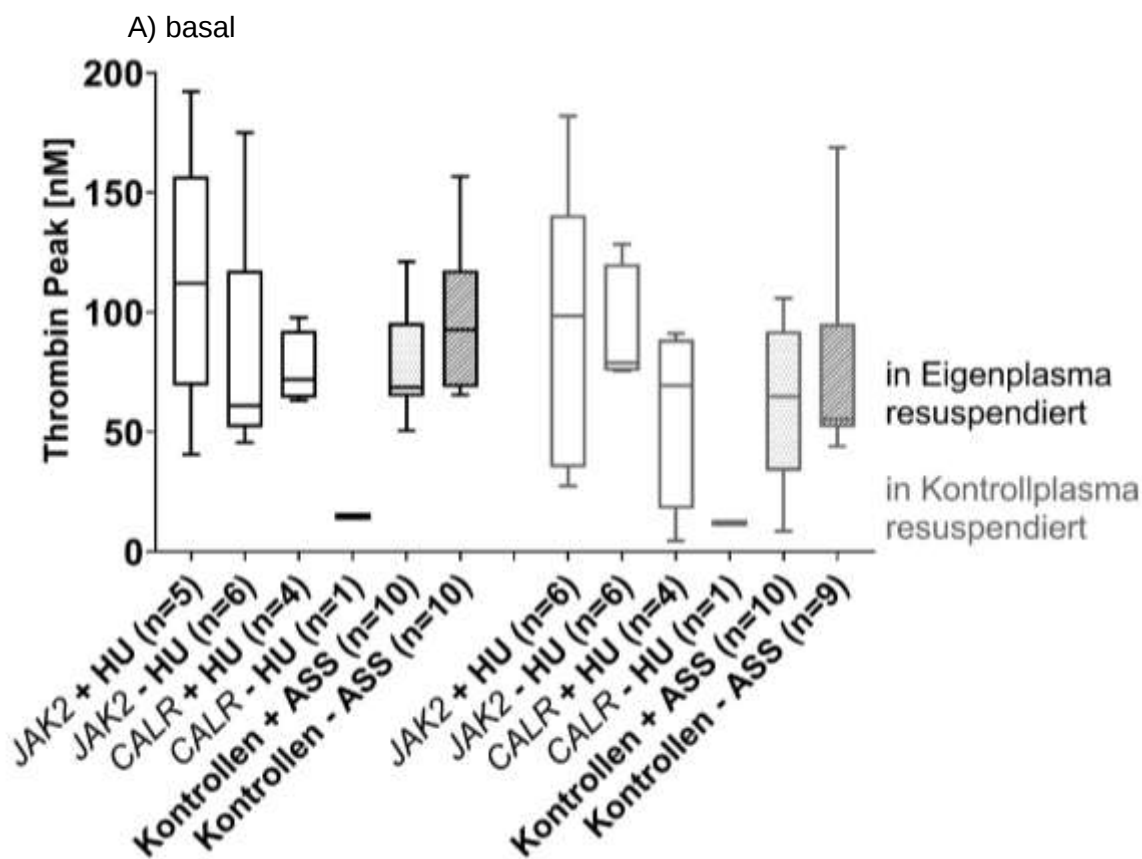
Abbildung 21 zeigt den „Thrombin Peak“ der isolierten Thrombozyten resuspendiert im jeweiligen Eigen- oder Kontrollplasma. Grafik A stellt dabei die „Thrombin Peak“-Werte der basalen Thrombinbildung dar. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS-Einnahme erreichten einen „Thrombin Peak“ im Eigenplasma von 92,72 nM (Median). Im Kontrollplasma lag der Median deutlich niedriger bei 55,28 nM. Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS erreichten ebenfalls einen niedrigeren „Thrombin Peak“. Jedoch sind die Mediane im Eigen- (68,6 nM) und Kontrollplasma (64,74 nM) ähnlich. Am höchsten war der „Thrombin Peak“ in der „JAK2+HU“-Gruppe im Eigenplasma (Median: 112,2 nM). Aber auch im Kontrollplasma war der Median mit 98,38 nM hoch. Niedriger dagegen war der thrombozytär erzeugte „Thrombin Peak“ der „JAK2-HU“-Gruppe im Eigenplasma (Median: 60,92 nM). Er stieg auf 78,91 nM (Median) im Kontrollplasma. Auch der mediane „Thrombin Peak“ der Thrombozyten der „CALR+HU“-Gruppe lag im Eigenplasma unterhalb der Kontrollen mit 71,89 nM und 69,48

nM im Kontrollplasma. Am niedrigsten war der „Thrombin Peak“ jedoch bei den Thrombozyten des *CALR*-positiven Patienten ohne HU-Einnahme. Er betrug nur 14,72 nM im Eigen- und 12,02 nM im Kontrollplasma. Die basale Messung der „Thrombin Peak“-Werte der isolierten Thrombozyten zeigte lediglich einen deutlich erhöhten Wert bei den *JAK2*-positiven Patienten mit HU im Eigenplasma gegenüber den Kontrollen mit ASS-Einnahme im Kontrollplasma ($p=0,038$). Alle weiteren Vergleiche der Gruppen ergaben keine Tendenzen.

In Grafik B sind die „Thrombin Peaks“ unter Zugabe von 1 pM TF zu sehen. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS erreichten einen Median von 159,2 nM im Eigenplasma. Im Kontrollplasma lag der Median deutlich niedriger bei 127,4 nM. Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS-Einnahme lagen mit ihren „Thrombin Peaks“ ebenfalls wesentlich niedriger. Im Eigenplasma betrug er im Median 118,1 nM und im Kontrollplasma etwas mehr mit einem Median von 130,5 nM. Die *JAK2*-mutierten Patienten mit HU-Einnahme erreichten wieder mit Ihren Thrombozyten hohe „Thrombin-Peak“-Werte im Eigen- (Median: 151,2 nM) und auch im Kontrollplasma (Median: 159 nM). Die *JAK2*-positiven Patienten ohne HU dagegen hatten nur einen thrombozytären „Thrombin Peak“ von 86,48 nM (Median) im Eigenplasma. Im Kontrollplasma lag der mediane „Thrombin Peak“ deutlich höher bei 115,8 nM. Die „*CALR*+HU“-Gruppe hatte mit ihren Thrombozyten einen medianen „Thrombin Peak“ im Eigenplasma von 118,9 nM. Dieser stieg im Kontrollplasma auf 136,4 nM. Einen ebenfalls hohen Peak generierten die Thrombozyten des *CALR*-mutierten Patienten ohne HU-Therapie im Eigenplasma (149,5 nM). Jedoch war der „Thrombin Peak“ deutlich reduziert im Kontrollplasma (94,6 nM). Die Ergebnisse der „Thrombin Peaks“ der isolierten Thrombozyten zeigten bei den *JAK2*-positiven Patienten ohne HU im Eigenplasma einen niedrigeren Wert gegenüber den Kontrollen mit ASS im Eigenplasma ($p=0,026$), sowie im Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS im Eigen- ($p=0,0005$) und Kontrollplasma ($p=0,016$). In der gleichen Patientengruppe jedoch im Kontrollplasma war der „Thrombin Peak“ nur gegenüber den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma auffällig niedriger ($p=0,014$). Ein weiterer statistisch auffälliger Vergleich ergab sich aus dem niedrigeren „Thrombin Peak“ der „*CALR*+HU“-Gruppe im Eigenplasma gegenüber den Kontrollen ohne ASS-Einnahme im Eigenplasma mit einem p -Wert von 0,035.

Grafik C zeigt die „Thrombin Peak“-Werte unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS erreichten unter diesen Bedingungen einen medianen „Thrombin Peak“ von 93,98 nM. Im Kontrollplasma lag der Median deutlich niedriger bei 65,16 nM. Auch die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS erreichten nur einen Median von 71,94 nM im Eigenplasma und 73,6 nM im Kontrollplasma. Auch unter Verwendung von Thrombin generierten die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie den höchsten „Thrombin Peak“ im Eigenplasma (Median: 98,83 nM) sowie im Kontrollplasma (Median: 95,78 nM). Die *JAK2*-Patienten ohne HU lagen mit ihrem thrombozytär erzeugten „Thrombin Peak“ mit 61,45 nM (Median) im Eigenplasma deutlich unter den Kontrollen. Im Kontrollplasma stieg

der thrombozytäre „Thrombin Peak“ auf 71,9 nM (Median). Auch die Thrombozyten der „CALR+HU“-Gruppe lagen im Median nur bei 66,59 nM im Eigenplasma und 60,69 nM im Kontrollplasma. Am niedrigsten waren die „Thrombin Peaks“ der Thrombozyten des CALR-mutierten Patienten ohne HU-Einnahme. Im Eigenplasma lag er bei 41,42 nM, im Kontrollplasma sogar nur bei 32,87 nM. Beim Vergleich der „Thrombin Peak“-Werte der isolierten Thrombozyten zeigte sich nur für die JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie im Eigenplasma ein deutlich erniedrigter Wert gegenüber den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma ($p=0,021$).



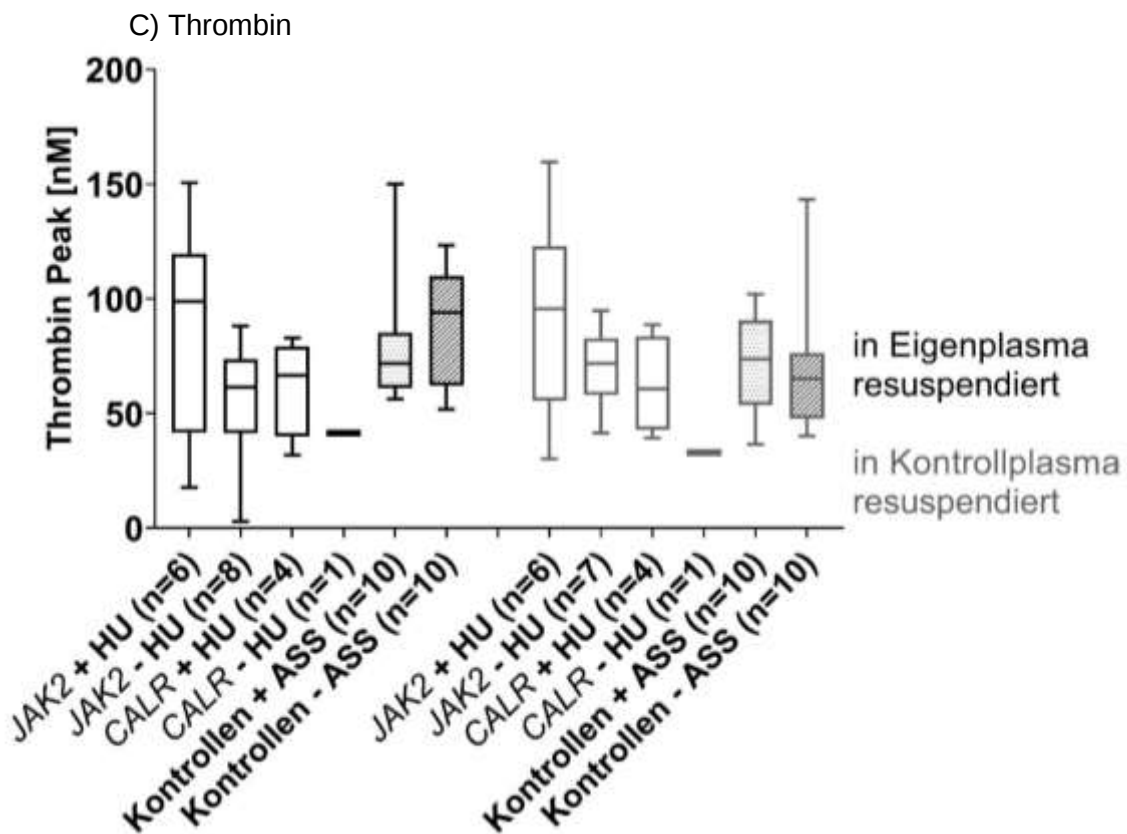


Abbildung 21: „Thrombin Peak“ der isolierten Thrombozyten in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, A) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) (pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, nM = Nanomolar)

4.3.4.4 „ETP“

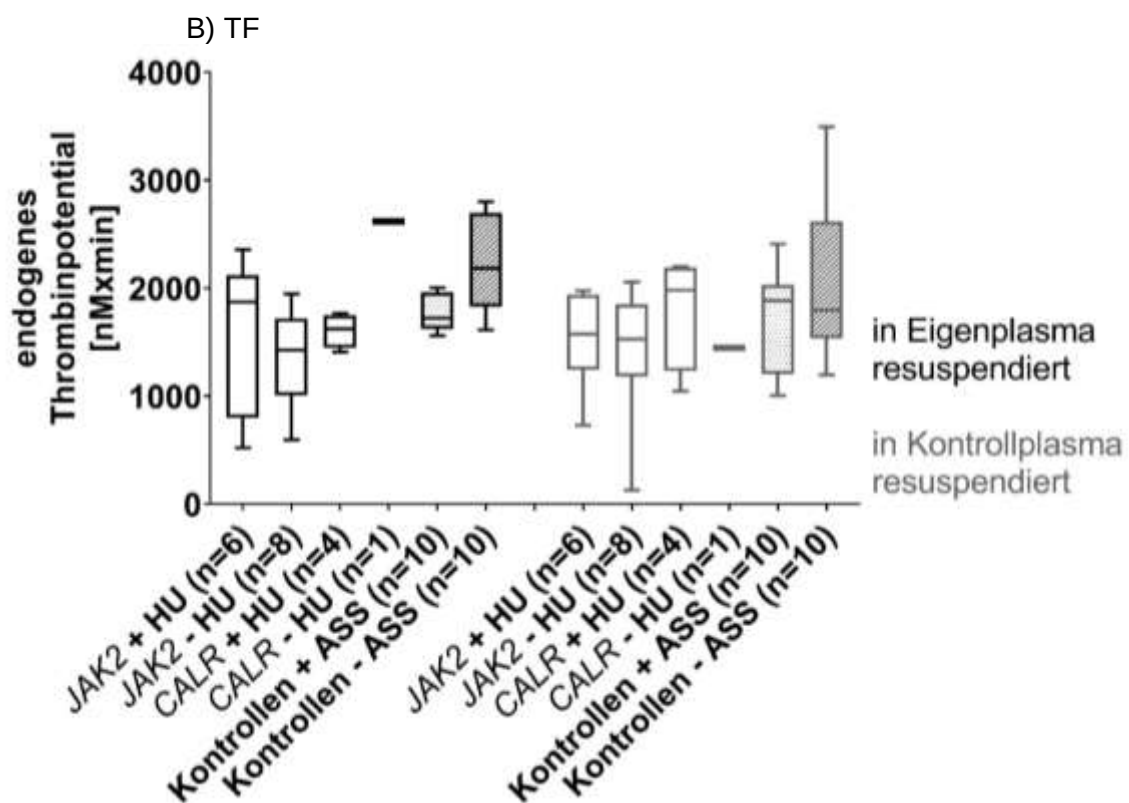
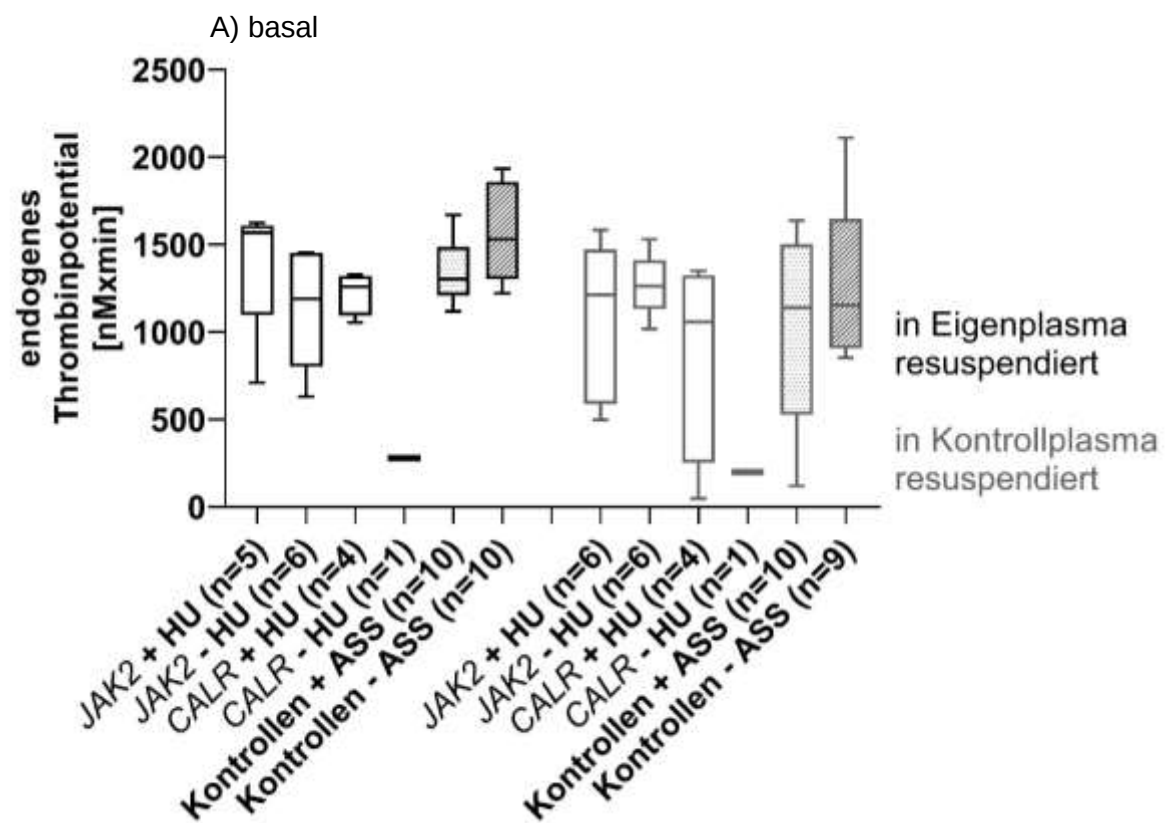
Die Abbildung 22 zeigt das „ETP“ der isolierten Thrombozyten resuspendiert in Eigen- bzw. Kontrollplasma. In Grafik A ist dabei das „ETP“ der basalen Thrombinbildung dargestellt. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS erreichten ein medianes „ETP“ von 1531 nM x min im Eigenplasma. Im Kontrollplasma lag es deutlich niedriger mit 1152 nM x min. Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS erzeugten auch ein niedrigeres „ETP“ (Eigenplasma: Median von 1302 nM x min; Kontrollplasma: Median von 1139 nM x min). Die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten mit HU generierten im Eigenplasma sogar ein etwas höheres „ETP“ als die Kontrollen mit einem Median von 1568 nM x min. Im Kontrollplasma lag der Median niedriger (1213 nM x min). Die „JAK2-HU“-Gruppe erreichte ein thrombozytäres „ETP“ von 1190 nM x min (Median) im Eigenplasma und ein etwas Höheres von 1260 nM x min (Median) im Kontrollplasma. Auch die CALR-positiven Patienten mit HU lagen mit ihren Thrombozyten im Eigenplasma unterhalb der Kontrollen ohne ASS mit einem medianen „ETP“ von 1259 nM x min. Im Kontrollplasma sank das „ETP“ noch weiter auf 1055 nM x min. Das geringste ETP generierten die Thrombozyten des CALR-mutierten Patienten ohne HU-

Einnahme im Eigen- (278,6 nM x min) wie auch im Kontrollplasma (198,8 nM x min). Das basale „ETP“ der isolierten Thrombozyten war deutlich erniedrigt bei den JAK2-positiven Patienten ohne HU im Eigenplasma gegenüber den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma ($p=0,015$) wie auch im Kontrollplasma der Patientengruppe ($p=0,038$). Gleiches galt für die „CALR+HU“-Gruppe im Eigen- ($p=0,041$) wie auch Kontrollplasma ($p=0,011$) gegenüber den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma. Jedoch bestand auch ein Unterschied durch ein niedriges „ETP“ im Kontrollplasma der „CALR+HU“-Gruppe gegenüber den Kontrollen mit ASS im Eigenplasma ($p=0,04$). Bei den JAK2-positiven Patienten mit HU zeigte sich nur eine statistische Auffälligkeit im Kontrollplasma im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma ($p=0,021$).

Grafik B zeigt das „ETP“ unter Zugabe von 1 pM TF. Die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS-Einnahme generierten ein medianes „ETP“ von 2181 nM x min im Eigenplasma und ein niedrigeres im Kontrollplasma von 1797 nM x min. Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS lagen bei einem Median von 1720 nM x min im Eigenplasma und 1882 nM x min im Kontrollplasma. Die „JAK2+HU“-Gruppe erreichte mit ihren Thrombozyten einen Median von 1872 nM x min im Eigenplasma und einen niedrigeren Median im Kontrollplasma (1573 nM x min). Die JAK2-positiven Patienten ohne HU erreichten nur ein thrombozytäres „ETP“ von 1429 nM x min (Median) im Eigenplasma. Im Kontrollplasma lag es etwas höher bei 1527 nM x min (Median). Auch die Thrombozyten der CALR-positiven Patienten mit HU lagen mit ihrem Median unter den Kontrollen im Eigenplasma (1622 nM x min). Dagegen war das „ETP“ im Kontrollplasma wesentlich höher (Median: 1980 nM x min). Einen starken Kontrast gab es beim CALR-mutierten Patienten ohne HU-Therapie. Seine Thrombozyten generierten ein „ETP“ von 2616 nM x min im Eigenplasma, jedoch nur 1446 nM x min im Kontrollplasma. Die Analyse der „ETPs“ der isolierten Thrombozyten ergaben niedrigere Werte für die JAK2-positiven Patienten mit HU im Eigen- ($p=0,038$) wie auch Kontrollplasma ($p=0,008$) gegenüber den Kontrollen ohne ASS-Einnahme im Eigenplasma. In der Gruppe „JAK2-HU“ zeigten sich die niedrigen „ETP“-Werte im Eigenplasma beim Vergleich mit den Kontrollen mit ASS im Eigenplasma ($p=0,019$), so wie auch gegenüber den Kontrollen ohne ASS im Eigen- ($p=0,001$) und Kontrollplasma ($p=0,04$). Auch im Vergleich im Kontrollplasma mit den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma ($p=0,003$) zeigte sich eine Tendenz. Bei den CALR-positiven Patienten mit HU fiel der Unterschied nur im Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS jeweils im Eigenplasma ($p=0,016$) auf.

In Grafik C ist das „ETP“ unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin zusammengestellt. Die Kontrollgruppe ohne ASS hatte dabei ein thrombozytär gebildetes „ETP“ von 1564 nM x min (Median) im Eigenplasma. Deutlich niedriger ist das thrombozytäre „ETP“ im Kontrollplasma mit 1181 nM x min (Median). Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS erreichten einen Median von 1353 nM x min im Eigen- und 1424 nM x min im Kontrollplasma. Die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten mit HU erreichten im Eigenplasma das höchste mediane „ETP“

aller Patientengruppen mit 1456 nM x min. Im Kontrollplasma lag es bei einem Median von 1261 nM x min. Die „JAK2-HU“-Gruppe generierte mit ihren Thrombozyten einen Median von 1165 nM x min im Eigenplasma und ein etwas niedrigeres „ETP“ im Kontrollplasma mit einem Median von 1086 nM x min. Ähnlich war das thrombozytäre „ETP“ der „CALR+HU“-Gruppe im Eigenplasma mit einem Median von 1098 nM x min. Im Kontrollplasma lag es etwas höher mit einem Median von 1174 nM x min. Auch die Thrombozyten des CALR-positiven Patienten ohne HU lagen mit ihrem „ETP“ unterhalb der Kontrollen. Dabei war das „ETP“ im Eigenplasma (1261 nM x min) wesentlich höher als im Kontrollplasma (776,4 nM x min). Bei der Messung des „ETP“ der isolierten Thrombozyten fielen die niedrigeren Werte bei den JAK2-positiven Patienten ohne HU im Eigenplasma gegenüber den Kontrollen mit ASS im Eigenplasma ($p=0,006$) und ohne ASS im Eigenplasma ($p=0,009$) auf. Diese ergaben sich auch im Kontrollplasma dieser Patientengruppe mit einem p-Wert von 0,035 im Vergleich mit den Kontrollen mit ASS im Eigenplasma und 0,016 im Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma. Auch die Thrombozyten der CALR-mutierten Patienten mit HU im Eigenplasma wiesen ein deutlich erniedrigtes „ETP“ gegenüber den Kontrollen mit ASS im Eigenplasma ($p=0,02$) und den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma ($p=0,025$) auf.



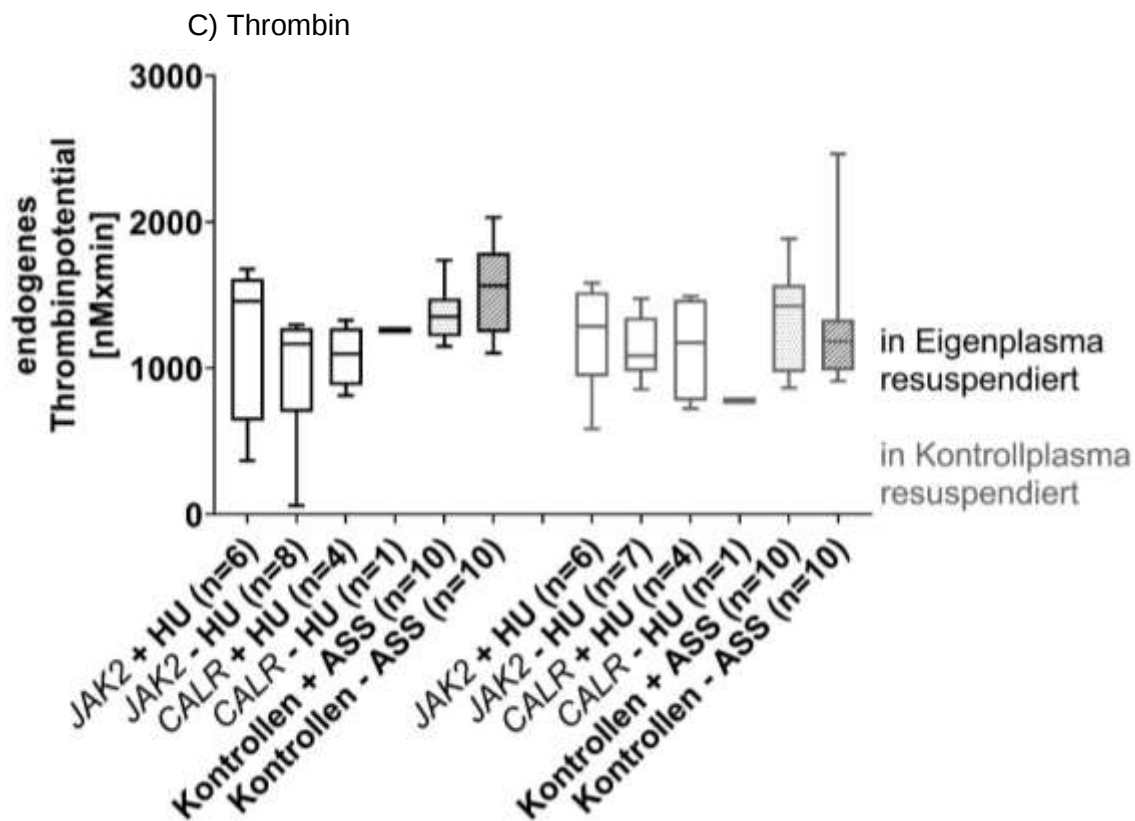


Abbildung 22: „ETP“ der isolierten Thrombozyten in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, A) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) („ETP“ = endogenes Thrombin Potential, pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, nM = Nanomolar, min = Minuten)

4.3.5 MESSUNG DER THROMBINGENERIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN

Eine Übersicht über Median, Minimum und Maximum, sowie 25% und 75% Perzentile und p-Werte der jeweiligen Gruppen und Experimente, findet sich im Anhang unter 8.1.5 und 8.2.5.

4.3.5.1 „LAG TIME“

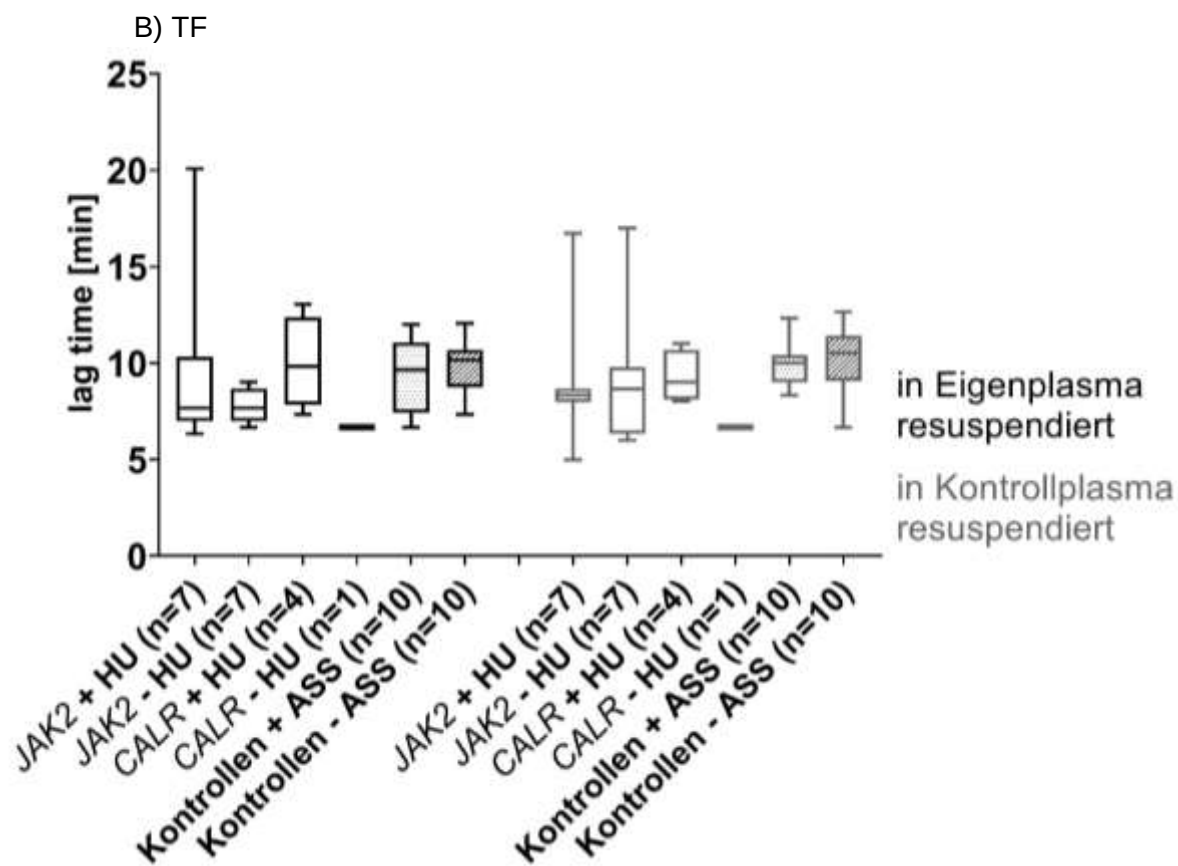
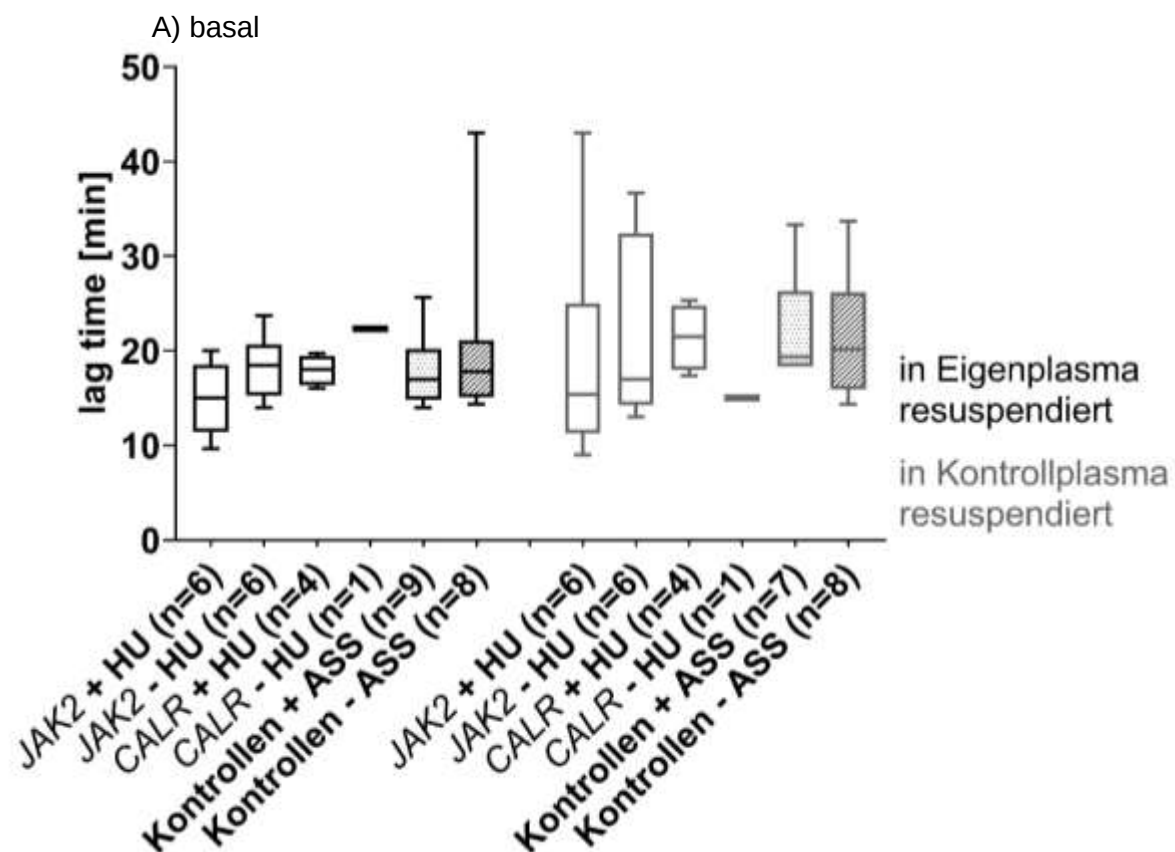
Abbildung 23 zeigt die „lag time“ der mononukleären Zellen (MNC) jeweils in Eigen- bzw. Kontrollplasma resuspendiert. Grafik A stellt dabei die basale Thrombinbildung dar. Die MNC der Kontrollen im Eigenplasma wiesen eine ähnliche „lag time“ auf (mit ASS: Median von 17 min; ohne ASS: Median von 17,84 min). Langsamer aber auch ähnlich verhielt sich die „lag time“ der MNC der Kontrollen im Kontrollplasma (mit ASS: Median von 19,33 min; ohne ASS: Median von 20,17 min). Die MNC der „JAK2+HU“-Gruppen hatten eine fast gleiche „lag time“ für die verschiedenen Plasmen (Eigenplasma: Median von 15 min; Kontrollplasma: Median von 15,34 min) und waren damit schneller als die Kontrollen. Die Gruppe der JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie lagen mit ihren MNC im Eigenplasma oberhalb der entsprechenden Kontrollen mit 18,5 Minuten (Median) und im Kontrollplasma unterhalb der

entsprechenden Kontrollen, sowie in Bezug auf das Ergebnis des Eigenplasmas mit 17 Minuten (Median). Bei der „CALR+HU“-Gruppe war die „lag time“ der MNC im Eigenplasma mit 18,02 Minuten (Median) langsamer als die entsprechenden Kontrollen. Auch im Kontrollplasma lag die gemessene „lag time“ der MNC oberhalb der entsprechenden Kontrollen mit einem Median von 21,53 Minuten. Im Vergleich zur „lag time“ im Eigenplasma der Patientengruppe war diese deutlich verlängert. Beim Patienten mit CALR-Mutation und ohne HU-Einnahme verhielt es sich komplett entgegengesetzt. Im Eigenplasma war die „lag time“ der MNC deutlich länger als bei den Kontrollen mit 22,33 Minuten. Dagegen war die „lag time“ im Kontrollplasma kürzer als die der Kontrollen, wie auch im autologen Plasma mit 15 Minuten. Bei der Analyse der „lag time“ der MNC unter basalen Bedingungen zeigten sich Tendenzen in der Gruppe „JAK2+HU“ im Eigenplasma im Vergleich zu den Kontrollen im Kontrollplasma (mit ASS: $p=0,016$; ohne ASS: $p=0,048$). Dabei war die „lag time“ der MNC der Patientengruppe deutlich schneller. Die Vergleiche der restlichen Patientengruppen mit den Kontrollgruppen zeigten keine statistischen Unterschiede.

Grafik B zeigt die „lag time“ der MNC unter Zugabe von 1 pM TF. Die MNC der Kontrollen erreichten eine ähnliche mediane „lag time“ mit und ohne ASS, aber auch im Eigen- bzw. Kontrollplasma (Eigenplasma mit ASS: 9,67 min, ohne ASS: 10,17 min; Kontrollplasma mit ASS: 10 min, ohne ASS: 10,52 min). Bis auf die MNC der „CALR+HU“-Gruppe (im Eigenplasma) mit einer medianen „lag time“ von 9,84 Minuten, sind alle Patientengruppen mit ihren MNC schneller als die Kontrollen. Im Kontrollplasma der „CALR+HU“-Gruppe lag die „lag time“ der MNC unter dem Median der Kontrollen im Eigen-, wie auch im Kontrollplasma mit 9,02 Minuten (Median). Die JAK2-positiven Patienten mit HU erreichten mit ihren MNC eine etwas schnellere „lag time“ im Eigenplasma (Median: 7,67 min) im Gegensatz zum Kontrollplasma (Median: 8,33 min). Auch die MNC der JAK2-positiven Patienten ohne HU lagen mit ihrer „lag time“ im Eigenplasma niedriger (Median: 7,67 min) als im Kontrollplasma (Median: 8,67 min). Der CALR-mutierte Patient ohne HU hatte mit seinen MNC dieselbe „lag time“ im Eigen- wie auch Kontrollplasma. Mit 6,67 Minuten war diese „lag time“ auch die schnellste aller Gruppen. Die Ergebnisse der „lag time“ der MNC bei Zugabe von TF zeigten vor allem Tendenzen im Eigenplasma der JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie. Die „lag time“ dieser Gruppe war deutlich kürzer im Vergleich zu den Kontrollen. So lag der p-Wert beim Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma bei 0,004 und im Kontrollplasma bei 0,005. Auch im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS ergab sich ein auffälliger p-Wert, jedoch nur im Kontrollplasma ($p=0,0006$) und nicht im Eigenplasma der Kontrollen. Nur noch der Vergleich der JAK2-positiven Patienten mit HU-Therapie im Kontrollplasma mit den Kontrollen mit ASS-Einnahme im Kontrollplasma ($p=0,022$) zeigte einen auffälligen Unterschied.

In Grafik C ist die „lag time“ der MNC unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin dargestellt. Die MNC der Kontrollen mit ASS hatten im Eigen- und Kontrollplasma dieselbe „lag time“ von 9,34

Minuten (Median). Etwas langsamer aber auch dieselbe „lag time“ erreichten die MNC der Kontrollen ohne ASS im Eigen- und Kontrollplasma mit einem Median von 10,5 Minuten. Ähnlich war auch die „lag time“ der MNC der JAK2-positiven Patienten mit HU-Therapie im Eigen- (Median: 9 min) und Kontrollplasma (Median: 8,84 min). Im Vergleich mit den Kontrollen waren sie deutlich schneller. Bei der „JAK2-HU“-Gruppe war die „lag time“ der MNC im Eigenplasma (Median: 9,67 min) schneller im Gegensatz zum Kontrollplasma (Median: 11 min). Auch bei den CALR-positiven Patienten mit HU-Einnahme verhielt es sich so (Eigenplasma: Median von 9,18 min, Kontrollplasma: Median von 12,86 min). Beim Patienten mit CALR-Mutation und ohne HU-Therapie war die „lag time“ der MNC dagegen im Eigenplasma etwas länger (10,67 min) im Vergleich zum Kontrollplasma (9,33 min). Bei der Messung der „lag time“ der MNC unter Zugabe von Thrombin fiel nur ein Vergleich auf, bei dem eine erhöhte Tendenz zu erkennen war. Es handelte sich dabei um die CALR-positiven Patienten mit HU-Therapie gemessen im Kontrollplasma im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS, ebenfalls im Kontrollplasma gemessen ($p=0,003$). Bei den restlichen Vergleichen waren keine Unterschiede mittels p-Wert erkennbar.



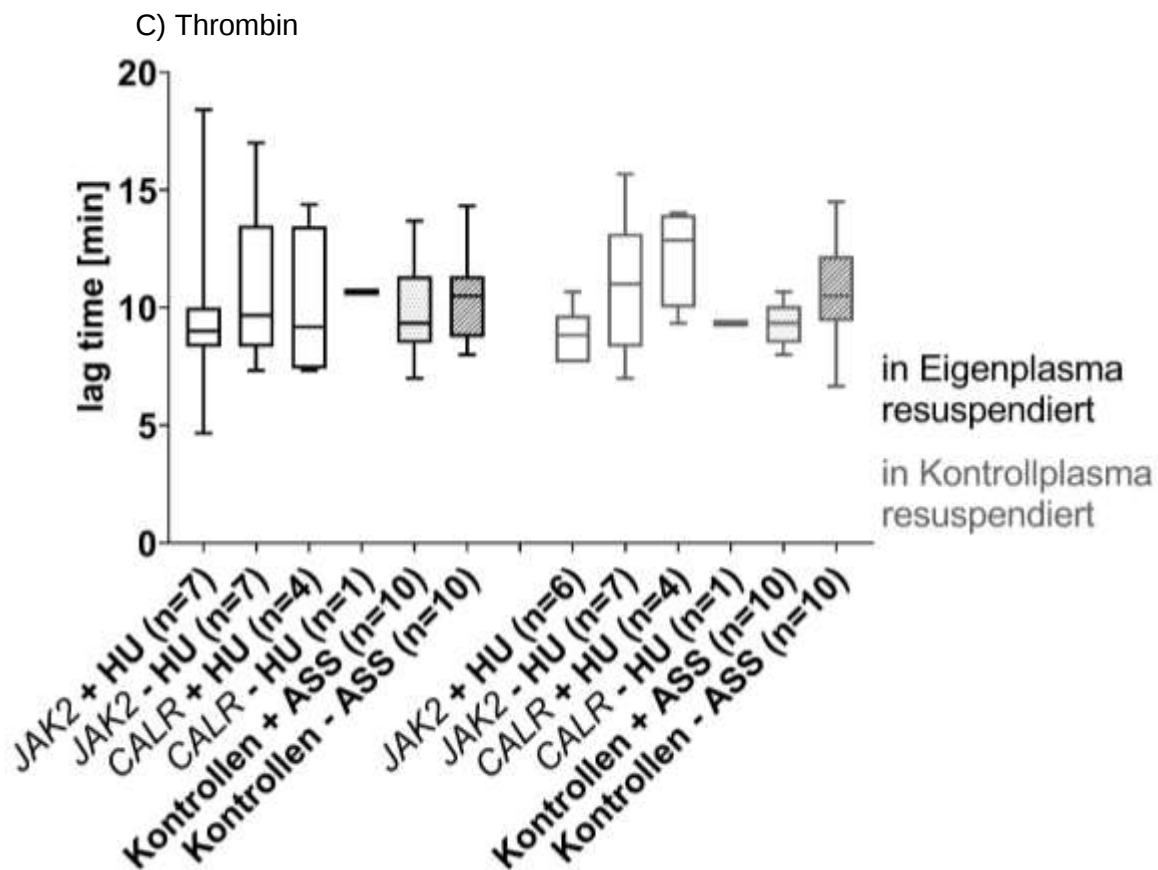


Abbildung 23: „Lag time“ der mononukleären Zellen in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, A) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) (pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten)

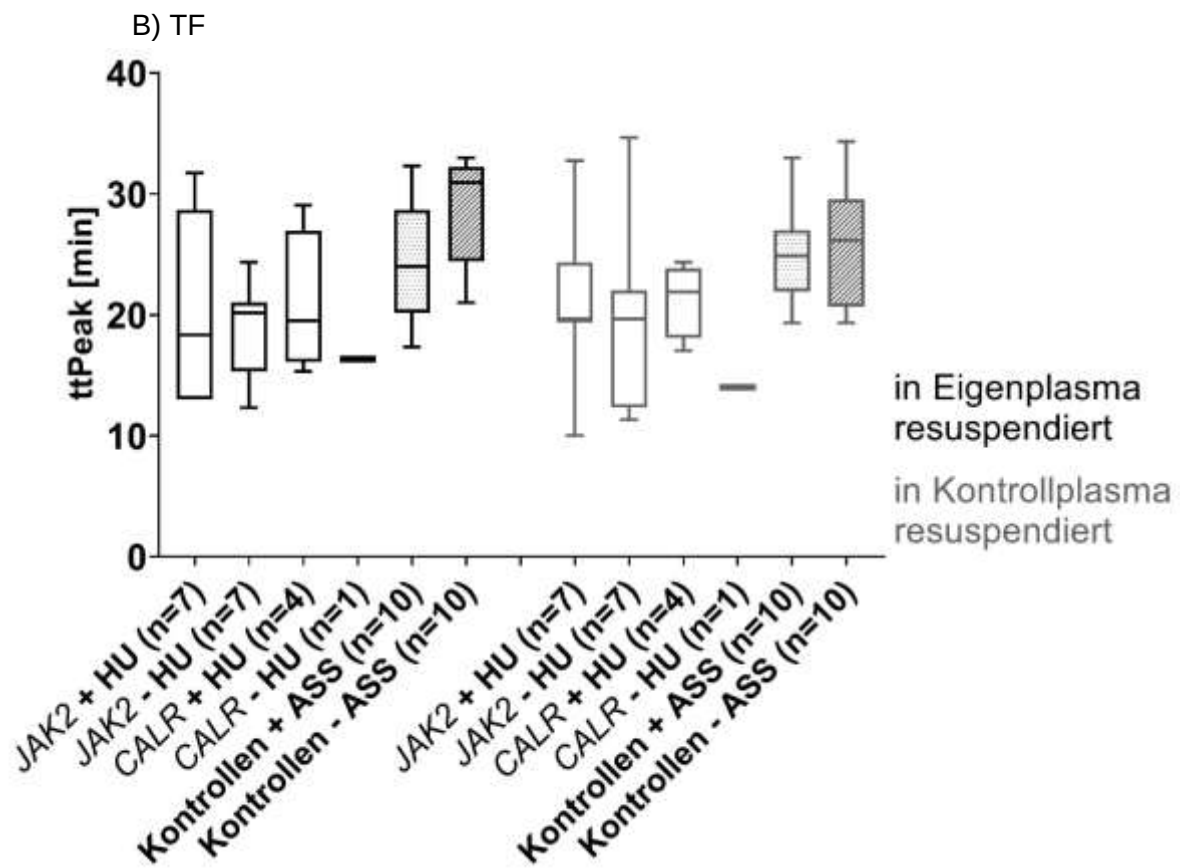
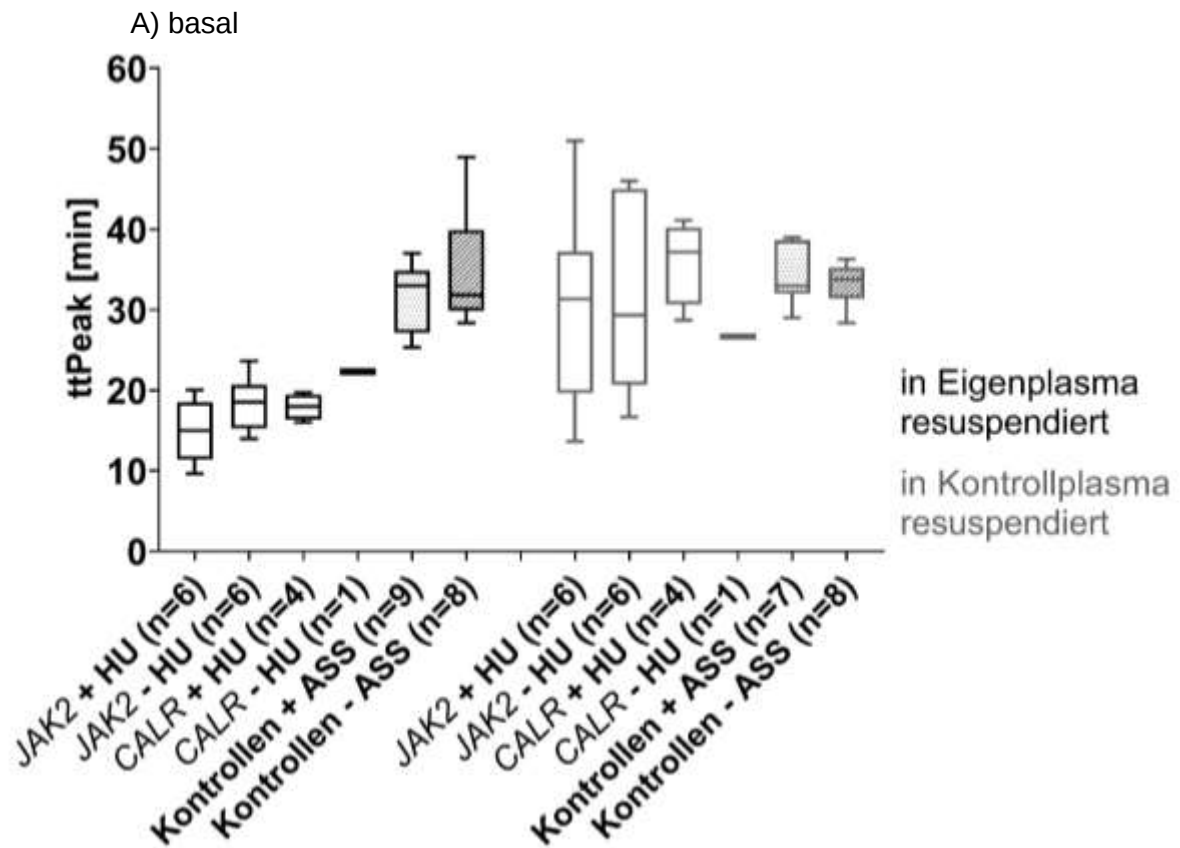
4.3.5.2 „TTPEAK“

In Abbildung 24 ist die „ttPeak“ der MNC der jeweiligen Gruppen, in Eigen- bzw. Kontrollplasma resuspendiert, dargestellt. Grafik A zeigt dabei die „ttPeak“ der basalen Thrombinbildung. In dieser Konstellation lag die „ttPeak“ für die MNC der Kontrollgruppe mit ASS bei beiden Plasmen im Median bei 33 Minuten. Ähnlich waren die Mediane der MNC der Kontrollen ohne ASS (Eigenplasma: 31,84 min, Kontrollplasma: 33,83 min). Die „ttPeak“ der MNC der Patienten im Eigenplasma waren deutlich schneller als die Kontrollen. Im Kontrollplasma der Patienten lagen die „ttPeak“-Werte der MNC jeweils höher. Bei der „JAK2+HU“-Gruppe verdoppelte sich dabei der Median von 15 Minuten im Eigenplasma auf 31,34 Minuten im Kontrollplasma. Auch bei der „JAK2-HU“-Gruppe stieg die mediane „ttPeak“ von 18,5 Minuten im Eigenplasma auf 29,33 Minuten im Kontrollplasma. Auch eine Verdopplung fand sich bei den MNC der CALR-positiven Patienten mit HU-Therapie von 18,02 Minuten (Median) im Eigenplasma auf 37,17 Minuten (Median) im Kontrollplasma. Nicht ganz so stark war der Anstieg der „ttPeak“ der MNC beim CALR-positiven Patienten ohne HU-Einnahme von 22,33

Minuten im Eigenplasma auf 26,67 Minuten im Kontrollplasma. Die Auswertung der „ttPeak-Werte“ der MNC zeigte für alle Patientengruppen gemessen im Eigenplasma einen statistischen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollgruppen im Eigen- wie auch im Kontrollplasma. Die MNC der Patienten erreichten dabei deutlich schneller den „Thrombin Peak“ ($p < 0,05$). Dagegen lagen die p-Werte beim Vergleich der Patientengruppen im Kontrollplasma mit den Kontrollen alle über 0,05 und zeigten somit keine Tendenzen für einen Unterschied.

In Grafik B ist die „ttPeak“ der MNC unter Zugabe von 1 pM TF aufgeführt. Am langsamsten waren dabei die MNC der Kontrollgruppe ohne ASS im Eigenplasma mit einem Median von 30,92 Minuten. Im Kontrollplasma lag die „ttPeak“ dagegen bei 26,17 Minuten (Median). Die MNC der Kontrollen mit ASS hatten eine ähnlich schnelle „ttPeak“ im Eigen- (Median: 24 min) und Kontrollplasma (Median: 24,84 min) und waren damit jeweils schneller als die Kontrollen ohne ASS-Einnahme. Die MNC der Patientengruppen dagegen erreichten alle eine schnellere „ttPeak“ als die Kontrollen. Am schnellste waren dabei die MNC des Patienten mit *CALR*-Mutation und ohne HU-Einnahme mit 16,33 Minuten im Eigenplasma bzw. 14 Minuten im Kontrollplasma. Die übrigen Patientengruppen generierten mit ihren MNC jeweils ähnliche mediane „ttPeak“-Werte im Eigen- und Kontrollplasma („*JAK2*+HU“: Eigenplasma: 18,33 min, Kontrollplasma: 19,67 min; „*JAK2*-HU“: Eigenplasma: 20,15 min, Kontrollplasma: 19,67 min; „*CALR*+HU“: Eigenplasma: 19,52 min, Kontrollplasma: 21,86 min). Die Analyse der „ttPeak“ der MNC ergab Tendenzen für die Gruppe der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie im Eigenplasma im Vergleich zu allen Kontrollgruppen. Auch auffällig waren die Vergleiche der Kontrollen ohne ASS-Einnahme im Eigenplasma mit allen anderen Patientengruppe im Eigen- wie auch Kontrollplasma. Die p-Werte lagen jeweils unter 0,05 und zeigten damit statistische Unterschiede. Die genauen p-Werte sind im Anhang unter 8.2.2 zu finden.

Die Grafik C stellt die „ttPeak“-Werte der MNC unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin dar. Die MNC der Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma hatten die langsamste „ttPeak“ von 27,33 Minuten (Median). Im Kontrollplasma lag sie nur bei 24,5 Minuten (Median). Die MNC der Kontrollen mit ASS im Eigenplasma waren schneller mit einem Median von 22,84 Minuten und im Kontrollplasma mit einem Median von 24 Minuten. Fast alle Patientengruppen erreichten mit ihren MNC eine niedrigere „ttPeak“ als die Kontrollen. Im Eigenplasma lagen die Mediane bei fast allen Gruppen bei 22 Minuten (Ausnahme bildete die Gruppe „*CALR*+HU“ mit 19,52 Minuten). Im Kontrollplasma waren die „ttPeak“-Werte noch etwas schneller. Nur die MNC der „*CALR*+HU“-Gruppe hatte eine verlängerte „ttPeak“ von 27,02 Minuten (Median). Bei der Messung der „ttPeak“ der MNC zeigte sich ein Unterschied bei den *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Einnahme gemessen im Kontrollplasma. Im Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma ergab sich ein p-Wert von 0,017 und im Kontrollplasma der Kontrollgruppe ohne ASS ein p-Wert von 0,029. Kein weiterer Vergleich wies eine Tendenz auf.



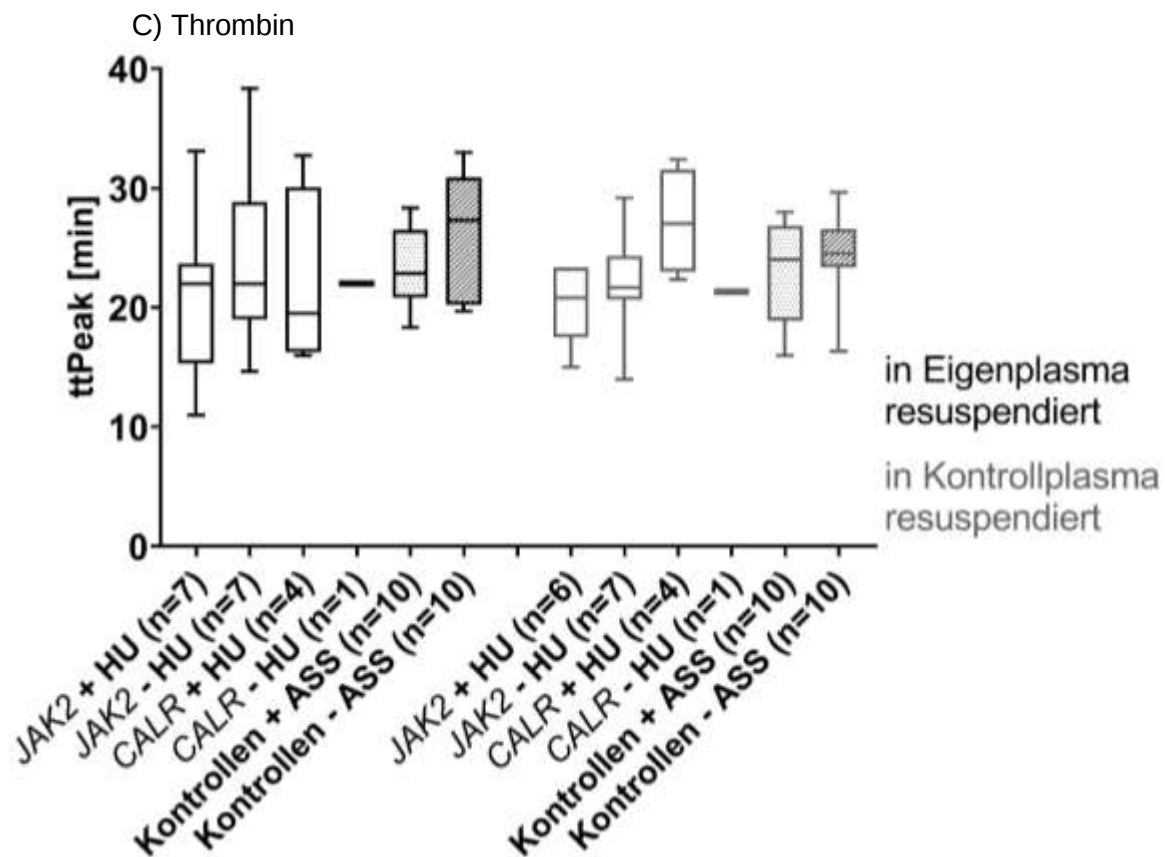


Abbildung 24: „ttPeak“ der mononukleären Zellen in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) („ttPeak“ = „time to Peak“ = Zeit bis zum Peak, pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, min = Minuten)

4.3.5.3 „THROMBIN PEAK“

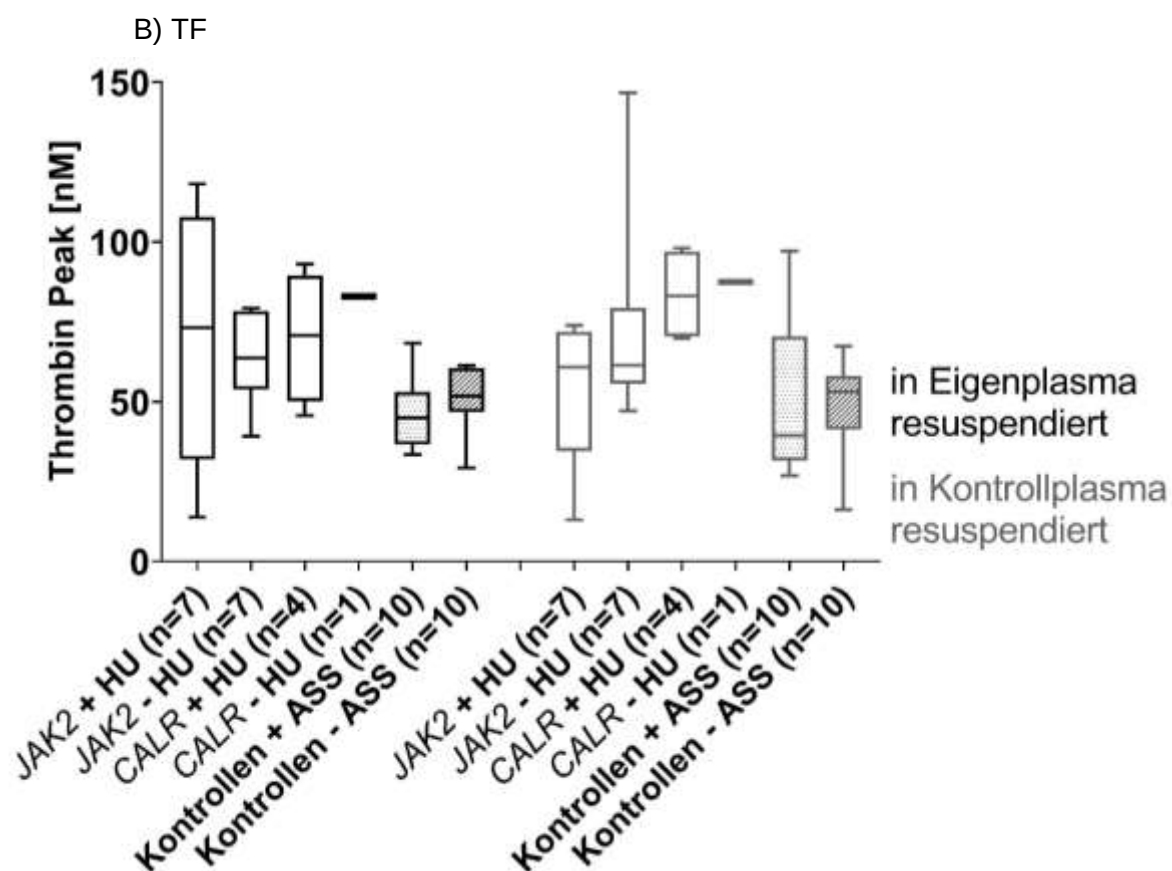
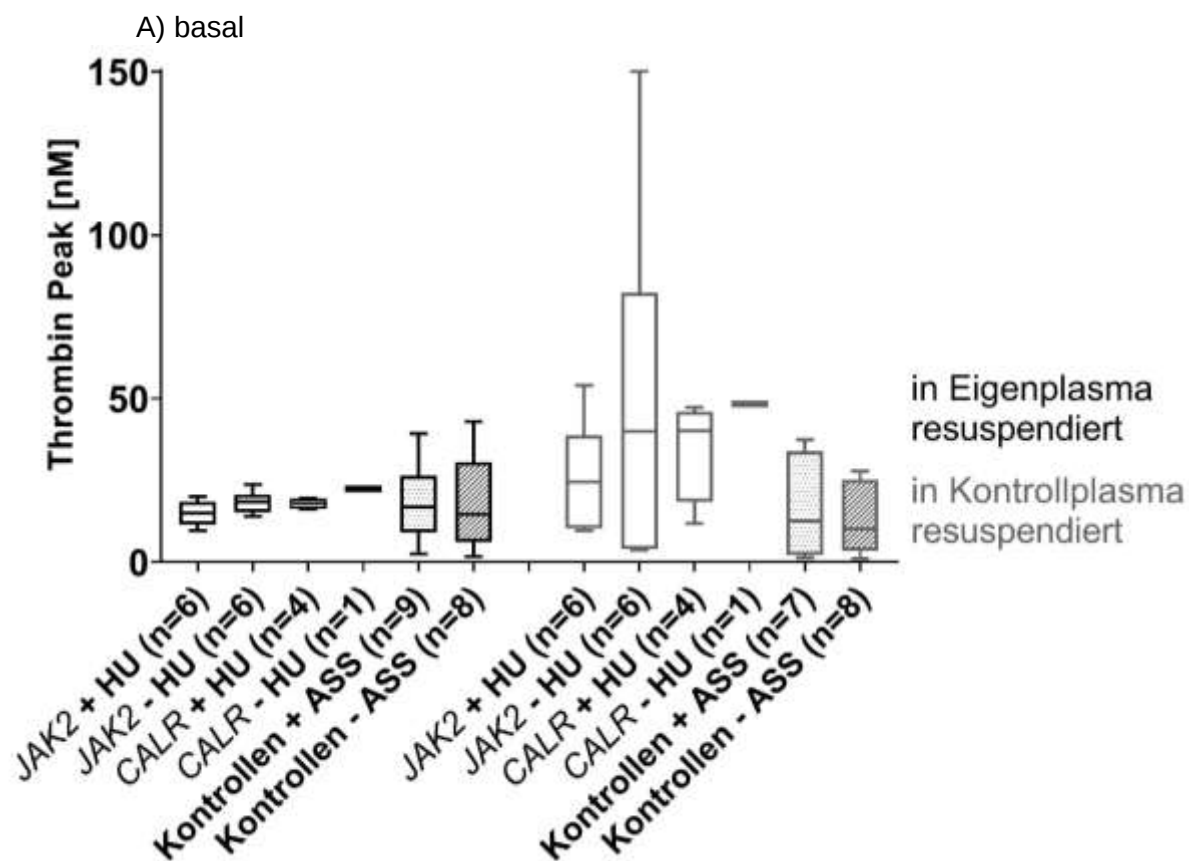
Abbildung 25 zeigt die „Thrombin Peaks“ der MNC der entsprechenden Gruppen in Eigen- und Kontrollplasma resuspendiert. Die Grafik A zeigt dabei die „Thrombin Peak“-Werte der basalen Thrombinbildung. Am niedrigsten war der „Thrombin Peak“ bei den Kontrollen im Kontrollplasma (mit ASS: Median von 12,56 nM, ohne ASS: Median von 10,08 nM). Im Eigenplasma lag der „Thrombin Peak“ der MNC der Kontrollen nur gering höher (mit ASS: Median von 16,86 nM, ohne ASS: Median von 14,62 nM). Die „Thrombin Peaks“ der MNC der Patientengruppen lagen jeweils über den Kontrollen. Dabei fiel auf, dass die „Thrombin Peaks“ im Eigenplasma nur gering höher waren. Im Kontrollplasma dagegen lagen sie wesentlich höher. So waren die medianen Werte im Vergleich von Eigen- zu Kontrollplasma bei den Patienten zum Teil mehr als doppelt so hoch („JAK2+HU“: Eigenplasma: 15 nM, Kontrollplasma: 24,53 nM; „JAK2-HU“: Eigenplasma: 18,5 nM, Kontrollplasma: 39,95 nM; „CALR+HU“, Eigenplasma: 18,02 nM, Kontrollplasma: 40,23 nM; „CALR-HU“: Eigenplasma:

22,33 nM, Kontrollplasma: 48,36 nM). Die „Thrombin Peak“-Messung der MNC unter basalen Bedingungen ergab nur eine statistische Auffälligkeit beim Vergleich der „CALR+HU“-Gruppe im Kontrollplasma mit der Kontrollgruppe ohne ASS im Kontrollplasma ($p=0,018$). Die MNC der Patientengruppe erreichte dabei einen deutlich höheren „Thrombin Peak“ als die Kontrollen. Die restlichen Gruppenvergleiche zeigten keine Unterschiede mittels p-Wert-Berechnung.

In Grafik B sind die „Thrombin Peaks“ der MNC unter Zugabe von 1 pM TF zusammengestellt. Die MNC der Kontrollen ohne ASS lagen im Median bei 51,83 nM im Eigenplasma und bei 53,22 nM im Kontrollplasma. Die MNC der Kontrollen mit ASS lagen im Median niedriger mit 44,95 nM im Eigenplasma und bei 39,41 nM im Kontrollplasma. Die MNC der Patienten erreichten deutlich höhere „Thrombin Peak“-Werte. Die JAK2-positiven Patienten mit HU erreichten mit ihren MNC im Eigenplasma einen höheren Peak mit 73,18 nM (Median) als im Kontrollplasma (Median: 60,85 nM). Die MNC der JAK2-positiven Patienten ohne HU hatten im Eigen- (Median: 63,62 nM) und Kontrollplasma (Median: 61,48 nM) ähnliche Werte. Die MNC der „CALR+HU“-Gruppe steigerte sich vom Eigenplasma (Median: 70,75 nM) zum Kontrollplasma (Median: 83,14 nM). Und der CALR-mutierte Patient ohne HU erreichte mit seinen MNC den höchsten „Thrombin Peak“ im Kontrollplasma mit 87,41 nM. Im Eigenplasma lag der Wert bei 82,9 nM. Bei der Messung des „Thrombin Peaks“ der MNC zeigten sich einige Unterschiede. Die MNC der „JAK2-HU“-Gruppe im Eigenplasma erreichte einen höheren „Thrombin Peak“ im Vergleich mit den Kontrollen mit ASS im Eigenplasma ($p=0,02$). Im Kontrollplasma lag der „Thrombin Peak“ dieser Patientengruppe ebenfalls höher, sodass im Vergleich mit den Kontrollen mit ASS im Eigenplasma ein p-Wert von 0,014 und mit den Kontrollen ohne ASS im Kontrollplasma ein p-Wert von 0,043 statistische Auffälligkeiten anzeigte. Die MNC der CALR-positiven Patienten mit HU-Therapie generierten auch einen hohen „Thrombin Peak“. Im Eigenplasma ergaben sich dabei im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS im Eigenplasma ($p=0,019$) und den Kontrollen ohne ASS im Eigen- ($p=0,034$) und Kontrollplasma ($p=0,0497$) tendenzielle Unterschiede. Auch im Kontrollplasma diese Patientengruppe im Vergleich zu allen Kontrollgruppen zeigten sich p-Werte unter 0,05 und damit statistische Auffälligkeiten. Lediglich die Vergleiche der „JAK2+HU“-Gruppe mit den Kontrollen blieben ohne Tendenzen.

Grafik C zeigt die „Thrombin Peaks“ der MNC unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin. Die Mediane der MNC der Kontrollen im Eigenplasma waren dabei ähnlich (mit ASS: 23,62 nM, ohne ASS: 23,54 nM). Im Kontrollplasma waren die medianen Werte niedriger (mit ASS: 16,92 nM, ohne ASS: 19,22 nM). Die MNC der Patienten lagen zumeist über den Kontrollen. Dabei waren die medianen „Thrombin Peaks“ der JAK2-positiven Patienten im Eigenplasma (mit HU: 40,52 nM, ohne HU: 43,2 nM) höher als im Kontrollplasma (mit HU: 29,3 nM, ohne HU: 29,12 nM). In der „CALR+HU“-Gruppe war der „Thrombin Peak“ der MNC im Eigenplasma gering höher (Median: 46,37 nM) als im Kontrollplasma (Median: 41,18 nM). Der Patient mit der

CALR-Mutation und ohne HU-Therapie dagegen erreichte mit seinen MNC im Eigenplasma einen geringeren „Thrombin Peak“ von 20,99 nM als im Kontrollplasma mit 37,55 nM. Die Analyse der „Thrombin Peaks“ der MNC ergab Unterschiede für alle Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS im Kontrollplasma. Hinzu kamen die Vergleiche der Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma mit allen Patienten gemessen in ihrem Eigenplasma. Ebenfalls eine p-Wert unter 0,05 ergab sich für die „JAK2+HU“-Gruppe im Eigenplasma mit den Kontrollen mit ASS im Eigenplasma und für die „*CALR*+HU“-Gruppe im Eigenplasma im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit ASS im Eigenplasma. Dabei lagen die „Thrombin Peak“-Werte der Patientengruppen jeweils deutlich höher.



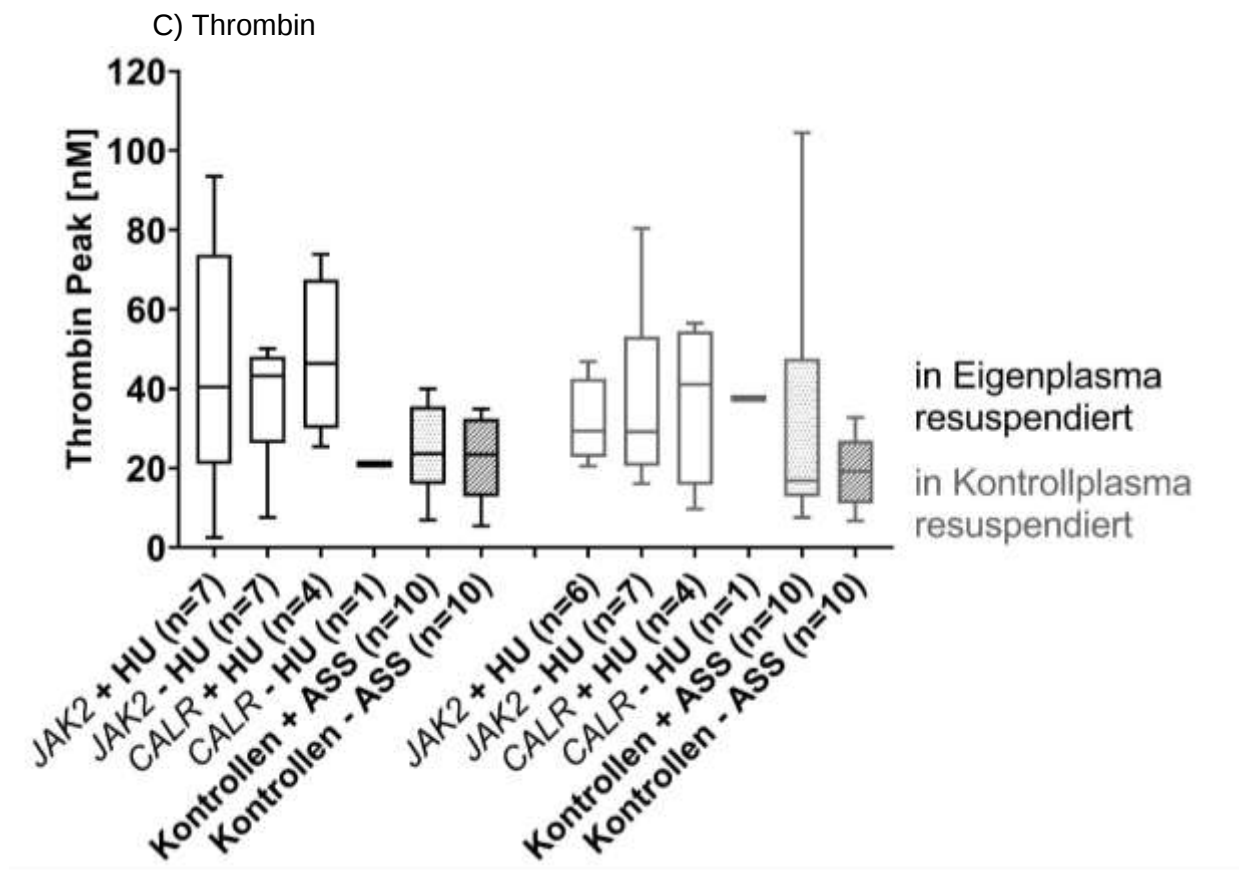


Abbildung 25: „Thrombin Peak“ der mononukleären Zellen in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) (pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, nM = Nanomolar)

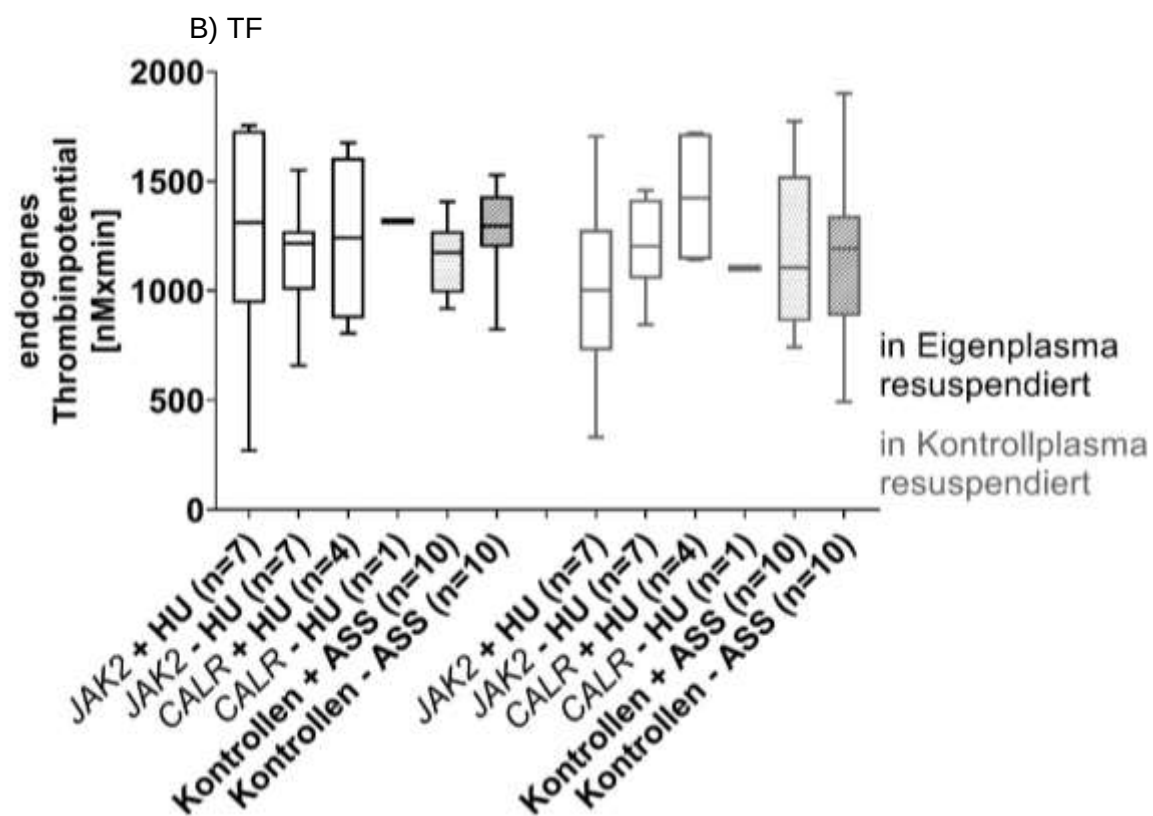
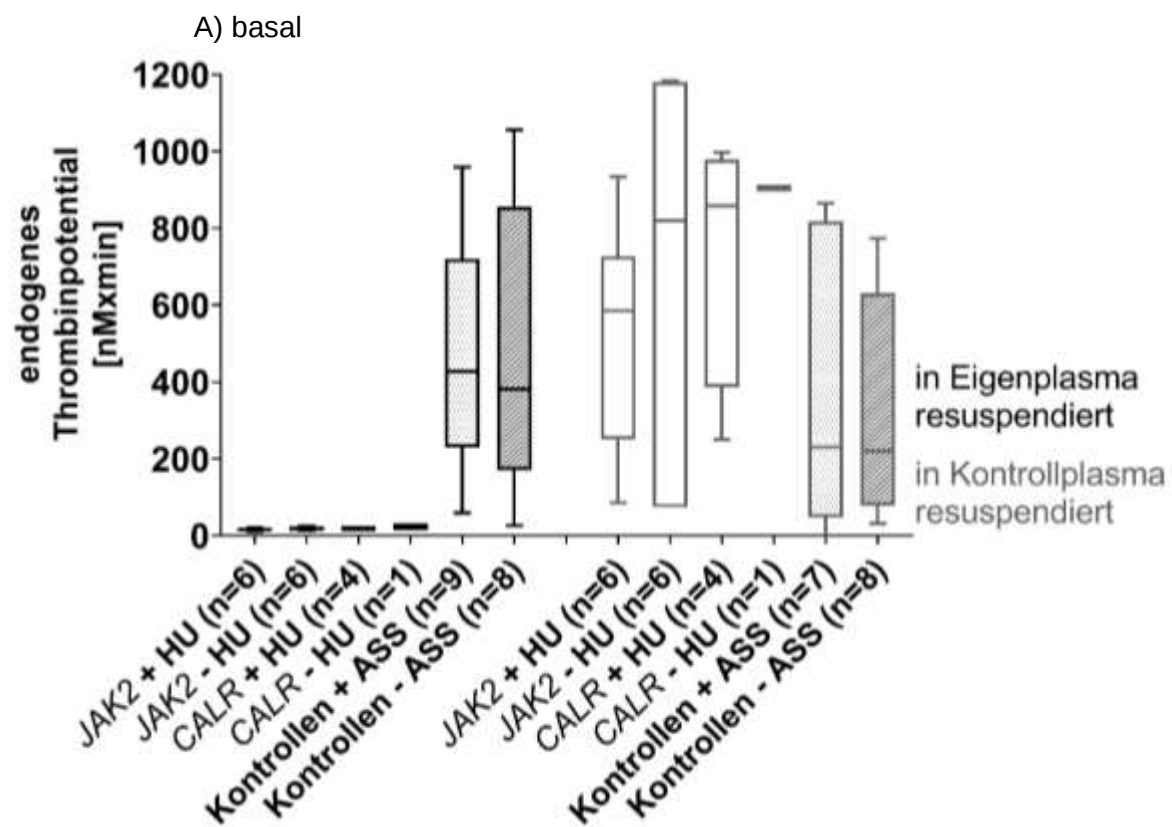
4.3.5.4 „ETP“

In Abbildung 26 ist das Endogene Thrombin Potential der mononukleären Zellen, in Eigen- und Kontrollplasma resuspendiert, dargestellt. Grafik A zeigt dabei die „ETP“-Werte der basalen Thrombinbildung. Die MNC der Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma erreichten einen Median von 381,3 nM x min, die MNC der Kontrollen mit ASS im Eigenplasma dagegen generierten einen erhöhten Median von 426,8 nM x min. Die MNC der Kontrollen im Kontrollplasma lagen darunter mit einem Median von 220,7 nM x min ohne ASS-Einnahme und 231 nM x min mit ASS. Auffällig war, dass die MNC der Patientengruppen im Eigenplasma ein stark erniedrigtes „ETP“ aufwiesen. Im Kontrollplasma erreichten sie dagegen stark erhöhte Werte. Am höchsten war das „ETP“ bei dem CALR-positiven Patienten ohne HU-Therapie mit 904,3 nM x min. Die Ergebnisse des „ETP“ der MNC ohne Zugabe eines Agonisten zeigte statistische Auffälligkeiten für alle Vergleiche der Patientengruppen im Eigenplasma mit den beiden Kontrollgruppen im Eigenplasma. Das „ETP“ der Patienten-MNC war dabei deutlich niedriger als das der MNC der Kontrollen. Die Vergleiche der JAK2-

positiven Patienten im Eigenplasma mit und ohne HU-Therapie mit den Kontrollen im Kontrollplasma zeigten ebenfalls einen Unterschied mittels p-Wert. Die Vergleiche der Patientengruppen im Kontrollplasma mit allen Kontrollgruppen ergaben dagegen keinerlei Tendenzen.

In Grafik B sind die „ETP“-Werte der MNC unter Zugabe von 1 pM TF dargestellt. Die MNC der Kontrollen ohne ASS-Einnahme erreichten ein medianes „ETP“ im Eigenplasma von 1297 nM x min und im Kontrollplasma von 1191 nM x min. Etwas niedriger waren die medianen „ETP“-Werte der MNC der Kontrollen mit ASS-Einnahme (Eigenplasma: 1174 nM x min, Kontrollplasma: 1104 nM x min). Die MNC der Patientengruppen gemessen im Eigenplasma lagen mit ihren medianen „ETP“-Werten um den Median der entsprechenden Kontrollgruppe ohne ASS. Bei der „JAK2+HU“-Gruppe war das „ETP“ der MNC im Eigenplasma mit einem Median von 1312 nM x min höher als im Kontrollplasma mit einem Median von 1002 nM x min. Bei den MNC der JAK2-positiven Patienten ohne HU lagen die „ETP“-Werte im Eigen- (Median: 1216 nM x min) und Kontrollplasma (Median: 1202 nM x min) nah beieinander. Die MNC der „CALR+HU“-Gruppe erhöhten das „ETP“ von Eigen- (Median: 1241 nM x min) zu Kontrollplasma (Median: 1424 nM x min). Beim CALR-positiven Patienten ohne HU dagegen nahm das „ETP“ der MNC vom Eigen- (1318 nM x min) zum Kontrollplasma (1103 nM x min) ab. Die Analyse des „ETP“ der MNC zeigte in keinem der Vergleiche eine statistische Auffälligkeit.

Die Grafik C zeigt das „ETP“ der MNC unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin. Die MNC der Kontrollen im Eigenplasma erreichten im Median ähnliche Werte (mit ASS: 677,8 nM x min, ohne ASS: 657 nM x min). Im Kontrollplasma waren die medianen Werte niedriger aber ähnlich untereinander (mit ASS: 497,2 nM x min, ohne ASS: 498,7 nM x min). Die MNC der Patientengruppen lagen, bis auf den CALR-positiven Patienten ohne HU, mit ihrem Median über den Kontrollen. Dabei war das „ETP“ der MNC der „JAK2+HU“-Gruppe im Eigenplasma mit einem Median von 989,7 nM x min deutlich höher als im Kontrollplasma (Median: 639,7 nM x min). Auch in der „JAK2-HU“-Gruppe war der Median der MNC im Eigenplasma mit 953,6 nM x min höher als im Kontrollplasma (702,5 nM x min). Bei den CALR-positiven Patienten mit HU-Therapie verhielten sich die „ETP“-Werte der MNC im Eigen- (Median: 967,7 nM x min) und Kontrollplasma (Median: 965,9 nM x min) ähnlich. Nur die MNC des CALR-mutierten Patienten hatten ein niedrigeres „ETP“ im Eigenplasma mit 495,7 nM x min als im Kontrollplasma (805,2 nM x min). Bei der Messung des „ETP“ der MNC ergab sich für die MNC der JAK2-positiven Patienten mit HU im Eigenplasma ein deutlich höheres „ETP“ im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS im Kontrollplasma ($p=0,03$). Ebenfalls deutlich erhöht und damit einen statistisch auffälligen p-Wert zeigte der Vergleich der „CALR+HU“-Gruppe im Eigenplasma mit den Kontrollen ohne ASS im Kontrollplasma ($p=0,031$).



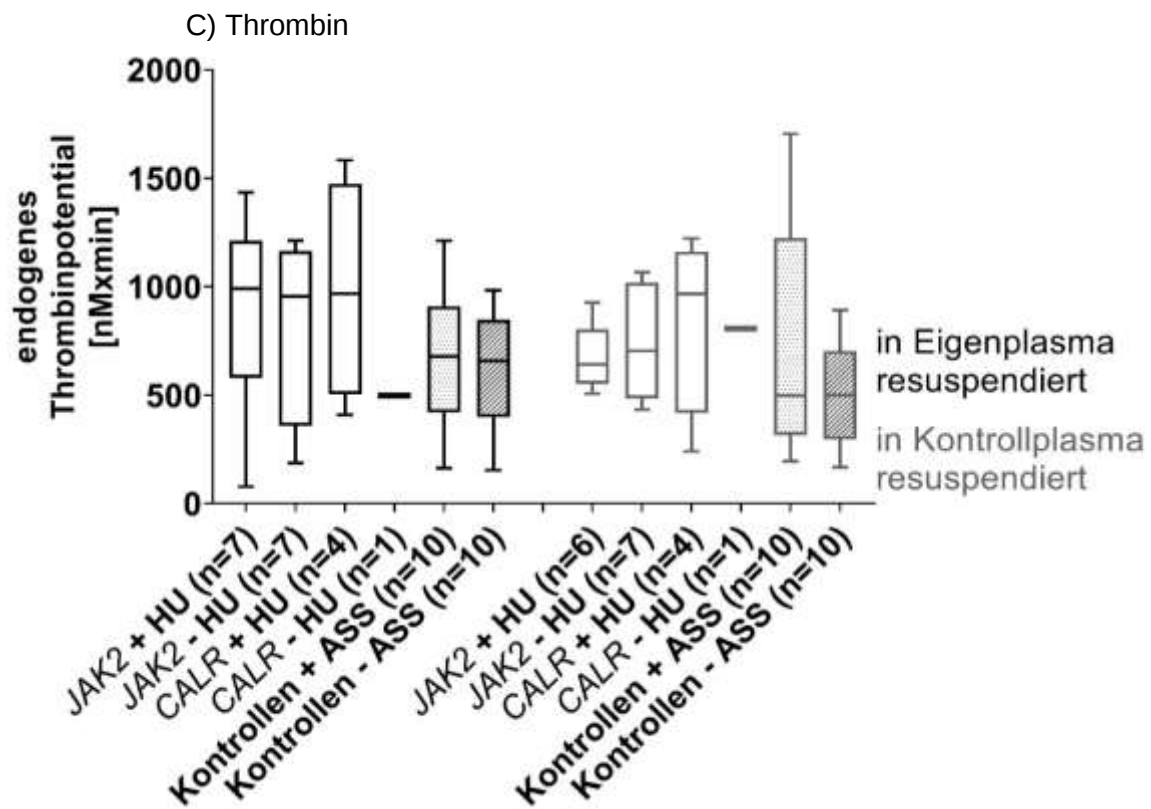


Abbildung 26: „ETP“ der mononukleären Zellen in Eigen- oder Kontrollplasma resuspendiert, a) basal, B) unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden, C) Unter Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) („ETP“ = endogenes Thrombin potential, pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, n = Anzahl, nM = Nanomolar, min = Minuten)

5 DISKUSSION

Die ET ist klinisch gekennzeichnet durch ihr gemischtes Bild an thromboembolischen und hämorrhagischen Komplikationen. Diverse Studien haben dabei verschiedenste Funktionsstörungen von Thrombozyten in ET-Patienten beschrieben, wie Scharf in seinem Kapitel „Acquired Disorders of Platelet Function“ erörtert. (10)

Zur Evaluierung möglicher dysfunktionaler Thrombozytenreaktionen der ET-Patienten dienten maximal 10 gesunde Kontrollprobanden mit 3-tägiger ASS- und ohne ASS-Einnahme zum Vergleich. In den folgenden Kapiteln wird die Komplexität der Thrombozyten-Dysfunktion der untersuchten ET-Patienten bezüglich Aggregation, ATP-Freisetzung aus den δ -Granula, Thrombinbildungskapazität sowie der Thrombinbildungskapazität von mononuklearen Zellen erörtert.

5.1 DIFFERENZIERTE THROMBOZYTEN-AGGREGABILITÄT BEI ET-PATIENTEN ZEIGT HYPO- UND HYPERAGGREGABILITÄT

Als primäre Reaktion auf eine Verletzung der Gefäße kommt es zur Bildung eines Thrombozytenaggregats (35, 36). Diese Reaktion lässt sich als Aggregation mittels Lichttransmissionsaggregometrie (LTA/Chronolog) im PRP messen. Daraus lassen sich Störungen der Thrombozyten in der primären Hämostase ableiten. Die Ergebnisse der gemessenen thrombozytären Aggregation bei ET-Patienten im Vergleich mit den Kontrollen sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Zusammenfassung der medianen Aggregationswerte in der Lumiaggregometrie mittels Chronolog (JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, AS = Arachidonsäure, TRAP-6 = Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6, mg = Milligramm, μ M = Mikromolar, μ g = Mikrogramm, ml = Milliliter, Ø – keine Reaktion, * - Abweichung eines Patienten mit entgegengesetzter Tendenz zum Median der Gruppe, ° - variable Aggregationswerte, (%) – medianer Aggregationswert in % bei Besonderheiten)

			n	AS	TRAP-6		Kollagen	
				0,5 mg/ml	10 μM	50 μM	2 μg/ml	10 μg/ml
JAK2	+ HU	- ASS	3	< 60% (50%)	(9%)	< 60% (52%)	(2%)	< 60% (55%)
		+ ASS	3	Ø *	(2%)	> 60%	(3%)	< 60%
	- HU	- ASS	4	> 60%	(39%)	> 60%	(20%)°	> 60%
		+ ASS	4	Ø *	(31,5%)°	> 60%	(1,5%)°	< 60% (47,5%)
CALR	+ HU	- ASS	1	> 60%	Ø	< 60% (43%)	(5%)	> 60%
		+ ASS	3	Ø	(12%)°	< 60%	(2%)	< 60%
	- HU	+ ASS	1	Ø	Ø	< 60% (15%)	(1%)	< 60%
Kontrollen		- ASS	9	> 60%	(35%)°	> 60%	(35%)°	> 60%
		+ ASS	9	Ø	(20%)°	> 60%	(2%)	> 60%

5.1.1 ARACHIDONSÄURE-INDUZIERTE AGGREGATION VON THROMBOZYTEN BEI ET-PATIENTEN

Der durch die Cyclooxygenase-1 gebildete Metabolit TxA₂ ist ein wichtiger Mediator in der Hämostase, durch seine positive Feedbackwirkung über den TP-Rezeptor auf die Thrombozyten (41). Mit Hilfe von Arachidonsäure als Agonisten bei der Lumiaggregometrie lassen sich Defekte und Störungen des TP-Rezeptors mit den nachgeschalteten Signalweg und die TxA₂-Synthese, aber auch die Wirkung von ASS evaluieren (80, 81).

Dabei zeigten die Thrombozyten der Kontrollprobanden ohne ASS-Einnahme unter Zugabe von 0,5 mg/ml Arachidonsäure eine maximale Aggregation über 60% (Median: 69%), während die Thrombozyten der Kontrollgruppe mit ASS unter diesen Bedingungen nicht aggregierten

und so die aggregationshemmende Wirkung von ASS auf die Thrombozyten der Kontrollprobanden bestätigten.

In der Gruppe der JAK2-positiven Patienten mit HU- und mit ASS-Therapie (n=3) lag die Arachidonsäure-induzierte Aggregation der Thrombozyten im Median erwartungsgemäß unterhalb des Cut-Offs von 60%. Jedoch gab es einen Patienten, dessen Thrombozyten über 60% aggregierten. Auch in der Gruppe der JAK2-positiven Patienten ohne HU-, aber mit ASS-Therapie (n=4) zeigten die Thrombozyten bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation im Median eine Reaktion unterhalb des Cut-Offs. Jedoch gab es auch hier einen Patienten, dessen Thrombozyten Aggregationswerte über 60% erzeugten. Es stellte sich hier die Frage der adäquaten Einnahme und Compliance bzw. das adäquate Ansprechen des Patienten auf ASS („Non-Responder“).

Eine andere Erklärung liefert Pascale et al. (82). Sie zeigten in ihrer Studie, dass Patienten mit ET bei einmal täglicher Einnahme von ASS keine ausreichende Hemmung der TxA₂-Synthese aufwiesen. Dagegen konnte die Wirkung bei zweimal täglicher Einnahme gesteigert werden. Sie führten dies auf die gesteigerte Megakaryopoese und damit schnelleren Neu-Synthese der Thrombozyten zurück. (82)

Auch Rocca et al. (83) zeigten mit ihren Ergebnissen der Phase 2 der doppelt-blind randomisierten ARES-Studie mit 245 ET-Patienten, dass das bisherige ASS-Regime mit einmal täglicher Einnahme von 75 bis 100 mg ASS inadäquat die thrombozytäre Thromboxansynthese von ET-Patienten inhibiert. Dabei wurde die, bei einmal täglicher ASS-Einnahme hohe interindividuelle Variabilität des im Serum gemessenen stabilen TxA₂-Metaboliten TxB₂ unter zweimal oder dreimal täglicher Einnahme von ASS reduziert und das TxB₂-Level im Serum um 90% gesenkt. Es wird sich nun zeigen, ob für ET-Patienten ein adäquateres ASS-Regime Anwendung finden wird, dass eine höhere Sicherheit für diese Patienten bietet in der Prophylaxe von thrombotischen Komplikationen, wenn die Ergebnisse der Phase 3 der ARES-Studie mit dem zweimal tägliche ASS-Regime vorliegen. (83)

In der Gruppe der JAK2-positiven Patienten mit HU-Therapie, aber ohne ASS-Einnahme (n=3) lag der Median der thrombozytären Aggregation unter Zugabe von Arachidonsäure knapp unterhalb des Cut-Offs von 60% (Median: 50%). Eine mögliche Ursache kann die Einnahme von ASS sein, zum Beispiel als Schmerzmittel, ohne dass dies vor der Blutentnahme angegeben wurde. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit einer Störung des TP-Rezeptors und des nachgeschalteten Signalweges oder des TxA₂-Syntheseweges (80).

Zur Differenzierung kann ein TxA₂-Mimetika wie U46619 genutzt werden, wie es auch Dawood et al. (80) bei Patienten mit Verdacht auf Thrombozytenfunktionsstörung in ihrer Studie taten. Zeigt ein Patient dabei eine reduzierte Aggregation auf Arachidonsäure und U46619, so ist von einem Defekt auf Rezeptorebene und der nachgeschalteten Signalkaskade auszugehen.

Ist dagegen die Aggregation unter Zugabe von U46619 normal, so ist die Synthese von TxA₂ aus der Arachidonsäure gestört. (80)

Dahingehend wären somit weitere Untersuchungen notwendig, um die verminderte Aggregation in dieser Patientengruppe zu erklären. Die Arachidonsäure-induzierte Hypoaggregabilität war dabei im Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS-Einnahme statistisch auffällig ($p=0,015$).

Bei den JAK2-positiven Patienten ohne HU- und ohne ASS-Therapie ($n=4$) lag der Median der Arachidonsäure-induzierten Aggregation der Thrombozyten über dem Cut-Off (Median: 65%). Auch die Thrombozyten des *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-, aber ohne ASS-Therapie ($n=1$) zeigten bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation Werte oberhalb des Cut-Offs (72%). Diese Patienten erreichten mit ihren Thrombozyten ähnlich hohe mediane Aggregationswerte wie die Kontrollgruppe ohne ASS (Median: 69%) und wiesen damit keine Störung des TP-Rezeptors mit Signalweg oder einen Defekt in der TxA₂-Synthese auf.

In der Gruppe der *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU- und ASS-Therapie ($n=3$) zeigten die Thrombozyten bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation keine Reaktion. Und auch der *Calreticulin*-positive Patient ohne HU-, aber mit ASS-Therapie ($n=1$) zeigte mit seinen Thrombozyten bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation keine Reaktion. Die Thrombozyten der Patienten zeigten somit ein gutes Ansprechen auf die ASS-Therapie.

Zusammenfassend zeigten bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation nur die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten Auffälligkeiten. Trotz Einnahme von ASS aggregierten die Thrombozyten mancher JAK2-positiven Patienten unabhängig von der HU-Therapie ($>60\%$). Dagegen zeigte ein Patient mit seinen Thrombozyten keine Reaktion auf die Arachidonsäure trotz nicht angeordneter ASS-Therapie. Lediglich die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten ohne HU- und ohne ASS-Therapie aggregierten entsprechend mit Werten über den Cut-Off. Bei den *Calreticulin*-positiven Patienten dagegen gab es keine Auffälligkeiten. Die Thrombozyten reagierten bei ASS-Einnahme unabhängig von der HU-Therapie nicht auf Arachidonsäure bzw. zeigten ohne ASS-Therapie Aggregationswerte über 60% bei Zugabe des Agonisten.

Tabelle 19: Zusammenfassung der medianen Arachidonsäure-induzierten Aggregationswerte in der Lumiaggregometrie mittels Chronolog (*JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, AS = Arachidonsäure, mg = Milligramm, ml = Milliliter, Ø – keine Reaktion, * - Abweichung eines Patienten mit entgegengesetzter Tendenz zum Median der Gruppe, ° - variable Aggregationswerte, (%) – medianer Aggregationswert in % bei Besonderheiten)

			n	AS
				0,5 mg/ml
JAK2	+ HU	- ASS	3	< 60% (50%)
		+ ASS	3	Ø *
	- HU	- ASS	4	> 60%
		+ ASS	4	Ø *
CALR	+ HU	- ASS	1	> 60%
		+ ASS	3	Ø
	- HU	+ ASS	1	Ø
Kontrollen		- ASS	9	> 60%
		+ ASS	9	Ø

5.1.2 TRAP-INDUZIERTE AGGREGATION VON THROMBOZYTEN BEI ET-PATIENTEN

Die Serinprotease Thrombin spaltet Fibrinogen in Fibrin und trägt somit zum Aufbau eines stabilen Thrombus bei (39). Neben dieser entscheidenden Funktion ist Thrombin auch an der Aktivierung der Thrombozyten, über verschiedene Rezeptoren wie PAR1 und PAR4, beteiligt (53).

PAR1 kann dabei über ein Thrombin Rezeptor Aktivierendes Peptid (TRAP) spezifisch aktiviert werden. Mit Hilfe von TRAP-6 als Agonisten kann damit in der Lumiaggregometrie spezifisch ein Defekt des PAR1 oder dessen Signalweges detektiert werden. (57, 58)

Bei der TRAP-6-induzierten Aggregation konnte bei der Kontrollgruppe ohne ASS mit der intermediären Konzentration von 10 µM eine reduzierte variable Aggregation der Thrombozyten gemessen werden. Unter Verwendung der hohen TRAP-Konzentration von 50 µM normalisierte sich die thrombozytäre Aggregation der Kontrollen ohne ASS auf über 60%. Diese Normalisierung der Aggregationswerte zeigten auch die Thrombozyten der Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme beim Vergleich von intermediärer und hoher TRAP-Konzentration. Die fehlende positive Feedbackwirkung des TxA₂ spielt damit keine essentielle Rolle und kann bei Verwendung der hohen TRAP-Konzentration umgangen werden (80).

Bei den *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie, aber ohne ASS-Einnahme (n=3) zeigte sich die TRAP-induzierte Aggregation der Thrombozyten bei Verwendung der intermediären Konzentration reduziert. Auch bei Zugabe der hohen TRAP-Konzentration kam es zu keiner Normalisierung auf Werte oberhalb des Cut-Offs, wobei der Median mit 52% nur knapp darunter lag. Statistisch war dies jedoch im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne ASS auffällig (p=0,007). Auch bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation zeigten die Thrombozyten dieser Patientengruppe eine reduzierte Aggregation, sodass der positive Feedback-Mechanismus des TxA_2 einen Einfluss haben könnte (41). Jedoch sollte dieser Einfluss durch die hohe TRAP-Konzentration umgangen werden (80).

Ist dagegen ein Defekt des PAR1 oder dessen Signalweges Ursache, so könnte dies umgekehrt die reduzierte Aggregation auf Arachidonsäure mit erklären, wie Holinstat et al. (84) zeigten. Sie wiesen nach, dass Thrombin über PAR1 die TxA_2 -Generierung stimuliert (84).

In der Literatur werden kaum Defekte des PAR1 aufgeführt. Als eine der ersten beschrieben 2003 Dupont und Kollegen einen PAR1 Polymorphismus, der einen Effekt auf die PAR1-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche hat und zu einem reduzierten Ansprechen der Thrombozyten auf SFLLRN, ein Thrombin Rezeptor Aktivierendes Peptid, führt. (85)

Mit Defekten des PAR-Signalweges befassten sich Moore et al (86). In ihrer Studie untersuchten sie Defekte des PI3 Kinase/Rap1/Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ Signalweges in Thrombozyten von 26 ET-Patienten (20 *JAK2*-positive und 6 *JAK2*-negative Patienten). Mittels Flowzytometrie zeigte sich dabei eine SFLLRN-vermittelte verminderte Fibrinogenbindung bei den ET-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen. Die Rezeptordichte von PAR1 und $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ war dabei nicht signifikant unterschiedlich zwischen ET-Thrombozyten und Kontroll-Thrombozyten. Auch die Rap1 Aktivierung nach SFLLRN-Stimulation war bei den ET-Patienten signifikant reduziert, sodass die Autoren schlussfolgerten, dass eine Beeinträchtigung des intrinsischen Signalweges von PI3 Kinase, Rap1 und Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ in ET vorliegt. (86)

Dies könnte ein Grund für die TRAP-induzierte Hypoaggregabilität in der Gruppe der *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie, aber ohne ASS-Einnahme. Es braucht diesbezüglich weitere Untersuchungen.

Die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten mit HU- und ASS-Einnahme (n=3) zeigten bei Verwendung der intermediären TRAP-Konzentration ebenfalls eine reduzierte Aggregation, die sich aber bei Verwendung der hohen Konzentration auf Werte über 60% normalisierten. Ein Defekt des PAR1 oder des nachfolgenden Signalweges scheint in dieser Gruppe nicht vorhanden zu sein.

Die *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Einnahme jeweils mit (n=4) und ohne ASS-Therapie (n=4) zeigten mit ihren Thrombozyten bei Verwendung der intermediären Konzentration im Median eine höhere Aggregationsleistung als die Thrombozyten der jeweiligen Kontrollgruppe

mit bzw. ohne ASS. Und auch bei Zugabe der hohen TRAP-Konzentration lag die Aggregation der Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten ohne HU unabhängig von der ASS-Einnahme im Median oberhalb des Cut-Offs von 60%. Jedoch war bei Zugabe von 50 μ M TRAP-6 der Median der Patientengruppen (JAK2/-HU/-ASS: 66%; JAK2/-HU/+ASS: 68%) jeweils niedriger als der Median der entsprechenden Kontrollgruppe (-ASS: 74%; +ASS: 73%). Dabei war zudem der statistische Vergleich der JAK2-positiven Patienten ohne HU- und ohne ASS-Therapie mit der Kontrollgruppe ohne ASS auffällig ($p=0,018$). Die erhöhten Aggregationswerte vor allem bei der intermediären Konzentration könnten auf eine TRAP-induzierte Hyperaggregabilität der Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie unabhängig von der ASS-Einnahme deuten. Eine solche TRAP-induzierte Hyperaggregabilität wurde bisher kaum in anderen Studien beschrieben.

So fanden Lussana et al. (87) in ihrer Studie bei der mit 10 μ M TRAP-14-induzierten Aggregation eine signifikant stärkere Aggregation der Thrombozyten von 24 ET-Patienten in unverdünnten PRP (Citrat, Lepirudin) gegenüber den 29 Kontrollen. Die höhere Thrombozytenkonzentration in ET-Patienten könnte hier jedoch eher für verantwortlich sein, da im verdünnten PRP (Citrat) die TRAP-induzierte Aggregation der Thrombozyten von ET-Patienten und Kontrollprobanden ähnlich waren. Auch bei der Impedanz-Messung in PRP und Vollblut zeigte sich in dieser Studie eine stärkere Aggregation bei den ET-Thrombozyten gegenüber den Kontrollen. (87)

Aber auch hier ist der Einfluss der Thrombozytenkonzentration bzw. anderer Zellen im Vollblut nicht zu vernachlässigen. Die Hyperaggregabilität scheint jedoch unabhängig von der ASS-Therapie und damit unabhängig von der positiven Feedbackwirkung des TxA_2 zu sein, wie auch die Ergebnisse der Arachidonsäure-induzierten Aggregation gezeigt haben. Dagegen könnte die Einnahme von HU Einfluss auf die TRAP-induzierte Aggregation haben. Studien, die sich mit dem Einfluss von HU auf die Thrombozytenfunktion beschäftigen, sind rar und nur eingeschränkt aussagekräftig.

So führten Tsantes et al. (88) diesbezüglich eine Studie mit 39 ET-Patienten durch, die in zwei Gruppen entsprechend ihrer Thrombozytenkonzentration (Grenze: $500 \times 10^9/\text{l}$) eingeteilt wurden. Die Patienten erhielten unterschiedliche zytoreduktive Therapien (HU, Anagrelid, Interferon), wobei die Gruppe mit einer Thrombozytenkonzentration unter $500 \times 10^9/\text{l}$ zum größten Teil HU einnahm. Untersucht wurde dabei mittels LTA in verdünnten PRP die Aggregation, mittels Immunoassay die vWF-Aktivität und -Antigenkonzentration und die Verschlusszeit („closure time“) mittels PFA-100. Die Ergebnisse zeigten in der Gruppe mit annähernd normaler Thrombozytenkonzentration ($<500 \times 10^9 \text{ TZ/l}$) eine signifikant erhöhte vWF-Aktivität und ein signifikant erhöhtes vWF-Aktivität/vWF-Antigen-Ratio, sowie eine signifikant höhere mit 0,1 mmol/l Epinephrin-induzierte Aggregation gegenüber der Gruppe mit höherer Thrombozytenkonzentration ($>500 \times 10^9 \text{ TZ/l}$). Die Autoren schlussfolgerten daraus einen Einfluss der reduzierten Thrombozytenkonzentration auf die Thrombozytenfunktion. Bei

der multivariablen Analyse bezüglich der zytoreduktiven Therapie konnte jedoch kein Einfluss festgestellt werden und auch eine *JAK2*-Mutation zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die *ex vivo* Funktionstests. (88)

Diese Ergebnisse zeigen entgegengesetzte Tendenzen zu den Beobachtungen in dieser Arbeit, bei der die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU eine stärkere Aggregation aufwiesen, als Patienten mit HU-Therapie oder *CALR*-Mutation. Lediglich die höhere vWF-Aktivität unter HU-Therapie zeigte sich auch in der Patientenkohorte dieser Arbeit (Mittelwerte: *JAK2*+HU: 115,33%; *JAK2*-HU: 70,67%).

Ebenfalls beschäftigten sich Trelinski und Kollegen mit der Wirkung von HU auf die Thrombozyten von ET-Patienten (89). Sie untersuchten dabei die Wirkung von ASS und HU auf die Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen und die P-Selektin Expression vor und nach Therapiebeginn mittels Flowzytometrie. Dabei zeigte sich bei den ET-Patienten, die mindestens 4 Wochen HU eingenommen hatten und dadurch eine Reduktion der Thrombozytenkonzentration auf unter $400 \times 10^9/l$ (komplette Resonanz) bzw. auf unter $600 \times 10^9/l$ (partielle Resonanz) erreichten, eine nicht signifikant erhöhte P-Selektin Expression nach Erreichen des Therapieziels als vor Therapiebeginn. Damit war die Aktivität der Thrombozyten, gemessen am Aktivitätsparameter P-Selektin, vor Therapiebeginn niedriger als mit HU-Einnahme. (89)

Auch dieses Ergebnis spiegelt nicht meine gemessene TRAP-induzierte Hyperaggregabilität bei den *JAK2*-positiven Patienten ohne HU wider. Dies zeigt jedoch, dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um den Einfluss von HU auf die Thrombozytenfunktion zu bestimmen, da dies ein wichtiger Einflussfaktor sein könnte.

Bei den *Calreticulin*-positiven Patienten, unabhängig von der HU- und ASS-Einnahme war die TRAP-induzierte thrombozytäre Aggregation nicht vorhanden bzw. bei den *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU- und ASS-Therapie (n=3) stark reduziert. Bei Verwendung der hohen TRAP-Konzentration kam es bei keiner der Patientengruppen zu einer Normalisierung auf Werte oberhalb des Cut-Offs. Jedoch lagen die Mediane der thrombozytären Aggregation bei den *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Therapie unabhängig von der ASS-Einnahme nur wenig unterhalb des Cut-Offs (*CALR*/+HU/-ASS: 47%; *CALR*/+HU/+ASS: 51%). Der Vergleich der *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU- und ASS-Therapie mit der Kontrollgruppe mit ASS war zudem statistisch auffällig ($p=0,002$). Die Ergebnisse deuten auf eine TRAP-induzierte Hypoaggregabilität der Thrombozyten der *Calreticulin*-positiven Patienten unabhängig von HU- und ASS-Therapie hin. Jedoch gab es jeweils nur einen Patienten in der Gruppe der *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-, aber ohne ASS-Einnahme und in der Gruppe der *Calreticulin*-positiven Patienten ohne HU-, aber mit ASS-Therapie. Auch hier zeigt sich die Hypoaggregabilität unabhängig von der ASS-Einnahme

und damit von der TxA_2 -Wirkung. Dagegen könnte die *Calreticulin*-Mutation Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Thrombozyten der ET-Patienten haben.

So zeigten Hauschner et al. in ihrer Studie, dass die Thrombozyten von *Calreticulin*-positiven ET-Patienten weniger reaktiv sind als von *JAK2*-positiven ET-Patienten (90). Dazu untersuchten sie 20 ET-Patienten (12 *JAK2*⁺ und 7 *CALR*⁺) und 13 Kontrollprobanden hinsichtlich der Thrombozytenaktivierung mit und ohne Stimulation, die Ausbreitung der Thrombozyten („Spreading“) und weitere Marker. Bei den genannten Parametern zeigten sich klare Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Mutationstypen. So war die im PRP mittels Flowzytometrie gemessene Thrombozytenaktivierung unter basalen Bedingungen zwischen ET-Patienten und Kontrollen ähnlich. Bei Stimulation mit 10 μ M ADP jedoch zeigte sich bei den *Calreticulin*-positiven Patienten ein signifikant reduzierter Thrombozytenaktivierungsstatus gegenüber den *JAK2*-positiven ET-Patienten und den Kontrollen. Auch das Thrombozyten-Spreading, welches mittels IRMikroskop ermittelt wurde, war bei den *Calreticulin*-positiven Patienten signifikant reduziert. Nur 54% der anhaftenden Thrombozyten der *Calreticulin*-positiven Patienten erreichte die volle Ausbreitung, während 78% der Thrombozyten der *JAK2*-positiven ET-Patienten und 90% der Kontrollthrombozyten die volle Ausbreitung zeigten. (90)

Dies kann zu einer Hypoaggregabilität bei den *Calreticulin*-positiven ET-Patienten führen, wie in dieser Arbeit gezeigt. Jedoch erklärt es nicht spezifisch die TRAP-induzierte Hypoaggregation.

Dahingehend liefern Zini et al. (91) mit ihrer Arbeit einen Ansatz. Sie untersuchten und analysierten bei 24 ET-Patienten (17 *JAK2*⁺ und 7 *CALR*⁺) und 15 Kontrollprobanden die Gene und das mRNA Expressionsprofil der CD34⁺-Knochenmarkszellen. Eines ihrer Ergebnisse zeigte eine Runterregulation von Proteinen, die in die Signalwege von Thrombin und Rho A involviert sind und somit die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten regulieren. (91)

Dies könnte eine Erklärung für die TRAP-induzierte Hypoaggregabilität bei allen *Calreticulin*-positiven Patienten in dieser Arbeit sein. Es fällt zudem in den Ergebnissen auf, dass die Aggregationswerte der *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Therapie unabhängig von der ASS-Einnahme bei der hohen TRAP-Konzentration nur knapp unterhalb des Cut-Offs lagen. Zini und Kollegen fanden dahingehend bei ihrer Analyse bei den *Calreticulin*-positiven Knochenmarkszellen eine Hochregulation von Transkriptionsfaktoren der Megakaryozyten und eine Runterregulation von Inhibitoren, die zu einer vermehrten Differenzierung der CD34⁺-Zellen zu Megakaryozyten führen, was wiederum die signifikant höhere Thrombozytenkonzentration bei *Calreticulin*-positiven Patienten gegenüber *JAK2*-positiven ET-Patienten erklären kann (91).

Betrachtet man diesen Aspekt, so könnte eine Reduktion der Thrombozytenkonzentration durch HU zu einer besseren Thrombozytenfunktion bei den *Calreticulin*-positiven Patienten

führen, wie oben bereits beschrieben Tsantes et al. in ihrer Studie schlussfolgerten (88). In ihrer Studie wurden jedoch hauptsächlich JAK2-positive ET-Patienten untersucht und nur die Epinephrin-induzierte Aggregation zeigte sich in der Gruppe mit annähernd normaler Thrombozytenkonzentration ($500 \times 10^9/l$) verbessert (88), sodass die Studie nur eingeschränkt aussagekräftig ist bezogen auf die Ergebnisse dieser Arbeit.

Auch muss man bedenken, dass es in meiner Arbeit zum Vergleich nur ein *Calreticulin*-positiven Patienten ohne HU-Einnahme gab. Jedoch scheint es ein wichtiger Ansatz zu sein, die Wirkung von HU oder anderer zytoreduktiver Therapien bei *Calreticulin*-positiven ET-Patienten auf die Thrombozytenfunktion zu untersuchen und so das Therapiekonzept zur Risikominimierung für diese Patientengruppe gegebenenfalls zu verbessern.

Zusammenfassend zeigte die TRAP-induzierte Aggregation bei den JAK2-positiven Patienten bereits Unterschiede bei der intermediären Konzentration. Die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten mit HU-Einnahme unabhängig von der ASS-Therapie reagierten stark vermindert, während die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten ohne HU und unabhängig von der ASS-Einnahme stärker als die Thrombozyten der jeweiligen Kontrollgruppe aggregierten. Bei Verwendung der hohen TRAP-Konzentration ergab sich eine Normalisierung der thrombozytären Aggregation bei den JAK2-positiven Patienten mit HU- und ASS-Therapie, während es in der Gruppe der JAK2-positiven Patienten mit HU und ohne ASS im Median zu Aggregationswerten knapp unterhalb des Cut-Offs kam. Die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten ohne HU-Einnahme unabhängig von der ASS-Therapie erreichten Aggregationswerte über dem Cut-Off und deuten damit auf eine Hyperaggregabilität der Thrombozyten hin. Die Gruppe der *Calreticulin*-positiven Patienten reagierte mit ihren Thrombozyten unabhängig von der medikamentösen Therapie (HU und ASS) bei der intermediären Konzentration reduziert bis gar nicht. Und auch bei Verwendung der hohen TRAP-Konzentration kam es zu keiner Normalisierung der thrombozytären Aggregation bei den *Calreticulin*-positiven Patienten unabhängig von HU- und ASS- Einnahme.

Tabelle 20: Zusammenfassung der medianen TRAP-6-induzierten Aggregationswerte in der Lumiaggregometrie mittels Chronolog (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, μM = Mikromolar, $\emptyset$ – keine Reaktion, * - Abweichung eines Patienten mit entgegengesetzter Tendenz zum Median der Gruppe, ° - variable Aggregationswerte, (%) – medianer Aggregationswert in % bei Besonderheiten)

			n	TRAP-6	
				10 μM	50 μM
JAK2	+ HU	- ASS	3	(9%)	< 60% (52%)
		+ ASS	3	(2%)	> 60%
	- HU	- ASS	4	(39%)	> 60%
		+ ASS	4	(31,5%)°	> 60%
CALR	+ HU	- ASS	1	$\emptyset$	< 60% (47%)
		+ ASS	3	(12%)°	< 60% (51%)
	- HU	+ ASS	1	$\emptyset$	< 60% (15%)
Kontrollen		- ASS	9	(35%)°	> 60%
		+ ASS	9	(20%)°	> 60%

5.1.3 KOLLAGEN-INDUZIERTE AGGREGATION VON THROMBOZYTEN BEI ET-PATIENTEN

Kollagen ist, als Makromolekül der extrazellulären Matrix (39), nicht nur wichtig für die Aktivierung der Thrombozyten, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle in der Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten über seine verschiedenen Rezeptoren wie $\alpha_2\beta_1$ Integrin (GPIa-IIa) (43), CD36 (GPIV) (44) und GPVI (P62) (45, 46). In der Lumiaggregometrie lässt sich mittels Kollagen als Agonist Defekte der Rezeptoren, wie auch deren Signalwege detektieren (80, 81).

Bei der Kollagen-induzierten Aggregation zeigten die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS bei der intermediären Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ zunächst eine reduzierte aber variable Aggregation, die sich bei Verwendung der hohen Kollagen-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ auf über 60% normalisierte. Denselben Effekt der Normalisierung der thrombozytären Aggregation bei Zugabe der höheren Kollagen-Konzentration im Vergleich zur intermediären Konzentration zeigte auch die Kontrollgruppe mit ASS. Die fehlende positive Feedbackwirkung des TxA_2 spielt damit keine essentielle Rolle und kann bei Verwendung der hohen Kollagen-Konzentration umgangen werden (80).

Die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten mit HU- und ASS-Einnahme (n=3) zeigten bei Zugabe der intermediären Konzentration ebenfalls eine reduzierte Aggregationsreaktion. Zudem kam es zu keiner Normalisierung der thrombozytären Aggregation bei der Verwendung der hohen Kollagenkonzentration. Dies war auch statistisch auffällig ($p=0,0026$) beim Vergleich mit der Kontrollgruppe mit ASS.

Bei den *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU- und ASS-Therapie (n=3) war die Kollagen-induzierten Aggregation der Thrombozyten bei Zugabe der intermediären Konzentration stark reduziert und zeigte bei der hohen Kollagenkonzentration keine Normalisierung auf Werte über 60%. Dies war ebenfalls statistisch auffällig ($p=0,0001$).

Der *Calreticulin*-positive Patient ohne HU-, aber mit ASS-Therapie (n=1) zeigte ebenso eine kaum vorhandene thrombozytäre Aggregationsreaktion auf die intermediäre Kollagenkonzentration. Bei Verwendung der hohen Kollagenkonzentration kam es zudem auch hier zu keiner Normalisierung.

Die reduzierte Aggregation der Thrombozyten bei Zugabe der niedrigen Kollagenkonzentration kann auf die fehlende Feedbackwirkung des TxA_2 durch Einnahme von ASS bedingt sein (80). Jedoch sollte es dann zu einer Normalisierung der Aggregation bei Verwendung der hohen Konzentration kommen, da vermehrt die GPVI Rezeptoren aktiviert werden und zudem die Integrine $\alpha_2\beta_1$ ihre Wirkung zeigen (80). Somit könnte ein Defekt des GPVI oder des Integrins $\alpha_2\beta_1$ und/oder deren Signalwege vorliegen. Um selektiv den Defekt von GPVI zu untersuchen, kann CRP („Collagen related peptide“) (80) oder Convulxin (48) verwendet werden.

Boulaftali et al. erörtern in ihrem Buchkapitel dazu verschiedene Studien, die Defekte der Signalproteine des GPVI-Signalweges aufdecken, die zu einem Defekt der Thrombozytenfunktion durch eine reduzierte Kollagen-induzierte Thrombusformation *in vitro* führen (92). Dagegen werden nur wenige Defekte des GPVI-Rezeptors in der Literatur beschrieben. Meistens sind Autoantikörper dafür verantwortlich (93-95). Es wurden aber auch Patienten mit einer vererbten Blutungerkrankung beschrieben, die mit einer Mutation des Kollagenrezeptors GPVI assoziiert wurde (96, 97). Bei allen diesen Studien werden nur milde Blutungskomplikationen beschrieben.

In einer weiteren Dissertation von Frau Dr. A. Huang (98) wurde die GPVI-vermittelte Thrombozytenaktivierung induziert durch Convulxin durchflusszytometrisch in der AG von [REDACTED] untersucht.

Defekte des Integrin $\alpha_2\beta_1$, die zu einer reduzierten Kollagen-induzierten Aggregation führen, sind in der Literatur rar. Im Gegenteil, Scharf erörtert in seinem Buchkapitel vor allem prothrombotische Rezeptorvarianten des Integrins $\alpha_2\beta_1$ (10).

Studien mit ET-Patienten zeigen häufig ebenfalls eine Kollagen-induzierte Hypoaggregabilität. So zeigte sich bei Lussana et al. (87) bei der Untersuchung von 24 ET-Patienten (17 *JAK2*+) mit ASS-Einnahme gegenüber 29 Kontrollprobanden mit ASS-Einnahme bei der Kollagen-

induzierten Aggregation (2 und 5 µg/ml) eine reduzierte Aggregation der ET-Thrombozyten in verdünnten und auch unverdünnten PRP. (87)

Auch Polokhov und Kollegen stellten eine reduzierte Aggregation im PRP bei Verwendung von 0,06 mg Kollagen fest. Ihre Studienkohorte bestand dabei aus 20 Kindern mit ET (13 triple-negativ, 3 JAK2+, 4 CALR+), die sie mit 14 gesunden Kindern verglichen. (99)

Welche Ursache diese Kollagen-induzierte Hypoaggregabilität der Thrombozyten bedingt, bedarf weiterer Abklärung. Jedoch zeigte sich, dass diese Hypoaggregation unabhängig von der Mutation und der HU-Therapie, aber im Zusammenhang mit der ASS-Einnahme in dieser Studienkohorte war.

Die Gruppe der JAK2-positiven Patienten ohne HU-, aber mit ASS-Therapie (n=4) zeigten mit ihren Thrombozyten bei der Kollagen-induzierten Aggregation unter Zugabe der intermediären Konzentration im Median eine reduzierte Reaktion. Jedoch gab es einen Patienten, dessen Thrombozyten eine maximale Aggregation von über 60% erreichten. Auch bei Verwendung der hohen Kollagenkonzentration lag der Median der thrombozytären Aggregation unterhalb des Cut-Offs (Median: 47,5%). Aber auch hier zeigte der oben erwähnte Patient thrombozytäre Aggregationswerte von über 60% und damit eine Normalisierung. Im Median zeigte sich eine Kollagen-induzierte Hypoaggregabilität der Thrombozyten, die auch statistisch auffällig war (p=0,0413). Mögliche Ursachen sind im oberen Abschnitt bereits diskutiert. Der eine Patient, dessen Thrombozyten jedoch eine Hyperaggregabilität auf Kollagen, wie auch auf TRAP und Arachidonsäure trotz ASS-Therapie zeigte, bedarf weiterer Untersuchungen, die, vor allem hinsichtlich einer möglichen Risikominimierung, Bedeutung haben können.

Auch die JAK2-positiven Patienten mit HU-, aber ohne ASS-Therapie (n=3) zeigten bei Verwendung von Kollagen mit der intermediären Konzentration eine reduzierte thrombozytäre Aggregation, die sich bei Zugabe der hohen Kollagenkonzentration ebenfalls nicht normalisierte, wobei der Median nur knapp unterhalb des Cut-Offs lag mit 55%. Jedoch zeigte sich der Vergleich mit der entsprechenden Kontrollgruppe ohne ASS statistisch auffällig (p=0,0218). Defekte der Kollagenrezeptoren und deren Signalwege, die zu der reduzierten Aggregation der Thrombozyten trotz hoher Kollagenkonzentration führen könnten, sind im oberen Abschnitt diskutiert. Jedoch fällt bei dieser Patientengruppe auf, dass keine ASS-Therapie bestand im Gegensatz zu den Patientengruppen in den oberen Abschnitten. Daher könnte hier die Feedback Wirkung des TxA₂ eine entscheidende Rolle für die reduzierte Aggregation der Thrombozyten spielen. Die JAK2-positiven Patienten mit HU-, aber ohne ASS-Therapie zeigten bereits bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation eine statistisch auffällig reduzierte thrombozytäre Aggregation. Defekte des TP-Rezeptors oder des Signalweges könnten daher mit Einfluss haben. Vor allem, da der Median nur knapp unterhalb des Cut-Offs liegt.

Bei den *JAK2*-positiven Patienten ohne HU- und ohne ASS-Therapie (n=4) zeigte sich bei der Verwendung der intermediären Kollagenkonzentration niedrig variable Aggregationswerte der Thrombozyten, die im Median geringer waren als bei der Kontrollgruppe ohne ASS. Bei Zugabe der hohen Kollagenkonzentration zeigte sich wiederum eine Normalisierung der thrombozytären Aggregation oberhalb des Cut-Offs. Der *Calreticulin*-positive Patient mit HU-, aber ohne ASS-Therapie (n=1) zeigte mit seinen Thrombozyten bei Zugabe der intermediären Konzentration eine stark reduzierte Aggregation. Diese normalisierte sich jedoch ebenfalls bei Verwendung der hohen Kollagenkonzentration. Damit gab es keine Hinweise auf eine Störung des Kollagen-Rezeptors oder -Signalweges der Thrombozyten dieser beiden Patientengruppen.

Zusammenfassend fielen bei der Kollagen-induzierten Aggregation in allen Patientengruppen bei Verwendung der intermediären Konzentration reduzierte bis nicht vorhandene Aggregationsreaktionen der Thrombozyten auf. Zu einer Normalisierung der Aggregation bei Zugabe der hohen Kollagenkonzentration kam es jedoch nur bei den Thrombozyten der *JAK2*-Patienten ohne HU- und ASS-Einnahme, sowie bei den Thrombozyten der *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-, aber ohne ASS-Einnahme. In der Gruppe der *JAK2*-positiven Patienten mit HU- und ohne ASS-Einnahme lag zudem der Median der thrombozytären Aggregation nur knapp unter 60%. Der statistische Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne ASS war jedoch auffällig, sodass nicht von einer Normalisierung gesprochen werden kann. Die Thrombozyten der *JAK2*- und *Calreticulin*-positiven Patienten mit ASS-Einnahme unabhängig der HU-Therapie zeigten keine Normalisierung unter Zugabe der hohen Kollagenkonzentration. Auffällig war hier nur ein Patient in der Gruppe der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-, aber mit ASS-Einnahme, dessen Thrombozyten sowohl bei der intermediären wie auch bei der hohen Kollagenkonzentration Aggregationswerte über 60% aufwies. Dieser Patient bedarf besonders weiterer Untersuchungen.

Tabelle 21: Zusammenfassung der medianen Kollagen-induzierten Aggregationswerte in der Lumiaggregometrie mittels Chronolog (JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, µg = Mikrogramm, ml = Milliliter, * - Abweichung eines Patienten mit entgegengesetzter Tendenz zum Median der Gruppe, ° - variable Aggregationswerte, (%) – medianer Aggregationswert in % bei Besonderheiten)

			n	Kollagen	
				2 µg/ml	10 µg/ml
JAK2	+ HU	- ASS	3	(2%)	< 60% (55%)
		+ ASS	3	(3%)	< 60%
	- HU	- ASS	4	(20%)°	> 60%
		+ ASS	4	(1,5%)°	< 60% (47,5%)
CALR	+ HU	- ASS	1	(5%)	> 60%
		+ ASS	3	(2%)	< 60%
	- HU	+ ASS	1	(1%)	< 60%
Kontrollen		- ASS	9	(35%)°	> 60%
		+ ASS	9	(2%)	> 60%

5.1.4 DELTA-STORAGE POOL DEFICIENCY IN DER ET

Neben den oben beschriebenen Agonisten-induzierten Störungen der Thrombozytenaggregation, können auch Defekte der Thrombozytengranula zu Störungen der Aggregation beitragen. Dabei sind ADP und ATP in großen Mengen in den dichten Granula (δ-Granula) der Thrombozyten gespeichert und werden bei Aktivierung durch Sekretion freigesetzt (41).

Ist die Zahl der Granula oder deren Inhalt reduziert, so spricht man von einem „delta storage pool disease“ (δ-SPD, delta Speicherpool Erkrankung). Diese seltene heterogene Gruppe von angeborenen oder erworbenen Thrombozytenerkrankungen, kann ein isolierter Thrombozytendefekt sein oder Teil eines komplexen Syndroms wie das Hermannsky-Pudlak Syndrom oder das Chediak-Higashi Syndrom. Bei hämatologischen Malignitäten, wie der ET, kann es sekundär als erworbene Erkrankung auftreten. (100, 101)

In meiner Arbeit wurde nur die ADP- und ATP-Freisetzung bei einer maximalen Aggregation von > 45% in die Auswertung aufgenommen, da nur bei ausreichender Aktivierung und Aggregation von einer ausreichenden Granulafreisetzung ausgegangen werden kann (41).

Bei der Untersuchung setzten die Thrombozyten der ET-Patienten erst ab einer Aggregation von > 45% ATP frei. Bei den Patienten ohne ausreichende Aggregation müssen weitere

Untersuchungen wie ein Mepacrine-Test, welcher im Rahmen einer anderen Doktorarbeit der Arbeitsgruppe von [REDACTED] durchgeführt wurde, oder die Untersuchung mittels Elektronenmikroskopie erfolgen, um sicher ein SPD zu detektieren und um auch zwischen quantitativen und qualitativen δ -SPD zu unterscheiden (100).

Die Ergebnisse meiner Untersuchung zeigten, dass alle Patienten aller Patientengruppen unabhängig von der zytoreduktiven Therapie mit HU deutlich weniger thrombozytär freigesetzte ADP- und ATP-Mengen bei Stimulation mit hohen Konzentrationen an TRAP (50 μ M) und Kollagen (10 μ g/ml) aufwiesen als die Kontrollgruppe ohne ASS-Einnahme. Auch die Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme zeigte reduzierte thrombozytär freigesetzte ADP- und ATP-Mengen im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS, was die Wichtigkeit des positiven Feedback-Mechanismus des TxA₂ für die Granulafreisetzung zeigt (41). Jedoch waren diese freigesetzten Mengen im Vergleich zu denen der Patientengruppen trotzdem größer. Verschiedene Autoren beschrieben ähnliche Tendenzen.

So konnten Löfvenberg und Nilsson eine reduzierte ATP-Freisetzung induziert durch 2 μ g Kollagen bei den Thrombozyten von ET-Patienten feststellen. Dabei waren vor allem die thrombozytär freigesetzten ATP-Mengen von ET-Patienten unter HU-Therapie reduziert (<0,6 μ mol/l). (9)

Auch Lussana et al. stellten in ihrer Studie reduzierte Adeninnukleotid-Inhalte (ADP, ATP) der Thrombozyten von ET-Patienten fest. Sie stimulierten dazu die Thrombozyten mit ADP (4 μ M), Kollagen (2 und 5 μ g/ml), TRAP-14 (10 μ M), Adrenalin (5 μ M) und U466619 (1 μ M), ein TxA₂ Mimetikum. (102)

Leoncini et al. induzierten die Nukleotidsekretion bei den Thrombozyten mit 5 U/ml Thrombin. Zusätzlich hatten sie die Konzentration von ATP und ADP im Zytosol durch Zelllyse gemessen. Es kristallisierten sich in ihrer Studie zwei Gruppen von ET-Patienten heraus. Gruppe 1 erreichte normale ADP- und ATP-Konzentrationen in den Granula und im Zytosol der Thrombozyten. Gruppe 2 dagegen zeigte signifikant niedrigere Konzentrationen in den Granula und im Zytosol gegenüber den Kontrollen. (103)

Bei der Verwendung von TRAP-6 zeigten in meiner Untersuchung 84% der ET-Patienten eine reduzierte ATP-Freisetzung, bei Kollagen 58% (ATP-Konzentration) bzw. 53% (ADP-Konzentration) der ET-Patienten. Coucelo et al. fanden in ihrer Studie bei 47% der ET-Patienten ein SPD (11).

Neben einer reduzierten Aggregation, sowie geringerer freigesetzter Adeninnukleotidmengen kann auch ein erhöhtes ATP/ADP-Ratio ein diagnostisches Zeichen für ein δ -SPD sein (100-102). In meiner Untersuchung ergab sich bei den JAK2-positiven Patienten mit ASS-Einnahme unabhängig von der HU-Therapie (mit HU: 1,0/ ohne HU: 0,875) ein ähnliches ATP/ADP-Ratio der Thrombozyten wie bei den Kontrollen mit ASS (0,87) und ohne ASS (0,81). Auch der *Calreticulin*-positive Patient mit HU und ohne ASS-Einnahme, als einziger Vertreter mit

Calreticulin-Mutation, erzeugte mit seinen Thrombozyten ein ähnliches ATP/ADP-Ratio von 1,0. Auffällig waren dagegen die deutlich erhöhten ATP/ADP-Ratio's der Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten ohne ASS-Einnahme unabhängig von der HU-Therapie (mit HU: 1,93/ ohne HU: 4,46). Diese weisen stark auf ein δ -SPD hin (100-102).

Zusammenfassend ist die stark erniedrigte ATP- wie auch ADP-Freisetzung der Thrombozyten aller Patientengruppen auffällig und würde zu der hohen Zahl an Blutungskomplikationen in der Studienkohorte passen, die bei 83% der *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie, 87,5% der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie und 50% der *CALR*-positiven Patienten mit HU-Therapie auftraten. Zudem findet sich bei den *JAK2*-positiven Patienten ohne ASS-Einnahme unabhängig von der HU-Therapie ein stark erhöhtes ATP/ADP-Ratio.

5.2 DIFFERENZIERTE THROMBINGENERIERUNG DER THROMBOZYTEN VON ET-PATIENTEN

Neben Störungen der Aggregation, können auch Dysfunktionen der Thrombingenerierung zu Komplikationen wie Thrombosen oder Blutungen führen. Zur Evaluation möglicher Störungen der thrombozytären Thrombinbildung in ET-Patienten wurde daher mittels CAT im PRP in Abhängigkeit verschiedener Trigger (TF, Thrombin und Convulxin) und unter basalen Bedingungen, sowie im PFP nach TF-Gabe die Thrombingenerationsparameter („lag time“, „ttPeak“, „Thrombin Peak“ und „ETP“) ermittelt. Die Messung der Thrombingenerierung stellt dabei ein wichtiges Werkzeug zur Bewertung der Thrombozytenfunktion dar (104). Auch kann durch die Messung der *ex vivo* Thrombingenerierung die endogene Kapazität des gesamten hämostatischen Systems evaluiert werden und somit auf ein Thrombose- oder Blutungsrisiko deuten (105). So stellten Al Dieri et al. in ihrem Review beim Vergleich verschiedener Studien eine hohe Korrelation zwischen einem hohem „ETP“ in PPP induziert durch TF und dem Auftreten von venösen Thrombosen fest (106-108). Auch wurde ein hohes „ETP“ in PPP durch TF induziert mit einem erhöhten Risiko für ischämische Schlaganfälle assoziiert (106, 109, 110) und stellt zudem einen guten Indikator für prothrombotische Tendenzen dar (76, 77). Die Studienlage zur Thrombingenerierung im PRP ist jedoch noch geringer, wie auch Panova-Noeva et al. in ihrem Review zeigte (110). Es zeigten jedoch Studien zu verschiedenen Erkrankungen eine erhöhte Thrombingenerierung im PRP, wie bei jungen Strokepatienten (111), bei (akuter) tiefer Venenthrombose (112, 113) oder auch bei den myeloproliferativen Neoplasien, wie der ET (114, 115). Auch zu Blutungsdiatesen finden sich Experimente mit dem CAT im PRP. Dabei wurde vor allem die von-Willebrand-Erkrankung untersucht und eine reduzierte Thrombinbildung festgestellt (116).

5.2.1 DIFFERENZIERTE THROMBINGENERIERUNG DER THROMBOZYTEN VON ET-PATIENTEN IM PRP IN ABHÄNGIGKEIT VOM TRIGGER (TF, THROMBIN, CONVULXIN)

Experimente zur Thrombingenerierung im PRP können am besten die Interaktionen der Thrombozyten mit dem Gerinnungssystem abbilden (76). Dabei ist die Thrombinbildung abhängig von den Thrombozyten und ihrer Aktivierung, wie auch von der Konzentration an bekannten und unbekannten Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren, sowie von Plasmaproteinen, die die Reaktionen modulieren (77, 106). Aber die Wirkung von Medikamenten, wie ASS, können mittels CAT-Methode evaluiert werden (76).

Die Ergebnisse meiner Messungen zeigen unter basalen Bedingungen eine verlängerte „ttPeak“ bei den Thrombozyten der Kontrollen mit ASS (n=9) gegenüber den Kontrollen ohne ASS (n=7). Auch der „Thrombin Peak“ und das „ETP“ sind in der Kontrollgruppe mit ASS niedriger als bei den Kontrollen ohne ASS. Dies könnte auf die Wirkung des ASS zurückzuführen sein, wodurch die fehlende positive Feedbackwirkung der TxA₂ zu einer reduzierten Aggregation und im Folgenden zu einer geringeren Thrombinbildung führen könnte (41).

Bei den JAK2-positiven Patienten mit HU-Therapie (n=5) zeigte sich dagegen ein gemischtes Bild. So war lediglich die „lag time“ gegenüber den Kontrollen ohne ASS verlängert, während der „Thrombin Peak“ median höher gegenüber den Kontrollen mit ASS lag. Das „ETP“ dagegen war gegenüber dem der Thrombozyten der Kontrollen mit und ohne ASS niedriger. Auch die statistische Analyse zeigte keine klaren Tendenzen beim Vergleich der JAK2-positiven Patienten mit HU gegenüber den beiden Kontrollgruppen. Aussagen über mögliche Störungen oder beeinflussende Faktoren können hier ohne Tendenzen nicht getroffen werden.

In der Gruppe der JAK2-positiven Patienten ohne HU-Einnahme (n=6) zeigte sich dagegen eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“ im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Und auch der „Thrombin Peak“ und das „ETP“ waren niedriger als bei den Kontrollen mit und ohne ASS. Dies war statistisch auffällig für die „lag time“, den „Thrombin Peak“ und das „ETP“ im Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS und beim „ETP“ im Vergleich mit den Kontrollen mit ASS. Diese Ergebnisse können die von einigen Wissenschaftlern, wie Falanga et al. (17, 117), aufgestellte Hypothese unterstützen, bei der man *in vitro* erschöpfte Thrombozyten in ET-Patienten vermutet. Verschiedene Studien zeigten dahingehend meist anhand der Messung von P-Selektin unter basalen Bedingungen eine erhöhte *in vivo* Aktivität in ET-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden (12, 89, 90). Auch in einer weiteren Dissertation von Frau Dr. A. Huang (98) in der AG von [REDACTED] wurde eine erhöhte Thrombozytenaktivität mittels durchflusszytometrischer P-Selektin-Bestimmung in ET-Patienten festgestellt. Die hier gezeigte basal reduzierte Reaktion der Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten ohne HU

und damit basale *in vitro* Hypofunktion könnte somit Zeichen der Erschöpfung der *in vivo* Aktivität sein.

Die *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Therapie (n=3) zeigten ebenfalls Tendenzen. Ihre Thrombozyten zeigten eine verlängerte „lag time“, sowie „ttPeak“ gegenüber beiden Kontrollgruppen. Im Gegensatz dazu waren die medianen „Thrombin Peaks“ und „ETPs“ aber höher als bei den Kontrollen mit und ohne ASS. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch auffällig bei der Analyse. Dass es zu einer erhöhten Thrombinbildung ohne Zugabe eines Triggers bei dieser Patientengruppe kam, könnte durch Mikropartikel (MP) erklärt werden, die einen Einfluss auf die Hämostase haben.

Sie werden von aktivierten Zellen als 0,1 bis 1 µm große Membranfragmente freigesetzt. Auf ihrer Oberfläche befinden sich Aminophospholipide sowie TF. Damit stellen sie eine wichtige prokoagulante Oberfläche dar und können somit in die Hämostase und auch Thrombogenese involviert sein. (14)

Trappenburg et al. (15) sowie Villmow et al. (16) fanden eine erhöhte Zahl von MP im peripheren Blut von ET-Patienten, die wiederum eine erhöhte Thrombingenerierung („Thrombin Peak“) im PPP von ET-Patienten, getriggert durch TF und Phospholipide, erzeugten. (15)

Auch andere Studien zeigten den Einfluss von MP in der ET. Jedoch fanden Charpentier und Kollegen bei der Untersuchung von 74 ET-Patienten, darunter 45 *JAK2*-positive, 15 *Calreticulin*-positive und 12 Triple-negative Patienten jeweils ohne HU-Therapie, mittels Flowzytometrie eine erhöhte MP-Zahl bei den *JAK2*-positiven Patienten gegenüber den *JAK2*-negativen Patienten. (118)

Und auch die MP-assoziierte prokoagulante Aktivität, die mittels CAT und MP-Aktivitätsassay gemessen wurde, war bei den *JAK2*-positiven Patienten erhöht im Vergleich zu den beiden anderen Patientengruppen (118). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Marchetti et al (119). Dies passt jedoch nicht zu den hier unter basalen Bedingungen ermittelten Ergebnissen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Tabelle 22: Vergleich der medianen Parameter der Thrombozyten im PRP mittels CAT unter basalen Bedingungen (PRP = Plättchen-reiches Plasma, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential)

basal		n	„lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+HU	5	> -ASS ~ +ASS	~ -ASS ~ +ASS	~ -ASS > +ASS	< -ASS < +ASS
	-HU	6	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	< -ASS < +ASS	< -ASS < +ASS
CALR	+HU	3	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS
	-HU	0	-	-	-	-
Kontrollen	-ASS/ +ASS	7/9	-ASS < +ASS	-ASS ~ +ASS	-ASS (>) +ASS	-ASS > +ASS

Bei Verwendung von 1 pM TF und anionischer Phospholipide zeigte sich bei den Kontrollen mit (n=10) und ohne ASS (n=10) jeweils ähnliche mediane Werte für die „lag time“, „ttPeak“ und den „Thrombin Peak“. Nur das „ETP“ war in der Kontrollgruppe ohne ASS leicht höher im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS. Die Einnahme von ASS und damit Hemmung der Thromboxansynthese scheint keinen Einfluss auf die TF-induzierte Thrombinbildung zu haben, wie auch Vanschoonbeek und Kollegen in ihrer Arbeit zeigten (120).

Auch unter diesen Versuchsbedingungen zeigte sich in der Gruppe der JAK2-positiven Patienten mit HU-Therapie (n=6) keine klare Tendenz. So war die „lag time“ gegenüber beiden Kontrollgruppen verlängert, der „Thrombin Peak“ dagegen höher als bei den Kontrollen mit und ohne ASS und das „ETP“ gering niedriger als bei den Kontrollen ohne ASS. In der statistischen Analyse war dabei nur der Vergleich der „lag time“ mit den Kontrollen ohne ASS auffällig. Dies spricht lediglich für eine verzögerte Initiierungsphase mit verstärkter Amplifizierung auf der Thrombozytenoberfläche, wie der erhöhte „Thrombin Peak“ zeigt (105, 120). Klare Tendenzen fehlen jedoch um konkrete Aussagen für diese Patientengruppe treffen zu können.

Die JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie (n=7) zeigten mit ihren Thrombozyten wiederum ähnliche Ergebnisse wie die Kontrollen mit ASS. Gegenüber den Kontrollen ohne ASS war nur das „ETP“ leicht höher. Die Thrombozyten dieser Patientengruppe scheinen

daher keine Störung bezüglich der TF-induzierten Thrombingenerierung bei ASS Therapie aufzuweisen.

Die *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Therapie (n=4) zeigten mit ihren Thrombozyten eine median verlängerte „lag time“ und „ttPeak“ im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Dies war auch statistisch auffällig. Dagegen lag der „Thrombin Peak“ bei den Thrombozyten der Patienten höher als bei beiden Kontrollgruppen, während das „ETP“ nur gegenüber den Kontrollen ohne ASS niedriger war. Auch hier scheint die Initiierungsphase verzögert zu sein, während die Amplifizierungsphase verbessert ist.

Dazu haben Vanschoonbeek et al. in ihrer Studie zur TF-induzierten Thrombingenerierung in PRP bei gesunden Probanden eine Erhöhung des „Thrombin Peaks“ um 36-59% bei zusätzlicher Stimulation von Gq-gekoppelten Rezeptoren wie P2Y, PAR-1 oder den TP-Rezeptor feststellt. Diese Stimulation führte auch zur Verkürzung der „lag time“ und „ttPeak“, sowie zur leichten Erhöhung des „ETP“. (120)

Es könnten jedoch bei den Thrombozyten der ET-Patienten differenzierte Effekte die Initiierungsphase stören und die Amplifizierungsphase trotzdem positiv beeinflussen. Auch hier sprechen die kinetischen Parameter für einer reduzierte TF-Aktivität (119).

Die Thrombozyten des *Calreticulin*-positiven Patienten ohne HU-Therapie (n=1) zeigten eine verkürzte „lag time“ und „ttPeak“ gegenüber den Kontrollen mit und ohne ASS-Einnahme. Dagegen waren jedoch die gebildeten Thrombinmengen („Thrombin Peak“ und „ETP“) niedriger als bei beiden Kontrollgruppen. Die schnelleren kinetischen Parameter („lag time“ und „ttPeak“) spiegeln eine hohe TF-Aktivität wider (119). Dagegen könnte die geringere Thrombinbildung auf eine erhöhte TFPI-Aktivität deuten, wie sie Ziolkowska und Kollegen in ihrer Studie bei 45 ET-Patienten gemessen haben (121). Dabei diskutierte Ziolkowska mit Hilfe anderer Studien, ob höhere TFPI-Konzentrationen möglicherweise ein Zeichen für einen kompensatorischen Mechanismus sind, der auf eine erhöhte Koagulation, induziert durch TF, deutet (121-123). Die geringe Patientenzahl in dieser Gruppe lassen jedoch keine konkreten Aussagen zu und benötigen weitere Untersuchungen, vor allem mit größerer Patientenzahl.

Tabelle 23: Vergleich der medianen Parameter der Thrombozyten im PRP mittels CAT unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden (PRP = Plättchen-reiches 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, ttPeak = „time to peak“ = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential)

TF		n	„lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+HU	6	> -ASS > +ASS	~ -ASS ~ +ASS	> -ASS > +ASS	(<) -ASS = +ASS
	-HU	7	~ -ASS ~ +ASS	~ -ASS ~ +ASS	~ -ASS = +ASS	(>) -ASS = +ASS
CALR	+HU	4	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	< -ASS ~ +ASS
	-HU	1	< -ASS < +ASS	< -ASS < +ASS	< -ASS (<) +ASS	< -ASS < +ASS
Kontrollen	-ASS/ +ASS	10/10	-ASS ~ +ASS	-ASS ~ +ASS	-ASS ~ +ASS	-ASS (>) +ASS

Unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin zeigten die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS (n=10) eine verkürzte „lag time“ und „ttPeak“ im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (n=10). Auch der „Thrombin Peak“ und das „ETP“ waren bei den Kontrollen mit ASS höher als bei den Kontrollen ohne ASS. Die Thrombinbildung war somit verbessert bei den Thrombozyten der Kontrollen mit ASS-Einnahme. Thrombozyten von Personen, die ASS einnehmen, können stimuliert durch potente Agonisten wie Thrombin trotzdem aggregieren (124, 125), wie die Ergebnisse der LTA auch gezeigt haben. Jedoch gibt es keine aktuelle Studie, die einen positiven Effekt von ASS auf die vor allem Thrombin-induzierte Thrombingenerierung zeigt, wie es meine Ergebnisse vermitteln. Undas et al. (124) konnten in ihrem Review nur Studien vorweisen, die mittels CAT eine reduzierte Thrombinbildung nach einmaliger ASS Einnahme (74) bzw. nach täglicher Einnahme von 300 mg ASS für einen Monat (126) zeigten. Es wurde in ihrem Review aber auch die mögliche Acetylierung von Plasmaproteinen durch ASS diskutiert, die jedoch wieder zu einer reduzierten Aggregation oder Thrombinbildung führen oder die Fibrinolyse unterstützen (124). Lediglich die von Villanueva und Allen (127) berichtete Acetylierung von Antithrombin konnte von Undas und Kollegen nicht eingeordnet werden (124). Diese könnte jedoch in Zusammenschau mit meinen Ergebnissen zu einer erhöhten Thrombingenerierung induziert durch Thrombin in der Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme beitragen. Weiterhin könnte die von Undas et al. (124) beschriebene Acetylierung von Fibrinogen oder Fibrin durch ASS zu einer verbesserten Bindung dieser Proteine an CD36

führen. Döhrmann et al. identifizierten dazu Fibrin als neuen CD36 Liganden, der zur Aktivierung von Thrombozyten und zur Thrombin-induzierten Thrombingeneration unter physiologischen und inflammatorischen Bedingungen, die zum Beispiel bei chronischen Nierenerkrankungen vorkommen, führen (128). Somit könnte auch dieser Ansatz bei ASS-Einnahme zur erhöhten Thrombinbildung beitragen.

Die Thrombozyten der *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie (n=6) zeigten eine verlängerte „lag time“ gegenüber den Kontrollen mit ASS, aber eine verkürzte „ttPeak“ im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Der „Thrombin Peak“ und das „ETP“ waren im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS höher. Dies war jedoch nicht statistisch auffällig. Im gesamten ähnelten die medianen Werte denen der Kontrollgruppe mit ASS. Wie oben bereits diskutiert gibt es zurzeit keine wissenschaftliche Literatur, die die verbesserte Thrombinwirkung vor allem unter ASS-Einnahme, wie die Hälfte (3 von 6 Patienten) der *JAK2*-positiven Patienten mit HU es als Co-Medikation einnimmt, erklären kann. Mögliche Erklärungen sind die von Undas et al. (124) oder auch von Ornelas und Kollegen (129) zusammengefassten Acetylierungen verschiedener Plasmaproteine, die wiederum zum Beispiel zu einer CD36-vermittelte Thrombin-induzierte Thrombingenerierung führen könnten (128).

Die *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie (n=7) zeigten gegenüber den Kontrollen mit ASS eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“, aber einen ähnlichen medianen „Thrombin Peak“ und „ETP“. Im Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS-Einnahme war die „ttPeak“ verkürzt und das „ETP“ höher. Dies war statistisch ebenfalls nicht auffällig, zeigt jedoch auch bei dieser *JAK2*-positiven Patientengruppe eine ähnliche Thrombinbildung wie bei den Kontrollen mit ASS. Daraus ergibt sich ein interessanter Ansatz für weitere Forschungen, da vor allem die *JAK2*-positiven Patienten unabhängig von der HU-Therapie eine ähnliche Thrombingenerierung wie die Kontrollprobanden mit ASS aufwiesen und dies im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne ASS verbessert war. Mögliche Gründe wie oben diskutiert könnten dabei neue Erkenntnisse zur häufig genutzten ASS-Therapie im Zusammenhang mit der ET-Erkrankung beitragen.

Die Thrombozyten der *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Therapie (n=4) zeigten ähnliche mediane Werte wie die Kontrollen ohne ASS. Nur das „ETP“ war gegenüber den Kontrollen ohne ASS niedriger. Beim Vergleich mit der Kontrollgruppe mit ASS dagegen zeigte sich bei den Patiententhrombozyten eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“, sowie ein niedrigerer „Thrombin Peak“ und „ETP“. Dies war statistisch nicht auffällig.

Die *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Therapie zeigten damit eine ähnliche Thrombingenerierung wie die gesunden Vergleichsprobanden ohne ASS-Einnahme. Somit gibt es keinen Hinweis auf eine Störung der Thrombin-induzierten sekundären Hämostase.

Der *Calreticulin*-positive Patient ohne HU-Therapie (n=1) zeigte mit seinen Thrombozyten eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“ gegenüber den Kontrollen mit ASS. „Thrombin Peak“ und „ETP“ waren gegenüber beiden Kontrollgruppen niedriger. Die Ergebnisse könnten auf eine Störung der Thrombin-Rezeptoren oder der nachfolgenden Signalwege deuten. So beschrieben Dupont et al. einen PAR1 Polymorphismus, der Einfluss auf die PAR1-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche hat und in Folge dessen zu einem reduzierten Ansprechen der Thrombozyten auf einen PAR1-Agonisten führte (85). Zudem gibt es Studien, die weitere Agonisten der PAR's, wie Serinproteasen, identifiziert haben (130). Dabei zeigten Sinha und Kollegen, dass nach der Vorbehandlung von PRP mit FXa die Thrombin-induzierte Aggregation inhibiert wurde (131). Es gibt daher verschiedene mögliche Einflüsse, die weitere Untersuchungen, vor allem auch mit einer größeren Patientenkohorte, benötigen.

Tabelle 24: Vergleich der medianen Parameter der Thrombozyten im PRP mittels CAT unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin (PRP = Plättchen-reiches Plasma, U = Unit, ml = Milliliter, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential)

Thrombin		n	„lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+HU	6	~ -ASS > +ASS	< -ASS = +ASS	> -ASS ~ +ASS	(>) -ASS = +ASS
	-HU	7	= -ASS > +ASS	< -ASS > +ASS	~ -ASS ~ +ASS	> -ASS ~ +ASS
CALR	+HU	4	~ -ASS > +ASS	~ -ASS > +ASS	~ -ASS < +ASS	< -ASS < +ASS
	-HU	1	~ -ASS > +ASS	~ -ASS > +ASS	< -ASS < +ASS	< -ASS < +ASS
Kontrollen	-ASS/ +ASS	10/10	-ASS > +ASS	-ASS > +ASS	-ASS (<) +ASS	-ASS (<) +ASS

Bei Verwendung von 50 ng/ml Convulxin zeigte der Vergleich der Kontrollen eine verlängerte „ttPeak“, sowie ein niedrigeres „ETP“ und ein statistisch auffälligen niedrigeren „Thrombin Peak“ bei den Thrombozyten der Kontrollen mit ASS (n=10) gegenüber den Kontrollen ohne ASS (n=10). Bei der Messung der Aggregation mittels Chronolog zeigte sich durch Zugabe von Kollagen, vor allem bei der hohen Konzentration, kaum ein Einfluss der ASS-Einnahme auf die Thrombozyten. Kollagen bindet und aktiviert jedoch die Thrombozyten über alle Kollagenrezeptoren (43-46). Da Convulxin nur spezifisch an das GPVI bindet und die

Thrombozyten darüber aktiviert (48, 50, 51), könnte hier die fehlende Feedbackwirkung des TxA_2 eine größere Rolle spielen (80) und so zu der reduzierten Reaktion der Thrombozyten der Kontrollen mit ASS führen.

Auch bei den *JAK2*-positiven Patienten mit (n=6) und ohne HU-Therapie (n=7) zeigte sich eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“ gegenüber beiden Kontrollgruppen. Dies war zudem statistisch auffällig. Zusätzlich war der „Thrombin Peak“ und das „ETP“ im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS niedriger. Für den „Thrombin Peak“ war der statistische Vergleich ebenfalls auffällig. Auch hier könnte die fehlende Feedbackwirkung des TxA_2 eine entscheidende Rolle spielen, da bei den *JAK2*-positiven Patienten mit HU 3 von 6 Patienten ASS einnahmen und bei den *JAK2*-positiven Patienten ohne HU 4 von 7 Patienten zusätzlich eine ASS-Therapie hatten. Da jedoch auch die Kollagen-induzierte Aggregation reduziert war (siehe 5.1.3), mit Ausnahme der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU- und ASS-Therapie, spricht dies für eine Störung oder einen Defekt des GPVI oder dessen Signalweges (80, 92, 132).

Bei den *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Therapie (n=4) zeigte sich ebenfalls eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“ gegenüber beiden Kontrollgruppen. Hier war jedoch nur der Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS statistisch auffällig. Aber auch hier zeigte sich ein niedrigerer „Thrombin Peak“ und ein niedrigeres „ETP“ als bei den Kontrollen ohne ASS. Drei von 4 Patienten dieser Gruppe nahmen ASS ein, sodass auch hier die Medikamentenwirkung mit für die Ergebnisse verantwortlich sein können. Ein Defekt oder eine Störung des GPVI und dessen Signalwege kann jedoch ebenso vorliegen (80, 92, 132).

Der *Calreticulin*-positive Patient ohne HU-Therapie (n=1) zeigte genauso eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“, aber auch ein niedrigeren „Thrombin Peak“ und „ETP“ gegenüber beiden Kontrollgruppen. Dieser Patient nahm ebenfalls ASS ein. Somit treffen die oben besprochenen Erklärungsansätze auch hier zu, wobei es sich nur um einen Patienten in dieser Gruppe handelt. Zusammenfassend zeigte sich unter diesen Versuchsbedingungen bei allen ET-Gruppen unabhängig vom Mutationsstatus und der HU-Therapie eine reduzierte Thrombingenerierung, die auf eine Störung oder Defekt des GPVI oder dessen Signalweges unter Beteiligung einer entsprechenden TxA_2 -Sensitivität deutet.

Tabelle 25: Vergleich der medianen Parameter der Thrombozyten im PRP mittels CAT unter Zugabe von 50 ng/ml Convulxin (PRP = Plättchen-reiches Plasma, ng = Nanogramm, ml = Milliliter, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential)

Convulxin		n	„lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+HU	6	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	< -ASS ~ +ASS	< -ASS ~ +ASS
	-HU	7	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	< -ASS > +ASS	< -ASS ~ +ASS
CALR	+HU	4	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	< -ASS > +ASS	< -ASS ~ +ASS
	-HU	1	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	< -ASS < +ASS	< -ASS < +ASS
Kontrollen	-ASS/ +ASS	10/10	-ASS ~ +ASS	-ASS < +ASS	-ASS > +ASS	-ASS (>) +ASS

Bei Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin zeigten die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS (n=10) wieder eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“, sowie eine geringere Thrombinbildung („Thrombin Peak“ und „ETP“ erniedrigt) im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (n=10). Dies war statistisch auffällig für den „Thrombin Peak“ als Parameter. Bei Verwendung von Thrombin und Convulxin bzw. Kollagen sollte es, wie bei Alberio et al. (133), zu einer verstärkten Aktivierung der Thrombozyten kommen. Auch Andersen und Kollegen haben eine verbesserte und erhöhte Phosphatidylserin-Exposition auf der Thrombozytenoberfläche nach simultanen Stimulation mit Thrombin und Kollagen beschrieben (134), was wiederum die Thrombinbildung fördert (135-137). Hier scheint jedoch die hemmende Wirkung des ASS einen größeren Einfluss auf die Thrombingenerierung zu nehmen. Die fehlende Feedbackwirkung des TxA_2 auf die Convulxin-induzierten Thrombingenerierung führt damit anscheinend zu der geringeren Thrombinbildung. Und auch die zuvor verbesserte Thrombinbildung unter Zugabe von Thrombin allein scheint unter simultaner Stimulation mit Convulxin keine Besserung zu bewirken.

Die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten mit HU-Therapie (n=6) zeigten erneut eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“, sowie einen niedrigeren „Thrombin Peak“ und ein niedrigeres „ETP“ im Vergleich zu Kontrollen ohne ASS-Einnahme. Dies war für die „ttPeak“ und den „Thrombin Peak“ statistisch auffällig. Gegenüber den Kontrollen mit ASS zeigte sich

nur eine verlängerte „ttPeak“ und ein niedrigerer „Thrombin Peak“ bei den Patiententhrombozyten.

Die Gruppe der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie (n=7) zeigte ebenfalls gegenüber den Kontrollen ohne ASS eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“, sowie einen niedrigeren medianen „Thrombin Peak“ und ein niedrigeres medianes „ETP“. Der statistische Vergleich war für alle Parameter außer dem „ETP“ auffällig. Beim Vergleich mit der Kontrollgruppe mit ASS zeigte sich nur ein niedrigerer „Thrombin Peak“ bei den Thrombozyten der Patienten.

Die Ergebnisse der *JAK2*-positiven Patienten mit und ohne HU zeigen ähnliche Tendenzen wie die Kontrollen mit ASS, sodass sich auch hier die Vermutung ergibt, dass die Hemmung der TxA_2 -Synthese durch die ASS-Einnahme bei über der Hälfte der Patienten (3 *JAK2*-positiven Patienten mit HU, 4 *JAK2*-positiven Patienten ohne HU) eine entscheidende Rolle spielt. Wie jedoch schon zuvor diskutiert, könnte hier auch eine Störung oder Defekt des GPVI oder dessen Signalweges maßgeblich für die reduzierte Thrombingenerierung sein (siehe auch Diskussion zur Convulxin-induzierte Thrombin).

Bei den *Calreticulin*-positiven Patienten mit (n=4) und ohne (n=1) HU-Therapie zeigte sich eine verlängerte „lag time“ und „ttPeak“, sowie eine niedrigere Thrombingenerierung („Thrombin Peak“ und „ETP“ niedriger) im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Der statistische Vergleich war dabei in der Gruppe der *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU auffällig beim Vergleich der „lag time“ und „ttPeak“ gegenüber beiden Kontrollgruppen, sowie beim „Thrombin Peak“ im Vergleich mit den Kontrollen ohne ASS. Da bereits zuvor die Thrombin-induzierte und auch die Convulxin-induzierte Thrombingenerierung bei den *Calreticulin*-positiven Patienten unabhängig von der HU-Therapie reduziert war, ist es nicht überraschend, dass auch die simultane Stimulation mit beiden Agonisten zu keiner Steigerung der Thrombinbildung geführt hat. Es könnten dabei Störungen oder Defekte der Rezeptoren (PAR1 und 4, GPVI) oder der nachfolgenden Signalwege ursächlich sein. Aber auch eine generelle geringere Reaktivität der Thrombozyten *in vitro* von ET-Patienten mit der *Calreticulin*-Mutation, wie Hauschner et al. in ihrer Studie herausfanden (90), könnte eine Erklärung dazu liefern.

Tabelle 26: Vergleich der medianen Parameter der Thrombozyten im PRP mittels CAT unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin (PRP = Plättchen-reiches Plasma, U = Unit, ml = Milliliter, ng = Nanogramm, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl, ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential)

Thrombin + Convulxin		n	„lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+HU	6	> -ASS ~ +ASS	> -ASS > +ASS	< -ASS < +ASS	< -ASS ~ +ASS
	-HU	7	> -ASS ~ +ASS	> -ASS ~ +ASS	< -ASS < +ASS	< -ASS ~ +ASS
CALR	+HU	4	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	< -ASS < +ASS	< -ASS < +ASS
	-HU	1	> -ASS > +ASS	> -ASS > +ASS	< -ASS < +ASS	< -ASS < +ASS
Kontrollen	-ASS/ +ASS	10/10	-ASS < +ASS	-ASS < +ASS	-ASS > +ASS	-ASS > +ASS

5.2.2 EINFLUSS DES BLUTPLASMAS UND SEINER BESTANDTEILE AUF DIE ZELL-ABHÄNGIGE THROMBINGENERIERUNG IN DER ET

Neben den Blutzellen sind auch die Gerinnungsfaktoren, prokoagulante Mikropartikel (MP) und die natürlich vorkommenden Antikoagulanzen, wie Antithrombin (AT), Protein C, Protein S, TFPI und α 2-Makroglobulin, wichtige Regulatoren der Hämostase. Defekte, erhöhte Konzentrationen oder ein Mangel dieser Plasmabestandteile können großen Einfluss auf die Gerinnung haben und Thrombosen oder Blutungen bedingen. (74, 76, 77, 106)

Die Untersuchung der Thrombingenerierung mittels CAT stellt dabei eine wichtige Methode dar, bei der das Zusammenspiel von pro- und antikoagulatorischen Faktoren unter Zugabe einer Standardmenge an Phospholipiden die Thrombingenerierung im PPP bestimmt (74). Dadurch können neben einem Mangel an Gerinnungsfaktoren oder Inhibitoren, auch Erkrankungen, wie die Hämophilie A und B, oder die Wirkung von Medikamenten, wie Heparine, Antikoagulanzen oder orale Kontrazeptiva erkannt und evaluiert werden (74, 76, 77, 106).

Der Einfluss des Blutplasmas und dessen Bestandteile wurde daher ebenfalls untersucht und wird in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

5.2.2.1 THROMBINGENERIERUNG IM PFP

Die Messung der Thrombingenerierung im PPP reflektiert nur die Aktivität des Gerinnungssystems und nicht die Aktivität der Thrombozyten oder des fibrinolytischen Systems (138). Entscheidend sind daher die beteiligten Faktoren der Thrombinbildung und wie Dielis et al. zeigten, die Konzentrationen dieser Faktoren (139). Aber auch Defekte von Gerinnungsfaktoren, mit Ausnahme von Faktor XIII, lassen sich mit Hilfe des CAT im PPP detektieren (140).

Durch Verwendung von PFP bei der Thrombingenerierung werden Einflüsse von geringen Mengen an kontaminierenden Thrombozyten verhindert. Hingegen, werden MP bei der Gewinnung von PFP nicht depletiert. Durch die Zugabe einer hohen Konzentration von Phospholipiden, wie hier eingesetzt, sind aber Effekte von MP auf die TF-induzierte Thrombingenerierung im PFP eher zu vernachlässigen. (112)

In meiner Untersuchung des PFP im CAT wiesen die Kontrollgruppen mit und ohne ASS-Einnahme jeweils ähnliche Werte auf. Im PFP aller Patientengruppen, unabhängig der Mutation oder der HU-Therapie, wurde zwar etwas langsamer (längere „lag time“ und „ttPeak“) und weniger Thrombin als im PFP der beiden Kontrollgruppen generiert, jedoch zeigten sich keine statistischen Auffälligkeiten, die auf einen Einfluss des Blutplasmas oder dessen Bestandteile auf die Thrombingenerierung in ET-Patienten deuten würden. Auch Duchemin et al. (14) und Panova-Noeva et al. (115) fanden bei der Untersuchung der Thrombingenerierung im PPP bzw. PFP von ET-Patienten unter Verwendung von TF und Phospholipiden keine erhöhte Thrombinbildung im Vergleich zu Kontrollen.

Die Ergebnisse des CAT im PFP weisen somit nicht auf erhöhte Plasmakonzentrationen oder einen Mangel bzw. Verbrauch an Gerinnungsfaktoren oder Inhibitoren in ET-Patienten hin. Dagegen wiesen Marchetti et al. (18) unter anderen Versuchsbedingungen eine APC-Resistenz (aktiviertes Protein C-Resistenz) in ET-Patienten nach. Dafür untersuchten sie die Thrombingenerierung mittels CAT im PPP von 59 Patienten mit ET und 30 Patienten mit PV im Vergleich zu 60 gesunden Probanden. Durch Zugabe von TF (6,8 pM), Phospholipiden (30 µM) und CaCl₂ (16 mM) wurde die Thrombinbildung ohne bzw. mit APC (4 nM) gemessen. Das Patientenplasma war dabei weniger sensitiv auf das APC, zu sehen in einem höheren „ETP“ im Vergleich zu den Kontrollen und im Vergleich zur Thrombinbildung ohne APC. Die errechnete Ratio war dabei deutlich höher in der Gruppe der Patienten im Vergleich zu den Kontrollen, was auf eine APC-Resistenz deutet. Die Gruppe um Marchetti stellte zudem erniedrigte Plasmakonzentrationen von FII, FV und Protein S bei den Patienten fest (18). Auch andere Studien fanden reduzierte Konzentrationen der natürlichen Antikoagulanzen im Plasma von Patienten mit ET und PV (141-144).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Tripodi et al. (145) bei der Untersuchung von 111 MPN-Patienten (29 PV, 61 ET und 21 IMF). In ihrer Studie wurde mittels CAT im PRP und PPP durch Zugabe von TF (1 pM) und in Ab- bzw. Anwesenheit von Thrombomodulin (TM, 6 nM), einem physiologischen Protein C Aktivator, die Thrombingenerierung gemessen. Dabei zeigte sich im PPP ohne TM ein geringeres „ETP“ bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen, während mit TM im PPP das „ETP“ etwas höher war. So ergab sich ein erhöhtes ETP Ratio, was laut den Autoren auf eine prokoagulante Imbalance bei den MPN-Patienten deutet. Auch die gemessenen Plasmakonzentrationen von PC und AT waren reduziert und tragen damit zu einer TM-Resistenz bei, die wiederum prokoagulante Auswirkungen haben kann. (145)

Diese Ergebnisse anderer Studien zeigen durchaus, dass in der ET das Blutplasma und dabei vor allem die natürlichen Antikoagulanzen, eine wichtige Rolle spielen können und so einen großen Einfluss auf die Thrombingenerierung haben könnten.

5.2.2.2 VERGLEICH DER THROMBINGENERIERUNG DER THROMBOZYTEN VON ET-PATIENTEN IM AUTOLOGEN PLASMA UND KONTROLLPLASMA UNTER BASALEN BEDINGUNGEN UND IN ABHÄNGIGKEIT DER TRIGGER TF UND THROMBIN

Um eine mögliche Beeinflussung der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung durch Blutplasmabestandteile weiter zu untersuchen, wurde ein Plasmaaustauschversuch im CAT durchgeführt. Isolierte gewaschene Thrombozyten wurden dabei jeweils in Eigen- (autologem) bzw. Kontrollplasma eines gesunden Spenders resuspendiert.

Unter basalen Bedingungen zeigte sich eine höhere Thrombingenerierung mit einem höherem „ETP“ der Thrombozyten der Kontrollgruppen mit und ohne ASS-Einnahme im Eigenplasma gegenüber dem Kontrollplasma. Zusätzlich zeigten sich bei den Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS-Einnahme eine verkürzte „lag time“ und „ttPeak“, sowie ein höherer „Thrombin Peak“ im autologen Plasma im Vergleich zum Kontrollplasma. Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch auffällig.

Auch die Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten mit HU-Therapie zeigten eine verkürzte „lag time“ und „ttPeak“, sowie einen erhöhten „Thrombin Peak“ und „ETP“ im Eigenplasma als im Kontrollplasma resuspendiert. Dies war aber für keine Parameter statistisch auffällig.

Bei den JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie dagegen war die thrombozytäre Thrombingenerierung („Thrombin Peak“ und „ETP“) im Kontrollplasma höher als im autologen Plasma. Auch die „lag time“ und „ttPeak“ waren im Kontrollplasma kürzer als im Eigenplasma gemessen. Dies war statistisch für alle Parameter jedoch unauffällig.

Bei den *Calreticulin*-positiven Patienten mit und ohne HU-Therapie zeigte sich wiederum eine verkürzte „lag time“ sowie höhere „ETP“-Werte im autologen Plasma, während der „Thrombin Peak“ in Eigen- und Kontrollplasma ähnlich hoch war.

Tabelle 27: Vergleich der medianen Parameter der isolierten Thrombozyten in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter basalen Bedingungen (JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl (EP/KP), ttPeak = „time to peak“ = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential, EP = Eigenplasma, KP = Kontrollplasma)

basal		n (EP/KP)	„Lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+ HU	5/6	EP < KP	EP < KP	EP > KP	EP > KP
	- HU	6/6	EP > KP	EP > KP	EP < KP	EP < KP
CALR	+ HU	4/4	EP < KP	EP < KP	EP = KP	EP > KP
	- HU	1/1	EP < KP	EP = KP	EP = KP	EP > KP
Kontrollen	+ ASS	10/10	EP > KP	EP = KP	EP = KP	EP > KP
	- ASS	10/9	EP < KP	EP < KP	EP > KP	EP > KP

Bei der Verwendung von TF als Agonisten zeigten die Kontrollen gegenläufige Tendenzen. Während die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS im Eigenplasma mehr Thrombin generierten, war die Thrombingenerierung der Thrombozyten der Kontrollen mit ASS im Kontrollplasma höher. Es zeigte sich aber keine statistische Auffälligkeit diesbezüglich.

Bei den JAK2-positiven Patienten mit HU-Therapie zeigte sich nur ein höheres „ETP“ im Eigenplasma im Vergleich zum Kontrollplasma ohne statistische Auffälligkeiten.

Die JAK2-positiven ohne HU-Therapie („Thrombin Peak“) und die *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Einnahme („Thrombin Peak“ und „ETP“) generierten mit ihren Thrombozyten jeweils im Kontrollplasma mehr Thrombin als im autologen Plasma. Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch auffällig.

Beim *Calreticulin*-positiven Patienten ohne HU-Einnahme zeigte sich eine thrombozytär stärkere Thrombinbildung („Thrombin Peak“ und „ETP“) im Eigenplasma gegenüber dem Kontrollplasma.

Tabelle 28: Vergleich der medianen Parameter der isolierten Thrombozyten in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter Zugabe von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden (JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl (EP/KP), ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, , ETP = endogenes Thrombin Potential, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, EP = Eigenplasma, KP = Kontrollplasma)

TF		n (EP/KP)	„Lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+ HU	6/6	EP = KP	EP = KP	EP = KP	EP > KP
	- HU	8/8	EP < KP	EP < KP	EP < KP	EP = KP
CALR	+ HU	4/4	EP = KP	EP < KP	EP < KP	EP < KP
	- HU	1/1	EP = KP	EP > KP	EP > KP	EP > KP
Kontrollen	+ ASS	10/10	EP = KP	EP < KP	EP < KP	EP < KP
	- ASS	10/10	EP = KP	EP = KP	EP > KP	EP > KP

Bei Zugabe von Thrombin zeigte sich in der Kontrollgruppe mit ASS Einnahme kein Unterschied bezüglich der Thrombingenerierung in beiden Plasmen, während die Thrombinbildung der Thrombozyten der Kontrollgruppe ohne ASS im autologen Plasma höher war. Dies war auch beim Vergleich der „ETP“-Werte der Kontrollgruppe ohne ASS im autologen Plasma und Kontrollplasma statistisch auffällig.

Bei den JAK2-positiven Patienten mit HU-Therapie war lediglich das „ETP“ im Eigenplasma höher als im Kontrollplasma. Dies war jedoch nicht statistisch auffällig.

Auch der *Calreticulin*-positive Patient ohne HU-Therapie zeigte eine höhere Thrombinbildung („Thrombin Peak“ und „ETP“) der Thrombozyten im autologen Plasma im Vergleich zum Kontrollplasma.

Bei den JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie zeigte sich dagegen ein leicht niedrigerer „Thrombin Peak“ im Eigenplasma im Vergleich zum Kontrollplasma. Die „lag time“ und „ttPeak“ waren zudem im autologen Plasma verlängert. Dies war für keinen der Parameter statistisch auffällig.

Bei den *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Therapie zeigte sich thrombozytär keine Unterschiede der Thrombingenerierung in beiden Plasmen.

Tabelle 29: Vergleich der medianen Parameter der isolierten Thrombozyten in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin (JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, n = Anzahl (EP/KP), ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential, U = Units, ml = Milliliter, EP = Eigenplasma, KP = Kontrollplasma)

Thrombin		n (EP/KP)	„Lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+ HU	6/6	EP = KP	EP = KP	EP = KP	EP > KP
	- HU	8/7	EP > KP	EP > KP	EP < KP	EP = KP
CALR	+ HU	4/4	EP > KP	EP < KP	EP = KP	EP = KP
	- HU	1/1	EP < KP	EP > KP	EP > KP	EP > KP
Kontrollen	+ ASS	10/10	EP = KP	EP = KP	EP = KP	EP = KP
	- ASS	10/10	EP = KP	EP = KP	EP > KP	EP > KP

Zusammenfassend zeigte sich bei den Kontrollen mit und ohne ASS jeweils unter basalen Bedingungen und bei Zugabe von Thrombin eine ähnliche oder höhere Thrombinbildung im Eigenplasma im Vergleich zum Kontrollplasma. Nur bei Verwendung von TF zeigten die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS eine niedrigere Thrombinbildung im Eigenplasma im Vergleich zum Kontrollplasma. Vanschoonbeek et al. (120) fanden bei ihrer Untersuchung der TF-induzierten Thrombingenerierung im PRP von gesunden Probanden heraus, dass die Thrombinbildungskapazität variabel bestimmt wird durch die Subjekt-abhängige Gerinnungsaktivität des Blutplasmas. Daraus folgernd könnte die Gerinnungsaktivität des Kontrollplasma zur besseren Phosphatidylserin-Exposition beitragen, die bei der TF-induzierten Thrombinbildung wesentlich entscheidend ist (120, 128), während im Eigenplasma die entsprechenden Faktoren und die hemmende Wirkung von ASS zu einer geringeren Phosphatidylserin-Exposition führen und damit zu einer geringeren Thrombinbildung im autologen Plasma der Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme. Im gesamten scheint jedoch eine Homöostase zwischen Thrombozyten und Faktoren im autologen Plasma zu geben, die zur besseren Thrombinbildung im Eigenplasma beiträgt.

Auch bei den JAK2-positiven Patienten mit HU-Therapie zeigte sich unter basalen Bedingungen, wie auch bei Verwendung von TF und Thrombin eine höhere Thrombinbildung im Eigenplasma im Vergleich zum Kontrollplasma. Im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS war diese höher, gegenüber den Kontrollen ohne ASS ähnlich oder niedriger. Dies könnte zum einen ebenfalls auf eine Homöostase zwischen Thrombozyten und Eigenplasma deuten. Es könnte aber auch bedeuten, dass die Konzentration an natürlichen Antikoagulanzen erniedrigt ist, wie diverse Studien bei ET-Patienten gezeigt haben (18, 141-145), und somit im autologen

Plasma die fehlende Inhibition der Thrombingenerierung zu einer höheren Thrombinbildung führt.

Bei den *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie dagegen war die Thrombingenerierung bei allen drei Bedingungen im autologen Plasma niedriger als im Kontrollplasma. Ursache könnte ein *in-vivo*-Verbrauch von Gerinnungsfaktoren sein, der sich bei der *in-vitro*-Messung der Thrombingenerierung durch erniedrigte Werte zeigt. Jedoch konnte bei der Messung im PFP *in vitro* kein Unterschied zwischen Patientenplasma und Kontrollplasma festgestellt werden, so dass ein Verbrauch unwahrscheinlich erscheint. Vielmehr besteht die Vermutung, dass in dieser Patientengruppe eine erhöhte Konzentration an Inhibitoren, wie AT oder PC, vorhanden sein könnte, die Einfluss auf die Thrombingenerierung bei allen Versuchen hat. Dielis et al. fanden in ihrer Studie bei einer gesunden Population heraus, dass dort der meiste Einfluss auf die Thrombingenerierung durch erhöhte oder erniedrigte Konzentrationen von Beteiligten der Thrombinbildung, wie Faktoren (Fibrinogen, FXII, Prothrombin) oder Inhibitoren (AT, freies TFPI) ausgeht (139). Qualitative Veränderungen der Proteinfunktion dieser Beteiligten können aber ebenso Einfluss auf die Thrombinbildung nehmen (138).

Die *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Einnahme zeigten sehr unterschiedliche Tendenzen. So war die Thrombinbildung basal im Eigenplasma leicht erhöht, während unter Verwendung von TF höhere Thrombinmengen im Kontrollplasma generiert wurden. Bei Zugabe von Thrombin zeigten sich dagegen keine Unterschiede in den beiden Plasmen. Durch die geringe Patientenzahl kann es sein, dass hier keine klaren Tendenzen zu erkennen sind. Möglich ist aber auch ein Defekt von Gerinnungsfaktoren wie FVIII, IX oder XI, die sensitiv mittels Zugabe von TF mit der CAT-Methode detektiert werden können (146) und somit zu einer differenzierten TF-induzierten geringeren Thrombinbildung führen würden. Eine weitere Erklärung könnte eine geringer TF-induzierte Thrombozytenaktivierung sein, mit infolge geringerer Phosphatidylserin-Exposition auf der Thrombozytenoberfläche. Diese ist jedoch von großer Wichtigkeit bei der TF-induzierten Thrombingenerierung und könnte folglich zu einer reduzierten Thrombinbildung führen während die Thrombin-induzierte Thrombinbildung normal ist (120, 128).

Beim *Calreticulin*-positiven Patienten ohne HU-Einnahme zeigte sich wie bei den *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie eine höhere Thrombinbildung im autologen Plasma unter allen drei Bedingungen (basal, TF und Thrombin). Jedoch war die Thrombingenerierung nur unter Zugabe von TF deutlich höher im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Dies könnte ein Hinweis für eine erniedrigte Konzentration von TFPI sein (74, 139), die zu einer deutlich höheren Thrombinbildung im autologen Plasma und auch im Vergleich zu den gesunden Probanden führen könnte. Unter basalen Bedingungen und unter Verwendung von Thrombin war die Thrombingenerierung gegenüber den Kontrollen mit und ohne ASS wesentlich

niedriger und deutet daher nicht auf triggernde Plasmafaktoren oder fehlende Inhibitoren hin. Aber auch hier ist zu bedenken, dass es sich nur um einen Patienten handelt und die Ergebnisse somit nicht repräsentativ sind.

5.3 THROMBINGENERIERUNG DURCH MONONUKLEÄRE ZELLEN (MNC) IN DER ET

Leukozyten verbinden den Entzündungsprozess mit der Aktivierung der sekundären Hämostase (63, 64). Dazu fanden verschiedene Studien eine Assoziation zwischen einer Leukozytose und thrombotischen Komplikationen (147). Leukozytäre Monozyten spielen eine wichtige Rolle im TF-vermittelten Koagulationsprozess (64) und können mittels Dextran sedimentation in der mononukleären Zellfraktion (MNC) angereichert werden. In einigen Studien wurden verschiedene Entdeckungen zu Monozyten in der ET gemacht. So wurde eine signifikant erhöhte Monozyten-Aktivierung mittels Bestimmung der CD11b-Oberflächenexpression beschrieben (11) vor allem bei ET-Patienten mit einer Thrombosevorgeschichte (12). Cervantes et al. fanden bei 80% der zirkulierenden Monozyten in ET Konjugate mit adhärenenten Thrombozyten (13) und Arellano-Rodrigo et al. zeigten eine erhöhte Konzentration an TF-Molekülen in der Monozytenmembran bei ET-Patienten (12).

5.3.1 DIFFERENZIERTE THROMBINGENERIERUNG DER MONONUKLEÄREN ZELLEN VON ET-PATIENTEN UNTER BASALEN BEDINGUNGEN UND NACH VERWENDUNG VON TF UND THROMBIN

Meine Ergebnisse zur Thrombingenerierung von MNC bei ET-Patienten gemessen im autologen Plasma tragen zu den oben genannten Studien entscheidend bei.

Unter basalen Bedingungen generierten die MNC der Kontrollen mit ASS-Einnahme ein wenig schneller mehr Thrombin als die Kontrollen ohne ASS. Bei allen Patientengruppen unabhängig vom Mutationsstatus und der HU-Therapie war die „ttPeak“ der MNC schneller und der „Thrombin Peak“ höher als bei beiden Kontrollgruppen. Das „ETP“ dagegen war massiv niedriger als bei beiden Kontrollgruppen.

Unter Zugabe von TF generierten die MNC der Kontrollen mit ASS zwar schneller, jedoch weniger Thrombin als die Kontrollen ohne ASS. Die MNC aller Patientengruppen unabhängig ihres Mutationsstatus und der HU-Einnahme reagierten ebenfalls schneller als beide Kontrollgruppen und bildeten auch höhere „Thrombin Peaks“ als diese. Das „ETP“ war gegenüber den Kontrollen mit ASS-Einnahme jeweils höher, gegenüber den Kontrollen ohne ASS zumeist ähnlich oder niedriger.

Bei Verwendung von Thrombin als Agonisten reagierten die MNC der Kontrollen mit ASS schneller und bildeten leicht mehr Thrombin als die Kontrollen ohne ASS-Einnahme. Auch hier war die Reaktion der MNC aller Patientengruppen unabhängig von Mutationsstatus und HU-

Therapie schneller. Auch die Thrombinbildung war höher als bei den Kontrollen. Vor allem das „ETP“ war wesentlich höher. Ausnahme bildete hier der Calreticulin-positive Patient ohne HU-Therapie, dessen MNC weniger Thrombin generierten.

Es zeigte sich also eine Agonisten-induzierte (TF und Thrombin) erhöhte Thrombinbildungskapazität der MNC in ET-Patienten unabhängig vom Mutationsstatus und der HU-Therapie.

Interessanterweise zeigten Torregrosa et al. (148) in ihrer Studie, dass der Mutationstyp bezüglich der Leukozyten in der ET eine Rolle spielen kann. Sie untersuchten dazu 70 ET-Patienten (40 *JAK2*+, 13 *CALR*+, 12 *JAK2*-/*CALR*-) mittels Flowzytometrie hinsichtlich Aktivierungsstatus und Thrombozyten-Leukozyten (Monozyten und Neutrophile) Aggregate. Es zeigte sich dabei, dass ET-Patienten mit *JAK2*-Mutation eine erhöhte Leukozytenaktivität aufwiesen. Die Abwesenheit der *JAK2*-Mutation dagegen reduzierte diese Aktivität. (148)

Auch bezüglich der HU-Therapie und den Leukozyten in ET-Patienten gibt es Untersuchungen. So zeigten Maugeri und Kollegen (149) anhand von 12 Patienten (6 ET, 6 PV) unter ASS-Therapie und nach 3-wöchiger HU-Einnahme bei 6 Patienten (5 ET, 1 PV), dass die TF-Expression und der Inhalt an TF in Leukozyten signifikant reduziert war. Dies wurde ebenfalls mittels Flowzytometrie gemessen. Es handelte sich jedoch um polymorphonukleäre Leukozyten. (149)

Einen Zusammenhang zwischen Mutationstyp bzw. HU-Therapie bezogen auf die erhöhte Thrombinbildung konnte jedoch in meiner Untersuchung nicht festgestellt werden. Aber wichtig ist, dass diese vermehrte Menge an Thrombin per se schon zu einer vermehrten Fibrinbildung und damit Thrombusentstehung beitragen kann. Das von den MNC gebildete Thrombin kann aber vor allem zur vermehrten Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten führen und damit zu einer Hyperaktivierung des Gerinnungssystems in der ET.

5.3.2 EINFLUSS DES BLUTPLASMAS UND SEINER BESTANDTEILE AUF DIE THROMBINGENERIERUNG DER MONONUKLEÄREN ZELLEN VON ET-PATIENTEN DURCH VERWENDUNG VON AUTOLOGEM PLASMA UND KONTROLLPLASMA

Wie in Kapitel 5.2.2 schon erörtert, können das Blutplasma und dessen Bestandteile großen Einfluss auf die Thrombingenerierung nehmen. Es wurde daher auch ein Plasmaaustauschversuch der MNC im CAT durchgeführt.

Unter basalen Bedingungen zeigte sich bei den Kontrollen mit und ohne ASS-Einnahme eine höhere Thrombingenerierung durch höhere „Thrombin Peaks“ und „ETPs“ der MNC im Eigenplasma im Vergleich zum Kontrollplasma. Auch zeigten die MNC der Kontrollgruppe ohne ASS eine kürzere „Lag time“ und „ttPeak“ im autologen Plasma im Vergleich zum Kontrollplasma. Die Kontrollgruppe mit ASS reagierte ebenfalls im Eigenplasma mit einer

kürzeren „Lag time“ als im Kontrollplasma. Dabei war nur die „Lag time“ der Kontrollgruppe mit ASS im Vergleich von autologen Plasma mit dem Kontrollplasma statistisch auffällig.

Bei allen Patientengruppen unabhängig vom Mutationsstatus oder von der HU-Therapie zeigte sich statistisch auffällig eine stark verlängerte „ttPeak“ und ein massiv erhöhtes „ETP“ im Kontrollplasma. Der „Thrombin Peak“ war ebenfalls im Kontrollplasma deutlich höher als im Eigenplasma bei allen Patientengruppen unabhängig von der Mutation oder von der HU-Einnahme. Jedoch zeigte sich für diesen Parameter keine statistische Auffälligkeit. Die Thrombingenerierung der MNC war somit im Kontrollplasma wesentlich höher, wenn auch verlängert bis zum Erreichen des Peaks, als im Eigenplasma. Die verlängerte „ttPeak“ deutet auf eine verzögerte Initiierungsphase hin.

Tabelle 30: Vergleich der medianen Parameter der MNC in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter basalen Bedingungen (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 (EP/KP), ttPeak = „time to peak“ = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential, EP = Eigenplasma, KP = Kontrollplasma)

basal		n (EP/KP)	„Lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+ HU	6/6	EP = KP	EP < KP	EP < KP	EP < KP
	- HU	6/6	EP > KP	EP < KP	EP < KP	EP < KP
CALR	+ HU	4/4	EP < KP	EP < KP	EP < KP	EP < KP
	- HU	1/1	EP > KP	EP < KP	EP < KP	EP < KP
Kontrollen	+ ASS	9/7	EP < KP	EP = KP	EP > KP	EP > KP
	- ASS	8/8	EP < KP	EP < KP	EP > KP	EP > KP

Bei Zugabe von TF zeigten die MNC der Kontrollen mit und ohne ASS eine ähnliche Thrombingenerierung in beiden Plasmen. Die nur leichten Unterschiede zum Beispiel bei der „ttPeak“ (verlängert im Eigenplasma) und dem „ETP“ (höher im Eigenplasma) in der Kontrollgruppe ohne ASS und der „Thrombin Peak“ (höher im Eigenplasma) in der Kontrollgruppe mit ASS-Einnahme waren nicht statistisch auffällig.

Auch bei den JAK2-positiven Patienten und dem Calreticulin-positiven Patienten jeweils ohne HU-Therapie war die Thrombinbildung der MNC in beiden Plasmen ähnlich. Nur beim Calreticulin-positiven Patienten ohne HU-Einnahme war das „ETP“ im Eigenplasma etwas höher als im Kontrollplasma. Dies war jedoch nicht statistisch auffällig.

Die MNC der *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie dagegen zeigten eine stärkere Bildung von Thrombin („Thrombin Peak“ und „ETP“) im autologen Plasma im Vergleich zum Kontrollplasma. Auch zeigte sich eine verkürzte „Lag time“ und „ttPeak“ im Eigenplasma im Vergleich zum Kontrollplasma in dieser Patientengruppe. Die statistische Auswertung war jedoch nicht auffällig für alle Parameter.

Die MNC der *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Therapie zeigten dagegen eine stärkere Thrombinbildung, mit höheren „Thrombin Peaks“ und „ETPs“, im Kontrollplasma im Vergleich zum autologen Plasma. Aber auch diese Unterschiede waren nicht statistisch auffällig.

Tabelle 31: Vergleich der medianen Parameter der MNC in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter von 1 pM TF und anionischen Phospholipiden (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 (EP/KP), ttPeak = „time to peak“ = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential, pM = Pikomolar, TF = „tissue factor“ = Gewebefaktor, EP = Eigenplasma, KP = Kontrollplasma)

TF		n (EP/KP)	„Lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+ HU	7/7	EP < KP	EP < KP	EP > KP	EP > KP
	- HU	7/7	EP < KP	EP > KP	EP = KP	EP = KP
CALR	+ HU	4/4	EP > KP	EP < KP	EP < KP	EP < KP
	- HU	1/1	EP = KP	EP > KP	EP = KP	EP > KP
Kontrollen	+ ASS	10/10	EP = KP	EP = KP	EP > KP	EP = KP
	- ASS	10/10	EP = KP	EP > KP	EP = KP	EP > KP

Bei Verwendung von Thrombin bildeten die MNC der Kontrollen mit und ohne ASS-Einnahme mehr Thrombin im Eigenplasma als im Kontrollplasma resuspendiert. Dies war statistisch unauffällig.

Auch die *JAK2*-positiven Patienten mit und ohne HU-Therapie zeigten eine höhere Thrombinbildung, mit höheren „Thrombin Peaks“ und „ETPs“, im autologen Plasma gegenüber dem Kontrollplasma. Statistisch waren diese Tendenzen aber nicht auffällig.

Die MNC der *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Einnahme zeigten eine ähnliche Thrombinbildung in beiden Plasmen, nur die Reaktionszeiten („Lag time“ und „ttPeak“) waren im Eigenplasma deutlich verkürzt im Vergleich zum Kontrollplasma. Statistisch auffällig war dies jedoch nicht.

Beim *Calreticulin*-positiven Patienten ohne HU dagegen bildeten die MNC im Kontrollplasma mehr Thrombin als im autologen Plasma.

Tabelle 32: Vergleich der medianen Parameter der MNC in Eigen- vs. Kontrollplasma resuspendiert mittels CAT unter Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin (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 (EP/KP), ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential, U = Units, ml = Milliliter, EP = Eigenplasma, KP = Kontrollplasma)

Thrombin		n (EP/KP)	„Lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+ HU	7/6	EP = KP	EP > KP	EP > KP	EP > KP
	- HU	7/7	EP < KP	EP = KP	EP > KP	EP > KP
CALR	+ HU	4/4	EP < KP	EP < KP	EP = KP	EP = KP
	- HU	1/1	EP > KP	EP = KP	EP < KP	EP < KP
Kontrollen	+ ASS	10/10	EP = KP	EP < KP	EP > KP	EP > KP
	- ASS	10/10	EP = KP	EP > KP	EP > KP	EP > KP

Zusammenfassend zeigte sich bei den MNC der Kontrollen mit und ohne ASS-Einnahme unter allen Versuchsbedingungen eine höhere Thrombinbildung im autologen Plasma im Vergleich zum Kontrollplasma. Dies spricht für eine Homöostase zwischen MNC und autologen Blutplasma.

Bei den *JAK2*-positiven Patienten mit HU-Therapie zeigte sich basal eine niedrigere Thrombinbildung der MNC im autologen Plasma während bei Zugabe der Trigger TF und Thrombin die Thrombingenerierung im Eigenplasma höher war als im Kontrollplasma. Dabei war die Thrombinbildung der MNC der Patienten bei Verwendung der beiden Agonisten im Vergleich zu den Kontrollen höher. Dies könnte, wie oben bereits diskutiert, auf eine erniedrigte Konzentration an Inhibitoren im Plasma deuten (18, 141-145).

Aber auch die *JAK2*-Mutation könnte einen Einfluss haben. So fanden Arellano-Rodrigo und Kollegen (12) bei der Untersuchung von 49 ET-Patienten mittels Flowzytometrie eine erhöhte Monozyten-/Leukozyten-Aktivität in den *JAK2*-positiven ET-Patienten. Dies zeigte sich durch eine signifikant höhere Expression von CD11b der Neutrophilen und TF Expression von Monozyten nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (10 µg/ml) bei den *JAK2* positiven ET-Patienten im Vergleich zu den *JAK2*-negativen ET-Patienten und den gesunden Kontrollen. Nicht signifikant aber dennoch höhere Werte zeigten die *JAK2*-positiven ET-Patienten bei der Messung der Thrombozyten-Leukozyten-Komplexe, sowie bei der basalen CD11b Expression der Monozyten und Neutrophilen und der basalen TF Expression der Monozyten. (12)

Auch Torregrosa et al. kamen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass die Leukozyten (inklusive Monozyten) in *JAK2*-positiven ET-Patienten einen erhöhten Aktivitätsstatus aufweisen (148). Die Thrombinbildung der MNC kann daher durch die *JAK2*-Mutation deutlich hyperkoagulatorisch sein, wie meine Ergebnisse hier zeigen.

Auch bei den *JAK2*-positiven ohne HU-Therapie wurden basal geringere Thrombinmengen im Eigenplasma generiert als im Kontrollplasma. Dagegen gab es keine Unterschiede bei Zugabe von TF und wiederum eine höhere Thrombinbildung im autologen Plasma bei Verwendung von Thrombin. Die Thrombinbildung der MNC der Patienten unter Verwendung von Thrombin war im Vergleich zu den Kontrollen dabei wesentlich höher. Es scheint in dieser Patientengruppe eine Homöostase im Eigenplasma zu herrschen, da MNC aktiviert werden müssen um TF zu bilden. Unter basalen Bedingungen ist dies nicht gegeben, während Thrombin ein guter Aktivator auch für MNC darstellt. Durch Zugabe von TF dagegen wird die Aktivierung nicht wesentlich verstärkt.

Die *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Einnahme generierten ebenfalls unter basalen Bedingungen im Eigenplasma weniger Thrombin. Aber auch bei Zugabe von TF war die Thrombinbildung im autologen Plasma geringer als im Kontrollplasma. Unter Zugabe von Thrombin zeigte sich dagegen kein Unterschied der Thrombingenerierung in Eigen- und Kontrollplasma. Die MNC der *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Einnahme scheinen eine geringere Thrombingenerierungskapazität im Eigenplasma zu haben.

Hier könnte die oben bereits erwähnte Studie von Torregrosa und Kollegen (148) Antwort geben. Sie verglichen den Aktivitätsstatus der Thrombozyten und Leukozyten von 40 *JAK2*-positiven ET-Patienten mit 13 *Calreticulin*-positiven ET-Patienten bzw. 12 *JAK2/Calreticulin*-negativen ET-Patienten. Mittels Flowzytometrie wurde in dieser Studie der Aktivitätsstatus durch Messung der CD11b Expression der Neutrophilen und Monozyten sowie die Zahl der Thrombozyten-Neutrophilen- und Thrombozyten-Monozyten-Aggregate evaluiert. Die Ergebnisse zeigten einen reduzierten Aktivitätsstatus der Leukozyten, wobei vielmehr die Abwesenheit der *JAK2*-Mutation als die Anwesenheit der *Calreticulin*-Mutation zu dieser Reduktion zu führen scheint. (148)

Nichts desto trotz lassen diese Ergebnisse die Vermutung zu, dass ein niedrigerer Aktivitätsstatus in *Calreticulin*-positiven ET-Patienten auch zu einer geringeren Thrombingenerierung beitragen kann.

Beim *Calreticulin*-positiven Patienten ohne HU-Einnahme war auch die basale Thrombinbildung im autologen Plasma wesentlich niedriger als im Kontrollplasma. Ebenso zeigte sich eine niedrigere Thrombingenerierung im Eigenplasma unter Verwendung von Thrombin als Trigger. Bei Zugabe von TF war die gebildete Thrombinmenge dagegen im autologen Plasma höher als im Kontrollplasma. Dabei war die Thrombingenerierung im

Vergleich zu den Kontrollen etwas höher. Durch die geringe Patientenzahl lässt sich hier jedoch keine repräsentative Aussage treffen.

Zusammenfassend waren in diesem Experiment bei der basalen Messung die extrem niedrigen „ETPs“ im Eigenplasma aller Patientengruppen unabhängig vom Mutationsstatus und von der HU-Therapie sehr auffällig. Im Kontrollplasma explodierten diese dann förmlich auf sehr hohe Werte, die sogar die Werte der beiden Kontrollgruppen stark überstiegen. Dies zeigt, dass die MNC der ET-Patienten eine sehr hohe Thrombinbildungskapazität besitzen, die unter ruhenden (basalen) Bedingungen im autologen Plasma nicht zu Tage tritt. Das Monozyten unter basalen Bedingungen geringe Konzentrationen an intrazellulären TF bilden, zeigte Egorina et al. (150), während andere Studien eine schnelle und vorübergehende TF-Bildung durch Monozyten nach Stimulation mit Lipopolysaccharid in verschiedenen Experimenten feststellten (151-153). Hier stellt sich jedoch die Frage, wie es zu einer massiven Thrombinbildung ohne Stimulation im Kontrollplasma kommen konnte. Denn diese hohe Thrombingenerierungskapazität der MNC der ET-Patienten kann stark prokoagulant wirken und somit zu den gefürchteten thrombotischen Komplikationen in der ET führen. Weitere Untersuchungen könnten klären, ob unter basalen Bedingungen im Blutplasma der ET-Patienten inhibitorische Faktoren ein Überschießen der Thrombinbildung durch die MNC verhindern oder ob die vorhandenen Faktoren ohne Stimulation nicht ausreichend für die Thrombinbildung durch die MNC der ET-Patienten sind.

Das Blutplasma scheint einen starken Einfluss auf die MNC zu haben. Es stellt sich hier vor allem die Frage, welcher bzw. welche Plasmabestandteile zu einer zum Teil explosionsartigen Thrombinbildung durch die MNC führt. Im Rahmen dieser ET-Studie erfolgten dahingehend Untersuchungen zum Aktivierungsprofil der Leukozyten bei den ET-Patienten in einer Substudie von [REDACTED]. Außerdem untersuchte eine Arbeitsgruppe von [REDACTED] in einer Substudie Monozyten-Thrombozyten-Konjugate, die eine gesteigerte Thrombingenerierung in ET-Patienten initiieren könnten. Weiterhin wurde das Zytokin- und Chemokinprofil im Serum der ET-Patienten in einer Substudie von [REDACTED] durchgeführt. Im Rahmen der ET-Studien wurden jedoch keine Mikropartikeluntersuchungen durchgeführt. Weitere Studien mit dieser Fragestellung könnten jedoch dazu beitragen mögliche Trigger bzw. Einflüsse des Blutplasmas auf die Thrombingenerierung in der ET zu identifizieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Dissertation untersuchte als Teil der ET-Studie des CTH und der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mainz die thrombozytäre Aggregation und ADP-, wie auch ATP-Freisetzung der Thrombozyten, als Teil der primären Hämostase, sowie die thrombozytäre und MNC-bedingte Thrombinbildung, als Teil der sekundären Hämostase, bei 19 eingeschlossenen ET-Patienten im Vergleich zu 10 gesunden Kontrollprobanden. Dabei wurden die Patienten hinsichtlich ihrer Mutation, 14 Patienten mit *JAK2* V617F Mutation und 5 Patienten mit *CALR*-Mutation, und ihrer entsprechenden Therapie, HU-Einnahme und ASS-Einnahme, in Gruppen eingeteilt. Die Kontrollprobanden wurden jeweils ohne Medikation und nach 3-tägiger Einnahme von 100 mg ASS untersucht. Die Untersuchung erfolgte mittels Lumiaggregometrie bzw. CAT unter basalen Bedingungen oder nach Zugabe verschiedener Agonisten.

Bei der Lumiaggregometrie zeigte sich bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation bei den *JAK2*-positiven Patienten mit ASS-Therapie unabhängig von der HU-Einnahme Aggregationswerte oberhalb des Cut-Offs von 60%. Dies würde zu den Ergebnissen von Pascale et al. (82) und Rocca et al. (83) passen, die in ihren Studien eine geringere Hemmung der TxA_2 -Synthese bei ET-Patienten mit einer einmal täglichen ASS-Einnahme fanden. Bezüglich der TRAP-induzierten Aggregation konnte ich eine Hyperaggregabilität der *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie und unabhängig von der ASS-Einnahme feststellen. Dies konnte bisher so in keiner publizierten Studie direkt gezeigt werden. Dagegen zeigten die *JAK2*-positiven Patienten mit HU aber ohne ASS-Therapie eine Hypoaggregabilität, wie auch alle *Calreticulin*-positiven Patienten unabhängig von der HU- und ASS-Einnahme. Einige Studien stellten ebenfalls eine erniedrigte Aggregation der Thrombozyten von ET-Patienten fest. Sie unterschieden jedoch zum Teil nicht genau nach Mutationstyp oder Medikation. Außerdem setzten sie häufig andere Agonisten ein wie ADP, Kollagen oder Epinephrin (99, 154-156). Bei der Kollagen-induzierten Aggregation zeigten alle Patientengruppen bis auf die *JAK2*-positiven Patienten ohne HU und ohne ASS, sowie die *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU- aber ohne ASS- Einnahme, eine Hypoaggregabilität wie es auch verschiedene Aggregationsstudien wie zum Beispiel von Lussana et al. (87) oder Polokhov et al. (99) zeigten. Von besonderer Bedeutung für Folgestudien könnte ein Patient aus der Gruppe der *JAK2*-positiven Patienten mit HU, aber ohne ASS-Einnahme sein, dessen Thrombozyten eine Kollagen- und TRAP-induzierte Hyperaggregation zeigten.

Auch mittels Lumiaggregometrie wurde die ADP- und ATP-Freisetzung der Thrombozyten untersucht. Dabei zeigten alle Patientengruppen unabhängig von ihrem Mutationstyp und unabhängig von der medikamentösen Therapie eine reduzierte thrombozytäre ADP- und ATP-Freisetzung nach TRAP- bzw. Kollagenstimulation. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vieler Studien bezüglich reduzierter Adeninnukleotid-Inhalte bzw. deren Freisetzung aus den

Thrombozyten von ET-Patienten (9, 102, 103). Dies deutet auf ein „delta storage pool disease“ hin, wie es auch Coucelo et al. in ihrer Studie bei 47% der ET-Patienten fanden (11). Zudem konnte bei den *JAK2*-positiven Patienten ohne ASS-Einnahme unabhängig von der HU-Therapie eine erhöhte ATP/ADP-Ratio festgestellt werden. Dies kann ebenso ein diagnostisches Zeichen für ein δ -SPD sein (100-102). Da nur ein *Calreticulin*-positiver Patient bei diesem Experiment als Vergleich vorhanden war, kann bezüglich eines möglichen *JAK2*-bedingten häufigeren Auftretens eines δ -SPD keine Aussage getroffen werden. Folgestudien mit einer größeren Patientenzahl könnten dazu beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Thrombingenerierung im PRP ermittelt. Hierbei kristallisierten sich unter basalen Bedingungen zwei Patientengruppen besonders heraus. Die *JAK2*-positiven Patienten ohne HU-Therapie zeigten eine reduzierte Thrombinbildungskapazität, die man als Zeichen einer *in vitro* Erschöpfung nach erhöhter *in vivo* Aktivität, wie sie diverse Studien bei ET-Patienten festgestellt haben (12, 89, 90), deuten könnte (17, 117). Dagegen zeigten die *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU-Einnahme eine erhöhte Thrombinbildung („Thrombin Peak“ und „ETP“) und könnten damit auf das Vorhandensein von Mikropartikeln, wie sie von verschiedenen Wissenschaftlern vermehrt im Plasma von ET-Patienten festgestellt wurden (15, 16), deuten. Bei der TF-induzierten Thrombingenerierung konnten nur bei den *Calreticulin*-positiven Patienten Auffälligkeiten festgestellt werden. Während die *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU eine Störung der Initiierungsphase (verlängerte „lag time“ und „ttPeak“), aber eine verbesserte Amplifizierung (erhöhter „Thrombin Peak“) im Vergleich mit den Kontrollen zeigten, war die Thrombinbildung bei dem *Calreticulin*-positiven Patient ohne HU-Einnahme reduziert („Thrombin Peak“ und „ETP“), die Reaktionszeit („lag time“ und „ttPeak“) jedoch schneller als bei den Kontrollen. Diese gegenläufigen Tendenzen in Bezug auf den TF als wichtiger Bestandteil der (sekundären) Hämostase werfen Fragen auf, die mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden können. Die Thrombinbildung induziert durch Thrombin selbst förderte interessante Ergebnisse zu Tage. So zeigte sich bereits bei den Kontrollprobanden unter ASS-Einnahme eine deutlich höhere Thrombinbildung gegenüber den Kontrollen ohne ASS. Auch die *JAK2*-positiven Patienten unabhängig von der HU-Therapie zeigten eine ähnlich verbesserte Thrombingenerierung wie die Kontrollen mit ASS, sodass sich hier die Frage stellt, ob ASS einen positiven Einfluss auf die Thrombinbildung hat. Dies spiegelt auch der Vergleich mit den Ergebnissen der Aggregation wider (Vergleichstabelle im Anhang unter 8.3 zu finden). Dort zeigte sich als Teil der primären Hämostase und damit Aktivierung der Thrombozyten unter Zugabe einer hohen Konzentration TRAP-6 (50 μ M) bei den *JAK2*-positiven Patienten eine Aggregation oberhalb des Cut-Offs. Lediglich die *JAK2*-positiven Patienten mit HU, aber ohne ASS Einnahme lagen knapp unterhalb des Cut-Offs und würden damit die Theorie untermauern, dass ASS einen positiven Effekt auf die Thrombinbildung nehmen könnte. Der *Calreticulin*-positive Patient ohne HU dagegen zeigte eine erniedrigte Thrombin-induzierte

Thrombinbildung. Auch die TRAP-induzierte Aggregation war bei diesem Patienten reduziert und zeigt damit die Wichtigkeit der Aktivierung der Thrombozyten, um über die daraus resultierende Phosphatidylserin-Exposition auf der Thrombozytenoberfläche die für die Thrombingenerierung notwendige prokoagulante Oberfläche zu bilden (137). Bei der Convulxin-induzierten Thrombinbildung zeigte sich eine erniedrigte Thrombinbildungskapazität bei allen Patientengruppen unabhängig vom Mutationstyp und von der Therapie. Zuvor hatte sich dies bereits bei der Kollagen-induzierten Aggregation angedeutet. Dort zeigte sich bei den meisten Patientengruppen eine reduzierte Aggregation auf die intermediäre (2 µg/ml), sowie hohe (10 µg/ml) Kollagen-Konzentration. Dies kann durch die geringere Aktivierung zu der oben bereits erwähnten geringeren Phosphatidylserin-Exposition führen, die jedoch essentiell ist (137) und folglich zu einer reduzierten Thrombinbildung beitragen. Lediglich bei den JAK2-positiven Patienten ohne HU und ohne ASS-Therapie, sowie bei den *Calreticulin*-positiven Patienten mit HU, aber ohne ASS-Einnahme kam es zur Normalisierung der thrombozytären Aggregation bei Verwendung der hohen Kollagenkonzentration. Bei diesen beiden Patientengruppen könnte daher spezifisch ein GPVI-Defekt vorliegen (80, 92, 132), da dieser spezifisch durch Convulxin aktiviert wird (48, 50, 51). Die Thrombinbildung induziert durch Thrombin und Convulxin simultan führte ebenfalls zu einer reduzierten Thrombingenerierung bei allen Patientengruppen unabhängig von der Mutation und der medikamentösen Therapie.

Die Ergebnisse der plasmatischen Thrombingenerierung gemessen im PFP, konnten keine Auffälligkeiten feststellen. In Bezug auf die Plasmaaustauschversuche zeigte sich nur bei den Thrombozyten der JAK2-positiven Patienten ohne HU-Therapie eine geringere Thrombinbildungskapazität im autologen Plasma als im Kontrollplasma unter allen drei Versuchsbedingungen (basal, TF- und Thrombin-getriggert). Dies könnte auf eine erhöhte Konzentration an Inhibitoren deuten (139), da ein *in-vivo*-Verbrauch von Gerinnungsfaktoren in Zusammenschau mit den Ergebnissen des PFP-Versuchs eher unwahrscheinlich scheint. Zu guter Letzt konnte bei der Untersuchung der Thrombingenerierung der MNC von ET-Patienten eine Agonisten-induzierte erhöhte Thrombinbildungskapazität unabhängig von der Mutation und der HU-Therapie festgestellt werden. Dies könnte mit der von Arellano-Rodrigo et al. gefundenen erhöhten Konzentration an TF-Molekülen in der Monozytenmembran bei ET-Patienten zusammenhängen (12). Beim Plasmaaustauschversuch zeigte sich zudem eine explosionsartige Erhöhung des „ETP“ der MNC aller Patientengruppen unabhängig vom Mutationstyp und der Therapie unter basalen Bedingungen im Kontrollplasma resuspendiert im Vergleich zum autologen Plasma. Dies zeigt die hohe Thrombinbildungskapazität die die MNC der ET-Patienten haben können und somit zu thrombotischen Komplikationen beitragen könnten. Welcher Bestandteil oder Faktor im Kontrollplasma dafür verantwortlich war, ist nicht bekannt. Es zeigt sich jedoch die Wichtigkeit auch die MNC bei der ET genauer zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Thrombozytenfunktion in ET-Patienten gestört ist. Zudem hat das Blutplasma Einfluss auf die zelluläre Thrombinbildung. Vor allem MNC können großen Einfluss auf die Thrombingenerierung nehmen und sollten damit ebenso in die Therapieentscheidung einfließen. Limitierend für diese Arbeit waren die geringen Patientenzahlen pro Patientengruppe. Es zeigt sich aber, dass eine Unterscheidung der Patienten hinsichtlich ihres Mutationstypes, wie auch hinsichtlich der medikamentösen Therapie in Folgestudien mit größeren Patientenzahlen zu statistisch signifikanten Ergebnissen führen könnten, die noch mehr Wissen über die Pathophysiologie der ET und damit zur Verbesserung der Therapie beitragen könnten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. 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.
2. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):680-92.
3. 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.
4. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):667-79.
5. Martin K. Risk Factors for and Management of MPN-Associated Bleeding and Thrombosis. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2017;12(5):389-96.
6. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(6):761-70.
7. Passamonti F, Thiele J, Girodon F, Rumi E, Carobbio A, Gisslinger H, et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2012;120(6):1197-201.
8. 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; quiz 252.
9. Löfvenberg E, Nilsson TK. Qualitative platelet defects in chronic myeloproliferative disorders: Evidence for reduced ATP secretion. 1989;43(5):435-40.
10. Scharf RE. Acquired Disorders of Platelet Function. In: Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP, editors. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 951-73.
11. 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. *International journal of hematology*. 2014;99(1):32-40.
12. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran 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.
13. Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A. Blood cell activation in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2009;94(11):1484-8.
14. Duchemin J, Ugo V, Ianotto JC, Lecucq L, Mercier B, Abgrall JF. Increased circulating procoagulant activity and thrombin generation in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res*. 2010;126(3):238-42.
15. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, ten Cate H, Leyte A, et al. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2009;94(7):911-8.

16. Villmow T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff AC. Markers of platelet activation and platelet–leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes. *Thrombosis Research*. 2002;108(2-3):139-45.
17. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2012;2012:571-81.
18. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HM, 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.
19. Etheridge SL, Roh ME, Cosgrove ME, Sangkhae V, Fox NE, Chen J, et al. JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(6):2295-300.
20. Ashorobi D, Gohari P. Essential Thrombocytosis (Essential Thrombocythemia, ET). *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.; 2019.
21. Tefferi A. Chapter 49 - Thrombocytosis and Essential Thrombocythemia. In: Michelson AD, editor. *Platelets (Third Edition)*: Academic Press; 2013. p. 999-1017.
22. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE, 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome biology*. 2004;5(12):253.
23. Staerk J, Constantinescu SN. The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective. *Jak-stat*. 2012;1(3):184-90.
24. Chou FS, Mulloy JC. The thrombopoietin/MPL pathway in hematopoiesis and leukemogenesis. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(6):1491-8.
25. Fowlkes S, Murray C, Fulford A, De Gelder T, Siddiq N. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) - Part 1: An overview of the diagnosis and treatment of the "classical" MPNs. *Canadian oncology nursing journal = Revue canadienne de nursing oncologique*. 2018;28(4):262-8.
26. Rumi E, Cazzola M. How I treat essential thrombocythemia. *Blood*. 2016;128(20):2403-14.
27. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *The New England journal of medicine*. 2005;353(1):33-45.
28. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka HM, et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013;121(10):1720-8.
29. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martinez-Trillos A, Casetti I, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(7):1062-9.
30. 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.
31. 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:e369.
32. Renso R, Aroldi A, Pioltelli P, Gambacorti-Passerini C, Elli EM. Long-term and low-dose of busulfan is a safe and effective second-line treatment in elderly patients with essential thrombocythemia resistant or intolerant to hydroxyurea. *Blood cancer journal*. 2018;8(6):56.
33. Pschyrembel W, Arnold U. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 263., neu bearb. und erw. Aufl. ed. Berlin u.a.2011.
34. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2005;31(4):381-92.

35. Jurk K, Kehrel BE. Pathophysiologie und Biochemie der Thrombozyten. *Der Internist*. 2010;51(9):1086-94.
36. Jurk K, Kehrel B. Die Rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose, Immunabwehr und Entzündung. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2008;133(21):1130-5.
37. Jurk K, Kehrel BE. Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase. *Hämostaseologie*. 2005;39-49.
38. Sucker C. 1. Grundlagen der Blutgerinnung. *Klinische Hämostaseologie in der Chirurgie* 2016.
39. Löffler G. Basiswissen Biochemie : mit Pathobiochemie. Springer-Lehrbuch. 7. komplett überarbeitete Auflage ed. Berlin, Heidelberg 2008.
40. Cattaneo M. Chapter 14 - The Platelet P2 Receptors. In: Michelson AD, editor. *Platelets (Third Edition)*: Academic Press; 2013. p. 261-81.
41. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation research*. 2006;99(12):1293-304.
42. Tallima H, El Ridi R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *Journal of Advanced Research*. 2018;11:33-41.
43. Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HF, Sage EH, et al. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood*. 1994;83(5):1244-50.
44. Diaz-Ricart M, Tandon NN, Gomez-Ortiz G, Carretero M, Escolar G, Ordinas A, et al. Antibodies to CD36 (GPIV) inhibit platelet adhesion to subendothelial surfaces under flow conditions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16(7):883-8.
45. 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.
46. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thrombosis Research*. 2004;114(4):221-33.
47. Jung SM, Moroi M. Activation of the Platelet Collagen Receptor Integrin $\alpha 2\beta 1$: Its Mechanism and Participation in the Physiological Functions of Platelets. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2000;10(7):285-92.
48. Polgar J, Clemetson JM, Kehrel BE, Wiedemann M, Magnenat EM, Wells TN, 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(21):13576-83.
49. 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 : official journal of the International Society on Toxinology*. 1997;35(8):1217-28.
50. Batuwangala T, Leduc M, Gibbins JM, Bon C, Jones EY. Structure of the snake-venom toxin convulxin. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2004;60(Pt 1):46-53.
51. Murakami MT, Zela SP, Gava LM, Michelan-Duarte S, Cintra ACO, Arni RK. Crystal structure of the platelet activator convulxin, a disulfide-linked $\alpha 4\beta 4$ cyclic tetramer from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;310(2):478-82.
52. Prado-Franceschi J, Brazil OV. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1981;19(6):875-87.

53. Zhang P, Covic L, Kuliopulos A. Chapter 13 - Protease-Activated Receptors. In: Michelson AD, editor. Platelets (Third Edition): Academic Press; 2013. p. 249-59.
54. Andrews RK, Berndt MC. Chapter 10 - The GPIb-IX-V Complex. In: Michelson AD, editor. Platelets (Third Edition): Academic Press; 2013. p. 195-213.
55. Vu T-KH, 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.
56. Lau LF, Pumiglia K, Cote 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. *The Biochemical journal*. 1994;303 (Pt 2):391-400.
57. Fuste B, Diaz-Ricart M, Jensen MK, Ordinas A, Escolar G, White JG. TRAP induces more intense tyrosine phosphorylation than thrombin with differential ultrastructural features. *The American journal of pathology*. 2002;160(6):2245-52.
58. Frelinger AL, 3rd, Grace RF, Gerrits AJ, Berny-Lang MA, Brown T, Carmichael SL, et al. Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP. *Blood*. 2015;126(7):873-9.
59. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. 2015:161-7.
60. Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry Part A*. 2010;9999A:NA-NA.
61. Sen P, Kemppainen E, Orešič M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Frontiers in molecular biosciences*. 2017;4:96.
62. Swystun LL, Liaw PC. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood*. 2016;128(6):753-62.
63. 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).
64. Bouchard BA, Tracy PB. The participation of leukocytes in coagulant reactions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1(3):464-9.
65. Born GVR. Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal. *Nature*. 1962;194(4832):927-9.
66. Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *The Journal of physiology*. 1962;162(Suppl):67P.
67. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vascular health and risk management*. 2015;11:133-48.
68. Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *The Journal of physiology*. 1963;168:178-95.
69. Fritsma GA. Platelet function testing: aggregometry and lumiaggregometry. *Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology*. 2007;20(1):32-7.
70. Feinman RD, Lubowsky J, Charo I, Zabinski MP. The lumi-aggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1977;90(1):125-9.
71. Holmsen H, Holmsen I, Bernhardsen A. Microdetermination of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate in plasma with firefly luciferase system. *Analytical biochemistry*. 1966;17(3):456-73.
72. Kronick PL, Jimenez SA. Simultaneous aggregation and release from platelets monitored continuously in plasma. *Thromb Res*. 1976;9(6):553-63.
73. Jurk K. Analysis of platelet function and dysfunction. *Hämostaseologie*. 2017;35(01):60-72.

74. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*. 2003;33(1):4-15.
75. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Beguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost*. 2000;83(4):589-91.
76. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*. 2002;32(5-6):249-53.
77. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Beguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*. 2006;96(5):553-61.
78. Zhou L, Schmaier AH. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma. *American Journal of Clinical Pathology*. 2005;123(2):172-83.
79. Althaus K, Zieger B, Bakchoul T, Jurk K, Hamatologie TH-PSdGfT-uHudGfPOu. Standardization of Light Transmission Aggregometry for Diagnosis of Platelet Disorders: An Inter-Laboratory External Quality Assessment. *Thromb Haemost*. 2019;119(7):1154-61.
80. Dawood BB, Lowe GC, Lordkipanidze 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.
81. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D, et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013.
82. Pascale S, Petrucci G, Dragani A, Habib A, Zaccardi F, Pagliaccia F, et al. Aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia is explained by accelerated renewal of the drug target. *Blood*. 2012;119(15):3595-603.
83. Rocca B, Tosetto 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.
84. Holinstat M, Boutaud O, Apopa PL, Vesce J, Bala M, Oates JA, et al. Protease-activated receptor signaling in platelets activates cytosolic phospholipase A2 α differently for cyclooxygenase-1 and 12-lipoxygenase catalysis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(2):435-42.
85. Dupont A, Fontana P, Bachelot-Loza C, Reny JL, Bieche I, Desvard F, et al. An intronic polymorphism in the PAR-1 gene is associated with platelet receptor density and the response to SFLLRN. *Blood*. 2003;101(5):1833-40.
86. Moore SF, Hunter RW, Harper MT, Savage JS, Siddiq S, Westbury SK, et al. Dysfunction of the PI3 kinase/Rap1/integrin α (IIb) β (3) pathway underlies ex vivo platelet hypoactivity in essential thrombocythemia. *Blood*. 2013;121(7):1209-19.
87. Lussana F, Femia EA, Pugliano M, Podda G, Razzari C, Maugeri N, et al. Evaluation of platelet function in essential thrombocythemia under different analytical conditions. *Platelets*. 2020;31(2):179-86.
88. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Tsirigotis P, Zoi K, Zomas A, Kapsimali V, et al. Direct evidence for normalization of platelet function resulting from platelet count reduction in essential thrombocythemia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011;22(6):457-62.
89. Trelinski J, Tybura M, Smolewski P, Robak T, Chojnowski K. The influence of low-dose aspirin and hydroxyurea on platelet-leukocyte interactions in patients with essential thrombocythemia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009;20(8):646-51.

90. 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.
91. Zini R, Guglielmelli P, Pietra D, Rumi E, Rossi C, Rontautoli S, et al. CALR mutational status identifies different disease subtypes of essential thrombocythemia showing distinct expression profiles. *Blood cancer journal.* 2017;7(12):638.
92. Boulaftali Y, Ho Tin Noé B, Jandrot-Perrus M, Mangin PH. GPVI. In: Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP, editors. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update.* Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 113-27.
93. Ryo R, Yoshida A, Sugano W, Yasunaga M, Nakayama K, Saigo K, et al. Deficiency of P62, a putative collagen receptor, in platelets from a patient with defective collagen-induced platelet aggregation. *Am J Hematol.* 1992;39(1):25-31.
94. Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K, Tanoue K. Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br J Haematol.* 1995;89(1):124-30.
95. Takahashi H, Moroi M. Antibody against platelet membrane glycoprotein VI in a patient with systemic lupus erythematosus. *Am J Hematol.* 2001;67(4):262-7.
96. Hermans C, Wittevrongel C, Thys C, Smethurst PA, Van Geet C, Freson K. A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2009;7(8):1356-63.
97. Dumont B, Lasne D, Rothschild C, Bouabdelli M, Ollivier V, Oudin C, et al. Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations. *Blood.* 2009;114(9):1900-3.
98. Huang AT-Y. Funktionale durchflusszytometrische Analyse der Thrombozyten im Bereich der primären Hämostase im Verlauf der essentiellen Thrombozythämie. Dissertation der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2020.
99. Polokhov DM, Ershov NM, Ignatova AA, Ponomarenko EA, Gaskova MV, Zharkov PA, et al. Platelet function and blood coagulation system status in childhood essential thrombocythemia. *Platelets.* 2019:1-11.
100. Masliah-Planchon J, Darnige L, Bellucci S. Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *Br J Haematol.* 2013;160(1):5-11.
101. Selle F, James C, Tuffigo M, Pillois X, Viallard JF, Alessi MC, et al. Clinical and Laboratory Findings in Patients with delta-Storage Pool Disease: A Case Series. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 2017;43(1):48-58.
102. Lussana F, Femia EA, Pugliano M, Podda G, Razzari C, Maugeri N, et al. Evaluation of platelet function in essential thrombocythemia under different analytical conditions. *Platelets.* 2019:1-8.
103. Leoncini G, Maresca M, Buzzi E, Piana A, Armani U. Platelets of patients affected with essential thrombocythemia are abnormal in plasma membrane and adenine nucleotide content. 1990;44(2):116-20.
104. 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(5):873-82.
105. Duarte RCF, Ferreira CN, Rios DRA, Reis HJD, Carvalho MDG. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2017;39(3):259-65.
106. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: what have we learned? *Blood reviews.* 2012;26(5):197-203.

107. ten Cate-Hoek AJ, Dielis AW, Spronk HM, van Oerle R, Hamulyák K, Prins MH, et al. Thrombin generation in patients after acute deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost.* 2008;100(2):240-5.
108. Tripodi A, Martinelli I, Chantarangkul V, Battaglioli T, Clerici M, Mannucci PM. The endogenous thrombin potential and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2007;121(3):353-9.
109. Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, Spaft C, Ducimetière P, Ritchie K, et al. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2011;31(6):1445-51.
110. Panova-Noeva M, van der Meijden PEJ, Ten Cate H. Clinical Applications, Pitfalls, and Uncertainties of Thrombin Generation in the Presence of Platelets. *Journal of clinical medicine.* 2019;9(1).
111. Faber CG, Lodder J, Kessels F, Troost J. Thrombin Generation in Platelet-Rich Plasma as a Tool for the Detection of Hypercoagulability in Young Stroke Patients. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis.* 2003;33(1):52-8.
112. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica.* 2003;88(5):547-54.
113. Panova-Noeva M, Wagner B, Nagler M, Koeck T, Ten Cate V, Prochaska JH, et al. Comprehensive platelet phenotyping supports the role of platelets in the pathogenesis of acute venous thromboembolism - results from clinical observation studies. *EBioMedicine.* 2020;60:102978.
114. 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.
115. 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. *Am J Hematol.* 2011;86(4):337-42.
116. Lucia R, Suzette B, Coenraad H, Jean-Claude B, Raphael F, Brigitte C, et al. Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease. *Haematologica.* 2007;92(12):1639-46.
117. Falanga A, Marchetti M. Thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 2014;40(3):348-58.
118. Charpentier A, Lebreton A, Rauch A, Bauters A, Trillot N, Nibourel O, et al. Microparticle phenotypes are associated with driver mutations and distinct thrombotic risks in essential thrombocythemia. *Haematologica.* 2016;101(9):e365-8.
119. 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. *Am J Hematol.* 2014;89(1):68-73.
120. Vanschoonbeek K, Feijge MA, Van Kampen RJ, Kenis H, Hemker HC, Giesen PL, et al. Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2004;2(3):476-84.
121. Ziolkowska K, Boinska J, Gadomska G, Wieczor R, Rosc D. Inhibitors of the blood coagulation process in patients with essential thrombocythemia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2020;31(3):219-24.
122. Anna Szczypiorska¹ MC-M, Barbara Góralczyk¹, Liliana Bielis¹, Ewelina Drela¹ KG, Barbara Ruszkowska-Ciastek¹, Danuta Rość¹. Tissue factor and tissue

- factor pathway inhibitor in chronic obstructive pulmonary disease. *Folia Medica Copernicana*. 2015;3:32 - 7.
123. Winckers K, Siegerink B, Duckers C, Maurissen LF, Tans G, Castoldi E, et al. Increased tissue factor pathway inhibitor activity is associated with myocardial infarction in young women: results from the RATIO study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9(11):2243-50.
 124. 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.
 125. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. 1999;96(1):272-7.
 126. Ratnatunga CP, Edmondson SF, Rees GM, Kovacs IB. High-dose aspirin inhibits shear-induced platelet reaction involving thrombin generation. 1992;85(3):1077-82.
 127. Villanueva GB, Allen N. Acetylation of antithrombin III by aspirin. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1986;12(3):213-5.
 128. Dohrmann 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. *FASEB J*. 2020;34(7):9337-57.
 129. Ornelas A, Zacharias-Millward N, Menter DG, Davis JS, Lichtenberger L, Hawke D, et al. Beyond COX-1: the effects of aspirin on platelet biology and potential mechanisms of chemoprevention. *Cancer metastasis reviews*. 2017;36(2):289-303.
 130. Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW. Biased signaling of protease-activated receptors. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:67.
 131. Sinha AK, Rao AK, Willis J, Colman RW. Inhibition of thromboxane A2 synthesis in human platelets by coagulation factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(19):6086-90.
 132. Pollitt AY, Hughes CE, Watson SP. Chapter 11 - GPVI and CLEC-2. In: Michelson AD, editor. *Platelets (Third Edition)*: Academic Press; 2013. p. 215-31.
 133. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*. 2000;95(5):1694-702.
 134. Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(20):11189-93.
 135. Bevers EM, Comfurius P, van Rijn JL, Hemker HC, Zwaal RF. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *European journal of biochemistry*. 1982;122(2):429-36.
 136. Bevers EM, Rosing J, Zwaal RF. Membrane phospholipids are the major determinant of the binding site for factor X activating--and prothrombinase complexes at the surface of human platelets. *Agents and actions Supplements*. 1986;20:69-75.
 137. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002;88(2):186-93.
 138. Segers O, van Oerle R, ten Cate H, Rosing J, Castoldi E. Thrombin generation as an intermediate phenotype for venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 2010;103(1):114-22.
 139. Dielis AW, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Hamulyák K, Ten Cate H, et al. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2008;6(1):125-31.

140. Brinkman HJ. Global assays and the management of oral anticoagulation. *Thromb J*. 2015;13:9.
141. Wiecezorek I, MacGregor IR, Ludlam CA. Low proteins C and S and activation of fibrinolysis in treated essential thrombocythemia. *Am J Hematol*. 1995;49(4):277-81.
142. Bucalossi A, Marotta G, Bigazzi C, Galieni P, Dispensa E. Reduction of antithrombin III, protein C, and protein S levels and activated protein C resistance in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients with thrombosis. *Am J Hematol*. 1996;52(1):14-20.
143. Kornblihtt LI, Heller PG, Correa G, Castañón M, Genoud V, Vassallu P, et al. Associated thrombophilic defects in essential thrombocythaemia: their relationship with clinical manifestations. *Thromb Res*. 2003;112(3):131-5.
144. Amitrano L, Guardascione MA, Ames PR, Margaglione M, Antinolfi I, Iannaccone L, et al. Thrombophilic genotypes, natural anticoagulants, and plasma homocysteine in myeloproliferative disorders: relationship with splanchnic vein thrombosis and arterial disease. *Am J Hematol*. 2003;72(2):75-81.
145. 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.
146. Keularts IM, Zivelin A, Seligsohn U, Hemker HC, Béguin S. The role of factor XI in thrombin generation induced by low concentrations of tissue factor. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):1060-5.
147. Afshar-Kharghan V, Thiagarajan P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Current opinion in hematology*. 2006;13(1):34-9.
148. Torregrosa JM, Ferrer-Marín F, Lozano ML, Moreno MJ, Martínez C, Anton AI, et al. Impaired leucocyte activation is underlining the lower thrombotic risk of essential thrombocythaemia patients with CALR mutations as compared with those with the JAK2 mutation. *Br J Haematol*. 2016;172(5):813-5.
149. 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 : JTH*. 2006;4(12):2593-8.
150. Egorina EM, Sovershaev MA, Bjørkøy G, Gruber FX, Olsen JO, Parhami-Seren B, et al. Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(7):1493-8.
151. Franco RF, de Jonge E, Dekkers PE, Timmerman JJ, Spek CA, van Deventer SJ, et al. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood*. 2000;96(2):554-9.
152. Gregory SA, Morrissey JH, Edgington TS. Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin. *Molecular and cellular biology*. 1989;9(6):2752-5.
153. Drake TA, Cheng J, Chang A, Taylor FB, Jr. Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *The American journal of pathology*. 1993;142(5):1458-70.
154. Avram S, Lupu A, Angelescu S, Olteanu N, Mut-Popescu D. Abnormalities of platelet aggregation in chronic myeloproliferative disorders. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2001;5(1):79-87.
155. Hehlmann R, Jahn M, Baumann B, Kopcke W. Essential thrombocythemia. Clinical characteristics and course of 61 cases. *Cancer*. 1988;61(12):2487-96.

156. Bellucci S, Janvier M, Tobelem G, Flandrin G, Charpak Y, Berger R, et al. Essential thrombocythemias. Clinical evolutionary and biological data. *Cancer*. 1986;58(11):2440-7.

8 ANHANG

8.1 TABELLEN: MEDIANE, MINIMA UND 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, µM = Mikromolar, µg = Mikrogramm, ml = Milliliter

	0,5 mg/ml Arachidonsäure									
Gruppe	<i>JAK2</i> + HU		<i>JAK2</i> - HU		<i>CALR</i> + HU		<i>CALR</i> - HU		Kon- trollen	Kon- trollen
	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS
n	3	3	4	4	1	3		1	9	9
Aggregation [%]										
Minimum	0	0	53	0	72	0		0	64	0
25% Perzentile	0	0	55,5	0	72	0		0	66	0
Median	50	0	65	0	72	0		0	69	0
75% Perzentile	67	61	67,75	48	72	0		0	74	0,5
Maximum	67	61	68	64	72	0		0	79	3
Range	67	61	15	64	0	0		0	15	3

	TRAP-6 (10 µM)									
Gruppe	<i>JAK2</i> + HU		<i>JAK2</i> - HU		<i>CALR</i> + HU		<i>CALR</i> - HU		Kon- trollen	Kon- trollen
	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS
n	3	3	4	4	1	3		1	9	9
Aggregation [%]										
Minimum	0	0	0	0	0	0		0	12	1
25% Perzentile	0	0	1,25	4,5	0	0		0	19	11
Median	9	2	39	31,5	0	12		0	35	20
75% Perzentile	70	39	73	57,75	0	19		0	73,5	48,5
Maximum	70	39	73	62	0	19		0	81	52
Range	70	39	73	62	0	19		0	69	51

	TRAP-6 (50 µM)									
Gruppe	JAK2 + HU		JAK2 - HU		CALR + HU		CALR - HU		Kon- trollen	Kon- trollen
	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS
n	3	3	4	4	1	3		1	9	9
Aggregation [%]										
Minimum	40	48	60	64	47	38		15	70	57
25% Perzentile	40	48	61,25	64,75	47	38		15	70	65,5
Median	52	63	66	68	47	51		15	74	73
75% Perzentile	73	77	71,5	76,5	47	58		15	79	76,5
Maximum	73	77	73	79	47	58		15	82	80
Range	33	29	13	15	0	20		0	12	23

	Kollagen (2 µg/ml)									
Gruppe	JAK2 + HU		JAK2 - HU		CALR + HU		CALR - HU		Kon- trollen	Kon- trollen
	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS
n	3	3	4	4	1	3		1	9	9
Aggregation [%]										
Minimum	1	0	0	1	5	1		1	1	1
25% Perzentile	1	0	0,25	1	5	1		1	4	1,5
Median	2	3	20	1,5	5	2		1	35	2
75% Perzentile	17	6	42,75	47	5	10		1	69	6,5
Maximum	17	6	44	62	5	10		1	77	23
Range	16	6	44	61	0	9		0	76	22

	Kollagen (10 µg/ml)									
Gruppe	JAK2 + HU		JAK2 - HU		CALR + HU		CALR - HU		Kon- trollen	Kon- trollen
	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS
n	3	3	4	4	1	3		1	9	9
Aggregation [%]										
Minimum	28	23	63	19	65	0		16	70	57
25% Perzentile	28	23	63,5	25,5	65	0		16	72,5	59,5
Median	55	36	69,5	47,5	65	17		16	76	70
75% Perzentile	79	58	77,75	71	65	28		16	77	75
Maximum	79	58	79	78	65	28		16	84	82
Range	51	35	16	59	0	28		0	14	25

8.1.2 AGONISTEN-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE ADP- UND 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, μM = Mikromolar, μg = Mikrogramm, ml = Milliliter, ATP = Adenosintriphosphat, nmol = Nanomol, TZ = Thrombozyten, ADP = Adenosindiphosphat

	TRAP-6 (50 μM)									
Gruppe	JAK2 + HU		JAK2 - HU		CALR + HU		CALR - HU		Kon- trollen	Kon- trollen
	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS
n	2	3	4	4	1	2			9	9
ATP-Freisetzung [nmol/2x10 ⁸ TZ/ml]										
Minimum	0,45	0	0,25	0,36	0,16	0,36			0,63	0,21
25% Perzentile	0,45	0	0,3025	0,41	0,16	0,36			0,84	0,485
Median	0,485	0,2	0,575	0,565	0,16	0,48			1,33	0,69
75% Perzentile	0,52	0,33	0,735	0,63	0,16	0,6			1,435	1,22
Maximum	0,52	0,33	0,75	0,65	0,16	0,6			2,04	1,52
Range	0,07	0,33	0,5	0,29	0	0,24			1,41	1,31

	Kollagen (10 $\mu\text{g/ml}$)									
Gruppe	JAK2 + HU		JAK2 - HU		CALR + HU		CALR - HU		Kon- trollen	Kon- trollen
	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS	- ASS	+ ASS
n	2	1	4	3	1				9	9
ATP-Freisetzung [nmol/2x10 ⁸ TZ/ml]										
Minimum	0,36	0,19	0,23	0,25	0,16				0,54	0,21
25% Perzentile	0,36	0,19	0,3025	0,25	0,16				0,585	0,415
Median	0,53	0,19	0,535	0,42	0,16				0,96	0,48
75% Perzentile	0,7	0,19	0,565	0,42	0,16				1,04	0,745
Maximum	0,7	0,19	0,57	0,42	0,16				1,58	0,88
Range	0,34	0	0,34	0,17	0				1,04	0,67
ADP-Freisetzung [nmol/2x10 ⁸ TZ/ml]										
Minimum	0,03	0,19	0	0,05	0,16				0,39	0,11
25% Perzentile	0,03	0,19	0	0,05	0,16				0,735	0,295
Median	0,275	0,19	0,12	0,48	0,16				1,19	0,55
75% Perzentile	0,52	0,19	0,42	0,63	0,16				1,61	0,71
Maximum	0,52	0,19	0,48	0,63	0,16				1,78	0,77

Range	0,49	0	0,48	0,58	0				1,39	0,66
ATP/ADP-Ratio	1,93	1,0	4,46	0,875	1,0				0,81	0,87

8.1.3 PLASMATISCHEN UND THROMBOZYTÄRE THROMBINGENERIERUNG MITTELS CAT

Legende: PFP = Plättchen-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

	PFP mit 5 pM TF					
Gruppe	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	6	7	4	1	10	10
Lag time [min]						
Minimum	3,22	2,79	2,91	3,67	3,00	3,00
25% Perzentile	3,30	3,11	3,21	3,67	3,00	3,08
Median	3,50	3,67	4,27	3,67	3,28	3,32
75% Perzentile	4,50	3,78	4,69	3,67	3,78	3,73
Maximum	6,00	5,44	4,78	3,67	4,22	4,00
Range	2,78	2,65	1,87	-	1,22	1,00
ttPeak [min]						
Minimum	5,89	5,02	6,02	6,89	5,22	5,78
25% Perzentile	6,39	5,89	6,35	6,89	5,84	5,97
Median	6,89	6,56	7,38	6,89	6,45	6,39
75% Perzentile	7,58	8,00	8,03	6,89	6,81	6,90
Maximum	8,67	10,33	8,22	6,89	7,89	7,44
Range	2,78	5,31	2,20	-	2,67	1,66
Thrombin Peak [nM]						
Minimum	159,70	133,90	216,10	226,50	224,30	252,60
25% Perzentile	209,50	179,70	222,60	226,50	249,00	263,30
Median	256,00	288,90	254,00	226,50	273,50	282,50
75% Perzentile	330,00	336,80	277,00	226,50	307,30	333,20
Maximum	357,40	382,40	280,70	226,50	339,90	353,60
Range	197,70	248,50	64,67	-	115,60	100,90
ETP [nMxmin]						
Minimum	839,2	1.248,0	1.490,0	1.552,0	1.259,0	1.467,0
25% Perzentile	1.249,0	1.322,0	1.508,0	1.552,0	1.529,0	1.537,0

Median	1.570,0	1.543,0	1.565,0	1.552,0	1.637,0	1.675,0
75% Perzentile	1.859,0	1.804,0	1.584,0	1.552,0	1.719,0	1.879,0
Maximum	2.181,0	1.826,0	1.590,0	1.552,0	1.957,0	1.964,0
Range	1.342,0	578,1	100,5	-	697,6	497,0

	basales PRP					
Gruppe	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	5	6	3		9	7
Lag time [min]						
Minimum	18,89	22,67	21,31		23,22	17,44
25% Perzentile	21,78	28,30	21,31		23,28	21,22
Median	25,17	31,84	24,67		24,33	21,83
75% Perzentile	33,56	33,06	29,31		26,34	28,50
Maximum	39,22	34,91	29,31		38,78	32,11
Range	20,33	12,24	8,00		15,56	14,67
ttPeak [min]						
Minimum	28,00	34,50	32,51		33,67	29,89
25% Perzentile	31,84	38,01	32,51		36,17	33,44
Median	37,33	42,61	39,17		38,11	37,67
75% Perzentile	43,45	44,57	42,34		40,84	42,17
Maximum	47,89	44,59	42,34		46,11	43,56
Range	19,89	10,09	9,83		12,44	13,67
Thrombin Peak [nM]						
Minimum	20,46	11,12	24,21		23,23	19,93
25% Perzentile	22,79	12,79	24,21		26,57	22,99
Median	54,13	38,78	75,58		48,11	55,33
75% Perzentile	63,96	42,96	99,44		59,27	70,67
Maximum	68,22	43,06	99,44		76,78	77,23
Range	47,76	31,94	75,23		53,55	57,30
ETP [nMxmin]						
Minimum	282,4	191,4	339,1		305,4	442,1
25% Perzentile	357,6	256,7	339,1		576,1	444,0
Median	995,9	640,5	1.228,0		1.062,0	1.216,0
75% Perzentile	1.181,0	761,9	1.459,0		1.156,0	1.285,0
Maximum	1.211,0	927,7	1.459,0		1.272,0	1.444,0
Range	928,2	736,3	1.120,0		966,4	1.002,0

	PRP mit 1 pM TF					
Gruppe	JAK2	JAK2	CALR	CALR	Kontrollen	Kontrollen

	+ HU	- HU	+ HU	- HU	+ ASS	- ASS
n	6	7	4	1	10	10
Lag time [min]						
Minimum	9,00	7,80	9,89	7,22	7,00	7,78
25% Perzentile	10,75	8,00	10,78	7,22	8,20	8,39
Median	11,73	10,89	15,12	7,22	10,39	9,89
75% Perzentile	13,84	11,22	17,20	7,22	11,44	10,33
Maximum	17,67	16,00	17,33	7,22	12,78	10,66
Range	8,67	8,20	7,44	-	5,78	2,88
ttPeak [min]						
Minimum	20,11	18,89	23,00	18,67	16,33	20,78
25% Perzentile	21,45	19,82	24,18	18,67	20,89	21,50
Median	23,28	23,22	28,03	18,67	24,11	23,06
75% Perzentile	25,33	25,89	29,77	18,67	25,72	24,11
Maximum	26,00	26,33	30,25	18,67	27,56	26,36
Range	5,89	7,44	7,25	-	11,23	5,58
Thrombin Peak [nM]						
Minimum	46,49	67,62	68,46	86,27	71,02	86,85
25% Perzentile	76,23	88,75	75,91	86,27	83,43	96,90
Median	113,10	96,42	115,60	86,27	96,58	102,90
75% Perzentile	125,40	108,80	144,80	86,27	118,10	121,20
Maximum	132,20	132,70	148,70	86,27	121,60	137,20
Range	85,75	65,10	80,28	-	50,55	50,35
ETP [nMxmin]						
Minimum	661,9	1.213,0	1.487,0	1.580,0	1.318,0	1.519,0
25% Perzentile	1.303,0	1.554,0	1.509,0	1.580,0	1.574,0	1.694,0
Median	1.713,0	1.711,0	1.696,0	1.580,0	1.710,0	1.864,0
75% Perzentile	2.015,0	1.941,0	1.835,0	1.580,0	1.819,0	1.981,0
Maximum	2.569,0	2.171,0	1.841,0	1.580,0	2.065,0	1.994,0
Range	1.908,0	958,1	353,6	-	747,2	475,3

	PRP mit 0,1 U/ml Thrombin					
Gruppe	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	6	7	4	1	10	9
Lag time [min]						
Minimum	9,22	9,67	13,22	13,22	8,33	10,43
25% Perzentile	10,98	11,00	13,47	13,22	9,86	10,72
Median	14,06	13,43	14,45	13,22	11,11	13,56
75% Perzentile	16,00	15,89	20,67	13,22	16,64	15,56

Maximum	18,00	17,89	22,67	13,22	18,56	16,33
Range	8,78	8,22	9,45	-	10,23	5,90
ttPeak [min]						
Minimum	20,67	22,00	28,11	26,56	18,00	22,11
25% Perzentile	22,67	26,34	28,68	26,56	20,48	23,78
Median	26,34	27,89	30,94	26,56	26,23	30,33
75% Perzentile	31,95	30,67	36,62	26,56	32,92	32,39
Maximum	32,44	31,22	38,33	26,56	37,00	33,11
Range	11,77	9,22	10,22	-	19,00	11,00
Thrombin Peak [nM]						
Minimum	32,88	47,49	24,23	33,93	29,70	46,76
25% Perzentile	52,73	48,08	27,71	33,93	47,68	52,62
Median	74,95	59,35	54,53	33,93	66,23	55,69
75% Perzentile	84,89	68,65	83,68	33,93	77,93	63,50
Maximum	87,75	79,30	87,94	33,93	102,80	88,55
Range	54,87	31,81	63,71	-	73,12	41,79
ETP [nMxmin]						
Minimum	568,2	1.030,0	602,3	910,8	812,0	1.099,0
25% Perzentile	1.099,0	1.132,0	648,3	910,8	1.210,0	1.207,0
Median	1.383,0	1.433,0	1.037,0	910,8	1.371,0	1.245,0
75% Perzentile	1.647,0	1.487,0	1.361,0	910,8	1.554,0	1.337,0
Maximum	1.790,0	1.590,0	1.385,0	910,8	1.644,0	1.442,0
Range	1.222,0	559,6	782,4	-	832,1	343,2

PRP mit 50 ng/ml Convulxin						
Gruppe	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	6	7	4	1	10	10
Lag time [min]						
Minimum	14,89	12,89	12,00	22,78	11,22	11,00
25% Perzentile	15,30	16,33	13,47	22,78	12,72	12,61
Median	16,62	17,26	18,00	22,78	14,95	13,84
75% Perzentile	19,50	33,50	28,06	22,78	15,80	14,70
Maximum	20,00	34,50	31,37	22,78	16,44	16,33
Range	5,11	21,61	19,37	-	5,22	5,33
ttPeak [min]						
Minimum	18,22	15,67	15,46	26,00	14,89	13,56
25% Perzentile	18,48	19,33	16,82	26,00	15,92	15,45
Median	20,22	20,60	21,28	26,00	18,45	16,50
75% Perzentile	22,75	38,17	36,46	26,00	19,42	18,48

Maximum	23,33	40,50	41,39	26,00	20,34	19,00
Range	5,11	24,83	25,93	-	5,45	5,44
Thrombin Peak [nM]						
Minimum	104,40	74,33	44,08	189,00	138,00	202,00
25% Perzentile	153,60	155,10	88,65	189,00	163,20	220,00
Median	202,90	231,90	226,70	189,00	208,60	275,00
75% Perzentile	264,20	265,80	246,30	189,00	256,40	297,00
Maximum	288,60	286,10	251,30	189,00	273,90	348,10
Range	184,20	211,80	207,20	-	135,90	146,10
ETP [nMxmin]						
Minimum	654,1	964,6	776,6	1.160,0	1.112,0	1.324,0
25% Perzentile	1.060,0	1.054,0	876,4	1.160,0	1.340,0	1.370,0
Median	1.388,0	1.455,0	1.361,0	1.160,0	1.422,0	1.591,0
75% Perzentile	1.673,0	1.582,0	1.658,0	1.160,0	1.530,0	1.670,0
Maximum	2.036,0	1.669,0	1.694,0	1.160,0	1.672,0	1.720,0
Range	1.381,0	704,4	917,8	-	560,0	396,4

	PRP mit 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin					
Gruppe	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU	Kontrollen + ASS	Kontrollen - ASS
n	6	7	4	1	10	10
Lag time [min]						
Minimum	6,67	7,11	8,88	9,67	7,00	6,44
25% Perzentile	7,92	7,78	8,94	9,67	7,08	6,84
Median	9,28	8,33	10,11	9,67	8,54	7,49
75% Perzentile	9,95	11,03	11,44	9,67	9,03	8,70
Maximum	10,44	15,33	11,55	9,67	9,67	9,77
Range	3,77	8,22	2,67	-	2,67	3,33
ttPeak [min]						
Minimum	13,67	13,32	15,57	19,44	11,44	10,56
25% Perzentile	14,83	13,33	15,96	19,44	13,53	11,50
Median	17,28	15,22	17,78	19,44	15,00	12,39
75% Perzentile	18,78	25,67	25,38	19,44	17,39	15,39
Maximum	18,78	26,56	27,69	19,44	17,97	17,12
Range	5,11	13,24	12,12	-	6,53	6,56
Thrombin Peak [nM]						
Minimum	52,92	58,19	49,41	71,85	63,19	105,10
25% Perzentile	68,30	69,86	61,19	71,85	74,86	124,00
Median	98,51	81,30	102,40	71,85	114,50	179,00
75% Perzentile	132,50	153,20	124,40	71,85	138,50	204,70

Maximum	167,00	185,00	129,70	71,85	186,50	241,40
Range	114,00	126,80	80,31	-	123,30	136,30
ETP [nMxmin]						
Minimum	646,6	1.115,0	1.211,0	1.134,0	1.078,0	1.334,0
25% Perzentile	1.105,0	1.182,0	1.215,0	1.134,0	1.418,0	1.451,0
Median	1.509,0	1.459,0	1.363,0	1.134,0	1.473,0	1.613,0
75% Perzentile	1.849,0	1.650,0	1.668,0	1.134,0	1.595,0	1.775,0
Maximum	1.965,0	1.784,0	1.724,0	1.134,0	1.729,0	1.879,0
Range	1.318,0	668,5	512,6	-	651,6	545,2

8.1.4 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" = Zeit bis zum Thrombin Peak, nM = Nanomolar, ETP = endogenes Thrombin Potential, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, U = Units, ml = Milliliter

	basale isolierte Thrombozyten											
Gruppe	Eigen-plasma: JAK2 + HU	Eigen-plasma: JAK2 - HU	Eigen-plasma: CALR + HU	Eigen-plasma: CALR - HU	Kontroll-plasma: JAK2 + HU	Kontroll-plasma: JAK2 - HU	Kontroll-plasma: CALR + HU	Kontroll-plasma: CALR - HU	Eigen-plasma: Kon-trollen + ASS	Eigen-plasma: Kon-trollen - ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen + ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen - ASS
n	5	6	4	1	6	6	4	1	10	10	10	9
Lag time [min]												
Minimum	13,33	16,33	15,00	31,00	11,67	16,44	17,33	33,67	13,00	12,33	13,00	10,67
25% Perzentile	13,67	18,09	15,75	31,00	15,17	16,86	18,42	33,67	17,67	15,46	17,58	17,50
Median	16,33	20,83	18,67	31,00	18,83	17,72	26,84	33,67	21,34	18,42	20,50	24,00
75% Perzentile	25,00	24,54	22,59	31,00	25,36	23,09	41,75	33,67	23,67	22,54	26,08	27,09
Maximum	25,67	25,79	23,67	31,00	31,43	24,33	45,00	33,67	26,33	27,67	38,00	30,00
Range	12,34	9,46	8,67	0,00	19,76	7,89	27,67	0,00	13,33	15,34	25,00	19,33
ttPeak [min]												
Minimum	18,00	23,33	23,33	44,67	15,33	25,33	29,00	45,50	26,00	18,00	24,67	17,33
25% Perzentile	18,67	24,58	24,75	44,67	20,58	26,67	30,25	45,50	29,17	24,77	31,17	29,00
Median	26,67	31,00	30,00	44,67	30,17	28,34	39,50	45,50	34,84	32,42	34,34	35,09
75% Perzentile	33,83	35,97	31,00	44,67	38,20	30,85	48,75	45,50	37,08	35,83	41,09	38,67
Maximum	34,33	37,47	31,00	44,67	41,78	33,00	50,00	45,50	41,67	39,17	47,67	40,33

Range	16,33	14,14	7,67	0,00	26,45	7,67	21,00	0,00	15,67	21,17	23,00	23,00
Thrombin Peak [nM]												
Minimum	40,64	45,58	63,22	14,72	27,45	75,37	4,56	12,02	50,55	65,47	8,51	43,97
25% Perzentile	69,34	51,80	64,35	14,72	35,24	75,48	17,94	12,02	64,79	68,84	33,69	52,03
Median	112,20	60,92	71,89	14,72	98,38	78,91	69,48	12,02	68,60	92,72	64,74	55,28
75% Perzentile	156,80	117,40	92,30	14,72	140,60	120,10	88,51	12,02	95,64	117,50	92,08	95,28
Maximum	192,10	175,10	97,72	14,72	181,90	128,30	91,06	12,02	121,10	156,70	105,70	168,90
Range	151,40	129,50	34,50	0,00	154,40	52,90	86,50	0,00	70,54	91,20	97,18	124,90
ETP [nMxmin]												
Minimum	710,10	630,40	1054,00	278,60	496,20	1017,00	48,66	198,80	1117,00	1219,00	119,80	852,40
25% Perzentile	1097,00	800,70	1095,00	278,60	587,50	1132,00	252,50	198,80	1209,00	1301,00	526,50	906,20
Median	1568,00	1190,00	1259,00	278,60	1213,00	1260,00	1055,00	198,80	1302,00	1531,00	1139,00	1152,00
75% Perzentile	1609,00	1453,00	1320,00	278,60	1471,00	1411,00	1324,00	198,80	1485,00	1859,00	1501,00	1648,00
Maximum	1626,00	1455,00	1327,00	278,60	1583,00	1530,00	1350,00	198,80	1671,00	1935,00	1637,00	2111,00
Range	915,50	824,50	272,80	0,00	1087,00	512,90	1301,00	0,00	553,70	715,40	1517,00	1259,00

	Isolierte Thrombozyten mit 1 pM TF											
Gruppe	Eigen-plasma: JAK2 + HU	Eigen-plasma: JAK2 - HU	Eigen-plasma: CALR + HU	Eigen-plasma: CALR - HU	Kontroll-plasma: JAK2 + HU	Kontroll-plasma: JAK2 - HU	Kontroll-plasma: CALR + HU	Kontroll-plasma: CALR - HU	Eigen-plasma: Kon-trollen + ASS	Eigen-plasma: Kon-trollen - ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen + ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen - ASS
n	6	8	4	1	6	8	4	1	10	10	10	10
Lag time [min]												
Minimum	7,00	6,33	7,33	8,67	5,33	7,33	9,00	7,17	7,33	6,33	8,67	6,67

25% Perzentile	7,75	7,42	8,08	8,67	6,08	8,33	9,33	7,17	8,50	7,00	10,50	7,50
Median	8,50	8,50	10,50	8,67	9,00	9,50	10,67	7,17	10,83	7,85	11,34	8,50
75% Perzentile	13,35	13,50	11,67	8,67	10,35	13,00	11,50	7,17	13,42	11,33	14,17	9,84
Maximum	23,41	15,77	12,00	8,67	12,39	14,44	11,67	7,17	14,00	12,00	15,00	12,00
Range	16,41	9,44	4,67	0,00	7,06	7,11	2,67	0,00	6,67	5,67	6,33	5,33
ttPeak [min]												
Minimum	15,00	14,67	16,00	23,00	10,00	15,33	19,67	17,67	18,67	12,67	19,33	14,67
25% Perzentile	15,25	15,17	16,92	23,00	12,75	17,84	19,84	17,67	19,17	15,85	21,17	16,62
Median	18,67	18,50	19,84	23,00	17,84	20,83	21,00	17,67	22,34	19,09	24,67	18,67
75% Perzentile	24,03	25,17	23,50	23,00	22,35	23,09	22,42	17,67	26,50	23,42	25,75	21,13
Maximum	33,10	29,13	24,67	23,00	25,42	26,12	22,67	17,67	28,33	24,00	27,67	25,33
Range	18,10	14,46	8,67	0,00	15,42	10,79	3,00	0,00	9,66	11,33	8,34	10,66
Thrombin Peak [nM]												
Minimum	31,25	28,73	96,57	149,50	47,83	5,61	101,10	94,60	90,30	119,50	53,75	75,64
25% Perzentile	55,45	79,58	101,30	149,50	78,19	91,15	107,80	94,60	105,00	136,30	80,50	124,50
Median	151,20	86,48	118,90	149,50	159,00	115,80	136,40	94,60	118,10	159,20	130,50	127,40
75% Perzentile	163,30	118,60	129,30	149,50	175,60	131,20	163,30	94,60	148,10	201,30	155,70	176,80
Maximum	171,80	138,50	131,60	149,50	176,90	183,00	169,50	94,60	166,60	243,00	168,30	268,30
Range	140,50	109,70	35,00	0,00	129,10	177,40	68,39	0,00	76,28	123,60	114,60	192,70
ETP [nMxmin]												
Minimum	520,9	596,7	1408	2616	727,6	128,6	1043	1446	1561	1609	1003	1193
25% Perzentile	799,2	1009	1445	2616	1246	1181	1231	1446	1623	1830	1204	1533
Median	1872	1429	1622	2616	1573	1527	1980	1446	1720	2181	1882	1797
75% Perzentile	2121	1718	1748	2616	1941	1848	2189	1446	1958	2697	2030	2618
Maximum	2354	1948	1768	2616	1974	2058	2197	1446	2004	2800	2407	3494

Range	1833	1351	359,6	0	1246	1929	1155	0	442,8	1190	1404	2302
-------	------	------	-------	---	------	------	------	---	-------	------	------	------

	Isolierte Thrombozyten mit 0,1 U/ml Thrombin											
Gruppe	Eigen-plasma: <i>JAK2</i> + HU	Eigen-plasma: <i>JAK2</i> - HU	Eigen-plasma: <i>CALR</i> + HU	Eigen-plasma: <i>CALR</i> - HU	Kontroll-plasma: <i>JAK2</i> + HU	Kontroll-plasma: <i>JAK2</i> - HU	Kontroll-plasma: <i>CALR</i> + HU	Kontroll-plasma: <i>CALR</i> - HU	Eigen-plasma: Kon-trollen + ASS	Eigen-plasma: Kon-trollen - ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen + ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen - ASS
n	6	8	4	1	6	7	4	1	10	10	10	10
Lag time [min]												
Minimum	8,00	7,33	7,67	8,67	7,67	7,33	8,00	10,67	9,00	7,04	7,33	8,00
25% Perzentile	8,50	8,84	7,84	8,67	8,42	9,33	8,00	10,67	10,50	8,42	10,17	9,13
Median	11,67	10,67	8,50	8,67	11,50	9,67	9,67	10,67	12,17	9,50	11,50	10,00
75% Perzentile	14,43	14,94	9,17	8,67	17,44	13,44	11,59	10,67	13,84	12,34	13,58	12,33
Maximum	15,73	20,67	9,33	8,67	18,74	14,67	11,67	10,67	18,00	14,67	15,00	22,67
Range	7,73	13,34	1,66	0,00	11,07	7,34	3,67	0,00	9,00	7,63	7,67	14,67
ttPeak [min]												
Minimum	14,00	14,33	19,00	31,00	12,00	17,67	15,67	24,67	22,00	17,06	18,33	20,33
25% Perzentile	16,00	17,42	19,08	31,00	15,75	17,67	16,84	24,67	23,67	18,83	22,83	20,67
Median	23,17	24,56	19,83	31,00	23,84	22,33	21,33	24,67	26,00	21,84	26,67	22,67
75% Perzentile	28,27	28,35	20,83	31,00	32,20	25,45	26,58	24,67	28,83	27,25	27,83	26,75
Maximum	34,10	34,33	21,00	31,00	33,77	29,33	28,00	24,67	32,00	30,50	32,33	37,17
Range	20,10	20,00	2,00	0,00	21,77	11,66	12,33	0,00	10,00	13,44	14,00	16,84
Thrombin Peak [nM]												
Minimum	17,76	2,80	31,89	41,42	30,11	41,36	39,26	32,87	56,36	51,71	36,43	40,20

25% Perzentile	41,66	41,24	40,12	41,42	55,67	58,02	42,83	32,87	61,04	62,15	53,69	47,89
Median	98,83	61,45	66,59	41,42	95,78	71,90	60,69	32,87	71,94	93,98	73,60	65,16
75% Perzentile	119,50	73,68	79,35	41,42	122,90	82,87	83,56	32,87	85,38	110,20	90,68	76,38
Maximum	150,70	88,28	83,00	41,42	159,60	94,81	88,80	32,87	150,20	123,30	102,00	143,50
Range	132,90	85,48	51,11	0,00	129,50	53,45	49,54	0,00	93,83	71,56	65,58	103,30
ETP [nMxmin]												
Minimum	365,80	58,60	810,80	1261,00	582,80	854,50	720,60	776,40	1151,00	1103,00	862,30	910,50
25% Perzentile	640,50	701,30	880,60	1261,00	942,80	977,70	778,40	776,40	1219,00	1246,00	970,60	984,20
Median	1456,00	1165,00	1098,00	1261,00	1287,00	1086,00	1174,00	776,40	1353,00	1564,00	1424,00	1181,00
75% Perzentile	1610,00	1273,00	1274,00	1261,00	1519,00	1347,00	1468,00	776,40	1477,00	1790,00	1572,00	1331,00
Maximum	1677,00	1296,00	1329,00	1261,00	1583,00	1474,00	1492,00	776,40	1738,00	2031,00	1884,00	2465,00
Range	1311,00	1237,00	518,40	0,00	1000,00	619,30	771,30	0,00	586,70	927,50	1021,00	1554,00

8.1.5 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" = Zeit bis zum Thrombin Peak, nM = Nanomolar, ETP = endogenes Thrombin Potential, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, U = Units, ml = Milliliter

	basale MNC											
Gruppe	Eigen-plasma: JAK2 + HU	Eigen-plasma: JAK2 - HU	Eigen-plasma: CALR + HU	Eigen-plasma: CALR - HU	Kontroll-plasma: JAK2 + HU	Kontroll-plasma: JAK2 - HU	Kontroll-plasma: CALR + HU	Kontroll-plasma: CALR - HU	Eigen-plasma: Kon-trollen + ASS	Eigen-plasma: Kon-trollen - ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen + ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen - ASS
n	6	6	4	1	6	6	4	1	9	8	7	8
Lag time [min]												
Minimum	9,67	14,00	16,00	22,33	9,00	13,00	17,36	15,00	14,00	14,33	18,33	14,33
25% Perzentile	11,42	15,25	16,34	22,33	11,25	14,25	18,02	15,00	14,84	15,08	18,33	15,92
Median	15,00	18,50	18,02	22,33	15,34	17,00	21,53	15,00	17,00	17,84	19,33	20,17
75% Perzentile	18,50	20,67	19,46	22,33	25,00	32,42	24,76	15,00	20,17	21,08	26,33	26,18
Maximum	20,00	23,67	19,72	22,33	43,00	36,67	25,33	15,00	25,67	43,00	33,33	33,67
Range	10,33	9,67	3,72	0,00	34,00	23,67	7,97	0,00	11,67	28,67	15,00	19,34
ttPeak [min]												
Minimum	9,67	14,00	16,00	22,33	13,67	16,67	28,71	26,67	25,33	28,33	29,00	28,33
25% Perzentile	11,42	15,25	16,34	22,33	19,67	20,67	30,70	26,67	27,17	29,92	32,00	31,42
Median	15,00	18,50	18,02	22,33	31,34	29,33	37,17	26,67	33,00	31,84	33,00	33,83
75% Perzentile	18,50	20,67	19,46	22,33	37,25	45,00	40,24	26,67	34,83	39,87	38,67	35,24

Maximum	20,00	23,67	19,72	22,33	51,00	46,00	41,09	26,67	37,00	49,00	39,00	36,33
Range	10,33	9,67	3,72	0,00	37,33	29,33	12,38	0,00	11,67	20,67	10,00	8,00
Thrombin Peak [nM]												
Minimum	9,67	14,00	16,00	22,33	9,67	3,73	11,79	48,36	2,49	1,71	1,39	1,15
25% Perzentile	11,42	15,25	16,34	22,33	10,28	3,91	18,36	48,36	9,04	6,12	2,18	3,45
Median	15,00	18,50	18,02	22,33	24,53	39,95	40,23	48,36	16,86	14,62	12,56	10,08
75% Perzentile	18,50	20,67	19,46	22,33	38,73	82,36	46,03	48,36	26,44	30,59	33,90	25,26
Maximum	20,00	23,67	19,72	22,33	54,10	150,10	47,23	48,36	39,27	42,91	37,46	27,79
Range	10,33	9,67	3,72	0,00	44,43	146,40	35,44	0,00	36,78	41,20	36,07	26,64
ETP [nMxmin]												
Minimum	9,67	14,00	16,00	22,33	85,67	73,97	249,90	904,30	58,58	25,97	0,00	31,37
25% Perzentile	11,42	15,25	16,34	22,33	251,00	74,04	386,30	904,30	230,20	169,80	46,69	78,23
Median	15,00	18,50	18,02	22,33	585,30	819,70	858,30	904,30	426,80	381,30	231,00	220,70
75% Perzentile	18,50	20,67	19,46	22,33	727,00	1181,00	978,50	904,30	720,30	855,50	818,80	630,60
Maximum	20,00	23,67	19,72	22,33	934,10	1184,00	997,70	904,30	959,20	1056,00	864,40	773,30
Range	10,33	9,67	3,72	0,00	848,40	1110,00	747,80	0,00	900,60	1030,00	864,40	742,00

	MNC mit TF											
Gruppe	Eigen-plasma: <i>JAK2</i> + HU	Eigen-plasma: <i>JAK2</i> - HU	Eigen-plasma: <i>CALR</i> + HU	Eigen-plasma: <i>CALR</i> - HU	Kontroll-plasma: <i>JAK2</i> + HU	Kontroll-plasma: <i>JAK2</i> - HU	Kontroll-plasma: <i>CALR</i> + HU	Kontroll-plasma: <i>CALR</i> - HU	Eigen-plasma: Kon-trollen + ASS	Eigen-plasma: Kon-trollen - ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen + ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen - ASS
n	7	7	4	1	7	7	4	1	10	10	10	10
Lag time [min]												

Minimum	6,33	6,67	7,33	6,67	5,00	6,00	8,01	6,67	6,67	7,33	8,33	6,67
25% Perzentile	7,00	7,00	7,83	6,67	8,00	6,33	8,10	6,67	7,42	8,75	9,00	9,08
Median	7,67	7,67	9,84	6,67	8,33	8,67	9,02	6,67	9,67	10,17	10,00	10,52
75% Perzentile	10,33	8,67	12,36	6,67	8,67	9,80	10,67	6,67	11,08	10,67	10,42	11,42
Maximum	20,07	9,00	13,04	6,67	16,73	17,00	11,00	6,67	12,00	12,05	12,33	12,67
Range	13,74	2,33	5,71	0,00	11,73	11,00	2,99	0,00	5,33	4,72	4,00	6,00
ttPeak [min]												
Minimum	13,00	12,33	15,33	16,33	10,00	11,33	17,02	14,00	17,33	21,00	19,33	19,33
25% Perzentile	13,00	15,33	16,09	16,33	19,33	12,33	18,10	14,00	20,17	24,42	21,92	20,67
Median	18,33	20,15	19,52	16,33	19,67	19,67	21,86	14,00	24,00	30,92	24,84	26,17
75% Perzentile	28,67	21,00	26,97	16,33	24,33	22,00	23,85	14,00	28,67	32,24	27,00	29,56
Maximum	31,76	24,33	29,07	16,33	32,76	34,67	24,33	14,00	32,33	33,00	33,00	34,33
Range	18,76	12,00	13,74	0,00	22,76	23,34	7,31	0,00	15,00	12,00	13,67	15,00
Thrombin Peak [nM]												
Minimum	13,88	39,20	45,65	82,90	13,07	47,09	69,80	87,41	33,42	29,22	26,85	16,12
25% Perzentile	31,92	53,83	50,06	82,90	34,52	55,57	70,44	87,41	36,60	46,67	31,60	41,21
Median	73,18	63,62	70,75	82,90	60,85	61,48	83,14	87,41	44,95	51,83	39,41	53,22
75% Perzentile	107,90	78,39	89,40	82,90	71,85	79,42	97,02	87,41	53,02	60,54	70,41	58,12
Maximum	118,10	79,24	93,13	82,90	73,95	146,60	98,05	87,41	68,30	61,37	97,16	67,43
Range	104,20	40,04	47,48	0,00	60,88	99,51	28,25	0,00	34,88	32,15	70,31	51,31
ETP [nMxmin]												
Minimum	270,40	658,20	805,50	1318,00	331,50	844,40	1141,00	1103,00	917,30	823,10	741,40	492,70
25% Perzentile	943,20	1003,00	874,40	1318,00	727,30	1054,00	1142,00	1103,00	989,10	1198,00	859,90	883,70
Median	1312,00	1216,00	1241,00	1318,00	1002,00	1202,00	1424,00	1103,00	1174,00	1297,00	1104,00	1191,00
75% Perzentile	1731,00	1274,00	1607,00	1318,00	1280,00	1417,00	1717,00	1103,00	1273,00	1433,00	1524,00	1344,00

Maximum	1756,00	1550,00	1676,00	1318,00	1705,00	1459,00	1721,00	1103,00	1406,00	1528,00	1775,00	1900,00
Range	1485,00	891,90	870,70	0,00	1373,00	614,90	580,70	0,00	488,50	705,20	1033,00	1408,00

MNC mit 0,1 U/ml Thrombin												
Gruppe	Eigen-plasma: <i>JAK2</i> + HU	Eigen-plasma: <i>JAK2</i> - HU	Eigen-plasma: <i>CALR</i> + HU	Eigen-plasma: <i>CALR</i> - HU	Kontroll-plasma: <i>JAK2</i> + HU	Kontroll-plasma: <i>JAK2</i> - HU	Kontroll-plasma: <i>CALR</i> + HU	Kontroll-plasma: <i>CALR</i> - HU	Eigen-plasma: Kon-trollen + ASS	Eigen-plasma: Kon-trollen - ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen + ASS	Kontroll-plasma: Kon-trollen - ASS
n	7	7	4	1	6	7	4	1	10	10	10	10
Lag time [min]												
Minimum	4,67	7,33	7,33	10,67	7,67	7,00	9,33	9,33	7,00	8,00	8,00	6,67
25% Perzentile	8,33	8,33	7,42	10,67	7,67	8,33	10,00	9,33	8,50	8,75	8,50	9,42
Median	9,00	9,67	9,18	10,67	8,84	11,00	12,86	9,33	9,34	10,50	9,34	10,50
75% Perzentile	10,00	13,48	13,45	10,67	9,67	13,14	13,94	9,33	11,33	11,34	10,08	12,20
Maximum	18,40	17,00	14,37	10,67	10,67	15,67	14,02	9,33	13,67	14,33	10,67	14,50
Range	13,73	9,67	7,04	0,00	3,00	8,67	4,69	0,00	6,67	6,33	2,67	7,83
ttPeak [min]												
Minimum	11,00	14,67	16,00	22,00	15,00	14,00	22,33	21,33	18,33	19,67	16,00	16,33
25% Perzentile	15,33	19,00	16,25	22,00	17,50	20,67	23,01	21,33	20,83	20,25	18,92	23,33
Median	22,00	22,00	19,52	22,00	20,84	21,67	27,02	21,33	22,84	27,33	24,00	24,50
75% Perzentile	23,67	28,83	30,06	22,00	23,33	24,33	31,56	21,33	26,50	30,90	26,84	26,60
Maximum	33,10	38,33	32,74	22,00	23,33	29,17	32,41	21,33	28,33	33,00	28,00	29,67
Range	22,10	23,66	16,74	0,00	8,33	15,17	10,08	0,00	10,00	13,33	12,00	13,34
Thrombin Peak [nM]												

Minimum	2,60	7,69	25,47	20,99	20,47	16,06	9,71	37,55	6,86	5,49	7,69	6,77
25% Perzentile	21,13	26,31	30,14	20,99	22,85	20,57	15,84	37,55	15,95	12,95	12,83	11,04
Median	40,52	43,20	46,37	20,99	29,30	29,12	41,18	37,55	23,62	23,54	16,92	19,22
75% Perzentile	73,84	48,04	67,52	20,99	42,51	53,14	54,44	37,55	35,61	32,46	47,59	26,98
Maximum	93,60	50,18	73,83	20,99	46,94	80,39	56,54	37,55	40,00	35,00	104,40	32,80
Range	91,00	42,49	48,36	0,00	26,47	64,33	46,83	0,00	33,14	29,51	96,74	26,03
ETP [nMxmin]												
Minimum	76,21	187,10	409,30	495,70	505,00	433,50	238,90	805,20	162,10	152,80	194,50	166,40
25% Perzentile	578,90	358,10	503,60	495,70	551,70	483,70	417,80	805,20	419,70	398,20	314,50	294,60
Median	989,70	953,60	967,70	495,70	639,70	702,50	965,90	805,20	677,80	657,00	497,20	498,70
75% Perzentile	1211,00	1162,00	1474,00	495,70	802,10	1018,00	1161,00	805,20	907,60	846,50	1223,00	702,20
Maximum	1435,00	1212,00	1583,00	495,70	926,00	1065,00	1222,00	805,20	1210,00	981,40	1705,00	891,40
Range	1359,00	1025,00	1173,00	0,00	421,00	631,80	982,80	0,00	1048,00	828,70	1511,00	725,00

8.2 TABELLEN: P-WERTE

8.2.1 AGONISTEN-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE AGGREGATION MITTELS

CHRONOLOG

Auswertung mittels t-Test oder **Mann-Whitney-Test**

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, µM = Mikromolar, µg = Mikrogramm, ml = Milliliter

Arachidonsäure (0,5 mg/ml)				
mit ASS				
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Kontrollen + ASS	0,673	0,664	0,796	-
Kontrollen - ASS	0,009	0,004	0,009	-
ohne ASS				
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Kontrollen + ASS	0,055	0,001	-	-
Kontrollen - ASS	0,015	0,040	-	-

TRAP-6 (10 µM)				
mit ASS				
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Kontrollen + ASS	0,307	0,832	0,174	-
Kontrollen - ASS	0,120	0,471	0,073	-
ohne ASS				
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Kontrollen + ASS	0,906	0,908	-	-
Kontrollen - ASS	0,406	0,573	-	-

TRAP-6 (50 µM)				
mit ASS				
	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU
Kontrollen + ASS	0,193	0,736	0,002	-
Kontrollen - ASS	0,046	0,166	0,0001	-
ohne ASS				
	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU
Kontrollen + ASS	0,034	0,250	-	-
Kontrollen - ASS	0,007	0,018	-	-

Kollagen (2 µg/ml)				
mit ASS				
	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU
Kontrollen + ASS	0,973	0,627	0,877	-
Kontrollen - ASS	0,119	0,276	0,133	-
ohne ASS				
	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU
Kontrollen + ASS	0,877	0,897	-	-
Kontrollen - ASS	0,164	0,429	-	-

Kollagen (10 µg/ml)				
mit ASS				
	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU
Kontrollen + ASS	0,0026	0,0413	<0,0001	-
Kontrollen - ASS	<0,0001	0,0048	<0,0001	-
ohne ASS				
	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU
Kontrollen + ASS	0,1511	0,6911	-	-
Kontrollen - ASS	0,0218	0,1137	-	-

8.2.2 AGONISTEN-INDUZIERTE THROMBOZYTÄRE ADP- UND ATP-FREISETZUNG MITTELS CHRONOLOG

Auswertung mittels t-Test oder **Mann-Whitney-Test**

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, μM = Mikromolar, μg = Mikrogramm, ml = Milliliter, ATP = Adenosintriphosphat, nmol = Nanomol, TZ = Thrombozyten, ADP = Adenosindiphosphat

TRAP-6 (50 μM)				
ATP-Freisetzung				
mit ASS				
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Kontrollen + ASS	0,039	0,265	0,236	-
Kontrollen - ASS	0,002	0,009	0,036	-
ohne ASS				
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Kontrollen + ASS	0,327	0,285	-	-
Kontrollen - ASS	0,036	0,011	-	-

Kollagen (10 $\mu\text{g/ml}$)				
ATP-Freisetzung				
mit ASS				
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Kontrollen + ASS	-	0,1273	-	-
Kontrollen - ASS	-	0,009	-	-
ohne ASS				
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Kontrollen + ASS	0,709	0,915	-	-
Kontrollen - ASS	0,200	0,032	-	-

Kollagen (10 µg/ml)				
ADP-Freisetzung				
mit ASS				
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Kontrollen + ASS	-	0,492	-	-
Kontrollen - ASS	-	0,025	-	-
ohne ASS				
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Kontrollen + ASS	0,327	0,039	-	-
Kontrollen - ASS	0,055	0,003	-	-

8.2.3 PLASMATISCHEN UND THROMBOZYTÄREN THROMBINGENERIERUNG MITTELS CAT

Auswertung mittels t-Test oder **Mann-Whitney-Test**

Legende: PFP = Plättchen-freies Plasma, PRP = Plättchen-reiches Plasma, JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des Calreticulin-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential, U = Units, ml = Milliliter, ng = Nanogramm

PFP mit 5 pM TF					
Lag time					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,230	0,324	0,059	-	0,871
Kontrollen - ASS	0,209	0,349	0,053	-	-
ttPeak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,191	0,179	0,115	-	0,91
Kontrollen - ASS	0,141	0,174	0,061	-	-
Thrombin Peak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,596	0,310	0,219	-	0,336

Kontrollen - ASS	0,278	0,162	0,069	-	-
ETP					
	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,656	0,556	0,487	-	0,386
Kontrollen - ASS	0,372	0,195	0,153	-	-

	basales PRP				
Lag time					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,582	0,068	0,964	-	0,392
Kontrollen - ASS	0,413	0,014	0,771	-	-
ttPeak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,671	0,097	0,766	-	0,606
Kontrollen - ASS	0,973	0,090	0,929	-	-
Thrombin Peak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,953	0,071	0,230	-	0,651
Kontrollen - ASS	0,686	0,038	0,428	-	-
ETP					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,663	0,027	0,710	-	0,299
Kontrollen - ASS	0,149	0,038	0,833	-	-

	PRP mit 1 pM TF				
Lag time					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,075	0,301	0,010	-	0,494
Kontrollen - ASS	0,014	0,126	0,001	-	-

ttPeak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,936	0,763	0,055	-	0,911
Kontrollen - ASS	0,787	0,629	0,005	-	-
Thrombin Peak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,827	0,389	0,396	-	0,319
Kontrollen - ASS	0,667	0,141	0,740	-	-
ETP					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,880	0,432	0,875	-	0,177
Kontrollen - ASS	0,454	0,160	0,176	-	-

PRP mit 0,1 U/ml Thrombin					
Lag time					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,496	0,355	0,142	-	0,589
Kontrollen - ASS	0,976	0,818	0,540	-	-
ttPeak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,906	0,352	0,15	-	0,407
Kontrollen - ASS	0,29	0,799	0,419	-	-
Thrombin Peak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,667	0,314	0,541	-	0,72
Kontrollen - ASS	0,224	0,607	0,825	-	-
ETP					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,995	0,98	0,085	-	0,451
Kontrollen - ASS	0,642	0,381	0,081	-	-

	PRP mit 50 ng/ml Convulxin				
Lag time					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,015	0,0097	0,057	-	0,352
Kontrollen - ASS	0,002	0,006	0,032	-	-
ttPeak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,027	0,027	0,072	-	0,188
Kontrollen - ASS	0,002	0,007	0,039	-	-
Thrombin Peak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,884	0,401	0,945	-	0,011
Kontrollen - ASS	0,037	0,017	0,188	-	-
ETP					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,738	0,252	0,417	-	0,099
Kontrollen - ASS	0,278	0,069	0,117	-	-

	PRP mit 0,1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml Convulxin				
Lag time					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,224	0,084	0,012	-	0,293
Kontrollen - ASS	0,056	0,030	0,003	-	-
ttPeak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,149	0,553	0,039	-	0,054
Kontrollen - ASS	0,005	0,027	0,006	-	-
Thrombin Peak					
	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,622	0,362	0,484	-	0,007

Kontrollen - ASS	0,009	0,004	0,013	-	-
ETP					
	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU	Kontrollen - ASS
Kontrollen + ASS	0,897	0,299	0,637	-	0,111
Kontrollen - ASS	0,362	0,079	0,137	-	-

8.2.4 THROMBINGENERIERUNG DER ISOLIERTEN THROMBOZYTEN MITTELS CAT

Auswertung mittels t-Test oder **Mann-Whitney-Test**

Legende: *JAK2* = Mutation des *JAK2*-Gens, *CALR* = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, U = Units, ml = Milliliter, ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential

basale isolierte Thrombozyten									
Lag time									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,483	0,794	0,509	-	0,854	0,530	0,066	-
	Kontrollen - ASS	0,914	0,373	0,988	-	0,723	0,903	0,042	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,367	0,688	0,422	-	0,540	0,370	0,262	-
	Kontrollen - ASS	0,322	0,696	0,357	-	0,535	0,313	0,200	-
ttPeak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,034	0,221	0,073	-	0,231	0,031	0,173	-
	Kontrollen - ASS	0,311	0,975	0,623	-	0,815	0,568	0,069	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,036	0,159	0,089	-	0,162	0,040	0,421	-
	Kontrollen - ASS	0,133	0,495	0,283	-	0,428	0,195	0,211	-
Thrombin Peak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU	<i>JAK2</i> + HU	<i>JAK2</i> - HU	<i>CALR</i> + HU	<i>CALR</i> - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,086	0,492	0,941	-	0,380	0,073	0,270	-

	Kontrollen - ASS	0,545	0,147	0,198	-	0,856	0,875	0,064	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,038	0,492	0,409	-	0,152	0,181	0,916	-
	Kontrollen - ASS	0,240	0,689	0,504	-	0,607	0,145	>0,9999	-
ETP									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,371	0,130	0,285	-	0,137	0,464	0,039	-
	Kontrollen - ASS	0,679	0,015	0,041	-	0,021	0,038	0,011	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,165	0,703	0,502	-	0,824	0,320	0,637	-
	Kontrollen - ASS	0,519	0,864	0,604	-	0,955	0,388	0,604	-

	basale isolierte Thrombozyten						
Lag time							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,7365	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,3945	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,17	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,4967	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,2194
ttPeak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,57	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,4828	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,0791	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,5503	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,4368

Thrombin Peak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,6138	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,2403	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,4307	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,2178	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,0653
ETP							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,1255	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,3944	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,2936	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,1042	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,0947

isolierte Thrombozyten mit 1 pM TF									
Lag time									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,324	0,556	0,682	-	0,133	0,773	0,901	-
	Kontrollen - ASS	0,577	0,475	0,335	-	0,857	0,199	0,172	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,051	0,130	0,159	-	0,014	0,157	0,230	-
	Kontrollen - ASS	0,813	0,429	0,234	-	0,860	0,146	0,085	-
ttPeak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,108	0,222	0,208	-	0,035	0,202	0,355	-

	Kontrollen - ASS	0,852	0,718	0,749	-	0,491	0,471	0,413	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,051	0,082	0,054	-	0,009	0,045	0,084	-
	Kontrollen - ASS	0,977	0,627	0,631	-	0,504	0,346	0,263	-
Thrombin Peak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,917	0,026	0,597	-	0,594	0,422	0,445	-
	Kontrollen - ASS	0,079	0,0005	0,035	-	0,167	0,014	0,175	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,999	0,095	0,813	-	0,594	0,559	0,535	-
	Kontrollen - ASS	0,367	0,016	0,270	-	0,626	0,129	0,674	-
ETP									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,447	0,019	0,111	-	0,146	0,080	0,886	-
	Kontrollen - ASS	0,038	0,0007	0,016	-	0,008	0,003	0,129	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,682	0,143	0,667	-	0,465	0,239	0,787	-
	Kontrollen - ASS	0,270	0,040	0,282	-	0,158	0,069	0,601	-

	isolierte Thrombozyten mit 1 pM TF						
Lag time							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,9004	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,7501	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,7264	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,2252	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,9713

ttPeak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,5628	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,8317	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,6175	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,5019	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,901
Thrombin Peak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,7013	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,3951	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,2769	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,8849	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,3242
ETP							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,8673	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,9106	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,5117	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,7369	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,3736

isolierte Thrombozyten mit 0,1 U/ml Thrombin									
Lag time									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,555	0,718	0,011	-	0,979	0,263	0,082	-
	Kontrollen - ASS	0,343	0,344	0,218	-	0,212	0,571	0,742	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,955	0,923	0,022	-	0,636	0,566	0,172	-
	Kontrollen - ASS	0,770	0,966	0,034	-	0,895	>0,9999	0,388	-
ttPeak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,205	0,323	0,002	-	0,375	0,058	0,055	-
	Kontrollen - ASS	0,991	0,726	0,246	-	0,822	0,900	0,647	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,297	0,446	0,012	-	0,484	0,126	0,113	-
	Kontrollen - ASS	0,771	0,966	0,026	-	>0,9999	0,652	0,479	-
Thrombin Peak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,492	0,173	0,454	-	0,313	0,813	0,374	-
	Kontrollen - ASS	0,979	0,021	0,110	-	0,790	0,138	0,113	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,377	0,170	0,449	-	0,220	0,844	0,462	-
	Kontrollen - ASS	0,313	0,633	>0,9999	-	0,220	0,475	0,839	-
ETP									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,367	0,006	0,020	-	0,240	0,035	0,114	-

	Kontrollen - ASS	0,145	0,009	0,025	-	0,085	0,016	0,066	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,517	0,055	0,158	-	0,446	0,187	0,304	-
	Kontrollen - ASS	0,635	0,573	0,635	-	0,713	0,962	0,733	-

isolierte Thrombozyten mit 0,1 U/ml Thrombin							
Lag time							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,6924	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,6559	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,2871	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,4911	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,4459
ttPeak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,866	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,676	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,544	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,7723	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,3619
Thrombin Peak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,846	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,246	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,983	-	-	-

	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	>0,9999	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,123
ETP							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,987	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,694	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,800	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,8232	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,0288

8.2.5 THROMBINGENERIERUNG DER MONONUKLEÄREN ZELLEN MITTELS CAT

Auswertung mittels t-Test oder **Mann-Whitney-Test**

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, pM = Pikomolar, TF = "tissue factor" = Gewebefaktor, U = Units, ml = Milliliter, ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential

		basale MNC							
Lag time									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,191	0,764	0,925	-	0,628	0,309	0,130	-
	Kontrollen - ASS	0,151	0,878	0,968	-	0,326	0,69	0,28	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,016	0,193	0,149	-	0,108	0,46	0,96	-
	Kontrollen - ASS	0,048	0,296	0,311	-	0,242	0,991	0,984	-
ttPeak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU

Eigenplasma	Kontrollen + ASS	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	0,811	0,994	0,112	-
	Kontrollen - ASS	<0,0001	0,0002	0,001	-	0,388	0,490	0,797	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	0,432	0,545	0,547	-
	Kontrollen - ASS	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	0,533	0,680	0,225	-
Thrombin Peak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,567	0,930	0,994	-	0,276	0,113	0,052	-
	Kontrollen - ASS	0,654	0,923	0,979	-	0,329	0,139	0,088	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,711	0,902	0,958	-	0,358	0,166	0,116	-
	Kontrollen - ASS	0,672	0,268	0,394	-	0,096	0,087	0,018	-
ETP									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,004	0,004	0,016	-	0,740	0,321	0,186	-
	Kontrollen - ASS	0,011	0,012	0,038	-	0,775	0,373	0,252	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,039	0,041	0,095	-	0,435	0,211	0,134	-
	Kontrollen - ASS	0,025	0,026	0,069	-	0,241	0,124	0,055	-

	basale MNC						
Lag time							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,974	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,467	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,118	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,0306	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,6289

ttPeak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,017	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,030	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,0006	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,1655	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,5058
Thrombin Peak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,1371	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,1949	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,0775	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,955	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,4613
ETP							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,0017	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,0101	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,0052	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,5722	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,4076

		MNC mit 1 pM TF							
Lag time									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,429	0,055	0,620	-	0,350	0,918	0,896	-
	Kontrollen - ASS	0,139	0,004	0,854	-	0,126	0,665	0,505	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,093	0,000 6	0,962	-	0,022	0,575	0,330	-
	Kontrollen - ASS	0,126	0,005	0,890	-	0,083	0,506	0,372	-
ttPeak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,203	0,022	0,261	-	0,224	0,163	0,257	-
	Kontrollen - ASS	0,011	0,000 2	0,017	-	0,011	0,010	0,010	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,126	0,005	0,145	-	0,137	0,101	0,115	-
	Kontrollen - ASS	0,083	0,005	0,113	-	0,089	0,067	0,096	-
Thrombin Peak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,061	0,020	0,019	-	0,503	0,014	0,000 4	-
	Kontrollen - ASS	0,106	0,051	0,033	-	0,855	0,055	0,000 4	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,174	0,241	0,193	-	0,904	0,161	0,029	-
	Kontrollen - ASS	0,089	0,059	0,050	-	0,664	0,043	0,002	-
ETP									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,681	0,920	0,553	-	0,382	0,545	0,304	-
	Kontrollen - ASS	0,765	0,252	0,791	-	0,118	0,514	0,635	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,874	0,770	0,831	-	0,387	0,901	0,304	-
	Kontrollen - ASS	0,800	0,880	0,766	-	0,464	0,801	0,454	-

		MNC mit 1 pM TF					
Lag time							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,6876	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,3294	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,6035	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,4252	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,6269
ttPeak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,9307	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,6733	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,906	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,8451	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,1953
Thrombin Peak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,2576	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,9015	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,3225	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,6107	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,6594
ETP							
		Eigenplasma					
		JAK2	JAK2	CALR	CALR	Kontrollen	Kontrollen

		+ HU	- HU	+ HU	- HU	+ASS	- ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,4314	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,6166	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,3429	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,7681	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,4349

MNC mit 0,1 U/ml Thrombin									
Lag time									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,550	0,527	0,881	-	0,287	0,358	0,058	-
	Kontrollen - ASS	0,257	0,857	0,779	-	0,087	0,664	0,133	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,756	0,241	0,504	-	0,421	0,117	0,003	-
	Kontrollen - ASS	0,153	0,991	0,678	-	0,091	0,836	0,248	-
ttPeak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,382	0,781	0,610	-	0,078	0,413	0,093	-
	Kontrollen - ASS	0,083	0,453	0,204	-	0,017	0,067	0,830	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,500	0,704	0,734	-	0,193	0,586	0,127	-
	Kontrollen - ASS	0,204	0,890	0,384	-	0,029	0,183	0,259	-
Thrombin Peak									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,039	0,088	0,012	-	0,197	0,126	0,144	-
	Kontrollen - ASS	0,028	0,049	0,007	-	0,105	0,083	0,095	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,230	0,327	0,142	-	0,181	0,133	0,540	-
	Kontrollen - ASS	0,013	0,012	0,002	-	0,019	0,033	0,034	-

ETP									
		Eigenplasma				Kontrollplasma			
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU
Eigenplasma	Kontrollen + ASS	0,191	0,488	0,173	-	0,970	0,642	0,389	-
	Kontrollen - ASS	0,118	0,336	0,109	-	0,723	0,430	0,265	-
Kontrollplasma	Kontrollen + ASS	0,417	0,813	0,454	-	0,313	0,475	0,635	-
	Kontrollen - ASS	0,029	0,093	0,031	-	0,168	0,087	0,080	-

MNC mit 0,1 U/ml Thrombin							
Lag time							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,8601	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,871	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,2936	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,4438	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,7898
ttPeak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,783	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,508	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,2805	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,8287	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,316

Thrombin Peak							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,2417	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,8586	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,4761	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,6305	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,4313
ETP							
		Eigenplasma					
		JAK2 + HU	JAK2 - HU	CALR + HU	CALR - HU	Kontrollen +ASS	Kontrollen - ASS
Kontrollplasma	JAK2 + HU	0,2333	-	-	-	-	-
	JAK2 - HU	-	0,768	-	-	-	-
	CALR + HU	-	-	0,698	-	-	-
	CALR - HU	-	-	-	-	-	-
	Kontrollen + ASS	-	-	-	-	0,8534	-
	Kontrollen - ASS	-	-	-	-	-	0,3316

8.3 TABELLEN ZUM VERGLEICH DER PARAMETER DER PRIMÄREN (CHRONOLOG) UND SEKUNDÄREN HÄMOSTASE (CAT)

Legende: JAK2 = Mutation des JAK2-Gens, CALR = Mutation des *Calreticulin*-Gens, HU = Hydroxyurea, ASS = Acetylsalicylsäure, + = Einnahme des Medikaments, - = keine Einnahme des Medikaments, TRAP-6 = Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6, µM = Mikromolar, µg = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = Units, ng = Nanogramm, ttPeak = "time to peak" = Zeit bis zum Thrombin Peak, ETP = endogenes Thrombin Potential, CAT = „Calibrated Automated Thrombography“ = kalibrierte automatisierte Thrombographie, Ø – keine Reaktion, (%) – medianer Aggregationswert in % bei Besonderheiten

	Therapie		Chronolog		CAT			
			TRAP-6		Thrombin			
			10 µM	50 µM	0,1 U/ml			
			Aggregation		„lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+HU	-ASS	9%	< 60% (52%)	~ -ASS	< -ASS	> -ASS	(>) -ASS
		+ASS	2%	> 60%	> +ASS	= +ASS	~ +ASS	= +ASS
	-HU	-ASS	39%	> 60%	= -ASS	< -ASS	~ -ASS	> -ASS
		+ASS	31,5%	> 60%	> +ASS	> +ASS	~ +ASS	~ +ASS
CALR	+HU	-ASS	Ø	< 60% (43%)	~ -ASS	~ -ASS	~ -ASS	< -ASS
		+ASS	12%	< 60%	> +ASS	> +ASS	< +ASS	< +ASS
	-HU	+ASS	Ø	< 60% (15%)	~ -ASS	~ -ASS	< -ASS	< -ASS
					> +ASS	> +ASS	< +ASS	< +ASS
Kontrollen		-ASS	35%	> 60%	-ASS >	-ASS >	-ASS (<)	-ASS (<)
		+ASS	20%	> 60%	+ASS	+ASS	+ASS	+ASS

	Therapie		Chronolog		CAT			
			Kollagen		Convulxin			
			2 µg/ml	10 µg/ml	50 ng/ml			
			Aggregation		„lag time“	„ttPeak“	„Thrombin Peak“	„ETP“
JAK2	+HU	-ASS	2%	< 60% (55%)	> -ASS	> -ASS	< -ASS	< -ASS
		+ASS	3%	< 60%	> +ASS	> +ASS	~ +ASS	~ +ASS
	-HU	-ASS	20%	> 60%	> -ASS	> -ASS	< -ASS	< -ASS
		+ASS	1,5%	< 60% (47,5%)	> +ASS	> +ASS	> +ASS	~ +ASS
CALR	+HU	-ASS	5%	> 60%	> -ASS	> -ASS	< -ASS	< -ASS
		+ASS	2%	< 60%	> +ASS	> +ASS	> +ASS	~ +ASS
	-HU	+ASS	1%	< 60%	> -ASS	> -ASS	< -ASS	< -ASS
Kontrolle n		-ASS	35%	> 60%	-ASS ~	-ASS <	-ASS >	-ASS (>)
		+ASS	2%	> 60%	+ASS	+ASS	+ASS	+ASS