

**Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten Interaktion bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Torben Malte Villmow  
aus Mülheim/Ruhr**

**Gießen 2003**

**Aus dem Medizinischem Zentrum für Innere Medizin**

**Medizinische Klinik**

**Abteilung für Hämatologie und Onkologie**

**Leiter: Prof. Dr. Pralle**

**des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Kemkes-Matthes**

**2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Reiter**

**Tag der Disputation: 11.02.2005**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Myeloproliferative Erkrankungen in der medizinischen Geschichte.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Charakterisierung und Komplikationen des MPS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Ursachen des MPS.....</b>	<b>2</b>
<b>1.4. MPS und Thrombozytenfunktionstests.....</b>	<b>3</b>
<b>1.5. Durchflußzytometrie und Thrombozytenfunktion.....</b>	<b>4</b>
<b>1.6. Thrombozyteninteraktion.....</b>	<b>6</b>
<b>1.7. Einschätzung des Risikoprofils bei MPS Patienten.....</b>	<b>7</b>
<b>1.8. Zweck der Studie.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Patienten, Material und Methoden.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Studienaufbau.....</b>	<b>9</b>
2.1.1. Studienablauf.....	9
2.1.2. Gruppeneinteilung.....	9
2.1.3. Blutentnahmen.....	9
2.1.4. Diagnostische Parameter und Krankenanamnese.....	10
<b>2.2. Materialien.....</b>	<b>11</b>
2.2.1. Tests.....	11
2.2.2. Probenaufbereitung.....	12
2.2.2.1. Reagenzien.....	12
<b>2.3. Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.3.1. PFA-100 (Platelet Function Analyzer).....	13
2.3.2. Durchflußzytometrie.....	14
2.3.2.1. Präparationsprotokoll zum Nachweis von aktivierten Thrombozyten sowie von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten.....	17
2.3.3. Gerinnungstests.....	18
2.3.3.1. Fibrinogen.....	18
2.3.3.2. Thromboplastinzeit (Quick).....	19
2.3.3.3. Partielle Thromboplastinzeit (PTT).....	19
2.3.3.4. Prothrombinfragment F 1+2.....	19
2.3.4. Thrombophiliediagnostik.....	20

2.3.4.1. Protein C-Aktivität.....	20
2.3.4.2. Protein S-Aktivität.....	20
2.3.4.3. Antithrombin-Aktivität.....	21
2.3.4.4. APC-Resistenz.....	21
2.3.5. Molekulargenetik.....	21
2.3.5.1. Faktor V-Leiden-Mutation/Prothrombin Polymorphismus....	21
2.3.5.2. MTHFR Polymorphismus.....	22
2.3.6. Elisa-Tests.....	23
2.3.6.1. D-Dimer.....	23
2.3.6.2. Tissue Faktor.....	23
2.3.7. Differentialblutbild.....	23
2.4. Statistische Methoden.....	24
3. Ergebnisse.....	25
3.1. Vergleich der Untergruppen der MPS Patienten mit der Kontrollgruppe....	25
3.1.1. Ergebnisse Geschlechtsverteilung.....	25
3.1.2. Ergebnisse Altersverteilung.....	26
3.1.3. Ergebnisse Blutbild.....	27
3.1.4. Ergebnisse Differentialblutbild.....	30
3.1.5. Ergebnisse Durchflußzytometrie.....	32
3.1.6. Ergebnisse PFA-100.....	36
3.1.7. Ergebnisse Gerinnungsanalyse.....	39
3.1.8. Ergebnisse Tissue Faktor/D-Dimer.....	42
3.1.9. Ergebnisse Thrombophiliediagnostik.....	44
3.1.10. Ergebnisse Faktor V-Leiden Mutation.....	47
3.1.11. Ergebnisse Prothrombin Polymorphismus.....	47
3.1.12. Ergebnisse MTHFR Polymorphismus.....	48
3.2. Vergleich der MPS Patienten mit/ohne thromboembolischen Ereignissen....	49
3.2.1. Ergebnisse Geschlechtsverteilung.....	49
3.2.2. Ergebnisse Altersverteilung.....	50
3.2.3. Ergebnisse Blutbild.....	51
3.2.4. Ergebnisse Differentialblutbild.....	52
3.2.5. Ergebnisse Durchflußzytometrie.....	53
3.2.6. Ergebnisse PFA-100.....	55

3.2.7. Ergebnisse Gerinnungsanalysen.....	58
3.2.8. Ergebnisse Tissue Faktor/D-Dimer.....	59
3.2.9. Ergebnisse Thrombophiliediagnostik.....	60
3.2.10. Ergebnisse Faktor V-Leiden Mutation.....	62
3.2.11. Ergebnisse Prothrombin Polymorphismus.....	62
3.2.12. Ergebnisse MTHFR Polymorphismus.....	62
3.3. Vergleich der MPS Patienten mit/ohne Blutungsereignissen.....	62
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>63</b>
4.1. Hintergrund der Studie.....	63
4.2. Einschätzung des Thrombose- oder Blutungsrisikos bei MPS Patienten.....	63
4.3. Plättchenfunktionstests (Ergebnisse PFA-100).....	68
4.4. Ergebnisse Durchflußzytometrie/Tissue Faktor Bildung.....	70
4.4.1. Thrombozytenaktivierung (CD62p-positive Thrombozyten).....	72
4.4.2. Thrombozyten-Mikroaggregate.....	73
4.4.3. Thrombozyten-Mikropartikel.....	73
4.4.4. Thrombozyten-Leukozyteninteraktion.....	74
4.4.5. Tissue Faktor.....	77
4.5. Gerinnungsanalysen/Thrombophiliediagnostik/D-Dimer.....	78
4.5.1. Protein C-, Protein S-, Antithrombin-Aktivität.....	79
4.5.2. Faktor V-Leiden Mutation/Prothrombin Polymorphismus.....	79
4.5.3. APC-Resistenz.....	81
4.5.4. MTHFR Polymorphismus.....	82
4.5.5. Thromboplastinzeit (Quick)/aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)/Fibrinogen.....	83
4.5.6. Prothrombinfragment F 1+2/D-Dimer.....	84
4.6. Aussichten zukünftiger Therapiestrategien.....	85
4.7. Schlussfolgerung.....	88
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>90</b>
5.1. Abstract.....	91
<b>6. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>92</b>

<b>7. Anhang.....</b>	<b>94</b>
<b>7.1. Patientenbeschreibung.....</b>	<b>94</b>
<b>7.2. Anamnesebogen.....</b>	<b>95</b>
<b>7.3. Rohdaten/Blutbild.....</b>	<b>96</b>
<b>7.4. Rohdaten/Durchflußzytometrie.....</b>	<b>97</b>
<b>7.5. Rohdaten/Gerinnungsanalysen.....</b>	<b>98</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>9. Tabellarischer Lebenslauf.....</b>	<b>114</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>116</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Myeloproliferative Erkrankungen in der medizinischen Geschichte

1895 beschrieb Dr. Richard C. Cabot in Boston den ersten Fall von Blutungen und Thrombosen bei einem Patienten mit einer Knochenmarkserkrankung, die in Folge einer Zahnextraktion auftraten (22).

Mehr als ein halbes Jahrhundert später wurde Anfang der Fünfziger Jahre von Dameshek der Begriff des chronischen myeloproliferativen Syndroms (MPS) geprägt (29).

Man versteht darunter eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, zu denen die chronische myeloische Leukämie (CML), die Osteomyelofibrose (OMF), die Polycythaemia vera (PV) und die Essentielle Thrombozythämie (ET) gezählt werden.

Es handelt sich um eine klonale Proliferation früher hämatopoetischer Progenitorzellen.

Die ET ist charakterisiert durch eine hohe Thrombozytenzahl, die PV durch erhöhte Erythrozytenzahlen, die OMF durch Knochenmarkfibrose und extramedullärer Blutbildung, die CML durch erhöhte Leukozytenzahlen und dem Nachweis des Philadelphia-Chromosoms (45, 111).

## 1.2. Charakterisierung und Komplikationen des MPS

Gemeinsames Merkmal dieser Gruppe von Krankheiten ist neben der übermäßigen Neubildung vorwiegend reifer Blutzellen die hohe Inzidenz von thrombotischen Komplikationen. Studien zeigen, daß neben Thrombosen und Embolien auch Blutungen auftreten können (5, 12, 14, 57). Vielfach wird daher von paradoxen Hämostasestörungen gesprochen, wobei eine höhere Inzidenz von Thrombosen als von Blutungen zu verzeichnen ist (161).

Die überwiegend retrospektiven Studien demonstrieren, daß sehr häufig Komplikationen in Form von transitorischen ischämischen Attacken und Durchblutungsstörungen der Akren auftreten (12, 20). Daneben erstrecken sich die Symptome von neurologischen Beschwerden wie Kopfschmerzen, Schwindel, Sehstörungen, Parästhesien in den Akren bis hin zur Erythromelalgie an den Extremitäten (110).

Hämorrhagischen Komplikationen treten auf nach zahnärztlichen Eingriffen, Operationen, bei sehr hohen Thrombozytenzahlen ( $> 10^{12}/l$ ) und in Verbindung mit Medikamenten wie Kortison, Aspirin oder nicht-steroidalen-Antirheumatika (12, 21).

Vor allem erscheinen sie in Form von gastrointestinalen Blutungen (75). Daneben äußert sich die Blutungsneigung in Form von Petechien, Nasenbluten und Melaena (110).

Gefürchtet sind lebensbedrohliche Ereignisse wie Lungenembolien sowie zerebrovaskuläre, koronare und periphere Gefäßverschlüsse, die zu Herzinfarkten und Schlaganfällen führen können (137).

Auch unübliche Lokalisationen wie Milz- und Lebervenen, Pfortader und mesenterische Gefäße können betroffen sein (111, 137).

### **1.3. Ursachen des MPS**

Als Ursache der Hämostasestörungen bei den myeloproliferativen Erkrankungen wird eine abnorme Megakaryopoese angenommen (161). Die klonale Proliferation der Megakaryozyten führt zu einer abnormen Bildung von Blutplättchen.

Es wurde ein breites Spektrum an thrombozytären Veränderungen beschrieben, wobei jeder Patient individuell verschiedene Anomalien aufweist (21, 49, 93, 137).

Zum einen werden vergrößerte Thrombozyten gebildet, die Thromboxansynthese ist gesteigert, sowie vermehrt plättchenspezifische Proteine synthetisiert.

Zum anderen lassen sich ultrastrukturell Abnormitäten erkennen. Die Anzahl an Speichergranula und Zellorganellen ist vermindert sowie die Endomembranstrukturen hyperthrophiert. Dieses Phänomen wird auch als erworbener Speicherdefekt bezeichnet. Abnorme Membranstrukturen führen u.a. zu defekten adrenergen Rezeptoren sowie zum Verlust der Prostaglandinrezeptoren (137).

Diese Thrombozytenfunktionsdefekte spiegeln sich in einer fehlenden oder herabgesetzten Antwort auf stimulierende Agonisten wie Epinephrin, ADP, Kollagen oder Adrenalin wieder (37, 137, 154). Als Folge bleibt die Aggregatbildung häufig aus oder ist vermindert.

Oft kommt es zu einer erhöhten Expression von aktivierungsspezifischen Epitopen auf der Membranoberfläche, was eine verstärkte Aktivierungsbereitschaft reflektiert (23, 54, 144). Daraus resultiert eine Neigung zu spontaner Plättchenaggregation.

Trotz Identifizierung zahlreicher Rezeptordefekte, intrazellulärer Signalkaskaden und der abnormen Plättchenbildung bei den myeloproliferativen Erkrankungen ist ein genereller Pathomechanismus nicht erkennbar. Es konnte kein klinischer Zusammenhang zu Thrombose- und Blutungskomplikationen hergestellt werden (11, 124, 137, 160).

Lediglich die Erhöhung des Hämatokritwertes auf über sechzig Prozent, welche mit verstärkter Blutviskosität assoziiert ist und den Thrombozyten einen intensiveren Kontakt mit

dem Endothel ermöglicht, kann als pathophysiologische Ursache der Thrombosebildung belegt werden (137). Mit steigendem Hämatokritwert werden die Thrombozyten in die Gefäßperipherie gedrängt, wo Scherkräfte und Kontaktzeit mit der Gefäßwand deutlich höher sind als im Axialstrom.

Im Verlauf der Erkrankung nimmt die Zahl der Plättchenabnormitäten zu, und damit auch die Gefahr thrombo-embolische Ereignisse oder Blutungskomplikationen zu entwickeln (161).

Dabei zeigt die CML in ihrer Akutphase (Blastenkrise) die meisten Anomalien (19).

Gleichzeitig verändert sich die Plättchenfunktion als Folge der pathologischen Bildung im Knochenmark, aber auch als Resultat möglicher Therapiemaßnahmen (93).

Der Einsatz von zytoreduktiven Substanzen wie Hydroxyurea führt nicht nur zu einem Rückgang thrombo-embolischer Komplikationen, sondern kann auch zu schwerwiegenden Langzeitwirkungen führen (39, 40). Im Vordergrund steht hier die Induktion von Sekundärneoplasien, die für alkylierende Substanzen belegt sind, und die für andere zytoreduktive Substanzen wie Hydroxyurea diskutiert werden.

Wenn man aber zytoreduktive Substanzen vermeiden will, um keine Sekundär-Leukämien zu indizieren, dann steigen wiederum die Thrombozyten mit allen verbundenen klinischen Komplikationen (6).

Zytoreduktive Medikamente wie Hydroxyurea verbessern nicht die abnormale Aggregation und Adhäsion der Thrombozyten (19). Die Membrandefekte bleiben unbeeinflusst. Es handelt sich um eine rein symptomatische Therapie, die die abnorme Bildung von Knochenmarkzellen nicht verhindern kann, sondern lediglich die Entwicklung von Komplikationen reduziert.

#### **1.4. MPS und Thrombozytenfunktionstests**

Die Thrombozytenabnormitäten und ihre klinische Relevanz sind Gegenstand vieler Studien. Patienten mit myeloproliferativen Syndromen weisen dabei Defekte auf, die in einigen Fällen in ihrer Kombination ähnlich den angeborenen Thrombozytendefekten sind (z.B. Glanzmann-Naegeli Thrombasthenie)(27).

Plättchenfunktionstests scheinen bisher wenig beizutragen, um klinische Komplikationen vorherzusagen (12, 41). Einige Patienten haben sowohl eine Hyper- als auch eine Hypofunktion der Thrombozyten (11). Studien mit Hilfe der Thrombozyten-Aggregometrie zeigten, daß bei Patienten mit Hyperreagibilität häufig venöse oder arterielle Thrombosen in der Anamnese beschrieben wurden. Im Gegensatz dazu hatten Patienten mit Hyporeagibilität

seltener eine Komplikation in der Vorgeschichte vorzuweisen. Die Ableitung einer Vorhersage von entsprechenden Komplikationen konnte jedoch nicht geliefert werden (93). Zahlreiche Studien haben demonstriert, daß unter zytoreduktiver oder antithrombozytärer Therapie thromboembolische Komplikationen deutlich zurückgehen (39, 40, 75, 110). Trotz Reduktion der Thrombozyten bleiben die Aggregationsdefekte für Plättchenagonisten wie Epinephrin bestehen (154). Auch verändert eine Zytoreduktion nicht die erhöhten Plasmawerte von Plättchensekretionsprodukten wie  $\beta$ -Thromboglobulin oder Fibrinopeptid A (158).

Der Nutzen für MPS Patienten durch den klinischen Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern wie Aspirin in der Prophylaxe und Behandlung von thrombo-embolischen Komplikationen unterstreicht, trotz der bisher nicht sicher etablierten Korrelation mit Aggregationstests, den Stellenwert der Thrombozyten Hyperreaktivität für den Pathomechanismus der Thrombosebildung (112).

### **1.5. Durchflußzytometrie und Thrombozytenfunktion**

Viele klinische Erscheinungsbilder wie z.B. koronare Herzkrankheit, Diabetes Mellitus, Schlaganfall, Schwangerschaft, tiefe Venenthrombosen, Hypercholesterinämie oder die Thrombozytenaufbereitung für Bluttransfusionen sind mit Plättchenhyperreagibilität und zirkulierenden aktivierten Blutplättchen assoziiert (106).

Die Thrombozytenaktivierung spielt eine wichtige Rolle im Pathomechanismus von arteriellen Verschußkrankheiten wie dem Schlaganfall oder dem Myokardinfarkt (133). Plättchenaggregate, stabilisiert von Fibrin, bilden sich bei Endothelschäden, rupturierten Arterioskleroseplaques oder in Regionen, wo der Blutfluß durch eine Stenose behindert wird. Die Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliale Strukturen wie Kollagen aktiviert über eine Signalkaskade die Blutplättchen und führt über zahlreiche Interaktionen zur Thrombozytenaggregation (122). Im Verlaufe dieses Geschehens kann es dann zur Entwicklung von thrombo-embolischen Komplikationen kommen.

Die Durchflußzytometrie hat sich im Laufe der letzten Jahre als sinnvolle Methode zur Studie von normalen und abnormalen Membranrezeptoren auf Thrombozyten etabliert (2, 96). Sie kann als Testmethode für die Thrombozytenfunktion und deren Interaktion mit anderen Zellen eingesetzt werden (10, 106).

Der Vorteil gegenüber anderen Plättchenfunktionstests besteht darin, daß die Thrombozytenaktivierung in Vollblut getestet wird. Sie entspricht daher nahezu dem in vivo

Zustand (108). Minimale Manipulationen während der Aufbereitung der Probe führen zu weniger Artefakten als es im in vitro Modellversuch der Fall ist. Dazu werden nur einige  $\mu\text{l}$  Blut benötigt, so daß nur wenig Aufwand für eine Testung entsteht (108).

Die Thrombozyten zirkulieren üblicherweise in einem nichtaktivierten Status durch das Gefäßsystem. Im Verlauf des Aktivierungsprozesses bilden die Thrombozyten Aggregate, geben Granulainhaltstoffe frei und unterstützen die Gerinnungsbildung (133). Während der Hämostase interagieren Komponenten der thrombozytären Plasmamembran mit Substanzen der Gefäßwand, mit Oberflächenmembranen weiterer Blutzellen und mit verschiedenen Gerinnungsproteinen (2). Einige dieser Kontakte führen zu physikalischen Veränderungen der Plättchenmembranproteine und Lipide, welche durch die Bindung von spezifischen, kommerziell erhältlichen, fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpern erkennbar werden (15, 60, 92).

So binden verschiedene Antikörper spezifisch an veränderte Strukturen der Plasmamembran, die sich aus der Expression bestimmter Rezeptoren und der Sekretion einzelner Substanzen nach Aktivierung der Thrombozyten ergeben (1).

Auf diese Weise ist es möglich, aktivierte Plättchen durch deren Antikörperbindungseigenschaften von anderen Blutzellen zu unterscheiden.

Es wird zwischen Antikörpern unterschieden, die gegen lysosomale Granulaproteine, gegen  $\alpha$ -Granulaproteine und gegen das Glykoprotein IIB/IIIa gerichtet sind (105).

Der Antikörper PAC 1 bindet an Epitope des Fibrinogenrezeptors auf Thrombozyten, die nur nach Aktivierung exprimiert werden (139). Dies geschieht durch Konversion des GP IIB/IIIa Rezeptors zu einem funktionellen Rezeptor für Fibrinogen (140). PAC 1 verhindert die fibrinogenvermittelte Plättchenaggregation.

S12 und KC4 sind Antikörper, die an den Rezeptor GMP-140 (PADGEM, P-Selektin, CD 62p) binden (17). Das  $\alpha$ -Granula-Glykoprotein P-Selektin wird während der Sekretion an die Membranoberfläche transloziert.

Viele Studien finden eine erhöhte Expression von GMP-140 bei Patienten mit myeloproliferativen Syndromen als Aktivierungsmarker für Thrombozyten. Ein Zusammenhang zu thrombo-embolischen Komplikationen oder Blutungsereignissen konnte jedoch nicht festgestellt werden (23, 54, 162).

Auffällig ist auch ein Formwandel („shape change“) der diskoiden, nicht-aktivierten Thrombozyten (Diskozyten) zu sphärischen Partikeln, welcher elektronenmikroskopisch sichtbar ist (49).

## 1.6. Thrombozyteninteraktion

Die Expression von Rezeptoren nach Aktivierung der Thrombozyten führt nicht nur zu Interaktionen zwischen Blutplättchen, sondern ermöglicht auch den Kontakt zu anderen Blutbestandteilen, Blutzellen und Endothel (151).

Die Kommunikation der Zellen untereinander erfolgt dann über chemische Metaboliten (z.B. Produkte des Arachidonsäurezyklus) und wird auch als „cross talk“ bezeichnet (141).

Eine komplexe Serie von Zelladhäsionen und Signalkaskaden regulieren die Inflammatorische Antwort auf Infektionen oder Gefäßschäden (104).

Zur Initiierung dieser Antwort müssen Leukozyten an die Gefäßwand binden.

Unterschiedliche Selektine vermitteln dabei (151).

GMP-140 vermittelt die Adhäsion von Thrombozyten an Leukozyten (48).

Diese Interaktion ist als wichtiger Faktor in der Pathogenese des vaskulären Verschlusssyndroms beschrieben (42, 76, 119, 165).

Die verstärkte Bildung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten wurde auch bei einigen Studien über invasive Eingriffe am Herzen dokumentiert.

Trotz Aspirin- und Heparinstandardtherapie konnte Leukozytenaktivierung und Thrombozytenadhäsion bei Patienten nach einer Koronar-Angioplastie nachgewiesen werden (109).

Eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Blutplättchen stellte man auch nach Ballondilatation an Koronargefäßen fest (120).

Ebenso zeigten Patienten mit instabiler Angina Pectoris einen signifikanten Anstieg von Neutrophilenaktivierung sowie eine erhöhte Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion (121).

Auch systemische Erkrankungen wie z.B. die Sepsis sind mit verstärkter Expression von Plättchenadhäsionsmolekülen und erhöhten Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten assoziiert (50).

Da den myeloproliferativen Syndromen eine klonale Proliferation aller Blutzellreihen zugrunde liegt, ist eine mögliche Schlüsselrolle der Thrombozyten-Leukozyten Interaktion bei den Veränderungen des Gerinnungsstatus und der Thrombozytenaktivierung anzunehmen (38).

## **1.7. Einschätzung des Risikoprofils bei MPS Patienten**

Eine Korrelation von Plättchenfunktionsdefekten in vitro, erhöhter Expression von Aktivierungsmarkern sowie klinischen Komplikationen ist nicht bekannt (11, 124, 154, 162). Bisher gibt es keine zuverlässige Methodik, die dabei hilft, schwerwiegende Komplikationen myeloproliferativer Erkrankungen vorherzusagen und so das Risikoprofil einzelner Patienten einzuschätzen.

Daher bleiben zur Abschätzung von Thrombose- oder Blutungsgefährdung bei MPS Patienten nur die wesentlichen Basisbefunde aus Anamnese, Familienanamnese, Medikation und Komorbidität (143).

## **1.8. Zweck der Studie**

In den letzten Jahren wurden eine Reihe neuer Untersuchungstechniken entwickelt, die angeborene und erworbene Veränderungen von plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten besser erkennen lassen (143).

Neben den bereits etablierten Gerinnungstests Thromboplastinzeit und PTT zählen dazu die Messung von Tissue Faktor, D-Dimer, Protein C, Protein S, Antithrombin und Prothrombinfragment F 1+2.

Hinzu kommt die molekularbiologische Untersuchung von spezifischen Mutationen wie dem Prothrombin Polymorphismus, der Faktor V-Leiden Mutation sowie dem MTHFR Polymorphismus.

Neben einer ausführlichen Anamnese sowie einer körperliche Untersuchung können diese neuen Diagnostikmethoden helfen, angeborene und erworbene Risikofaktoren für Thrombose- oder Blutungskomplikationen aufzudecken.

Wir möchten im Rahmen der vorgelegten Studie prüfen, ob sich mit diesen neuen Methoden spezifische Gerinnungsveränderungen bei Patienten mit myeloproliferativen Syndromen definieren lassen.

Bestehen Korrelationen zu Blutungsereignissen oder thrombo-embolischen Komplikationen? Zusätzlich untersuchen wir mit Hilfe der Durchflußzytometrie die Thrombozyten auf Aktivierungsmarker sowie ihre Interaktion zu den Leukozyten.

Möglicherweise gibt es Hinweise auf vermehrte Aggregatbildung zwischen diesen beiden Zelltypen.

Eine Korrelation zu den einzelnen Subtypen des MPS ist denkbar, so daß Patienten mit einem erhöhten Risiko für Thrombose- oder Blutungskomplikationen identifiziert werden könnten. Desweiteren wird über den Platelet Function Analyzer (PFA-100) die Thrombozytenadhäsion und -aggregation simuliert, um dadurch die Thrombozytenfunktion besser beurteilen zu können.

Ziel ist, bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen durch frühzeitiges Erkennen spezieller Veränderungen des Gerinnungssystems drohende Komplikationen zu erkennen und im Idealfall durch entsprechende therapeutische Maßnahmen thrombo-embolische Ereignisse oder Blutungen zu vermeiden.

## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1. Studienaufbau**

#### **2.1.1. Studienablauf**

Zum Probandenkollektiv zählten Patienten aus der Hämatologisch-Onkologischen Ambulanz der Universitätsklinik Gießen. Bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen wurden nach einem Informationsgespräch über Hintergrund und Ziel dieser Studie eine Einverständniserklärung unterschrieben sowie einmalig Blutproben entnommen.

#### **2.1.2. Gruppeneinteilung**

Gruppe A: Patienten mit Chronisch myeloischer Leukämie (n=10)

Gruppe B: Patienten mit Essentieller Thrombozythämie (n=12)

Gruppe C: Patienten mit Polyzythämie vera (n=13)

Gruppe D: Patienten mit Osteomyelofibrose (n=12)

Als Vergleichsgruppen dienten 16 Normalprobanden.

#### **2.1.3. Blutentnahmen**

Die Patienten erschienen nüchtern an einem Vormittag, möglichst ohne sich vorher körperlich belastet zu haben. Die Blutentnahme erfolgte beim sitzenden Patienten mit kurzfristiger venöser Stauung und G18 Kanüle. Es wurde darauf geachtet, daß eine Punktion nicht an einer Armvene erfolgte, die kurz zuvor schon einmal punktiert worden war.

Zur Fixierung der Thrombozyten für die durchflußzytometrische Untersuchung enthielt das entsprechende Entnahmeröhrchen Cyfix-Stabilisierungslösung (0,2% w/v Paraformaldehyd, 0,1% w/v Glyoxal) sowie Citrat-Lösung (0,11 mol/l). Für die anderen Laboruntersuchungen wurden die jeweiligen standardisierten EDTA oder Citratröhrchen mit einer Konzentration von 0,11 mol Citrat/l und 1 mg EDTA/ml benutzt.

#### 2.1.4. Diagnostische Parameter und Anamnese

Vor den Blutentnahmen wurden die Patienten befragt. Um Informationen über abgelaufene Thrombosen, Embolien oder Blutungen zu erhalten, wurde die Anamnese erhoben (der Anamnesebogen siehe Anhang 7.2.). Aus Blutproben wurden folgende Parameter bestimmt:

Gerinnungsanalyse:

- Fibrinogen > Multifibren (Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland)
- Partielle Thromboplastinzeit > Pathromtin (Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland)
- Thromboplastinzeit > Thromborel (Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland)
- Prothrombinfragment F 1+2 > Enzygnost<sup>®</sup> F 1+2 micro (Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland)

Thrombophiliediagnostik:

- aPC-Resistenz > COATEST<sup>®</sup> (Chromogenix Milano, Italien)
- Protein C-Aktivität > Berichrom<sup>®</sup> Protein C (Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland)
- Protein S-Aktivität > Protein S-Reagenz<sup>®</sup> (Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland)
- Antithrombin -Aktivität > Berichrom<sup>®</sup> Antithrombin III (Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland)
- Faktor V-Leiden Mutation > ThromboType<sup>®</sup> (ADS GmbH, Nehren, Deutschland)
- Prothrombin Polymorphismus > ThromboType<sup>®</sup> (ADS GmbH, Nehren, Deutschland)
- MTHFR Polymorphismus > ThromboType<sup>®</sup> (ADS GmbH, Nehren, Deutschland)

Blutbild (Beckmann-Coulter, Krefeld, Deutschland):

- Hämatokrit
- Hämoglobin
- Leukozytenzahl
  - Monozyten
  - Neutrophile Granulozyten
  - Lymphozyten
- Thrombozytenzahl
- Erythrozytenzahl

Elisa-Tests:

- Tissue Faktor > IMUBIND® Tissue Factor ELISA Kit (American diagnostica inc., Greenwich, USA)
- D-Dimer > ASSERACHROM D-Dimer® (BOEHRINGER, Mannheim, Deutschland)

Anamnese:

Die Anamnese sollte neben der Standarddatenerhebung sowie den konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren vor allem Vorerkrankungen, Medikamente und spezielle Risikofaktoren erfassen, die erhöhte Thrombose-, Embolie- oder Blutungsneigungen aufzeigen.

Bei den Vorerkrankungen interessierten besonders Angina Pectoris Anfälle, Herzinfarkte, Lungenembolien sowie Thrombosen unterschiedlicher Lokalisation.

Medikamente wie Aspirin, Heparin sowie unterschiedliche Chemotherapeutika, darunter Interferon, LitaliR, Anagrelide etc. wurden erfragt.

Angaben über Blutungsereignisse, (wie Petechien, Hämatome, Wundheilungsstörungen, häufiges Zahnfleischbluten, Blut im Stuhl oder im Urin) bzw. Thrombosezeichen (wie Stauungszeichen, periphere Durchblutungsstörungen oder schnelle Kanülenverstopfungen) ergänzten die Anamneseerhebung.

Der Anamnesebogen ist dem Anhang unter 7.2. zu entnehmen.

## **2.2. Materialien**

### **2.2.1. Tests**

Durchflußzytometer (Epics XL2, Coulter Corporation, Miami, Florida, USA); Messung von:

- CD62p-positive Thrombozyten
- Thrombozyten-Mikropartikel
- Thrombozyten-Mikroaggregate
- Thrombozyten-Leukozyten Aggregate

Platelet Function Analyzer (PFA-100) (Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland);

Messung von:

- Verschußzeit im Platelet Function Analyzer (VZ)

## 2.2.2. Probenaufbereitung (Cyfix III-Protokoll/Thrombozyten-Leukozyten Protokoll)

### 2.2.2.1. Reagenzien

Phosphatpuffer (PP):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Deutschland) wird in destilliertem Wasser gelöst (0,15 M).  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Deutschland) wird in destilliertem Wasser gelöst (0,15 M). Die  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung wird vorgelegt und mit  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung auf pH 7,4 titriert. Die Osmolarität wird mit destilliertem Wasser auf 300 mosmol/l eingestellt.

Formaldehydlösung:

Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) wird in destilliertem Wasser gelöst (10% w/v). Die Lösung wird auf ca.  $70^\circ \text{C}$  erwärmt. Danach wird 1 N Natronlauge tropfenweise so lange zugegeben, bis die Lösung klar wird.

Glyoxal:

40% Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Stabilisierungslösung Cyfix III:

1 Teil Glyoxallösung und 8 Teile Formaldehydlösung werden zu Phosphatpuffer ad 200 Teile gegeben. Die Lösung muß täglich frisch angesetzt werden.

Verdünnungslösung:

Glycine (Serva) gelöst in Phosphatpuffer (0,2 % w/v).

Antikörper:

Die Thrombozytenaktivierung, die Bildung von Thrombozyten-Mikropartikeln, Thrombozyten-Mikroaggregaten, sowie die Thrombozyten-Leukozyten Aggregate wurden mit Hilfe fluorochrom-markierter monoklonaler Antikörper bestimmt. Dabei wurde Vollblut mit entsprechenden Markern inkubiert.

- PE (Phycoerythrin)-markierte anti-CD14 (Clone RMO52, IgG<sub>2a</sub>, mouse, Immunotech, Marseille, Frankreich); zur Detektion der Monozyten;
- FITC (Fluorescein Isothiocyanat)-markierte anti-CD42b (anti-GPIIb $\alpha$ , Clone SZ2, IgG<sub>1</sub>, mouse, Immunotech, Marseille Frankreich); zur Detektion der Thrombozyten;

- PerCP-anti-CD45 (Clone 2D1, IgG<sub>1</sub>, mouse, Becton Dickinson, San Jose, Californien, USA); zur Detektion der Leukozyten;
- PE-markierte anti-CD62p (Clone CLB-Thromb/6, IgG<sub>1</sub>, mouse, Immunotech, Marseille, Frankreich); zur Detektion der aktivierten Thrombozyten;
- Isotyp-Kontroll-Marker (Clone 679.1Mc7, Isotyp IgG<sub>1</sub>, mouse, Immunotech, Marseille, Frankreich);

Lysereagenz:

FACS TM Lysing Solution (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA);  
Verdünnung 1:10 mit destilliertem Wasser;

Cell WASH

(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA);

## **2.3. Methoden**

### **2.3.1. PFA-100 (Platelet Function Analyzer)**

Prinzip der Methode:

Das PFA-100 Analysensystem simuliert den Prozeß der Thrombozytenadhäsion und -aggregation in vitro. Es dient zur Erkennung von ererbten und erworbenen Funktionsstörungen.

Eine Membran, die mit Kollagen und ADP benetzt ist, führt zur Anlagerung und Aktivierung von Thrombozyten. Folge ist eine Aggregatbildung, die zu einem Thrombozytenpfropf führt. Es kommt zur Verringerung des Blutflusses. Das Gerät ermittelt die Zeit vom Beginn bis zum vollständigen Membranverschluß. Diese sogenannte Verschlußzeit wird in Sekunden angegeben.

Vorbereitung:

Die Meßzelle muß Raumtemperatur angenommen haben. Daraufhin werden 800 µl Blut in die Meßzelle pipettiert. Anschließend erfolgt eine Doppelbestimmung.

Qualitätskontrolle:

Vor der Messung wird ein Selbsttest durch das Gerät durchgeführt, um mögliche Fehlerquellen zu entdecken.

Mit Kontrollproben wird ein individueller Referenzwert des Gerätes ermittelt.

Das verwendete Gerät wurde von der Firma Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland hergestellt.

Referenzbereich: Kollagen/Epinephrin: 94-193 Sekunden

Kollagen/ADP: 71-118 Sekunden

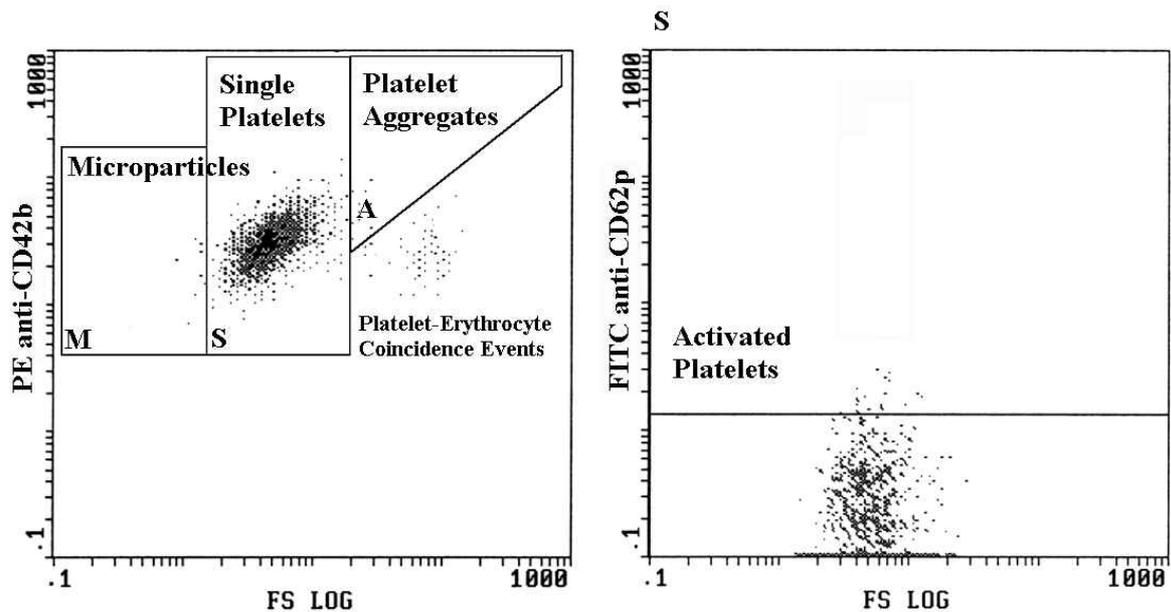
### **2.3.2. Durchflußzytometrie**

Prinzip der Methode:

Die Durchflußzytometrie erlaubt es, mit Hilfe von fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpern spezifische Veränderungen der aktivierten Plättchenoberfläche zu charakterisieren. Dabei analysiert sie Einzelzellen, die in einem konstanten Fluß durch einen Laserstrahl detektiert werden. Das Streulicht und die Intensität der Fluoreszenzintensität werden durch spezifische Photodioden registriert. Dadurch kann die Größe (Vorwärtsstreulicht = forward scatter), Granularität (Seitwärtsstreulicht = side scatter) und Oberflächenexpression von Antigenen nach Bindung eines fluorochrom-markierten Antikörpers bestimmt werden. Durch Verwendung verschiedener Fluorochrome mit unterschiedlichen Lichtfrequenzspektren ist es möglich, verschiedene Antigene und deren quantitative Veränderungen auf der Thrombozytenoberfläche gleichzeitig zu erkennen. Das verwendete Durchflußzytometer war ein Epics XL2 (Coulter Corp., Miami, Florida, USA) mit einem 488 nm Argonlaser.

Forward Scatter (FS), Sidescatter (SS) sowie die unterschiedlichen Fluoreszenzkanäle wurden logarithmisch in einem Koordinatensystem aufgetragen. Vor jeder Messung wurde eine Kalibrierung mit fluoreszierenden Standardmikrobeads (CaliBRITE beads, Becton Dickinson Immunocytometry Systems) durchgeführt.

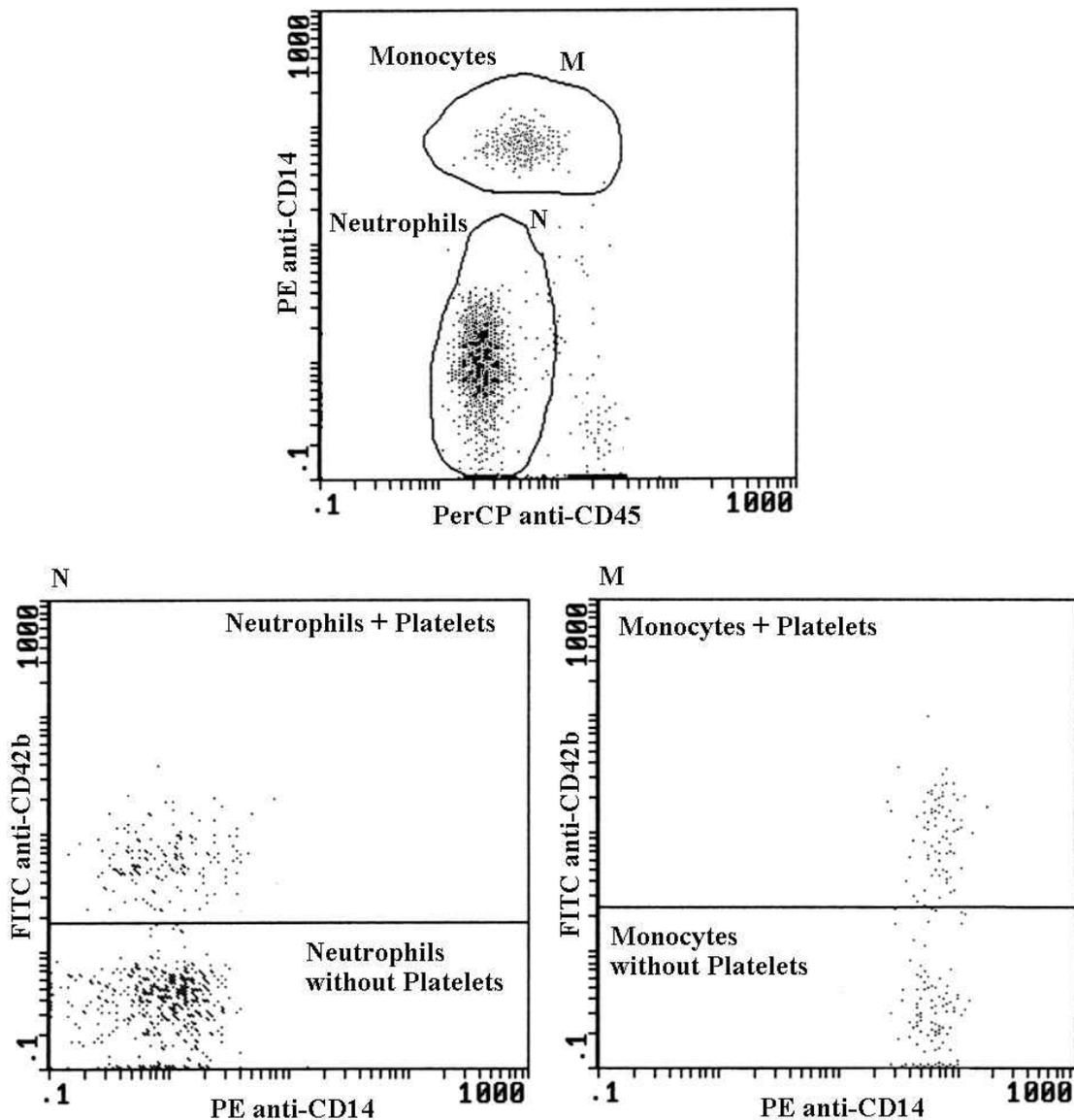
Es wurden zwei Scatter-Plot Protokolle erstellt (siehe Abbildung 2.3.2.a: Scatter-Plot der Thrombozytenaktivierung, siehe Abbildung 2.3.2.b: Scatter-Plot der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregatbildung).



**Abbildung 2.3.2.a: Scatter-Plot der Thrombozytenaktivierung**

Zur Unterscheidung der Thrombozyten von anderen Zellreihen (Erythrozyten, Leukozyten und Zellfragmenten) wurden diese mit FITC-anti-CD42b (Gp Ib Rezeptor, ein thrombozytenspezifisches Oberflächenprotein) markiert. Durch Forward Scatter Einstellung konnten Thrombozyten-Mikropartikel, einzelne Thrombozyten und Thrombozyten-Aggregate getrennt werden. Mit Hilfe der Proben von gesunden Normalprobanden wurden arbiträre 5% und 95% FS Schwellenwerte definiert; alle FITC-anti-CD42b positiven Ereignisse unterhalb der 5 Prozent Perzentile werden als Mikropartikel definiert, alle FITC-anti-CD42b positiven Ereignisse, die oberhalb dieses Grenzwertes liegen, werden zu den Thrombozyten-Aggregaten gerechnet. Zur Messung der Aktivierung einzelner Thrombozyten wurden alle CD42b-positiven Partikel, die den einzelnen Thrombozyten entsprechen in ein separates Protokoll mit Hilfe eines Gates (S) überführt und nach positiver Markierung mit PE-anti-CD62 (Thrombozytenaktivierungsmarker) analysiert. Auch hier wurde zuvor bei einer gesunden Gruppe von Normalprobanden ein Schwellenwert ermittelt. Unterhalb dieses Schwellenwertes liegen die mit PE-anti-CD62p markierten Thrombozyten in einen nicht aktivierten Status vor. Oberhalb davon werden die Thrombozyten mit PE-anti-CD62p Fluoreszenz definitionsgemäß als aktiviert angesehen.

Die Bestimmung der Schwellenwerte, oberhalb derer 5 Prozent der Thrombozyten mit den unterschiedlichen Subpopulationen der Leukozyten Aggregate bilden, erfolgte ebenso mit Hilfe der Proben gesunder Normalprobanden. Unterhalb der Schwellenwerte zeigten entsprechend 95 Prozent der FITC-anti-CD42 markierten Thrombozyten keine Aggregatbildung.



**Abbildung 2.3.2.b: Scatter-Plot der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregatbildung**

Analog zu dem Scatter-Plot der Thrombozytenaktivierung wurden zur Abgrenzung der Leukozyten von anderen Zellreihen (Erythrozyten, Zellfragmente etc.) diese mit PerCP-anti-CD45 (Leukozytenmarker) markiert. Zur Unterscheidung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie Lymphozyten wurde PE-anti-CD14 (Monozytenmarker) eingesetzt. Die unterschiedlichen Subpopulationen der Leukozyten wurden dann in einzelnen Scatter-Plots (N,M) durch entsprechende Gates voneinander getrennt, und nach positiver Markierung mit FITC-anti-CD42 (Thrombozytenmarker) analysiert.

Das Zytometer liefert einen Prozentsatz von Mikropartikeln, Mikroaggregaten und aktivierter Thrombozyten. Diese Prozentwerte können mit der absoluten Thrombozytenzahl multipliziert werden und ergeben die Konzentration von Mikropartikeln, Mikroaggregaten usw. pro Mikroliter.

Es werden bei beiden Scatter-Plot Protokollen die Prozentwerte von der jeweiligen Gesamtpopulation angegeben. Diese werden durch Messung der Fluoreszenz der einzelnen Zellen in Form von Ereignissen bestimmt, und können anhand der bekannten Leukozytenzahl in Absolutwerte umgerechnet werden.

Beispiel eines Patienten:

Differentialblutbild	Durchflußzytometrische Messungen
Leukozyten 5800/ $\mu$ l	Leukozytenereignisse 10000
- Neutrophile Granulozyten 2720/ $\mu$ l	- Neutrophile Granulozyten 4689 (46,9%)
- Monozyten 389/ $\mu$ l	- Monozyten 677 (6,7%)
- Lymphozyten 2407/ $\mu$ l	- Lymphozyten 4151 (41,5%)

### **2.3.2.1. Präparationsprotokoll zum Nachweis von aktivierten Thrombozyten sowie von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten:**

- Vorbereitung von CyFix III-Stabilisierungslösung.
- Blutabnahme von 2,5 ml Vollblut und Citratröhrchen, vorgefüllt mit 2,5 ml CyFix III-Lösung, welche 10 Minuten inkubiert wurde.

Nachweis aktivierter Thrombozyten:

Zu 50  $\mu$ l der stabilisierten Blutprobe wurde Verdünnungslösung (450  $\mu$ l Phosphatpuffer + Glycine) hinzugegeben (Verhältnis 1:10).

Davon wurden 50  $\mu$ l abpipettiert und Antikörper (FITC-markierte anti-CD42b + PE-markierte anti-CD62p ) hinzugefügt.

Inkubation dieser Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Danach Zugabe von 450  $\mu$ l Phosphatpuffer (Verdünnungslösung).

Nachweis von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten:

Zu 200 µl der stabilisierten Blutprobe wurden 2 ml Waschlösung im Verhältnis 1:10 dazugegeben und zentrifugiert (RCF 300 x 8 Minuten). Hiervon wurden 2 ml abpipettiert. Es bleiben 200 µl übrig.

Danach wurden Antikörper (FITC-markierte anti-CD42 + PE-markierte anti-CD14 + PerCP-markierte anti-CD45 Isotyp FITC + PE-markierte anti-CD14 + PerCP-markierte anti-CD 45) hinzugefügt, welche für 15-30 Minuten inkubiert wurden.

Im weiteren Verlauf Hinzugabe von Lyse Reagenz (Verhältnis 1:10) für 3 Minuten.

Danach wurden 2 ml Waschlösung hinzugefügt und die Lösung zentrifugiert (RCF 300 x 8 Minuten).

Es folgten zwei Waschschritte. Danach wurden 500 µl Phosphatpuffer (Verdünnungslösung) hinzugegeben.

### **2.3.3. Gerinnungstests**

#### **2.3.3.1. Fibrinogen**

Prinzip der Methode:

Modifikation der Methode nach Clauss.

Citrat-Plasma wird mit einem großen Überschuß an Thrombin zur Gerinnung gebracht. Die Gerinnungszeit hängt hierbei weitgehend vom Fibrinogengehalt der Probe ab. Thrombin hemmenden Substanzen (Heparin bis 2 U/ml oder Hirudin in therapeutischer Dosis) beeinflussen den Test nicht.

Bestimmung mit Hilfe von Multifibren<sup>®</sup>U der Firma Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland.

Referenzbereich: 1,8-3,5 g/l

#### **2.3.3.2. Thromboplastinzeit (Quick)**

Prinzip der Methode:

Durch Inkubation von Plasma mit der optimalen Menge Thromboplastin und Calcium wird der Gerinnungsvorgang ausgelöst; die Zeit bis zur Bildung des Fibringerinnsels wird gemessen. An photometrisch messenden Gerinnungsautomaten von Dade Behring kann aus

der Trübungszunahme nach Ablauf der Gerinnung eine Aussage über die Fibrinogenkonzentration erhalten werden.

Bestimmung mit Hilfe von Thromborel<sup>®</sup> S der Firma Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland.

Referenzbereich: 70-130 % d. N.

### **2.3.3.3. Partielle Thromboplastinzeit (PTT)**

Prinzip der Methode:

Inkubation von Plasma mit der optimalen Menge von Phospholipiden und einem Oberflächenaktivator führt zur Aktivierung von Faktoren des endogenen Gerinnungssystems. Durch Zugabe von Calcium-Ionen wird der Gerinnungsvorgang ausgelöst; gemessen wird die Zeit bis zur Bildung eines Fibringerinnsels.

Bestimmung mit Hilfe von Pathromtin<sup>®</sup> SL der Firma Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland.

Referenzbereich: 26-36 Sekunden

### **2.3.3.4. Prothrombinfragment F 1+2**

Prinzip der Methode:

Prothrombinfragment F 1+2 wird durch ein Enzymimmunoassay nach Sandwich-Methode quantitativ bestimmt. Die Mikrotitrationsplatten sind mit Kaninchen-Antikörpern gegen Human-F 1+2 beschichtet. Nach der Testdurchführung entsprechend der Firmenangaben wurde die der Konzentration von F 1+2 proportionale Farbintensität photometrisch bestimmt.

Bestimmung mit Hilfe von Enzygnost<sup>®</sup> F 1+2 micro der Firma Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland.

Referenzbereich: 0,4-1,1 nmol/l

## 2.3.4. Thrombophiliediagnostik

### 2.3.4.1. Protein C-Aktivität

Prinzip der Methode:

Protein C der Patientenprobe wird mit einem spezifischen Aktivator inkubiert. Das entstandene Protein Ca wird in einem kinetischen Test mit Extinktionszunahme bei 405 nm nach folgendem Reaktionsschema bestimmt:

Bestimmung mit Hilfe von Berichrom<sup>®</sup> der Firma Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland.

Referenzbereich: 70-140 % d. N.

### 2.3.4.2. Protein S-Aktivität

Prinzip der Methode:

Protein Ca spaltet proteolytisch F Va, der bei der Aktivierung der Gerinnungskaskade durch RVV (Gift von *Vipera russelli*) entsteht. Protein S wirkt dabei als Kofaktor, der die Reaktion beträchtlich beschleunigt. Dadurch kommt es zu einer mit der Aktivität an Protein S in der Probe proportional zunehmenden Gerinnungszeit.

Bestimmung mit Hilfe von Protein S-Reagenz der Firma Dade Behring GmbH, Marburg, Deutschland.

Referenzbereich: 70-123 % d. N.

### 2.3.4.3. Antithrombin-Aktivität

Prinzip der Methode:

Das Antithrombin der Probe wird durch Heparin in einen Sofort-Inhibitor überführt und inaktiviert vorgelegtes Thrombin. Der Rest-Thrombin-Gehalt wird in einem kinetischen Test mit Extinktionszunahme bei 405 nm bestimmt:

Bestimmung mit Hilfe von Berichrom<sup>®</sup> Antithrombin III (A) der Firma Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland.

Referenzbereich: 75-125 % d. N.

#### **2.3.4.4. APC-Resistenz**

Prinzip der Methode:

Probenplasma wird mit V-DEF Plasma vorverdünnt und für einen festgesetzten Zeitraum mit dem APTT Reagenz inkubiert. Die Zeitdauer bis zur Fibrinbildung wird nach Zugabe von CaCl<sub>2</sub> mit und ohne APC gemessen.

Bestimmung mit Hilfe von COATEST<sup>®</sup> der Firma CHROMOGENIX, Milano, Italien.

Referenzbereich: 2,0-3,5 (Ratio)

#### **2.3.5. Molekulargenetik**

##### **2.3.5.1. Faktor V-Leiden Mutation/Prothrombin Polymorphismus**

Dieser Test dient zur einfachen und sicheren Identifizierung von Trägern der Faktor V-Leiden Mutation und/oder der Prothrombin-Mutation G20210A sowie der Unterscheidung zwischen heterozygoten und homozygoten Merkmalsträgern.

Prinzip der Methode:

Der ThromboTyp<sup>®</sup> ist ein molekularbiologischer Nachweis und beruht auf der Identifizierung der risikoassoziierten Punktmutation im Faktor V- bzw. Faktor II-Gen. Hierzu ist es zunächst notwendig, die DNA des Patienten aus einer EDTA- oder Citrat- Blutprobe zu isolieren. Der nächste Schritt besteht in einer Multiplex-Amplifizierung von Fragmenten des Faktor V- und des Faktor II-Gens mittels der Polymerase-Kettenreaktion (Patent der Firma Hoffmann La-Roche). Die hierbei synthetisierten DNA-Fragmente stellen das Ausgangsmaterial für die reverse Hybridisierung dar. Auf Nitrocellulosestreifen immobilisiert liegen Gensonden für die Wildtyp- und die mutierte Sequenz der beiden untersuchten Gene sowie verschiedene Kontrollzonen vor. Denaturierte Amplifikat-DNS bindet während der Hybridisierung an diese Gensonden. Durch einen hochspezifischen Waschschrift wird gewährleistet, daß die Sonden

nur bei 100% komplementärer Sequenz an das Amplifikat binden. Das Hybrid aus Gensonde und Biotin-markiertem Amplifikat kann dann über einen Komplex Biotin/Steptavidin-Alkalische Phosphatase mit NBT/BCIP angefärbt werden. Der Vergleich des Bandenmusters mit einer mitgelieferten Schablone erlaubt eine rasche und einfache Auswertung des Tests.

Bestimmung mit Hilfe von ThromboType<sup>®</sup>-Kit der Firma ADS GMBH, Nehren, Deutschland.

### **2.3.5.2. MTHFR Polymorphismus**

Prinzip der Methode:

Der GenoType<sup>®</sup>MTHFR-Kit kann mittels reverser Hybridisierung die Position 677 des menschlichen MTHFR-Gens genetisch charakterisieren.

Gereinigte DNA wird hierzu zunächst einer PCR unterzogen. Die dazu notwendigen, für den untersuchten Genlocus spezifischen und mit Biotin markierten Primer sind Bestandteil des Kits. Das amplifizierte DNA-Fragment stellt das Ausgangsmaterial für die hier beschriebene Reverse Hybridisierung dar.

Bestimmung mit Hilfe von ThromboType<sup>®</sup>-Kit der Firma ADS GmbH, Nehren, Deutschland.

### **2.3.6. Elisa-Tests**

#### **2.3.6.1. D-Dimer**

Enzymimmunologischer in vitro Test zur quantitativen Bestimmung von Fibrinospaltprodukten.

Prinzip der Methode:

Sandwich-Assay

Bei der 1. Immunreaktion bindet der auf den Mikrotitrationsstreifen fixierte spezifische Antikörper gegen D-Dimer die Fibrinospaltprodukte der Probe, reagiert aber nicht mit Fibrinogen und dessen Spaltprodukten. D-Dimer besitzt mehrere antigene Determinanten. Daher werden in der anschließenden 2. Immunreaktion mit POD-markierten FDP-D Antikörpern Sandwich-Komplexe gebildet. Die Menge der Sandwich-Komplexe stellt ein Maß für den D-Dimer-Gehalt der Probe dar. Im nachfolgenden Waschschrift (bound-free-

separation) wird das nichtgebundene POD-Konjugat entfernt. Nach Zusatz von Harnstoffperoxid und Chromogen (O-Phenylendiamin) wird die gebundene POD-Aktivität photometrisch bestimmt.

Bestimmung mit Hilfe von ASSERACHROM D-Dimer<sup>®</sup> der Firma Boehringer, Mannheim, Deutschland.

Referenzbereich: < 500 ng Fibrinogenäquivalente/ml

### **2.3.6.2. Tissue Faktor**

Prinzip der Methode:

Eingesetzt wird ein spezieller monoklonaler Antikörper gegen Tissue Faktor Antigen. Dieser Antikörper erkennt in der 1. Immunreaktion antigene Determinanten des Tissue Faktors. In der anschließenden 2. Immunreaktion werden mit HRP-markierten Antikörpern Sandwich-Komplexe gebildet. Die Menge der Sandwich-Komplexe stellt ein Maß für den Tissue Faktor-Gehalt der Probe dar. Hinzugabe von TMB Substrat führt zur Bildung einer blauen Lösung, die durch weitere Zugabe von 0,5 M Sulfuridsäure zu einer gelben Farbe umschlägt. Die Messung der Enzym-Konjugat Aktivität erfolgt bei 450 nm Absorbierung und wird mit den Werten einer Standardkurve verglichen.

Bestimmung mit Hilfe von IMUBIND<sup>®</sup> Tissue Factor ELISA Kit der Firma american diagnostica inc., Greenwich, USA.

Referenzbereich: pg/ml

### **2.3.7. Differentialblutbild**

Das Blutbild wurde im hämatologischen Labor mit dem Gerät Coulter, Max M von der Firma Beckmann-Coulter, Krefeld, Deutschland, bestimmt.

## **2.4. Statistische Methoden**

Die Auswertung der Daten erfolgte im Institut für Medizinische Informatik (Leiter Prof. Dr. Dudeck) der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Beratung von Herrn Papst und Herrn Dr. Bödecker.

Die Datenerfassung erfolgte mit dem Programm EXCEL 97 SR-2 der Firma Microsoft auf einem Personal Computer. Für die Bearbeitung der Daten wurde das Programm SPSS<sup>TM</sup> (Version 9.0) für Windows<sup>TM</sup> angewandt. Die Graphiken wurden durch das Programm GraphPad Prism (Version 3.0) erstellt.

Die Daten wurden deskriptiv mit Hilfe von Median, Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwert dargestellt.

Bei der Durchflußzytometrie wurden 5000 Ereignisse bei jedem Meßvorgang gemessen. Der Mittelwert aus zwei Messungen wurde für die statistische Auswertung gebildet.

Normalverteilung konnte für die Meßwerte nicht vorausgesetzt werden. Daher wurden Vergleiche mit parameterfreien Rangverfahren durchgeführt

Zusammenhänge zwischen verschiedenen Parametern wurden mit Hilfe des Spearman-Rang-Testes getestet, Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes, Unterschiede zwischen paarigen Stichproben mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichenstestes beurteilt. Das Signifikanzniveau wurde dabei mit 0,05 festgelegt.

### 3 Ergebnisse

47 Patienten mit Myeloproliferativen Syndrom (MPS) wurden untersucht, 16 Probanden dienten als Kontrollgruppe. Die Beschreibung dieser Gruppen ist dem **Anhang unter 7.1.** zu entnehmen. Alle CML Patienten erhielten antiproliferative Medikamente. Die meisten Patienten mit PV, OMF und ET wurden mit Thrombozytenaggregationshemmern behandelt.

#### 3.1. Vergleich der Untergruppen der MPS Patienten mit der Kontrollgruppe

##### 3.1.1. Geschlechtsverteilung

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Geschlechtsverteilung festgestellt werden (vgl. **Tab. 1**). Beschreibung der Gruppen sind im **Anhang unter 7.1.** zu entnehmen.

	<b>Frauen</b>	<b>Männer</b>	<b>N</b>
<b>Kontrolle</b>	6	10	16
<b>CML</b>	5	5	10
<b>PV</b>	6	7	13
<b>OMF</b>	5	7	12
<b>ET</b>	7	5	12
<b>Gesamt (N)</b>	29	34	63

**Tab. 1:** Geschlechtsverteilung innerhalb der einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe.

### 3.1.2. Altersverteilung

	<b>Alter (Mittelwert ±Standardabweichung (Jahre))</b>	<b>Minimum/Maximum (Jahre)</b>
<b>Kontrolle</b>	42 ±15	23-63
<b>CML</b>	57 ±13	24-71
<b>PV</b>	61 ±13	43-79
<b>OMF</b>	60 ±8	38-84
<b>ET</b>	42 ±15	23-63

**Tab. 2:** Altersverteilung innerhalb der einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe.

### 3.1.3. Ergebnisse Blutbild

Patienten mit CML ( $18300 \pm 10530/\mu\text{l}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und PV ( $11000 \pm 2300/\mu\text{l}$ ) hatten im Mittel signifikant höhere Leukozytenwerte im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $6400 \pm 1500/\mu\text{l}$ ) (vgl. **Abb. 3.1**).

Ebenso hatten Patienten mit PV ( $531000 \pm 213000/\mu\text{l}$ ) und ET ( $567000 \pm 252000/\mu\text{l}$ ) im Mittel signifikant höhere Thrombozytenwerte im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $275000 \pm 6300/\mu\text{l}$ ) (vgl. **Abb. 3.3**).

Bei den übrigen Blutwerten konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe festgestellt werden (vgl. **Abb. 3.1-3.6**).

Mittelwerte und Standardabweichung sind dem **Anhang unter 7.3.** zu entnehmen.

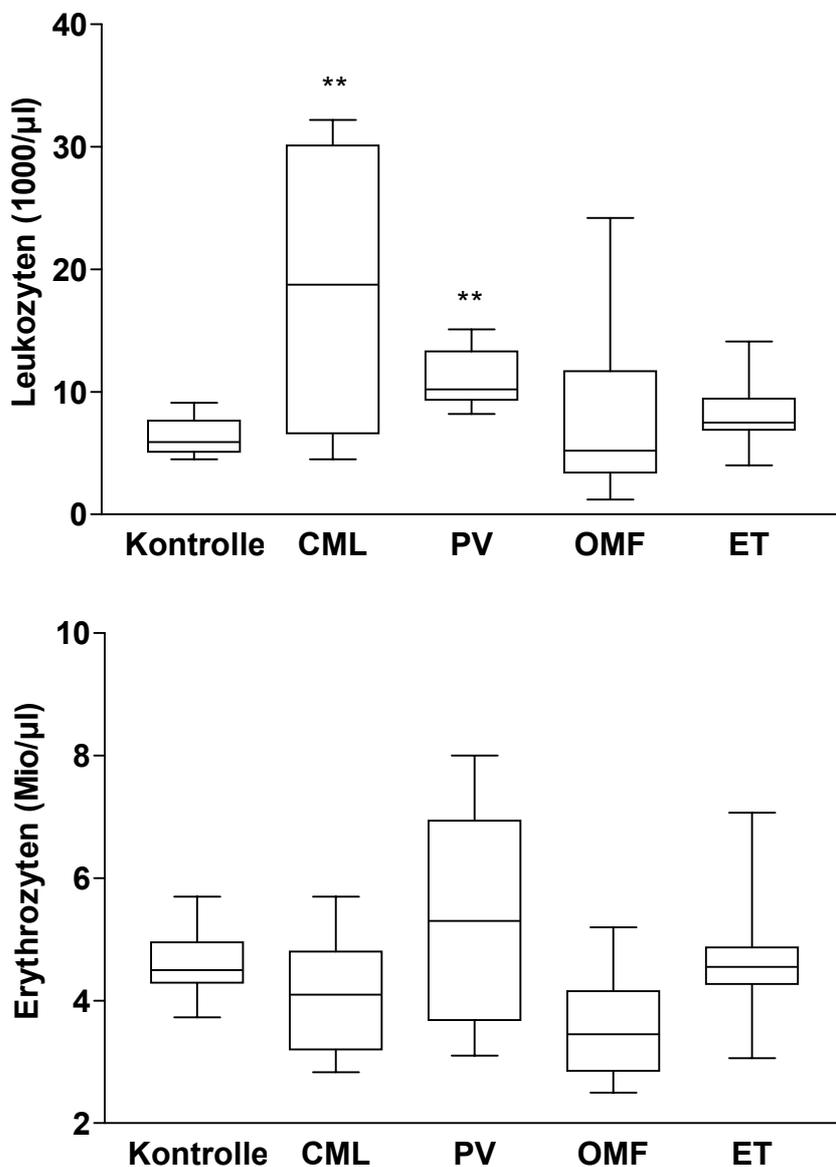


Abb. 3.1/3.2

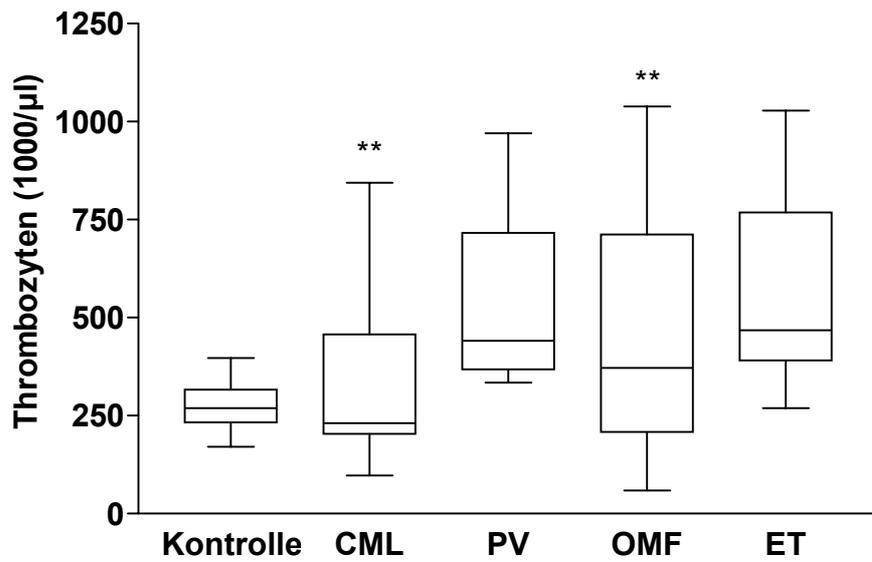


Abb. 3.3

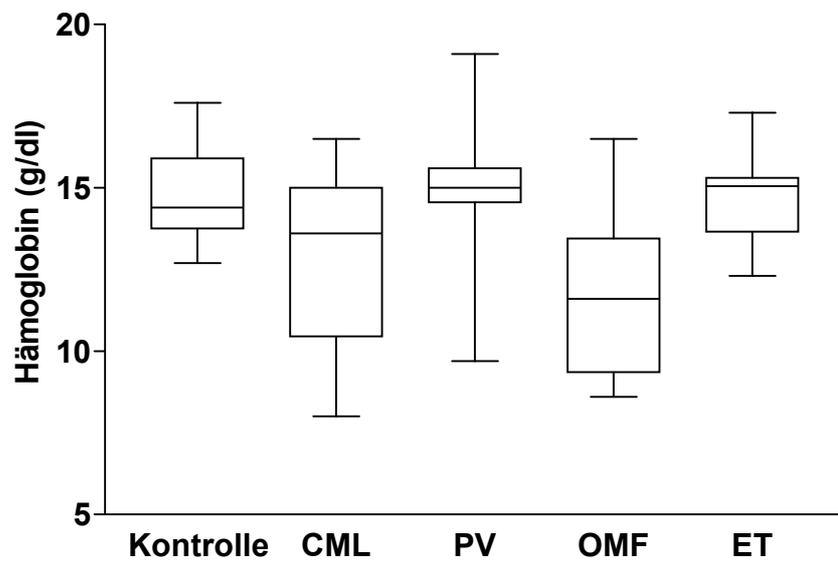


Abb. 3.4

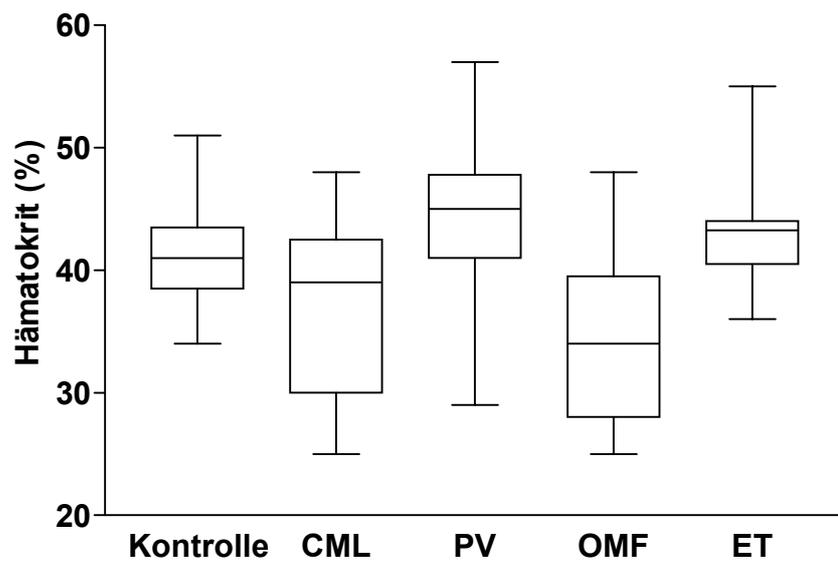


Abb. 3.5

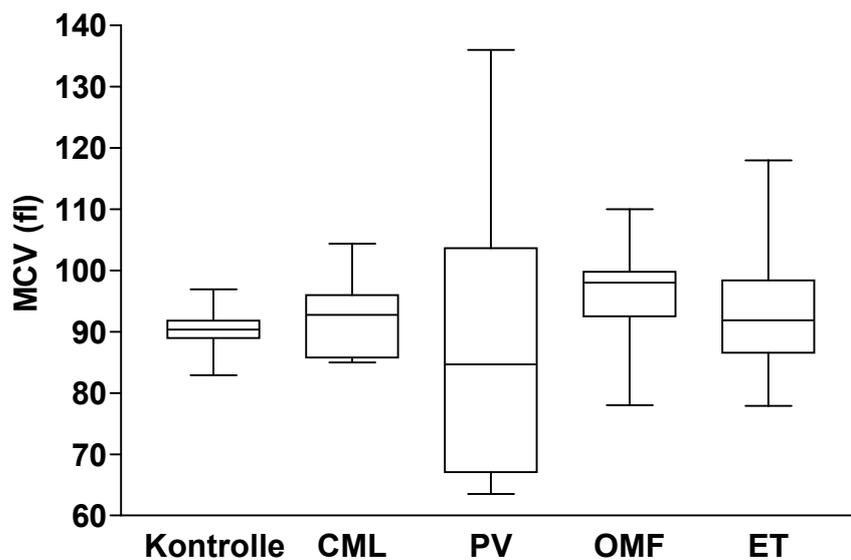


Abb. 3.6

Abb. 3.1-3.6: Ergebnisse des Blutbildes (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV) im Vergleich zwischen den einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe. Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile ( $\square$ ). Eingezeichnet ist der Median ( $-$ ) sowie der maximale und minimale Wert (T/ $\perp$ ).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

### 3.1.4. Ergebnisse Differentialblutbild

Patienten mit CML ( $12900 \pm 9800/\mu\text{l}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und PV ( $8800 \pm 2100/\mu\text{l}$ ) hatten im Mittel signifikant höhere Werte von Neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $3600 \pm 1100/\mu\text{l}$ ) (Vgl. **Abb.4.1**).

Bei den übrigen Blutwerten konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe festgestellt werden (vgl. **Abb. 4.1-4.3**).

Mittelwerte und Standardabweichung sind dem **Anhang unter 7.3.** zu entnehmen.

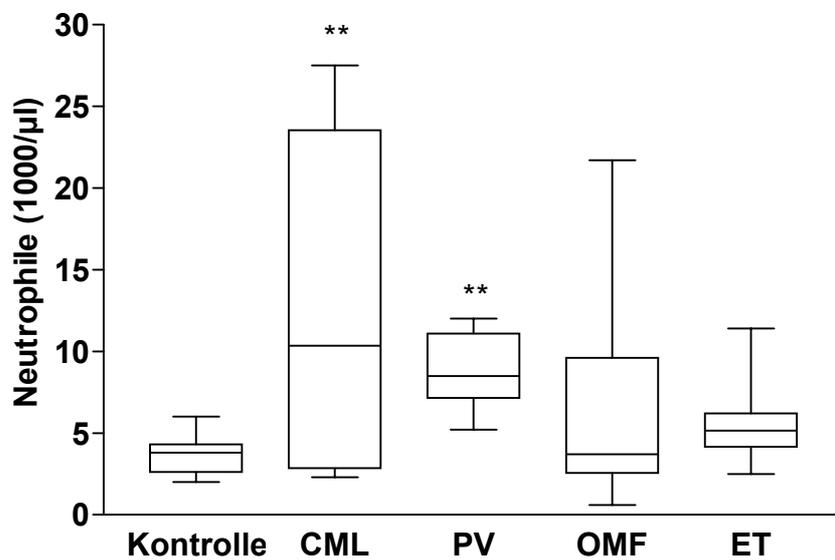


Abb. 4.1

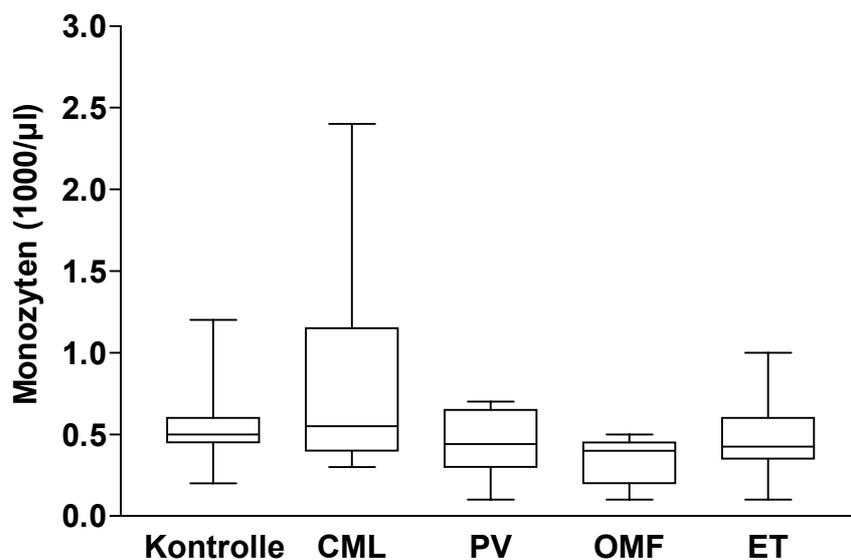


Abb. 4.2

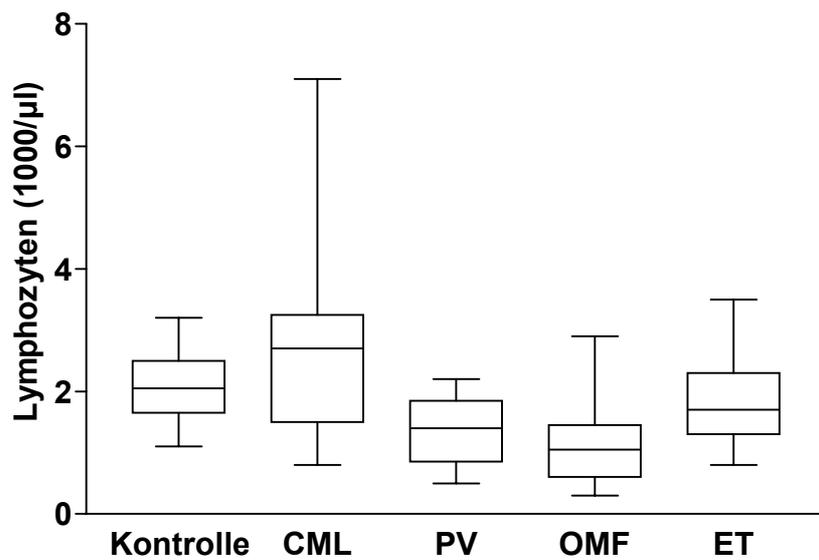


Abb. 4.3

Abb. 4.1-4.3: Ergebnisse des Differentialblutbildes (Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) im Vergleich zwischen den einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe. Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile (□). Eingezeichnet ist der Median (—) sowie der maximale und minimale Wert (T/⊥).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

### 3.1.5. Ergebnisse Durchflußzytometrie

Alle Patienten der Untergruppen des MPS (CML ( $14.6 \pm 4.0$  %, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), PV ( $11.7 \pm 1.9$  %), OMF ( $17.6 \pm 9.9$  %) und ET ( $13.1 \pm 4.4$  %)) hatten im Mittel signifikant höhere Prozentanteile an CD62p-positive Thrombozyten im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $10.1 \pm 3.8$  %) (vgl. **Abb. 5.1**).

Patienten mit PV ( $11.2 \pm 3.2$  %), OMF ( $10.7 \pm 4.5$  %) und ET ( $10.4 \pm 3.0$  %) hatten zudem im Mittel signifikant höhere Prozentanteile an Thrombozyten-Mikropartikeln im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $5.4 \pm 1.2$  %), während CML Patienten sich davon nicht unterschieden ( $6.4 \pm 2.4$  %) (vgl. **Abb. 5.2**).

Der Prozentanteil an Thrombozyten-Mikroaggregaten unterschied sich nicht signifikant zwischen gesunden Probanden ( $2.6 \pm 0.9$  %) und MPS Patienten (CML ( $2.0 \pm 0.7$  %), PV ( $2.5 \pm 1.6$  %), OMF ( $2.7 \pm 3.3$  %), ET ( $2.4 \pm 1.4$  %) (vgl. **Abb. 5.3**)).

Der Prozentanteil an Thrombozyten-Neutrophilen Aggregaten unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen Kontrollgruppe ( $6.6 \pm 1.9$  %) und Patienten mit CML ( $9.3 \pm 6.0$  %) sowie OMF ( $9.7 \pm 8.1$  %). MPS Patienten mit PV ( $9.1 \pm 3.3$  %) oder ET ( $10.7 \pm 5.3$  %) hatten dagegen signifikant höhere Werte (vgl. **Abb. 5.4**).

Der Prozentanteil an Thrombozyten-Monozyten Aggregaten war im Ganzen höher als der von Thrombozyten-Neutrophilen Aggregaten. Die Kontrollgruppe hatte  $8.8 \pm 2.9$  % Thrombozyten-Monozyten Aggregaten, während Patienten mit CML ( $15.2 \pm 13.9$  %) und OMF ( $17.6 \pm 15.7$  %) sich davon nicht statistisch signifikant unterschieden. MPS Patienten mit PV ( $16.6 \pm 5.9$  %) und ET ( $19.1 \pm 11.7$  %) hatten dagegen signifikant höhere Prozentanteile an Thrombozyten-Monozyten Aggregaten (vgl. **Abb. 5.5**).

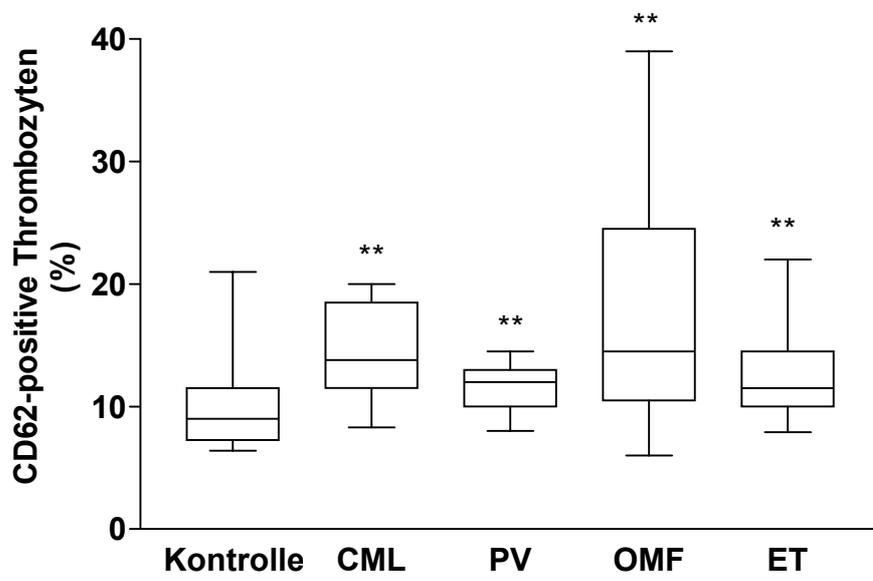


Abb. 5.1

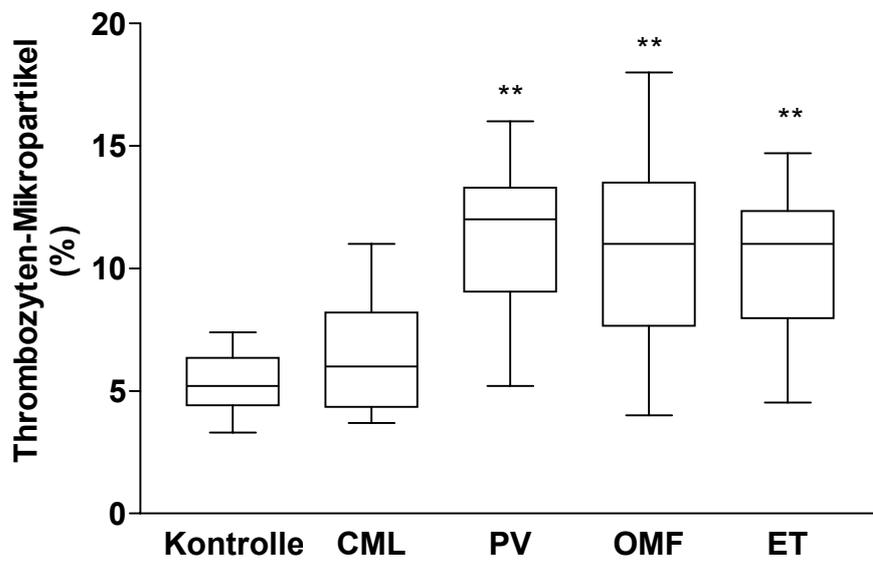


Abb. 5.2

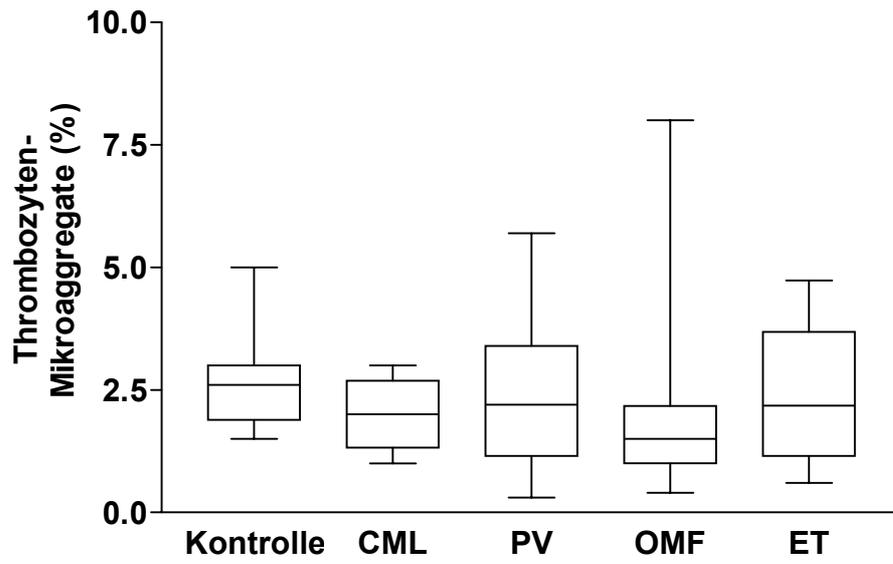


Abb. 5.3

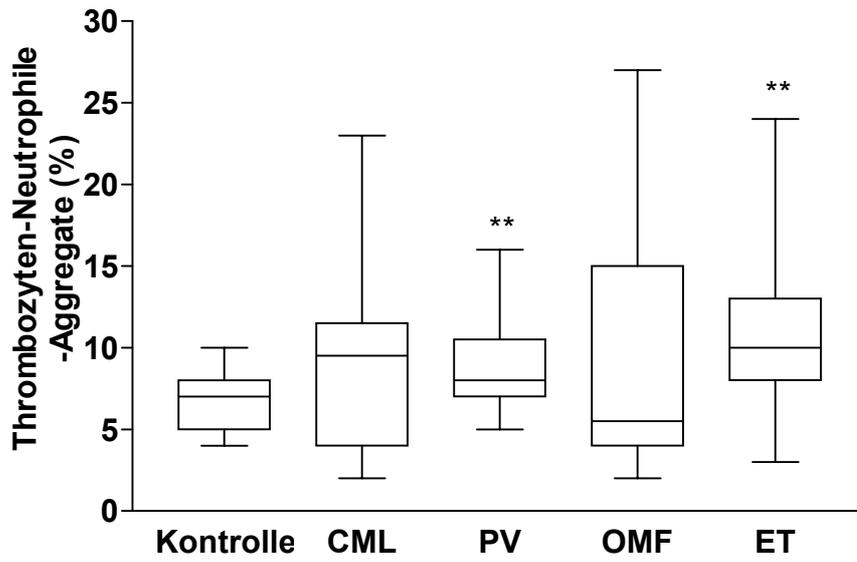


Abb. 5.4

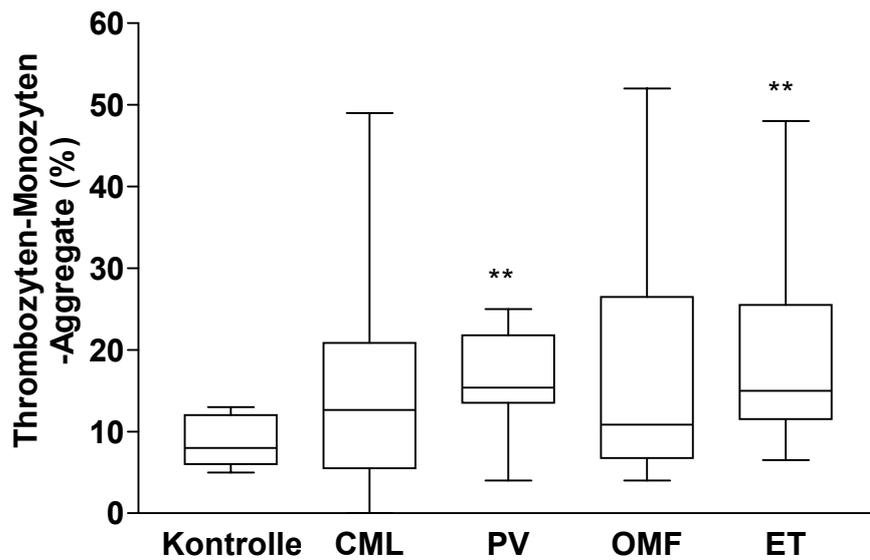


Abb. 5.5

**Abb. 5.1-5.5:** Ergebnisse der Durchflußzytometrie (CD62p-positive Thrombozyten, Thrombozyten-Mikropartikel, Thrombozyten-Mikroaggregate, Thrombozyten-Neutrophilen Aggregate, Thrombozyten-Monozyten Aggregate) im Vergleich zwischen den einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe. Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile ( $\square$ ). Eingezeichnet ist der Median ( $—$ ) sowie der maximale und minimale Wert (T/ $\perp$ ).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

### 3.1.6. PFA-100 (Platelet Function Analyzer)-Analysen

Die Ergebnisse, der mit dem PFA-100 durchgeführten Tests wurden in Abhängigkeit von der ASS Medikation dargestellt. Einer von 16 gesunden Probanden, 3 von 10 CML Patienten, 6 von 13 PV Patienten, 6 von 12 OMF Patienten und 8 von 12 ET Patienten erhielten Aspirin.

Bei den MPS Patienten, die eine aggregationshemmenden Therapie mit einschlossen, wurden folgende Resultate gefunden:

Die Verschußzeit der Kollagen/Epinephrin Meßzelle war signifikant verlängert bei Patienten mit PV ( $186.0 \pm 47.5$  Sek., Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und ET ( $144 \pm 41.6$  Sek.) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $100.5 \pm 18.6$  Sek.), befand sich jedoch immer noch im Rahmen des vorgegebenen Referenzbereiches (94-193 Sek.).

Patienten mit CML ( $113.9 \pm 28.3$  Sek.) sowie mit OMF ( $152.8 \pm 39.8$  Sek.) unterschieden sich nicht signifikant von den gesunden Probanden (vgl. **Abb. 6.1**). Die Ergebnisse von zwei CML-, vier PV-, vier OMF- sowie drei ET Patienten konnten aufgrund einer abnormen Aggregation nicht bewertet werden.

Die Verschußzeit der Kollagen/ADP Meßzelle war mit Ausnahme der CML Patienten ( $101.3 \pm 65.9$  Sek.) bei allen anderen MPS Patienten (PV ( $115.2 \pm 31.4$  Sek.), OMF ( $98.8 \pm 39.9$  Sek.), ET ( $102.2 \pm 33.1$  Sek.)) signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $72.4 \pm 13.3$  Sek.) verlängert. Auch hier befanden sich die Werte noch im vorgegebenen Referenzbereich (71-118 Sek.)(vgl. **Abb. 6.2**).

Bei den MPS Patienten **ohne** Einfluß einer ASS Medikation wurden folgende Ergebnisse gefunden:

Die Verschußzeit der Kollagen/Epinephrin Meßzelle war ebenfalls signifikant verlängert bei Patienten mit PV ( $191.9 \pm 54.6$  Sek., Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $103.6 \pm 23.5$  Sek.), befand sich aber im vorgegebenen Referenzbereich (94-193 Sek.). Im Gegesatz zu den Resultaten der Patienten, die eine aggregationshemmende Therapie einschlossen hatten MPS Patienten mit ET ohne eine ASS Medikation keine verlängerte Verschußzeit ( $106.5 \pm 13.4$  Sek.). Gleiches wurde für die CML Patienten ( $106.2 \pm 24.2$  Sek.) beobachtet. Dagegen zeigte sich bei OMF Patienten auch ein signifikanter Unterschied ( $176 \pm 33.8$  Sek.) zu der Kontrollgruppe, der aber im Normbereich lag (vgl. **Abb. 6.3**). Die Ergebnisse von drei OMF-, einem CML- sowie von zwei PV Patienten konnten aufgrund einer abnormen Aggregation nicht bewertet werden.

Die Verschlusszeit der Kollagen/ADP Messzelle zeigte mit Ausnahme der PV Patienten (118.1±30.0 Sek.) bei allen anderen MPS Untergruppen ((CML (85.3±33.7 Sek.), OMF (104.8±48.1 Sek.), ET (84.5±10.3 Sek.)) keinen Unterschied zu der Kontrollgruppe (72.9±13.6 Sek.). Die Ergebnisse unterschieden sich damit von den MPS Patienten, die eine ASS Therapie mit einschlossen. Die signifikant verlängerte Verschlusszeit der PV Patienten lag allerdings noch im vorgegebenen Normbereich (71-118 Sek.) (vgl. **Abb. 6.4**).

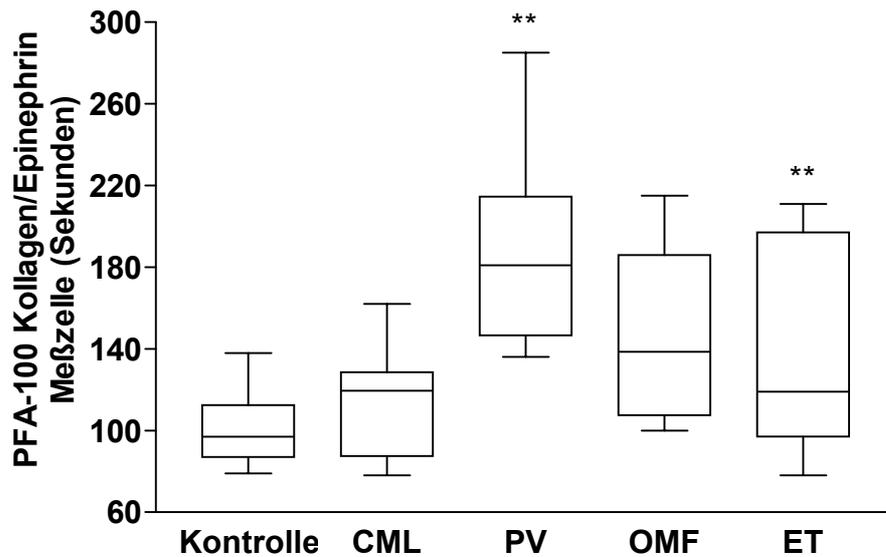


Abb. 6.1

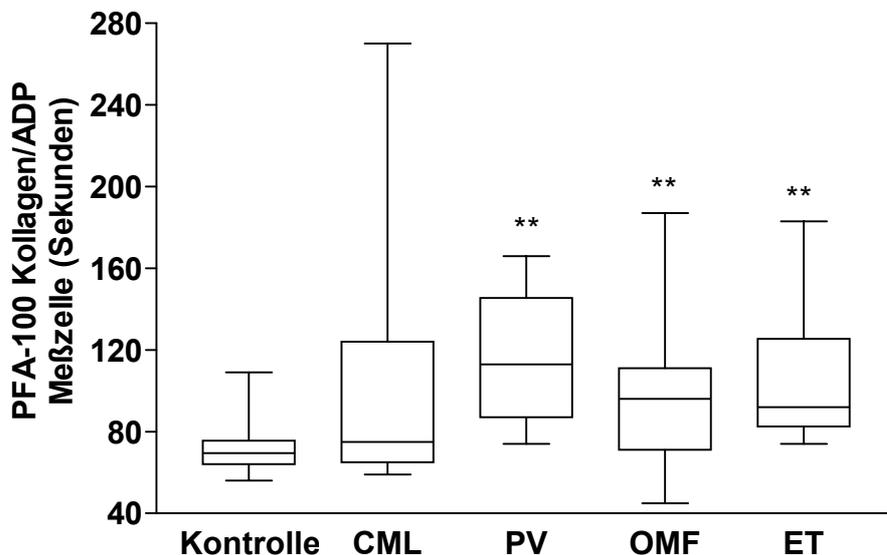


Abb. 6.2

**Abb. 6.1/6.2:** Ergebnisse des PFA-100 (Kollagen/Epinephrin Messzelle, Kollagen/ADP Messzelle) im Vergleich zwischen den einzelnen Untergruppen des MPS (**inklusive** Patienten mit ASS Medikation) und der Kontrollgruppe. Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der

25. bis zur 75. Perzentile (□). Eingezeichnet ist der Median (—) sowie der maximale und minimale Wert (T/⊥).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

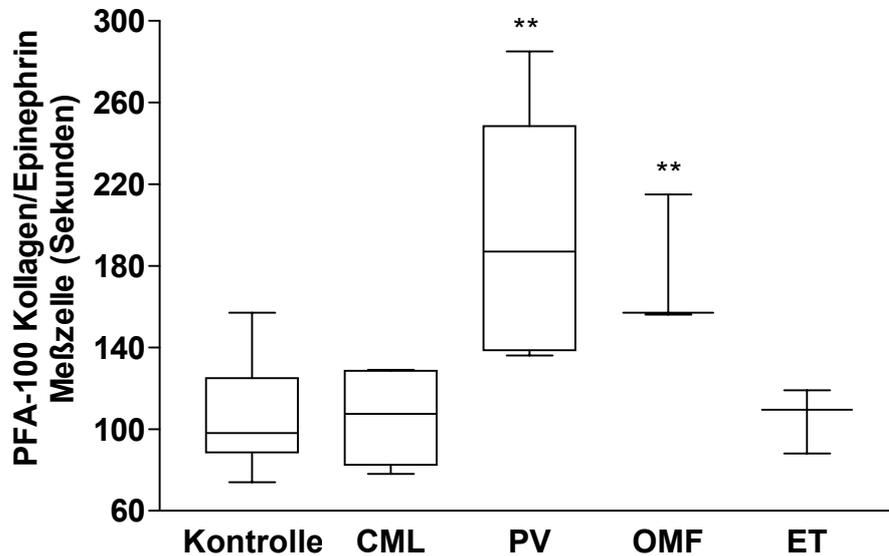


Abb. 6.3

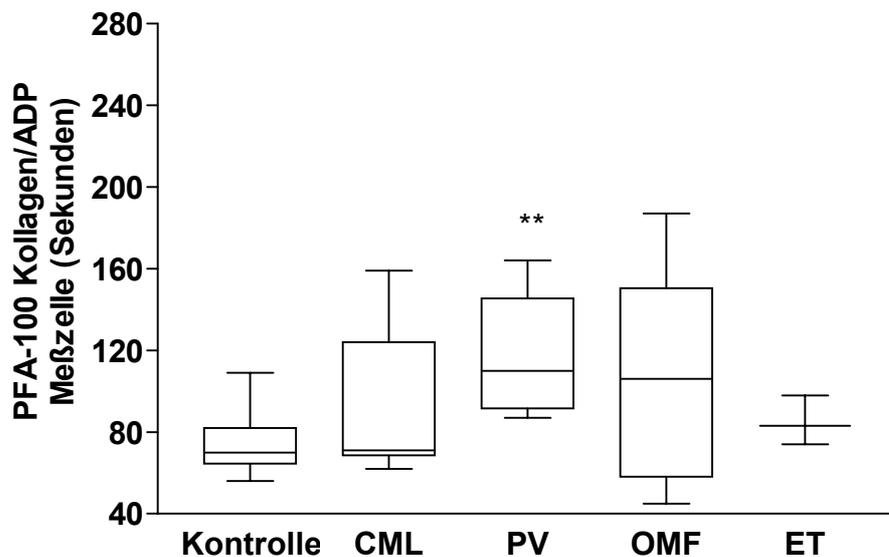


Abb. 6.4

Abb. 6.3/6.4: Ergebnisse des PFA-100 (Kollagen/Epinephrin Messzelle, Kollagen/ADP Messzelle) im Vergleich zwischen den einzelnen Untergruppen des MPS (ohne ASS Medikation) und der Kontrollgruppe. Das Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile (□). Eingezeichnet ist der Median (—) sowie der maximale und minimale Wert (T/⊥).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

### 3.1.7. Ergebnisse Gerinnungsanalysen

MPS Patienten und Kontrollgruppe zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Untersuchung der Thromboplastinzeit sowie der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (Vgl. **Abb. 7.1/7.2**). Mittelwerte und Standardabweichung sind dem **Anhang unter 7.5** zu entnehmen.

Patienten mit CML hatten signifikant erhöhte Fibrinogenwerte ( $3.6 \pm 0.8$  g/l, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) im Vergleich zu den gesunden Probanden ( $2.7 \pm 0.4$  g/l), während alle anderen Patienten der MPS Untergruppen (PV ( $2.4 \pm 0.7$  g/l), OMF ( $3.1 \pm 0.7$  g/l), ET ( $2.8 \pm 0.7$  g/l)) sich davon nicht statistisch unterschieden (Vgl. **Abb. 7.3**).

Alle MPS Patienten (CML ( $2.3 \pm 2.5$  nmol/l), PV ( $2.2 \pm 2.4$  nmol/l), ET ( $1.6 \pm 1.7$  nmol/l) außer die OMF Patienten ( $2.1 \pm 2.5$  nmol/l) hatten signifikant höhere Prothrombinfragment Werte als die gesunden Probanden ( $0.8 \pm 0.4$  nmol/l) (Vgl. **Abb. 7.4**).

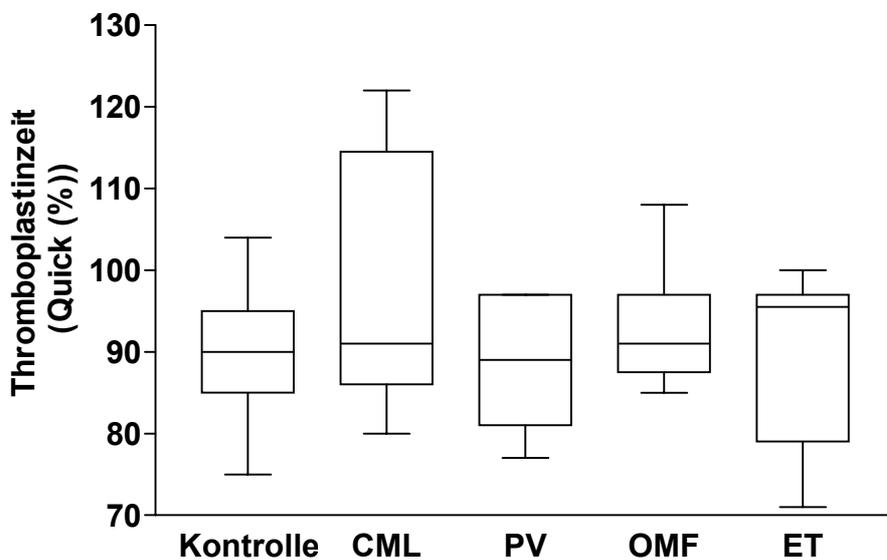


Abb. 7.1

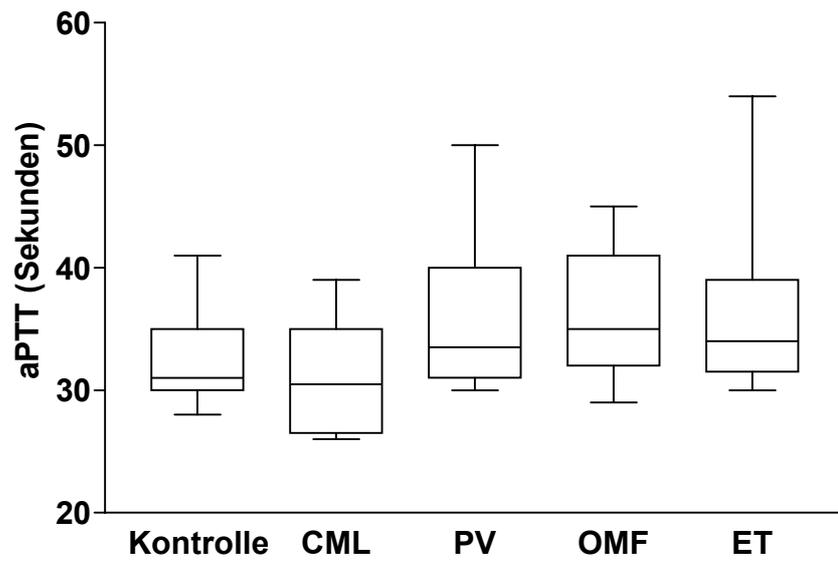


Abb. 7.2

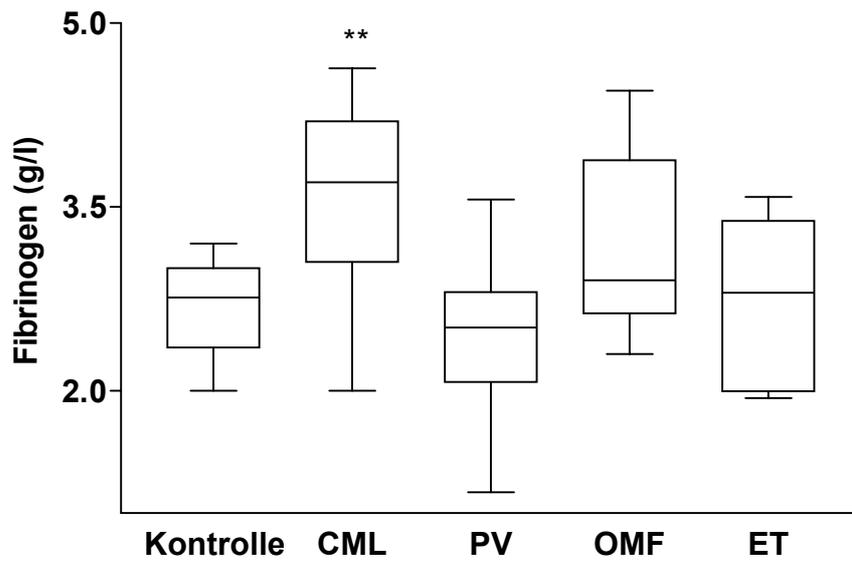
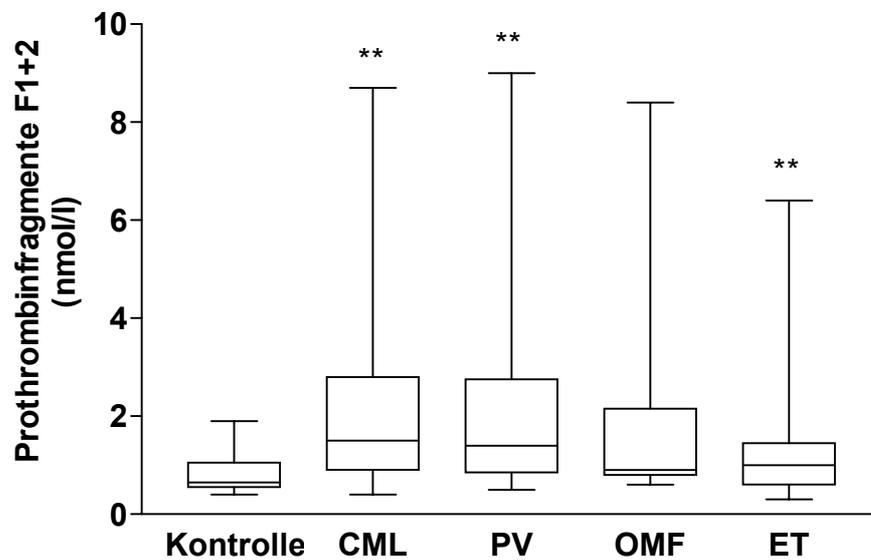


Abb. 7.3



**Abb. 7.4**

**Abb. 7.1-7.4:** Ergebnisse der Gerinnungsanalysen (Quick, aPTT, Fibrinogen, Prothrombinfragment F1+2) im Vergleich zwischen den einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe. Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile (□). Eingezeichnet ist der Median (—) sowie der maximale und minimale Wert (T/⊥).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

### 3.1.8. Ergebnisse Tissue Faktor/D-Dimere

Die Werte des Tissue Faktors unterschieden sich statistisch nicht signifikant zwischen MPS Patienten und der Kontrollgruppe (vgl. **Abb. 8.1**). Mittelwerte und Standardabweichung sind dem **Anhang unter 7.5.** zu entnehmen.

Im Gegensatz zu den gesunden Probanden ( $254.4 \pm 160.4$  Fibrinogenäquivalente/ml, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) hatten MPS Patienten (CML ( $575.4 \pm 398.5$  Fibrinogenäquivalente/ml), OMF ( $494.7 \pm 341.1$  Fibrinogenäquivalente/ml), ET ( $411.3 \pm 187.1$  Fibrinogenäquivalente/ml)) mit Ausnahme der PV Patienten ( $270.7 \pm 137.3$  Fibrinogenäquivalente/ml) signifikant höhere D-Dimere Werte (vgl. **Abb. 8.2**).

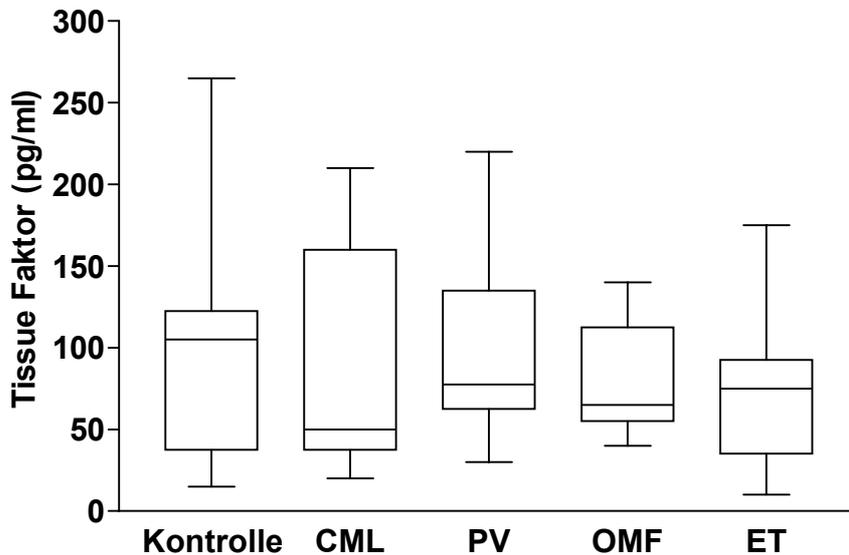


Abb. 8.1

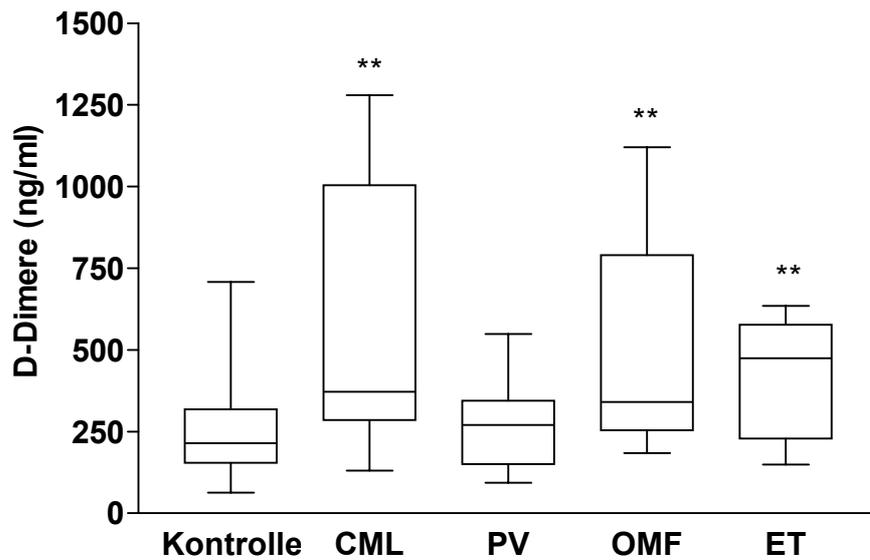


Abb. 8.2

Abb. 8.1-8.2: Ergebnisse Tissue Faktor/D-Dimere im Vergleich zwischen den einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe. Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile ( $\square$ ). Eingezeichnet ist der Median ( $\text{—}$ ) sowie der maximale und minimale Wert ( $\text{T}/\perp$ ).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

### 3.1.9. Ergebnisse Thrombophiliediagnostik

MPS Patienten und Kontrollgruppe unterschieden sich statistisch nicht signifikant untereinander in der APC-Resistenz Ratio, in der Protein C-Aktivität sowie in der Antithrombin-Aktivität (vgl. **Abb. 9.1-9.4**). Mittelwerte und Standardabweichung sind dem **Anhang unter 7.5.** zu entnehmen.

Patienten und gesunde Probanden mit einer Faktor-V-Leiden Mutation wurden aus der APC-Resistenz Wertung genommen.

Patienten mit PV ( $72.1 \pm 18.8$  % d. N., Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und OMF hatten ( $80.4 \pm 13.3$  % d. N.) eine signifikant niedrigere Protein S-Aktivität als die gesunden Probanden ( $97.9 \pm 15.6$  % d. N.) (vgl. **Abb. 9.3**). Die Werte sind jedoch noch im vorgegebenen Referenzbereich (70-123 % d. N.). Patienten mit CML ( $106.7 \pm 23.4$  % d. N.) und ET ( $90.5 \pm 20.1$  % d. N.) unterschieden sich statistisch nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

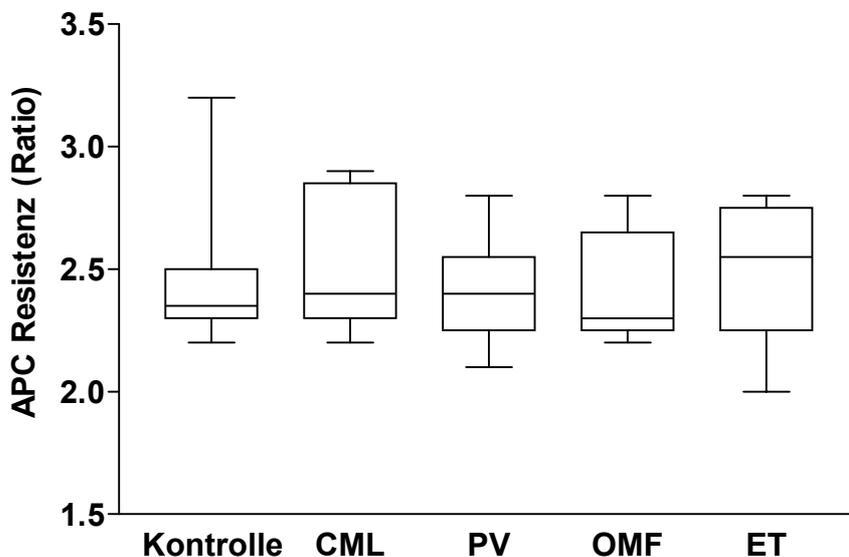


Abb. 9.1

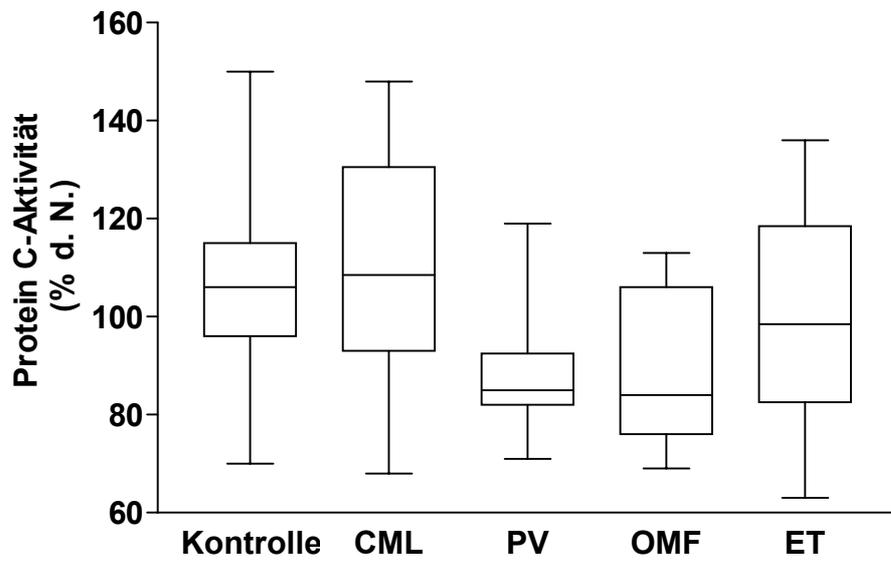


Abb. 9.2

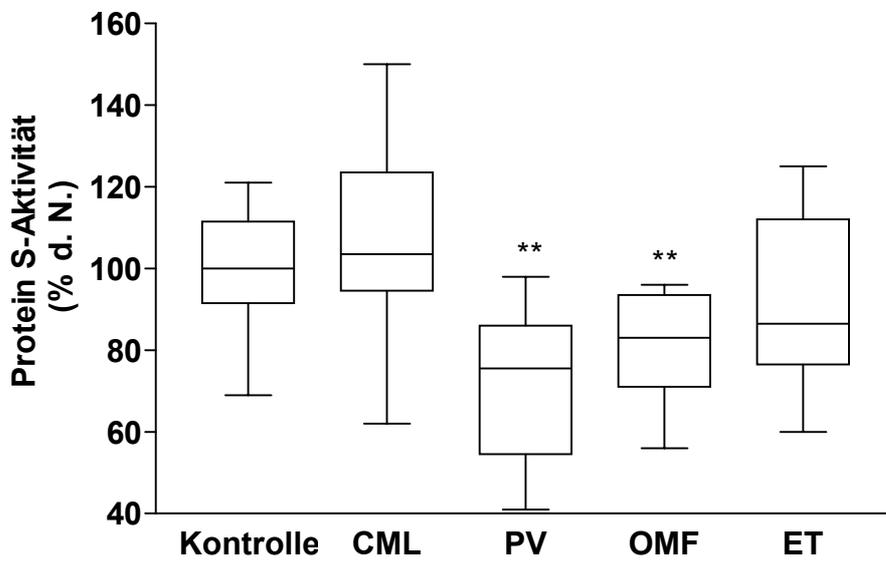
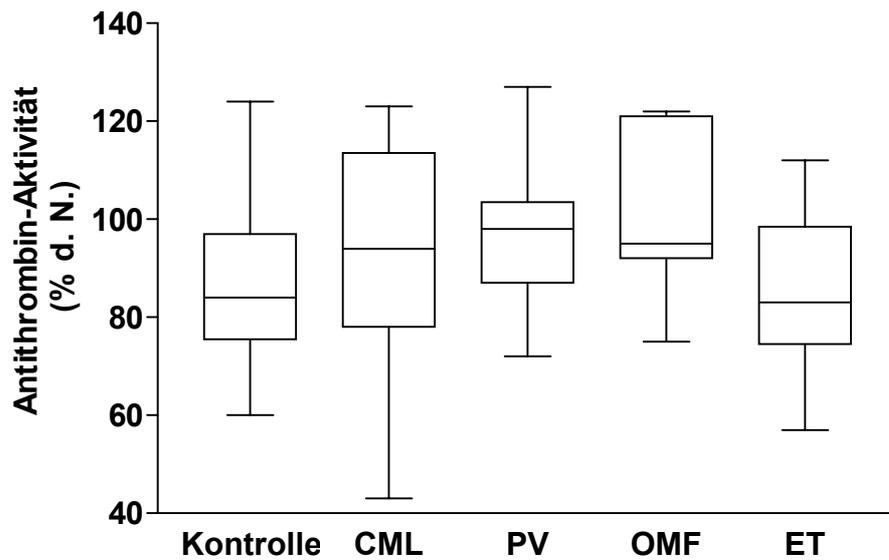


Abb. 9.3



**Abb. 9.4**

**Abb. 9.1-9.4:** Ergebnisse der Thrombophiliediagnostik (APC Resistenz, Protein C-Aktivität, Protein S-Aktivität, Antithrombin-Aktivität) im Vergleich zwischen den einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe. Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile ( $\square$ ). Eingezeichnet ist der Median ( $—$ ) sowie der maximale und minimale Wert (T/ $\perp$ ).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

### 3.1.10. Ergebnisse Faktor-V-Leiden Mutation

Drei Probanden der gesunden Kontrollgruppe wiesen eine heterozygote Mutation vor. Bei den MPS Patienten lag lediglich eine Mutation bei der ET Gruppe vor (Vgl. **Tab. 3**). Dieser Patient hatte ein thrombo-embolisches Ereignis in der Anamnese vorzuweisen.

	<b>Kontrolle</b>	<b>CML</b>	<b>PV</b>	<b>OMF</b>	<b>ET</b>
<b>Homozygote Mutation</b>	0	0	0	0	0
<b>Heterozygote Mutation</b>	3	0	0	0	1

**Tab. 3:** Ergebnisse der Faktor-V-Leiden Mutation im Vergleich zwischen den einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe.

### 3.1.11. Ergebnisse Prothrombin Polymorphismus

In der Kontrollgruppe hatte ein Proband eine heterozygote Mutation. Ein CML Patient wies ebenfalls eine heterozygote Mutation vor, ein OMF Patient dagegen eine homozygote Mutation (Vgl. **Tab. 4**). Nur der CML Patient hatte eine thrombo-embolische Komplikation im Verlauf der Erkrankung erlitten.

	<b>Kontrolle</b>	<b>CML</b>	<b>PV</b>	<b>OMF</b>	<b>ET</b>
<b>Homozygote Mutation</b>	0	0	0	1	0
<b>Heterozygote Mutation</b>	1	1	0	0	0

**Tab. 4:** Ergebnisse Prothrombin Polymorphismus im Vergleich zwischen den einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe.

### 3.1.12. Ergebnisse MTHFR Polymorphismus

Vier gesunde Probanden wiesen eine heterozygote, einer eine homozygote Mutation vor. Bei den MPS Patienten hatte die CML Gruppe (1 heterozygote/2 homozygote) die PV Gruppe (5 heterozygote/2 homozygote), die OMF Gruppe (3 heterozygote/3 homozygote) und die ET Gruppe (7 heterozygote/3 homozygote) Mutationen.

Die Daten wurden unterteilt in eine Gruppe mit, die Andere ohne thrombo-embolische Komplikationen in der Vorgeschichte (Vgl. **Tab. 5/Tab. 5.1.**).

	Kontrolle	CML	PV	OMF	ET
<b>Homozygote Mutation</b>	-	0/1	2/10	2/5	1/7
<b>Heterozygote Mutation</b>	-	0/1	3/10	1/5	5/7

**Tab. 5:** Ergebnisse MTHFR Polymorphismus bei den einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe **mit** einer thrombo-embolischen Komplikation in der Anamnese (Anzahl Patienten mit entsprechender Mutation/Gesamtzahl der thrombo-embolischen Ereignisse in der Untergruppe).

	Kontrolle	CML	PV	OMF	ET
<b>Homozygote Mutation</b>	1/16	2/9	0/3	1/7	2/5
<b>Heterozygote Mutation</b>	4/16	1/9	2/3	2/7	2/5

**Tab. 5.1.:** Ergebnisse MTHFR Polymorphismus bei den einzelnen Untergruppen des MPS und der Kontrollgruppe **ohne** eine thrombo-embolische Komplikation in der Anamnese (Anzahl Patienten oder Gesunde mit entsprechender Mutation/Gesamtzahl der Patienten oder Gesunden ohne ein thrombo-embolisches Ereignis).

### 3.2. MPS Patienten mit/ohne thrombo-embolischen Ereignissen im Vergleich

23 von 47 Patienten mit MPS (49%) hatten thrombo-embolische Ereignisse, 4 Patienten hatten dazu auch noch ein Blutungsereignis in der Anamnese vorzuweisen (Beschreibung der Patienten im **Anhang unter 7.1.** zu entnehmen).

Patienten mit PV und ET zeigten die höchste Rate von thrombo-embolischen Ereignissen (77% und 58%). Die Inzidenz war niedriger bei CML und OMF Patienten (10% und 42%). Für statistische Analysen innerhalb einer Untergruppe war die Anzahl der MPS Patienten leider zu gering. Daher wurden die Daten aller MPS Patienten mit/ohne thrombo-embolischen Ereignissen zusammengefaßt und miteinander verglichen.

#### 3.2.1. Geschlechtsverteilung

Die Verteilung von Männern und Frauen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen MPS Patienten mit (12 Frauen/11 Männern) oder ohne (12 Frauen/12 Männer) thrombo-embolischen Ereignissen.

	<b>MPS + TE</b>	<b>MPS - TE</b>	<b>N</b>
<b>Frauen</b>	12	12	24
<b>Männer</b>	11	12	23
<b>N</b>	23	24	47

**Tab. 1:** Geschlechtsverteilung im Vergleich bei MPS Patienten mit (+) /ohne (-) thrombo-embolischen Ereignissen (TE).

### 3.2.2. Altersverteilung

Es zeigt sich kein Unterschied in der Altersverteilung zwischen MPS Patienten mit oder ohne thrombo-embolischen Ereignissen (Durchschnittsalter 64 Jahre)(vgl. **Tab. 2**).

	<b>MPS + TE</b>	<b>MPS – TE</b>
<b>Alter (Mittelwert ± Standardabweichung (Jahre))</b>	64±14	64±15
<b>Minimum-Maximum (Jahre)</b>	38-81	24-91

**Tab. 2:** Altersverteilung bei MPS Patienten mit (+) /ohne (-) thrombo-embolischen Ereignissen (TE).

### 3.2.3. Ergebnisse Blutbild

MPS Patienten mit einem thrombo-embolischem Ereignis in der Anamnese hatten signifikant höhere Erythrozytenwerte ( $4.6 \pm 1.7$  Mio/ $\mu$ l, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) als Patienten ohne entsprechende Anamnese ( $4.1 \pm 0.8$  Mio/ $\mu$ l) (vgl. **Abb. 3.1**). Die Werte liegen allerdings noch im vorgegebenen Referenzbereich (3.9-5.3 Mio/ $\mu$ l).

Ebenso hatten die MPS Patienten mit einer positiven Anamnese auch einen signifikant höheren Hämatokritwert ( $41.9 \pm 7.9\%$ ) als die Vergleichsgruppe ( $37.8 \pm 6.7\%$ ) (vgl. **Abb. 3.4**). Auch hier liegen die Werte noch im vorgegebenen Referenzbereich (37-52%).

Thrombozyten und Hämoglobin unterschieden sich statistisch nicht signifikant zwischen den beiden MPS Vergleichsgruppen (vgl. **Abb. 3.2/3.3**).

Abb. 3.1

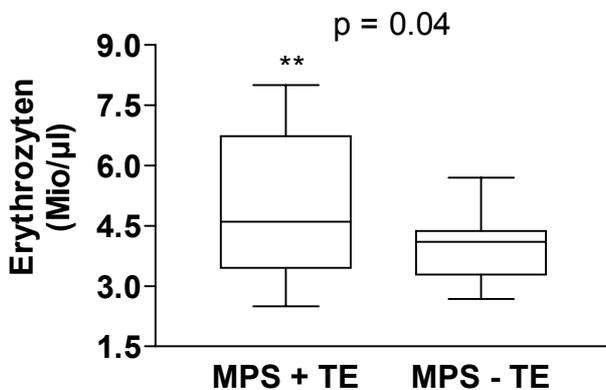


Abb. 3.2

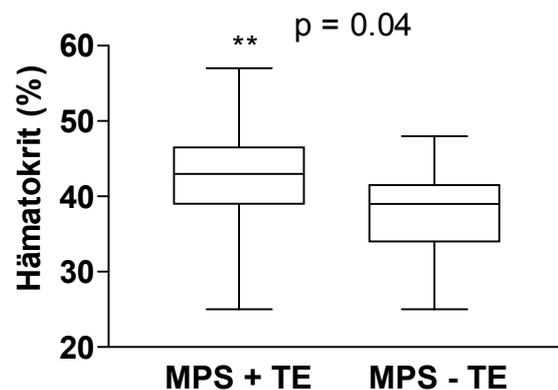
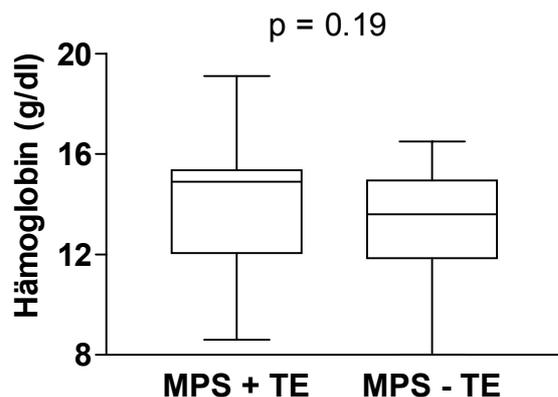
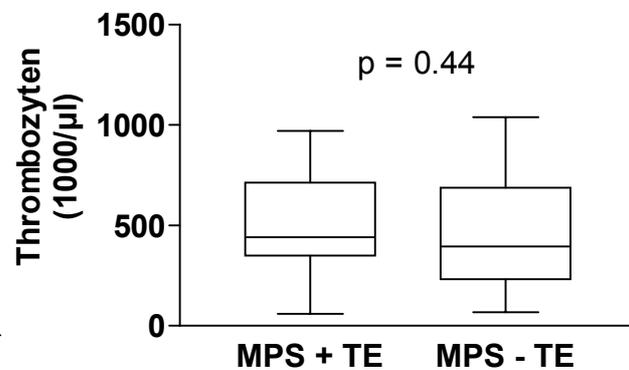


Abb. 3.3

Abb. 3.4

**Abb. 3.1-3.4:** Blutbildergebnisse (Erythrozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, Hämatokrit) im Vergleich bei MPS Patienten mit(+)/ohne(-) thrombo-embolischen Ereignissen (TE). Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile ( $\square$ ). Eingezeichnet ist der Median ( $—$ ) sowie der maximale und minimale Wert (T/ $\perp$ ).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich

### 3.2.4. Ergebnisse Differentialblutbild

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen MPS Patienten mit oder ohne thrombo-embolischen Ereignissen (vgl. **Abb. 4.1-4.4**).

Abb. 4.1

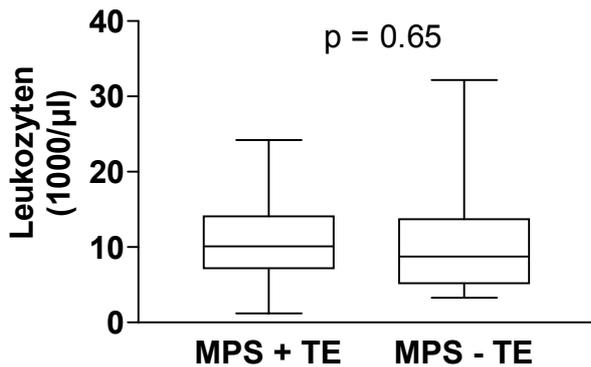


Abb. 4.2

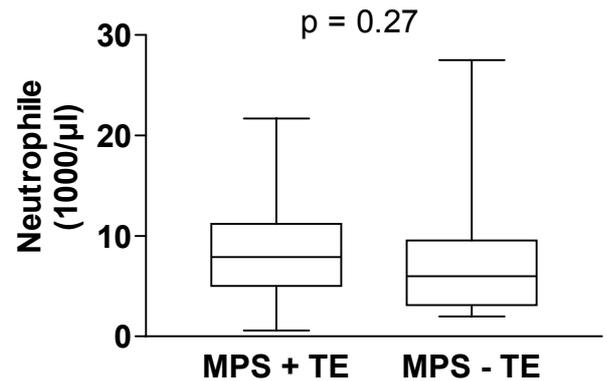


Abb. 4.3

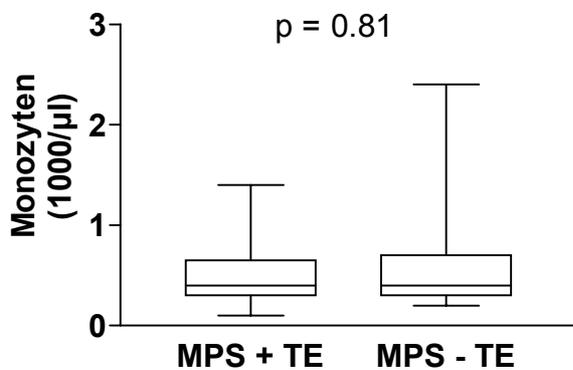
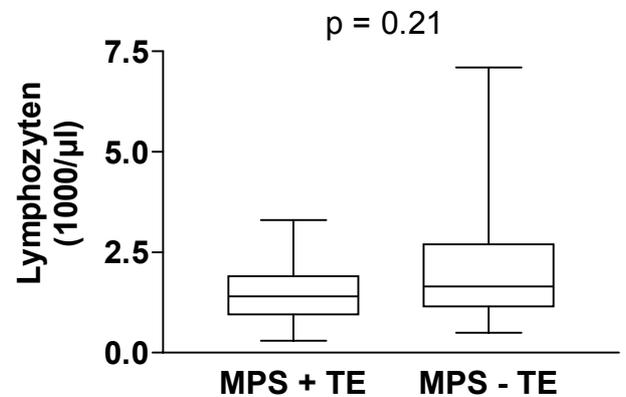


Abb. 4.4



**Abb. 4.1-4.4:** Differentialblutbildergebnisse (Leukozyten, Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) im Vergleich bei MPS Patienten mit(+)/ohne(-) thrombo-embolischen Ereignissen (TE). Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile (□). Eingezeichnet ist der Median (—) sowie der maximale und minimale Wert (T/⊥).

### 3.2.5. Ergebnisse Durchflußzytometrie

Die Expression von CD62p-positiven Thrombozyten, die Bildung von Thrombozyten-Mikropartikeln, Thrombozyten-Mikroaggregaten, Thrombozyten-Neutrophilen- oder Thrombozyten-Monozyten Aggregaten unterschied sich statistisch nicht signifikant zwischen beiden MPS Gruppen (vgl. **Abb.5.1-5.5**).

Es ist jedoch ein Trend zu einem höheren Prozentsatz von Mikropartikeln sowie einer geringeren Anzahl von Thrombozyten-Neutrophilen Aggregaten bei Patienten mit thromboembolischen Komplikationen zu erkennen (vgl. **Abb. 5.1/5.4**).

Abb. 5.1

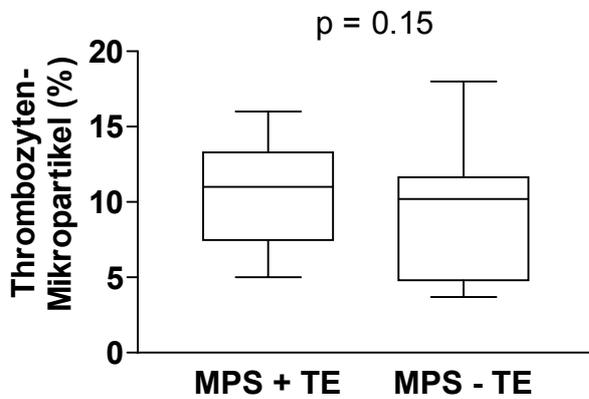


Abb. 5.2

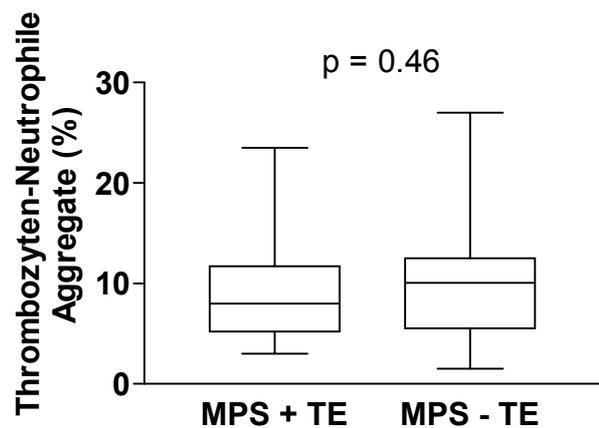
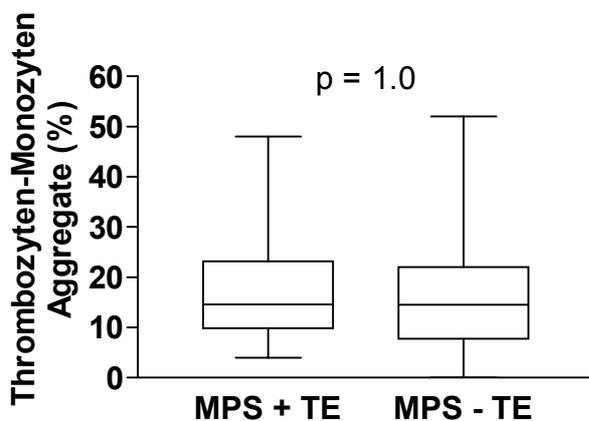
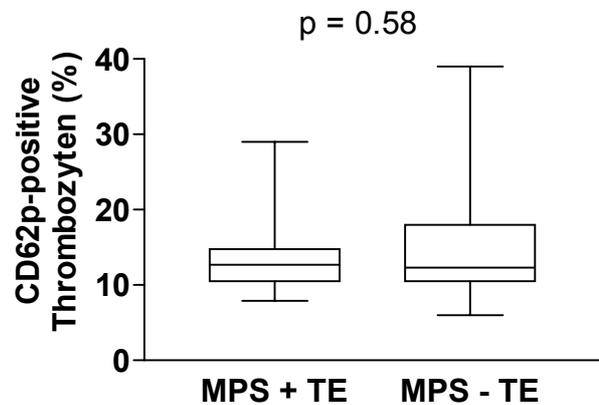


Abb. 5.3

Abb. 5.4

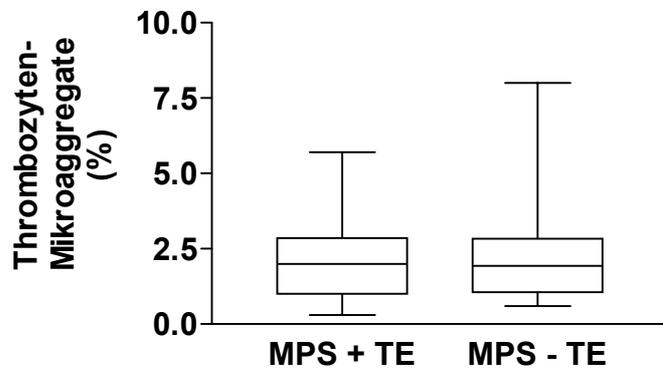


Abb. 5.5

Abb. 5.1-5.5: Durchflußzytometrische Ergebnisse (CD62p-positive Thrombozyten, Thrombozyten-Mikropartikel, Thrombozyten-Mikroaggregate, Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregate, Thrombozyten-Monozyten Aggregate) im Vergleich bei MPS Patienten mit(+)/ohne(-) thrombo-embolischen Ereignissen (TE). Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile ( $\square$ ). Eingezeichnet ist der Median ( $—$ ) sowie der maximale und minimale Wert (T/ $\perp$ ).

### 3.2.6. Ergebnisse PFA-100

Die Ergebnisse des PFA-100 wurden in Abhängigkeit von der ASS Medikation dargestellt. 14 von 23 MPS Patienten mit thrombo-embolischen Ereignissen erhielten Aspirin. In der Vergleichsgruppe ohne Komplikationen waren es 8 von 24 Patienten.

Bei dem Kollektiv von MPS Patienten, die eine aggregationshemmende Therapie mit einschloß, wurden folgende Resultate gefunden:

Die Verschußzeit der Kollagen/Epinephrin Meßzelle war signifikant verlängert bei MPS Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen ( $168.5 \pm 52.5$  Sek., Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) im Vergleich zu der MPS Vergleichsgruppe ( $131.3 \pm 40.7$  Sek.) (vgl. **Abb. 6.1**). Die Werte liegen im vorgegebenen Referenzbereich (94-193 Sek.).

8 Patienten konnten aufgrund einer abnormen Aggregation nicht bewertet werden.

Bei der Kollagen/ADP Meßzelle zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Verschußzeit zwischen den MPS Vergleichsgruppen (vgl. **Abb. 6.2**). Hier wurde 1 Patient wegen abnormer Aggregation nicht bewertet.

Bei den MPS Patienten **ohne** Einfluß einer ASS Medikation wurden folgende Ergebnisse gefunden:

Auch hier war die Verschußzeit der Kollagen/Epinephrin Meßzelle verlängert bei MPS Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen ( $173.4 \pm 63.6$  Sek., Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) im Vergleich zu der MPS Vergleichsgruppe ( $122.9 \pm 33.5$  Sek.) (vgl. **Abb. 6.3**). Die Verschußzeiten unterschieden sich aber nicht im Signifikanzniveau und liegen im vorgegebenen Normalbereich (94-193 Sek.).

1 MPS Patient mit thrombo-embolischem Ereignis sowie fehlender ASS Medikation in der Anamnese konnte aufgrund einer abnormen Aggregation nicht bewertet werden. Bei den Patienten ohne Komplikationen wurden 4 Patienten nicht bewertet.

Bei der Kollagen/ADP Meßzelle zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Verschußzeit zwischen den MPS Vergleichsgruppen (vgl. **Abb. 6.4**). Hier wurde 1 Patient mit einem thrombo-embolischem Ereignis in der Anamnese wegen abnormer Aggregation nicht bewertet.

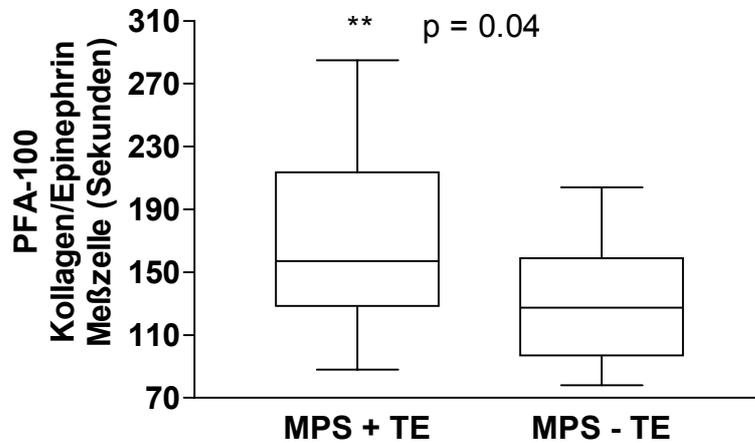


Abb. 6.1

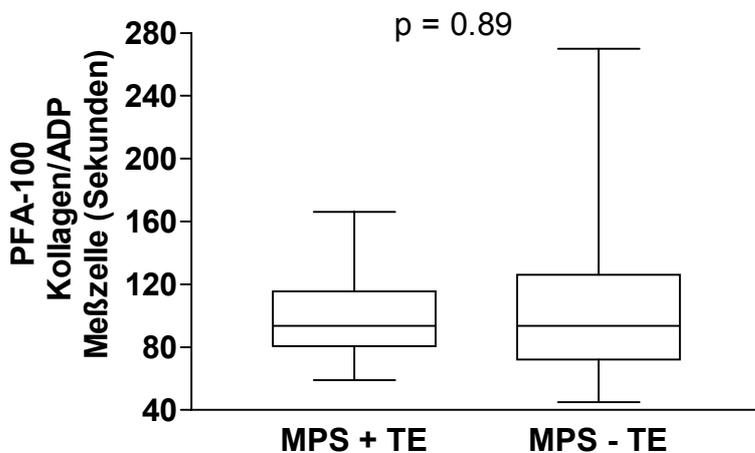


Abb. 6.2

**Abb. 6.1/6.2:** PFA-100 Ergebnisse (Kollagen/Epinephrin Messzelle, Kollagen/ADP Messzelle) im Vergleich zwischen den MPS Patienten mit (+) /ohne (-) thrombo-embolischen Ereignissen (TE) (**inklusive** Patienten mit ASS Medikation). Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile (□). Eingezeichnet ist der Median (—) sowie der maximale und minimale Wert (T/⊥).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

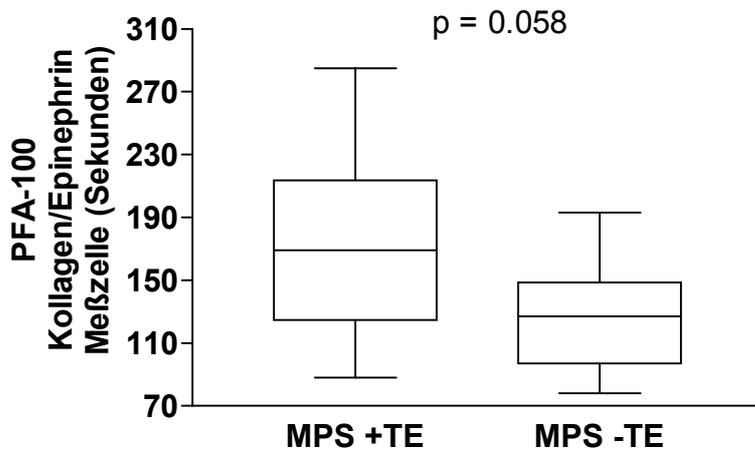


Abb. 6.3

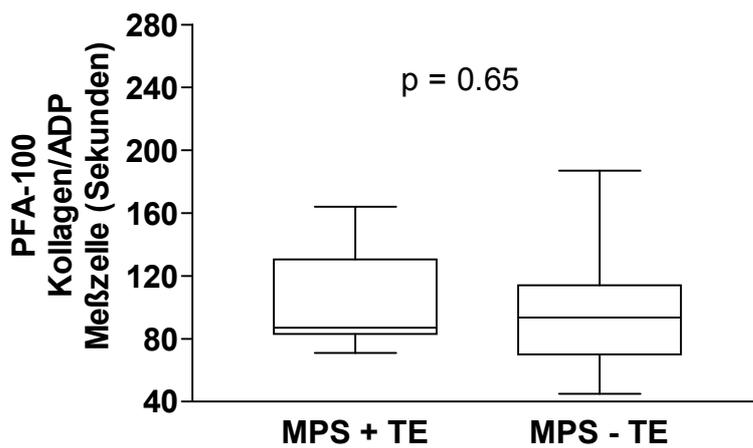


Abb. 6.4

**Abb. 6.3/6.4:** Ergebnisse des PFA-100 (Kollagen/Epinephrin Messzelle, Kollagen/ADP Messzelle) im Vergleich zwischen den MPS Patienten mit (+) /ohne (-) thrombo-embolischen Ereignissen (TE) (ohne Patienten mit ASS Medikation). Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile ( $\square$ ). Eingezeichnet ist der Median ( $—$ ) sowie der maximale und minimale Wert (T/ $\perp$ ).

### 3.2.7. Ergebnisse Gerinnungsanalysen

MPS Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen hatten signifikant niedrigere Fibrinogenwerte ( $2.5 \pm 0.8$  g/l, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) als die MPS Vergleichsgruppe ( $3.2 \pm 0.8$  g/l) ((Vgl. **Abb.7.1**). Die Werte liegen noch im vorgegebenen Referenzbereich (1.8–3.5 g/l).

Die Thromboplastinzeit (Quick), die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (PTT) sowie die Werte der Prothrombinfragmente F 1+2 unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Vergleichsgruppen (Vgl. **Abb. 7.2-7.4**). Es ist jedoch ein Trend zu höheren Werten von Prothrombinfragmenten F 1+2 bei Patienten mit thrombo-embolischen Ereignissen in der Anamnese zu erkennen (Vgl. **Abb. 7.2**).

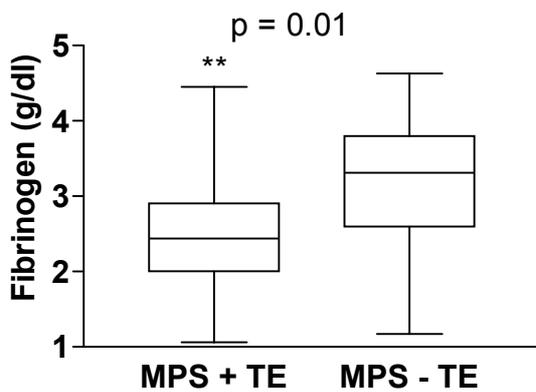


Abb. 7.1

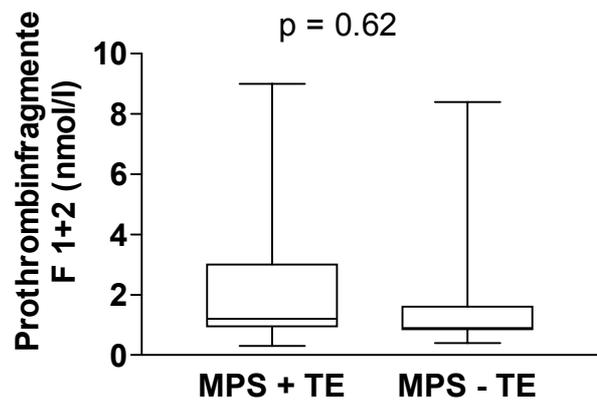


Abb. 7.2

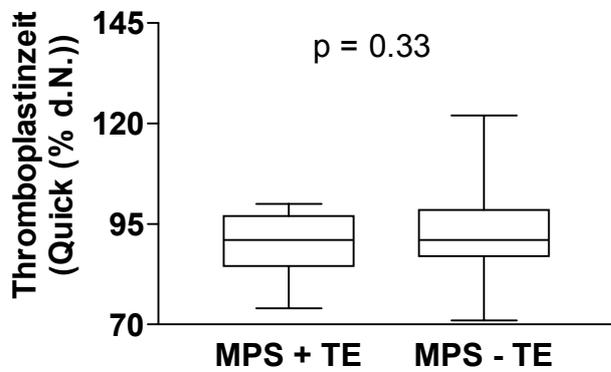


Abb. 7.3

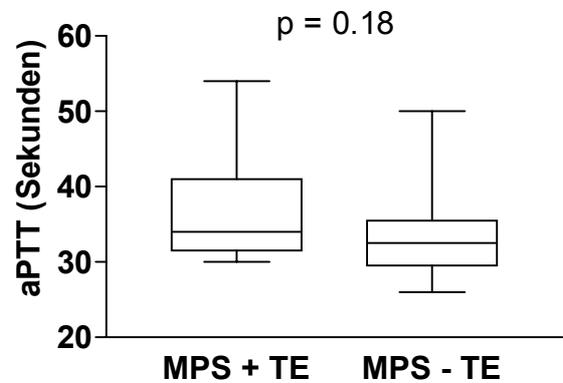


Abb. 7.4

**Abb. 7.1-7.4:** Ergebnisse der Gerinnungsanalysen (Fibrinogen, Prothrombinfragmente F 1+2, Thromboplastinzeit (Quick), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (PTT)) im Vergleich bei MPS Patienten mit (+) /ohne (-) thrombo-embolischen Ereignissen (TE). Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile ( $\square$ ). Eingezeichnet ist der Median ( $\text{—}$ ) sowie der maximale und minimale Wert (T/ $\perp$ ).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

### 3.2.8. Ergebnisse Tissue Faktor/D-Dimere

MPS Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen hatten signifikant höhere Tissue Faktor Werte ( $97.5 \pm 55.9$  pg/ml, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) als die MPS Vergleichsgruppe ( $63.3 \pm 30.9$  pg/ml) (vgl. **Abb. 8.1**).

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei den D-Dimer Werten (vgl. **Abb. 8.2**).

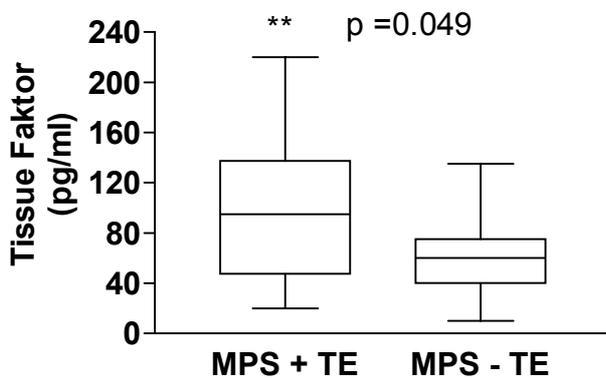


Abb. 8.1

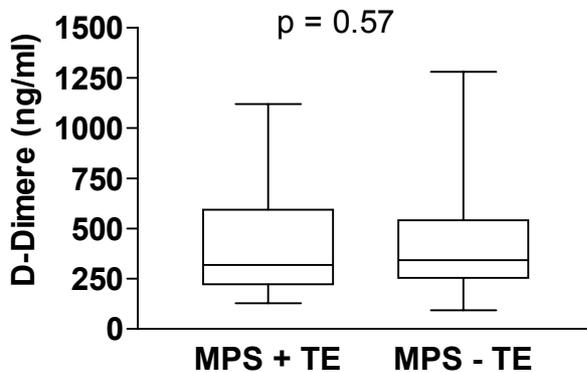


Abb. 8.2

**Abb. 8.1/8.2:** Ergebnisse Tissue Faktor/D-Dimer im Vergleich bei MPS Patienten mit (+) /ohne (-) thrombo-embolischen Ereignissen (TE). Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile ( $\square$ ). Eingezeichnet ist der Median ( $—$ ) sowie der maximale und minimale Wert (T/ $\perp$ ).

\*\* für  $p < 0.05$  im statistischen Vergleich.

### 3.2.9. Ergebnisse Thrombophiliediagnostik

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den MPS Vergleichsgruppen (Vgl. **Abb. 9.1-9.4**). Patienten mit einer Faktor V-Leiden Mutation wurden aus der Wertung für die APC Resistenz genommen. Auffallend ist der Trend zu einer erniedrigten Protein C-, Protein S-, Antithrombin-Aktivität bei MPS Patienten mit thromboembolischen Komplikationen in der Anamnese. Die Mittelwerte liegen jedoch im vorgegebenen Referenzbereich (vgl. **Abb. 9.1/9.2/9.4**).

Abb. 9.1

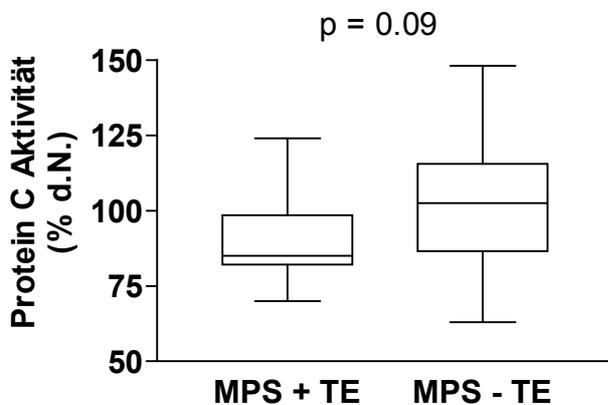


Abb. 9.2

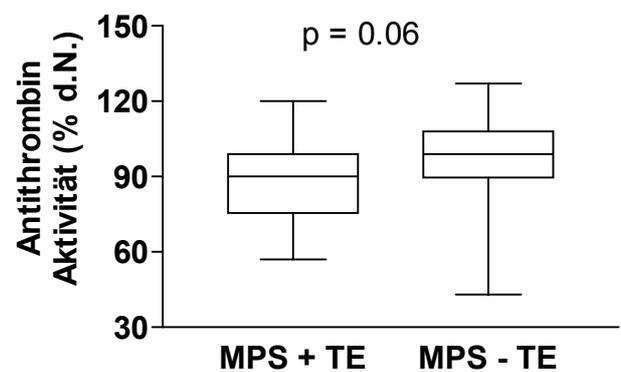
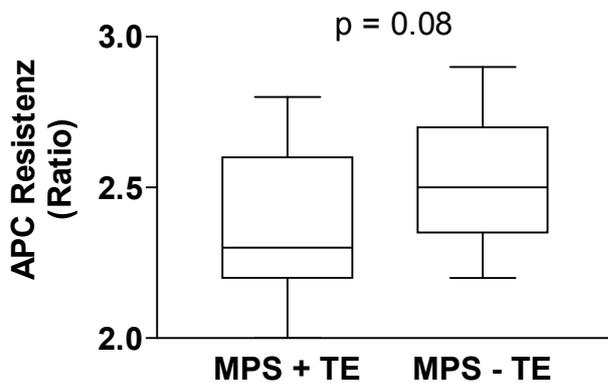
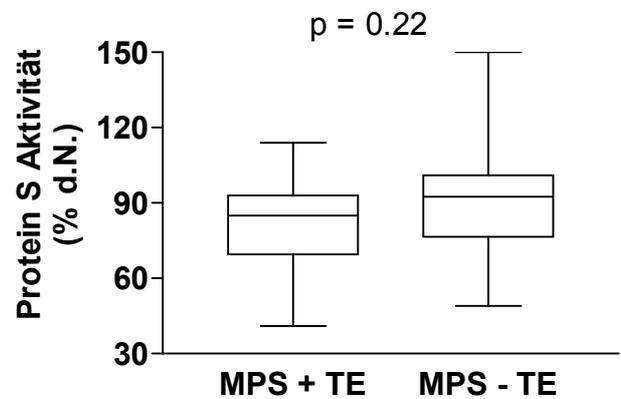


Abb. 9.3

Abb. 9.4

**Abb. 9.1-9.4:** Ergebnisse der Thrombophiliediagnostik (APC Resistenz, Protein C-, Protein S-, Antithrombin-Aktivität) im Vergleich bei MPS Patienten mit (+) /ohne (-) thromboembolischen Ereignissen (TE). Jedes Diagramm zeigt die Daten innerhalb der 25. bis zur 75. Perzentile (□). Eingezeichnet ist der Median (—) sowie der maximale und minimale Wert (T/⊥).

### 3.2.10. Ergebnisse Faktor V-Leiden Mutation

Kein MPS Patient hatte eine Faktor V-Leiden Mutation.

### 3.2.11. Ergebnisse Prothrombin Polymorphismus

Ein MPS Patient mit einem thrombo-embolischem Ereignis in der Anamnese konnte eine heterozygote Prothrombin Mutation vorweisen.

Ein MPS Patient ohne thrombo-embolischem Ereignis wies eine homozygote Mutation vor.

### 3.2.12. Ergebnisse MTHFR Polymorphismus

Fünf MPS Patienten mit einem thrombo-embolischem Ereignis (insgesamt 23 Patienten) in der Anamnese hatten eine homozygote, neun eine heterozygote Mutation (vgl. **Tab. 6**).

Fünf MPS Patienten ohne thrombo-embolischem Ereignis (insgesamt 24 Patienten) hatten eine homozygote, sieben eine heterozygote Mutation (vgl. **Tab. 6**).

	MPS + TE	MPS – TE	N
<b>Homozygote Mutation</b>	5	5	10
<b>Heterozygote Mutation</b>	9	7	16
<b>N</b>	14	12	26

**Tab. 6:** MTHFR Polymorphismus bei MPS Patienten mit/ohne thrombo-embolischem Ereignis.

### 3.3. Vergleich der MPS Patienten mit/ohne Blutungsereignissen

Von 47 MPS Patienten hatten 4 Blutungsereignisse in der Anamnese vorzuweisen (9%). 2 davon stammten aus der OMF Gruppe, 1 Patient aus der PV Untergruppe und ein weiterer aus der ET Gruppe (Beschreibung der Patienten im **Anhang unter 7.1.** zu entnehmen).

Für eine statistische Analyse war das Patientenkollektiv leider zu klein.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Hintergrund der Studie**

Patienten mit myeloproliferativen Syndromen haben ein hohes Risiko sowohl thrombo-embolische Komplikationen zu entwickeln, als auch Blutungsereignisse zu erleiden (137). In einigen Fällen erscheinen beide Komplikationen auch gleichzeitig bei einer Person (20). In dieser Studie war dies bei drei Patienten mit MPS zu beobachten.

Es wird behauptet, daß sowohl quantitative als auch qualitative Defekte der Thrombozyten verantwortlich sind für die hämostatischen Veränderungen bei MPS Patienten (85).

Es handelt sich dabei um erworbene Defekte, ausgelöst durch die MPS Erkrankung. Die genaue Ursache der Thrombozytendefekte bei Patienten mit MPS ist jedoch unklar (160).

Auch zeigt sich kein Zusammenhang zwischen aggregometrischen Funktionsstörungen und klinischen Komplikationen (11, 93, 137).

Plättchenfunktionstests scheinen deshalb wenig nützlich zu sein, um klinische Komplikationen vorherzusagen (12, 41).

In vielen Studien wurde gezeigt, daß Leukozyten eine wichtige Rolle innerhalb des Gerinnungsprozesses spielen (42, 76, 119, 165). Über eine mögliche Schlüsselfunktion der Leukozyten für die Thromboseentwicklung wird diskutiert. Aus dieser Überlegung heraus wollten wir den Zusammenhang zwischen Thrombozyten und Leukozyten genauer analysieren.

Diese Studie sollte den in vivo Aktivierungsstatus von Thrombozyten und die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion von Patienten mit myeloproliferativen Syndromen (CML, PV, OMF, ET) untersuchen, um mögliche Zusammenhänge mit thrombo-embolischen Komplikationen aufzudecken .

### **4.2. Einschätzung des Thrombose- oder Blutungsrisikos bei MPS Patienten**

Die Einschätzung des Thrombose- oder Blutungsrisikos und seine Auswirkung auf die damit verbundenen Therapieoptionen sowie auf die Überlebenszeiten werden in der Literatur unterschiedlich bewertet.

Einigkeit herrscht darüber, daß ein früheres Thromboseereignis in der Anamnese als Risikofaktor betrachtet werden kann, welcher eine entsprechende antikoagulatorische Medikation verlangt (25, 28, 39).

Eine positive Familienanamnese hinsichtlich einer Thrombose- oder Blutungskomplikation kann ein wichtiger Hinweis für Thrombozytenfunktionsdefekte sein (168).

Dagegen werden Alter, Geschlecht, Hämoglobinspiegel, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl und Thrombozytenzahl als relevante prognostische Faktoren bewertet (82). Ein signifikanter Einfluß auf die Überlebenszeit der MPS Patienten konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (5, 6, 38, 39, 152).

Murphy et al. favorisieren bei MPS Patienten mit ET und PV sowie einer Thrombose in der Anamnese eine myelosuppressive Therapie (114). Junge Patienten mit ET oder PV ohne entsprechende Anamnese brauchen wahrscheinlich keine Therapie. Im Hinblick auf die Nebenwirkungen zytoreduktiver Therapien und dem bisher nicht zweifelsfrei ausgeschlossenen Risiko der Induktion von Neoplasien ist die Entscheidung eine Nutzen/Risiko Abwägung (40, 75). Es wird diskutiert, daß eine Begrenzung der zytoreduktiven Medikation möglicherweise die Inzidenz von sekundären Leukämien senkt, auf der anderen Seite jedoch die Gefahr eine Thrombose- oder Blutungskomplikation zu erleiden erhöht wird (6). Die Therapie verlangt daher eine individuelle Handhabung, die dem jeweiligen Patienten und seinem Krankheitsbild gerecht wird.

Auch die mit großer Erwartung begonnene nicht-zytostatische Behandlung mit Interferon hat ihre Nachteile. Diese Therapieform ist teuer und nebenwirkungsreich. So kommt es häufig zu Therapieabbrüchen, weil die Patienten über Schwäche, Muskelschmerzen oder Haar- und Gewichtsverlust klagen (40). Auch diese Therapieoption scheint daher MPS Patienten nicht optimal helfen zu können.

Generell wird von einer myelosuppressiven Therapie bei jungen asymptomatischen Patienten abgeraten, wenn die Thrombozytenwerte es erlauben ( $< 1,5$  Millionen/ $\mu$ l) (39, 40).

Neben den Plättchenabnormitäten spielt auch die proliferative Aktivität der Zellen eine entscheidende Rolle. So kann die Expansion myeloider Zellreihen zu einer erhöhten Produktion prothrombotischer Zellen und Substanzen führen, welche das Thromboserisiko erheblich erhöhen (85). Einige Autoren sehen deshalb eine Thrombozytose als Risikofaktor für thrombo-embolische Komplikationen (12, 28, 30, 83, 137), welche eine zytoreduktive Therapie rechtfertigen. Andere in der Literatur veröffentlichte Studien kommen dagegen zu entgegengesetzten Meinungen. Sie finden keinen Zusammenhang zwischen erhöhten Thrombozytenwerten und klinischen Komplikationen (25, 39, 65, 75, 157).

Blutungskomplikationen, die deutlich seltener als Thrombosen auftreten, zeigen eine Abhängigkeit von hohen Thrombozytenzahlen (115, 137, 154). So werden Blutungen

signifikant häufiger beobachtet, wenn die Thrombozytenzahlen mehr als 1,5 Millionen/ $\mu$ l betragen.

Die vorliegende Studie zeigte keinen Unterschied der Thrombozytenwerte zwischen MPS Patienten mit oder ohne thrombo-embolischen Komplikationen.

Dagegen zeigt sich, daß die Hämatokrit- und Erythrozytenwerte bei Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen zwar noch im Normbereich liegen, insgesamt aber signifikant höher, als bei Patienten ohne Komplikationen. Kessler et al. beschrieben ebenfalls einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Hämatokritwert und Thrombosen (75). Randi et al. zeigten für PV Patienten, daß der Hämatokritwert aussagefähiger ist als eine isolierte Betrachtung der Thrombozytenwerte (127). Die starke Erhöhung des Hämatokritwertes, welche mit erhöhter Blutviskosität assoziiert ist, und den Thrombozyten einen intensiveren Kontakt mit dem Endothel ermöglicht, kann als eine der pathophysiologischen Ursachen der Thrombosebildung angenommen werden (137). Leider verfügten wir nicht über die technische Ausstattung zur Messung der Blutviskosität. Mit steigendem Hämatokritwert werden die Thrombozyten in die Gefäßperipherie gedrängt, wo Scherkräfte und Kontaktzeit mit der Gefäßwand deutlich höher sind als im Axialstrom. Dies unterstützt die Annahme der thrombogenen Wirkung bei erhöhter proliferativer Aktivität der myeloiden Zellreihen. Auch andere Parameter werden von manchen Autoren mit Komplikationen assoziiert (94, 157). Eine pathologische Erhöhung der Erythrozytenwerte, des Hämoglobins sowie der Neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt der Diagnose scheint mit einem verstärkten Risiko für Thrombosen einherzugehen. Für das Blutungsrisiko gelten entsprechend pathologisch erniedrigte Werte dieser Blutparameter. Dies stimmt mit Ausnahme des Hämoglobinspiegels und der Neutrophilen Granulozyten mit den Ergebnissen unserer Studie überein, sofern man berücksichtigt, daß die Erythrozytenwerte noch im vorgegebenen Referenzbereich lagen, allerdings signifikant höher bei MPS Patienten mit thrombo-embolischer Vorgeschichte im Vergleich zu den Patienten ohne entsprechende Anamnese. Diese Resultate bestätigen die Annahme, daß hohe Erythrozytenzahlen innerhalb der Hämostase die Gerinnselbildung fördern und bei einer übermäßigen Thrombozytenaktivierung die Regulationsmechanismen des Gerinnungsprozesses überlasten können (95). Beim Vergleich der Untergruppen der MPS Patienten ohne Berücksichtigung der Komplikationen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Erythrozytenzahlen, dem Hämatokritwerten sowie den Hämoglobinspiegeln. Die Festlegung eines bestimmten pathologischen Grenzwertes für Blutzellen bei MPS Patienten erscheint diskussionswürdig bei der Vielzahl von thrombozytären Abnormitäten und ihres unterschiedlichen Auftretens bei jedem einzelnen Patienten. Die erhöhte Viskosität des

Blutes dürfte daher, neben dem Proteingehalt des Blutes (insbesondere Fibrinogen) nicht nur von der absoluten Zellzahl jeder Zellreihe beeinflusst werden, sondern auch vom Funktionsstatus der einzelnen Zellen sowie deren Interaktionen untereinander. Diese gegenseitigen Wechselwirkungen der unterschiedlichen Zelllinien versucht unsere Studie genauer zu untersuchen.

Als Risikofaktoren für thrombo-embolische Komplikationen zählen für manche Autoren auch hohes Alter (>60 Jahre)(40, 137) sowie die konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Rauchen und Fettstoffwechselstörungen (137). Auch Geschlechtsunterschiede werden in der Literatur mit Komplikationen in Verbindung gebracht. So scheinen Frauen mit einer ET häufiger asymptomatisch zu bleiben, während Männer ein größeres Risiko für thrombo-embolische Komplikationen aufweisen (65). Thrombosen können auch schon im jugendlichen Lebensalter auftreten. Sie sind dann häufig das erste Symptom der Erkrankung. Gelegentlich gehen sie sogar mit normalen Thrombozytenzahlen einher (14, 149). Junges Alter wird von einigen Autoren als ungünstiger Prognosefaktor beschrieben (14, 113). Wehmeier et al. sehen im Patientenalter keinen Risikofaktor für Blutungen (157). Sie demonstrieren für jüngere Patienten (<40 Jahren) eine Häufung von Blutungsereignissen und für ältere Patienten (>70 Jahren) eine Häufung von Thromboseereignissen. Insgesamt unterscheiden sich junge Patienten aber nicht signifikant von älteren Patienten (158).

Unsere Studie kam zu gleichen Resultaten, und konnte hinsichtlich der Geschlechterverteilung und des Altersdurchschnittes keine Unterschiede zwischen den MPS Untergruppen sowie zwischen den Patienten mit oder ohne thrombo-embolischen Komplikationen feststellen.

Die MPS Untergruppen PV und die ET sind durch eine hohe Inzidenz an Thrombosen charakterisiert (39, 85, 157, 158). Bei der CML treten am seltensten Komplikationen auf (159). Unsere Studie bestätigt auch diese Ergebnisse. Die PV und ET Patienten hatten signifikant höhere pathologische Thrombozytenzahlen als die anderen MPS Untergruppen sowie die Kontrollgruppe. Dies unterstützt die Annahme, daß Thrombozytose ein Risikofaktor für ein thrombo-embolisches Ereignis darstellt (12, 28, 30, 83, 137). Beim Vergleich aller MPS Patienten mit und ohne eine Komplikation zeigte sich jedoch bezüglich der Thrombozytenwerte kein Unterschied. Diese Ergebnisse demonstrieren, daß der Subtyp der MPS Patienten wesentlich die Entwicklung von Komplikationen mitbestimmt und zur Vorhersage als Risikofaktor hinzugezogen werden kann (81, 137, 157). Michiels et al. teilen daher die Patienten mit ET entsprechend in Gruppen nach niedrigem, mittlerem und hohem

Risiko ein, um gegebenenfalls eine zytoreduktive oder niedrig dosierte Aspirintherapie einzuleiten (112).

Auch bei den Leukozytenzahlen fanden sich bei Patienten mit PV und CML signifikant höhere pathologische Werte als bei den anderen Untergruppen. Die CML Patienten hatten sogar noch um ca. ein Drittel höhere Werte als die Patienten mit PV (CML (18300/ $\mu$ l) PV (11000/ $\mu$ l)). Beim Vergleich aller MPS Patienten mit und ohne thrombo-embolischem Ereignis konnte kein Unterschied festgestellt werden. Markus et al. schreiben den Neutrophilen Granulozyten eine hemmende Funktion zu, die die Gerinnung während der Hämostase limitiert (95). Dies könnte erklären, warum die CML Patienten viel seltener als alle anderen Untergruppen thrombo-embolische Komplikationen entwickeln.

Zusammenfassend weisen die Untergruppen des MPS eine große Variabilität der klinisch-hämatologischen Befunde auf, so daß die unterschiedlichen Prognosekriterien in Erwägung gezogen werden müssen. Die widersprüchlichen Ergebnisse vieler Studien zeigen, wie schwierig es ist, eine allgemeine Einschätzung des Risikos zu erstellen.

Entscheidend ist der synergistische Effekt bei Vorhandensein von mehreren Risikofaktoren, der den prognostischen Verlauf der Krankheit bestimmt und zu einer niedrigeren Lebenserwartung führen kann (78, 143).

Das Zusammenspiel krankheitsspezifischer Abnormitäten und allgemeiner kardiovaskulärer Risikofaktoren wie z.B. Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes, Hypercholesterinämie etc. sollte bei der Entwicklung von thrombo-embolischer Komplikationen und Blutungsereignissen mitberücksichtigt werden, da sie eine abnormale Plättchenfunktion induzieren oder verstärken können (53, 85). Hierzu zählen auch viele andere Faktoren wie z.B. Schwangerschaft, Operationen, Verletzungen, Medikamente etc., die die Thrombosebildung oder das Auftreten von Blutungen begünstigen (21, 75, 78, 106). Das synergistische Wirken von speziellen Risikofaktoren, wie es bei der Kombination von Kontrazeptiva und Rauchen bekannt ist, kann eine wichtige Rolle spielen. Van Rensburg et al. zeigten, daß Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie und Arteriosklerose eine abnormale Plättchenfunktion aufweisen (150). Ursache dieser Fehlfunktion ist möglicherweise nicht die primäre Thrombozytenhyperreagibilität, sondern die sekundäre Thrombozyten Interaktion mit der verletzten arteriosklerotischen Gefäßwand. Dies demonstriert, wie schwierig die Interpretation eines präthrombotischen oder hyperkoagulierenden Status ist. Einerseits kann eine intrinsische Plättchenaktivierung vorliegen, andererseits aber auch eine Thrombozytenfehlfunktion wegen degenerativer Arteriengefäße, an deren Oberfläche sich Zellaggregate bilden können.

Betrachtet man das durchschnittlich hohe Alter der Untergruppen der MPS Patienten in dieser Studie ( CML (57 Jahre), PV (61 Jahre), OMF (76 Jahre), ET (60 Jahre)), so wird deutlich, daß neben den krankheitsspezifischen Thrombozytendefekten auch altersbedingte Ursachen wie z.B. eine ausgeprägte Arteriosklerose für den erhöhten Gerinnungsstatus verantwortlich sein können. Auch diese Faktoren müssen in die Interpretation der Ergebnisse einfließen. Gegen einen Einfluß des Patientenalters auf die Thrombozytenfunktion spricht eine Studie von Randi et al., bei der alte und junge Patienten mit Thrombozytose ähnliche Ergebnisse zeigten (127). Thrombozytenfunktionstests sind nicht in der Lage zwischen den Ursachen der Plättchendefekte zu unterscheiden, sondern analysieren nur den aktuellen Status der Thrombozyten.

Insgesamt handelt es sich bei den thrombo-embolischen Komplikationen innerhalb der myeloproliferativen Erkrankungen um einen multifaktoriellen Prozeß. Die individuelle Krankheitskonstellation darf deshalb nicht außer Acht gelassen werden.

Diese Studie konzentriert sich besonders auf den Einfluß von angeborenen und erworbenen Thrombophiliefaktoren (Ergebnisse werden im Kapitel 4.4. diskutiert).

#### **4.3. Plättchenfunktionstests (Ergebnisse PFA-100 (Platelet Function Analyzer))**

Plättchenfunktionstest scheinen wenig nützlich zu sein, um klinische Komplikationen bei MPS Patienten vorherzusagen (12, 41, 109, 137). Einige Studien mit Hilfe der Aggregometrie von thrombozytenreichem Plasma sind teilweise in der Lage, Patienten mit einem hohen Thrombose- oder Blutungsrisiko zu identifizieren (37, 93). Patienten mit einer Thrombozytenhyperreagibilität haben demnach häufig eine venöse oder arterielle Thrombose in der Anamnese vorzuweisen, welche bei Patienten mit einer Hyporeagibilität seltener auftritt. Diese Testmethode beruht auf einer Zunahme der Lichttransmission im Verlauf der voranschreitenden Plättchenaggregation nach Zusatz von Plättchenagonisten zu plättchenreichem Zitratplasma, welche photometrisch registriert wird (49).

Eine anderer Test ist der PFA-100 (Platelet Function Analyzer). Diesem Analysegerät wird eine nützliche Funktion als Screeningtest zur Untersuchung von Thrombozytenfunktionsdefekten in der klinischen Praxis zugeschrieben (44, 80). Die Messzelle dieses Gerätes simuliert den Prozeß der Thrombozytenadhäsion und -aggregation in vitro. Eine Membran, welche mit Kollagen/ADP und mit Kollagen/Epinephrin benetzt ist, führt zur Anlagerung und Aktivierung von Thrombozyten. Folge ist eine Aggregatbildung, die

zu einem Thrombozytenpfropf führt. Es kommt zur Verringerung des Blutflusses. Das Gerät ermittelt die Zeit vom Beginn bis zum vollständigen Membranverschluß.

Spannagel et al. zeigten eine hohe Sensitivität des PFA-100 für das Willebrand-Jürgens-Syndrom und Aspirin Einnahmen (143). Robinson et al. stellten bei MPS Patienten mit ET keinen Unterschied bezüglich der ADP Meßzellen Verschlußzeit zwischen Patienten und Kontrollgruppe fest (132). Bei der Epinephrin Meßzelle wurde dagegen eine signifikant verlängerte Verschlußzeit nachgewiesen.

In unserer Studie zeigten sich ähnliche Ergebnisse bei der Epinephrin Meßzelle, bei der neben den MPS Patienten mit ET auch die Patienten mit PV eine signifikant verlängerte Verschlußzeit im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufweisen konnten. Die Resultate lagen jedoch noch im vorgegebenen Referenzbereich. Beim Vergleich aller MPS Patienten wurde ebenfalls eine signifikant verlängerte Verschlußzeit bei der Gruppe mit thrombo-embolischen Komplikationen festgestellt. Die Patienten mit PV und ET machten in dieser Gruppe den größten Anteil aus. Auch bei der ADP Meßzelle zeigte sich bei allen MPS Untergruppen mit Ausnahme der CML Patienten eine signifikant verlängerte Verschlußzeit im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die allerdings noch im Rahmen des Referenzbereiches lag. Der Vergleich zwischen MPS Patienten mit und ohne Komplikationen zeigte keinen Unterschied. Diese Ergebnisse schlossen alle MPS Patienten mit ein, die eine Aspirintherapie erhielten. Diese Resultate sind auf einen möglichen Einfluß der antithrombozytären Therapie auf die PFA-100 Messung zurückzuführen. Bei den MPS Patienten, die keine Aspirinmedikation einnahmen, zeigte sich hingegen in der ET Untergruppe keine signifikant verlängerte Verschlußzeit bei der Epinephrin Meßzelle. Auch bei der ADP Meßzelle konnte nur bei PV Patienten ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Beim Vergleich zwischen MPS Patienten mit und ohne thrombo-embolische Komplikationen in der Vorgeschichte zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied der Verschlußzeiten sowohl bei der ADP- als auch bei der Epinephrin Messzelle.

Auffallend waren zahlreiche Fehlmessungen bei MPS Patienten, unabhängig davon, welche Medikation sie erhielten, oder ob es sich um ein ADP- oder Epinephrin Meßzelle handelte. Dies ist typisch für PFA-100 Ergebnisse bei Patienten mit myeloproliferativen Syndromen (132). Es zeigt sich ein große Spannweite der Verschlußzeiten. Diese Heterogenität der Ergebnisse reflektiert möglicherweise die zahlreichen unterschiedlichen Thrombozytenfunktionsveränderungen, die bei myeloproliferativen Erkrankungen auftreten können, oder ist bedingt durch den Medikamenteneinfluß auf die Blutplättchen. Abnormale PFA-100 Ergebnisse sind häufig assoziiert mit Aspirin Medikation, Thrombozytopenie,

Anämie, Herzklappenfehlern sowie Nierenversagen (44). Waddell et al. zeigten, daß einige MPS Patienten eine abnormale Aggregation auf Epinephrin, ADP und Kollagen aufweisen (154). In einer anderen Studie demonstrierten Kaywin et al., daß Epinephrin teilweise bei Patienten mit ET keine Aggregation auslöst (72). Dies könnte die zahlreichen Fehlmessungen in unserer Studie sowie die große Spannweite im Ergebnis der Verschlußzeiten erklären. Für eine Vorhersage thrombo-embolischer Komplikationen scheint daher die PFA-100 Messung im Hinblick auf die unzuverlässigen Resultate ungeeignet zu sein. Auf der anderen Seite war die Epinephrin Meßzellen Verschlußzeit bei den Patienten mit ET und PV, also der Gruppe mit der höchsten Rate an Komplikationen signifikant verlängert. Ebenso bei allen MPS Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen, was einen Zusammenhang zwischen Thromboseereignis und fehlerhafter Aggregation vermuten läßt.

Ein Erklärungsansatz für die schlechte Vorhersagbarkeit von Komplikationen durch Thrombozytenfunktionstests könnte sein, daß myeloproliferative Erkrankungen eine klonale Proliferation aller Zelllinien beinhalten, und Thrombozytenfunktionstests wie z.B. die Aggregometrie nicht die Abnormitäten anderer Zellreihen (z.B. Leukozyten) entdecken können. Auch die Interaktion zwischen den einzelnen Zellreihen kann durch Plättchenfunktionstests nicht ausreichend untersucht werden, obwohl diese eine wichtige Funktion im Pathomechanismus der Thrombose- oder Blutungsentwicklung darstellt (38). Aus diesem Blickwinkel heraus versucht unsere Studie den physiologischen Gegebenheiten in einem höheren Maße gerecht zu werden, indem das Zusammenspiel der verschiedenen Zellreihen nämlich zwischen Thrombozyten und Leukozyten genauer untersucht wird.

#### **4.4. Ergebnisse der Durchflußzytometrie/Tissue Faktor Bildung**

Die Durchflußzytometrie hat sich im Laufe der letzten zehn Jahre als nützliche Methode zur Studie von normalen und abnormalen Membranrezeptoren auf Thrombozyten erwiesen. Sie kann dadurch als Test für die Thrombozytenfunktion eingesetzt werden, analysiert aber auch deren Interaktion mit anderen Zellen (1, 2, 10, 88, 96, 106, 129).

Thrombozyten zirkulieren üblicherweise in einem nichtaktivierten Status durch das Gefäßsystem. Im Verlauf des Aktivierungsprozesses bilden die Thrombozyten Aggregate, geben Granulainhaltsstoffe frei und unterstützen die Bildung eines hämostatischen Gerinnsels. Während der Hämostase interagieren Komponenten der thrombozytären Plasmamembran mit Substanzen der Gefäßwand, mit Oberflächenrezeptoren anderer Blutzellen und mit

verschiedenen Gerinnungsproteinen. Diese Interaktion kann Thrombozyten aktivieren, was sich wiederum mit Hilfe der Durchflußzytometrie nachweisen läßt (15, 60, 92).

Mit Hilfe von kommerziell erhältlichen fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern oder Substanzen, können diese spezifischen Veränderungen der aktivierten Plättchenoberfläche charakterisiert werden (1). Dabei analysiert das Messgerät des Zytometers Einzelzellen, die in einem konstanten Fluß durch einen Laserstrahl detektiert werden (49). Das Streulicht und die Intensität der Fluoreszenz wird durch spezifische Photodioden registriert. Dadurch kann die Größe (Vorwärtsstreulicht = forward scatter), Granularität (Seitwärtsstreulicht = side scatter) und Oberflächenexpression von Antigenen nach Bindung eines fluorochrommarkierten Antikörpers bestimmt werden. Durch Verwendung verschiedener Fluorochrome mit unterschiedlichen Lichtfrequenzspektren ist es möglich, verschiedene funktionelle Veränderungen der Thrombozytenmembran gleichzeitig zu bestimmen.

So binden verschiedene fluorochrommarkierte monoklonale Antikörper spezifisch an Veränderungen der Plasmamembran, die sich aus der Expression bestimmter Rezeptoren und der Sekretion einzelner Substanzen nach Aktivierung der Thrombozyten ergeben (1). Auf diese Weise ist es möglich, aktivierte Plättchen durch deren Bindungseigenschaften von anderen Blutzellen zu unterscheiden.

Es wird zwischen drei Antikörpern unterschieden, die gegen lysosomale Granulaproteine, gegen  $\alpha$ -Granulaproteine und gegen das Glykoprotein IIb/IIIa gerichtet sind (105).

Der Antikörper PAC 1 bindet Antigene des GP IIb/IIIa Rezeptors, die nach Aktivierung zugänglich werden (46, 47, 108, 138, 139, 140). Dies geschieht durch Konversion des GP IIb/IIIa Rezeptors zu einem funktionellen Rezeptor für Fibrinogen. PAC 1 verhindert die fibrinogenvermittelte Plättchenaggregation.

S12 und KC4 sind Antikörper, die an den Rezeptor GMP-140 (PADGEM, P-Selektin, CD 62) binden (17). Das  $\alpha$ -Granula-Glykoprotein P-Selektin wird während der Sekretion an die Membranoberfläche transloziert (17, 144).

Auffällig ist auch ein elektronenmikroskopisch beobachtbarer Formwandel („Shape Change“) von der diskoiden Form nicht-aktivierter Thrombozyten (Diskozyten) zu kugeligen aktivierten Thrombozyten (49).

Zur Detektion zirkulierender aktivierter Thrombozyten ist u.a. neben dem Formwandel der Blutplättchen die Expression von fibrinogenbindenden Rezeptoren sowie die Freisetzung von Granulamembranproteinen (messbar in Form von CD62p) geeignet. Diese verschiedenen

Aktivierungsmarker gelten daher als nützliche Indikatoren eines erhöhten Gerinnungsstatus (133).

Unsere Studie hat den Formwandel („Shape Change“) der Thrombozyten nicht untersucht, weil dies den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte. Der Schwerpunkt der Studie lag in der durchflußzytometrischen Messung von Thrombozytenaktivierung, Thrombozyten-Mikropartikeln, Thrombozyten-Mikroaggregaten sowie von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten.

Mit Hilfe der durchflußzytometrischen Messtechnik können angeborene Defekte der Oberflächenmembranglykoproteine diagnostiziert werden. Auch ein Monitoring der Behandlung mit Gp IIb/IIIa Rezeptor Antagonisten ist möglich. Der wichtigste klinische Einsatz ist die Messung der Thrombozyten Hyperreagibilität sowie der zirkulierenden aktivierten Thrombozyten, die bei einer Vielzahl von Erkrankungen wie z.B. dem Myokardinfarkt oder dem Schlaganfall auftreten (108). Leider hat die Durchflußzytometrie für klinische Fragestellungen noch eine relativ geringe Rolle innerhalb der Diagnostik, so daß bisher wenig Erfahrungen speziell bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen gemacht werden konnten (2).

#### **4.4.1. Thrombozytenaktivierung (CD62p-positive Thrombozyten)**

In unserer Studie zeigten sich erhöhte Werte von CD62p-positiven Thrombozyten bei allen Untergruppen der MPS Patienten. Dies stimmt mit den bisher publizierten Ergebnissen anderer Arbeiten in der Literatur überein (23, 54, 162). Die Daten müssen allerdings vorsichtig interpretiert werden. Einige, aber nicht alle Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen weisen eine erhöhte Anzahl zirkulierender aktivierter Blutplättchen auf. Nur bei bestimmten Patienten treten dabei Thrombose- oder Blutungsereignisse auf (162). Erhöhte Expression des CD62p Rezeptors bedeutet nicht zwangsläufig, daß die entsprechenden Thrombozyten verstärkt thrombogen wirken, und ein erhöhtes Risiko für ein thromboembolischen Ereignis erwartet werden muß (78). In einer früheren Studie wiesen Patienten mit ET eine signifikant höhere P-Selektin Expression als Normalpersonen auf (54). Es konnte aber kein Unterschied zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten nachgewiesen werden.

Die erhöhte CD62p Expression auf zirkulierenden Thrombozyten könnte auch bedeuten, daß diese Plättchen einen funktionellen Defekt aufweisen, durch den sie in ihren Adhäsions- und Aggregationseigenschaften behindert werden (71). Sie sind zwar aktiviert, aber zirkulieren

weiterhin im Blutkreislauf, ohne mit anderen Plättchen Aggregate zu bilden oder an Gefäßläsionen zu binden.

Für eine erhöhte CD62p Expression kann daher nur angenommen werden, daß eine gewisse Aktivierung der Thrombozyten stattgefunden hat, und daß dies ein häufiger Vorgang bei allen Untergruppen des MPS ist.

#### **4.4.2. Thrombozyten-Mikroaggregate**

Unsere Studie zeigte keine erhöhten Werte von zirkulierenden Thrombozyten-Mikroaggregaten. In früheren Studien wurde beschrieben, daß Thrombozyten-Mikroaggregatformationen innerhalb weniger Sekunden reversibel sind (102). Es wird daher angenommen, daß Thrombozyten-Mikroaggregate entweder bei Patienten mit MPS nicht auftreten, oder daß die Aggregatbildung so schnell wieder aufgelöst wird, daß sie in venösen Blutproben nicht entdeckt werden kann.

#### **4.4.3. Thrombozyten-Mikropartikel**

Wir fanden erhöhte Werte von Thrombozyten-Mikropartikeln bei MPS Patienten mit PV, OMF und ET, nicht jedoch bei CML Patienten. Frühere Studien stufen das thrombo-embolische Risiko für CML Patienten als niedrig, für OMF Patienten als mittel und für Patienten mit PV oder ET als hoch ein (12, 161). Bei unserer Untersuchung waren Patienten mit PV und ET die MPS Untergruppen mit der höchsten Rate an thrombo-embolischen Komplikationen (PV 77%, ET 58%), während nur ein CML Patient eine venöse Thrombose in der Anamnese aufweisen konnte.

Es ist ein Trend zu erhöhten Werten von Mikropartikeln bei MPS Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen im Vergleich zu Patienten ohne entsprechende Komplikationen zu erkennen.

Bisher ist wenig bekannt über die Rolle der Thrombozyten-Mikropartikel (70). Während des Aktivierungsvorganges schnüren Blutplättchen von ihrer Membran kleine Membranvesikel (Mikropartikel) ab, die durch Bildung des Prothrombinasekomplexes auf ihrer Oberfläche eine starke prokoagulatorische Wirkung in der Umgebung des Plättchenaggregates entfalten (49, 62, 107). Sie unterstützen die Thrombin Bildung während der Entwicklung eines thrombotischen Gerinnsels (16), fördern die Adhäsion von Leukozyten an Gefäßoberflächen und verstärken die Leukozytenaggregation (43). Gemmel et al. demonstrierten zum ersten

Mal, daß Oberflächen Mikropartikelformationen induzieren können (52). Sie zeigten einen signifikanten Anstieg von aktivierten Thrombozyten, die Neutrophile Granulozyten und Monozyten binden.

Es wird spekuliert, daß Mikropartikel auch als Brücken zwischen Neutrophilen Granulozyten erscheinen können (70). Auf diese Weise bilden sich Zellcluster, die aus fünf bis zwanzig Zellen bestehen.

Die Interaktionen zwischen Leukozyten erfolgen u.a. über den L-Selektin Rezeptor (43, 104, 151). Forlow et al. zeigten, daß eine Blockade dieses Rezeptors eine Aggregation von Neutrophilen Granulozyten nicht hemmt (43). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß Mikropartikel eine besondere Rolle als zusätzliches Bindeglied zwischen den Leukozyten spielen.

Erhöhte Werte von Thrombozyten-Mikropartikeln scheinen am thrombo-embolischen Gefäßverschluß zahlreicher klinischer Erscheinungsbilder beteiligt zu sein (26, 63, 68). Normale Konzentrationen haben keinen Einfluß auf die Leukozyten Interaktionen (43). So weisen Patienten mit thrombo-embolischen Erkrankungen wie transitorisch ischämischen Attacken (TIA) und lakunären Infarkten signifikant höhere Werte von Mikropartikeln vor (87). Es ist daher denkbar, daß erhöhte Werte von Thrombozyten-Mikropartikeln verantwortlich sind für das höhere thrombo-embolische Risiko bei Patienten mit MPS. Auch bei gesunden Probanden wurden niedrige Mengen von Mikropartikeln in der Blutzirkulation festgestellt (16). Der größte Teil stammt von den Thrombozyten. Es sind jedoch auch andere Zelltypen wie Endothelzellen oder Leukozyten an der Bildung von Mikropartikeln beteiligt, welche durch entsprechende Antikörper detektiert werden können (64).

Für die Vorhersage einer Thrombose- oder Blutungskomplikation bei MPS Patienten könnte daher die Anzahl der Mikropartikel einen interessanten Hinweis geben. Erhöhte Werte über den Normbereich könnten als Risikofaktor für eine mögliche Thromboseentwicklung sprechen (63).

#### **4.4.4. Thrombozyten-Leukozyten Interaktion**

MPS Patienten haben Thrombozyten mit einer erhöhten CD62p Expression, welche die Adhäsion von Blutplättchen an Leukozyten vermittelt (31, 107, 117). In unserer Studie fanden wir eine erhöhte Anzahl von Thrombozyten-Neutrophilen Aggregaten sowie von Thrombozyten-Monozyten Aggregaten bei Patienten mit PV und ET. Diese beiden

Untergruppen des MPS hatten auch die höchste Rate an thrombo-embolischen Ereignissen. Unsere Ergebnisse stimmen mit einer von Jensen et al. in der Literatur bereits veröffentlichten Studie überein (66). Deren Forschungsgruppe findet ebenfalls erhöhte Thrombozyten-Monozyten Aggregate sowie Thrombozyten-Neutrophile Aggregate bei allen Patienten der verschiedenen MPS Untergruppen. Die Werte unterschieden sich nicht zwischen Patienten mit ET, PV oder OMF. Im Vergleich zu unserer Studie hatten die MPS Patienten allerdings höhere Werte. Ebenso zeigten sich in unserer Studie keine höheren Werte bei allen MPS Patienten mit thrombo-embolischen Ereignissen in der Anamnese im Vergleich zu den Patienten ohne Komplikationen. Dies konnten Jensen et al. bei ihrer MPS Gruppe demonstrieren. Im Vergleich zu den MPS Patienten ohne Thrombosen in der Vorgeschichte zeigte die Gruppe mit einer positiven Anamnese deutlich höhere Werte an Thrombozyten-Neutrophilen- und Thrombozyten-Monozyten Aggregaten. Die möglichen Ursachen dieser unterschiedlichen Resultate werden unter 4.6. diskutiert.

Erhöhte Werte von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten werden als Indikator für in vitro Aktivierung angesehen und bei Patienten mit Sepsis sowie bei der koronaren Herzkrankheit gefunden (50, 52, 121). Michelson et al. sehen erhöhte Thrombozyten-Monozyten Aggregate sowie Thrombozyten-Neutrophile Aggregate als sensitiveren Marker für Plättchenaktivierung an als P-Selektin (107). Die Ergebnisse dieser Studie sollten in ähnlicher Weise interpretiert werden. D.h., daß Thrombozyten-Leukozyten Aggregate auf einen hämostatischen Aktivierungsprozeß bei MPS Patienten hinweisen.

Thrombozyten tragen zahlreiche Membranrezeptoren, die nur zu bestimmten Phasen der Thrombozytenaktivierung aktiviert werden oder die nur mit bestimmten Zellen oder chemischen Metaboliten interagieren (69, 104, 122, 151). So existieren Rezeptoren auf der Oberfläche für Thrombin, Thromboxan A<sub>2</sub>, Kollagen, ADP oder Fibrinogen.

P-Selektin (CD62p) ist einer dieser Membranrezeptoren auf Blutplättchen. Es vermittelt den Kontakt zwischen aktivierten Thrombozyten und Leukozyten (31, 86, 91, 123, 130, 141).

Endothelzellen enthalten in den Weibel-Palade-Körperchen ebenfalls CD62p, das wahrscheinlich in ähnlicher Weise eine Bindung von Leukozyten an Endothel vermitteln kann (12, 56, 141). Die Neutrophilen Granulozyten binden jedoch vorzugsweise an Thrombozyten (79). Die Adhäsion an verschiedene Zellpopulationen verstärkt sich unter hohen Scherkräften umso intensiver (79). Dies kann auftreten bei hoher Viskosität des Blutes sowie bei Gefäßverengungen durch Arteriosklerose oder durch Appositionsthrombenbildung. Die Ursache eines vaskulären Verschlusses kann direkt von einem Endothelschaden ausgehen, bei dem Kollagen freigelegt wurde und als potenter Plättchenagonist fungiert (122). Sie kann

auch durch chemotaktische Stoffe unterschiedlicher Zellen induziert werden (24). Durch Aktivierung von Signalkaskaden werden vermehrt Granula Inhaltstoffe ausgeschüttet (122). Dadurch werden zahlreiche Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert, die zur Aggregation unter den Blutplättchen führen aber auch die Interaktion zu anderen Zellreihen vermitteln. So zeigen Deuel et al., daß PDGF (Platelet Derived Growth Faktor) chemotaktisch auf Neutrophile Granulozyten und Monozyten wirkt (33). Es könnte eine Erklärung dafür sein, daß aktivierte Blutplättchen nur sehr schwach an Lymphozyten (69, 129, 130) und bevorzugt an Monozyten binden (130, 131). Dies würde auch mit den in unserer Studie gefundenen Ergebnissen übereinstimmen. In einer anderen Publikation zeigten Kirchhofer et al. in einem Modell einer Gefäßverletzung, daß T- und B-Lymphozyten nicht an der Bildung des Gerinnungsthrombus beteiligt sind, während Monozyten verstärkt vorgefunden werden (77). Lymphozyten scheinen nicht an der Thrombosebildung zu partizipieren. Monozyten dagegen wird über die Tissue Faktor Bildung eine prokoagulatorische Funktion zugeschrieben (77).

P-Selektin, das als integrales Membranprotein nach Zellaktivierung durch Translokation an die Oberfläche der Plasmazellmembran gelangt (56), hat Ähnlichkeit mit zwei Adhäsionsmolekülen der Leukozyten (ELAM-1 (Endothel-leukocyte-adhesion-molecule = E-Selektin) und Lymphocyte-homing-receptor (L-Selektin)). Dabei triggert P-Selektin die Protein-Tyrosin-Phosphorylation und löst eine Signalkaskade in den Neutrophilen Granulozyten aus. Neutrophile Zytotoxizität, Lysozymproduktion und Arachidonsäuremetabolismus sind in Anwesenheit von Thrombozyten erhöht (117). Die Folge davon ist ein Aktivierungsstatus, in dem zahlreiche Sekretionsprodukte wie inflammatorische Leukotriene oder proteolytische lysosomale Enzyme ausgeschüttet werden (48). Diese können direkt vaskuläre Schäden verursachen, oder ihrerseits den Aktivierungsstatus von Blutplättchen, anderen Leukozyten sowie von Endothelzellen beeinflussen. Neutrophile Granulozyten, die keine Thrombozyten gebunden haben, zeigen eine signifikant niedrigere Phagozytose Aktivität (91). Die aktivierten Thrombozyten ermöglichen über die Bindung spezieller Integrine die Migration der Leukozyten entlang der Endothelzellen, was den Entzündungsvorgang des Blutgefäßes aufrecht erhält (48). Die verstärkten Zellkontakte führen zu einer höheren lokalen Konzentration an freigesetzten Mediatoren und verhindern möglicherweise dadurch eine Neutralisation durch Plasma-Inhibitoren (117). Dieses Ungleichgewicht kann einem erhöhten Gerinnungsstatus Vorschub leisten.

Hier sind unterschiedliche Erklärungsansätze für die erhöhte Gefahr von Thrombosen, Ischämien, Atherosklerosebildung sowie Gefäßschäden speziell bei MPS Patienten aufgeführt. Dabei handelt es sich bei der Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten nicht um eine für MPS Patienten spezifische Beobachtung. Zirkulierende Neutrophile Granulozyten sind zu einem geringen Prozentsatz auch bei Normalpersonen mit Thrombozyten verbunden (125). Diese Interaktion wurde in unserer Studie aber nicht untersucht. Die Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion findet auch über andere Rezeptoren statt. Neben P-Selektin sind Corezeptoren wie GP IIb/IIIa (CD41) beteiligt (142). Aktivierte Neutrophile Granulozyten können die Thrombozytenaktivierung induzieren (48). Sekretionsprodukte wie die Protease Kathepsin G sind potente Plättchenagonisten und modifizieren die thrombozytären Oberflächenglykoproteine. Der Rezeptor GP IIb/IIIa wird daraufhin vermehrt exprimiert, welcher wiederum über Fibrinogen, Bindungen mit den  $\beta$ -2 Integrinen CD 11b/CD18 auf Leukozyten eingehen kann (35, 36, 121, 134, 135, 141). Diese Interaktionen beider Zellreihen während der Hämostase/Inflammation könnten sich gegenseitig verstärken, so daß eine Rekrutierung neuer Blutplättchen und Leukozyten aufrechterhalten wird (50). Neutrophile Granulozyten mit einem Mangel an CD11b/CD18 sind schlechter in der Lage, an aktivierte Thrombozyten zu binden (35). Auch Yeo et al. zeigten anhand eines Modells, daß verletzte Gefäße zur Leukozytenaktivierung führen, die wiederum über CD11b/CD18 an Thrombozyten binden (165). Dabei verändern Scherbedingungen die Bindungseigenschaften der Neutrophilen Granulozyten sowie der Thrombozyten. Intensivere Scherkräfte führen zu einem erhöhten Aktivierungsstatus. Sie unterstützen damit die Hypothese, daß die Aktivierung der Zellen durch Kontakt oder durch Oberflächenbindung von Zytokinen bedingt ist.

Diese Ergebnisse demonstrieren den Einfluß unterschiedlicher Faktoren auf die Ausbildung der Rezeptorstrukturen von Thrombozyten. Deren große Variation bestimmt die Bindungseigenschaften, und zeigt die Komplexität der Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellreihen. Hier wird deutlich, wie wichtig eine Miteinbeziehung anderer Zelllinien und chemischer Metaboliten als Einflußfaktoren für das Modell der Hämostase/Inflammation ist.

#### **4.4.5. Tissue Faktor**

Der genaue Mechanismus der Thrombozyten-Leukozyten Interaktion im Hinblick auf den Gerinnungsprozeß ist bisher unklar. Derzeitige Studien nehmen an, daß die Interaktion von

Blutplättchen und Leukozyten an der Tissue Faktor Bildung sowie an der Aktivierung des extrinsischen Gerinnungswegs beteiligt sind (67, 77, 105, 128, 167).

Der Tissue Faktor ist ein membrangebundenes Protein, das spezifische Phospholipide für seine Funktion benötigt (118). Es ist sowohl Rezeptor, als auch Cofaktor für die Gerinnungsfaktoren VII und VIIa. Dieser Komplex aus Tissue Faktor und Gerinnungsfaktoren aktiviert nun wiederum Faktor IX und X und führt zur Thrombingenerierung sowie zur Fibrinbildung (118). Als potenter Initiator der Blutkoagulation wird dem Tissue Faktor daher eine wichtige Funktion innerhalb der Hämostase und der Thrombosepathogenese zugeschrieben.

Neutrophile Granulozyten sowie Monozyten transferieren den Tissue Faktor auf Blutplättchen und triggern dadurch die Thrombosebildung (128). Zillmann et al. zeigen, daß Thrombozyten ihrerseits Tissue Faktor Protein enthalten, welches nach Aktivierung der Plättchen exprimiert wird (167). Durch Stimulierung mit Kollagen wird Tissue Faktor auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert, welche zusätzlich an Leukozyten gebunden sind. Dabei konnte kein Tissue Faktor Antigen in Neutrophilen Granulozyten und Monozyten gefunden werden. Die direkte Interaktion zwischen Neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie Thrombozyten scheint deshalb notwendig, um die plättchenabhängige Tissue Faktor Präsentation zu aktivieren, welche zum Start der Gerinnungskaskade führt. Jones et al. zeigen bei Patienten mit Arteriosklerose signifikant erhöhte Werte von Thrombozyten-Leukozytenaggregaten sowie eine verstärkte Expression des Tissue Faktors sowohl auf Thrombozyten-Monozyten-, Thrombozyten-Neutrophilen Aggregaten als auch auf aggregatfreien Monozyten (67). Ähnliche Resultate wurden bei Patienten mit instabiler Angina Pectoris gefunden (89).

Diese Ergebnisse lassen auch auf ein erhöhtes prothrombotisches Potential bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen schließen.

In unserer Studie konnten allerdings keine erhöhten Werte von Tissue Faktor bei den Untergruppen des MPS nachgewiesen werden. Auch beim Vergleich von Patienten mit und ohne thrombo-embolischen Komplikationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

#### **4.5. Gerinnungsanalysen/Thrombophiliediagnostik/D-Dimer**

Neben den in 4.2. bereits geschilderten Risikofaktoren werden auch einigen anderen klinischen Zuständen ein erhöhtes Risiko zugeschrieben, die Pathogenese der Thrombosebildung zu fördern (116, 168). Dazu zählen neben dem Antithrombin-, Protein C-,

Protein S-Mangel auch verschiedene Mutationen ( Faktor V-Leiden Mutation, Prothrombin Polymorphismus, MTHFR Polymorphismus, APC-Resistenz )(168).

Die Erstmanifestation eines thrombo-embolischen Ereignisses erscheint meistens im Zusammenhang mit einem Risikofaktor wie Schwangerschaft, Trauma oder Immobilisation. Dem Gerinnungssystem steht ein Inhibitorsystem gegenüber, das eine Sicherung gegen den unkontrollierten Ablauf der Gerinnung darstellt. So ist Antithrombin der plasmatische Inhibitor von Thrombin und aktiviertem Faktor X, und inaktiviert diese Faktoren irreversibel (58). Erworbene Mängel treten häufig infolge eines Verbrauchs nach großen Operationen oder infolge disseminierter intravaskulärer Gerinnung (DIC) bei Sepsis auf.

Protein C ist zusammen mit dem Cofaktor Protein S ein potenter Inaktivator von den Gerinnungsfaktoren Va sowie VIIIa (73, 155). Ihnen wird eine antikoagulatorische Funktion zugeschrieben, die die Ausbildung eines Gerinnungsthrombus verhindern kann. Beides sind Vitamin K-abhängige Plasmaproteine. Ursachen für eine verminderte Aktivität sind hereditärer Mangel, Leberschäden, orale Antikoagulation, Schwangerschaft, orale Kontrazeptiva, Vitamin K-Mangel oder Östrogentherapien.

#### **4.5.1. Protein C-, Protein S-, Antithrombin-Aktivität**

Unsere Studie zeigte bei der Protein C-, Protein S- sowie bei der Antithrombin-Aktivität keinen Unterschied zwischen den MPS Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen und den Patienten ohne entsprechende Ereignisse in der Anamnese.

Auch beim Vergleich der einzelnen Untergruppen miteinander zeigte sich mit Ausnahme der Protein S-Aktivität keine Differenz bei diesen Thrombophilie markern. Dagegen hatten Patienten mit PV und OMF eine signifikant niedrigere Protein S-Aktivität im Vergleich zu den anderen Untergruppen und der Kontrollgruppe (Marcumarpatienten wurden aus der Analyse ausgeschlossen). Diese Resultate könnten auf eine stärkere Thromboseneigung bei bestimmten Untergruppen des MPS hindeuten, da Patienten mit PV auch die höchste Rate an thrombo-embolischen Komplikationen hatten. Ein Mangel an Protein S könnte als wichtiger Einflußfaktor in Kombination mit anderen Risikofaktoren eine erhöhte Thromboseneigung bei dieser Patientengruppe fördern. Unsere Studie faßte alle MPS Patienten mit thrombo-embolischen Ereignissen zusammen, weil eine separate Analyse in jeder Untergruppe wegen der niedrigen Zahl betroffener Patienten hier nicht möglich war. Das könnte eine Erklärung dafür sein, daß wir dort keine Hinweise auf einen Mangel an Protein S fanden. Auffallend war jedoch eine Tendenz zu einer erniedrigten Aktivität sowohl von Protein C, Protein S als auch

von Antithrombin im Vergleich zu den übrigen MPS Patienten ohne Komplikationen in der Vorgeschichte. Es sollten weitere Studien diese Vermutung anhand von größeren Patientenkollektiven überprüfen.

#### **4.5.2. Faktor V-Leiden Mutation/Prothrombin Polymorphismus**

Die Faktor V-Leiden Mutation sowie der Prothrombin Polymorphismus gelten als häufige angeborene Risikofaktoren für venöse thrombo-embolische Ereignisse (3).

Beim Faktor V-Leiden handelt es sich um eine Punktmutation an Position 1691 des Faktor-V-Gens, welche in einem Aminosäureaustausch von Arginin nach Glutamin an Position 506 des korrespondierenden Proteins resultiert (18). Da die durch diese Mutation veränderte Aminosäure in der Bindungsregion des aktivierten Protein C (APC) liegt, kann die Faktor V-Leiden Mutante nur noch unzureichend von APC gespalten und damit inaktiviert werden. Das physiologische Gleichgewicht ist somit in Richtung Thrombophilie verschoben. Man unterscheidet homozygote und heterozygote Formen, wobei die homozygote Form mit sehr hohem Thromboserisiko behaftet ist. Die heterozygote Form wird in der gesunden Bevölkerung zu ca. 5% angetroffen (74).

Die Prothrombin-Mutation G20210A ist charakterisiert durch einen Austausch von Guanin (G) nach Adenin (A) in der nichttranslatierten, regulatorischen Region des Prothrombin-Gens auf Chromosom II, was in einer erhöhten Prothrombinkonzentration im Plasma resultiert (126). Bei der Umwandlung des inaktiven Fibrinogens in das aktive Fibrin, also dem letzten Schritt der Gerinnungskaskade, wird durch die Serinprotease Thrombin katalysiert, welches wiederum unter der Einwirkung von der Faktoren Xa, V, Phospholipiden und Calciumionen aus seiner Vorstufe, dem inaktiven Prothrombin (Faktor II) hervorgeht. Erhöhte Prothrombinkonzentrationen führen daher über eine verstärkte Thrombin- sowie Fibrinbildung zu einem erhöhtem Gerinnungsstatus bei Patienten mit entsprechendem hereditären Defekt.

Adamczuk et al. schreiben Patienten mit diesen beiden Mutationen ein drei bis fünffach erhöhtes Risiko zu, eine Thrombose zu entwickeln (3). Hessner et al. fanden dagegen keinen Zusammenhang zwischen Thromboseentwicklung und Trägern einer einzelnen Faktor V-Leiden Mutation, bzw. einer Prothrombin-Mutation (59). Auch Lindmarker et al. demonstrierten für heterozygote Faktor-V-Leiden Träger kein erhöhtes Risiko wiederholt eine tiefe Venenthrombose zu erleiden (90). Homozygote Träger wiesen dagegen ein höheres Risiko auf. Die gleichen Ergebnisse wurden für Träger einer heterozygoten Prothrombin-

Mutation gefunden. Homozygote Patienten dieser Mutation wurden in der Studie nicht gefunden. Eine andere retrospektive Studie von Patienten, die erstmalig eine tiefe Venenthrombose entwickelten zeigte, daß Patienten die beide Mutationen aufwiesen, auch ein doppelt so hohes Risiko einer wiederholten Thrombose hatten, im Vergleich zu jenen, die Träger nur einer Mutation waren (32). Eine spontane Entwicklung dieser Thrombose erhöhte das Risiko bei Patienten mit beiden Mutationen um ein Vielfaches verglichen mit Patienten, die eine sekundäre Thrombose (Schwangerschaft, Hormontherapie, Operation, Immobilisation) als Erstmanifestation erlitten hatten.

Diese Ergebnisse unterstützen die unter 4.2. bereits diskutierten Zusammenhänge von Risikofaktoren und Thromboseentwicklung. Sie zeigen auf, wie wichtig eine umfassende Anamnese bei Risikopatienten im Hinblick auf eine notwendige lebenslange antikoagulatorische Medikation ist.

Bisher gibt es nur sehr wenige Studien bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen, die den Einfluß dieser Thrombophiliefaktoren untersuchen.

Dicato et al. fanden in einer Studie über MPS Patienten mit ET keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Auftretens von Faktor V-Leiden Mutation bzw. der Prothrombin-Mutation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (34). Diese Resultate sprechen gegen die Annahme von besonders hervorzuhebenden Risikofaktoren für thrombo-embolische Ereignisse bei MPS Patienten. Unsere Studie bestätigt diese Vermutung. Insgesamt hatte nur einer der MPS Patienten eine heterozygote Faktor V-Leiden Mutation. Dieser Patient mit ET konnte jedoch eine Thrombose in der Anamnese vorweisen. Zwei MPS Patienten hatten eine Prothrombin-Mutation, von denen nur der CML Patient mit einer heterozygoten Mutation eine thrombo-embolische Komplikation erlitten hatte. Der andere MPS Patient mit einer OMF hatte eine homozygote Mutation, bisher aber noch keine Komplikation entwickelt. Allerdings ist die Anzahl der Patienten zu gering, um wirklich relevante statistische Aussagen machen zu können. Auch hier sollten größere Patientenkollektive hinzugezogen werden, um diese Vermutung zu prüfen.

#### **4.5.3. APC-Resistenz**

Die APC-Resistenz wird als zusätzlicher Risikofaktor für thrombo-embolische Ereignisse bei MPS Patienten mit PV angesehen (84). Mehr als 90% aller Fälle von APC-Resistenz sind durch eine Mutation im Faktor V Gen erklärbar (145). Es gibt aber auch Patienten mit APC-Resistenz, die keine Faktor V-Leiden Mutation vorweisen können. Deshalb haben wir eine

separate Analyse für diesen Thrombophilie marker durchgeführt. Wie oben bereits geschildert, führt die Faktor V-Leiden Mutation zu einer Aminosäuresubstitution im Faktor V Protein, genau an der Stelle, die durch aktiviertes Protein C gespalten wird. Durch diese Änderung in der Aminosäuresequenz wird die Spaltung und Inaktivierung des Faktor Va durch APC gehemmt. Taube et al. zeigten, daß Thrombozytenaktivierung mit Thrombin eine APC-Resistenz induzieren kann (147). Gleiche Ergebnisse zeigen sich durch Hinzugabe von Mikropartikeln. Dadurch könnte die wichtige antikoagulatorische Funktion des Protein C bei einem Endothelschaden herabgesetzt werden, was wiederum das Thromboserisiko fördern würde. Dies unterstützt die unter 4.4.3. diskutierte Annahme, daß Mikropartikel für die Pathogenese der Thromboseentwicklung eine prokoagulatorische Funktion haben. Unsere Studie konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen APC-Resistenz und erhöhter Thromboseneigung feststellen. MPS Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen in der Anamnese unterschieden sich nicht in der APC Ratio von den übrigen Patienten. Auch zwischen den Untergruppen und der Kontrollgruppe wurde keine Differenz beobachtet. Bei MPS Patienten ohne Faktor V-Leiden Mutation konnten auch keine APC-Resistenz vorweisen.

#### **4.5.4. MTHFR Polymorphismus**

Der C677T-Genotyp (MTHFR Polymorphismus), bzw. der sich daraus ergebende hohe Homocysteinspiegel im Plasma wird heute ebenfalls als unterstützender Risikofaktor u.a. für venöse Thrombosen, Schlaganfälle und koronare Herzerkrankungen angesehen (7, 8). Die Aminosäure Methionin ist als Baustein der Proteinbiosynthese sowie in aktivierter Form (S-Adenosylmethionin) als Methylgruppendonator zahlreicher Stoffwechselforgänge für den Körper von essentieller Bedeutung. Unmittelbaren Einfluß auf den Methioninspiegel hat das Enzym Methyltetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR), das die Umwandlung von N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-Methyltetrahydrofolat (N<sup>5</sup>N<sup>10</sup>-MTHF) zu N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat (N<sup>5</sup>-MTHF) katalysiert und somit den Methylgruppenüberträger für die Methionin-Synthese aus Homocystein zur Verfügung stellt (8). Bei einem Teil der Bevölkerung weist dieses Enzym eine um bis zu 50% verringerte Aktivität auf.

Eine häufige Folge dieser Funktionsstörung ist eine erhöhte Konzentration des Intermediärproduktes Homocystein im Organismus, da nicht genügend N<sup>5</sup>-MTHF zur Methionin-Synthese gebildet wird. Hyperhomocysteinämie führt neben der Endothelschädigung auch zu erhöhter Aktivität von den Gerinnungsfaktoren XIIa sowie Va

und zu herabgesetzter Aktivität von Protein C, Thrombomodulin sowie von Tissue Faktor (163). Es wird daher mit einem erhöhtem Risiko für periphere-, cerebrovaskuläre- sowie koronare Gefäßerkrankungen assoziiert. Venöse thrombo-embolische Erkrankungen können bereits mit einer milden Hyperhomocysteinämie einhergehen, vor allem wenn sie mit anderen Risikofaktoren kombiniert auftritt (163).

Einige Autoren konnten dagegen keinen Zusammenhang von MTHFR Polymorphismus und Thromboseereignissen demonstrieren. Sie stellen keinen Unterschied in der Prävalenz von MTHFR Polymorphismus beim Vergleich von Thrombosepatienten und Kontrollgruppe fest (59, 168). In unserer Studie zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Auffallend ist ein sehr heterogenes Auftreten dieser Mutation sowohl bei MPS Patienten mit oder ohne thrombo-embolischen Komplikationen. Im Vergleich zu der Inzidenz von MTHFR Polymorphismus in der Normalbevölkerung (11-15%) sehen wir bei unserem Patientenkollektiv mehr als das Doppelte an Mutationen. Möglicherweise gibt es eine Verbindung zwischen MTHFR Polymorphismus und dem Auftreten von myeloproliferativen Erkrankungen (57). Eine Zusammenhang zwischen Trägern eines MTHFR Polymorphismus und einer erhöhten Thromboseneigung konnte jedoch nicht abgeleitet werden. Auch bei den gesunden Probanden in unserer Kontrollgruppe konnte bei ca. einem Drittel eine entsprechende Mutation vorgefunden werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß nur in einer speziellen Risikokonstellation eine erhöhte Thromboseneigung bei Patienten mit dieser Form von genetischem Defekt anzunehmen ist.

#### **4.5.5. Thromboplastinzeit (Quick)/aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)/Fibrinogen**

Die konventionelle Gerinnungsdiagnostik umfaßt Globaltests wie die Thromboplastinzeit (Quick), die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) sowie die Bestimmung von Fibrinogen im Plasma (74).

Der Quicktest dient zur Bestimmung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, V, VII und X. Es ist ein Screening-Test auf Gerinnungsstörungen im Bereich des exogenen Systems. Es können genetisch bedingte oder erworbene Mängel an Gerinnungsfaktoren erfaßt werden. Daneben kann eine orale Antikoagulantientherapie eingestellt und kontrolliert, sowie die hepatische Syntheseleistung überprüft werden.

Die Bestimmung der aPTT dient als Suchtest für Gerinnungsstörungen des endogenen Systems. Sie erfaßt die Faktoren VIII und IX sowie die Kontaktfaktoren. Der Test ist geeignet

zur Bestimmung von Einzelfaktoren, zur Diagnose einer Hämophilie sowie zur Überwachung einer Heparintherapie.

Die Bestimmung von Fibrinogen im Plasma erlaubt eine Suche nach erworbenen oder angeborenen Hypo- oder Afibrinogenämien sowie von erhöhten Fibrinogenspiegeln. Mangelzustände treten besonders infolge intravaskulärer Proteolyse von Fibrinogen durch Thrombin oder Plasmin (z.B. bei Verbrauchskoagulopathien oder Streptokinasetherapie) auf. Erhöhte Fibrinogenämien werden infolge des Verhaltens von Fibrinogen als „Akute-Phase-Protein“ gefunden. Vorübergehende Hyperfibrinogenämien können nach Operationen, Traumen, Herzinfarkten oder Infektionen auftreten. Länger bestehende erhöhte Spiegel finden sich bei Neoplasien und chronisch entzündlichen Erkrankungen.

Bisherige Studien bei MPS Patienten zeigten eine teilweise verlängerte Thromboplastinzeit sowie aPTT. Auch der Fibrinogenspiegel war bei einigen Patienten erhöht, lag aber auch bei vielen im Normalbereich (146).

Unsere Studie konnte keinen Unterschied zwischen den MPS Untergruppen hinsichtlich Thromboplastinzeit oder aPTT nachweisen. Auch beim Vergleich der MPS Patienten mit und ohne thrombo-embolischen Komplikationen konnte kein Unterschied zwischen beiden Personengruppen festgestellt werden. Die Globaltests der konventionellen Gerinnungsdiagnostik scheinen daher ungeeignet im Hinblick auf die Erfassung von Gerinnungsstörungen zur Vorhersage von thrombotischen Ereignissen bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen. Beim Fibrinogenspiegel zeigten sich dagegen signifikant höhere Werte bei CML Patienten. Auffällig ist auch ein signifikant niedrigerer Spiegel bei den MPS Patienten mit thrombo-embolischen Ereignissen in der Anamnese. Eine möglich Ursache dafür könnte die antikoagulatorische Therapie darstellen (Marcumarpatienten wurden aus der Analyse ausgeschlossen).

#### **4.5.6. Prothrombinfragment F 1+2/D-Dimer**

Die Umwandlung von Prothrombin zum aktiven Thrombin unter Bildung von Fragmenten stellt ein zentrales Ereignis im Ablauf der Gerinnungskaskade dar. Der Nachweis von Prothrombinfragment F 1+2 kann damit als direktes Maß für die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin angesehen werden. Der Nachweis vermehrter Fragmente zeigt hyperkoagulatorische Zustände an (148).

D-Dimer dagegen entsteht bei der fibrinolytischen Auflösung von quervernetztem Fibrin. Erhöhte Werte sind u.a. nachweisbar bei Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose oder Lungenembolie (74).

Falanga et al. demonstrierten für MPS Patienten mit ET signifikant höhere Plasmawerte von D-Dimer und Prothrombinfragment F 1+2 (38). Sie stellten jedoch keinen Zusammenhang zu thrombo-embolischen Komplikationen in der Anamnese her. Unsere Studie kommt zu gleichen Ergebnissen. Neben den ET Patienten hatten auch die anderen MPS Untergruppen mit Ausnahme der OMF Patienten signifikant höhere Plasmawerte von Prothrombinfragment F 1+2. Bei den D-Dimer Werten zeigte sich dagegen auch bei den OMF Patienten ein signifikanter Unterschied, während sich die PV Patienten nicht von der Kontrollgruppe unterschieden. Auch in unserer Untersuchung konnte kein Zusammenhang zu thrombo-embolischen Komplikationen in der Vorgeschichte der einzelnen MPS Patienten hergestellt werden. Zusammenfassend weisen die Resultate zwar auf einen erhöhten Gerinnungsstatus bei den verschiedenen MPS Untergruppen hin. Eine Vorhersage für eine mögliche Thromboseentwicklung kann dagegen nicht abgeleitet werden. Vielleicht auch deshalb, weil weniger die Fibrinbildung als die Thrombozytenaktivierung eine Rolle spielt.

#### **4.6. Aussichten zukünftiger Therapiestrategien**

Derzeit werden Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen individuell je nach Risikofaktorenkonstellation mit Interferon, antikoagulatorischen (Aspirin etc.) oder zytoreduktiven (Hydroxyurea etc.) Medikamenten behandelt (siehe 4.2.).

Zytoreduktive Medikamente normalisieren die Thrombozytenzahl und reduzieren so das Auftreten von thrombo-embolischen Komplikationen (137, 157). Die abnorme Bildung von Zellen im Knochenmark und die damit einhergehenden Funktionsdefekte der Thrombozyten können dadurch aber nicht behoben werden (154, 161).

Auch die unter 4.2. beschriebene Nutzen/Risiko Abwägung im Hinblick auf eine eventuelle Induktion von Neoplasien ist ein Nachteil dieser Medikation, besonders bei sehr jungen Patienten.

In unserer Studie wurde keiner der Patienten aus der CML-Gruppe mit dem neuen Tyrosinkinaseblocker Imatinib = Glivec® behandelt, weshalb zu dem Einfluss dieses neuen Medikamentes auf thromboembolische Ereignisse keine Aussage gemacht werden kann.

Bei der Vielzahl von Plättchenabnormitäten, die intraindividuell beim gleichen Patienten auftreten, und die sich im Verlauf der Erkrankung ändern können, wird eine spezifisch auf die Korrektur des Funktionsdefektes gerichtete Therapie sehr schwierig bleiben.

Umso wichtiger bleibt die Vorhersage von Komplikationen durch Einschätzung des Risikoprofils beim jeweiligen Patienten. Hierbei stellt eine ausführliche Anamnese die Basis weiterer Untersuchungen.

Die Durchflußzytometrie bietet für die Zukunft gute Perspektiven, um den Krankheitsverlauf bei myeloproliferativen Erkrankungen zu überwachen (106). Patienten, die von einer antithrombozytären Therapie profitieren, könnten möglicherweise identifiziert werden. Ebenso ist ein Monitoring der Therapieeffekte bei medikamentöser Intervention des Krankheitsverlaufes denkbar.

Die Vorhersage von thrombo-embolischen Komplikationen oder Blutungsereignissen erfordert weitere Studien mit den unter 4.4. beschriebenen Schwerpunkten.

Es bieten sich zahlreiche pharmakologische Angriffspunkte, die eine erhöhte Gerinnungs- oder Blutungsneigung hemmen können (33, 48, 92, 117). Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle sowie chemische Botenstoffe wie z.B. Histamin oder PDGF (Platelet derived growth factor), die die Inflammation und Interaktion zwischen den einzelnen Zellen regulieren.

Die Interaktion verschiedener Zellreihen könnte als Angriffspunkt dienen. Fischer et al. beschreiben, daß Leukozyten beim Pathomechanismus von Gefäßkrankheiten zu unterschiedlichen Phasen aktiv sind (42). Eine entscheidende Rolle spielen sie für die Entwicklung eines akuten ischämischen Ereignisses, eine weitere wichtige Funktion besteht in der Organisation des thrombotischen Verschlusses nach dem Eintreten des akuten Ereignisses. Therapeutische Interventionen könnten demnach während und im Verlauf des akuten Geschehens sinnvoll sein. Aber auch ein prophylaktischen Eingreifen wäre denkbar.

Es gibt interessante Therapieansätze, die auf bereits etablierten Medikamenten basieren. Ziel ist die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten auf Rezeptor- oder Stoffwechselebene zu beeinflussen. So finden Combes et al. geringere Werte von Thrombozyten-Mikropartikeln am Ende einer Koronarangioplastie, bei der die Patienten Kalzium Antagonisten erhielten beim Vergleich mit Patienten, die nur Heparin oder  $\beta$ -Blocker einnahmen (26). Inwieweit Kalzium Blocker eine plättchenhemmende Wirkung bei Patienten mit Koronarangioplastie unterstützen und inwieweit die Ergebnisse auch auf andere Erkrankungen wie z.B. die myeloproliferativen Syndrome übertragen werden können, müssen zukünftige Studien klären.

Gawaz et al. machen auf die Wirkung von intravenösem Magnesium aufmerksam. In einer Studie behaupten Sie, daß die erhöhte P-Selektin Expression sowie die vermehrte Thrombozyten-Leukozyten Aggregatbildung bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit wieder reduziert werden kann (51). Auch Evangelista et al. zeigten, daß die Bindung von aktivierten Neutrophilen an Thrombozyten über den CD11b/CD18 Rezeptor sowohl Kalzium, als auch Magnesium abhängig ist (36).

Der Transfer des Tissue Faktors von Neutrophilen Granulozyten auf Thrombozyten, der als Triggerung der Thrombosebildung diskutiert wird, kann durch Hemmung der Elastase verhindert werden (167). Diese Protease wird nach Aktivierung von Leukozyten sekretiert, Auch eine Blockade von Rezeptoren wie CD15, welcher die Interaktion von Zellen und Tissue Faktor vermittelt, ist denkbar (128). Die Stimulierung von Monozyten zur Expression von Tissue Faktor kann durch Antikoagulation und Gabe von Aspirin gesenkt werden (4). Damit bietet sich durch Blockierung spezifischer Enzymsysteme oder Elektrolyte ein weiterer pharmakologischer Angriffspunkt. Auch die interessante Wirkung von Magnesium als antiaggregatorische Substanz sollte weiter untersucht, und bei weiteren Studien mitberücksichtigt werden.

Neumann et al. sehen in der Blockade des GP IIb/IIIa Rezeptors eine therapeutische Option, um bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion zu verhindern (119). Dabei reduziert Abciximab die Thrombozyten-Leukozyten Aggregate überwiegend durch Hemmung der Thrombozyten-Monozyten Interaktion. Sie spekulieren, daß die Reduktion der Aggregatbildung möglicherweise die Zytokinbildung oder die Abgabe von lysosomalen Enzymen der entsprechenden Zellen beeinflusst. Das Medikament könnte auch die Reperfusion auf mikrovaskulärer Ebene positiv verbessern. Diese Vermutung wird durch eine Studie von Xiao et al. gestützt (164). Sie zeigen eine Verringerung der Thrombozyten-Neutrophilen Aggregatbildung, sowie eine Hemmung der Induktion mit Plättchenagonisten durch Blockade des GP IIb/IIIa Rezeptors mit Tirofiban. Ebenso verhindert die Gabe eines GP IIb/IIIa Rezeptor Blockers, die durch aktivierte Thrombozyten induzierte APC-Resistenz (147). Auch über diesen Weg ist eine medikamentöse Senkung des Thromboserisikos daher denkbar.

Ebenso hemmt eine Kombination von Thrombozytenaggregationshemmern wie Aspirin, Dipyridamol und Clopidogrel die P-Selektin Expression, die Aktivierung von Neutrophilen sowie von Monozyten und die Bildung von Thrombozyten-Monozyten- sowie von Thrombozyten-Neutrophilen Aggregaten stärker als die Einzelgabe von Aspirin (166).

Eine Kombination von Medikamenten, die an unterschiedlichen Mechanismen der Thrombozytenfunktion angreifen, ist möglicherweise zur Protektion von Thrombose- oder Blutungskomplikationen sinnvoller als die Gabe nur eines einzelnen Wirkstoffes. Dies würde die Vielzahl der Plättchenabnormitäten und die daraus resultierenden Fehlregulationen besser berücksichtigen. Auch die Interaktionen der verschiedenen Zellreihen über unterschiedliche Rezeptoren könnte auf diese Weise besser beeinflußt werden. Hier stellt sich die Frage, inwieweit sie auch langfristig Komplikationen bei MPS Patienten verhindern können. Es müssen weitere Studien näher über Wirkung dieser aussichtsreichen Therapieoption Aufschluß geben.

Einen ganz neuer Therapieansatz wird von anderen Autoren diskutiert.

Im Gegensatz zu den übrigen Untergruppen des MPS sind bei der CML chromosomale Veränderungen bekannt. Der Nachweis des Philadelphia Chromosoms ist dafür ein Beleg. Das bcr-abl Genprodukt ist notwendig für die hämatopoetische Zelltransformation. Die Induktion unterschiedlicher Signalkaskaden ist bekannt, deren Funktion bleibt jedoch häufig unklar. Das bessere Verständnis der biologischen Zusammenhänge könnte daher neue Therapiestrategien auch auf molekularer Basis eröffnen (156). In der nahen Zukunft könnten dadurch MPS Patienten nicht nur symptomatisch behandelt werden. Die Ursache der abnormen Plättchenbildung wäre möglicherweise auf Molekularebene zu beheben.

#### **4.7. Schlußfolgerung**

Der pathophysiologische Hintergrund von Blutungen und Thrombosen bei Patienten mit myeloproliferativen Syndromen ist sehr komplex. Zahlreiche unterschiedliche Faktoren tragen zum hämostatischen Ungleichgewicht bei. Dazu zählen u.a. das erworbene von Willebrand Syndrom (153), Rezeptordefekte (71) sowie angeborene und erworbene Thrombophilie Faktoren (34). Das Zusammenspiel aller Faktoren bestimmt, ob ein Patient eine Blutung oder eine Thrombose erleidet, oder ob er symptomfrei bleibt.

In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Thrombozyten-Leukozyten Aggregate, Thrombozyten-Mikropartikel oder CD62p-positiven Thrombozyten beim Vergleich der MPS Patienten mit Komplikationen und ohne entsprechende Ereignisse in der Anamnese gefunden werden.

Diese Studie sollte den in vivo Aktivierungsstatus der Blutplättchen sowie die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion bei den unterschiedlichen Untergruppen des MPS untersuchen. Leider war die Anzahl der Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen oder

Blutungsereignissen zu gering für einen Vergleich innerhalb der Untergruppen. Zusätzlich bekamen die Patienten mit Komplikationen in der Anamnese eine antikoagulatorische Medikation, welche aus ethischen Gründen für eine Blutuntersuchung nicht abgesetzt werden durfte.

Die Medikation könnte die Ergebnisse dieser Studie beeinflusst haben, was die Diskrepanz zu anderen in der Literatur veröffentlichten Untersuchungen erklären würde. So finden Jensen et al. eine leicht höhere Anzahl von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten bei MPS Patienten mit Thrombose (66).

In unserer Studie wurden neue Marker zur Messung von Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten Interaktion eingesetzt.

Bisher zeigte nur die Aggregometrie von thrombozytenreichem Plasma teilweise Erfolge in der Identifizierung von MPS Patienten mit einem erhöhten Thrombose- oder Blutungsrisiko (93).

Die Resultate dieser Studie unterstützen das Cell-based Model of Hemostasis, d. h. das Hämostase ein Zusammenspiel zellulärer und plasmatischer Faktoren ist (15, 60, 92).

Dazu zählen die unterschiedlichen Zellreihen mit ihrer Vielzahl von Rezeptoren und Sekretionsprodukten, die durch bestimmte Regulationsmechanismen miteinander interagieren. Früher wurde oft von einer Gerinnungskaskade gesprochen, die stufenweise hintereinander abläuft. Hoffman et al. sehen den Gerinnungsprozeß eher als drei überlappende Stadien, die zuerst nach Initiierung über Tissue Faktor tragende Zellen zu einer Amplifikation führen. Dabei werden Thrombozyten und Cofaktoren aktiviert und bilden Thrombin. In einem weiteren Schritt der sogenannten Propagation kommt es dann zu Fortsetzung der Bildung großer Mengen Thrombin (60). Die Interaktion zwischen Blutplättchen und anderen Zellen über unterschiedlichste Rezeptoren spielt in diesem Modell eine wichtige Rolle und sollte bei Betrachtung des Gerinnungsprozesses miteinbezogen werden. Ein Ungleichgewicht der Regulationsmechanismen führt dann entsprechend zu Blutungen oder Thrombosen.

Zukünftige Studien über Gerinnungsveränderungen bei Patienten mit MPS dürfen nicht allein auf Thrombozyten oder plasmatische Gerinnungsfaktoren beschränkt bleiben, sondern müssen das Zusammenwirken dieser Vielzahl von Faktoren mitberücksichtigen. So sollten die Untersuchungen auch zusätzliche Komponenten wie z.B. Thrombozyten-Mikropartikel oder Thrombozyten-Leukozyten Interaktion einschließen, um dem oben beschriebenen Modell der Hämostase gerecht werden zu können.

## 5. Zusammenfassung

**Einleitung:** Patienten mit myeloproliferativen Syndromen (MPS) leiden verstärkt unter thrombo-embolischen Komplikationen, welche auf Veränderungen in der Thrombozytenfunktion und der Anzahl der Blutplättchen zurückzuführen sind. Derzeitig ist eine genaue Vorhersage dieser lebensbedrohlichen Ereignisse nur bedingt möglich.

Unsere Studie hat mit Hilfe der Durchflußzytometrie die Thrombozytenaktivierung sowie die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion bei MPS Patienten untersucht. Zusätzlich haben wir neue Gerinnungstests und Thrombophilie marker eingesetzt.

**Methodik:** Für die Studie wurde Vollblut von insgesamt 47 MPS Patienten (10 mit chronischer myeloischer Leukämie (CML), 13 mit Polycythaemia vera (PV), 12 mit Osteomyelosklerose (OMF), 12 mit Essentieller Thrombozythämie (ET)) sowie von 16 gesunden Probanden für die Durchflußzytometrie mit Hilfe fluoreszierender monoklonaler Antikörper analysiert. Thrombozyten-Mikropartikel und Thrombozyten-Mikroaggregate wurden durch anti-CD42b und Forward Scatter (FS) identifiziert, Thrombozytenaktivierung durch anti-CD62p, anti-CD42b und anti-CD14, die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion durch anti-CD45.

**Ergebnisse:** MPS Patienten mit thrombo-embolischen Komplikationen in der Anamnese zeigten hinsichtlich der durchflußzytometrischen Parameter sowie der Ergebnisse in der Gerinnungsanalyse und der Thrombophiliediagnostik keinen Unterschied zu der MPS Vergleichsgruppe ohne entsprechende Vorgeschichte. Tendenziell zeigten sich bei MPS Patienten mit thrombo-embolischen Ereignissen aber höhere Mikropartikelwerte, eine geringere Anzahl von Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten, eine erniedrigte Aktivität von Protein C, -S und Antithrombin sowie erhöhte Werte von Tissue Faktor und Prothrombinfragment F 1+2.

Alle MPS Untergruppen wiesen eine erhöhte Thrombozytenaktivierung (CD62p-positive Thrombozyten) auf. Mit Ausnahme der CML Patienten hatten alle Untergruppen signifikant höhere Mikropartikelwerte als die Kontrollgruppe. Patienten mit PV und ET, die die höchste Rate an thromboembolischen Komplikationen unter allen Untergruppen vorwiesen, zeigten signifikant höhere Werte von Thrombozyten-Neutrophilen- und von Thrombozyten-Monozyten Aggregaten als die gesunde Vergleichsgruppe. Die Thrombozytenfunktion, die mit Hilfe des PFA-100 (Platelet Function Analyzer) simuliert wurde, offenbarte bei fast allen Subtypen des MPS signifikant verlängerte Verschlußzeiten im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Ein Unterschied zwischen Patienten mit thromboembolischen Komplikationen und ohne konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

**Schlußfolgerung:** Die geschilderten Ergebnisse sprechen dafür, daß Thrombozytenaktivierung, Thrombozyten-Mikropartikel sowie Thrombozyten-Leukozyten Interaktion bei Patienten mit myeloproliferativen Syndromen (MPS) eine wichtige Rolle spielen. Erhöhte Mikropartikelwerte könnten durch ihre prokoagulatorische Wirkung die Thrombinbildung und damit die Thromboseneigung fördern. Dies würde die klinische Symptomatik von MPS Patienten erklären, die durch ein höheres Risiko für arterielle oder venöse thrombo-embolische Komplikationen gekennzeichnet ist. Insgesamt läßt sich eine erhöhte Aktivierung des Gerinnungssystems sowie eine abnorme Thrombozytenfunktion bei allen Untergruppen des MPS feststellen, ohne jedoch daraus eine genauere Vorhersage der thrombo-embolischen Ereignisse ableiten zu können.

## 5.1. Abstract

**Introduction:** Changes in platelet count and function contribute to thrombo-hemorrhagic episodes in chronic myeloproliferative syndromes (MPS). We used flow cytometry to study platelet–leukocyte conjugates and markers of platelet activation in patients with MPS.

**Methods:** Whole blood from patients with chronic myelogenous leukemia (CML), polycythemia vera (PV), chronic myelofibrosis (MF), and essential thrombocythemia (ET) and from healthy volunteers was prepared for flow cytometry. Platelet microparticles and platelet microaggregates were identified with anti-CD42b and forward scatter, activated platelets with anti-CD62p. Anti-CD42b, anti-CD14, and anti-CD45 were used to study platelet–leukocyte conjugates. **Results:** The percentage of CD62p-positive platelets was elevated in all myeloproliferate syndrome subtypes. The median percentage of platelet microparticles was 5.4% in controls and significantly higher in PV (11.2 %), MF (10.7 0%), and ET (10.4 %, all  $p < 0.05$ ). There was an increased percentage of platelet–neutrophil conjugates in patients with PV (9.1%) and ET (10.7%) compared to normal controls (6.6%, all  $p < 0.05$ ). Platelet–monocyte conjugates were 8.8 % in controls and elevated in PV (16.6 %) and ET (19.1 %, all  $p < 0.05$ ). Patients with a history of venous or arterial thrombotic events had slightly less platelet–leukocyte conjugates and slightly more microparticles than patients without thrombosis; however, this difference was not statistically significant. **Conclusions:** These findings suggest that platelet–leukocyte conjugate formation occurs in myeloproliferative syndromes and indicates platelet activation. Also, platelet microparticles are elevated and might provide a catalytic surface for thrombin generation. This could explain the clinical observation that patients with myeloproliferative syndromes have an increased risk to experience arterial or venous thrombotic events.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
Akt	Aktivität
APC-Resistenz	Resistenz gegen aktiviertes Protein C
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT	Antithrombin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD	Cluster of Differentiation (Immunphänotypisierungseinteilung)
CML	Chronische myeloische Leukämie
d. N.	der Norm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ET	Essentielle Thrombozythämie
F 1+2	Prothrombinfragment F 1+2
F II	Faktor II
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FS	Forward angle light scatter
GMP	Granule membrane protein
GP	Glykoprotein
Hb	Hämoglobin
Hk	Hämatokrit
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IL	Interleukin
MCH	Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt

MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MTHFR	Methyltetrahydrofolatreduktase
n	Stichprobenumfang
OMF	Osteomyelofibrose
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PADGEM	Platelet activation dependent granule external membrane
PC	Protein C
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PF 4	Plättchenfaktor 4
PS	Protein S
PTT (aPTT)	(aktivierte) partielle Thromboplastinzeit
PV	Polyzythaemia vera
SD	Standard deviation
Sek.	Sekunden
SSC	Side angle light scatter
Suppl.	Supplement
Tab.	Tabelle
TF	Tissue Faktor
Vgl.	Vergleiche
Vol.	Volume
VWF	von Willebrand Faktor
w/v	weight per volume

## 7. Anhang

### 7.1. Patientenbeschreibung

	Myeloproliferative Erkrankungen				Kontrolle
	CML	PV	OMF	ET	
	N=10	N=13	N = 12	N = 12	N = 16
<b>Frauen/Männer</b>	5/5	6/7	5/7	7/5	6/10
<b>Alter (Jahre, Mittelwert, Minimum Maximum,)</b>	57 24-71	61 43-79	76 43-79	60 38-84	42 23-63
<b>Thrombo-embolische Ereignisse<sup>++</sup> (Zahl der Patienten)</b>	1	10	5	7	0
<b>Blutungsereignisse<sup>§§</sup> (Zahl der Patienten)</b>	0	1	2	1	0
<b>Anti-koagulatorische Therapie</b>	3	6	6	8	0

<sup>++</sup> Folgende Erkrankungen wurden als thrombo-embolische Ereignisse gewertet, wenn diese zeitgleich zu oder nach der Diagnose eines myeloproliferativen Syndroms auftraten: Oberflächliche Thrombophlebitis, tiefe Venenthrombose, Lungenembolie, Myokardinfarkt, Schlaganfall, periphere Gefäßverschuß, Mikrozirkulationsstörungen.

<sup>§§</sup> Folgende Erkrankungen wurden als Blutungsereignis gewertet, wenn diese zeitgleich zu oder nach der Diagnose eines myeloproliferativen Syndroms auftraten, ohne in Bezug zu einer antikoagulatorischen Therapie zu stehen: Hämatome, Petechien, Mukosa-blutungen, Gastrointestinale-blutungen, Hämatokult-positiver Stuhl, Makro-oder Mikrohämaturie.

## 7.2. Anamnesebogen

Patientenaufkleber	Alter: Grösse: Geschlecht: Gewicht:	Datum
Erkrankung	<input type="checkbox"/> CML <input type="checkbox"/> P.V. <input type="checkbox"/> OMF <input type="checkbox"/> ET    seit:	<input type="checkbox"/> Akute Entzündung
Eigenanamnese	Vorerkrankungen	<input type="checkbox"/> KHK <input type="checkbox"/> Angina Pectoris <input type="checkbox"/> Herzinfarkt <input type="checkbox"/> Lebererkrankung <input type="checkbox"/> Nierenerkrankung <input type="checkbox"/> Thrombosen: <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Lungenembolie</li> <li><input type="checkbox"/> Schlaganfall</li> <li><input type="checkbox"/> Tiefe Venenthrombose</li> <li><input type="checkbox"/> Periphere Durchblutungsstörungen</li> <li><input type="checkbox"/> Stauungszeichen</li> <li><input type="checkbox"/> Schnelle Kanülenverstopfung</li> <li><input type="checkbox"/> Thrombophlebitis</li> </ul> <input type="checkbox"/> Blutungen: <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Zahnfleischblutungen</li> <li><input type="checkbox"/> Blut im Stuhl</li> <li><input type="checkbox"/> Blut im Urin</li> <li><input type="checkbox"/> Petechien</li> <li><input type="checkbox"/> Hämatome</li> <li><input type="checkbox"/> Wundheilungsstörungen</li> </ul> <input type="checkbox"/> Andere:
	Risikofaktoren	<input type="checkbox"/> Hypertonie <input type="checkbox"/> Übergewicht <input type="checkbox"/> Hypercholesterinämie <input type="checkbox"/> Bewegungsmangel <input type="checkbox"/> Rauchen <input type="checkbox"/> Stress <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Alkoholkonsum <input type="checkbox"/> Hyperurikämie                 — 1 / Tag
	Operationen	
	Medikamente	<input type="checkbox"/> Aspirin <input type="checkbox"/> Tirlid <input type="checkbox"/> Heparin <input type="checkbox"/> Chemotherapie <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Interferon</li> <li><input type="checkbox"/> Litalir (Hydroxyurea)</li> <li><input type="checkbox"/> Anagrelide</li> </ul> <input type="checkbox"/> Andere:
Familienanamnese	Kreberkrankungen	<input type="checkbox"/> Mutter <input type="checkbox"/> Vater <input type="checkbox"/> Geschwister <input type="checkbox"/> Großeltern
	Andere genetische Erkrankungen	

### 7.3. Rohdaten/Blutbild (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung)

	<b>CML</b>	<b>PV</b>	<b>OMF</b>	<b>ET</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>Erythrozyten (Mio/<math>\mu</math>l)</b>	4.1 $\pm$ 0.9	5.4 $\pm$ 1.8	3.6 $\pm$ 0.9	4.6 $\pm$ 0.9	4.6 $\pm$ 0.5
<b>Leukozyten (/<math>\mu</math>l)</b>	18300 $\pm$ 10530	11000 $\pm$ 2300	7800 $\pm$ 6500	8200 $\pm$ 2700	6400 $\pm$ 1500
<b>Neutrophile</b>	12900 $\pm$ 9800	8800 $\pm$ 2100	6100 $\pm$ 5900	5500 $\pm$ 2300	3600 $\pm$ 1100
<b>Monozyten</b>	800 $\pm$ 650	450 $\pm$ 210	320 $\pm$ 150	470 $\pm$ 240	580 $\pm$ 250
<b>Lymphozyten</b>	2800 $\pm$ 1700	1400 $\pm$ 560	1100 $\pm$ 700	1900 $\pm$ 800	2100 $\pm$ 570
<b>Thrombozyten (1000/<math>\mu</math>l)</b>	336 $\pm$ 217	531 $\pm$ 213	441 $\pm$ 305	567 $\pm$ 252	275 $\pm$ 63
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>	13.1 $\pm$ 2.7	14.8 $\pm$ 2.1	11.5 $\pm$ 2.5	14.7 $\pm$ 1.3	14.7 $\pm$ 1.4
<b>Hämatokrit (%)</b>	37 $\pm$ 7	44 $\pm$ 7	34 $\pm$ 7	43 $\pm$ 5	41 $\pm$ 5

**7.4. Rohdaten/Durchflußzytometrie  
(Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)**

	<b>CML</b>	<b>PV</b>	<b>OMF</b>	<b>ET</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>CD62p-positive Thrombozyten (%)</b>	14.6 $\pm$ 4.0	11.7 $\pm$ 1.9	17.6 $\pm$ 9.9	13.1 $\pm$ 4.4	10.1 $\pm$ 3.8
<b>Thrombozyten-Mikropartikel (%)</b>	6.4 $\pm$ 2.4	11.2 $\pm$ 3.2	10.7 $\pm$ 4.5	10.4 $\pm$ 3.0	5.4 $\pm$ 1.2
<b>Thrombozyten-Mikroaggregate (%)</b>	2.0 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 1.6	2.7 $\pm$ 3.3	2.4 $\pm$ 1.4	2.6 $\pm$ 0.9
<b>Thrombozyten-Monozyten-Aggregate (%)</b>	15.2 $\pm$ 13.9	16.6 $\pm$ 5.9	17.6 $\pm$ 15.7	19.1 $\pm$ 11.7	8.8 $\pm$ 2.9
<b>Thrombozyten-Neutrophile-Aggregate (%)</b>	9.2 $\pm$ 6.0	9.2 $\pm$ 3.3	19.8 $\pm$ 8.1	10.8 $\pm$ 5.5	6.8 $\pm$ 1.8

### 7.5. Rohdaten/Gerinnungsanalyse (Mittelwerte ± Standardabweichung)

	<b>CML</b>	<b>PV</b>	<b>OMF</b>	<b>ET</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>PTT (Sekunden)</b>	31.1±4.4	35.8±6.3	35.5±5.1	36.2±7.0	32.6±3.7
<b>Quick (%)</b>	97.6±14.8	87.6±7.9	92.2±6.8	90.1±10.3	89.9±8.1
<b>Fibrinogen (g/l)</b>	3.6±0.8	2.4±0.7	3.1±0.7	2.8±0.7	2.7±0.4
<b>APC - Resistenz (Ratio)</b>	2.5±0.3	2.4±0.2	2.4±0.2	2.5±0.2	2.3±0.4
<b>Protein C - Aktivität (%)</b>	110.2±23.7	89.1±14.2	88.0±15.3	99.7±21.7	105.1±19.7
<b>Protein S - Aktivität (%)</b>	106.7±23.4	72.1±18.8	80.4±13.3	90.5±20.1	97.9±15.6
<b>Antithrombin - Aktivität (%)</b>	93.0±23.6	97.1±14.4	100.6±15.0	84.2±15.5	85.5±17.3
<b>D-Dimere (ng/ml)</b>	575.4±398.5	270.7±137.3	494.7±341.1	411.3±187.1	254.4±160.4
<b>Tissue Faktor (pg/ml)</b>	76.4±67.9	97.9±52.9	78.6±33.8	69.6±45.6	91.5±67.9
<b>F1+F2 (nmol/l)</b>	2.3±2.5	2.2±2.4	2.1±2.5	1.6±1.7	0.8±0.4
<b>PFA-100 Epinephrin (Sekunden)</b>	113.9±28.3	186.0±47.5	152.8±39.8	144.0±41.6	100.5±18.6
<b>PFA-100 ADP (Sekunden)</b>	101.3±65.9	115.2±31.4	98.8±39.9	102.2±33.1	72.4±13.3
<b>Faktor-V-Leiden-Mutation</b>	0	0	0	1 x heterozygot	3 x heterozygot
<b>Prothrombin-Mutation</b>	1 x heterozygot	0	1 x homozygot	0	1 x heterozygot
<b>MTHFR-Mutation</b>	1 x heterozygot 2 x homozygot	5 x heterozygot 2 x homozygot	3 x heterozygot 3 x homozygot	7 x heterozygot 3 x homozygot	4 x heterozygot 1 x homozygot

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ:** Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans.  
In: *Blood* 75:128-138, 1990.
2. **Abrams CS, Shattil SJ:** Immunological detection of activated platelets in clinical disorders.  
In: *Thrombosis and Hemostasis* 65: 467-473, 1991.
3. **Adamczuk Y, Iglesias Varela ML, Forastiero R, Martinuzzo M, Cerrato G, Pombo G, Carreras LO:** Factor V Leiden and Prothrombin G20210A Variant are risk factors for venous thromboembolism in the argentinean population.  
In: *Thrombosis and Hemostasis* 83:509-510, 2000.
4. **Amirkhosravi A, Alexander M, Francis DA, Warnes G, Biggerstaff J, Francis JL:** The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay.  
In: *Thrombosis and Hemostasis* 75:87-95, 1996.
5. **Anger B, Haug U, Seidler R, Heimpel H:** Polycythemia vera: A clinical study of 141 patients.  
In: *Blut* 59:493-500, 1989.
6. **Anger B, Seidler R, Haug U, Popp C, Heimpel H:** Idiopathic myelofibrosis: A retrospective study of 103 patients.  
In: *Haematologica* 75:228-234, 1990.
7. **Araujo F, Lopes M, Goncalves L, Maciel MJ, Cunhar-Ribeiro LM:** Hyperhomocysteinemia, MTHFR C677T genotype and low folate levels: A risk combination for acute coronary disease in a portuguese population.  
In: *Thrombosis and Hemostasis* 83:517-518, 2000.
8. **Arrunda VR, von Zuben PM, Chiaparini LC, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF:** The mutation Ala677→Val in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis.  
In: *Thrombosis and Hemostasis* 77:818-821, 1997.
9. **Ault KA:** The clinical utility of flow cytometry in the study of platelets.  
In: *Seminars in Hematology* 38:160-168, 2001.
10. **Ault KA, Mitchell J:** Analysis of platelets by flow cytometry.  
In: *Methods in Cell Biology* 42:275-294, 1994.
11. **Baker RI, Manoharan A:** Platelet function in myeloproliferative disorders: Characterization and sequential studies show multiple platelet abnormalities, and change with time.  
In: *European Journal of Haematology* 40:267-272, 1988.

12. **Barbui T, Cortelazzo S, Viero P, Bassan R, Dini E, Semeraro N:** Thrombohaemorrhagic complications in 101 cases of myeloproliferative disorders: relationship to platelet number and function.  
In: *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 19:1593-1599, 1983.
13. **Barkalow FJ, Barkalow KL, Mayadas TN:** Dimerization of P-selectin in platelets and endothelial cells.  
In: *Blood* 96:3070-3077, 2000.
14. **Bazzan M, Tamponi G, Schinco P, Vaccarino A, Foli C, Gallone G, Pileri A:** Thrombosis-free survival and life expectancy in 187 consecutive patients with essential thrombocythemia.  
In: *Annals of Hematology* 78:539-543, 1999.
15. **Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S:** Endothelial function and hemostasis.  
In: *Zeitschrift für Kardiologie* 89:160-167, 2000.
16. **Berckmans RJ, Nieuwland R, Boeing AN, Romijn FPHTM, Hack CE, Sturk A:** Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation.  
In: *Thrombosis and Hemostasis* 85:639-646, 2001.
17. **Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie BC, Ginsberg MH, Furie B:** A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation.  
In: *Journal of Clinical Investigation* 78:130-137, 1986.
18. **Bertina R, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH:** Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.  
In: *Nature* 369:64-67, 1994.
19. **Boneu B, Nouvel C, Sie P, Caranobe C, Combes D, Laurent G, Pris J, Bierme R:** Platelets in myeloproliferative disorders. I. A comparative evaluation with certain platelet function tests.  
In: *Scandinavian Journal of Haematology* 25:214-220, 1980.
20. **Brodmann S, Passweg JR, Gratwohl A, Tichelli A, Skoda RC:** Myeloproliferative disorders: complications, survival and causes of death.  
In: *Annals of Hematology* 79:312-318, 2000.
21. **Buss DH, Stuart JJ, Lipscomb GE:** The incidence of thrombotic and hemorrhagic disorders in association with extreme thrombocytosis: An analysis of 129 cases.  
In: *American Journal of Hematology* 20:365-372, 1985.
22. **Cabot RC:** A case of chronic cyanosis without discoverable cause, ending in cerebral hemorrhage.  
In: *Boston Medical Surgery Journal* 141:574, 1899.
23. **Cahill MR, Macey MG, Newland AC:** Correlation of GP53 and p-selectin expression in myeloproliferative disorders and normal controls.

- In: Blood Coagulation and Fibrinolysis 7:169-171, 1996.
24. **Cerletti C, Evangelista V, Molino M, De Gaetano G:** Platelet activation by polymorphonuclear leucocytes.  
In: Thrombosis and Hemostasis 74:218-223, 1995.
  25. **Colombi M, Radaelli F, Zocchi L, Maiolo AT:** Thrombotic and hemorrhagic complications in essential thrombocythemia.  
In: Cancer 67:2926-2930, 1991.
  26. **Combes V, Joly P, Ambrosi P, Sabatier F, Camoin L, Pili J, Sampol J, Dignat-George F:** Platelet vesiculation in angina patients treated with coronary angioplasty.  
In: Thrombosis and Hemostasis 83:518, 2000.
  27. **Cortelazzo S, Viero P, Bassan R, Barbui T:** Spectrum of platelet aggregation abnormalities in myeloproliferative diseases.  
In: Ric Clin Lab 11:35-42, 1981.
  28. **Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T:** Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia.  
In: Journal of Clinical Oncology 8:556-562, 1990.
  29. **Dameshek W:** Some speculations on the myeloproliferative syndromes.  
In: Blood 6:372-375, 1951.
  30. **Davis RB:** Acute thrombotic complications of myeloproliferative disorders in young adults.  
In: American Journal of Clinical Pathology 84:180-185, 1985.
  31. **De Bruijne-Admiraal LG, Modderman PW, Von dem Borne AEGK, Sonnenberg A:** P-selectin mediates  $Ca^{2+}$ -dependent adhesion of activated platelets to many different types of leucocytes: Detection by flow cytometry.  
In: Blood 80:134-142, 1992.
  32. **De Stefano V, Martinelli I, Mannuccio Mannucci P, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, Rossi E, Leone G:** The risk of recurrent deep vein thrombosis among heterozygous carriers of both factor leiden and the G20210A prothrombin mutation.  
In: New England Journal of Medicine 341:801-806, 1999.
  33. **Deuel TF, Senior RM, Huang JS, Griffin GL:** Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor.  
In: Journal of Clinical Investigation 69:1046-1049, 1982.
  34. **Dicato MA, Schroell B, Berchem GJ, Duhem C, Ries F, Mahon GA:** In essential thrombocythemia the mutations V leiden, prothrombin and methylene-tetrahydrofolate reductase are not risk factors for thromboembolic disease.  
In: Blood 94(Suppl. 1, Part 1):488, 1999.

35. **Diacovo TG, Roth Sj, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA:** Neutrophil rolling, arrest and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of p-selectin and the beta (2) –integrin CD 11b/CD18.  
In: Blood 88:146-157, 1996.
36. **Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuk R, McGregor JL, deGaetano G, Cerletti C:** Platelet/Polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: Evidence of adhesion cascade and cross talk between p-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18.  
In: Blood 88:4183-4194, 1996.
37. **Fabris F, Randi M, Sbrojavacca R, Casonato A, Girolami A:** The possible value of platelet aggregation studies in patients with increased platelet number.  
In: Blut 43:279-285, 1981.
38. **Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, Manarini S, Finazzi G, Cerletti C, Barbui T:** Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera.  
In: Blood 96:4261-4266, 2000.
39. **Fenaux P, Simon M, Caulier MT, Lai JL, Goudemand J, Bauters F:** Clinical course of essential thrombocythemia in 147 cases.  
In: Cancer 66:549-556, 1990.
40. **Finazzi G, Barbui T:** Treatment of essential thrombocythemia with special emphasis on leukemogenic risk.  
In: Annals of Hematology 78:389-392, 1999.
41. **Finazzi G, Budde U, Michiels JJ:** Bleeding time and platelet function in essential thrombocythemia and other myeloproliferative syndromes.  
In: Leukemia and Lymphoma 22:71-78, 1996.
42. **Fisher TC, Meiselmann HJ:** Polymorphonuclear leukocytes in ischemic vascular disease.  
In: Thrombosis Research 74:21-34, 1994.
43. **Forlow SB, McEver RP, Nollert MU:** Leucocyte-leucocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow.  
In: Blood 95:1317-1323, 2000.
44. **Francis JL:** Clinical experience with the platelet function analyser (PFA)-100<sup>R</sup>.  
In: Blood 94(Suppl. 1, part 1):3513, 1999.
45. **Fritze D, Matzdorff A:** Innere Medizin.  
In: Hippokrates Verlag im Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1999.
46. **Frojmovic M, Wong T, van de Ven T:** Dynamic measurements of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa receptor for fibrinogen by flow cytometry. I. Methodology, theory and results for two distinct activators.  
In: Biophysical Journal, 59: 815-827, 1991.

47. **Frojmovic M, Wong T:** Dynamic measurements of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa receptor for fibrinogen by flow cytometry. II. Platelet size-dependent subpopulations.  
In: *Biophysical Journal*, 59: 828-837, 1991.
48. **Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V:** Recent advances in platelet-polymorphonuclear leucocyte interaction.  
In: *Haemostasis* 29:41-49, 1999.
49. **Gawaz M.** Das Blutplättchen.  
In: Thieme Verlag 1999.
50. **Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K:** Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with multiple organ failure.  
In: *European Journal of Clinical Investigation* 25:843-851, 1995.
51. **Gawaz M, Reininger A, Neumann FJ:** Platelet function and platelet-leucocyte adhesion in symptomatic coronary heart disease. Effects of intravenous magnesium.  
In: *Thrombosis Research* 83:341-349, 1996.
52. **Gemmell CH, Ramirez SM, Yeo EL, Sefton MV:** Platelet activation in whole blood by artificial surfaces: Identification of platelet-derived microparticles and activated platelet binding to leukocytes as material-induced activation events.  
In: *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 125:276-287, 1995.
53. **George JN, Shattil SJ:** The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function.  
In: *New England Journal of Medicine* 324: 27-39, 1991.
54. **Griesshammer M, Beneke H, Nussbaumer B, Grünewald M, Bangerter M, Bergmann L:** Increased platelet surface expression of p-selectin and thrombospondin as markers of platelet activation in essential thrombocythaemia.  
In: *Thrombosis Research* 96:191-196, 1999.
55. **Gris JC, Mercier E, Quéré I, Dautat M:** Association between the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism and the risk of secondary lymphoproliferative disease in patients with a first idiopathic thrombosis.  
In: *Blood* 100:735, 2002.
56. **Hamburger SA, McEver RP:** GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils.  
In: *Blood* 75:550-554, 1990.
57. **Hasselbalch H:** Idiopathic myelofibrosis: A clinical study of 80 patients.  
In: *American Journal of Hematology* 34:291-300, 1990.
58. **Hathaway, WE:** Clinical aspects of antithrombin III deficiency.  
In: *Seminars in Hematology* 28:19-23, 1991.
59. **Hessner MJ, Dinauer DM, Luhm RA, Endres J, Montgomery RR, Friedmann KD:** Contribution of the glycoprotein Ia 807TT, methylen tetrahydrofolate reductase 677TT

and prothrombin 20210GA genotypes to prothrombotic risk among factor V 1691GA (Leiden) carriers.  
In: British Journal of Medicine 106:237-239, 1999.

60. **Hoffman M, Monroe DM:** A cell-based model of hemostasis.  
In: Thrombosis and Hemostasis 85:958-965, 2001.
61. **Holme S, Sweeney JD, Sawyer S, Elfath MD:** The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability.  
In: Transfusion 37:12-17, 1997.
62. **Howard MA, Coghlan M, David R, Pfueller SL:** Coagulation activities of plasma microparticles.  
In: Thrombosis Research 50:145-156, 1988.
63. **Hugel B, Socie G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, Scrobohaci ML:** Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia.  
In: Blood 93:3451-3456, 1999.
64. **Hughes M, Hayward CPM, Warkentin TE, Horsewood P, Chorneyko KA, Kelton JG:** Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia.  
In: Blood 96:188-194, 2000.
65. **Jantunen R, Juvonen E, Ikkala E, Oksanen K, Anttila P, Hormila P, Jansson SE, Kekomäki R, Ruutu T:** Essential thrombocythemia at diagnosis: causes of diagnostic findings.  
In: Annals of Hematology 77:101-106, 1998.
66. **Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC:** Increased circulating platelet-leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count.  
In: European Journal of Haematology 66:143-151, 2001.
67. **Jones CI, Payne DA, Chapman P, Lamb DJ, Naylor AR, Hayes PD, Goodall AH:** Simultaneous detection of tissue factor expression on platelet-leukocyte aggregates and free monocytes: Increased levels in patients with atherosclerotic disease.  
In: Thrombosis and Hemostasis 86:(Suppl.):P2716, 2001.
68. **Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FPHTM, Hack CE, Sturk A:** Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms.  
In: Thrombosis and Hemostasis 85:810-820, 2001.
69. **Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S:** Platelet-leucocyte interaction: Selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leucocytes, and related cell lines.  
In: Blood 67:629-636, 1986.

70. **Jy W, Mao WW, Horstman LL, Tao J, Ahn Y:** Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils.  
In: *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 30:217-231, 1995.
71. **Kaplan R, Gabbeta J, Sun L, Fen Mao G, Koneti Rao A:** Combined defect in membran expression and activation of platelet gpIIb/IIIa complex without primary sequence abnormalities in myeloproliferative disease.  
In: *British Journal of Haematology* 111:954-964, 2000.
72. **Kaywin P, McDonough M, Insel PA, Shattil SJ:** Platelet function in essential thrombocythemia. Decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet alpha-adrenergic receptors.  
In: *New England Journal of Medicine* 299:505-509, 1978.
73. **Kemkes-Matthes B:** Aquired protein s deficiency.  
In: *Clinical Investigations* 70:529-534, 1992.
74. **Kemkes-Matthes B, Oehler G, Kujath P, Spannagel U:** *Blutgerinnung und Thrombose*. 3. Auflage.  
In: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001.
75. **Kessler C, Klein HG, Havlik RJ:** Uncontrolled thrombocytosis in chronic myeloproliferative disorders.  
In: *British Journal of Haematology* 50:157-167, 1982.
76. **Khairy M, Lasne D, Brohard-Bohn B, Aiach M, Rendu F, Bachelot-Loza:** A new approach in the study of molecular and cellular events implicated in heparin-induced thrombocytopenia. Formation of leukocyte-platelet aggregates.  
In: *Thrombosis and Hemostasis* 85:1090-1096, 2001.
77. **Kirchhofer D, Riederer Ma, Baumgartner HR:** Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model.  
In: *Blood* 89:1270-1278, 1997.
78. **Kitchens, CS:** Concept of hypercoagulability: A review of its development, clinical application, and recent progress.  
In: *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 11:293-315, 1985.
79. **Kuijper PHM, Torres HIG, vander Linden JAM, Lammers JWJ, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ:** Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin- and integrin- mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions.  
In: *Blood* 87:3271-3281, 1996.
80. **Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA:** Characterization of an in vitro platelet function analyser, PFA-100™.  
In: *Clinical and Applied Thrombosis Hemostasis* 2:241-249, 1996.
81. **Kvasnicka HM, Thiele J, Schmitt-Graeff A, Schaefer HE:** Prognostische Faktoren und Ueberlebenszeiten bei chronischen myeloproliferativen Erkrankungen (CMPE).

In: Pathologie 21:63-72, 2000.

82. **Kvasnicka HM, Thiele J, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R:** Prognostic factors in idiopathic (Primary) osteomyelofibrosis.  
In: Cancer 80:708-719, 1997.
83. **Lahuerta-Palacios JJ, Bornstein R, Fernandez-Debora FJ, Gutierrez-Rivas E, Ortiz MC, Larregla S, Calandre L, Montero-Castillo J:** Controlled and uncontrolled thrombocytosis. Ist clinical role in essential thrombocythemia.  
In: Cancer 61:1207-1212, 1988.
84. **Lamparter S, Schuermann M, Heidtmann HH:** APC resistance as an additional thrombotic risk factor in a patient suffering from polycythemia vera and recurrent thrombosis  
.In: Annals of Hematology 74:49-50, 1997.
85. **Landolfi R, Marchioli R, Patrono C:** Mechanism of bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders.  
In: Thrombosis and Hemostasis 78:617-621, 1997.
86. **Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B:** PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes.  
In: Cell 59:305-312, 1989.
87. **Lee YJ, Jy W, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, Ahn YS:** Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts and multiinfarct dementias.  
In: Thrombosis Research 72:295-304, 1993.
88. **Li N, Goodall AH, Hjemdahl P:** A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leucocyte aggregates.  
In: British Journal of Haematology 99:808-816, 1997.
89. **Lindmark E, Wallentin L, Siegbahn A:** Blood cell activation, coagulation, and inflammation in men and women with coronary artery disease.  
In: Thrombosis Research 103:249-259, 2001.
90. **Lindmarker P, Schulman S, Sten-Linder M, Wiman B, Egberg N, Johnson H, DURAC trial study group:** The risk of recurrent venous thromboembolism in carriers and non-carriers of the G1691A allele in the coagulation factor V gene and the G20210A allele in the prothrombin gene.  
In: Thrombosis and Hemostasis 81:684-689, 1999.
91. **Loesche W, Dressel M, Krause S, Redlich H, Spangenberg P, Heptinstall S:** Contact-induced modulation of neutrophil elastase secretion and phagocytic activity by platelets.  
In: Blood Coagulation and Fibrinolysis 7:207-210, 1996.
92. **Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E:** Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine.  
In: Inflammation Research 46:4-18, 1997.

93. **Manoharan A, Gemmel R, Brighton T, Dunkley S, Lopez K, Kyle P:** Thrombosis and bleeding in myeloproliferative disorders: identification of at-risk patients with whole blood platelet aggregation studies.  
In: *British Journal of Haematology* 105:618-625, 1999.
94. **Manoharan A, Smart RC, Pitney WR:** Prognostic factors in myelofibrosis.  
In: *Pathology* 14:455-461, 1982.
95. **Marcus AJ, Safier LB:** Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis.  
In: *FASEB Journal* 7:516-522, 1993.
96. **Marti GE, Magruder L, Schuette W, Gralnick HR:** Flow cytometric analysis of platelet surface antigens.  
In: *Cytometry* 9:448-455, 1988.
97. **Matzdorff A, Goerg A, Fenchel K, Kemkes-Matthes B, Pralle H:** Quantification of tissue-factor antigen expression on monocytes and neutrophils in healthy volunteers and in AML patients.  
In: *Blood* 96 (Suppl. 1, Part 2):75b, abstr. #4003, 2000.
98. **Matzdorff A, Green D, Cohen I, Bauer KD.** Effect of r-aprotinin on platelet activation in patients undergoing open heart surgery.  
In: *Haemostasis* 23:293-300, 1993.
99. **Matzdorff A, Kemkes-Matthes B, Pralle H:** Microparticles and reticulated platelets in Wiskott-Aldrin syndrome patients.  
In: *British Journal of Haematology* 109:671-678, 2000.
100. **Matzdorff A, Kemkes-Matthes B, Pralle H:** Expression of membrane glycoproteins on young platelets.  
In: *Annals of Hematology* 72 (Suppl.1):A66, 1996.
101. **Matzdorff A, Kemkes-Matthes B, Voss R, Pralle H.** Comparison of  $\beta$ -thromboglobulin, flow cytometry, and platelet aggregometry to study platelet activation.  
In: *Haemostasis* 26:98-106, 1996.
102. **Matzdorff A, Kuehnel G, Kemkes-Matthes B, Pralle H:** Quantitative assessment of platelets, platelet microparticles and platelet aggregates with flow cytometry.  
In: *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 131:507-517, 1998.
103. **Matzdorff A, Kuehnel G, Kemkes-Matthes B, Pralle H, Voss R:** Relative and absolute changes of activated platelets, microparticles and platelet aggregates after activation.  
In: *Haemostasis* 28:277-288, 1998.
104. **McEver RP, Cummings RD:** Role of PSGL-1 binding to selectins in leucocyte recruitment.  
In: *Journal of Clinical Investigation* 100:485-492, 1997.

105. **Metzelaar MJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK:** Detection of platelet activation using activation specific monoclonal antibodies.  
In: Blood Cells 16:85-96, 1990.
106. **Michelson AD:** Flow cytometry: A clinical test of platelet function.  
In: Blood 87:4925-4936, 1996.
107. **Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI:** Circulating monocyte-platelet aggregates are more sensitive marker of platelet activation than platelet surface p-selectin.  
In: Thrombosis and Hemostasis 86(Suppl.):OC2494, 2001.
108. **Michelson AD, Shattli SJ:** The use of flow cytometry to study platelet activation.  
In: Platelet function and signal transduction: A practical approach. Oxford, UK p.111, 1996.
109. **Michelson JK, Lakkis NM, Villarreallevy G, Hughes BJ, Smith CW:** Leucocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: A mechanism for recurrent disease?  
In: Journal of the American College of Cardiology 28:345-353, 1996.
110. **Michiels JJ, Abels J, Steketee J, Van Vliet HH, Vuzevski VD:** Erythromelalgia caused by platelet-mediated arteriolar inflammation and thrombosis in thrombocythemia.  
In: Annals of Internal Medicine 102:466-471, 1985.
111. **Michiels JJ:** The myeloproliferative disorders. An historical appraisal and personal experiences.  
In: Leukemia and Lymphoma 22:1-14, 1996.
112. **Michiels, JJ:** Aspirin and platelet-lowering agents for the prevention of vascular complications in essential thrombocythemia.  
In: Clinical Applied Thrombosis/Hemostasis 5:247-251, 1999.
113. **Mitus J A, Barbui T, Shulman LN, Rosenthal DS, Viero P, Cortelazzo S, Schafer I A:** Hemostatic complications in young patients with essential thrombocythemia.  
In: The American Journal of Medicine 88:371-375, 1988.
114. **Murphy S:** Therapeutic dilemmas: Balancing the risks of bleeding, thrombosis and leukemic transformation in myeloproliferative disorders (mpd).  
In: Thrombosis and Hemostasis 78:622-626, 1997.
115. **Murphy S, Davis JL, Walsh PN, Gardner FH:** Template bleeding time and clinical hemorrhage in myeloproliferative disease.  
In: Archives of Internal Medicine 138:1251-1253, 1978.
116. **Nachman RL, Silverstein R:** Hypercoagulable states.  
In: Annals of Internal Medicine 119:819-827, 1993.
117. **Nash GB:** Adhesion between neutrophils and platelets: A modulator of thrombotic and inflammatory events?.

- In: *Thrombosis Research* 74: S3-S11, 1994.
118. **Nemerson Y:** Tissue factor and hemostasis.  
In: *Blood* 71:1-8, 1988.
119. **Neumann FJ, Zohlnhöfer D, Fakhoury L, Ott I, Gawaz M, Schömig A:** Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin mac-1 in acute myocardial infarction.  
In: *Journal of the American College of Cardiology* 34:1420-1426, 1999.
120. **Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schomig A:** Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty.  
In: *Journal of the American College of Cardiology* 27:819-824, 1996.
121. **Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schoemig A:** Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina.  
In: *Circulation* 94:1239-1246, 1996.
122. **Packham M:** Role of platelets in thrombosis and hemostasis.  
In: *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 72:278-284, 1994.
123. **Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B:** Leucocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets.  
In: *Nature* 359: 848-850, 1992.
124. **Pareti FI, Gugliotta C, Mannucci L, Guarini A, Mannucci PM:** Biochemical and metabolic aspects of platelet dysfunction in chronic myeloproliferative disorders.  
In: *Thrombosis and Hemostasis* 47:84-89, 1982.
125. **Peters MJ, Heyderman RS, Hatch DJ, Klein NJ:** Investigation of platelet-neutrophil interaction in whole blood by flow cytometry.  
In: *Journal of Immunological Methods* 209:125-135, 1997.
126. **Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM:** A common genetic variation in the 3'untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.  
In: *Blood* 88:3698-3703, 1996.
127. **Randi ML, Casonato A, Fabris F, Vio C, Girolami A:** The significance of thrombocytosis in old age.  
In: *Acta Haematologica* 78:41-54, 1987.
128. **Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y:** Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by cd15 and tissue factor.  
In: *Blood* 96:170-175, 2000.
129. **Redlich H, Vickers J, Loesche W, Heptinstall S, Kehrel B, Spangenberg P:** Formation of platelet-leucocyte conjugates in whole blood.  
In: *Platelets* 8:419-425, 1997.

130. **Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR:** Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood.  
In: *Blood* 78: 1730-1737, 1991.
131. **Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR:** Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils.  
In: *Blood* 78: 1760-1769, 1991.
132. **Robinson MSC, Harrison C, Machin SJ, Harrison P:** Platelet activation, function and turnover in essential thrombocythaemia.  
In: *Thrombosis and Hemostasis* 86(Suppl.):P383, 2001.
133. **Ruf A, Patscheke H:** Flow cytometric detection of activated platelets: Comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression.  
In: *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 21: 146-151, 1995.
134. **Ruf A, Patscheke H:** Platelet-induced neutrophil activation: Platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11C/CD18.  
In: *British Journal of Haematology* 90: 791-796, 1990.
135. **Ruf A, Schlenk RF, Maras A, Morgenstern E, Patscheke H:** Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood.  
In: *Blood* 80: 1238-1246, 1992.
136. **Sanderson HM, Heptinstall S, Vickers J, Loesche W:** Studies on the effects of agonists and antagonists on platelet shape change and platelet aggregation in whole blood.  
In: *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 7:245-248, 1996.
137. **Schafer A:** Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders.  
In: *Blood* 64: 1-12, 1984.
138. **Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA:** Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry.  
In: *Blood* 70: 307-315, 1987.
139. **Shattil SJ, Hoxie JA; Cunningham M, Brass LF:** Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation.  
In: *Journal of Biological Chemistry* 260: 11107-11114, 1985.
140. **Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ:** Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex.  
In: *Journal of Biological Chemistry* 266: 7345-7352, 1991.
141. **Spangenberg P:** Adhesion of activated platelets to polymorphonuclear leucocytes.  
In: *Thrombosis Research* 74:35-44, 1994.
142. **Spangenberg P, Redlich H, Bergmann I, Loesche W, Goetzrath M, Kehrel B:** The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leucocytes.  
In: *Thrombosis and Haemostasis* 70:514-521, 1993.

143. **Spannagel M, Schramm W:** Hämostaseologie – rationale Diagnostik.  
In: *Der Internist* 40:657-665, 1999.
144. **Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF:** A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation.  
In: *Journal of Cell Biology* 101:880-886, 1985.
145. **Svensson PJ, Dahlbäck B:** Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis.  
In: *New England Journal of Medicine* 330:517-522, 1994.
146. **Takahashi H, Hattori A, Shibata A:** Profile of blood coagulation and fibrinolysis in chronic myeloproliferative disorders.  
In: *Tohoku-Journal of experimental medicine* 138:71-80, 1982.
147. **Taube J, Mc William N, Luddington R, Byrne CD, Baglin T:** Activated protein C resistance. Effect of platelet activation, platelet-derived microparticles, and atherogenic lipoproteins.  
In: *Blood* 93:3792-3797, 1999.
148. **Teitel JM, Bauer KA, Lau HK, Rosenberg RD:** Studies of the prothrombin activation pathway utilizing radioimmunoassays for the F2/F1+2 fragment and thrombin-antithrombin complex.  
In: *Blood* 59:1086-1097, 1982.
149. **Vadher BD, Machin SJ, Patterson KG, Sukhu C, Walker H:** Life-threatening thrombotic and haemorrhagic problems associated with silent myeloproliferative disorders.  
In: *British Journal of Haematology* 85:213-216, 1993.
150. **Van Rensburg EJ, Heyns AP:** The effect of age, arteriosclerosis and hypercholesterinaemia on platelet function tests.  
In: *Thrombotic and Haemorrhagic Disorders* 1:11-16, 1990.
151. **Varki A:** Selectin ligands.  
In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 91: 7390-7397, 1994.
152. **Varki A, Lottenberg R, Griffith R, Reinhard E:** The syndrome of idiopathic myelofibrosis: A clinicopathologic review with emphasis on the prognostic variables predicting survival.  
In: *Medicine-Baltimore* 62:353-371, 1983.
153. **Veyradier A, Jenkins CSP, Fressinaud E, Meyer D:** Acquired von Willebrand syndrome: From Pathophysiology to management.  
In: *Thrombosis and Hemostasis* 84:175-182, 2000.
154. **Waddell CC, Brown JA, Repinecz YA:** Abnormal platelet function in myeloproliferative disorders.

- In: Archives of Pathology and Laboratory Medicine 105:432-435, 1981.
155. **Walker, FJ:** Protein s and the regulation of activated protein c.  
In: Thrombosis and Hemostasis 10:131-138, 1984.
156. **Warmuth M, Danhauser-Riedl S, Hallek M:** Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies.  
In: Annals of Hematology 78:49-64, 1999.
157. **Wehmeier A, Daum I, Jamin H, Schneider W:** Incidence and clinical risk factors for bleeding and thrombotic complications in myeloproliferative disorders.  
In: Annals of Hematology 63:101-106, 1991.
158. **Wehmeier A, Fricke S, Scharf RE, Schneider W:** A prospective study of haemostatic parameters in relation to the clinical course of myeloproliferative disorders.  
In: European Journal of Haematology 45:191-197, 1990.
159. **Wehmeier A, Scharf RE, Fricke S, Schneider W:** Bleeding and thrombosis in chronic myeloproliferative disorders: Relation of platelet disorders to clinical aspects of the disease.  
In: Haemostasis 19:251-259, 1989.
160. **Wehmeier A, Schneider W:** Megakaryocytes and platelets as the main cause for vascular events in chronic myeloproliferative disorders.  
In: Hämostaseologie 16:151-163, 1996.
161. **Wehmeier A, Sudhoff T, Meierkord F:** Relation of platelet abnormalities to thrombosis and hemorrhage in chronic myeloproliferative disorders.  
In: Seminars in Thrombosis and Hemostasis 23:391-402, 1997.
162. **Wehmeier A, Tschoepe D, Esser J, Menzel C, Nieuwenhuis HK, Schneider W:** Circulating activated platelets in myeloproliferative disorders.  
In: Thrombosis Research 61:271-278, 1991.
163. **Welch GN, Loscalzo J:** Homocysteine and atherothrombosis.  
In: New England Journal of Medicine 338:1042-1050, 1998.
164. **Xiao Z, Theroux P, Frojmovic M:** Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet gpIIb/IIIa receptor.  
In: Thrombosis and Hemostasis 81:281-285, 1999.
165. **Yeo EL, Sheppard JAI, Feuerstein IA:** Role of p-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model).  
In: Blood 83:2498-2507, 1994.
166. **Zhao L, Bath P, Heptinstall S:** Effects of combining three different antiplatelet agents on platelets and leukocytes in whole blood in vitro.  
In: Thrombosis and Hemostasis 86 (Suppl.):P2681, 2001.

167. **Zillmann A, Luther T, Mueller I, Kotzsch M, Spannagel M, Kauke T, Oelschlaegel U, Zahler S, Engelmann B:** Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation.  
In: Biochemical and Biophysical Research Communications 281:603-609, 2001.
168. **Zotz RB, Gerhardt A, Pilch J, Maruhn-Debowski B, Rommerskirchen H, Scharf RE:** Inherited risk factors and family history as predictors of thrombosis.  
In: Blood 94 (Suppl. 1, part 1):1081, 1999.

## 9. Tabellarischer Lebenslauf

Von Torben Malte Villmow

20.05.1975	geboren in Mülheim an der Ruhr
1981-1985	Besuch der Matthias-Claudius-Grundschule in Ratingen-Breitscheid
1985-1994	Besuch des Theodor-Heuss-Gymnasiums in Essen-Kettwig
1993	Schiffspraktikum bei Hapag-Lloyd auf der CMS Köln-Express
05/1994	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
09/1994-12/1995	Zivildienst im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenkrankheiten (Tropenkrankenhaus) in Hamburg
01/1996-10/1996	Freiwilliges soziales Jahr bei der Johanniter-Unfall-Hilfe in Ratingen-Lintorf
09/1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
08/1998	Ärztliche Vorprüfung
03/1999	Famulatur Innere Medizin (Abteilung für Infektionskrankheiten) im Evangelischen Krankenhaus in Mülheim a. d. Ruhr
08/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/1999	Beginn der Promotionsarbeit (Thema: Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten Interaktion bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen)
03/2000	Famulatur Innere Medizin (Abteilung Onkologie/Hämatologie) an der Universitätsklinik in Gießen

08/2000 Famulatur Neurologie im Allgemeinen Krankenhaus Ochsenzoll in Hamburg

03/2001 Famulatur Praxis für Allgemeinmedizin in Hamburg

08/2001 Famulatur Innere Medizin (Abteilung Onkologie/Hämatologie) an der Northwestern University of Chicago

03/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2002 Beginn des praktischen Jahres:  
1. Tertial in der neurologischen Abteilung am Uni-Klinikum Gießen

02/2003 2. Tertial in der Abteilung für Innere Medizin in der Asklepiosklinik in Lich

06/2003 3. Tertial im Notfallzentrum Chirurgie sowie in der Viszeralchirurgie des Universitätsspitals Bern (Inselspital) in der Schweiz

01/2004 Beginn des Arzt im Praktikums in der Abteilung für Innere Medizin im St. Marienkrankenhaus in Ratingen

## 10. Danksagung

Ich möchte allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben ganz herzlich danken.

Frau Prof. Dr. B. Kemkes-Matthes danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und ihre jederzeit zuverlässige Unterstützung.

Herrn PD Dr. A. Matzdorff danke ich ganz besonders herzlich für die optimale Betreuung, die sich ein Student wünschen kann.

Bei Frau Nees und Frau Kühnel aus dem Gerinnungslabor möchte ich mich bedanken für ihre geduldige Anleitung in den Techniken zur Bestimmung der Gerinnungsfaktoren sowie zur Bedienung des Durchflußzytometers. Desweiteren für ihre gute Laune und ihre aufmunternden Worte. Es hat viel Spaß gemacht, mit ihnen zusammenzuarbeiten.

Mein Dank gilt natürlich auch den anderen Mitarbeiterinnen des hämatologischen Labors sowie der hämatologischen Ambulanz, die viel zusätzliche Arbeit durch zeitaufwendiges Blutabnehmen hatten.

Nicht zuletzt danke ich allen Patienten und Freiwilligen, ohne die diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Darüber hinaus danke ich Herrn Pabst und Herrn Dr. Bödecker vom Institut für Medizinische Informatik für die Beratung und Durchführung des statistischen Anteils der Arbeit.

Meinem Freund Jörg Wiltink danke ich ganz besonders für seine Anleitung im Umgang mit den unterschiedlichen Computerprogrammen sowie seinen Ergänzungen zum statistischen Teil dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für ihre großzügige Unterstützung während meiner Ausbildung danken, welche auf diese Weise großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten.