

Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und  
Hämostaseologie der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. R. Henschler

**Interaktion der Thrombozyten und des von Willebrand  
Faktors in Patienten mit Essentieller  
Thrombozythämie und Polyzythämia vera**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Elisabeth Kapfhammer  
aus  
Deggendorf  
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. J. Reininger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Hiddemann  
Priv. Doz. Dr. K. Kurnik  
Prof. Dr. Dr. h. c. R. Huß

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser,  
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2013

Meinen Eltern und meiner Großmutter in Dankbarkeit gewidmet

# **Interaktion der Thrombozyten und des von Willebrand Faktors in Patienten mit Essentieller Thrombozythämie und Polyzythämia vera**

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Chronisch Myeloproliferative Erkrankung</b> .....	<b>9</b>
1.1.1 Essentielle Thrombozythämie und Polyzythämia vera .....	10
1.1.1.1 Epidemiologie.....	10
1.1.1.2 Symptome und klinischer Verlauf .....	10
1.1.1.3 Diagnostische Kriterien .....	12
1.1.1.4 Therapiemöglichkeiten .....	14
<b>1.2 Thrombozyten</b> .....	<b>17</b>
1.2.1 Synthese und Morphologie der Thrombozyten.....	17
1.2.2 Ultrastruktur der Thrombozyten .....	18
1.2.3 Oberflächenstruktur der Thrombozyten .....	19
<b>1.3 von Willebrand Faktor</b> .....	<b>21</b>
1.3.1 Synthese, Speicherung und Sekretion.....	21
1.3.2 Struktur und Funktion des von Willebrand Faktors .....	22
<b>1.4 Entstehung eines Thrombus</b> .....	<b>24</b>
1.4.1 Physiologische Gegebenheiten der Blutzirkulation.....	24
1.4.2 Initiale Adhäsion von Thrombozyten.....	24
1.4.3 Aktivierung von Thrombozyten .....	25
1.4.4 Permanente Adhäsion.....	27
1.4.5 Aggregation .....	28
1.4.6 Einfluss der Strömung auf die Thrombusbildung .....	29
<b>2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT</b> .....	<b>32</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 Materialien</b> .....	<b>34</b>
3.1.1 Geräte .....	34
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	35
3.1.2.1 Chemikalien .....	35
3.1.2.2 Gebrauchslösungen .....	38
3.1.2.3 Antikörper .....	39

<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>40</b>
3.2.1 Flussexperimente .....	40
3.2.1.1 Theoretische Grundlagen .....	40
3.2.1.1.1 Untersuchung der Thrombozytenaggregation unter Flussbedingungen .....	40
3.2.1.1.2 Untersuchung der Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen .....	42
3.2.1.2 Zusammensetzung und Kenngrößen der Patienten- und Kontrollgruppe .....	43
3.2.1.3 Präparation der Proben .....	45
3.2.1.3.1 Versuche zur Thrombozytenaggregation .....	45
3.2.1.3.1.1 Nicht zentrifugierte und mehrfach zentrifugierte Probe .....	45
3.2.1.3.1.2 Tauschversuche in der Patientengruppe .....	46
3.2.1.3.1.3 In vitro hergestellte supranormale Thrombozytenzahlen in der Kontrollgruppe ..	47
3.2.1.3.2 Versuche zur Thrombozytenadhäsion .....	47
3.2.1.3.2.1 Präparation vor dem Flussversuch .....	47
3.2.1.3.2.2 Thrombozytenkonzentrationen der Patienten und der Kontrollgruppe für den Adhäsionsversuch .....	48
3.2.1.4 Präparation der Deckgläser .....	49
3.2.1.5 Präparation der Flusskammer .....	49
3.2.1.6 Flussexperiment .....	50
3.2.1.7 Aufzeichnung und Auswertung .....	52
3.2.1.8 Statistische Auswertung – Berechnung der Signifikanzen .....	52
3.2.2 Durchflusszytometrischer Nachweis thrombozytärer Oberflächenstrukturen .....	53
3.2.2.1 Theoretische Grundlagen .....	53
3.2.2.2 Nachgewiesenen Oberflächenmerkmale und eingesetzte Antikörper .....	54
3.2.2.3 Pipettierschema für Probensatz .....	55
3.2.2.4 Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen .....	55
3.2.3 Nachweis des von Willebrand Faktors .....	57
3.2.3.1 Multimerenanalyse des von Willebrand Faktors mittels Gelelektrophorese .....	57
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>58</b>
<b>4.1 Initiale Adhäsion der Thrombozyten unter Strömungsbedingungen</b> .....	<b>58</b>
4.1.1 Thrombozyten gesunder Probanden versus Patienten mit primärer Thrombozytose ..	59
<b>4.2 Durchflusszytometrischer Nachweis von Thrombozytenrezeptoren</b> .....	<b>62</b>
4.2.1. Adhäsionsrezeptoren $\alpha_{IIb}\beta_3$ und GP Ib-V-Komplex .....	62
4.2.2 Thrombozytäre Aktivierungsmarker .....	63
4.2.2.1 Nachweis von P-Selektin .....	64
4.2.2.2 Nachweis von Phosphatidylserin .....	65

<b>4.3 Aggregation von Thrombozyten unter Strömungsbedingungen - Flusseexperimente über Kollagen .....</b>	<b>66</b>
4.3.1 Einfluss methodebedingter Störgrößen auf die Aggregation - Vergleich von nicht zentrifugierten mit mehrfach zentrifugierten Proben gesunder Probanden .....	66
4.3.1.1 Scherrate $800\text{ s}^{-1}$ .....	67
4.3.1.2 Scherrate $1500\text{ s}^{-1}$ .....	69
4.3.1.3 Scherrate $4000\text{ s}^{-1}$ .....	71
4.3.1.4 Aggregationsverhalten nicht zentrifugierter Thrombozyten gesunder Spender unter verschiedenen Scherraten bei statistisch äquivalent prozentualer Flächendeckung .....	73
4.3.2 Patienten mit primärer Thrombozytose: Vergleich von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Proben.....	75
4.3.2.1 Scherrate $800\text{ s}^{-1}$ .....	75
4.3.2.2 Scherrate $1500\text{ s}^{-1}$ .....	77
4.3.2.3 Scherrate $4000\text{ s}^{-1}$ .....	79
4.3.3 Gesunde Probanden versus Patienten mit primärer Thrombozytose.....	81
4.3.4 Patientenspezifische Einflußfaktoren auf die Aggregation .....	84
4.3.4.1 Kinetik der Thrombozytenaggregation gesunder Spender: Thrombozytenwerte im Normalbereich und in vitro hergestellte Thrombozytenwerte im Supranormalbereich.....	84
4.3.4.1.1 Scherrate $800\text{ s}^{-1}$ .....	85
4.3.4.1.2 Scherrate $1500\text{ s}^{-1}$ .....	86
4.3.4.1.3 Scherrate $4000\text{ s}^{-1}$ .....	88
4.3.4.2 Einfluss von Acetylsalicylsäure auf das Aggregationsverhalten der Thrombozyten gesunder Spender und auf Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose.....	89
4.3.4.2.1 Scherrate $800\text{ s}^{-1}$ .....	90
4.3.4.2.2 Scherrate $1500\text{ s}^{-1}$ .....	91
4.3.4.2.3 Scherrate $4000\text{ s}^{-1}$ .....	93
4.3.5 Einfluss der einzelnen Komponenten der primären Hämostase auf die Aggregation ..	94
4.3.5.1 Austausch von Thrombozyten .....	95
4.3.5.1.1 Vergleich von gesunden Spendern, Patienten mit primärer Thrombozytose und in vitro hergestellten Patientenproben mit Ersatz der Thrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender.....	95
4.3.5.1.1.1 Scherrate $800\text{ s}^{-1}$ .....	96
4.3.5.1.1.2 Scherrate $1500\text{ s}^{-1}$ .....	97
4.3.5.1.1.3 Scherrate $4000\text{ s}^{-1}$ .....	98
4.3.5.2 Austausch der Erythrozyten und des Plasmas .....	99

4.3.4.2.1 Vergleich von gesunden Spendern, Patienten mit primärer Thrombozytose und in vitro hergestellten Blutproben von Patienten mit Ersatz der Erythrozyten und des Plasmas durch Erythrozyten und Plasma gesunder Spender .....	99
4.3.4.2.1.1 Scherrate $800\text{ s}^{-1}$ .....	99
4.3.4.2.1.2 Scherrate $1500\text{ s}^{-1}$ .....	100
4.3.4.2.1.2 Scherrate $4000\text{ s}^{-1}$ .....	101
<b>4.4 Multimeren- und Proteinanalyse des von Willebrand Faktors .....</b>	<b>102</b>
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>104</b>
<b>5.1 Diskussion der Methode.....</b>	<b>104</b>
5.1.1 Flusskammer als geeignetes in vitro Modell des Gefäßsystems.....	104
5.1.2 Methodenbedingte Störgrößen .....	104
<b>5.2 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>105</b>
5.2.1 Untersuchung der Thrombozytenadhäsion.....	105
5.2.2 Untersuchung der Thrombozytenaggregation über Kollagen Typ I.....	107
5.2.2.1 Aggregatbedeckte Kollagenoberflächen von nicht zentrifugierten Thrombozyten gesunder Probanden und von Patienten mit primärer Thrombozytose .....	107
5.2.2.2 Einfluss der methodenbedingten Störgrößen .....	109
5.2.2.3 Einfluss krankheitsspezifischer Veränderungen einzelner Komponenten von Patienten mit primärer Thrombozytose auf die Aggregation .....	111
5.2.2.3.1 Aspekt der Thrombozytenzahl im Vollblut .....	111
5.2.2.3.2 Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die Aggregation.....	114
5.2.2.4 Ersatz einzelner Komponenten des Blutes von Patienten mit primärer Thrombozytose durch die entsprechende Komponente gesunder Spender .....	119
5.2.2.4.1 Ersatz der Patiententhrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender.....	119
5.2.2.4.2 Ersatz des Patientenplasmas und der Erythrozyten durch Plasma und Erythrozyten gesunder Spender.....	122
5.2.1.6 Schlussfolgerung hinsichtlich der Aggregation .....	123
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>126</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>128</b>
<b>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>137</b>
<b>9. ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN.....</b>	<b>140</b>

**10. DANKSAGUNG.....143**



# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Chronisch Myeloproliferative Erkrankung

Der Begriff der Chronisch Myeloproliferativen Erkrankung wurde 1951 von dem Hämatologen Dameshek geprägt. Unter diesem Begriff werden mehrere Erkrankungen zusammengefasst, deren gemeinsames Merkmal die monoklonale Expansion einer transformierten, pluripotenten Stammzelle ist, wodurch eine unkontrollierte hämatopoetische Zellproliferation resultiert (Fialkow et al., 1981).

Im Jahre 2001 wurde die Thematik von der Weltgesundheitsorganisation aufgegriffen und eine neue Klassifikation über Tumore des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes erstellt. Definiert sind die in dieser Klassifikation enthaltenen Entitäten hinsichtlich klinischer, morphologischer und molekularer Merkmale. Dabei werden Epidemiologie, Alters- und Geschlechtsverteilung, anatomische Lokalisation und prognostisch relevante Faktoren berücksichtigt.

Die Einteilung umfasst sieben Subtypen (Vardiman et al., 2001):

### **WHO Klassifikation der Chronischen Myeloproliferativen Erkrankungen (CMPE) 2001:**

1. Chronische myeloische Leukämie
2. Chronische Neutrophilenleukämie
3. Chronische Eosinophilenleukämie
4. Polyzythämia vera
5. Chronische ideopathische Myelofibrose
6. Essentielle Thrombozythämie
7. Chronische myeloproliferative Erkrankung, unklassifizierbar

Meist sind die Erkrankungen aus dem Formenkreis der CMPE den einzelnen Subtypen sicher zuzuordnen. Es kommen jedoch auch myeloproliferative Erkrankungen vor, welche die Kriterien eines Subtypen nur teilweise erfüllen und unter dem Begriff der *unklassifizierbaren CMPE* zusammengefasst werden (Thiele et al., 2001).

Im Folgenden werden die zwei Entitäten der Polyzythämia vera und der Essentielle Thrombozythämie erläutert, da diese auch im Fokus dieser Arbeit stehen.

### **1.1.1 Essentielle Thrombozythämie und Polyzythämia vera**

#### **1.1.1.1 Epidemiologie**

Die Inzidenzen der Essentiellen Thrombozythämie und der Polyzythämia vera sind sehr ähnlich. Die Anzahl der neuerkrankten Personen innerhalb eines Jahres liegt für die Essentielle Thrombozythämie zwischen 0,59 bis 2,53/100.000 Einwohner (Fabrizio, 2009). Bei Diagnosestellung sind die meisten Patienten zwischen 50 - 60 Jahre, 20% sind jedoch jünger als 40 Jahre (Johannson et al., 2004). Die frühe Diagnosestellung beruht auf Zufallsbefunden in asymptomatischen Stadien der Erkrankung, die bei Routineuntersuchungen festgestellt werden (Gugliotta et al., 1997; Mitus et al., 1990; Randi et al., 1990).

Die Inzidenz der Polyzythämia vera wird in verschiedenen Studien zwischen 0,7 bis 2,6/100.000 pro Jahr angegeben, wobei hier das mittlere Erkrankungsalter über dem 60. Lebensjahr liegt (Carli, 1994; Bilgrami, 1995; Ania, 1994). Die Polyzythämia vera tritt gehäuft bei Männern auf. Das Verhältnis der Fälle zwischen Männern und Frauen liegt bei 3:2 (McNally, 1997; Berglund 1992).

#### **1.1.1.2 Symptome und klinischer Verlauf**

Die Essentielle Thrombozythämie zeigt sich hinsichtlich des klinischen Bildes sehr vielfältig. Häufig entstehen im Verlauf der Erkrankung Mikrozirkulationsstörungen, die durch Mikrothromben der Endstrombahn verursacht werden (van Genderen et al., 1996). Je nach Lokalisation der Mikrozirkulationsstörungen beklagen die Patienten Erythromelalgien (anfallsartig auftretende, schmerzhafte Rötung an den Extremitäten) und Parästhesien an Händen und Füßen. Zudem treten unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen, Schwindel und Sehstörungen auf (Herold et al., 2009). Hinsichtlich Morbidität und Mortalität stehen thrombembolische Geschehen im Vordergrund (Murphy et al., 1997). Diese thrombembolischen Ereignisse treten im arteriellen als auch im venösen System auf (Petrides, 2005).

Paradoxerweise wird jedoch bei Patienten mit massiv erhöhten Thrombozytenzahlen über 1.000.000/ $\mu$ l klinisch ein höheres Blutungsrisiko beobachtet (Michiels et al., 2006). Diese Patienten neigen zu Epistaxis, postoperativen Nachblutungen und Hämatomen. Für dieses Phänomen werden in der Literatur verschiedene Ursachen beschrieben. Zum einen diskutiert man eine verstärkte Affinität des von Willebrand Faktors zu funktionsuntüchtigen Thrombozyten, welche durch die hohe Produktion und mangelnde Ausreifung bei Ausschüttung aus dem Knochenmark entstehen. In diesem Fall steht der von Willebrand Faktor für die Hämostase nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung (van Genderen, 1996). Zum anderen ist das durch erhöhte Proteolyse verursachte Fehlen der großen Multimere des von Willebrand Faktors für die Erkrankung typisch, und es resultiert ein erworbenes von Willebrand Jürgens Syndrom Typ 2 mit verstärkter Blutungstendenz (Michiels et al., 2006).

Kennzeichnend für die Erkrankung der Polyzythämia vera hingegen ist, dass alle Zellreihen der hämatopoetischen Stammzelle betroffen sind. Es zeigt sich eine absolut erhöhte Erythrozytenzahl und eine gesteigerte Proliferation der Granulo- und Megakaryopoese. Ein weiteres Kriterium der Erkrankung ist ein erhöhter Hämatokritwert und eine Erhöhung der Hämoglobinkonzentration. Durch die veränderte Zusammensetzung des Blutes und die dadurch bedingte Viskositätserrhöhung stellen hier ebenfalls Thrombosen die häufigste Komplikation der Erkrankung dar (Herold et al., 2009; Landolfi et al., 1997). Es besteht ein signifikant erhöhtes Risiko für zerebrovaskuläre Ischämien, Myokardinfarkte, Lebervenenenthrombosen oder peripher ischämische Ereignisse (Michiels et al., 2006). Die Polyzythämia vera bringt es mit sich, dass 20 bis 40% der Patienten aufgrund thromboembolischer Komplikationen versterben (Spivak, 2002). Jedoch auch bei der Polyzythämia vera kann es zu einer hämorrhagischen Diathese kommen, die sich vorwiegend mit Epistaxis, Hämatomen und gastrointestinalen Blutungen äußert (Spivak, 2002).

Ein weiteres Symptom, welches Patienten mit Polyzythämia vera häufig beklagen, ist der aquagene Pruritus. Dieser definiert sich als starker Juckreiz der Haut ohne Effloreszenzen, der meist durch Kontakt mit Wasser verstärkt wird. Ursächlich vermutet man einen erhöhten Histamingehalt der Haut (Westin, 1975; Petrides, 2008). Charakteristischerweise zeigen die Patienten zudem oft eine Rötung des Gesichtes (Plethora) sowie der Extremitäten, die ihnen ein „blühendes Aussehen“

verleiht. Unspezifische Symptome wie Schwindel, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Ohrensausen und Sehstörungen beeinträchtigen die Patienten zusätzlich (Herold et al., 2009).

### **1.1.1.3 Diagnostische Kriterien**

Leitbefund der Essentiellen Thrombozythämie ist die konstante, meist langsam progrediente Erhöhung der Thrombozytenzahl und eine deutliche Vermehrung großer beziehungsweise riesiger Megakaryozyten im Knochenmark (Thiele, 2004). Die WHO erstellt unter Mitberücksichtigung der Knochenmarkshistologie Kriterien zur Diagnosestellung der Essentiellen Thrombozythämie (Thiele, 2001):

#### *Positivkriterien*

- Thrombozytenzahl über  $600.000/\mu\text{l} \times 10^9/\text{l}$
- Knochenmark mit überwiegender Proliferation der Megakaryopoese sowie einer deutlich erhöhten Anzahl großer, reifer Megakaryozyten

#### *Negativkriterien*

- Keine PCV
- Keine CML
- Keine CIMF
- Kein MDS
- Keine reaktive Thrombozytose

Die diagnostischen Kriterien der Polyzythämia vera basieren auf Kriterien der Polyzythämia Vera Study Group von 1971 und den von Person et al. 2001 aufgestellten Merkmalen. Aktuell berücksichtigt der Katalog der American Society of Hematology neben diesen klassischen Kriterien auch neue wissenschaftliche Erkenntnisse. Man unterscheidet hier vier Haupt- („A-Kriterien“) und vier Nebenkriterien („B-Kriterien“) (Campbell, 2005; Pearson, 2000).

Modifizierte WHO-Diagnosekriterien der Polyzythämia vera (Herold et al., 2009):

**A1** Erythrozytenzahl über 5,5 Mio./ $\mu$ l (5,0 Mio./ $\mu$ l) oder Hämoglobinwerte über 18,5 g/dl (16,5 g/dl) oder ein Hämatokrit über 52% (49%) bei Männern (Frauen)

**A2** Ausschluss einer sekundären oder kongenitale primären Erythrozytose

**A3** JAK2-Mutation in kernhaltigen Blut- oder Knochenmarkszellen, oder PRV1-Expression in reifen Neutrophilen oder klonale zytogenetische Abberation in Knochenmarkszellen außer Ph-Chromosomen

**A4** Bildung erythropoetischer Kolonien im Erythropoetin-freien Milieu

**A5** Splenomegalie

**B1** Thrombozytenzahl über 450.000/ $\mu$ l

**B2** Leukozytenzahl über 12.000/ $\mu$ l

**B3** Vermehrung der myelopoetischen Zellen im Knochenmark mit Prominenz der Erythroblasten und Megakaryozyten

**B4** Verminderte oder niedrig-normale Erythropoetinkonzentration im Serum

Die Diagnose einer Polyzythämia vera kann gestellt werden, wenn A1 zusammen mit A2 oder A3 und eine der anderen Kategorien von A oder zusätzlich zwei B - Kategorien vorliegen (Herold et al., 2009).

Bei beiden Erkrankungen wird der molekulare Nachweis der JAK2-V617F-Mutation zur Diagnosestellung herangezogen (Campbell, 2005). Nahezu in allen Fällen der Polyzythämia vera aber auch bei 75% der Patienten mit Essentieller Thrombozythämie kann eine JAK2-V617F-Mutation nachgewiesen werden (Kravlovics et al., 2006). Die Mutation ist gekennzeichnet von dem Austausch der DNA-Base Valin durch Phenylalanin an Position 617 der Janus-Kinase. Diese Punktmutation erhöht die Aktivität dieser Kinase. Bei beiden Erkrankungen führt dies zu einer überempfindlichen Reaktion der hämatopoetischen Stammzelle und zu einer Myeloproliferation (Steark, 2005; Kaushansky, 2005; Lu X, 2005).

#### 1.1.1.4 Therapiemöglichkeiten

Im Vergleich zu anderen Subtypen der CMPE spricht man der Essentiellen Thrombozythämie eine relativ günstige Prognose zu. Die größte Bedrohung im Verlauf der Erkrankung besteht, neben einem erhöhten Risiko an einer akuten Leukämie zu erkranken, in der Entwicklung von Thrombosen beziehungsweise schwerer Blutungen (Herold et al., 2009).

Um gefährdete Patienten zu erkennen und frühzeitig optimal zu behandeln, wurden Risikofaktoren für assoziierte Komplikationen erarbeitet, die eine individuelle Risikostratifikation erlauben. Als wichtigste Risikofaktoren sind ein hohes Lebensalter (über 60 Jahre), frühere thromboembolische Ereignisse sowie kardiovaskuläre Vorerkrankungen zu nennen (Barbui, 2004). Faktoren wie Diabetes mellitus, Adipositas, arterielle Hypertonie und Nikotinabusus spielen zusätzlich eine Rolle (Griesshammer, 2006). Durch diese Kriterien können Patienten, die an Essentieller Thrombozythämie erkrankt sind in Niedrig-, Intermediär- oder Hochrisikogruppen unterteilt werden (Barbui, 2004; Griesshammer, 2006).

Die Niedrigrisikogruppe umfasst Patienten, die jünger als 60 Jahre sind, einen Thrombozytenwert von unter 1,5 Mio./ $\mu$ l zeigen und symptomfrei sind.

Patienten der Intermediärgruppe sind ebenfalls jünger als 60 Jahre, haben Thrombozytenwerte von weniger als 1,5 Mio./ $\mu$ l und zeigen keine beziehungsweise lediglich milde Mikrozirkulationsstörungen. Es liegen jedoch hereditäre thrombophile und/oder kardiovaskuläre Risikofaktoren vor.

Hochrisikopatienten sind hingegen älter als 60 Jahre oder haben Thrombozytenwerte von über 1,5 Mio./ $\mu$ l oder zeigten im Zusammenhang mit der Erkrankung bereits thromboembolische oder hämorrhagische Komplikationen.

Entsprechend der Einordnung der Patienten in die unterschiedlichen Risikogruppen erfolgt die Therapie. Patienten der Niedrigrisikogruppe können zunächst unter engmaschiger Kontrolle klinisch und laborchemisch beobachtet werden. Als Prophylaxe kann Acetylsalicylsäure verabreicht werden. Entspricht das Risikoprofil

eines Patienten der Intermediär- oder Hochrisikogruppe wird eine medikamentöse Therapie empfohlen. Die aktuelle medikamentöse Behandlungsstrategie der Essentiellen Thrombozythämie umfasst die zwei Möglichkeiten der antiaggregatorischen und der thrombozytoreduktiven Therapie (Harrison, 2005). Die antiaggregatorische Therapie wird mittels Acetylsalicylsäure durchgeführt. Da Acetylsalicylsäure als anerkanntes Medikament zur Vermeidung arterieller Thrombosen gilt, ist dies als prophylaktische Therapie anzusehen. Sinnvoll ist die prophylaktische Gabe allerdings nur in der Niedrig- und Intermediärgruppe (Barbui, 2004). Zudem konnte hinsichtlich der Mikrozirkulationsstörungen, insbesondere der Erythromelalgie und der zerebrovaskulären Ereignisse, eine Symptomlinderung durch eine Acetylsalicylsäure - Therapie beobachtet werden (Griesshammer, 2006). Der zytoreduktiven Therapie sind die Medikamente Hydroxyurea, Interferon alpha und Anagrelide zuzuordnen. Thrombozytenreduktive Medikamente kommen vor allem bei Patienten mit einem hohen Risikopotential zum Einsatz. Die Italian Society of Hematology hat einen Standard für die Verwendung der verschiedenen zytoreduktiven Medikamente entworfen, der sich in Bezug auf das Alter der Patienten wie folgt gliedert (Barbui, 2004):

<b>Alter in Jahren</b>	< 18	18-39	40-59	60-69	> 70
<b>Medikament</b>	ANAG / IFN	ANAG / IFN	ANAG / IFN	HU	HU

Hydroxyurea (HU) wird als Standardmedikament der Essentiellen Thrombozythämie verwendet, welches die Thrombozytenzahl und nachweislich das Thromboserisiko reduziert (Cortellazo, 1995). Hydroxyurea ist ein Alkylanz, welches die DNA-Synthese inhibiert und Apoptose induziert. Da es allerdings nicht spezifisch auf Megakaryozyten und Thrombozyten wirkt, bringt es viele Nebenwirkungen mit sich. Die häufigsten Nebenwirkungen unter Hydroxyurea sind die Entwicklung einer Makrozytären Anämie aber auch das Auftreten von allergischen Reaktionen und Fieber. Zudem wird eine potentielle Teratogenität des Medikamentes angenommen. Der Verdacht, dass Hydroxyurea den Übergang der Essentiellen Thrombozythämie in eine akute Leukämie fördert (Finazzi, 2000), konnte bislang ebenfalls nicht ausgeräumt werden.

Interferon alpha (IFN) wird in der Therapie der Essentiellen Thrombozythämie seit 1980 erfolgreich eingesetzt. Bis zu 80% der Krankheitsfälle unter Interferon alpha zeigen sehr gute Verläufe (Barbui, 2004).

Als weiteres Medikament der zytoreduktiven Therapie ist Anagrelid (ANAG) zu nennen. Es hat einen selektiven Effekt auf die Megakaryopoese und wirkt somit ausschließlich auf die Thrombozytenproduktion. Anagrelid zeichnet sich durch eine hohe Effektivität aus, jedoch sind aufgrund hoher Rezidivraten engmaschige Kontrollen notwendig (Petitt, 1997). In Europa ist Anagrelid aufgrund der Studienlage nur als second-line Medikament für Patienten mit hohem Risikoprofil zugelassen, da sich gehäuft arterielle Thrombosen, Blutungen und Übergänge in eine Osteomyelofibrose zeigen (Barosi, 2007).

Die Therapie der Polyzythämia vera ist ähnlich. Mittel der Wahl ist allerdings hier zunächst der konservative Versuch durch regelmäßige Aderlässe oder Erythrozytaphoresen den Hämatokrit unter 45% zu senken. Auf diese Weise wird versucht die Rheologie des Blutes zu normalisieren (Herold et al, 2009). Als antiaggregatorische beziehungsweise prophylaktische Therapie der Thrombozytose kann auch hier Acetylsalicylsäure angewandt werden. Eine medikamentöse zytoreduktive Therapie ist bei der Polyzythämia vera erst indiziert, wenn durch wiederholte Aderlässe der Hämatokrit nicht unter 45% gesenkt werden kann. Medikamente der Wahl sind hier Interferon alpha und Hydroxyurea (Spivak et al, 2003).

Zur Vereinfachung werden die Entitäten der Polyzythämia vera und der Essentiellen Thrombozythämie im Weiteren als primäre Thrombozytose zusammengefasst.



## 1.2 Thrombozyten

### 1.2.1 Synthese und Morphologie der Thrombozyten

Bei einem gesunden Erwachsenen liegen die Thrombozyten in einem Bereich zwischen 150.000 und 400.000/ $\mu\text{l}$ . Die Produktion der Thrombozyten beschränkt sich ausschließlich auf im Knochenmark angesiedelte Megakaryozyten. Megakaryozyten haben einen Durchmesser von bis zu 100  $\mu\text{m}$  mit einem polyploiden Zellkern, der durch wiederholte Kernverdopplung ohne gleichzeitige Zellteilung (Endomitose) zustande kommt (Ravid, 2002). Sind die Megakaryozyten ausgereift, bilden sich lange zytoplasmahaltige Zellausläufer, die als „Proplatelets“ bezeichnet werden. An den Spitzen dieser Zellausläufer bilden sich durch die Vereinigung der im Zytoplasma vorhandenen Kanälchen Demarkationszonen aus. Dadurch werden reife Thrombozyten von dem Megakaryozyten abgeschnürt und in die Peripherie abgegeben (Italiano et al., 2007). Ein Megakaryozyt ist in der Lage täglich 5 - 6 Proplatelets zu formieren und jedes dieser gibt etwa 1000 Plättchen ab (Schmidt et al., 2004). So werden pro Tag durchschnittlich  $15 \times 10^{10}$  Thrombozyten produziert und stehen in der Blutzirkulation zur Verfügung. Die mittlere Lebensdauer der Thrombozyten beträgt 7-10 Tage, bis sie im retikuloendothelialen System der Milz und Leber abgebaut werden (Bruhn et al., 2003).

Thrombozyten sind die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes mit einem Durchmesser von 2 - 4  $\mu\text{m}$ . Charakteristischerweise besitzen Thrombozyten keinen Zellkern. Im nichtaktivierten, ruhenden Zustand weisen die Thrombozyten eine diskoide Zellform auf und besitzen ein durchschnittliches Zellvolumen von 8  $\mu\text{m}^2$  (Morgenstern, 1999).

## 1.2.2 Ultrastruktur der Thrombozyten

Der ultrastrukturelle Aufbau nichtaktivierter Thrombozyten wird morphologisch in vier Bereiche eingeteilt (Morgenstern, 1999):

### 1. *Periphere Zone*

Die periphere Zone beinhaltet die Zytoplasmamembran, die aus verschiedenen Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden besteht. Typischerweise ist diese Membran eine Phospholipidschicht, in welche Membranproteine integriert sind. Unter diesen Proteinen finden sich auch Rezeptoren, die für Adhäsionsproteine und lösliche Agonisten von Bedeutung sind.

### 2. *Strukturelle Zone*

In der submembranös gelegenen sogenannten strukturellen Zone finden sich Mikrotubuli und ein Netzwerk verschiedenster Strukturproteine, die das Zytoskelett bilden. Einen Großteil dieser Proteine nehmen Aktin und das Aktinbindungsprotein (etwa 10–20% des Gesamtproteins) ein. In einem geringeren Anteil finden sich Myosin und Tubulin. Diese Komponenten wahren die diskoide Form des Thrombozyten in Ruhe und sind zudem für die Formveränderung und Pseudopodienbildung während des Aktivierungsvorganges notwendig.

### 3. *Zone der Organellen*

Das Zytoplasma der Thrombozyten ist reich an Mitochondrien, Glykogenspeicher und Speichergranula. Es lassen sich drei Arten an Speichergranula unterscheiden: die dichte Granula, auch dense bodies genannt,  $\alpha$ -Granula und Lysosomen. Die Granula ist spezifisch für Thrombozyten und dient als Speicherort für Substanzen, die für sämtliche Funktionen der Thrombozyten unerlässlich sind.

Die *dichte Granula* ist aufgrund ihrer hohen elektronenoptischen Dichte benannt und enthält viele niedermolekulare Substanzen wie beispielsweise ADP, ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  und Serotonin. Diese Stoffe sind für den Aggregationsvorgang notwendig.

Am häufigsten vertreten ist allerdings die  *$\alpha$ -Granula*. Sie enthält adhäsive Proteine wie Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , Enzyme ( $\alpha_1$ -Antitrypsin), Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF), zytokinähnliche Proteine (Plättchenfaktor-4) und Koagulationsfaktoren (z.B. Faktor V und Plasminogen).

Die lysosomale Granula beinhaltet hydrolytische Enzyme wie Kollagenasen und Elastasen. Diese Art von Granula mit ihren Inhaltsstoffen ist den Lysosomen anderer Zellen sehr ähnlich.

#### *4. Zone des Membransystems*

Desweiteren kann man an nicht aktivierten Thrombozyten des Menschen zwei aufeinander abgestimmte Membransysteme unterscheiden - das offene kanalikuläre System („surface connected open canalicular system“, SCS oder open canalicular system OCS) und das dichte tubuläre System. Das offene kanalikuläre System besteht aus Kanälen, welche von der Plasmamembran aus weit in das Innere des Thrombozyten reichen. Dadurch bietet das offene kanalikuläre System ein Membranreservoir, welches bei Aktivierung exvaginiert werden kann und eine Pseudopodienbildung ermöglicht. Das dichte tubuläre System hingegen ist im Inneren der Thrombozyten angesiedelt und hat keine Verbindung zum Extrazellulärraum. Dies ist ein Abkömmling des rauhen endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten und dient als Hauptspeicherort für intrazelluläres Kalzium, welches für den Aktivierungs- und Aggregationsvorgang von Bedeutung ist.

### **1.2.3 Oberflächenstruktur der Thrombozyten**

Die Oberfläche der Thrombozyten ist mit charakteristischen Rezeptoren ausgestattet, welche aufgrund struktureller Merkmale in vier Gruppen eingeteilt werden: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp (Morgenstern, 1999).

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren. Diese auch als Transmembranrezeptoren einzuordnenden Strukturen reichen durch die gesamte Zytoplasmamembran eines Thrombozyten. Intrazellulär besteht Kontakt zum Zytoskelett der Thrombozyten. Auf der extrazellulären Seite des Rezeptors befinden sich Bindungsstellen für Liganden. Grundsätzlich bestehen diese Adhäsionsrezeptoren aus Heterodimeren mit einer nichtkovalent verbundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\beta$ -Untereinheit definiert die strukturelle Einteilung und die  $\alpha$ -Untereinheit die Spezifität; erst beide zusammen bilden den funktionellen Rezeptor. Integrine interagieren mit einer Vielzahl an Liganden wie Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Thrombospondin und dem von

Willebrand Faktor, welche in der Gefäßwand als auch im Plasma vorkommen können (Gawaz, 1999). Charakteristisch für diese Art von Rezeptoren ist zudem die Eigenschaft durch extrazelluläre Einflüsse die Konformation - und somit die Bindungsstelle für Liganden - zu ändern. Auf diese Weise gehen diese Rezeptoren von einem niedrigaffinen in einen hochaffinen Zustand über (Gawaz, 1999; Shattil, 2004).

Ein Vertreter aus der Gruppe der Integrine ist der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor, der mit 60.000-100.000 Kopien pro Thrombozyt am häufigsten auf dessen Oberfläche exprimiert wird. Dieser Rezeptor findet sich in der Plasmamembran, in den Kanälen des offenen kanalikulären Systems und in der Membran der  $\alpha$ -Granula. Auf ruhenden Thrombozyten liegt der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor zu 70% sowie im niedrigaffinen Zustand vor. In dieser Konformation ist der Rezeptor ausschließlich in der Lage immobilisiertes Fibrinogen zu binden. Erfolgt eine Aktivierung der Thrombozyten, wird die Membran des offenen kanalikulären Systems nach außen gestülpt und die restlichen 30% des Rezeptors gelangen an die Oberfläche (Gawaz, 1999). Desweiteren geht der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor nach Aktivierung in die hochaffine Form über (Shattil, 2004) und die Affinität des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors insbesondere zu dem von Willebrand Faktor erhöht sich (Jung et al., 2000).

Ein weiterer Adhäsionsrezeptor ist der GPIb-V-IX-Komplex. Dieser Rezeptor gehört in die Gruppe der leuzinreichen Glykoproteine und liegt in etwa 25.000 Kopien auf einem Thrombozyten vor (Gawaz, 1999). Der Rezeptor besteht aus vier Untereinheiten (GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPV, GPIX) wobei der GP-Ib $\alpha$ -Untereinheit die zentrale Rolle der Rezeptorfunktion zugesprochen wird. Seine Hauptaufgabe liegt in der Adhäsion zirkulierender Thrombozyten an immobilisiertem von Willebrand Faktor auf freiliegenden Kollagenfasern (Gawaz, 1999).

Zudem tragen Thrombozyten P-Selektin aus der Gruppe der Selektine auf ihrer Oberfläche. Dies ist auf einem nichtaktivierten Thrombozyten mit 800 Kopien zu finden. P-Selektin ist in der  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert. Findet eine Aktivierung der Thrombozyten statt, wird das P-Selektin durch Exozytose auf die Zelloberfläche transportiert und dort exprimiert (Gawaz, 1999). Durch die Aktivierung kann ein Thrombozyt auf seiner Oberfläche bis zu 13.000 Kopien aufweisen. Demzufolge

kann das P-Selektin unter Berücksichtigung der Kopienanzahl als Marker einer abgelaufenen Thrombozytenaktivierung gewertet werden (Michelson, 1996). P-Selektin stellt eine zusätzliche Bindungsstelle für den von Willebrand Faktor dar und dient somit ebenfalls der Adhäsion von Thrombozyten an Gefäßwandläsionen (Gawaz, 1999; Padilla, 2004).

### **1.3 von Willebrand Faktor**

#### **1.3.1 Synthese, Speicherung und Sekretion**

Der von Willebrand Faktor gehört zu den Adhäsivproteinen, welcher als sogenanntes „Brückenmolekül“ den Kontakt zwischen subendothelialen Matrixkomponenten verletzter Gefäße und Thrombozyten herstellt (Mendolicchio et al., 2005). Die Synthese des von Willebrand Faktors findet ausschließlich in Endothelzellen und Megakaryozyten statt. Das in den Megakaryozyten produzierte Protein findet sich in der  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten wieder, in Endothelzellen wird der von Willebrand Faktor in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert (Weibel, 1964; Gawaz, 1999). Die Sekretion des von Willebrand Faktors aus den Endothelzellen erfolgt entweder apikal in das Blutvolumen oder basolateral in die subendotheliale Matrix (Mendolicchio et al., 2005). Immunhistochemische Daten belegen, dass der von Willebrand Faktor ausschließlich in der subendothelialen Matrix von Arterien, Arteriolen und großen Venen eingelagert ist (van der Kwast, 1986). Das Gen des von Willebrand Faktors ist auf dem Chromosom 12 lokalisiert und besteht aus 52 Exons. Die kodierende Sequenz enthält 8.439 Nukleotide für 2.813 Aminosäuren (Pötzsch, 2010).

Die Synthese des von Willebrand Faktors beginnt mit der Translation eines einkettigen Proteins, dem Prä-Pro-vWF, welches zum endoplasmatischen Retikulum transportiert wird. Dort entsteht nach mehrstufiger Prozessierung und Ausbildung von Disulfidbrücken das Pro-vWF-Dimer. Diese Dimere werden an den Golgi-Apparat weitergeleitet, wo sie sich zu Multimeren zusammenlagern (Pötzsch, 2010). Abhängig von der Anzahl der miteinander verknüpften Dimere entstehen Multimere mit einem Molekulargewicht zwischen 250.000 Dalton (Monomeren) und  $20 \times 10^6$  Dalton (Ruggeri, 1999). Der im Plasma zirkulierende von Willebrand Faktor erreicht

eine Konzentration von 5-10 µg/ml (Tomokiyo et al., 2004) und kann in einer Länge von bis zu 1 µm vorliegen (Fowler et al., 1989).

### **1.3.2 Struktur und Funktion des von Willebrand Faktors**

Der von Willebrand Faktor ist modular mit den Domänen in der Reihenfolge D1-D2-D´-D3-A1-A2-A3-D4-B-C1-C2-CK aufgebaut. Die funktionellen Domänen besitzen Bindungsstellen für lösliche und zelluläre Komponenten, unter anderem für den Gerinnungsfaktor VIII, Kollagen, Heparin sowie für den Thrombozytenrezeptor GPIb-V-IX-Komplex (Ruggeri 2001; Wagner 1990).

Zunächst wird der von Willebrand Faktor als hochmolekulares Protein produziert und sezerniert. Das Protein in seiner ursprünglichen Beschaffenheit hat eine hohe Reagibilität, eine hohe Affinität und eine starke Bindungsfähigkeit zu dem GPIb-V-IX-Komplex. (Federici, 1989). Das von Endothelzellen frisch sezernierte und noch größte von Willebrand Faktor – Molekül geht die stärkste Bindung mit dem Thrombozytenrezeptor GPIb-V-IX-Komplex ein (Arya, 2002). Jedoch sind diese größten von Willebrand Faktor Multimere bei gesunden Menschen im zirkulierenden Blut nicht nachweisbar (Moake, 1982). Man nimmt an, dass der supranormale von Willebrand Faktor noch an der Endotheloberfläche unmittelbar nach Sekretion durch die Protease ADAMTS-13 enzymatisch verkleinert wird. Die für diese Spaltung zuständige Protease ADAMTS-13 („a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motif“) konnte von zwei Forschern (Furlan et al., 1996; Tsai et al., 1996) nachgewiesen werden. Als Schnittstelle für die enzymatische Zerkleinerung des ursprünglichen größten von Willebrand Moleküls wird die A2-Domäne beschrieben (Reininger, 2008). Durch Bindung des von Willebrand Faktors mittels der D´D3 Domäne an das P-Selektin von Endothelzellen oder aktivierter Thrombozyten wird die A2-Domäne des von Willebrand Moleküls für die Metalloprotease ADAMTS-13 zugänglich (Pötzsch, 2010; Padilla, 2004). Die enzymatische Spaltung wird zusätzlich durch den im Blutfluss herrschenden Scherstress begünstigt (Furlan et al., 1996). Durch die mechanischen Zugkräfte des Blutflusses, wird das globuläre Protein gestreckt, die A2-Domäne somit noch besser als Angriffsstelle für das Enzym zugänglich (Bienkowska 1997; Emsley 1998; Schneider, 2007) und die Spaltung des größten von Willebrand Faktor Multimers möglich.

Die Kollagenbindung des von Willebrand Faktors an die subendotheliale Matrix im Falle einer Gefäßwandläsion findet hauptsächlich über die A3-Domäne statt (Ruggeri, 2003). Zusätzlich besteht eine weitere Bindungsmöglichkeit für Kollagen Typ IV an der A1-Domäne (Varughese et al., 2002)

Der von Willebrand Faktor hat verschiedene Funktionen. Eine dieser stellt die Transport- und Schutzfunktion für den Gerinnungsfaktor VIII dar (Pötzsch, 2010). Unter physiologischen Gegebenheiten sind 95% des Gerinnungsfaktors VIII an die D3-Domäne des von Willebrand Faktors gebunden. In dieser Konstellation schützt der von Willebrand Faktor den Gerinnungsfaktor VIII vor proteolytischem Abbau durch Protein C und aktivierten Faktor V (Mazurier, 1996). Die Schutzfunktion spiegelt sich in der Halbwertszeit wieder, die bei an von Willebrand Faktor gebundenem Gerinnungsfaktor VIII mit zwölf Stunden im Gegensatz zu ungebundenem Gerinnungsfaktor VIII mit drei Stunden steht (Lutze, 1999).

Eine weitere Funktion des von Willebrand Faktors ist es als Transportprotein für Osteoprotegerin zu agieren. Osteoprotegerin besitzt eine regulatorische Funktion im Knochenstoffwechsel, zudem spielt es eine Rolle im Endothelzellstoffwechsel. Man spricht Osteoprotegerin einen präventiven Charakter hinsichtlich der Entstehung von Arteriosklerose zu (Pötzsch, 2010).

Die zentrale Aufgabe des von Willebrand Faktors liegt jedoch in der primären Hämostase (Pötzsch, 2010). Im zirkulierenden Blut liegt der von Willebrand Faktor zunächst als globuläres Protein vor (Reininger, 2008). Hierbei sind intramolekulare Bindungsstellen so ausgerichtet, dass eine spontane Anlagerung von Thrombozyten an den von Willebrand Faktor nicht stattfinden kann. Durch die auftretenden Scherkräfte des Blutflusses an einer Gefäßwandläsion und durch die einwirkenden Kräfte der Strömung wird der von Willebrand Faktor gestreckt (Schneider, 2007). Dadurch werden die A1-Domänen des von Willebrand Faktors, das heißt die Bindungsstellen des GPIb-V-IX-Komplexes zugänglich und vermitteln die Thrombozytenadhäsion an subendothelialen Strukturen. Diese Bindung an sich besitzt eine hohe Dissoziationskonstante und ermöglicht keine dauerhafte, irreversible Verbindung (Savage, 1996; Reininger, 2006).

## **1.4 Entstehung eines Thrombus**

### **1.4.1 Physiologische Gegebenheiten der Blutzirkulation**

Physiologischerweise zirkulieren die Thrombozyten in unserem Körperkreislauf in einem intakten geschlossenen Gefäßsystem. Von gesunden Endothelzellen der Gefäßwand werden antithrombotische Substanzen wie NO und Prostazyklin zum Schutz gegen spontane Adhäsion und Aggregation sezerniert. Zudem besitzt die Endothelzellschicht eine Glykokalix mit negativer Oberflächenladung, die vermutlich eine spontane Anlagerung der ebenfalls negativ geladenen Thrombozyten und deren Aggregation an gesundem Gefäßendothel verhindert (Pötzsch, 2010).

Im Falle einer Gefäßwandverletzung oder unter pathologischen Veränderungen des Endothels, wie beispielsweise einer Plaqueablagerung im Rahmen einer Stenose, wird dieses System jedoch aus dem Gleichgewicht gebracht. Bei Gefäßverletzungen werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt, welche Bindungsstellen für Adhäsionsproteine (von Willebrand Faktor, Fibrinogen und Fibronectin) besitzen und somit thrombogenes Potential aufweisen. Zudem sind im Subendothel wie bereits erläutert Adhäsionsproteine (von Willebrand Faktor, Fibrinogen und Fibronectin) in gebundener Form vorhanden (Turitto et al, 1985).

### **1.4.2 Initiale Adhäsion von Thrombozyten**

Entsteht eine Gefäßwandläsion, kommt es zunächst im Rahmen der primären Hämostase zu einer primären, reversiblen Adhäsion von Thrombozyten. Dabei adhären einzelne nicht aktivierte Thrombozyten an durch die Verletzung freigelegten subendothelialen Komponenten der Gefäßwand. Hierfür ist der von Willebrand Faktor als sogenanntes „Brückenmolekül“ zwischen den Thrombozyten und dem Kollagen maßgeblich. Der im Plasma zirkulierende von Willebrand Faktor bindet über die A3 - Domäne an subendotheliales Kollagen. Durch den Blutfluss wird das globuläre Protein gestreckt und die Bindungsstelle für Thrombozyten - die A1-Domäne des von Willebrand Faktors wird zugänglich (Reininger, 2006). An dieser Bindungsstelle erfolgt die Adhäsion seitens der Thrombozyten mittels des thrombozytären GPIb-V-IX-Rezeptor Komplexes (Pötzsch, 2010). Das initiale Abbremsen und Anhaften der Thrombozyten erfolgt aktivierungsunabhängig. Die Adhäsion ist als reversible „selektin-ähnliche“ Bindung zwischen dem von



Willebrand Faktor und dem GPIb-V-IX-Komplex anzusehen, welche einerseits durch eine hohe Bindungsrate andererseits auch durch eine hohe Dissoziationsrate charakterisiert ist (Donadelli, 2002). Findet nach der Adhäsion keine Aktivierung statt, fließen Thrombozyten, die zunächst nur über diese Bindung Kontakt zu der subendothelialen Matrix haben, nach kurzem Anhaften wieder mit dem Blutfluss weiter (Ruggeri, 2007; Reininger, 2008).

### **1.4.3 Aktivierung von Thrombozyten**

Im Zuge der Thrombusbildung folgt der primären Adhäsion die Aktivierung der Thrombozyten. Zunächst findet eine Aktivierung der ersten Thrombozytenschicht statt, welche die Gefäßwandläsion bedeckt (Ruggeri, 2002). Die Aktivierung der Thrombozyten wird durch verschiedene Mechanismen verursacht.

Einen Aktivierungsmechanismus stellt die Interaktion zwischen dem GPIb-V-IX-Rezeptor - Komplex und dem von Willebrand Faktor selbst dar. Darüber hinaus können jedoch andere lösliche Agonisten eine Aktivierung und somit morphologische und funktionelle Veränderungen der Thrombozyten hervorrufen. Diese Agonisten werden teils von den Thrombozyten sezerniert, teils werden sie vom umliegenden Gewebe oder im Plasma gebildet (Morgenstern, 1999; Gawaz, 1999).

Als löslicher Mediator der Aktivierung ist das Adenosindiphosphat (ADP) zu nennen. ADP wird in großen Mengen in der dichten Granula der Thrombozyten gespeichert (Morgenstern, 1999). Sezerniert wird dieses unmittelbar nach der initialen Adhäsion der Thrombozyten an dem von Willebrand Faktor. Eine weitere Freisetzung von ADP erfolgt aus umliegenden intakten Endothelzellen, Gefäßwandgewebe als auch aus Erythrozyten. ADP bindet an spezifische purinerge P2X-Rezeptoren der Thrombozyten. Diese Bindung führt zu einem raschen Kalziumeinstrom und zu einer Formveränderung der Thrombozyten (Gawaz, 1999). Desweiteren führt die ADP-Bindung zu einer Konformationsänderung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , welches eine wesentliche Bedeutung hinsichtlich der Thrombusformation einnimmt. Der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor verändert seine Konformation und geht von dem niedrigaffinen in den hochaffinen Zustand über (Mazzucato, 2002).

Zudem dient das während der Aktivierung im Thrombozyten entstehende Thromboxan A<sub>2</sub> zur Erhaltung der Aktivierung und der Aggregation im späteren Verlauf. Thromboxan A<sub>2</sub> entsteht als Produkt aus Arachidonsäure nach Prozessierung durch die Cyclooxygenase-1 und Thromboxansynthetase. Thromboxan A<sub>2</sub> wirkt allerdings aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit nur lokal. Durch einen erhöhten Thromboxan A<sub>2</sub> Spiegel wird zunächst eine „shape change“-Reaktion verursacht und im Weiteren wird die Aggregation durch einen Anstieg des zytoplasmatischen Kalziumspiegels unterhalten (Ruggeri, 2002).

Den potentesten Thrombozytenaktivator stellt allerdings das Thrombin dar. Die Bildung von Thrombin findet an zellulären Strukturen insbesondere an der aktivierten, thrombozytären Oberfläche statt. Thrombin bindet an G-Protein-abhängigen proteinaseaktivierenden Rezeptoren, von denen vier Subtypen auf der Thrombozytenoberfläche identifiziert wurden. Die thrombinsensitiven Rezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4 und der durch Trypsin aktivierte Rezeptor PAR-2 weisen abhängig von der Thrombinkonzentration unterschiedliche Bindungsstärken zum Thrombin auf (Nystedt et al, 1994). Während der Aktivierung der Thrombozyten kommt es auf der thrombozytären Oberfläche zu einer gesteigerten Thrombinbildung. Durch die Bindung zwischen dem GPIIb-IIIa-Komplex und Thrombin wird der Aktivierungsprozess unterhalten (Ruggeri, 2002). Darüber hinaus vermittelt Thrombin die Konsolidierung des hämostatischen Pfropfes mittels Fibrinvernetzung. Dieser Schritt stellt die Voraussetzung zur Bildung eines stabilen Thrombus dar (Gawaz, 1999; Heemskerk, 2002).

Jeder der oben genannten Thrombozytenaktivatoren bindet an jeweils einen spezifischen Rezeptor der Thrombozyten und bewirkt über Signaltransduktionswege intrazelluläre Veränderungen. Die Signaltransduktionswege erfolgen größtenteils über drei große Enzymkomplexe: die Phospholipase C, die Phospholipase A<sub>2</sub> und die Adenylatzyklase. Unabhängig vom Rezeptor und dessen Signaltransduktionsweg mündet die Aktivierung jedoch, in dem biochemisch gesehen, wichtigsten Schritt - der Erhöhung des zytoplasmatischen Kalziumspiegels (Gawaz, 1999). In der Regel sind zwei aufeinanderfolgende zytoplasmatische Kalziumpeaks messbar. Die erste Kalziumfreisetzung erfolgt bei Interaktion von immobilisiertem von Willebrand Faktor mit thrombozytären GPIIb-IIIa-Rezeptoren

und der durch Scherstress in verletzten Blutgefäßen ausgeübten mechanischen Kraft im Sinne von vermehrt auftretenden Strömungsturbulenzen. Ein weiterer transmembranärer Kalziumanstieg mit höherer Amplitude und längerer Dauer wird durch die ADP-Wirkung, die in Abhängigkeit zur GPIIb-V-IX-Rezeptorstimulation erfolgt, ausgelöst. (Mazzucato, 2002). Zudem findet man thrombininduzierte, PAR-abhängige aufeinanderfolgende Kalziumfreisetzungen bei Bindung von Thrombin an die thrombozytäre Oberfläche (Covic et al, 2000).

Die Aktivierung der Thrombozyten führt zu einer irreversiblen Formveränderung. Dieser bereits erwähnte „shape-change“ ist als erste morphologische Veränderung an aktivierten Thrombozyten zu beobachten (Sanderson, 1996). Dabei geht der ursprüngliche, nicht aktivierte diskoide Thrombozyt durch Aktinpolymerisation und Zytoskelettorganisation in eine sphäroide Form über und dessen Oberfläche vergrößert sich auf bis zu  $13 \mu\text{m}^2$  (Bauer et al., 2002).

Ebenfalls während des Aktivierungsvorganges findet eine Reorganisation der thrombozytären Plasmamembranproteine statt. Die Plasmamembran besteht aus Phospholipiden, welche in dieser inhomogen verteilt sind. Von Bedeutung ist das Phosphatidylserin, welches in ruhenden Plättchen zur zytosolischen Seite hin ausgerichtet ist. Bei einer Aktivierung der Thrombozyten findet ein „flip-flop-Mechanismus“ innerhalb der Plasmamembran statt. Vor allem saure Phospholipide, zu denen auch das Phosphatidylserin gehört, gelangen an die Oberfläche (Hemker et al., 1983). Dadurch erhöht sich der Anteil des Phosphatidylserins an der Oberfläche eines Thrombozyten von 2% auf 12%. Phosphatidylserine, die unter anderem Bindungsstellen für Faktoren der Gerinnungskaskade z.B.: Va, VIIIa, IXa und Xa darstellen, erhöhen durch die Veränderung in der Plasmamembran die prokoagulatorische Aktivität der Thrombozyten (Kehrel, 2003).

#### **1.4.4 Permanente Adhäsion**

Ist nun die erste Schicht der Thrombozyten, die über der Gefäßwandverletzung liegt, aktiviert, findet eine Stabilisierung statt. Dies geschieht über die Interaktion des von Willebrand Faktors mit dem  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Rezeptor, sobald dieser durch die aktivierungsabhängige Konformitätsänderung in den hochaffinen Zustand übergegangen ist. Die Bindung zwischen dem von Willebrand Faktor und dem  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -

Rezeptor stellt eine wesentlich stabilere Bindung als die Interaktion zwischen dem von Willebrand Faktor und dem GPIb-IX-V-Komplex, welche im Rahmen der initialen Adhäsion stattfindet, dar (Coller et al, 1989). Damit sich weitere Schichten von Thrombozyten auf dieser ersten gefäßwandläsionsbedeckenden Schicht anhaften können, ist erneut der initiale Schritt der Adhäsion notwendig - nun allerdings zwischen einem bereits angelagerten Thrombozyten und einem vorbeiströmenden Thrombozyten. Das erfordert das Anlagern des von Willebrand Faktors auf der Thrombozytenoberfläche der schon gebundenen, aktivierten Thrombozyten über den GPIb-IX-V-Rezeptor. Ist dies erfolgt, können vorbeiströmende Thrombozyten abgebremst und angelagert werden. Die Stabilisierung erfolgt ebenfalls mittels der Bindung zwischen dem Integrin  $\alpha_{11b}\beta_3$  und dem von Willebrand Faktor. Auf diese Weise lagern sich mehrere Schichten von Thrombozyten auf die Gefäßwandläsion, dichten diese ab und führen zu einem Thrombus (Reininger AJ, zit. n. Hämostaseologie, Pötzsch 2010).

#### **1.4.5 Aggregation**

Als Thrombozytenaggregation bezeichnet man den Prozess einer festen, irreversiblen Zusammenlagerung von mehr als zwei Thrombozyten. Die Aggregation führt zur Bildung eines stabilen Thrombus, wobei Fibrinogen als lösliche Plasmakomponente einen wichtigen Interaktionspartner darstellt (Gawaz, 1999). Physiologischerweise findet sich Fibrinogen im Blutplasma. Durch das bei der Aktivierung von Thrombozyten freigesetzte Thrombin wird Fibrinogen enzymatisch in Fibrinmonomere und Fibrinogenspaltprodukte gespalten.

Eine weitere bedeutende Rolle hinsichtlich der Aggregation spielt die Konformationsänderung des thrombozytären  $\alpha_{11b}\beta_3$ -Rezeptors (Ruggeri, 2007). Durch die Konformitätsänderung des Rezeptors kommt es neben einer verstärkten Affinität zu dem von Willebrand Faktor zu einem erhöhten Bindungsvermögen der Fibrinbindungsstellen an dem  $\alpha_{11b}\beta_3$ -Rezeptor. Die Bindungsfähigkeit an den Fibrinbindungsstellen wird zusätzlich durch lösliche Agonisten wie z.B.: Thrombin, ADP und Epinephrin verstärkt und ist von einem ausreichend hohen  $Ca^{2+}$ -Spiegel abhängig. Eine stabile Aggregatbildung erfolgt ausschließlich durch die Fibrinvernetzung der  $\alpha_{11b}\beta_3$ -Rezeptoren (Ruggeri, 1999).

Die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor-Fibrin-Interaktion ist initial reversibel. Allerdings bei weiterer Sekretion von Granulainhaltsstoffen der Thrombozyten geht die Bindung zwischen dem  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor und dem Fibrin in eine irreversible Phase (sekundäre Aggregationsphase) über (Gawaz, 1999; Ruggeri, 2002). Durch Fortschreiten der Aggregation und Erreichen einer bestimmten Konzentration der Freisetzungserzeugnisse kommt es unter Verlust der Thrombozytenmembranen zu dem Verschmelzen der Thrombozyten (Savage et al., 2001) wodurch schlussendlich ein Thrombozytenaggregat entsteht.

Die Aggregation wird primär durch sezernierte Agonisten wie ADP, Thromboxan A2 und Thrombin unterhalten, dennoch sind für die Rekrutierung weiterer Thrombozyten aus dem Blutfluss in den wachsenden Thrombus, funktionsfähige Adhäsionsrezeptoren notwendig (Reininger AJ, zit. n. Hämostaseologie, Pötzsch 2010).

#### **1.4.6 Einfluss der Strömung auf die Thrombusbildung**

Ein wesentlicher Faktor, welcher die Thrombusbildung beeinflusst, ist der Blutfluss in unserem Blutkreislauf an sich. Die physiologischen Gegebenheiten des Blutflusses innerhalb der Gefäße werden mittels Scherraten beschrieben. Diese Scherraten sind vom Durchmesser des Gefäßes, der Flussgeschwindigkeit und der Viskosität des Blutes abhängig. Eine Scherrate gibt den relativen Geschwindigkeitsgradienten zwischen angrenzenden Flüssigkeitsschichten innerhalb des Blutes wieder und wird mit der Einheit  $s^{-1}$  bzw.  $cm \times s^{-1} \times cm^{-1}$  angegeben. Die höchsten Scherraten eines Geschwindigkeitsprofils finden sich in unmittelbarer Nähe der Gefäßwand (folgende Angaben beziehen sich auf die sogenannte „Wandscherrate“) (Ruggeri, zit. n. Hemostasis and Thrombosis, Colman et al., 2001).

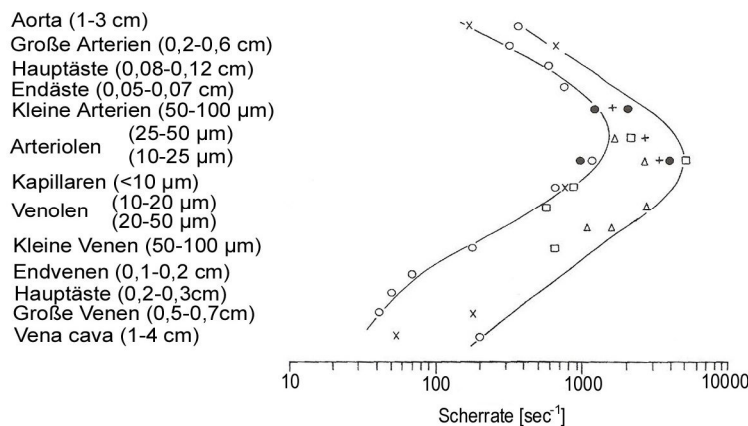


Abb. 1: Vorherrschende Scherraten in verschiedenen Abschnitten des Gefäßsystems

Die Abbildung zeigt schematisch die typischen Scherraten, welche in unterschiedlichen Abschnitten des Gefäßsystems gefunden werden. Die Scherraten wurden bei physiologischer Rheologie und unter der Annahme einer Newton'schen Flüssigkeit berechnet. (x) Mensch, (o) Hund, (+) Katze, (●) andere Spezies, ( $\Delta$ ) Kaninchen, ( $\square$ ) Katze (Ruggeri, zit. n. Hemostasis and Thrombosis, Colman et al., 2001).

Die Abb. 1 zeigt, dass sich in Gefäßen mit geringerem Durchmesser die Scherraten erhöhen. In großen arteriellen als auch venösen Gefäßen wie der beispielsweise der Aorta oder der Vena cava, finden sich geringere Scherraten von  $200 \text{ s}^{-1}$ .

In Abhängigkeit der unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten, wie sie in verschiedenen Abschnitten unseres Gefäßsystemes herrschen, sind für die Adhäsion der Thrombozyten unterschiedliche Proteine notwendig (Jackson et al, 2003). Bei Scherraten von bis zu  $1000 \text{ s}^{-1}$ , wie sie in Venen, mittelgroßen Arterien und Kapillaren vorkommen (Abb. 1), wird die Adhäsion der Thrombozyten an einer verletzten Gefäßwand durch mehrere Adhäsionsproteine und deren Liganden vermittelt. Verschiedene Liganden-Rezeptoren Systeme wie Kollagen und GP VI, Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , Fibronectin und Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Jackson et al., 2006; Nesbitt et al. 2006), Fibrinogen und Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Ruggeri, 1997; Savage 1998, Savage, 1996) aber auch die Interaktion zwischen GPIb-V-Rezeptor an gebundenem von Willebrand Faktor vermitteln hier die Adhäsion. Unter höheren Scherraten ab etwa  $1500 \text{ s}^{-1}$  ist die initiale Adhäsion ausschließlich von der Interaktion des auf der Thrombozytenoberfläche exprimierten GP Ib-V Rezeptorkomplexes und dem an die subendotheliale Matrix gebundenen von Willebrand Faktor abhängig (Gawaz, 1999; Ruggeri, 2002).

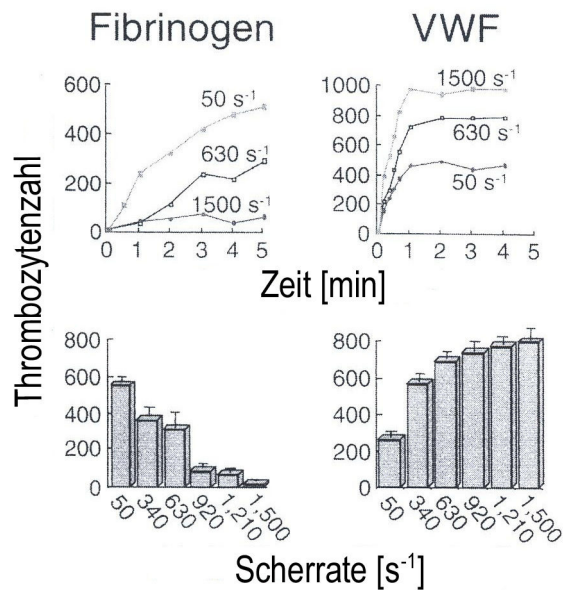


Abb. 2: Bedeutung der Plasmaproteine unter verschiedenen Scherraten

Die Abbildung zeigt die Interaktionen der Thrombozyten mit den Plasmaproteinen Fibrinogen und von Willebrand Faktor in Abhängigkeit zur Scherrate.

Obere Abbildung: Anzahl der Thrombozyten, die sich an die mit Substrat bedeckte Oberfläche in Abhängigkeit der Zeit binden. Unter Fibrinogen zeigt sich eine konstante Zunahme der Thrombozyten über 5 Minuten im Vergleich zu einer maximal bedeckten Fläche nach etwa einer Minute bei einer Beschichtung mit von Willebrand Faktor.

Untere Abbildung: Anzahl der einzelnen Thrombozyten die an Fibrinogen (links) und von Willebrand Faktor (rechts) nach 5 Minuten binden. Unter der Scherrate von 50 s<sup>-1</sup> wird die Interaktion der Thrombozyten hauptsächlich mittels Fibrinogen und den entsprechenden Liganden vermittelt. Unter einer Scherrate von 1500 s<sup>-1</sup> ist Fibrinogen nicht mehr effektiv und der von Willebrand Faktor wird als Adhäsionsprotein benötigt (Ruggeri, zit. n. Hemostasis and Thrombosis, Colman et al., 2001).

Durch Bindung der Liganden an den Kollagen-, Fibronectin- und Lamininrezeptoren, welche sich ebenfalls auf der Thrombozytenoberfläche befinden, werden die adhärenen Thrombozyten stabilisiert.

Die primäre Adhäsion kann über eine Aktivierung zu Formveränderung und Spreizung der adhärenen Thrombozyten führen. Daraufhin folgen die Sekretion der Granulainhaltsstoffe und die Aggregation (Pötzsch, 2001).

## 2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Die Erkrankungen der Polyzythämia vera und der Essentiellen Thrombozythämie sind durch supranormale Thrombozytenwerte gekennzeichnet. Als eine der häufigsten Komplikation ist bei beiden Erkrankungen die Thrombose zu nennen. Von verschiedenen Forschungsgruppen wird jedoch unter Thrombozytenwerte von über 1.000.000/ $\mu$ l eine hämorrhagische Diathese beschrieben. Diese Blutungsneigung wird auf das reaktive beziehungsweise kompensatorische Fehlen der großen Multimere des von Willebrand Faktors zurückgeführt, welche insbesondere für die primäre Hämostase unter erhöhten Strömungsbedingungen von Bedeutung sind (Michiels JJ, 2006).

In unserer Arbeit stellt sich zunächst die zentrale Frage, wie sich Thrombozyten der Patienten mit Essentieller Thrombozythämie und Polyzythämia vera bei Strömung über eine thrombogene Oberfläche verhalten. Hierbei wurde die Adhäsion als auch die Aggregation mit Echtzeitmikroskopie unter verschiedenen Strömungsbedingungen und im Vergleich zu gesunden Spendern beobachtet und analysiert. Aufgrund des vielfältig beschriebenen Verlustes der großen Multimere des von Willebrand Faktors im Sinne eines erworbenen von Willebrand Jürgens Syndromes analysierten wir die Proben unserer Patienten auf dieses Merkmal hin. Desweiteren galt es zu prüfen, ob die Auswirkungen dieses Verlustes mittels Echtzeitmikroskopie nachzuweisen sind. Ebenso untersuchten wir die Thrombozyten der Patienten hinsichtlich quantitativer und qualitativer Veränderungen. Neben der Verteilung der Rezeptoren auf den Thrombozyten wurde isoliert ihre Aggregationsfähigkeit unter Echtzeitmikroskopie beobachtet.

Die Therapie der essentiellen Thrombozythämie und Polyzythämia vera, insbesondere die Handhabung der Thromboseprophylaxe wird von mehreren Forschungsgruppen kontrovers diskutiert. Hierbei stellt sich die Frage, ob der generelle Einsatz von Acetylsalicylsäure zu vertreten ist. Es wird befürchtet, dass bei Patienten mit möglicherweise bestehender Blutungsneigung diese durch Thrombozytenaggregationshemmer verstärkt wird und sich das Risiko einer Blutung erhöhen könnte (Alvarez-Larran, 2010). Zudem wird ein durch Acetylsalicylsäure induzierter Abbau des Thrombozytenrezeptors GPIIb-V-IIIa beschrieben (Aktas B., 2005). Dies ist unseres Erachtens als iatrogene Ursache für eine möglicherweise



verstärkte Blutungsneigung in einigen Fällen der Erkrankungen zu diskutieren. Ob dieses Phänomen allerdings unter der geringen Dosierung von Acetylsalicylsäure - wie sie in unserem Patientenkollektiv eingesetzt wurde - in Betracht zu ziehen ist, wird ebenfalls in dieser Arbeit evaluiert.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Geräte

Flusskammer	Werkstatt Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians Universität München (München, Deutschland)
Silikonschablone	Werkstatt Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians Universität München (München, Deutschland)
Perfusorpumpe	Pump 33 Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA)
Heizgerät	Incubator (Solent Scientific)
Mikroskop	Axioskop2plus, Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Objektiv	Plan-NEOFLUOAR, 40-fach / 1,3 / Öl / ∞ / 0,7 Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Videokamera	CCD Farbkamera, Sony (Japan) Schwarz-weiß Kamera, AVT Horn (Aalen, Deutschland)
DVD Videorekorder	LQ-MD800, Panasonic (Osaka, Japan)
Monitor	Trinitron super fine pitch, Sony (Japan)
Kameraversorgungsgerät	AVT Horn BC - 71 (Aalen, Deutschland)
Zentrifuge	Rotina48S, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Waage	Sartorius universal (Göttingen, Deutschland)

pH-Meter	PerpHecT LogRmeter model 330, Orion (Dreieich, Deutschland)
Durchflusszytometer	Epics XL, BeckmanCoulter (Krefeld, Deutschland)
Vortexgerät	Reamix, E. Plazotta (München, Deutschland)
Blutbildautomat	Sysmex KX 21 (Norderstedt, Deutschland)

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Corning Cover Glass No. 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> , 24 x 50 mm (Schiphol-Rijk, Niederlande)
Perfusorspritze	BD Plastikpak Perfusion syringe (Heidelberg, Deutschland)
DVD	DVD RAM 240 Min., Panasonic (Osaka, Japan)
Rundbodenröhrchen	Probenröhrchen FACS 5 ml tubes, 75 x 12 mm, Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

#### 3.1.2.1 Chemikalien

Immersionsöl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Fibrilläres Kollagen Typ I	Horm Reagenz, Nycomed Austria GmbH (Konstanz, Deutschland)
SKF-Lösung	Verdünnungslösung für fibrilläres Kollagen Typ I isotonische Glukoselösung pH 2,7 – 2,9 Nycomed Austria GmbH (Konstanz, Deutschland)

Albumin	aus Rinderserum Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
ACD	Anticoagulant Citrate Dextrose, Solution A 750 ml, Caridian BCT (Zarventem, Belgien)
Apyrase	Adenosindiphosphatase Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
von Willebrand Faktor-Wildtyp	freundliche Gabe von Prof. Z. Ruggeri The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
NaCl	Natriumchlorid, Merck (Darmstadt, Deutschland)
CELLPACK™-Puffer	Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Mepacrin	Quinacridindihydrochlorid, Fluoreszenzfarbstoff Apotheke Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians Universität München (München, Deutschland)
FACS-Flow 20 I	Trägerlösung FACS-Gerät BeckmanCoulter (Krefeld, Deutschland)
Flow Set	Kalibrierbeads für Durchflusszytometrie Qualitätskontrolle - Fluoreszenzintensität BeckmanCoulter (Krefeld, Deutschland)
Flow Check	Kalibrierbeads für Durchflusszytometrie Qualitätskontrolle - Größe der Partikel BeckmanCoulter (Krefeld, Deutschland)

KCl	Kaliumchlorid Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Dextrose	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Aq. dest.	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Apotheke Innenstadt Universität München (München, Deutschland)
P-PACK	Chloromethylketontrifluoroacetat Selektiver Thrombininhibitor Bachem GmbH (Weil am Rhein, Deutschland)
PGE1	Prostaglandin E1 Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Aggrastat	$\alpha_{IIb}\beta_3$ - Rezeptorblocker MSD Sharp & Dohme GmbH (Haar, Deutschland)
TRAP 6	Thrombinrezeptoraktivator Dynabyte (München, Deutschland)

### **3.1.2.2 Gebrauchslösungen**

#### HBSS-Puffer

4,7 g HEPES + 7,8 g NaCl

in 1 l aq. dest auflösen

pH-Wert 7,4

#### Tyrode-Puffer (Stammlösung) (10x)

40 g NaCl

1 g KCl

0,65 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5,96 g HEPES

2,5 g Dextrose

in 500 ml aq. dest. lösen

Stammlösung 1:10 verdünnen und mit einem pH-Wert von 7,4 bzw. pH-Wert von 6,5 einsetzen.

#### Kollagenreagens 1 IU/ml

100 µl Kollagenreagens Horm + 900 µl SKF-Lösung (= isotone Glukoselösung)

#### Albuminlösung

1,25 g Rinderalbumin + 25 ml HbSS-Puffer

#### Apyrase

Lyophilisierte Apyrase + 2002 µl HbSS-Puffer

Einstellen einer Konzentration von 1 U/l, Zugabe von HBSS-Puffer entsprechend dem Molekulargewicht

#### TRAP 6

Lyophilisiertes TRAP 6 mit 1 ml aq. dest. auflösen

### 3.1.2.3 Antikörper

<i>Detektierte Rezeptoren</i>	<i>verwendete Antikörper</i>
IgG-1	Mouse-Anti-Human IgG:FITC, Beckman Coulter (Marseille, Frankreich)
GP Ib-V	CD 42b, Mouse-Anti-Human CD 42b:FITC 0,1 mg, AbD Serotec (Oxford, UK)
Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	CD 41b, Mouse-Anti-Human CD 41b:FITC 0,1 mg, AbD Serotec (Oxford, UK)
Phosphatidylserin	Annexin V, Mouse-Anti-Human AnnexinV:FITC
P-Selektin	CD 62P, Mouse-Anti-Human CD 62P:FITC 0,1 mg, Beckman Coulter (Marseille, Frankreich)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Flusseexperimente**

#### **3.2.1.1 Theoretische Grundlagen**

##### **3.2.1.1.1 Untersuchung der Thrombozytenaggregation unter Flussbedingungen**

Um die Thrombozytenaggregation unter verschiedenen physiologischen Strömungsbedingungen zu beobachten, wurden Experimente mit Fluoreszenztechnik unter Echtzeitmikroskopie durchgeführt.

Die Versuche umfassten zunächst zwei verschiedene Ansätze. Eine Probe wurde nach Venenpunktion ohne weitere Behandlungsschritte für das Flusseexperiment eingesetzt. Diese Probe wurde als nicht zentrifugierte Probe bezeichnet. Eine weitere Probe wurde mehrfach zentrifugiert - im Verlauf auch so bezeichnet - und erst anschließend für das Experiment verwendet.

Die mehrfach zentrifugierte Probe wurde wie folgt aufbereitet. Nach der ersten Zentrifugation, welche die korpuskulären Anteile vom Plasma trennt, entsteht im Überstand plättchenreiches Plasma, welches für die Präparation der Thrombozyten notwendig ist. Um eine vorzeitige Aktivierung und spontane Aggregation der Thrombozyten durch die Zentrifugation zu verhindern, waren Zusätze erforderlich. Zum einen wurde dies über die Zugabe von Apyrase erreicht. Diese ATP - Diphosphohydrolase, hydrolysiert das möglicherweise während der Zentrifugation und Präparation frei werdende ADP aus den Thrombozyten und verhindert den ADP-abhängigen Aktivierungsmechanismus. Zum anderen wurde die Probe mit ACD (acid citrate dextrose) versetzt, welche der Stabilisierung der Thrombozytenmembran dient.

Die einzelnen Komponenten der Blutprobe wurden nach den Zentrifugationsschritten in die ursprüngliche Zusammensetzung gebracht und für das Flusseexperiment verwendet. Die Thrombozyten- und Hämatokritwerte in den mehrfach zentrifugierten Proben der Patienten mit primärer Thrombozytose wurden dabei auf Normwerte eingestellt.

Unmittelbar vor Flussbeginn wurde dem Citratblut Mepacrin zugefügt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird mittels Serotonintransporter in die Granula der



Thrombozyten aufgenommen. Bei einer Wellenlänge von 488 nm wird der Farbstoff angeregt und ermöglicht eine Visualisierung der Thrombozyten.

Die Probe wurde während des Flussexperimentes in der Flusskammer über eine kollagenbeschichtete Oberfläche geströmt. Kollagen wurde dabei als Oberfläche gewählt, da dies die zentrale Rolle bei Gefäßverletzungen und der primären Hämostase spielt.

Alle Flussexperimente erfolgten unter drei verschiedenen Scherraten, welche repräsentativ für physiologische Strömungsgeschwindigkeiten im arteriellen und venösen System stehen. Für das venöse System wurde die Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  gewählt, für das arterielle System  $1500 \text{ s}^{-1}$  und  $4000 \text{ s}^{-1}$ . In der Flusskammer entsteht bei der Perfusion mit dem Vollblut - wie auch im Gefäßsystem (s.

Abb. 3) - eine laminare Strömung und eine Schichtung des Blutes. Auf diese Weise haben Thrombozyten, die als kleine korpuskuläre Bestandteile an den Rand des Blutgefäßes gedrängt werden, sehr engen Kontakt zur Gefäßwand und zu den - bei Gefäßverletzungen - freiliegenden Kollagenfasern (Carr, 1995; Gaegtens 1981).

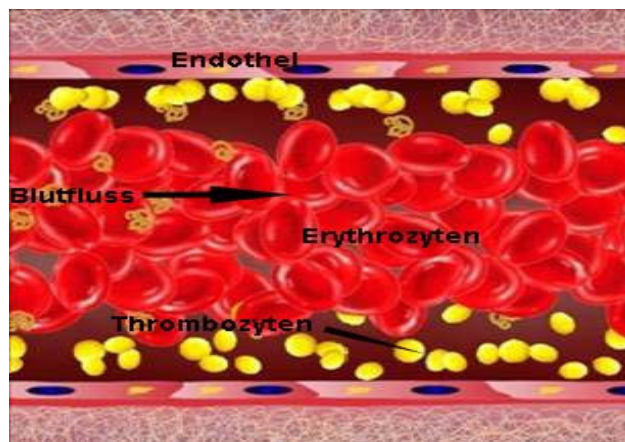


Abb. 3: Schematische Darstellung des Blutflusses in einem intakten Blutgefäß

Durch die laminare Strömung kommt es zu einer Schichtung des Blutes. Zentral im Blutfluss finden sich vorwiegend Erythrozyten, die Thrombozyten strömen nahe dem Endothel (Carr, 1995; Abb. mit freundlicher Erlaubnis von Prof. Dr. med. A.J. Reininger)

### **3.2.1.1.2 Untersuchung der Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen**

Um die Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten und explizit die Rezeptorfunktion des GP Ib-V-Komplex an einer thrombogenen Oberfläche zu beobachten, wurden die Thrombozyten über eine mit von Willebrand Faktor Antigen beschichtete Oberfläche geströmt. Für diesen Versuch wurde ein intaktes, immobiles von Willebrand Faktor Antigen gewählt. Um störende Interferenzen des eigenen von Willebrand Faktors der Patienten beziehungsweise der gesunden Spender zu vermeiden, wurde das Vollblut für dieses Flussexperiment nach Zugabe mehrerer Thrombozytenaggregationshemmer gewaschen. Auf diese Weise trennt man Blutplasma und Proteine von den korpuskulären Bestandteilen unter anderem auch von den Thrombozyten des Blutes. Um anschließend für den Flussversuch wieder den physiologischen kolloidalen Zustand des Blutes herzustellen, wurden die Proteine und das Plasma durch eine physiologische Albuminlösung ersetzt. Dieses Experiment wurde in Hellfeldmikroskopie und RIKM – Technik durchgeführt. Durch die Hellfeldmikroskopie kann die Größe und Form der Thrombozyten analysiert werden. Die RIKM-Technik (Reflexion-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie) ermöglicht die Beurteilung der Adhäsionsfläche der Thrombozyten an dem von Willebrand Faktor Antigen. Mit dieser Technik kann eine Aussage über den Abstand der Thrombozyten von der Glasoberfläche, die mit von Willebrand Faktor Antigen beschichtet ist, getroffen werden. Je dunkler die Strukturen erscheinen, desto näher sind sie an der Oberfläche gebunden (4 - 12 nm). Dies entspricht genau der Länge eines thrombozytären GPIb-Rezeptors, welcher an einem von Willebrand Faktor Molekül bindet. Je heller die Thrombozyten erscheinen, desto weiter sind diese von der Oberfläche entfernt (bis zu 30 nm).

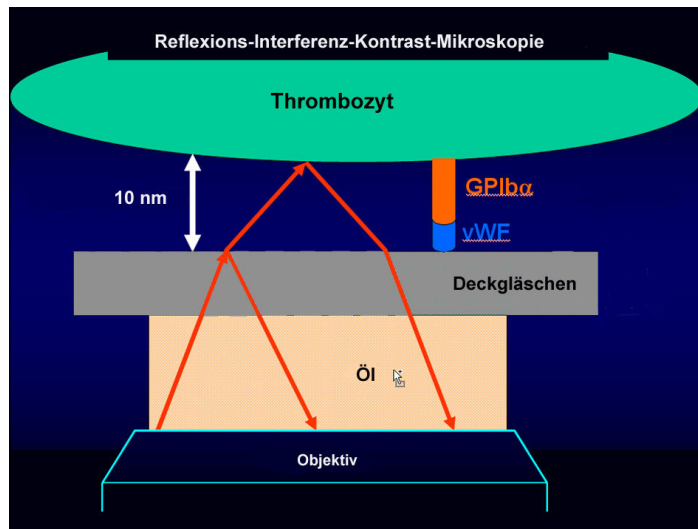


Abb. 4: Schematische Darstellung der Reflexion-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie  
 Findet die Interaktion zwischen Thrombozyt und von Willebrand Faktor mittels GPIb-Rezeptor statt, entspricht der Abstand des Thrombozyten von der thrombogenen Oberfläche der Länge der Bindung des thrombozytären GPIb-Rezeptors und dem von Willebrand Faktor.

### 3.2.1.2 Zusammensetzung und Kenngrößen der Patienten- und Kontrollgruppe

Nr.	Alter	Geschlecht	Thrombozytenzahl /μl	Hämoglobinwert (g/dl)	Hämatokritwert (%)
1	67	m	1065 x 10 <sup>3</sup>	12,2	38,8
2	45	w	1047 x 10 <sup>3</sup>	11,3	42,7
3	44	m	1066 x 10 <sup>3</sup>	13,2	44,6
4	63	m	573 x 10 <sup>3</sup>	13,9	41,8
5	42	w	1053 x 10 <sup>3</sup>	13,9	47,3
6	59	w	1964 x 10 <sup>3</sup>	12,1	38,1
7	70	m	1550 x 10 <sup>3</sup>	13,7	42,4
8	94	w	525 x 10 <sup>3</sup>	11,8	36,2
9	50	w	1910 x 10 <sup>3</sup>	13,0	41,0
10	75	w	1112 x 10 <sup>3</sup>	15,4	48,6
11	57	w	1748 x 10 <sup>3</sup>	14,0	43,7
12	52	w	873 x 10 <sup>3</sup>	13,7	41,0

Tabelle 1: Patientenkollektiv unbehandelte Proben

Nr.	Alter	Geschlecht	Thrombozytenzahl / $\mu\text{l}$	Hämatokritwert (%)
1	67	M	$279 \times 10^3$	37,2
2	45	W	$234 \times 10^3$	36,3
3	44	M	$317 \times 10^3$	36,3
4	63	M	$234 \times 10^3$	37,9
5	42	w	$778 \times 10^3$	41,1
6	59	w	$386 \times 10^3$	36,3
7	70	m	$355 \times 10^3$	36,2
8	94	w	$233 \times 10^3$	35,3
9	50	w	$194 \times 10^3$	37,1
10	75	w	$345 \times 10^3$	39,3
11	57	w	$258 \times 10^3$	37,3
12	52	w	$175 \times 10^3$	36,9

Tabelle 2: Patientenkollektiv mehrfach zentrifugierte Proben

Nr.	Alter	Geschlecht	Thrombozytenzahl / $\mu\text{l}$	Hämoglobinwert (g/dl)	Hämatokritwert (%)
1	52	m	$255 \times 10^3$	13,0	40,7
2	30	w	$281 \times 10^3$	13,4	41,6
3	24	w	$225 \times 10^3$	12,7	39,0
4	54	m	$220 \times 10^3$	15,0	45,6
5	23	w	$210 \times 10^3$	12,7	40,0
6	23	w	$263 \times 10^3$	13,6	43,0
7	29	w	$288 \times 10^3$	13,1	42,4
8	23	w	$263 \times 10^3$	13,4	38,3
9	55	m	$138 \times 10^3$	12,9	37,4
10	51	w	$173 \times 10^3$	14,1	41,9
11	72	m	$191 \times 10^3$	15,8	49,5

Tabelle 3: gesunde Kontrollgruppe

Die Untersuchung der Parameter erfolgte am Sysmex KX 21 unter Verwendung von EDTA – Blut.

Zur Beurteilung der Aggregation wurden zwölf Patienten mit Essentieller Thrombozythämie oder Polyzythämia vera untersucht. Als Kontrollgruppe dienten elf gesunde Probanden.

Für die Versuche zur Beurteilung der Adhäsion wurden aus der Patientengruppe zufällig fünf Patienten ausgewählt. Drei von diesen spendeten das Blut für den Versuch mit supranormalen Thrombozytenwerten, also mit ihren ursprünglichen Konzentrationen an Thrombozyten im Blut. Mit zwei Patienten wurde der Versuch unter normaler Thrombozytenzahl durchgeführt, dazu wurde die Thrombozytenzahl in-vitro durch Zentrifugation reduziert. Die Kontrollgruppe umfasst drei gesunde Spender mit Thrombozytenkonzentration im Normalbereich.

### **3.2.1.3 Präparation der Proben**

Für die Flussexperimente wurde Citratblut benötigt, welches innerhalb einer Stunde nach Venenpunktion weiterverarbeitet wurde. Es wurde darauf geachtet, dass während der Blutentnahme möglichst wenige Reize auf die Thrombozyten einwirken. Aus diesem Grunde wurde bei der Blutentnahme eine möglichst kurze und geringe Stauung durch den Stauschlauch verursacht. Der Stauschlauch wurde unmittelbar nach der Punktion einer Kubitalvene gelockert. Anschließend erfolgte die Entnahme des Blutes mit geringem Sog durch langsamen Rückzug des Kolbens.

#### **3.2.1.3.1 Versuche zur Thrombozytenaggregation**

##### **3.2.1.3.1.1 Nicht zentrifugierte und mehrfach zentrifugierte Probe**

Zunächst wurden in der Kontroll- als auch in der Patientengruppe jeweils eine nicht zentrifugierte und eine mehrfach zentrifugierte Probe untersucht. Die nicht zentrifugierte Probe wurde ohne weitere Behandlungsschritte für das Flussexperiment verwendet. Die mehrfach zentrifugierte Probe unterlag mehreren Zentrifugationsschritten und der Zugabe von gerinnungshemmenden Substanzen (s. theoretische Grundlage). Die Behandlung wurde wie folgt durchgeführt:

Das Citratblut wurde zunächst 20 Minuten bei 120 g zentrifugiert. Dabei entstand im Überstand thrombozytenreiches Plasma (PRP = platelet rich plasma). Dieses wurde abgehoben, in ein separates Röhrchen überführt und pro ml PRP 111 µl ACD

(acid citrate dextrose) und 5 µl Apyrase zugegeben. In einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 650 g wurden thrombozytenarmes Plasma (PPP = platelet poor plasma) und ein Thrombozytenpellet hergestellt. Das thrombozytenarme Plasma wurde in ein weiteres Röhrchen dekantiert und erneut 20 Minuten mit 3000 U/m zentrifugiert. Das gewonnene Thrombozytenpellet wurde vorsichtig mit 250 µl HbSS-Puffer resuspendiert. Die Komponenten der Probe wurden für das Flussexperiment wieder zusammengeführt, sodass die Probe alle ursprünglichen Komponenten des Blutes enthielt. Thrombozytenwerte und Hämatokritwerte wurden in der mehrfach zentrifugierten Probe der gesunden Spender als auch der Probe der Patienten mit primärer Thrombozytose auf Normwerte eingestellt.

Dieses Verfahren ermöglicht eine in vitro Einstellung der Thrombozytenzahlen auf den gewünschten Bereich bzw. eine in vitro Reduktion der supranormalen Thrombozytenwerte der Patienten auf Werte im Normbereich. Zudem erlaubt dieses Verfahren im Vergleich zu der nicht zentrifugierten Probe eine Aussage über die methodenbedingten Störgröße der Zentrifugation.

#### **3.2.1.3.1.2 Tauschversuche in der Patientengruppe**

Die Patienten wurden für eine zweite Blutentnahme einbestellt um einen sogenannten „Tauschversuch“ durchzuführen. In diesem Experiment wurde versucht, eine möglicherweise krankhaft veränderte Komponente der primären Hämostase der Patienten durch die eines gesunden Spenders zu ersetzen. Dazu wurden 40 ml Citratblut des Patienten als auch 40 ml Citratblut eines jeweils blutgruppenkompatiblen gesunden Probanden aus der Kontrollgruppe benötigt.

Die Präparation beider Proben erfolgte wie die der mehrfach zentrifugierten Probe unter 3.2.1.3.1. Im letzten Arbeitsschritt der Zusammenführung der Komponenten des Blutes wurde jedoch hier eine Komponente des Blutes der Patienten durch die entsprechende Komponente eines gesunden Spenders ersetzt. Dies erforderte zwei voneinander unabhängige Aufbereitungen der Proben. In einem Ansatz wurden die Thrombozyten des Patienten durch die Thrombozyten gesunder Probanden ersetzt. In einem zweiten Ansatz wurden das Patientenplasma und die Erythrozyten durch gesundes Spenderplasma und Spendererythrozyten ausgetauscht. In beiden

Ansätzen wurden die Thrombozytenzahlen im Normbereich gehalten. Der Hämatokritwert wurde auf 35 - 39% eingestellt.

### **3.2.1.3.1.3 In vitro hergestellte supranormale Thrombozytenzahlen in der Kontrollgruppe**

In einem weiteren Testansatz wurde versucht mit Blut von gesunden Spendern die hämostaseologische Situation des Patienten bezüglich der supranormalen Thrombozytenkonzentration nachzustellen. Hierzu wurde eine Thrombozytenzahl von über 800.000/ $\mu$ l durch in vitro Präparation erstellt.

Für den Versuch wurden 100 ml Citratblut eines gesunden Spenders benötigt, welches - ebenfalls wie unter 3.2.1.3.1 der mehrfach zentrifugierten Probe - beschrieben, zentrifugiert wurde. Die dabei hergestellten Thrombozytenpellets wurden mit spendereigenem Plasma anstatt mit HbSS-Puffer aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung wurde mit spendereigenem Plasma durchgeführt, um die Menge an gerinnungsfördernden Substanzen ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) für die im Versuch erwartete Aggregation sicherzustellen. Die Thrombozyten wurden auf supranormale Werte, der Hämatokrit auf Normwerte eingestellt.

### **3.2.1.3.2 Versuche zur Thrombozytenadhäsion**

#### **3.2.1.3.2.1 Präparation vor dem Flussversuch**

Zunächst wurde den Probanden 45 ml Vollblut entnommen, welches in eine Spritze gefüllt wird, die bereits folgende Zusätze enthält:

- P-PACK, mit einer Endkonzentration von 46  $\mu$ M
- 5 ml ACD bei 45 ml Vollblut
- Apyrase mit einer Endkonzentration von 1,3 U/ml und
- Prostaglandin E1, mit einer Endkonzentration von 0,35 U/ml.

P-PACK gehört zu den Thrombininhibitoren. Es verändert die Spaltungstriade des Thrombins irreversibel und führt auf diese Weise zu einem Verlust der Proteaseaktivität (Hämostaseologie, Pötzsch, 2010). ACD senkt den pH-Wert des Vollblutes und stabilisiert diesen, zusätzlich stabilisiert es die

Thrombozytenmembran. Eine Aktivierung der Thrombozyten wird über den Zusatz von Apyrase (s. Theoretische Grundlagen 3.2.1.1) und Prostaglandin E1 verhindert. Das Vollblut wurde mit allen Zusätzen vorsichtig gemischt, bevor es 12 Minuten mit 650 g bei Raumtemperatur zentrifugiert wird. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen.

Für den nächsten Zentrifugationsschritt wurde das Plasmavolumen durch Tyrodepuffer (pH 6,5) ersetzt. Diesem Ansatz wurde erneut Apyrase (0,65 U/ml) und PGE1 (0,35 µl/ml) zugefügt, vorsichtig gemischt und schließlich zentrifugiert. Auf diese Weise wurde das Blut viermal gewaschen. Zu beachten ist, dass die Konzentration der Apyrase bei jedem Waschschrift reduziert wird. Der dritte Waschschrift enthält noch 0,325 U/ml Apyrase, der vierte 0,1625 U/ml Apyrase als Endkonzentration.

Nach dem vierten Waschschrift wurde die Plasmamenge durch Tyrodepuffer mit Albumin mit einem pH-Wert von 7,4 ersetzt und nur noch Prostaglandin E1 (0,35 µl/ml Vollblut) zugesetzt.

Vor dem Flussexperiment wurde dem Blut  $\text{CaCl}_2$ , mit der Endkonzentration im Plasma von 1 mM und  $\text{MgCl}_2$ , mit einer Endkonzentration im Plasma von 0,5 mM zugefügt.

### **3.2.1.3.2.2 Thrombozytenkonzentrationen der Patienten und der Kontrollgruppe für den Adhäsionsversuch**

Die Flussexperimente mit Thrombozyten der Patienten wurden im Normalbereich als auch im Supranormalbereich durchgeführt. Drei Patienten spendeten das Blut für den Versuch mit supranormalen Thrombozytenzahlen, also deren ursprüngliche Konzentration an Thrombozyten im Blut. Mit zwei Patienten wurde der Versuch unter normaler Thrombozytenzahl durchgeführt. Dazu wurde die Probe zunächst bei 120 g für 20 Minuten zentrifugiert. Das dabei entstehende plättchenreiche Plasma wurde verworfen, da sich bei extrem hohen Thrombozytenzahlen in dem Erythrozytensediment noch ausreichend Thrombozyten befinden. Diese Thrombozyten reichen aus um eine Konzentration im Normalbereich zu erreichen. Die Kontrollgruppe umfasst drei gesunde Spender mit Thrombozytenkonzentrationen im Normalbereich.



#### **3.2.1.4 Präparation der Deckgläser**

Die Deckgläser wurden mit aq. dest. gereinigt. Ihre weitere Präparation erfolgte in einer feuchten Kammer. Für die Versuche zur Beurteilung der Thrombozytenaggregation wurde mittig auf die Deckgläser 150 µl Kollagenreagens (1 IU/ml) aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen an der Glasoberfläche wurde das Kollagenreagens mit HbSS-Puffer abgespült und für 20 Minuten mit 1 ml Albuminlösung überschichtet. Die gebrauchsfertigen Deckgläser wurden dann bis zum Experiment mit 1 ml HbSS-Puffer gegen Austrocknung geschützt.

Für die Versuche zur Thrombozytenadhäsion wurde mittig auf die Deckgläser 100 µl gereinigtes von Willebrand Antigen Wildtyp in einer Konzentration von 100% aufgetragen und für mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **3.2.1.5 Präparation der Flusskammer**

Die Flusskammer besteht aus einem Plexiglaskörper mit zwei Bohrungen für den Zu- und Abfluss des Flusskanals. Auf diesen Plexiglaskörper wurde ein 125 µm dickes Silikonplättchen aufgebracht, welches als Begrenzung für den Flusskanal dient, mit den Maßen von 31 mm Länge, 3 mm Breite und 0,125 mm Höhe. An den Seiten wurde ein zu- und abführender Schlauch angebracht, jeweils luftblasenfrei mit HbSS gefüllt und mit einer Klemme abgeklemmt. In einen entsprechenden Metallrahmen wurde das mit Kollagen beschichtete Deckglas gelegt. Das Deckglas wurde mit HbSS-Puffer überschichtet und die Flusskammer wurde mit der Seite der Silikonmembran auf das Deckglas gelegt. Anschließend wurde der Metallrahmen mit der Flusskammer verschraubt.

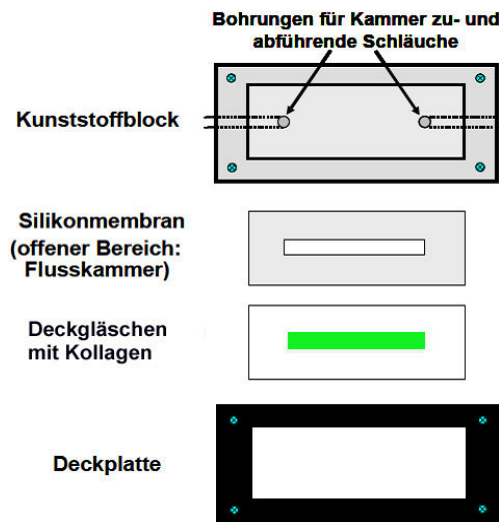


Abb. 5: Schematische Darstellung der Flusskammer mit den Einzelkomponenten

Gezeigt ist der Kunststoffblock auf den von oben die Silikonmembran für die Flusskammer aufgebracht wird. Darunter das kollagenbeschichtete Glasdeckgläschen, welches in eine entsprechende Deckplatte aus Metall eingelegt wird. Nach dem Anbringen der mit HbSS-Puffer gefüllten Schläuche und Aufbringen von HbSS-Puffer auf das Deckgläschen werden die Teile über 4 Schrauben und entsprechende Bohrungen (⊗) luftblasenfrei miteinander verschraubt.

### 3.2.1.6 Flussexperiment

Nachdem die Flusskammer auf dem Mikroskopiertisch positioniert ist, wird der zu untersuchenden Probe für die Aggregationsversuche pro ml Vollblut 1  $\mu\text{l}$  Mepacrin hinzugefügt und vorsichtig geschwenkt. Die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes war für die Adhäsionsversuche nicht notwendig. Der zuführende Schlauch wird in das Probenröhrchen eingebracht, der abführende an die Perfusorpumpe angeschlossen und beide Klemmen werden gelöst. An der Perfusorpumpe wird die entsprechende Scherrate eingestellt. Diese Einstellung ist von dem Durchmesser der sich darin befindlichen Spritze abhängig, welche die Flüssigkeit ansaugt und mit einer konstanten Geschwindigkeit durch den Flusskanal transportiert.

Bei Durchführung der Aggregationsversuche werden folgende Scherraten an der Perfusorpumpe gewählt:

Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1} \rightarrow 1.292 \text{ ml/min}$

Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1} \rightarrow 0.484 \text{ ml/min}$

Scherrate  $800 \text{ s}^{-1} \rightarrow 0.250 \text{ ml/min}$

Beide Experimente werden bei 40-facher Vergrößerung, mit Ölimmersion und einem Zoom von 0,5 über das Mikroskop beobachtet und auf DVD aufgenommen.

Bei Versuchen zur Beurteilung der Adhäsion wurde die Einstellung

Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ : 0,484 ml/min und

Scherrate  $10.000 \text{ s}^{-1}$ : 3,22 ml/min

gewählt. Das Flussexperiment wurde 90 Sekunden unter RIKM durchgeführt, anschließend wurde auf Hellfeld - Mikroskopie gewechselt.

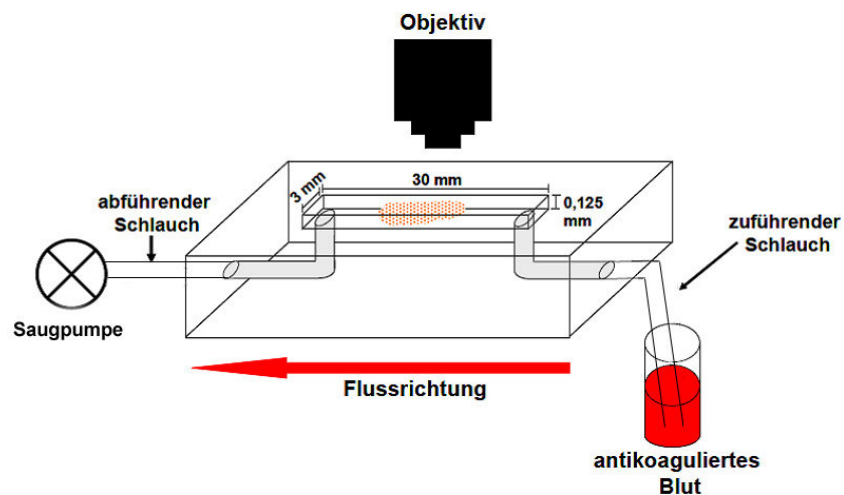


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Flusskammer

Gezeigt sind von rechts nach links das Blutröhrchen mit antikoaguliertem Blut, in welches der Flusskammer zuführende Schlauch getaucht ist, sowie die Kollagenbeschichtung in dem Flusskanal (rot-weiß gepunktet) und der abführende Schlauch aus der Flusskammer, über welchen das Blut mittels einer direkt verbundenen Perfusorpumpe durch die Kammer und somit über die Kollagenfasern „gesaugt“ wird.

### **3.2.1.7 Aufzeichnung und Auswertung**

Die Echtzeitmikroskopie wurde bei den Aggregationsversuchen über die Farbkamera, bei den Adhäsionsversuchen über die Schwarz-Weiss-Kamera auf den Monitor übertragen. Ab dem Einströmen des Citratblutes in den Flusskanal wurde dies auf DVD aufgezeichnet. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte im Anschluss über das Programm Matrox 8.0. Dazu wurde hinsichtlich der Aggregation zu den Zeitpunkten  $t = 1, 2, 3, 4, 5, 7$  Minuten nach Beginn der Blutperfusion jeweils eine Sequenz von 500 Bildern in das Bildanalyseprogramm Matrox 8.0 geladen, davon wiederum 5 Bilder ausgewählt und ausgewertet. Mit dem Programm wurden pro Bild die zu den genannten Zeitpunkten entstehenden Aggregatflächen quantitativ berechnet.

Bei Beurteilung der Adhäsion wurden nach 60 Sekunden 5 Bilder ausgewertet. Hier wurde die Gesamtadhäsionsfläche der Thrombozyten an der Gesamtfläche berechnet. Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit dem Microsoft-Programm Excel. Es wurde von den aggregatbedeckten bzw. adhäsionsbedeckten Flächen fünf einzelner Bilder pro Zeiteinheit der Mittelwert errechnet. Aus den Mittelwerten einer Gruppe pro Zeiteinheit wurde ein Gesamtmittelwert mit Standardabweichung berechnet und graphisch dargestellt. Die graphische Auswertung erfolgte mit dem Microsoft-Programm Excel.

### **3.2.1.8 Statistische Auswertung – Berechnung der Signifikanzen**

Die Auswertung des Vergleiches zwischen zwei verschiedenen Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-Test, bei mehreren zu vergleichenden Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test in dem Statistikprogramm SPSS. Im Vergleich wurden die verschiedenen Gruppen jeweils pro Minute auf eine statistische Signifikanz hin untersucht. Das Signifikanzniveau ist auf  $p < 0,05$  festgelegt. Es erfolgte die Durchführung einer explorativen Analyse der Daten. Diese Analyse bedarf keiner Adjustierung des Signifikanzniveaus.

## **3.2.2 Durchflusszytometrischer Nachweis thrombozytärer Oberflächenstrukturen**

### **3.2.2.1 Theoretische Grundlagen**

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozyten ermöglicht eine quantitative Beurteilung von Zellen und stellt zusätzlich eine Methode zum Nachweis verschiedenster molekularer Zellstrukturen dar.

Das Prinzip der durchflusszytometrischen Messung beruht auf der Emission von Lichtsignalen sobald Zellen die Sensorzelle eines Laserstrahls passieren. Die zu messenden Zellen einer Suspension werden mit Hilfe von Überdruck in einem „Hüllstrom“ fokussiert und nacheinander durch die Fließzelle des Geräts transportiert. Hierbei spricht man von *hydrodynamischer Fokussierung*. Die Zellen fließen mit einer Geschwindigkeit zwischen 200 bis 2000 Ereignissen pro Sekunde einzeln im rechten Winkel an der Lichtquelle monochromatischen Lichts mit einer Wellenlänge von 488 nm vorbei. Je nach physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen wird das Anregungslicht gestreut.

Abhängig vom Winkel der Lichtstreuung können verschiedene Aussagen über die passierende Zelle getroffen werden. Wird das Licht bei Durchtritt der Zelle durch den Fokus des Lasers in einem engen Winkel von 1 - 20 ° zum Laserlicht gestreut, beschreibt dies die Größe der Zellen beziehungsweise Partikel. Lichtanteile die in einem Winkel von 15° - 150° abgelenkt werden, werden als Seitwärtsstreulicht detektiert. Das Seitwärtsstreulicht ist von intrazellulären Komponenten wie beispielsweise Lysosomen abhängig, man spricht hier von der Granularität der Zellen.

Bevor das Streulicht die Photodetektoren erreicht wird es durch einen Bandpassfilter gelenkt, der die Detektion verfeinert und nur Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs passieren lässt. Dies erhöht die Präzision der Messung. Der Photodetektor zeichnet die ankommenden Lichtsignale auf und wandelt sie in elektrische Signale um (Rothe G, zit. n. Zelluläre Diagnostik, Sack 2007, S. 27-70).

Weitere Informationen über die zu untersuchenden Zellen, zum Beispiel molekulare Strukturen auf der Zelloberfläche, können durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden.

Der von uns eingesetzte Farbstoff ist Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Bei Anregung durch einen Argonlaser besitzt dieser Fluoreszenzfarbstoff das Emissionsmaximum bei 525 nm. Der Nachweis von Oberflächenstrukturen der Thrombozyten erfolgt über die Bindung von fluoreszenzmarkierte Antikörper an die Rezeptoren der Thrombozyten. Es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Probe festgestellt und anschließend mit den Werten eines Normalkollektivs verglichen.

### 3.2.2.2 Nachgewiesen Oberflächenmerkmale und eingesetzte Antikörper

Zur Identifizierung von Thrombozyten eignen sich Antikörper gegen den GPIIb-V Komplex und den  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor, da diese von Thrombozyten gesunder Probanden konstant in einer definierten Menge exprimiert werden.

Antikörper (FITC)	Thrombozytenantigen	Funktion
CD 41	$\alpha_{IIb}\beta_3$	Adhäsion und Aggregation
CD 42b	GPIIb – V Komplex	Adhäsion

Um den Funktions- und Aktivierungszustand der Thrombozyten zu erfassen, wurden Antigene gewählt, die je nach Aktivierungsgrad in einer signifikant veränderten Anzahl auf der Oberfläche nachweisbar sind. Als Aktivierungssubstanz wurde TRAP (thrombin receptor activating peptide) gewählt.

Antikörper (FITC)	Thrombozytenantigen	Funktion
CD 62 P	P-Selektin	Adhäsionsmolekül zwischen Thrombozyten und von Willebrand Faktor; Marker für Degranulation
Annexin V	Phosphatidylserin	Marker für Membranaktivierung der Plättchen

Das Thrombozytenantigen P-Selektin findet sich bei ruhenden Thrombozyten in der  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten. Auf der Oberfläche der Thrombozyten ist das P-Selektin in nur sehr geringer Zahl exprimiert. Jedoch wenige Sekunden nach der Aktivierung findet man vermehrt P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche.

Zusätzlich wird ein Teil des P-Selektins als lösliche Komponente in die Umgebung abgegeben. Diese rasche Expression ermöglicht es, den Aktivierungsgrad zirkulierender Thrombozyten zu quantifizieren (Michelson, 1996).

Annexin V detektiert das durch die Aktivierung an der Thrombozytenoberfläche nachweisbare Phosphatidylserin.

### **3.2.2.3 Pipettierschema für Probensatz**

Es wird Citratblut gesunder Thrombozytenspender verwendet, die 10 Tage vor der Blutentnahme keine thrombozytenwirksamen Medikamente eingenommen haben. Das Citratblut wurde für den Versuch 1:10 mit Tyrodepuffer (1x, pH 7,4) verdünnt. Zu 100 µl verdünnter Probe des Patienten beziehungsweise des gesunden Spenders wird 10 µl des jeweils entsprechenden Antikörpers hinzugefügt. Dies wurde dann für 30 Minuten im Dunklen inkubiert. Nach der Zugabe von 1000 µl HbSS mit Paraformaldehyd (1%) erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung.

### **3.2.2.4 Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen**

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung wurden mit dem Programm FlowJo ausgewertet. Dabei wurden die absoluten Thrombozytenzahlen und der Mittelwert der Mittleren Fluoreszenzintensität der durchflusszytometrischen Messung ermittelt.

In dem Programm FlowJo wird in einer zweidimensionalen Darstellung auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität und auf der y-Achse die Größendarstellung der gemessenen Partikel aufgetragen (s. Abb. 7, Bild A). Für die verschiedenen Komponenten werden sogenannte „gates“ gesetzt - das bedeutet, dass die interessierenden Populationen eingegrenzt und die übrigen Zellen ausgeblendet werden (s. Abb. 7, Bild B). Anhand der Größe kann die Thrombozytenpopulation identifiziert und eingegrenzt werden.

Die darin befindliche mittlere Fluoreszenzintensität wird über die Darstellung im Histogramm errechnet (s. Abb. 7, Bild C) und mit der mittleren Fluoreszenzintensität eines Normalkollektivs verglichen.

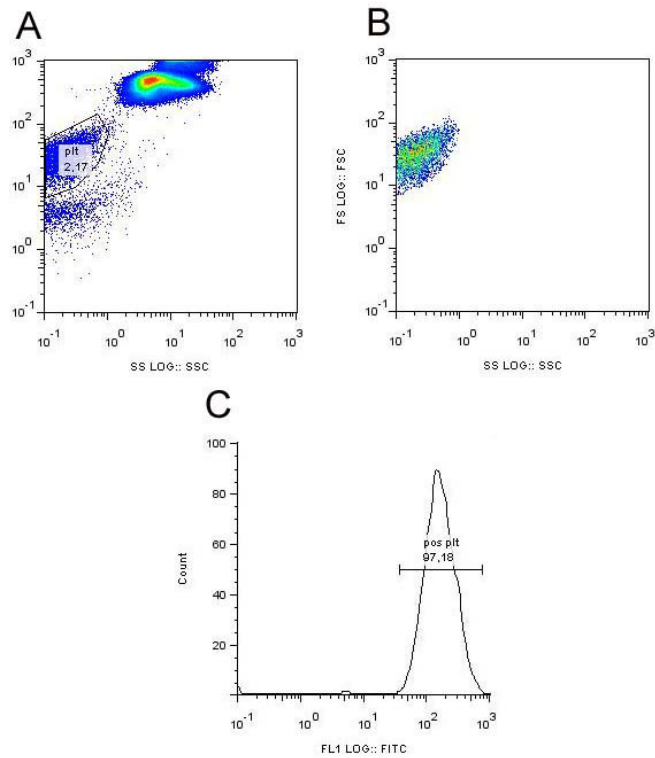


Abb. 7: Beispielhafte Auswertung einer durchflusszytometrischen Analyse

In Bild A sind die Fluoreszenzintensität auf der x-Achse und die Größe der Zellen auf der y-Achse dargestellt. Bild B zeigt die fokussierte Population unter Ausblendung aller anderen Zellgruppen. Bild C zeigt die Fluoreszenzintensität der fokussierten Zellpopulation graphisch dargestellt.

Die errechneten Daten der mittleren Fluoreszenzintensität der Thrombozyten wurden graphisch als Boxplot mit SigmaPlot 10.0 dargestellt. Verglichen wurde die Intensitäten der Kontrollgruppe mit den Werten der Patientengruppe.



### **3.2.3 Nachweis des von Willebrand Faktors**

#### **3.2.3.1 Multimerenanalyse des von Willebrand Faktors mittels Gelelektrophorese**

Der Nachweis des von Willebrand Faktors der Patienten erfolgte durch eine von Prof. U. Budde, Hamburg, etablierte Methode. Da physiologisch im Blut unterschiedlich große Multimere des von Willebrand Faktors vorhanden sind, kann die Verteilung dieser in einer Gelelektrophorese optisch dargestellt werden. Die dazu erforderliche Auftrennung der Multimere erfolgt in einem Agarosegel mit einer Konzentration von 1,6% und 1,2% SDS-PAGE. Anschließend wird das Ergebnis der Elektrophorese mittels Western Blot auf ein Trägermaterial übertragen und die unspezifischen Bindungsstellen der Trägermembran mit Milchprotein geblockt. Das Trägermaterial wird mit einem Peroxidase markierten von Willebrand Faktor-spezifischen Antikörper inkubiert. Mittels Lumineszenz wird die Peroxidaseaktivität über eine Spezialkamera visualisiert.

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1 Initiale Adhäsion der Thrombozyten unter Strömungsbedingungen**

Für die Adhäsion von Thrombozyten an einer geschädigten oder verletzten Gefäßwand sind unter Strömungsbedingungen des Blutes subendotheliale Matrixmoleküle und spezifische Thrombozytenrezeptoren notwendig. Je nach Strömungsverhältnis treten einzelne Proteine und deren entsprechende Adhäsionsliganden in den Vordergrund (Jackson et al, 2003). So ermöglichen bei niedrigeren Scherraten unter anderem die subendothelialen Matrixmoleküle Fibronectin und Fibrinogen eine Adhäsion von Thrombozyten an die Gefäßwand (Nesbitt et al, 2006). Bei Scherraten, welche über  $1500\text{ s}^{-1}$  liegen, ist die initiale Adhäsion der Thrombozyten von der Interaktion des GP Ib-V Komplexes und des subendothelial gebundenen von Willebrand Faktors abhängig (Ruggeri, 2004). Um isoliert den für die Adhäsion wichtigen Thrombozytenrezeptorenkomplex GP Ib-V zu beurteilen, wurde in unserer Arbeit die zu beströmende Oberfläche mit von Willebrand Faktor Antigen beschichtet. Zudem wurde das Vollblut der zu testenden Probe mehrfach mit Pufferlösung gewaschen, um den körpereigenen von Willebrand Faktor zu eliminieren. Dadurch wird verhindert, dass Wechselwirkungen durch den im Patientenplasma möglicherweise defekten, eigenen von Willebrand Faktor verursacht werden. Das Blutplasma wurde durch eine physiologische kolloidosmotische Lösung ersetzt.

Es wurden entsprechend hohe Scherraten gewählt, unter welchen die Adhäsion ausschließlich durch die Interaktion zwischen dem GPIb-Rezeptor und dem von Willebrand Faktor vermittelt wird.

#### 4.1.1 Thrombozyten gesunder Probanden versus Patienten mit primärer Thrombozytose

Um Referenzwerte für die Adhäsion von Thrombozyten im Flussversuch zu erstellen werden Thrombozyten gesunder Spender über eine mit von Willebrand Antigen beschichtete Oberfläche geströmt. Die Thrombozytenwerte der gesunden Spender liegen im Normalbereich. Diesem Probandenkollektiv werden die Patienten mit supranormalen Thrombozytenwerten und mit in vitro auf Normwerte reduzierte Thrombozytenwerte gegenübergestellt.

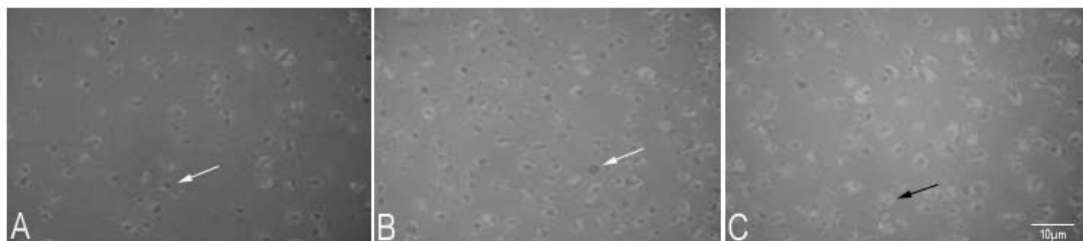


Abb. 8: Exemplarische Darstellung des Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf einer mit von Willebrand Faktor Antigen beschichteten Oberfläche.

Exemplarische Darstellung von Thrombozyten gesunder Spender im Normalbereich (A) von Patienten mit Werten im Supranormalbereich (B) und mit in vitro eingestellten Thrombozytenkonzentrationen im Normalbereich (C). Hier unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ . Die Aufnahme erfolgte mittels RIKM-Technik.

Zunächst wird exemplarisch gezeigt, wie sich Thrombozyten hinsichtlich der Adhäsion verhalten, wenn diese über eine mit von Willebrand Antigen beschichtete Oberfläche geströmt werden. Die weißen Pfeile in Bild A und B markieren Thrombozyten, die sich auffallend dunkel darstellen. Mittels RIKM-Technik werden Strukturen, welche in engem Kontakt (4 - 12 nm) zur Oberflächenbeschichtung stehen dunkler abgebildet als Strukturen mit weniger engem Kontakt. Der schwarze Pfeil in Bild C zeigt einen Thrombozyten der weniger stark an die Oberflächenbeschichtung gebunden ist. Darüber hinaus zeigt sich in Bild B und C, in welchen die Thrombozyten der Patienten repräsentiert werden, eine Tendenz zu größeren Adhäsionsflächen der einzelnen Thrombozyten.

Unter den Scherraten  $1500 \text{ s}^{-1}$  und  $10000 \text{ s}^{-1}$  wird insbesondere die GPIIb-von Willebrand Interaktion für die Adhäsion notwendig. Daher wurde unter diesen beiden Scherraten die Fläche der adhärierenden Thrombozyten berechnet. Die graphische

Darstellung der mittels RIKM-Technik angefertigten Aufnahmen zeigen Abb. 9 und Abb. 10.

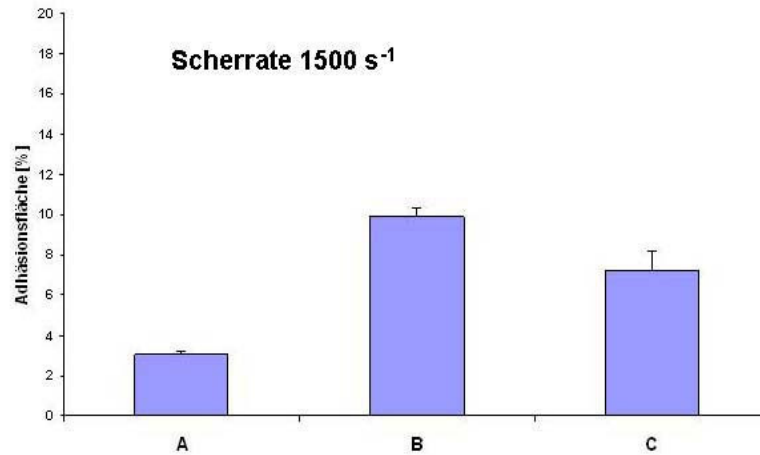


Abb. 9: Darstellung der prozentualen Adhäsionsfläche von Thrombozyten auf einer mit von Willebrand Faktor Antigen beschichteten Oberfläche unter der Scherrate 1500 s<sup>-1</sup>. Quantifiziert wurde die Kontaktfläche der Thrombozyten nach 30 Sekunden von drei gesunden Spendern mit Thrombozyten im Normalbereich (A), von drei Patienten mit Thrombozytenzahlen im Supranormalbereich (B) und von drei Patienten mit in vitro reduzierten Thrombozytenzahlen im Normalbereich (C). Für die Auswertung wurden lediglich die dunkel gefärbten Kontaktflächen herangezogen, die eine enge Bindung des Thrombozyten an die Oberfläche bedeuten.

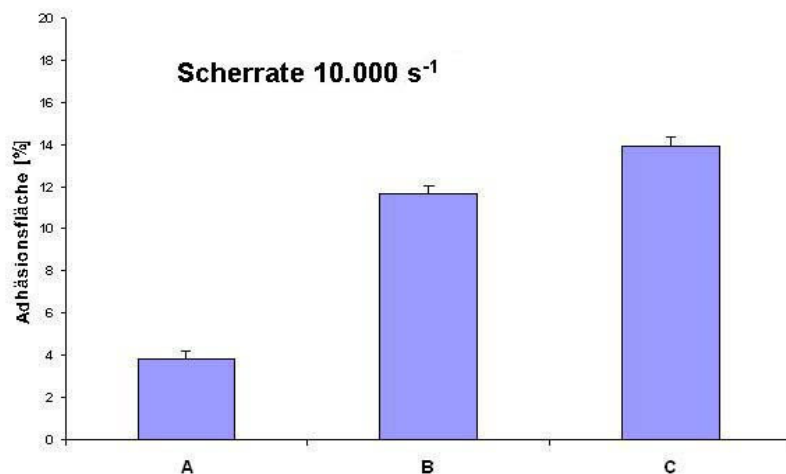


Abb. 10: Darstellung der prozentualen Adhäsionsfläche von Thrombozyten auf einer mit von Willebrand Faktor Antigen beschichteten Oberfläche unter der Scherrate 10.000 s<sup>-1</sup>. Quantifiziert wurde die Kontaktfläche der Thrombozyten nach 30 Sekunden von drei gesunden Spendern mit Thrombozyten im Normalbereich (A), von drei Patienten mit Thrombozytenzahlen im Supranormalbereich (B) und von drei Patienten mit in vitro reduzierten Thrombozytenzahlen im Normalbereich (C). Für die Auswertung wurden lediglich die dunkel gefärbten Kontaktflächen herangezogen, die eine enge Bindung des Thrombozyten an die Oberfläche bedeuten.

Das Experiment, welches über die Adhäsion Aufschluss gibt, wurde innerhalb der Patientengruppe mit zwei verschiedenen Ansätzen hinsichtlich der Thrombozytenzahl durchgeführt. Zum einen wurde der Versuch mit der ursprünglichen Thrombozytenzahl, die bei unseren Patienten gefunden wurde, durchgeführt, das heißt mit Thrombozytenwerten im Supranormalbereich. Zum anderen wurde getestet, ob eine in vitro Reduktion der Thrombozytenzahl der Patienten auf Normalwerte einen Einfluss auf die berechnete Adhäsionsfläche nimmt. Zwischen diesen Untergruppen der Patienten finden sich unter beiden Scherraten keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse stehen im Vergleich zu der Adhäsionsfläche gesunder Spender mit Thrombozytenwerten im Normalbereich. Die Abbildungen der Scherraten  $1500 \text{ s}^{-1}$  und  $10000 \text{ s}^{-1}$  zeigen deutliche Unterschiede zwischen der Adhäsionsfläche der gesunden Probanden und der Patientengruppe. Unter der Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  (Abb. 9) ist der Unterschied zwischen der gesunden Probandengruppe mit Thrombozyten im Normbereich mit etwa 3,0% Adhäsionsfläche zu sehen. Hingegen ist die prozentuale Adhäsionsfläche der Patientengruppe mit Thrombozytenzahlen im Supranormalbereich bei 9,9% der Gesamtfläche, als auch in der Patientengruppe mit in vitro reduzierten Thrombozytenwerten bei etwa 7,2% angesiedelt. Unter der Scherrate von  $10.000 \text{ s}^{-1}$  haben ebenfalls die Proben der Patienten die prozentual größere Adhäsionsfläche. Sowohl die Patientenproben mit Thrombozytenwerten im Supranormalbereich als auch die mit in vitro reduzierten Thrombozytenwerten zeigen eine prozentuale Adhäsionsfläche von bis zu 14%. Im Gegensatz dazu die Gruppe der gesunden Spender mit Thrombozytenwerten im Normbereich mit einer Adhäsionsfläche von 3,8%.

## 4.2 Durchflusszytometrischer Nachweis von Thrombozytenrezeptoren

### 4.2.1. Adhäsionsrezeptoren $\alpha_{IIb}\beta_3$ und GP Ib-V-Komplex

Die Thrombozytenrezeptoren  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und der GP Ib-V-Komplex werden unabhängig vom Aktivierungsstatus der Thrombozyten in einer bestimmten Anzahl auf einer Thrombozytenoberfläche exprimiert (Gawaz, 1999). Die Rezeptoren können durchflusszytometrisch mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und nachgewiesen werden. Dabei wird die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt, wobei die gemessene Intensität den vorhandenen Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche entspricht. Der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose wird eine Gruppe von gesunden Spendern als Referenzgruppe gegenübergestellt.

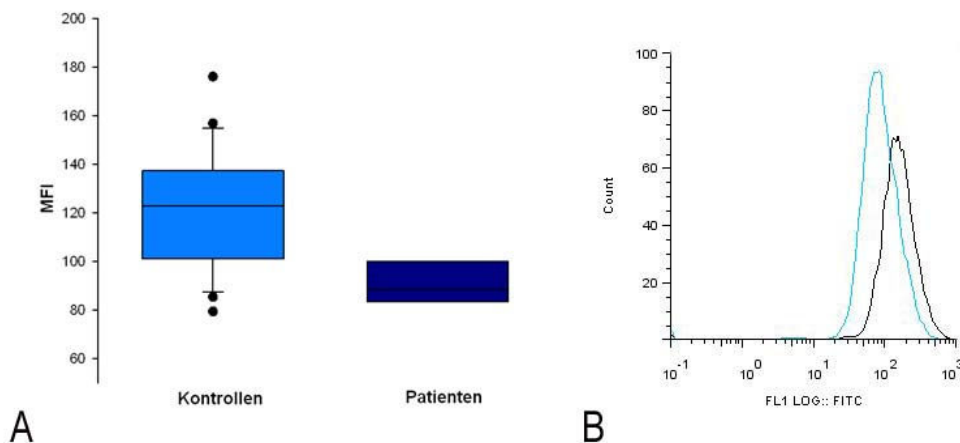


Abb. 11: Durchflusszytometrischer Nachweis der mittleren Fluoreszenzintensität des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors auf Thrombozyten im Vollblut.

Für den Nachweis wurde CD 41, ein FITC - markierter Antikörper, eingesetzt. Es wird die mittlere Fluoreszenzintensität von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit primärer Thrombozytose verglichen (A). Der hellblaue Boxplot zeigt die Kontrollgruppe, mit dem dunkelblauen Boxplot ist die Gruppe der Patienten dargestellt. Bild B zeigt die Veranschaulichung der mittleren Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe (türkise Linie) und der Patienten (schwarze Linie) mit Hilfe eines Histogramms.

Mittels CD 41 wird durchflusszytometrisch der Thrombozytenrezeptor  $\alpha_{IIb}\beta_3$  nachgewiesen. Das Diagramm A zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität der gesunden Spender (hellblau) im Vergleich zu den Patienten (dunkelblau). Hierbei erkennt man eine deutlich geringere mittlere Fluoreszenzintensität in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose.

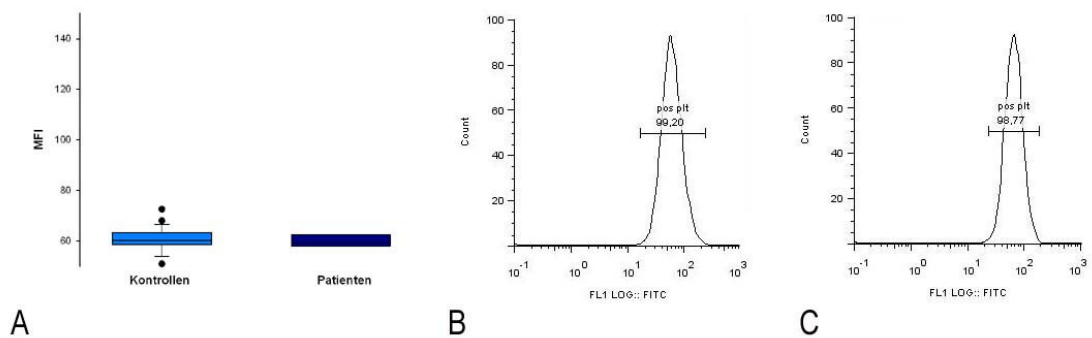


Abb. 12: Durchflusszytometrischer Nachweis der mittleren Fluoreszenzintensität des GP IIb-Rezeptor Komplexes auf Thrombozyten im Vollblut.

Für den Nachweis wurde CD 42, ein FITC - markierter Antikörper, eingesetzt. Es wird die mittlere Fluoreszenzintensität von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit primärer Thrombozytose verglichen (A). Bild B zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe im Histogramm, das Histogramm der mittleren Fluoreszenzintensität der Patientengruppe ist in C aufgezeigt.

Der durchflusszytometrische Nachweis des GPIIb-V-Rezeptorkomplexes wird mittels CD 42 geführt. Hinsichtlich der mittleren Fluoreszenzintensität kann zwischen der Gruppe der gesunden Spender und der Patienten kein Unterschied festgestellt werden.

#### 4.2.2 Thrombozytäre Aktivierungsmarker

Einige Thrombozytenrezeptoren sind nach Aktivierung der Thrombozyten vermehrt auf der Oberfläche zu finden. Die Rezeptoren werden im Zuge des Aktivierungsprozesses mittels Exozytose an die Oberfläche der Thrombozyten transportiert und können durchflusszytometrisch in einer erhöhten Anzahl nachgewiesen werden. Typischerweise gehören P-Selektin und Phosphatidylserin zu diesen Rezeptoren. Diese können demzufolge als Marker für eine abgelaufene Aktivierungsreaktion verstanden werden. In dieser Arbeit wird das Aktivierungsvermögen der Thrombozyten gesunder Probanden dem von Patienten mit primärer Thrombozytose gegenübergestellt.

#### 4.2.2.1 Nachweis von P-Selektin

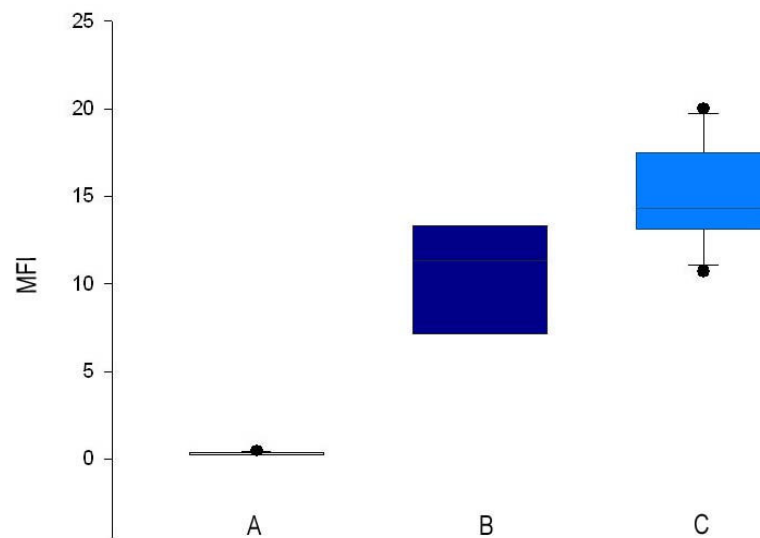


Abb.13: Durchflusszytometrischer Nachweis von P-Selektin auf Thrombozyten vor und nach Stimulation mit TRAP im Vollblut.

Nachgewiesen wurde das P-Selektin mit CD 62, einem FITC - markierten Antikörper. Es wird die mittlere Fluoreszenzintensität von gesunden Kontrollpersonen bzw. Patienten mit primärer Thrombozytose ohne Stimulation (A) gezeigt. Der Vergleich zeigt den Unterschied zu den mittels TRAP stimulierten Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose (B) und zu den mittels TRAP stimulierten Thrombozyten gesunder Spender (C).

Der Abb.13 ist zu entnehmen, dass gesunde Spender als auch Patienten mit primärer Thrombozytose ohne einwirkende Aktivierungsreize P-Selektin in gleichen Mengen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nach Stimulation mit TRAP zeigen gesunde Patienten wesentlich mehr P-Selektin auf der Oberfläche der Thrombozyten als Patienten mit primärer Thrombozytose.



#### 4.2.2.2 Nachweis von Phosphatidylserin

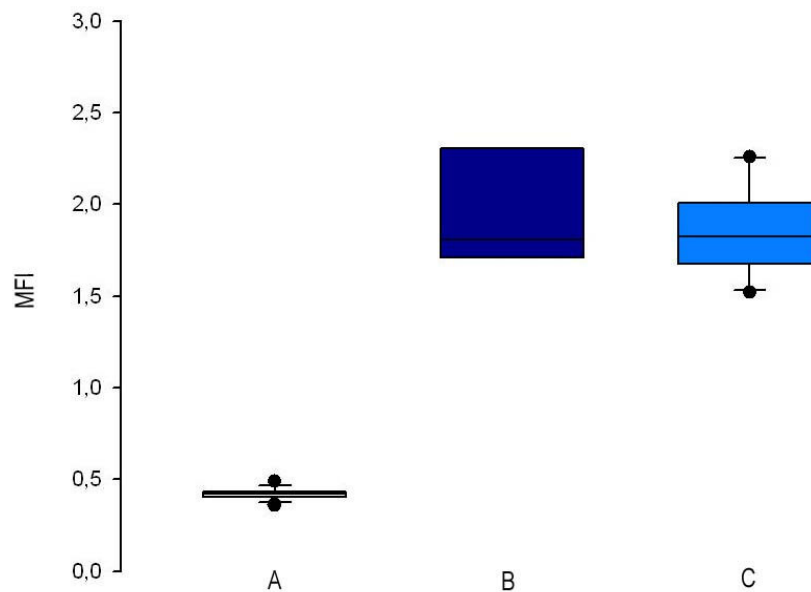


Abb. 14: Durchflusszytometrischer Nachweis von Phosphatidylserin auf Thrombozyten vor und nach Stimulation mit TRAP im Vollblut.

Nachgewiesen wurde Phosphatidylserin mit Annexin, einem FITC - markierten Antikörper. Es wird die mittlere Fluoreszenzintensität von gesunden Kontrollpersonen beziehungsweise Patienten mit primärer Thrombozytose ohne Stimulation (A) gezeigt. Der Vergleich zeigt den Unterschied von mittels TRAP stimulierten Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose (B) und den mittels TRAP stimulierten Thrombozyten gesunder Spender (C).

Der Nachweis von Phosphatidylserin an nicht stimulierten Thrombozyten in der Gruppe der gesunden Spender als auch in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose zeigt gleiche Werte bezüglich der mittleren Fluoreszenzintensität. Auch nach Stimulation mit TRAP finden sich in beiden Gruppen gleichzusetzende Werte.

### **4.3 Aggregation von Thrombozyten unter Strömungsbedingungen - Flusseexperimente über Kollagen**

Das Aggregationsverhalten der Thrombozyten wurde auf einer kollagenbeschichteten Oberfläche mit Fluoreszenztechnik visualisiert und auf DVD aufgenommen. Quantitativ analysiert wurde die von Aggregaten bedeckte Kollagenoberfläche pro Gesichtsfeld und pro Zeiteinheit. Von jedem Probanden wurden die Flusseexperimente unter drei verschiedenen Scherraten durchgeführt. Repräsentativ für das venöse System steht die Scherrate  $800\text{ s}^{-1}$ , für arterielle Bedingungen  $1500\text{ s}^{-1}$  und  $4000\text{ s}^{-1}$ . Die Scherrate  $4000\text{ s}^{-1}$  steht zudem für eine maximal physiologisch erreichbare Scherrate bei einem gesunden Menschen (Ruggeri, zit. n. Hemostasis and Thrombosis, Colman et al., 2001).

#### **4.3.1 Einfluss methodebedingter Störgrößen auf die Aggregation - Vergleich von nicht zentrifugierten mit mehrfach zentrifugierten Proben gesunder Probanden**

Um Referenzwerte zu generieren wurden mit elf gesunden Probanden unter den verschiedenen oben genannten Strömungsgeschwindigkeiten Flusseexperimente über Kollagen durchgeführt. Die Thrombozyten wurden dazu in der Gruppe der gesunden Probanden und in der Gruppe der Patienten mit denselben Präparationsschritten vorbereitet. Dies war im Vorfeld notwendig, um die in vitro-Reduktion der Thrombozytenzahlen der Patienten mit essentieller Thrombozythämie und Polyzythämia vera auf im Normbereich liegende Thrombozytenwerte in weiterführenden Experimenten methodisch bewerten zu können. Zunächst wurden Perfusionsexperimente von Thrombozyten auf Kollagen untersucht. Dazu wurde das Ablagerungsverhalten von Thrombozyten in frisch abgenommenem Citratblut (nicht zentrifugiert) mit demjenigen von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten, welche im Ausgangsvollblut resuspendiert wurden, verglichen. Nicht zentrifugierte Thrombozyten wurden nach Blutentnahme ohne weitere Präparationsschritte mit Mepacrin versetzt und über die kollagenbeschichtete Oberfläche geströmt. Die Proben mit mehrfach zentrifugierten Thrombozyten wurden nach den Zentrifugationsschritten (s. Material und Methoden) mit Mepacrin versetzt und ebenfalls über eine kollagenbeschichtete Oberfläche geströmt.

#### 4.3.1.1 Scherrate $800 \text{ s}^{-1}$

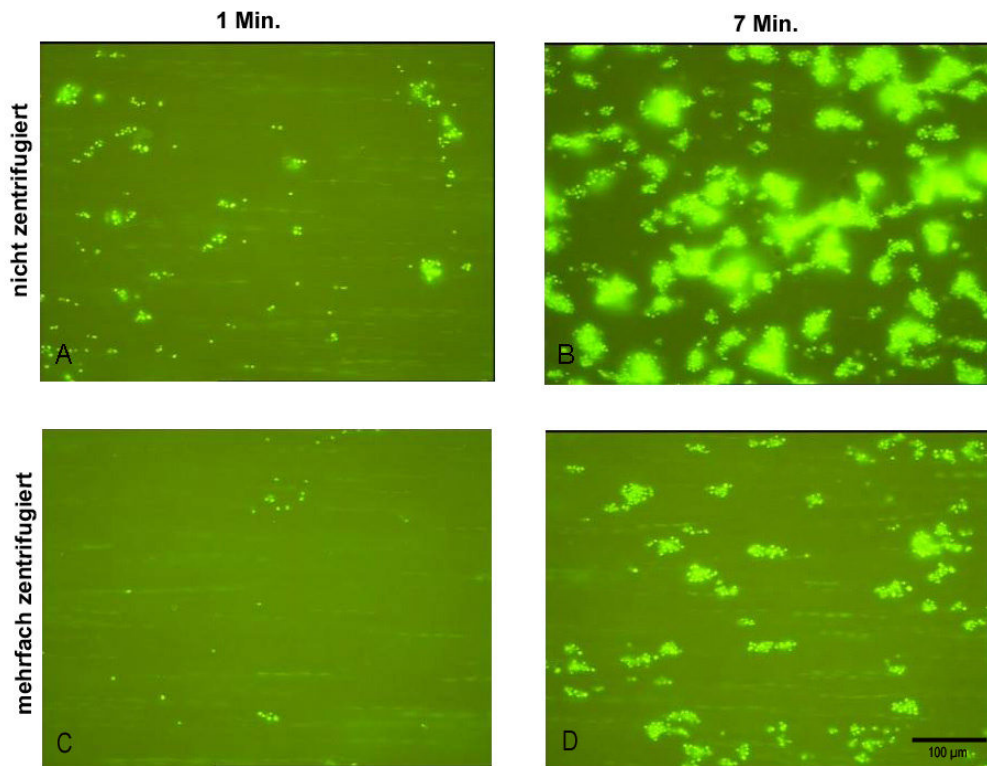


Abb. 15: Aggregationsverhalten von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter Flussbedingungen unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$ .

Die Bilder A bis D zeigen exemplarisch im Vergleich die aggregatbedeckte Oberfläche zwischen nicht zentrifugierten Thrombozyten nach 1 Minute (A) und 7 Minuten (B) und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten nach 1 Minute (C) und 7 Minuten (D). Der Versuch erfolgte mit Thrombozyten gesunder Spender unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$ . Zur Visualisierung wurden die Thrombozyten mit Mepacrin markiert und über eine kollagenbeschichtete Oberfläche geströmt. Die Bilder aller Probanden stellen die Basis der Auswertung für die folgende graphische Darstellung (Abb. 16) dar.

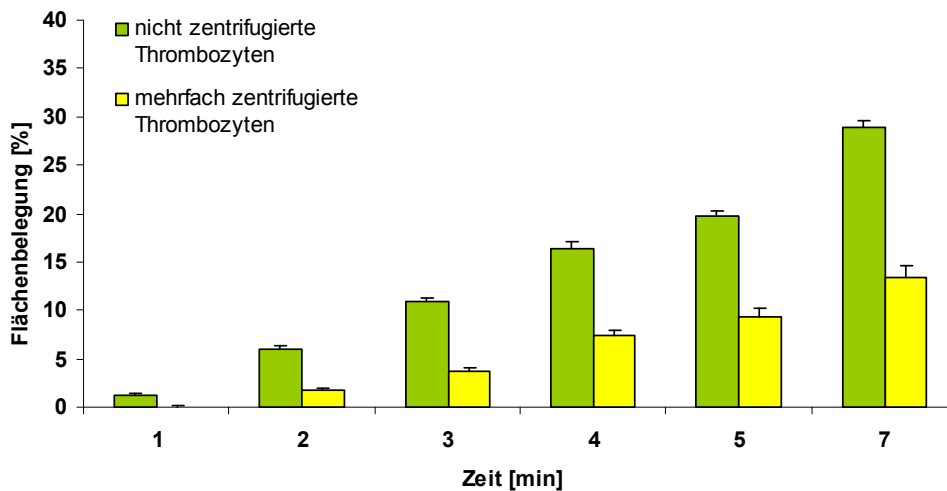


Abb. 16: Kinetik des Aggregatwachstums von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$ . Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5 und 7 Minuten nach Strömungsbeginn quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aller 11 Probanden der Kontrollgruppe.

Die Mittelwerte der nicht zentrifugierten Thrombozyten der gesunden Probanden zeigen einen linearen Zuwachs der aggregatbedeckten Kollagenoberfläche von 1,2% nach der ersten Minute bis zu 28,8% nach sieben Minuten Blutperfusion über die kollagenbeschichtete Oberfläche. Im Vergleich dazu zeigen die mehrfach zentrifugierten Thrombozyten ebenfalls einen linearen Zuwachs an Aggregatfläche, jedoch nur mit etwa der Hälfte der prozentual bedeckten Fläche (13,5%) nach sieben Minuten Strömungsdauer. Über den gesamten Zeitverlauf hinweg besteht zwischen den nicht zentrifugierten Thrombozyten und den mehrfach zentrifugierten Thrombozyten ein statistisch signifikanter Unterschied, welcher mit dem Mann-Whitney-Test ( $p < 0,05$ ) berechnet wurde.

#### 4.3.1.2 Scherrate $1500 \text{ s}^{-1}$

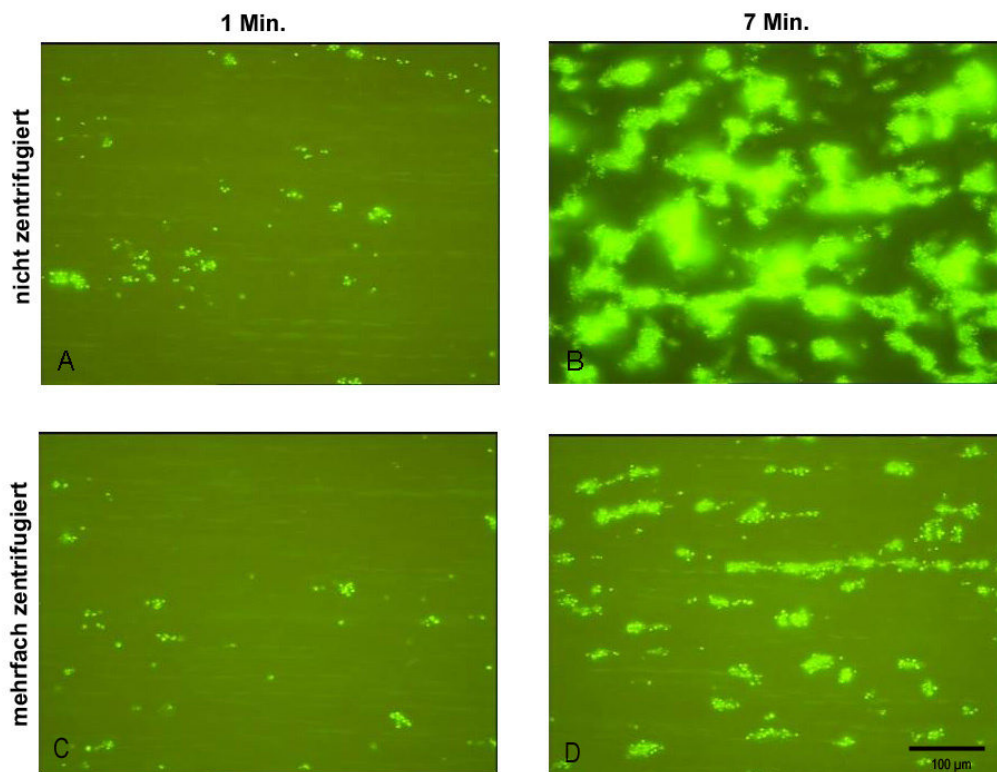


Abb. 17: Aggregationsverhalten von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter Flussbedingungen unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ .

Die Bilder A bis D zeigen exemplarisch im Vergleich die aggregatbedeckte Oberfläche zwischen nicht zentrifugierten Thrombozyten nach 1 Minute (A) und 7 Minuten (B) und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten nach 1 Minute (C) und 7 Minuten (D). Der Versuch erfolgte mit Thrombozyten gesunder Spender unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ . Zur Visualisierung wurden die Thrombozyten mit Mepacrin markiert und über eine kollagenbeschichtete Oberfläche geströmt. Die Bilder aller Probanden stellen die Basis der Auswertung für die folgende graphische Darstellung (Abb. 18) dar.

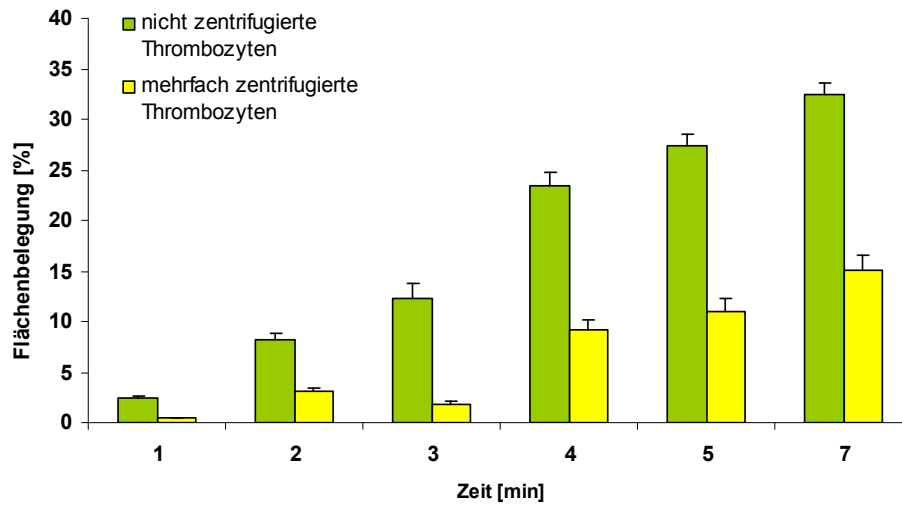


Abb. 18: Kinetik des Aggregatwachstums von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ . Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5 und 7 Minuten nach Strömungsbeginn quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aller 11 Probanden der Kontrollgruppe.

Auch unter der Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  findet sich sowohl in der Gruppe der nicht zentrifugierten als auch in der Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten der gesunden Probanden ein linearer Zuwachs der aggregatbedeckten Kollagenoberfläche. Nach einer Minute beträgt die prozentuale Flächenbedeckung der nicht zentrifugierten Thrombozyten 2,3%, welche nach sieben Minuten 32,4% erreicht. Die Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten bedeckt auch unter dieser Scherrate im Vergleich zu den nicht zentrifugierten Thrombozyten nach sieben Minuten eine statistisch signifikant geringer bedeckte Fläche mit 15,0%. Über den gesamten Zeitverlauf zeigen sich mittels Auswertung über den Mann-Whitney-Test statistisch signifikante Unterschiede zwischen nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.1.3 Scherrate $4000 \text{ s}^{-1}$

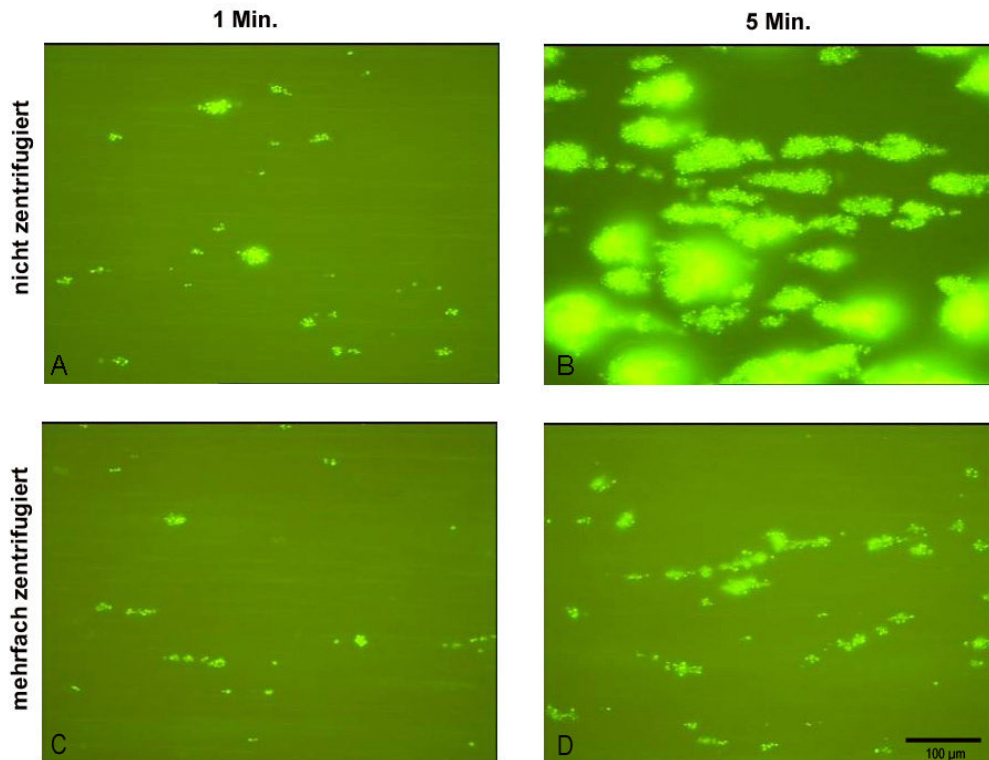


Abb. 19: Aggregationsverhalten von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter Flussbedingungen unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$ . Die Bilder A bis D zeigen exemplarisch im Vergleich die aggregatbedeckte Oberfläche zwischen nicht zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender nach 1 Minute (A) und nach 4 Minuten (B) und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender nach 1 Minute (C) und nach 5 Minuten (D). Zur Visualisierung wurden die Thrombozyten mit Mepacrin markiert und über eine kollagenbeschichtete Oberfläche geströmt. Die Bilder aller Probanden stellen die Basis der Auswertung für die folgende graphische Darstellung (Abb. 20) dar.

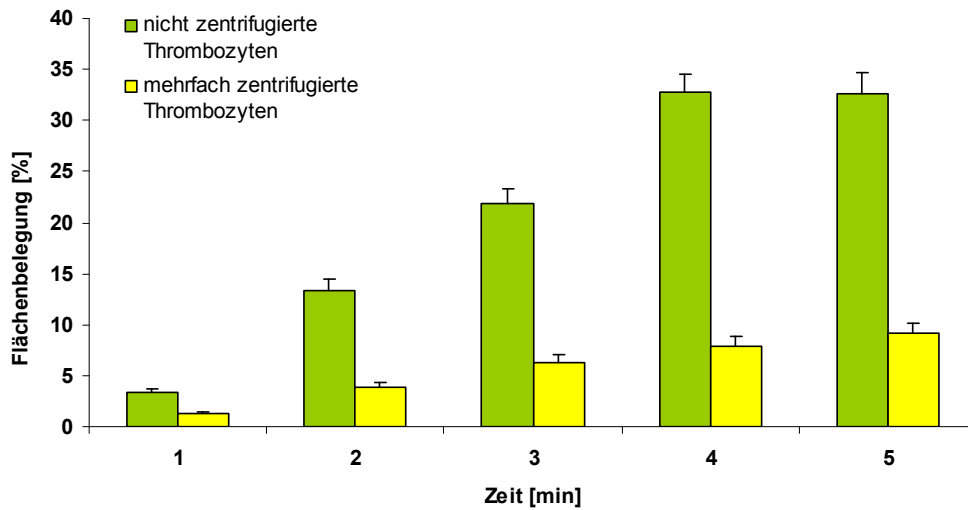


Abb. 20: Kinetik des Aggregatwachstums von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$ . Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten nach Strömungsbeginn quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aller 11 Probanden der Kontrollgruppe.

Unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  zeigt sich zunächst ebenfalls - wie unter den Scherraten  $800 \text{ s}^{-1}$  und  $1500 \text{ s}^{-1}$  - ein linearer Zuwachs der aggregatbedeckten Kollagenoberfläche. Auffallend jedoch ist eine schnellere und stärkere Aggregatbildung der nicht zentrifugierten Thrombozyten der gesunden Probanden, also der Thrombozyten, die direkt - ohne vorausgehende Behandlungsschritte - über die Kollagenoberfläche geströmt wurden. Die Thrombozyten erreichten bereits schon nach 4 Minuten eine prozentuale Aggregatfläche von 32%, ausgehend von einer Flächenbedeckung von 3% der Gesamtfläche nach der ersten Minute. Die Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten zeigt auch unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  ebenfalls eine signifikant geringere prozentuale aggregatbedeckte Fläche mit 8% nach vier Minuten. Jedoch ist hier der Unterschied gravierender als unter den Scherraten  $800 \text{ s}^{-1}$  und  $1500 \text{ s}^{-1}$ .

Über den gesamten Zeitverlauf zeigen sich mittels Auswertung mit dem Mann-Whitney-Test statistisch signifikante Unterschiede zwischen den nicht zentrifugierten und den mehrfach zentrifugierten Thrombozyten ( $p < 0,05$ ).



Bei Betrachtung des Kurvenverlaufes der nicht zentrifugierten Thrombozyten zeichnet sich nach der vierten Minute eine Tendenz zur Sättigung ab. Dies lässt sich auch als morphologisches Korrelat in Bild A der

Abb. 21 (nach der 4. Minute) und Bild B der

Abb. 21 (nach der 5. Minute) erkennen, welche eine ähnlich prozentuale Flächendeckungen zeigen.

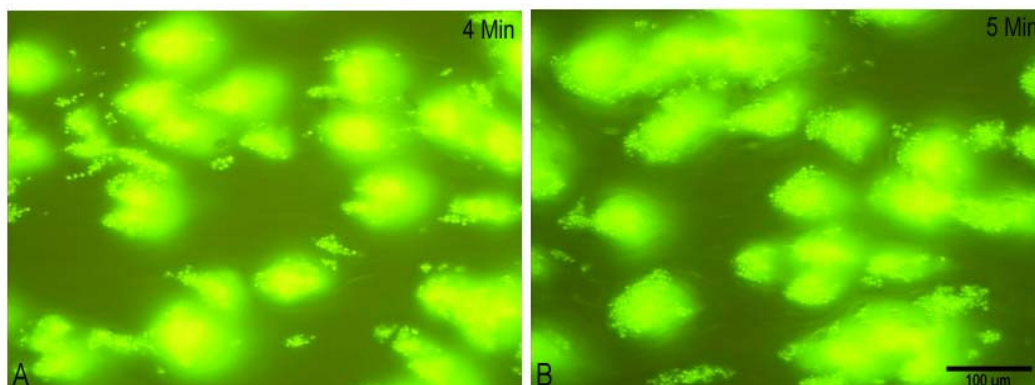


Abb. 21: Exemplarische Darstellung der aggregatbedeckten Kollagenoberfläche im Flusseexperiment mit nicht zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  nach 4 Minuten (A) und 5 Minuten (B).

#### 4.3.1.4 Aggregationsverhalten nicht zentrifugierter Thrombozyten gesunder Spender unter verschiedenen Scherraten bei statistisch äquivalent prozentualer Flächendeckung

Vergleicht man ein Bild aus der Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  nach 4 Minuten mit den Bildern der nicht zentrifugierten Thrombozyten der Scherraten  $1500 \text{ s}^{-1}$  und  $800 \text{ s}^{-1}$  jeweils nach sieben Minuten, so kann annähernd eine gleiche aggregatbedeckte Fläche angenommen werden.

Scherrate [ $\text{s}^{-1}$ ]	Zeit [min]	aggregatbedeckte Fläche [%]
800	7	28,8
1500	7	32,4
4000	4	32,0

Dies zeigt in der Gruppe der gesunden Spender eine schnellere Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten unter der Scherrate von  $4000\text{ s}^{-1}$  im Vergleich zu den Scherraten  $800\text{ s}^{-1}$  und  $1500\text{ s}^{-1}$ .

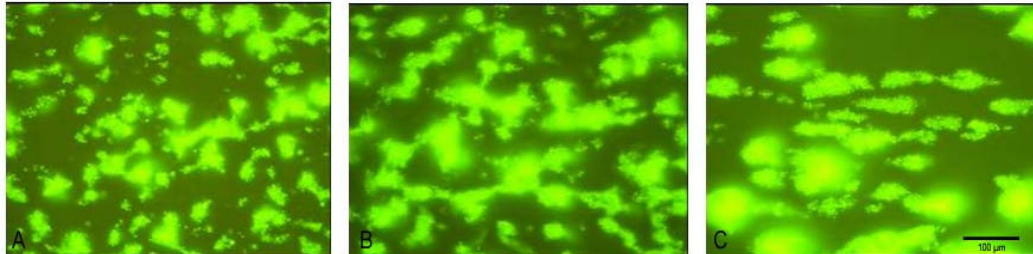


Abb. 22: Aggregationsverhalten von nicht zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender unter den verschiedenen Scherraten. Vergleich von statistisch prozentual ähnlich bedeckten Kollagenoberflächen unabhängig von der Zeitkomponente.  
Bild A zeigt exemplarisch die Aufnahme bei der Scherrate  $800\text{ s}^{-1}$  nach sieben Minuten, Bild B zeigt die Scherrate  $1500\text{ s}^{-1}$  nach 7 Minuten. Bild C zeigt die Endpunktaufnahme nach 4 Minuten unter der Scherrate  $4000\text{ s}^{-1}$ .

### 4.3.2 Patienten mit primärer Thrombozytose: Vergleich von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Proben

#### 4.3.2.1 Scherrate $800 \text{ s}^{-1}$

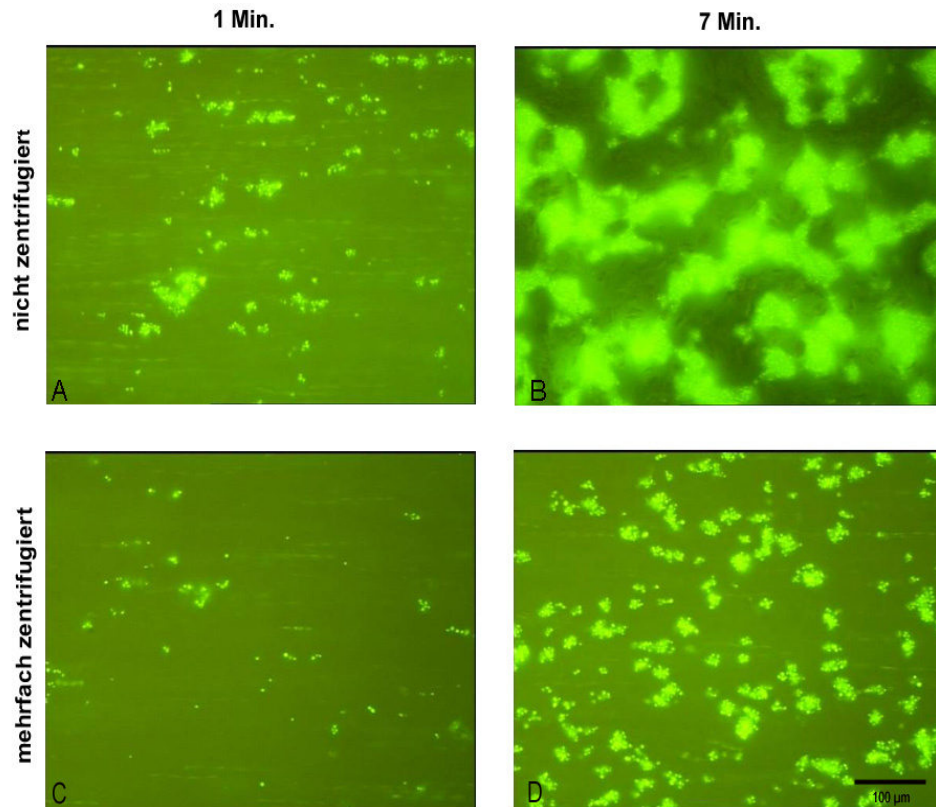


Abb. 23: Aggregationsverhalten von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter Flussbedingungen unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$ . Die Bilder A bis D zeigen exemplarisch im Vergleich die aggregatbedeckte Oberfläche zwischen nicht zentrifugierten Thrombozyten nach 1 Minute (A) und 7 Minuten (B) und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten nach 1 Minute (C) und 7 Minuten (D). Der Versuch erfolgte mit Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose unter der Scherrate von  $800 \text{ s}^{-1}$ . Zur Visualisierung wurden die Thrombozyten mit Mepacrin markiert und über eine kollagenbeschichtete Oberfläche geströmt. Die Bilder aller Probanden stellen die Basis der Auswertung für die folgende graphische Darstellung (Abb. 24) dar.

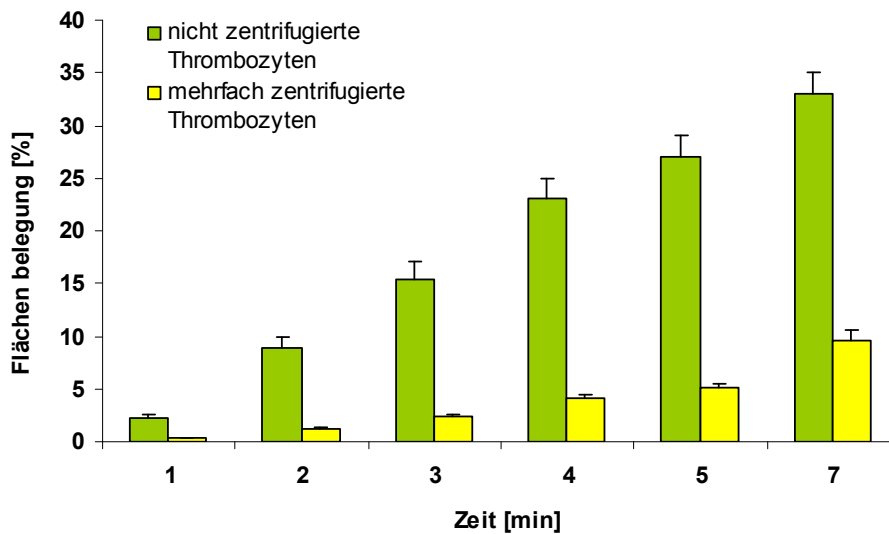


Abb. 24: Kinetik des Aggregatwachstums von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen bei einer Scherrate von  $800 \text{ s}^{-1}$ . Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5 und 7 Minuten nach Strömungsbeginn quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aller 12 Patienten mit primärer Thrombozytose.

In der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose zeigt sich über den gesamten Zeitverlauf hinweg ein kontinuierlicher Zuwachs der aggregatbedeckten Kollagenoberfläche - in der Gruppe mit nicht zentrifugierten Thrombozyten bis auf 33% als auch in der Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten bis auf 9,6%. Zwischen den nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten zeigen sich über den gesamten Zeitverlauf hinweg mittels Mann-Whitney-Test statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2.2 Scherrate $1500 \text{ s}^{-1}$

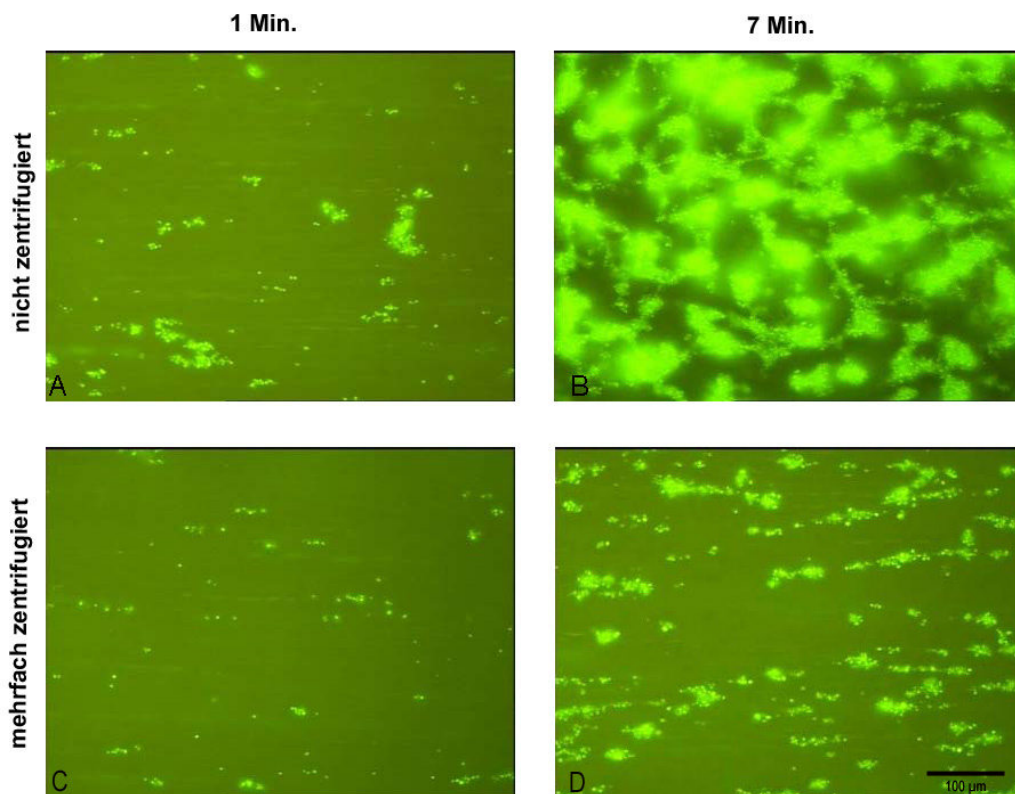


Abb. 25: Aggregationsverhalten von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter Flussbedingungen unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ . Die Bilder A bis D zeigen exemplarisch im Vergleich die aggregatbedeckte Oberfläche zwischen nicht zentrifugierten Thrombozyten nach 1 Minute (A) und 7 Minuten (B) und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten nach 1 Minute (C) und 7 Minuten (D). Der Versuch erfolgte mit Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ . Zur Visualisierung wurden die Thrombozyten mit Mepacrin markiert und über eine kollagenbeschichtete Oberfläche geströmt. Die Bilder aller Patienten stellen die Basis der Auswertung für die folgende graphische Darstellung (Abb. 26) dar.

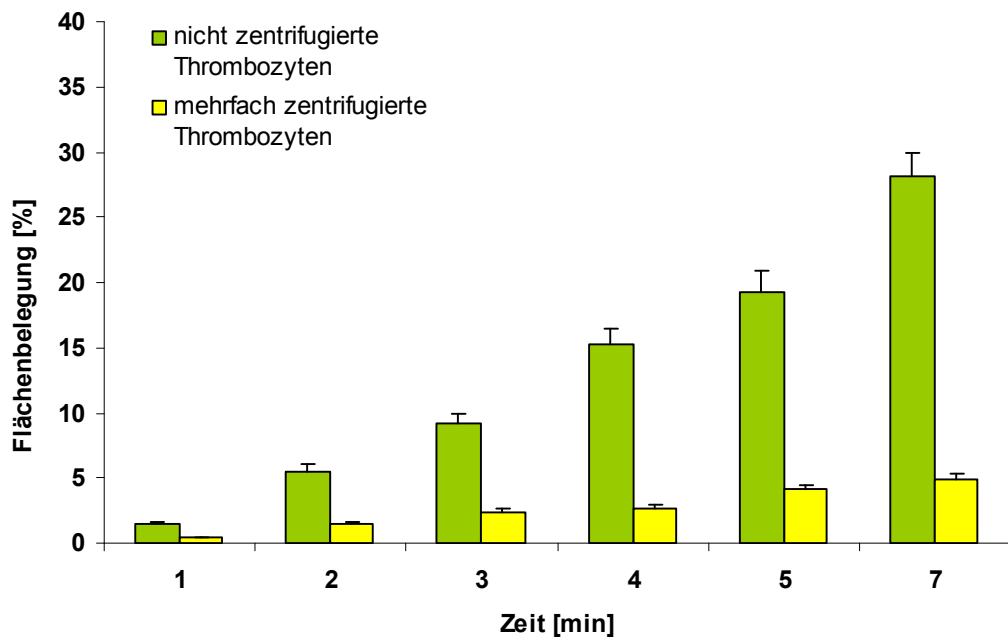


Abb. 26: Kinetik des Aggregatwachstums von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ . Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberflächen mit Aggregaten wurde zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5 und 7 Minuten nach Strömungsbeginn quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aller 12 Patienten mit primärer Thrombozytose.

Auch unter der Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  zeigt sich ein kontinuierlicher Zuwachs der prozentualen aggregatbedeckten Kollagenoberfläche. In der Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten steigt die prozentuale Fläche nach sieben Minuten bis auf 28,1%, die prozentuale Fläche der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf 4,9%. Zwischen den nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten zeigen sich über den gesamten Zeitverlauf hinweg mittels Auswertung mit dem Mann-Whitney-Test ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2.3 Scherrate $4000 \text{ s}^{-1}$

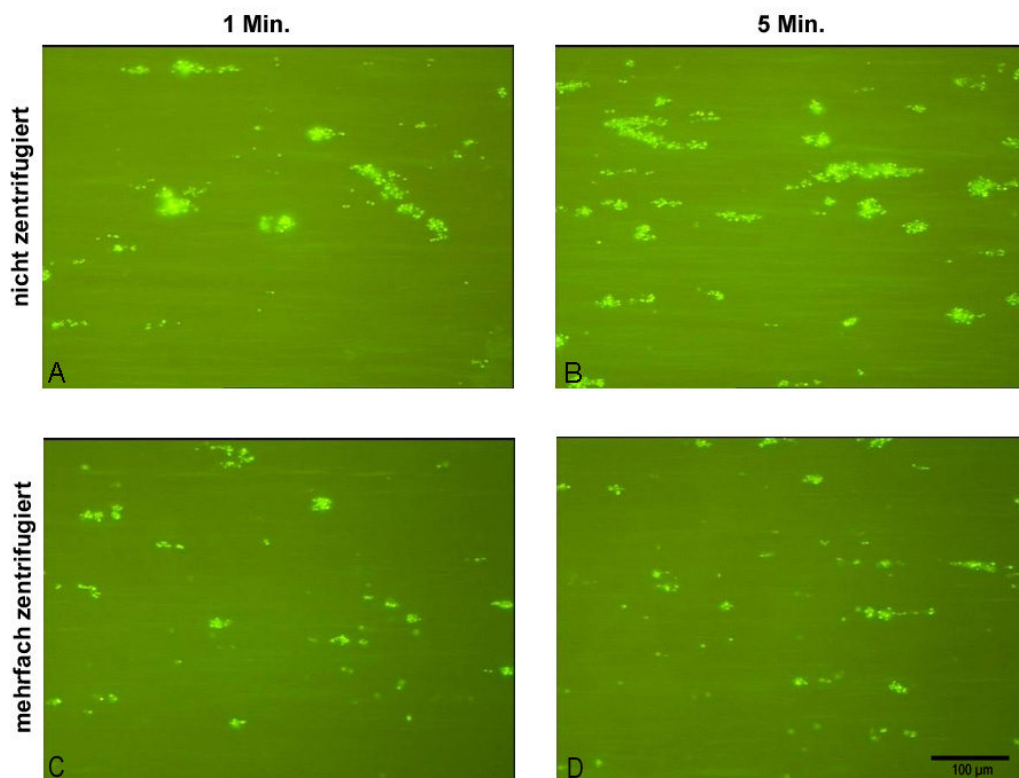


Abb. 27: Aggregationsverhalten von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter Flussbedingungen unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$ .

Die Bilder A bis D zeigen exemplarisch im Vergleich die aggregatbedeckte Oberfläche zwischen nicht zentrifugierten Thrombozyten nach 1 Minute (A) und 5 Minuten (B) und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten nach 1 Minute (C) und 5 Minuten (D). Der Versuch erfolgte mit Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$ . Zur Visualisierung wurden die Thrombozyten mit Mepacrin markiert und über eine kollagenbeschichtete Oberfläche geströmt. Die Bilder aller Patienten stellen die Basis der Auswertung für die folgende graphische Darstellung (Abb. 28) dar.



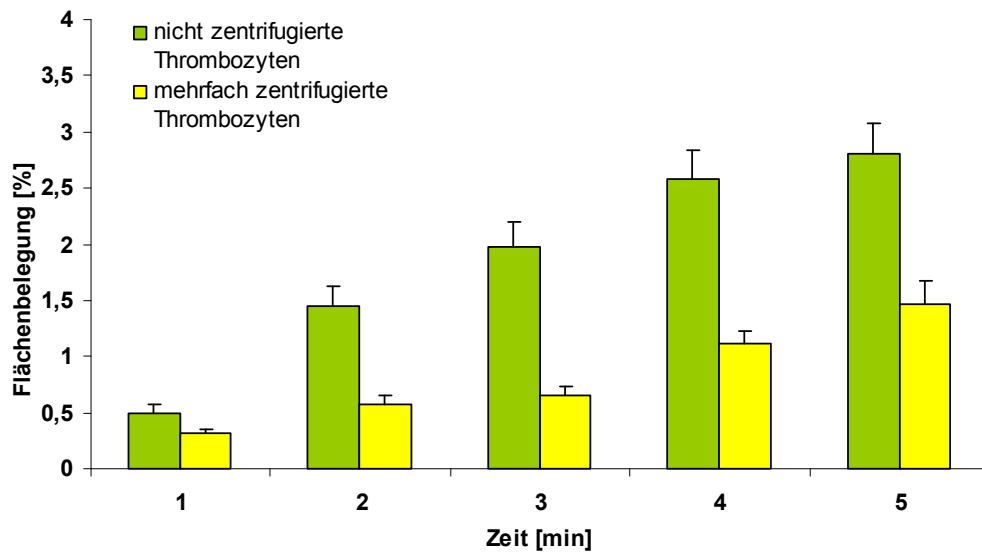


Abb. 28: Kinetik des Aggregatwachstums von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten auf Kollagen unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$ . Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberflächen mit Aggregaten wurde zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten nach Strömungsbeginn quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aller 12 Patienten mit primärer Thrombozytose.

Die Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  in Abb. 28 dargestellt, wurde bis zu 5 Minuten Strömungsdauer visualisiert und ausgewertet. Die Aggregatflächen bleiben hier in einer geringen Ausprägung mit einem Maximum in der Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten von 2,8%. Die prozentuale aggregatbedeckte Oberfläche in der Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten beträgt nach fünf Minuten 1,5%. Die Kurvenverläufe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten über die Zeit ist ebenfalls linear, die prozentualen Aggregatflächen der nicht zentrifugierten als auch der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten sind jedoch erheblich reduziert. Im Vergleich sind die aggregatbedeckten Flächen mittels Auswertung mit dem Mann-Whitney-Test nach fünf Minuten statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).



### **4.3.3 Gesunde Probanden versus Patienten mit primärer Thrombozytose**

Der Vergleich zwischen der Probanden- und Patientengruppe erfolgte jeweils unter Berücksichtigung der Scherrate und der vorausgegangenen Behandlung der Blutprobe. Da möglichst die Situation der Blutzirkulation der Probanden als auch der Patienten nachgestellt werden sollte, wurden für die Gegenüberstellung die Flusseexperimente beider Gruppen mit nicht zentrifugierten Thrombozyten herangezogen. Dabei dürfen allerdings folgende Aspekte nicht außer Acht gelassen werden: die nicht zentrifugierten Thrombozyten der Patienten liegen im supranormalen Bereich zwischen 525.000 bis 1.964.000/ $\mu\text{l}$  und stehen unter dem Einfluss von Acetylsalicylsäure. Die Thrombozyten der gesunden Probanden hingegen liegen bezüglich der Werte im Normbereich und unterliegen keinen antiaggregatorischen Arzneimitteln.

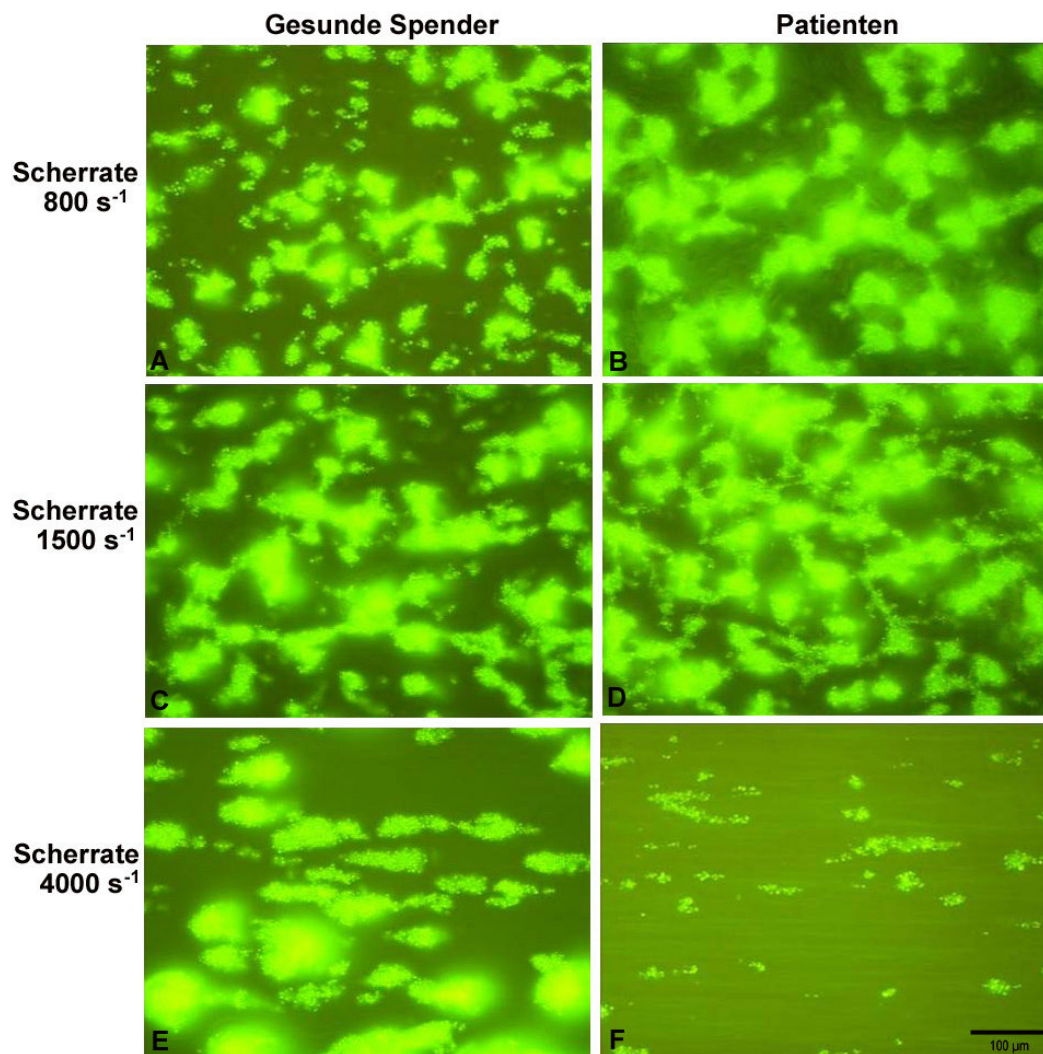


Abb. 29: Exemplarische Darstellung der Aggregatformierung nicht zentrifugierter Thrombozyten gesunder Spender im Vergleich zu Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose am Ende der Beobachtungszeit. In vitro Flusseexperiment über Kollagen unter den Scherraten  $800 \text{ s}^{-1}$ ,  $1500 \text{ s}^{-1}$  und  $4000 \text{ s}^{-1}$ .

Die Echtzeitmikroskopieaufnahmen zeigen exemplarisch die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche der nicht zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender mit Thrombozytenwerten im Normbereich (A, C und E). Im Vergleich dazu stehen die aggregatbedeckten Kollagenoberflächen von nicht zentrifugierten Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose mit Werten im Supranormalbereich (B, D und F) jeweils unter den entsprechenden Scherraten. Die Bilder A, B, C, D zeigen die Aggregatformierung nach sieben Minuten, Bilder E und F nach fünf Minuten.

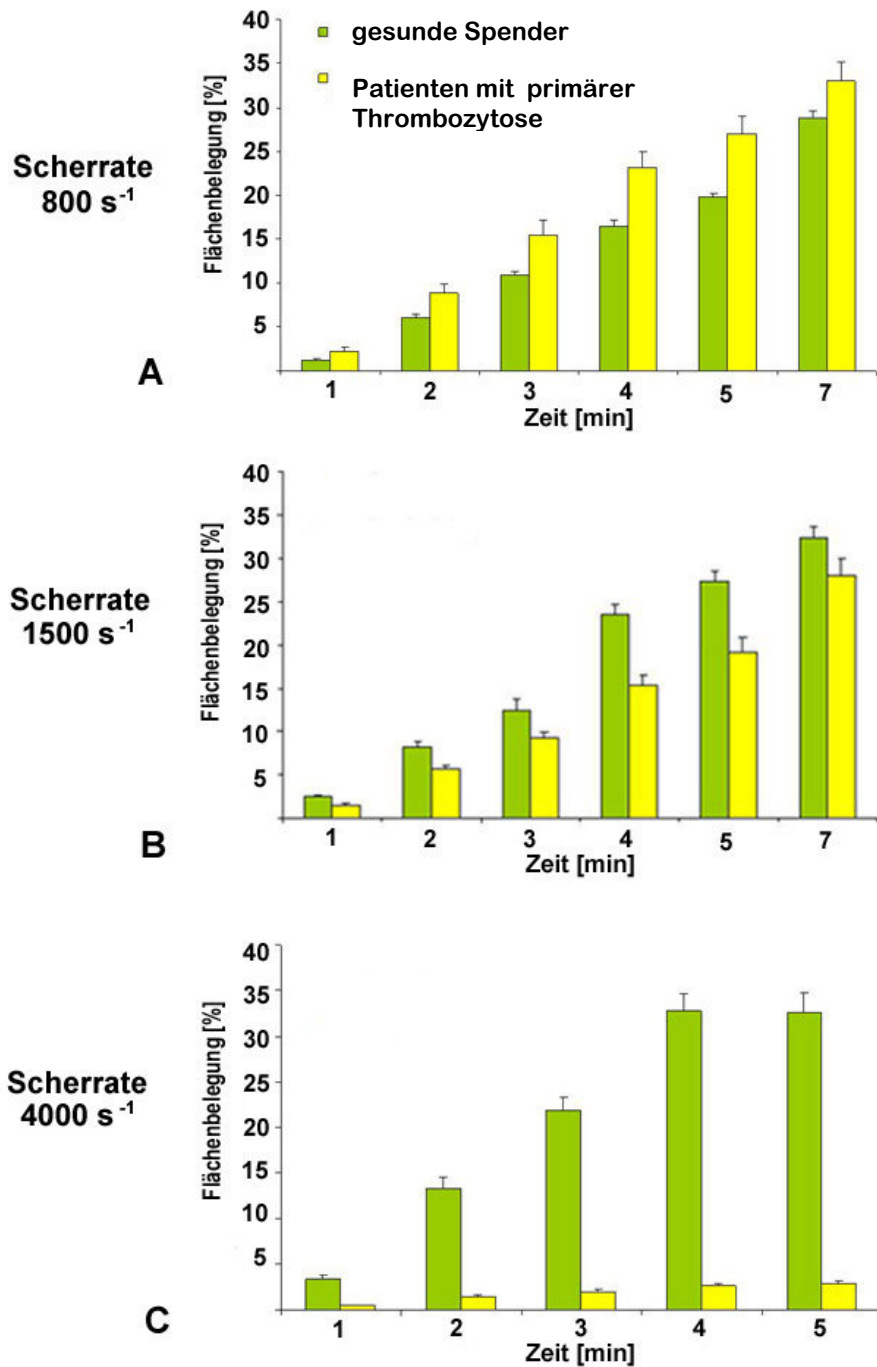


Abb. 30: Kinetik des Aggregatwachstums nicht zentrifugierter Thrombozyten gesunder Spender im Vergleich zu nicht zentrifugierter Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose. In vitro Flusseexperiment über Kollagen unter der Scherraten 800 s<sup>-1</sup>, 1500 s<sup>-1</sup> und 4000 s<sup>-1</sup>. Der Vergleich der Kinetik des Aggregatwachstums in Bild A zeigt die Scherrate 800 s<sup>-1</sup>, Bild B die Scherrate 1500 s<sup>-1</sup> und Bild C die Scherrate 4000 s<sup>-1</sup>.

Über den gesamten Zeitverlauf des Flussexperimentes unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  (A) zeigt sich in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose eine größere prozentuale aggregatbedeckte Fläche als in der Gruppe der gesunden Spender ( $p > 0,05$ ). Jedoch schon unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  (F) zeichnet sich eine Änderung beziehungsweise Umkehrung dieses Verhältnisses ab. Trotz eines Mehrfachen an Thrombozyten im Blut der Patienten übersteigt die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche der gesunden Spender die aggregatbedeckte Fläche der Patienten ( $p > 0,05$ ).

Ein noch deutlicheres Bild zeigt der exemplarische Vergleich der Echtzeitaufnahmen zwischen nicht zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender und Patienten mit primärer Thrombozytose in Bild G und H unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  nach fünf Minuten. Dieser Eindruck wird mit der graphischen Darstellung in C (Abb. 30) bestätigt. Die prozentual bedeckte Kollagenoberfläche der gesunden Spender liegt hier trotz der im Normbereich liegenden Thrombozytenwerte jeweils ungefähr um ein zehnfaches höher als die der Patienten mit primärer Thrombozytose. Mittels Mann-Whitney-Test konnte unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  ein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden ( $p < 0,05$ ).

#### **4.3.4 Patientenspezifische Einflussfaktoren auf die Aggregation**

##### **4.3.4.1 Kinetik der Thrombozytenaggregation gesunder Spender: Thrombozytenwerte im Normalbereich und in vitro hergestellte Thrombozytenwerte im Supranormalbereich**

Um den Stellenwert der Thrombozytenkonzentration im Vollblut einzuschätzen, wurden die Thrombozyten in Proben gesunder Spender auf supranormale Thrombozytenwerte eingestellt. Die in vitro Herstellung dieser hohen Thrombozytenkonzentrationen im Vollblut von über  $800.000/\mu\text{l}$  erfordert mehrere Zentrifugationsschritte und die Zugabe von Apyrase (s. Material und Methodenteil). Um sich auf methodisch vergleichbare Referenzwerte beziehen zu können, wurden für den Vergleich mehrfach zentrifugierte Thrombozyten gesunder Spender im Normalbereich eingesetzt.

#### 4.3.4.1.1 Scherrate $800 \text{ s}^{-1}$

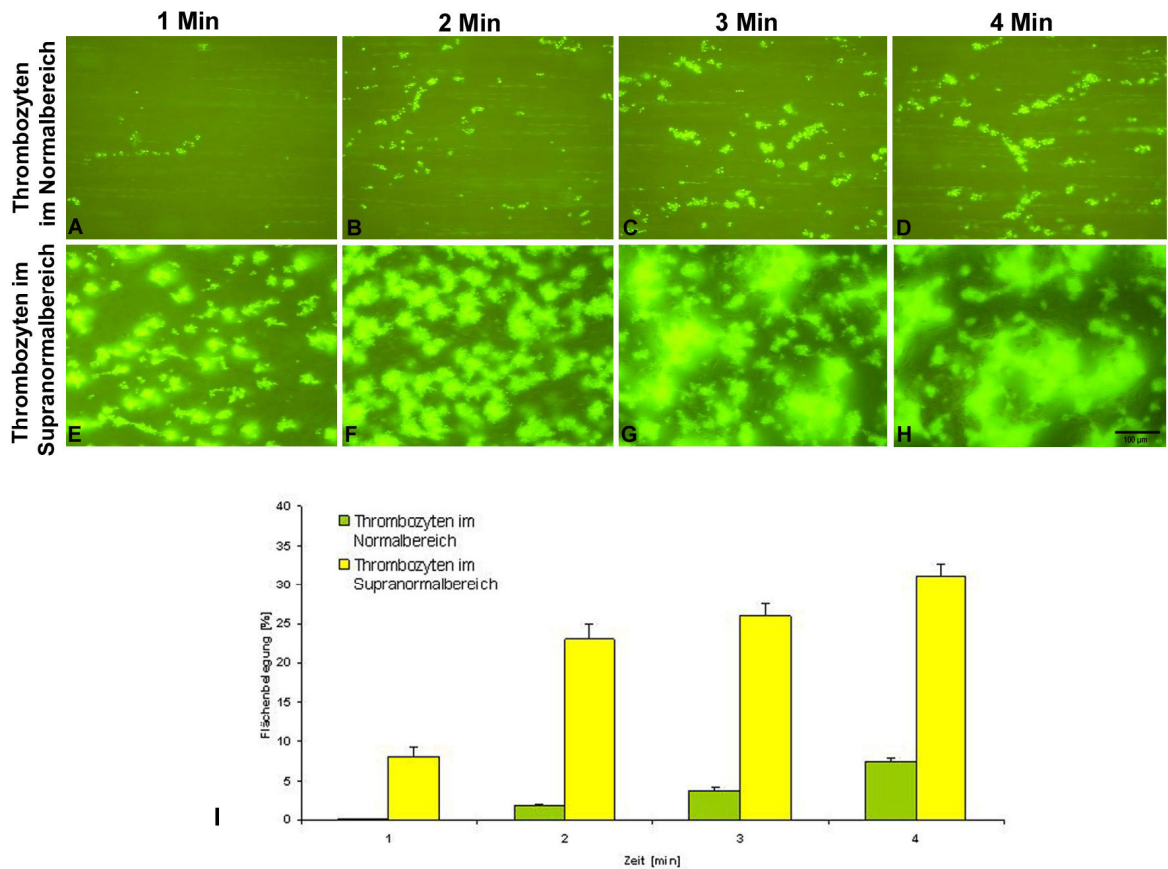


Abb. 31: Aggregationsverhalten von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender im Normalbereich im Vergleich zu Thrombozyten gesunder Spender mit Konzentrationen im Supranormalbereich unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$ .

Die Bilder A bis D zeigen exemplarisch das Aggregationsverhalten von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten im Normalbereich im Vergleich zu mehrfach zentrifugierten Thrombozyten im Supranormalbereich (E bis H) jeweils zu den Zeitpunkten 1, 2, 3 und 4 Minuten. Es werden Proben von jeweils 11 gesunden Spendern gegenübergestellt. Die Kinetik des Aggregatwachstums ist in Abhängigkeit zu der Zeit in I dargestellt.

Die Einstellung der Thrombozytenzahl über  $800.000/\mu\text{l}$  erfolgte durch in vitro Konzentration. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils 11 gesunden Spendern.

Die prozentuale aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von Proben gesunder Spender mit in vitro eingestellten Thrombozytenwerten im Supranormalbereich, zeigt unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  zu jeder Minute ab Beginn der Blutperfusion einen kontinuierlichen Zuwachs. Die prozentuale Fläche erreicht bei diesen Proben bereits nach vier Minuten einen Wert von 31,2%.

In der Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten, die aufgrund gleicher Zentrifugationsschritte hinsichtlich der Vorbehandlung zum Vergleich herangezogen wurden, mit Thrombozytenzahlen im Normalbereich, zeigt sich nach vier Minuten lediglich eine prozentuale Flächenbedeckung mit Aggregaten von 7,4%. Die statistische Auswertung des Vergleiches erfolgt mittels Mann-Whitney Test, welcher über den gesamten Zeitverlauf ein statistisch signifikantes Ergebnis zeigt ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.4.1.2 Scherrate $1500 \text{ s}^{-1}$

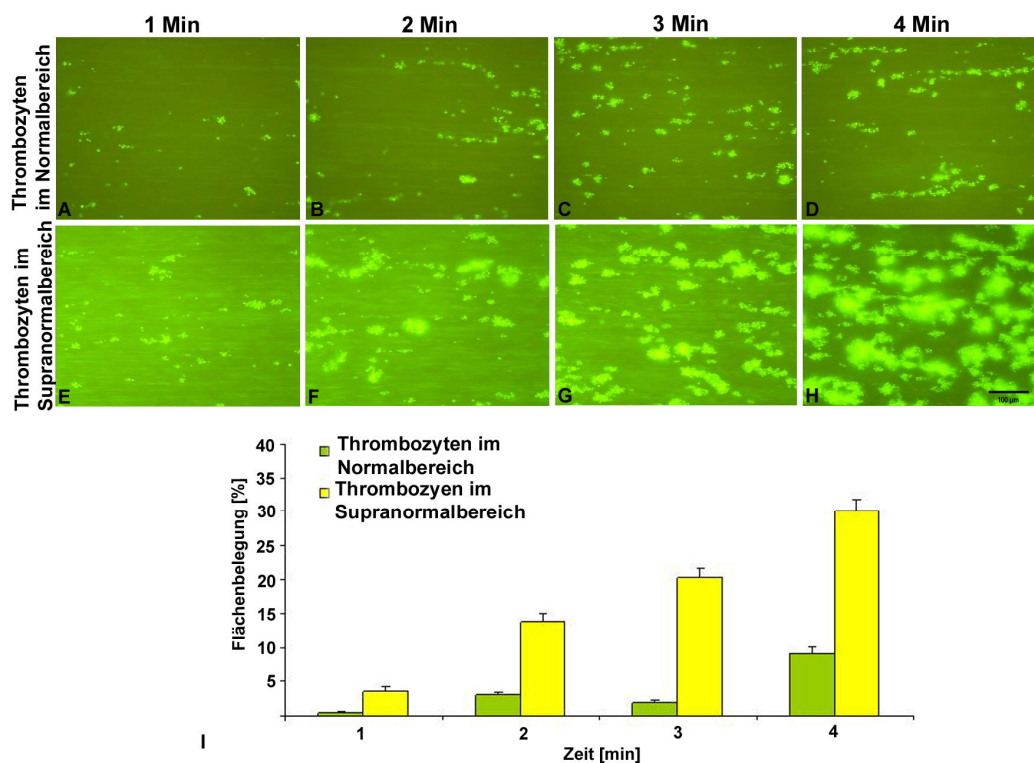


Abb. 32: Aggregationsverhalten von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender im Normalbereich im Vergleich zu Thrombozyten gesunder Spender mit Konzentrationen im Supranormalbereich unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ . Die Bilder A bis D zeigen exemplarisch das Aggregationsverhalten von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten im Normalbereich im Vergleich zu mehrfach zentrifugierten Thrombozyten im Supranormalbereich (E bis H) jeweils zu den Zeitpunkten 1, 2, 3 und 4 Minuten. Es werden Proben von jeweils 11 gesunden Spendern gegenübergestellt. Die Kinetik des Aggregatwachstums ist in Abhängigkeit zu der Zeit in der Graphik I dargestellt. Die Einstellung der Thrombozytenzahl über  $800.000/\mu\text{l}$  erfolgte durch in vitro Konzentration. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils 11 gesunden Spendern.

Unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  zeigt sich in der Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten als auch in der Gruppe mit supranormalen Thrombozytenwerten ein kontinuierlicher Zuwachs an aggregatbedeckter Kollagenoberfläche. Die Gruppe mit Thrombozyten im Supranormalbereich erreicht nach 4 Minuten eine Flächenbedeckung von 30%. Hingegen erreicht die Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten mit Werten im Normalbereich nur eine prozentuale Flächenbedeckung von 9,2%. Die statistische Auswertung des Vergleiches erfolgt mittels Mann-Whitney Test, welcher über den gesamten Zeitverlauf ein statistisch signifikantes Ergebnis zeigt ( $p < 0,05$ ).



#### 4.3.4.1.3 Scherrate $4000 \text{ s}^{-1}$

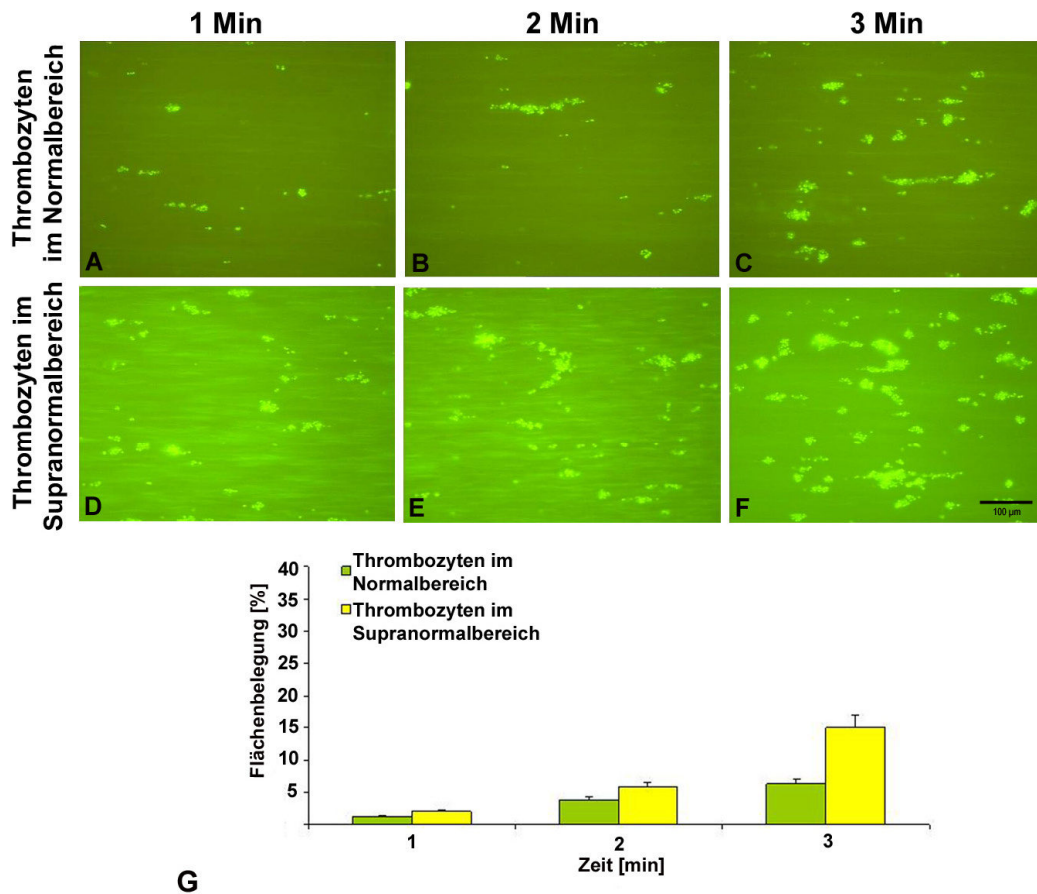


Abb. 33: Aggregationsverhalten von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender im Normalbereich im Vergleich zu Thrombozyten gesunder Spender mit Konzentrationen im Supranormalbereich unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$ .

Die Bilder A bis C zeigen exemplarisch das Aggregationsverhalten von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender mit Thrombozytenkonzentrationen im Normalbereich im Vergleich zu mehrfach zentrifugierten Thrombozyten mit Konzentrationen im Supranormalbereich (D - F) jeweils zu den Zeitpunkten 1, 2 und 3 Minuten. Es wurde die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten quantifiziert. Die Kinetik des Aggregatwachstums beider Gruppen ist in Abhängigkeit zu der Zeit in der Graphik G dargestellt. Die Einstellung der Thrombozytenzahl über  $800.000/\mu\text{l}$  erfolgte durch in vitro-Konzentration. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardabweichung von jeweils 11 gesunden Spendern.

Unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  zeigt sich ebenfalls ein kontinuierlicher Zuwachs an aggregatbedeckter Kollagenoberfläche. Jedoch findet sich in der Gruppe der in vitro eingestellten Thrombozyten mit Werten über  $800.000/\mu\text{l}$  nach 3 Minuten lediglich eine aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von 14,8%. In der Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten nimmt die aggregatbedeckte



Kollagenoberfläche 6,2% der Gesamtfläche ein. Mittels Mann-Whitney-Test konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

#### **4.3.4.2 Einfluss von Acetylsalicylsäure auf das Aggregationsverhalten der Thrombozyten gesunder Spender und auf Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose**

Unter dem Aspekt der *supranormalen Thrombozytenkonzentration* gibt diese Gegenüberstellung Aufschluss über das Verhalten der Thrombozyten im Bereich zwischen 525.000 bis 1.964.000/ $\mu\text{l}$  unter verschiedenen Bedingungen. Zunächst wurden Proben gesunder Probanden mit in vitro hergestellten supranormalen Thrombozytenwerten mit nicht zentrifugierten Thrombozyten von Patienten verglichen. Zusätzlich findet in dieser Versuchsreihe eine weitere Gruppe gesunder Spender deren Thrombozyten unter dem Einfluss von Acetylsalicylsäure stehen, Berücksichtigung. Dazu wurden von gesunden Spendern, die Acetylsalicylsäure eingenommen haben, Vollblutproben entnommen und in vitro auf supranormale Thrombozytenwerte eingestellt. Dieser Testansatz kommt der Konstellation im Blut der Patienten sehr nahe. Für den Vergleich mit Referenzwerten wurden nicht zentrifugierte Thrombozyten der Patienten gewählt, da hier das Hauptaugenmerk auf die *Konzentration der Thrombozyten im Supranormalbereich* gelegt wurde. Zudem führte die in vorangehenden Flusseexperimenten starke Beeinträchtigung der Thrombozyten insbesondere in der Gruppe der Patienten durch die Zentrifugation zu dieser Entscheidung.

#### 4.3.4.2.1 Scherrate $800 \text{ s}^{-1}$

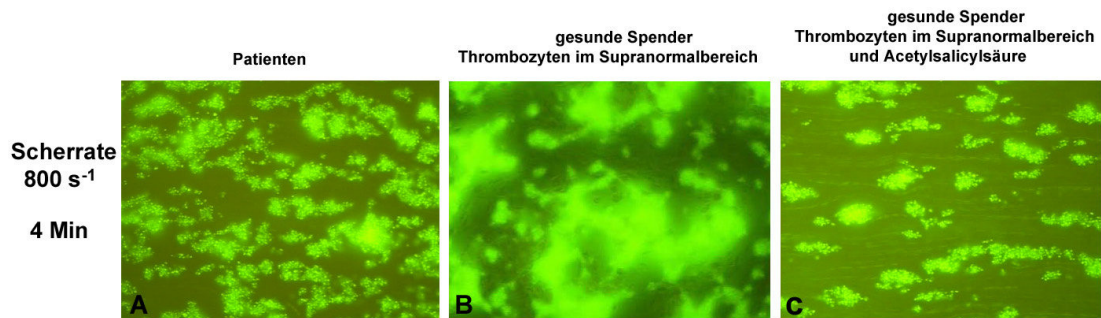


Abb. 34: Exemplarische Darstellung des Aggregationsverhaltens nicht zentrifugierter Thrombozyten von Patienten (A). Im Vergleich dazu mehrfach zentrifugierte Thrombozyten zum Zweck der Einstellung auf supranormale Werte in der Gruppe der gesunden Spender (B) und mehrfach zentrifugierte Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure (C). Die Bilder zeigen die Ablagerung von Thrombozyten und Aggregatbildung auf Kollagen jeweils vier Minuten nach Perfusionsbeginn unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$ .

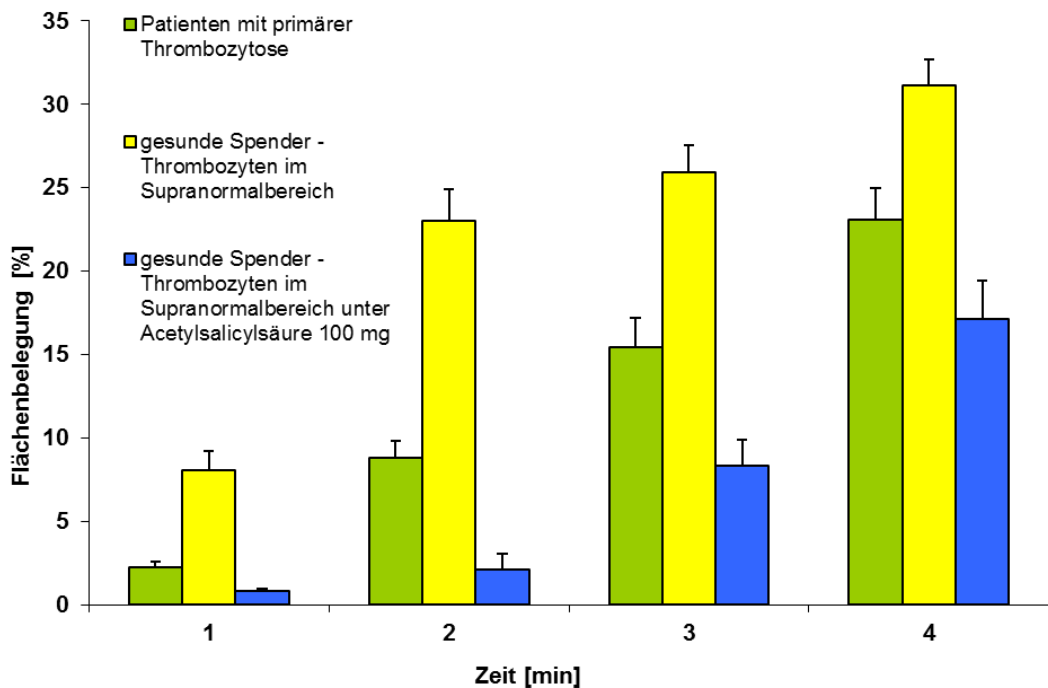


Abb. 35: Kinetik des Aggregatwachstums nicht zentrifugierter Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose, im Vergleich zu Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich und Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure 100 mg/Tag unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$ .

Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde zu den Zeitpunkten 1, 2, 3 und 4 Minuten quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und

die Standardabweichung von 12 Patienten für die Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten, der 11 gesunden Spender für die in vitro Konzentration der Thrombozyten sowie der 7 gesunden Spendern mit supranormalen Thrombozytenwerten unter Einnahme von 100 mg Acetylsalicylsäure pro Tag.

Nach vier Minuten Perfusion zeigt sich in der Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose eine prozentual bedeckte Kollagenoberfläche von 23%. Im Vergleich dazu erreicht die Gruppe der gesunden Spender deren Thrombozytenwerte durch in vitro Konzentration auf supranormale Werte angehoben wurde, eine Fläche von 31,2%. Diese Fläche konnte in der Gruppe der gesunden Spender mit supranormalen Thrombozytenwerten durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure deutlich reduziert werden und erreicht nur noch einen Wert von 16%.

#### 4.3.4.2.2. Scherrate $1500\text{ s}^{-1}$

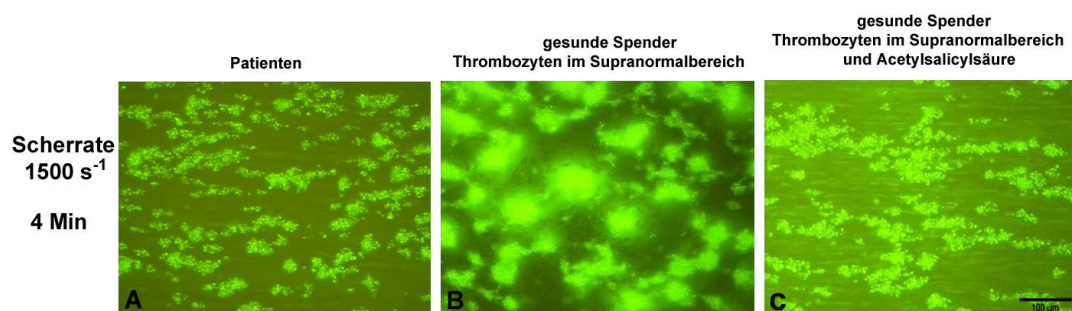


Abb. 36: Exemplarische Darstellung des Aggregationsverhaltens nicht zentrifugierter Thrombozyten von Patienten (A). Im Vergleich dazu mehrfach zentrifugierte Thrombozyten zum Zweck der Einstellung auf supranormale Werte in der Gruppe der gesunden Spender (B) und mehrfach zentrifugierte Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure (C). Die Bilder zeigen die Ablagerung von Thrombozyten und Aggregatbildung auf Kollagen jeweils vier Minuten nach Perfusionsbeginn unter der Scherrate  $1500\text{ s}^{-1}$ .

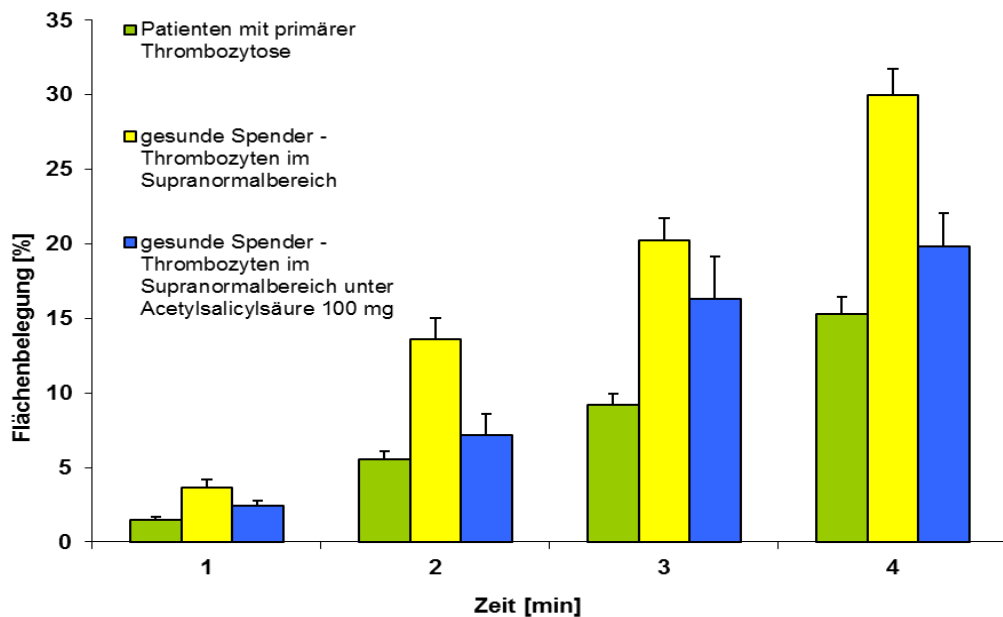


Abb. 37: Kinetik des Aggregatwachstums nicht zentrifugierter Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose, im Vergleich zu Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich und im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure 100 mg/Tag unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ .

Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  zu den Zeitpunkten 1, 2, 3 und 4 Minuten quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung von 12 Patienten für die Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten, der 11 gesunden Spender für die in vitro Konzentration der Thrombozyten sowie der 7 gesunden Spendern mit supranormalen Thrombozytenwerten unter Einnahme von 100 mg Acetylsalicylsäure pro Tag.

Unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  findet sich nach vier Minuten in der Gruppe mit nicht zentrifugierten Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose eine aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von 15%. Im Vergleich dazu steht die Gruppe der gesunden Spender, deren Thrombozytenwerte durch in vitro – Konzentration auf supranormale Werte angehoben wurden, mit einer aggregatbedeckten Fläche von 30%. Durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure konnte in der Gruppe der gesunden Spender mit in vitro eingestellten supranormalen Thrombozytenwerten eine Reduktion der prozentual bedeckten Fläche auf 19% erreicht werden.

#### 4.1.1.4.3 Scherrate $4000 \text{ s}^{-1}$

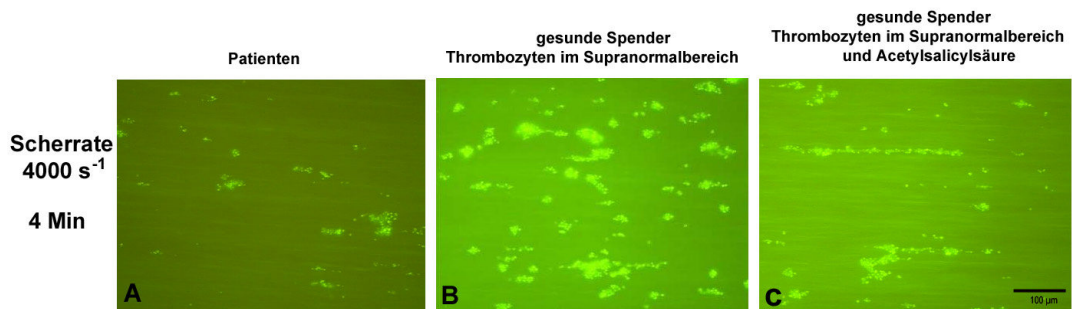


Abb. 38: Exemplarische Darstellung des Aggregationsverhaltens nicht zentrifugierter Thrombozyten von Patienten (A). Im Vergleich dazu mehrfach zentrifugierte Thrombozyten zum Zweck der Einstellung auf supranormale Werte in der Gruppe der gesunden Spender (B) und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure (C). Die Bilder zeigen die Ablagerung von Thrombozyten und Aggregatbildung auf Kollagen jeweils drei Minuten nach Perfusionsbeginn unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$ .

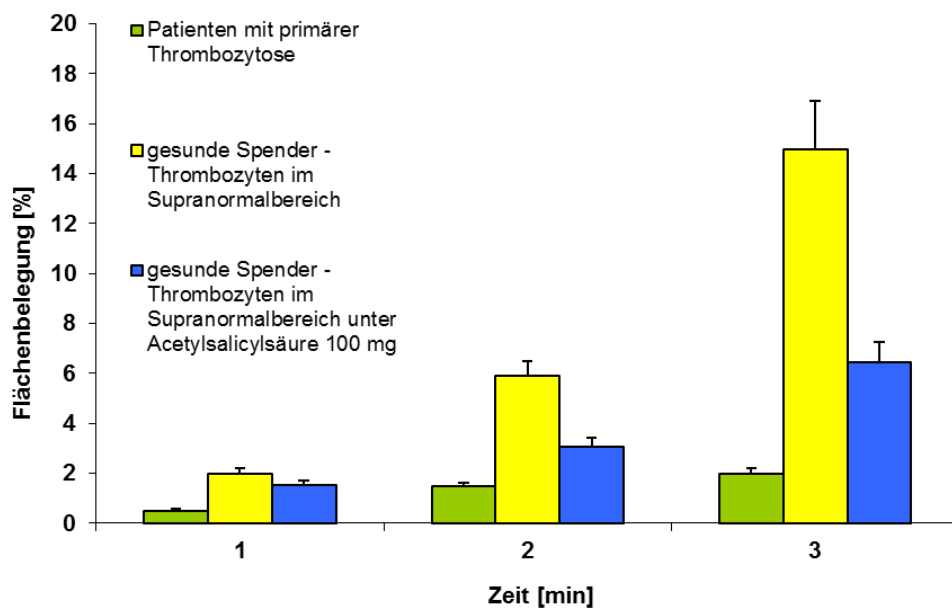


Abb. 39: Kinetik des Aggregatwachstums nicht zentrifugierter Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose, im Vergleich zu Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich und im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure 100 mg/Tag unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$ .

Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde zu den Zeitpunkten 1, 2, und 3 Minuten quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung von 12 Patienten in der Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten, der 11 gesunden Spender für die in vitro Konzentration der Thrombozyten sowie der 7 gesunden Spendern mit supranormalen Thrombozyten unter Einnahme von Acetylsalicylsäure.

Unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  findet sich nach drei Minuten in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose mit nicht zentrifugierten Thrombozyten eine aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von 2%. Im Vergleich dazu steht die Gruppe der gesunden Spender, deren Thrombozytenwerte durch in vitro - Konzentration auf supranormale Werte angehoben wurde. Dieser Gruppe gelingt es unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  mit Abstand am besten Aggregate zu formieren und erreicht nach drei Minuten eine prozentuale aggregatbedeckte Fläche von 15%. Durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure in der Gruppe der gesunden Spender mit in vitro eingestellten supranormalen Thrombozytenkonzentrationen wird eine Reduktion der prozentual bedeckten Aggregatfläche auf 6,4% erreicht.

Im Vergleich zu den Scherraten  $800 \text{ s}^{-1}$  und  $1500 \text{ s}^{-1}$  zeigt sich jedoch unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  ein prozentualer Abfall der maximal erreichbaren aggregatbedeckten Oberfläche in allen Gruppen und zu jedem gemessenen Zeitpunkt.

#### **4.3.5 Einfluss der einzelnen Komponenten der primären Hämostase auf die Aggregation**

Da die Auswertung der prozentualen Aggregationsflächen der Flusseexperimente gesunder Probanden im Vergleich zu Patienten mit primärer Thrombozytose signifikante Unterschiede zeigte, wurden weiterführende Versuche - sogenannte Tauschversuche - durchgeführt. Hierbei wurde jeweils eine mögliche fehlerhafte Komponente des Patientenblutes durch die korrespondierende Komponente gesunder Spender ersetzt. Zum einen wurden dabei isoliert die Thrombozyten der Patienten durch Zentrifugation entfernt und durch Thrombozyten eines gesunden Spenders ersetzt. Zum anderen wurden von dem gleichen Patienten in einem weiteren Ansatz das Plasma und die Erythrozyten aus der Vollblutprobe entfernt und durch Material eines gesunden Spenders ersetzt. Die Versuche fanden unter Berücksichtigung der Blutgruppe statt, um störende Interaktionen aufgrund von Blutgruppeninkompatibilitäten zu vermeiden. Desweiteren erfolgte in der in vitro hergestellten Vollblutprobe der Patienten die Einstellung der Thrombozyten- und Hämoglobinkonzentration auf im Normbereich liegende Werte.

Als äquivalente Referenzbereiche hinsichtlich der prozentualen aggregatbedeckten Kollagenoberfläche wurden die mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder

Spender, als auch die mehrfach zentrifugierten Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose herangezogen. Diese sind hinsichtlich der Thrombozytenwerte und der methodischen Probenaufbereitung mit der in vitro hergestellten Probe des Tauschversuches vergleichbar.

#### **4.3.5.1 Austausch von Thrombozyten**

##### **4.3.5.1.1 Vergleich von gesunden Spendern, Patienten mit primärer Thrombozytose und in vitro hergestellten Patientenproben mit Ersatz der Thrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender**

Zunächst werden die Thrombozyten aus einer Patientenprobe mittels Zentrifugation entfernt und durch Thrombozyten gesunder Probanden ersetzt. Das über das Kollagen strömende Blut enthält alle physiologischen Komponenten. Bei dem Austausch der Komponenten wurden die Hämoglobin- und Thrombozytenwerte auf Normwerte eingestellt. Für den Vergleich in den folgenden Diagrammen wurden die mehrfach zentrifugierten Testansätze der gesunden Probanden und der Patienten mit primärer Thrombozytose gewählt, da diese methodisch denselben Präparationsschritten unterliegen.

#### 4.3.4.1.1.1 Scherrate $800\text{ s}^{-1}$

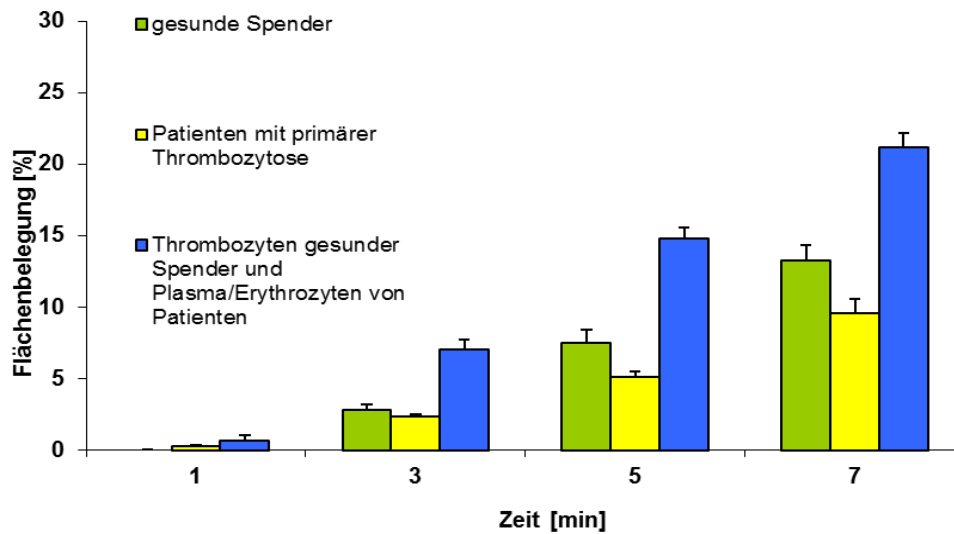


Abb. 40: Kinetik des Aggregatwachstums mehrfach zentrifugierter Thrombozyten gesunder Spender im Vergleich zu mehrfach zentrifugierter Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose und der in vitro hergestellten Blutproben von Patienten, in welchen die Thrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender ersetzt wurden.

Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde unter der Scherrate  $800\text{ s}^{-1}$  zu den Zeitpunkten 1, 3, 5 und 7 Minuten quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung 11 gesunder Spender, der 12 Patienten mit primärer Thrombozytose und der 8 Patienten für die in vitro Herstellung der Vollblutprobe mit Ersatz der Thrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender.

In der Abb. 40 welche der Scherrate  $800\text{ s}^{-1}$  entspricht, zeigen sich zwischen den Proben der gesunden Spender und der Patienten mit primärer Thrombozytose eine ähnliche Flächenbelegung. Jedoch im Vergleich dieser beiden Gruppen zu den in vitro hergestellten Blutproben, in welchen die Thrombozyten der Patienten durch Thrombozyten gesunder Spender ersetzt wurden, zeigen sich signifikante Unterschiede. Diese Gruppe übersteigt mit einer prozentualen Aggregatfläche von 21,2% die aggregatbedeckte Fläche der Gruppe der gesunden Spender (13,5%) als auch die der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose (9,6%). Der Unterschied zwischen den Gruppen der gesunden Spender und der Patienten mit primärer Thrombozytose im Vergleich zu der in vitro hergestellten Proben von Patienten mit Thrombozyten gesunder Spender ist als statistisch signifikant zu bezeichnen (Kruskal-Wallis-Test;  $p < 0,05$ ).



#### 4.3.4.1.1.2 Scherrate $1500\text{ s}^{-1}$

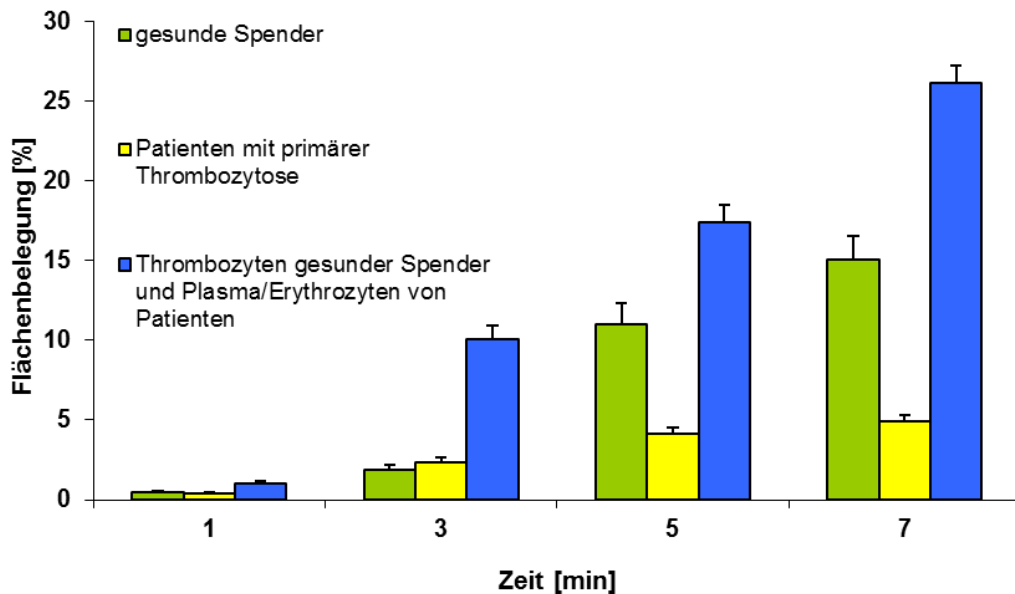


Abb. 41: Kinetik des Aggregatwachstums mehrfach zentrifugierter Thrombozyten gesunder Spender im Vergleich zu mehrfach zentrifugierten Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose und der in vitro hergestellten Blutproben der Patienten, in welchen die Thrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender ersetzt wurden

Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde unter der Scherrate  $1500\text{ s}^{-1}$  zu den Zeitpunkten 1, 3, 5 und 7 Minuten quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung von 11 gesunden Spendern, der 12 Patienten mit primärer Thrombozytose und der 8 Patientenproben für die in vitro Herstellung der Vollblutprobe mit Ersatz der Thrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender.

Unter der Scherrate  $1500\text{ s}^{-1}$  (Abb. 41) zeigt sich, dass die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche in der Gruppe der in vitro hergestellten Proben der Patienten mit den Thrombozyten gesunder Spender die Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten der gesunden Spender, als auch der Patienten mit primärer Thrombozytose, in signifikantem Maße übersteigt. Nach sieben Minuten Bestromung des Kollagens mit in vitro bearbeitetem Blut erreicht diese Gruppe eine aggregatbedeckte Oberfläche von 26,1%, im Vergleich zu den mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender mit 15,0% und der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten der Patienten mit 4,9%. Auch hier ist der Unterschied zwischen den Gruppen der gesunden Spender und der Patienten im Vergleich zu der Gruppe der in vitro hergestellten Patientenprobe mit Ersatz der Thrombozyten durch die Thrombozyten gesunder Spender als statistisch signifikant anzusehen ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test).

#### 4.3.4.1.1.3 Scherrate $4000\text{ s}^{-1}$

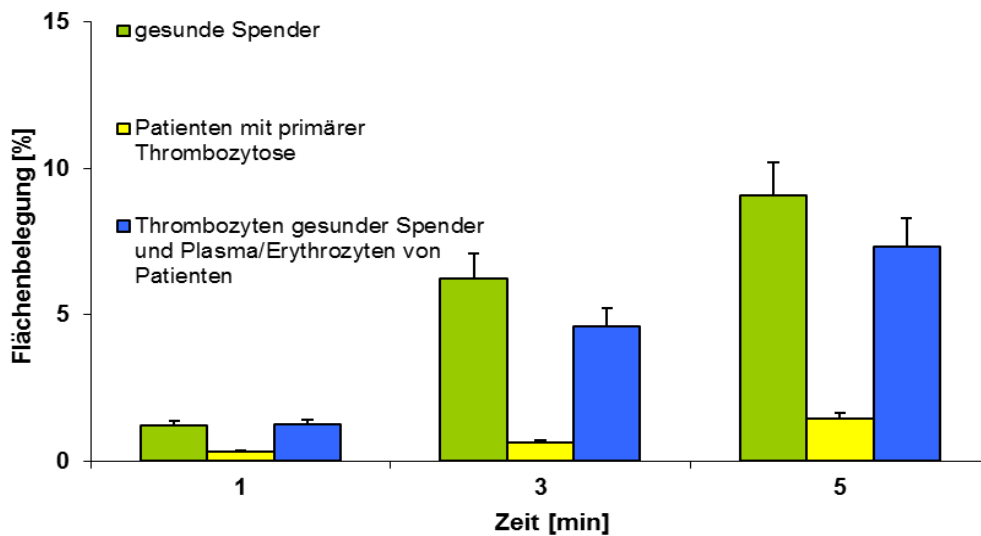


Abb. 42: Kinetik des Aggregatwachstums mehrfach zentrifugierter Thrombozyten gesunder Probanden im Vergleich zu mehrfach zentrifugierten Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose und in vitro hergestellten Blutproben der Patienten, in welchen die Thrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender ersetzt wurden.

Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde unter der Scherrate  $4000\text{ s}^{-1}$  zu den Zeitpunkten 1, 3 und 5 Minuten quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung von 11 gesunden Spendern, der 12 Patienten mit primärer Thrombozytose und der 8 Patientenproben für die in vitro Herstellung der Vollblutprobe mit Ersatz der Thrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender.

Unter der Scherrate von  $4000\text{ s}^{-1}$  (Abb. 42) zeigt sich über den gesamten Zeitverlauf in allen Gruppen eine deutlich reduzierte aggregatbedeckte Kollagenoberfläche im Vergleich zu den anderen Scherraten. Tendenziell zeigt sich jedoch, dass die prozentual aggregatbedeckte Kollagenoberfläche der Gruppe der gesunden Spender als auch die der in vitro hergestellten Blutproben der Patienten mit Ersatz der Thrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender die prozentuale Fläche der Patienten signifikant übersteigen. Die prozentual bedeckte Oberfläche beträgt in der Gruppe der gesunden Spender 9% und in der Gruppe der in vitro hergestellten Patientenprobe mit den Thrombozyten der gesunden Spender 7,3%. Im Gegensatz dazu steht die Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose, die nach 5 Minuten nur eine Fläche von 1,5% erreicht. Zwischen der Gruppe der gesunden Spender und der in vitro hergestellten Patientenprobe mit dem Ersatz der Thrombozyten durch gesunde Thrombozyten besteht kein signifikanter Unterschied.

#### 4.3.4.2 Austausch der Erythrozyten und des Plasmas

##### 4.3.4.2.1 Vergleich von gesunden Spendern, Patienten mit primärer Thrombozytose und in vitro hergestellten Blutproben von Patienten mit Ersatz der Erythrozyten und des Plasmas durch Erythrozyten und Plasma gesunder Spender

In dem Ansatz des sogenannten Plasmatauschversuches wurden sowohl das Plasma als auch die Erythrozyten durch Zentrifugation entfernt und ersetzt. Die Thrombozytenzahlen und die Hämatokritwerte wurden auf Normwerte eingestellt. Als Vergleichswerte wurden die mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender und die mehrfach zentrifugierten Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose verwendet, da diese methodisch den gleichen Bedingungen unterliegen.

###### 4.3.4.2.1.1 Scherrate $800\text{ s}^{-1}$

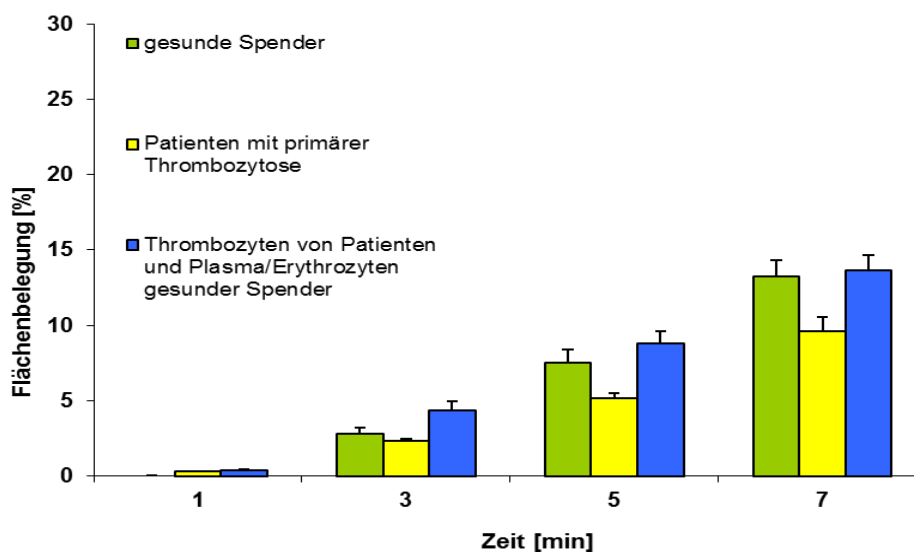


Abb. 43: Kinetik des Aggregatwachstums von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Probanden, von Patienten mit primärer Thrombozytose und von in vitro hergestellten Proben der Patienten, in welchen das Plasma und die Erythrozyten durch Plasma und Erythrozyten gesunder Spender ersetzt wurden.

Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde unter der Scherrate  $800\text{ s}^{-1}$  zu den Zeitpunkten 1, 3, 5 und 7 Minuten quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung von 11 gesunden Spendern, 12 Patienten mit primärer Thrombozytose und 8 Patientenproben für die in vitro Herstellung von Vollblut mit Ersatz des Plasmas und der Erythrozyten durch die entsprechenden Komponenten eines gesunden Spenders.

Die Abb. 43 veranschaulicht, dass die Aggregatbildung unter der Scherrate  $800\text{ s}^{-1}$  in allen Gruppen relativ ähnlich ist. Es konnte zwischen den Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Gruppe der gesunden Spender erreicht eine prozentual bedeckte Kollagenoberfläche von 13,6%, die Gruppe der Patienten von 9,6% und die Patientenprobe in der das Plasma und die Erythrozyten ersetzt wurden, erreicht 13,5%.

#### 4.3.4.2.1.2 Scherrate $1500\text{ s}^{-1}$

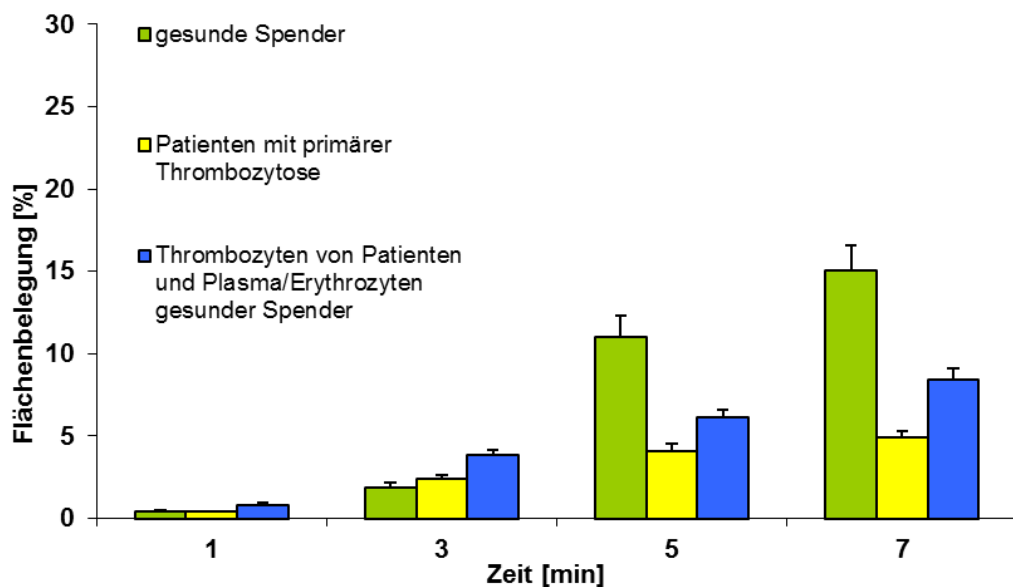


Abb. 44: Kinetik des Aggregatwachstums von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Probanden, von Patienten mit primärer Thrombozytose und von in vitro hergestellten Blutproben der Patienten, in welchen das Plasma und die Erythrozyten durch Plasma und Erythrozyten gesunder Spender ersetzt wurden.

Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde unter der Scherrate  $1500\text{ s}^{-1}$  zu den Zeitpunkten 1, 3, 5 und 7 Minuten quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung von 11 gesunden Spendern, 12 Patienten mit primärer Thrombozytose und 8 Patientenproben für die in vitro Herstellung von Vollblut mit Ersatz des Plasmas und der Erythrozyten durch die entsprechenden Komponenten eines gesunden Spenders.

Die Kinetik des Aggregatwachstums ändert sich unter der Scherrate von  $1500\text{ s}^{-1}$  im Vergleich zu der Scherrate von  $800\text{ s}^{-1}$ . Die Proben der gesunden Probanden zeigen hier mit 15,0% eine größere aggregatbedeckte Kollagenoberfläche als die Proben der Patienten mit primärer Thrombozytose (4,9%) und der in vitro

hergestellten Proben mit Ersatz des Patientenplasmas und der Erythrozyten durch die Komponenten eines gesunden Spenders mit 8,4%.

#### 4.3.4.2.1.2 Scherrate $4000\text{ s}^{-1}$

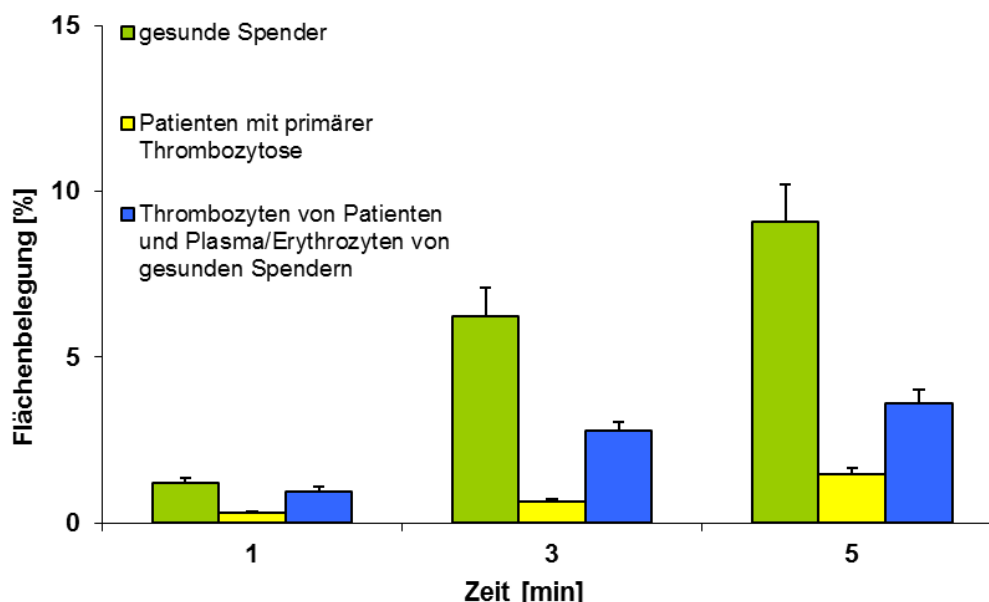


Abb. 45: Kinetik des Aggregatwachstums von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Probanden, von Patienten mit primärer Thrombozytose und von in vitro hergestellten Blutproben der Patienten in welchen das Plasma und die Erythrozyten durch Plasma und Erythrozyten gesunder Spender ersetzt wurden.

Die prozentuale Bedeckung der Kollagenoberfläche mit Aggregaten wurde unter der Scherrate  $4000\text{ s}^{-1}$  zu den Zeitpunkten 1, 3 und 5 Minuten quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung von 11 gesunden Spender, 12 Patienten mit primärer Thrombozytose und 8 Patientenproben für die in vitro Herstellung von Vollblut mit Ersatz des Plasmas und der Erythrozyten durch die entsprechenden Komponenten eines gesunden Spenders.

Auch unter der Scherrate von  $4000\text{ s}^{-1}$  in Abb. 45 kann durch Ersatz des Plasmas eines Patienten durch gesundes Plasma mit einer prozentual bedeckten Fläche von 3,6% nicht die prozentuale Aggregatfläche der Gruppe der gesunden Probanden mit 9,1% erreicht werden. Die Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose erreicht eine maximal aggregatbedeckte Fläche von 1,5%.

Unter allen drei Scherraten zeigt sich im Vergleich zwischen der Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten mit den in vitro hergestellten Blutproben von Patienten, in welchen das Blutplasma und die Erythrozyten durch die Komponenten

eines gesunden Spenders ersetzt wurden jeweils mittels Kruskal-Wallis Test kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4 Multimeren- und Proteinanalyse des von Willebrand Faktors

Eine wichtige Komponente der Hämostase ist neben den Thrombozyten der von Willebrand Faktor. Laboranalytisch können die einzelnen Multimere mittels Elektrophorese auf einem Agarosegel aufgetrennt werden. Dieses Verfahren wurde durch Prof. Dr. med. U. Budde etabliert und findet seither Anwendung in der von Willebrand Faktor Diagnostik. Bei Auftrennung eines Normalplasmapools findet man folgendes Bild.

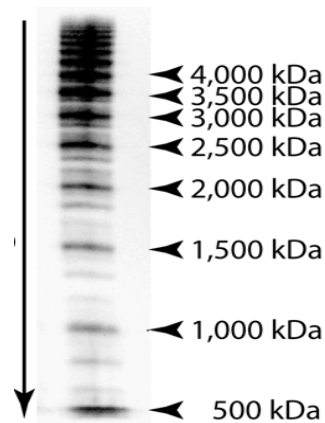


Abb. 46: Charakteristische elektrophoretische Auftrennung der von Willebrand Multimere eines Normalplasmapools in 1,6 % igem Agarosegel.

Die letzte Bande in Pfeilrichtung (entspricht der Laufrichtung im Gel) steht repräsentativ für das kleinste auch als Dimer bezeichnete von Willebrand Faktor Molekül. Das Molekül mit dem geringsten Molekulargewicht bringt im Gel die größte Strecke hinter sich. Die Multimere trennen sich nach ihrem Molekulargewicht auf, bis zu den größten von Willebrand Faktor Multimeren mit 4000 kDa. Bei jeder elektrophoretischen Auftrennung wird als Referenz bei jedem Patient ein Normalplasmapool mitgeführt, um Abweichungen der Gelzusammensetzung als relevanten Störungen zu erkennen.

Bei Patienten mit primärer Thrombozytose ist ein Verlust der großen Multimere des von Willebrand Faktors beschrieben (von Genderen, 1996).

In unserem Patientenkollektiv zeigt sich bei 58% in der elektrophoretischen Auftrennung der Multimere des von Willebrand Faktors eine relative Abnahme der großen Multimere, 42% unserer Patienten zeigen Veränderungen die die Tripletstruktur der einzelnen Oligomere betrifft. Die Tripletstruktur ist in diesen

Patientenplasmen nachweisbar, jedoch zeigt sich eine Betonung der schnellsten Subbande. In der Tabelle 4 ist die Auswertung der Veränderungen des von Willebrand Faktors dargestellt.

Patient	von Willebrand Faktor		
	relative Abnahme der großen Multimere	Fehlen der größten Multimere	erhöhte Proteolyseaktivität
1	x		
2	x		
3		x	
4		x	X
5		x	X
6		x	X
7	x		
8	x		
9	x		
10	x		
11	X		X
12		x	

Tabelle 4: Auswertung der gelelektrophoretischen Analyse des von Willebrand Faktors

## **5. DISKUSSION**

### **5.1 Diskussion der Methode**

#### **5.1.1 Flusskammer als geeignetes in vitro Modell des Gefäßsystems**

Die Flusskammer kommt den in vivo Bedingungen eines Gefäßes sehr nahe, zudem können die Flussexperimente unter sehr kontrollierten Strömungsbedingungen durchgeführt werden. Durch den kontrollierten Versuchsaufbau mit einer stabilen Flusskammer ist eine Rekonstruktion und Wiederholung der Experimente jederzeit möglich. Die Einzelteile der Kammer, die zu Beginn eines Flussexperimentes zusammengebaut werden, begrenzen den Flusskanals immer mit den gleichen Abmessungen.

Zu berücksichtigen ist jedoch, dass an beiden Rändern des Flusskanals jeweils Turbulenzen und Strömungen auftreten, die eine Thrombusablagerung begünstigen. Diese Randbezirke können für die Auswertung nicht herangezogen werden. Die Kammerdimensionierung erlaubt jedoch einen genügend hohen Messabstand vom Kammerrand und dadurch eine zuverlässige Bewertung der Ablagerung in Abhängigkeit von der Scherrate.

#### **5.1.2 Methodenbedingte Störgrößen**

Die Durchführung der verschiedenen Testansätze erfordert eine spezielle Bearbeitung der Proben. Insbesondere für das Einstellen der Thrombozytenwerte der Proben gesunder Spender auf supranormale Thrombozytenwerte werden Zentrifugationsschritte und die Zugabe von transient wirkenden Inhibitoren zu der Probe notwendig. Durch die mechanischen Kräfte der Zentrifugation werden die Thrombozyten möglicherweise aktiviert, die Thrombozyteninhibitoren verhindern jedoch eine komplette Aktivierung und Aggregation. Dennoch stehen die Thrombozyten anschließenden für die Versuche nicht mehr in voller Reaktionsfähigkeit zur Verfügung. Um diese Störgröße zu minimieren, wurden die Versuche der unbehandelten und der behandelten Blutproben der Patienten und der gesunden Spender im Vergleich durchgeführt und gegenübergestellt.



## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Untersuchung der Thrombozytenadhäsion

Um die Thrombozytenadhäsion beurteilen zu können, wurden Blutproben gesunder Spender und der Patienten mit primärer Thrombozytose über immobilisierten von Willebrand Faktor geströmt. Vor dem Flussversuch wurden die Blutproben gewaschen und aufbereitet, um Störfaktoren des eigenen von Willebrand Faktors zu vermeiden. Für das Experiment wurden die Scherraten  $1500 \text{ s}^{-1}$  und  $10000 \text{ s}^{-1}$  gewählt, da die Adhäsion unter diesen Scherraten ausschließlich mittels Interaktion des von Willebrand Faktors und dem GP Ib-Rezeptors stattfindet (Ruggeri, 2004). Es wurden gesunde Spender und Patienten mit primärer Thrombozytose verglichen. In der Gruppe der Patienten wurden zwei verschiedene Ansätze hinsichtlich der Thrombozytenzahl durchgeführt. Zum einen Proben von Patienten mit supranormaler Thrombozytenzahl und zum anderen mit in vitro reduzierter Thrombozytenzahl.

Der Vergleich zwischen der Gruppe der gesunden Spender und der Patienten mit primärer Thrombozytose zeigt unter beiden Scherraten in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose eine signifikant höhere Adhäsionsfläche als in der Gruppe der gesunden Spender. Als Ursache für die größere Adhäsionsfläche in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose könnte die supranormale Zahl an Thrombozyten der Patienten vermutet werden. Allerdings bestätigte sich dieser Verdacht in der Untersuchung von Patientenproben mit in vitro auf Normwerte reduzierte Thrombozytenwerte nicht. Unter der Scherrate  $10000 \text{ s}^{-1}$  erreicht die Gruppe der Patienten mit in vitro reduzierten Thrombozytenzahlen die größte prozentuale Adhäsionsfläche. Durch die in vitro - Reduktion der Thrombozytenzahl wird bewiesen, dass nicht die erhöhte Thrombozytenzahl in dem Blut der Patienten mit primärer Thrombozytose eine vermehrte Adhäsion verursacht. Demzufolge wirft dies die Frage auf, ob quantitative Veränderungen des GPIb-Rezeptors ursächlich für die vermehrte Adhäsion in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose sein könnten.

Um die Frage einer verstärkten Ausprägung des GP Ib-Rezeptors zu klären, wurde die Rezeptordichte der Patienten im Vergleich zu einem Normalkollektiv mittels

durchflusszytometrischer Verfahren untersucht. Dabei wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten beider Gruppen verglichen. Bezüglich des Adhäsionsrezeptors GP Ib konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Demnach kann man davon ausgehen, dass die Rezeptordichte des GP Ib-Rezeptors der Patienten mit primärer Thrombozytose der eines gesunden Spenders entspricht, und dies somit nicht die Ursache der größeren Adhäsionsfläche ist.

Hinsichtlich der größeren Adhäsionsfläche in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose sind, nach Ausschluss einer vermehrten Ausprägung der Thrombozytenrezeptoren, noch zwei Komponenten als ursächlich für die verstärkte Adhäsion in Betracht zu ziehen. Beide Komponenten in Kombination führen vermutlich zu der vergrößerten Adhäsionsfläche in der Gruppe der Patienten.

Zum einen gilt es zu diskutieren, ob die vermehrte Adhäsion durch andere Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche vermittelt werden kann. Laut Literatur ist das P-Selektin ebenfalls zur Bindung an den von Willebrand Faktor befähigt (Gawaz, 1999). Unsere durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen bezüglich des P-Selektins in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose eine vermehrte Ausprägung dieses Rezeptors nach Stimulation mit TRAP (thrombin receptor activating peptide). Man kann davon ausgehen, dass in dem Flussversuch über den von Willebrand Faktor die Stimulation beziehungsweise Aktivierung der Thrombozyten mittels mechanischer Kräfte durch die vorbereitenden Schritte der Zentrifugation (s. Material und Methoden) und der Versuch unter Strömungsbedingungen die Aktivierung der Thrombozyten triggert und vermehrt P-Selektin auf der Oberfläche der Thrombozyten präsentiert wird. Da aber gesunde Thrombozyten ebenfalls diesen Zentrifugationsschritten ausgesetzt wurden ist von einer erhöhten Aktivierbarkeit der Patiententhrombozyten auszugehen. Wir nehmen an, dass durch das vermehrt nachweisbare P-Selektin auf den Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose eine zusätzliche Bindung am immobilisierten von Willebrand Faktor stattfindet und eine verstärkte Adhäsion verursacht.

Die zweite Komponente welche zu einer größeren Adhäsionsfläche führen kann, zeigt sich bei Beurteilung der RIKM-Aufnahmen. Dabei fällt in der Gruppe der Patienten eine vergrößerte Adhäsionsfläche der einzelnen Thrombozyten auf. Diese morphologische Auffälligkeit bezüglich der Größe der Thrombozyten wurde bereits

in Blutausstrichpräparaten als Makro- und Mikrothrombozyten mit einer veränderten Thrombozytenverteilungskurve, die eine erhöhte Frequenz der Mikro- und Makrothrombozyten angibt, nachgewiesen (J. van der Lelie, 1986). Diese größere Fläche der einzelnen Thrombozyten trägt vermutlich ebenfalls zu einem gewissen Anteil an der größeren Adhäsionsfläche in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose bei.

## **5.2.2 Untersuchung der Thrombozytenaggregation über Kollagen Typ I**

### **5.2.2.1 Aggregatbedeckte Kollagenoberflächen von nicht zentrifugierten Thrombozyten gesunder Probanden und von Patienten mit primärer Thrombozytose**

Zunächst erfolgt ein direkter Vergleich der durch in-vitro Flusseexperimente ermittelten aggregatbedeckten Kollagenoberfläche nicht zentrifugierter Thrombozyten gesunder Probanden und von Patienten mit primärer Thrombozytose. Dies dient um Veränderungen des Aggregationsverhaltens und der Kinetik bei Patienten mit primärer Thrombozytose zu evaluieren. Nach sieben Minuten Bestromung der Kollagenoberfläche mit Citratblut wurde die prozentuale aggregatbedeckte Kollagenoberfläche bestimmt. Diese Fläche liegt in der Gruppe der gesunden Spender unter der Scherrate von  $800 \text{ s}^{-1}$  bei 28,8% im Vergleich zu der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose bei 33%. Unter der Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  beträgt die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche in der Gruppe der gesunden Spender 32,4%, in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose 28,1%. Bezüglich der Aggregatfläche zeigen sich im Vergleich der beiden Gruppen unter den Scherraten  $800 \text{ s}^{-1}$  und  $1500 \text{ s}^{-1}$  keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dies bestätigt, dass der in der Literatur mehrfach beschriebene Verlust an großen Multimere des von Willebrand Faktors unter diesen niedrigen Scherraten ( $0-1500 \text{ s}^{-1}$ ) keinen Einfluss zu haben scheint, da die Aggregatflächen der gesunden Spender und der Patienten mit primärer Thrombozytose annähernd gleiche Werte annehmen. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass unter niedrigen Scherraten neben dem von Willebrand Faktor zusätzlich weitere Plasmaproteine wie Fibrinogen dem Aggregationsvorgang dienen (Savage B et al., 1996). Wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben wird der Mangel an großen Multimeren des von Willebrand Faktors unter niedrigen Scherraten durch Fibrinogen oder anderen

prokoagulatorischen Plasmaproteinen kompensiert (Savage B et al., 1996). Der Mangel des von Willebrand Faktors wird demnach unter niedrigen Scherraten, das heißt in Gefäßen des venösen Systems bis hin zu mittelgroßen Arterien, klinisch nicht relevant.

Dieser Mechanismus greift, unseren Ergebnissen nach, jedoch nur unter niedrigen Scherraten (bis maximal  $1500 \text{ s}^{-1}$ ). Unter hohen Scherraten kann der Mangel an großen Multimeren beziehungsweise die besondere Funktion des von Willebrand Faktors im Hinblick auf die primäre Hämostase weder durch andere Plasmaproteine ersetzt, noch durch die supranormalen Thrombozytenwerte kompensiert werden. Dies zeigt die Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$ . Dabei finden sich statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose und der gesunden Spender. Die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche der Patienten mit primärer Thrombozytose zeigt unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  über den gesamten Zeitverlauf hinweg deutlich reduzierte aggregatbedeckte Kollagenoberflächen im Vergleich zu der aggregatbedeckten Fläche der gesunden Spender. Nach fünf Minuten Beströmung der Kollagenoberfläche mit Citratblut beträgt die prozentuale Fläche in der Gruppe der gesunden Spender 32,0%, im Vergleich zu einer Fläche von 2,8% in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose. Das Ergebnis der gering ausgeprägten Aggregatformierungen in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  ist mit den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe von Budde et al. zu erklären, welche bei Patienten mit primärer Thrombozytose einen Verlust der großen Multimere des von Willebrand Faktors beschreiben (Budde et al., 2010). Dieser Verlust beziehungsweise die Reduktion der großen Multimere des von Willebrand Faktors konnte auch in unserem Patientenkollektiv zu 100% festgestellt werden. Da die großen Multimere und gleichermaßen entscheidend die physiologische Verteilung dieser, eine enorme Bedeutung unter hohen Scherraten gewinnt, ist der Verlust beziehungsweise die Reduktion der großen von Willebrand Faktor Multimere eine plausible Erklärung für die geringgradige Ausprägung der Aggregate unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  (Savage B, 1996). Klinisch könnte sich dies in einer verstärkten Blutungsneigung bei Verletzung kleinerer arterieller Blutgefäße äußern, wie es in der Körperperipherie als auch in Gefäßen der Organversorgung typisch ist.

### 5.2.2.2 Einfluss der methodenbedingten Störgrößen

Um Experimente anzuschließen, die eine in vitro Konzentration von Thrombozyten gesunder Spender mit Normwerten auf Supranormalwerte beziehungsweise die in vitro Reduktion der Thrombozytenzahl von Patienten mit primärer Thrombozytose beinhalteten, musste die Gewichtung der dazu notwendigen Präparationsschritte evaluiert werden. Als Präparationsschritte waren vor dem Flussexperiment mehrere Zentrifugationsschritte und die Zugabe eines reversiblen Thrombozytenaggregationshemmers notwendig. Diese beiden Faktoren - die Zentrifugation als auch die Zugabe des reversiblen Thrombozytenaggregationshemmers - können die Thrombozytenaktivierbarkeit sowie die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen. Daher sind diese beiden Faktoren als Störgröße zu erkennen und in der Beurteilung der Flussexperimente zu berücksichtigen. Um den Einfluss der Störgrößen abzuschätzen, vergleichen wir die Flussexperimente der unbehandelten, nicht zentrifugierten Proben mit den mehrfach zentrifugierten und mit Apyrase (ADP-Dihydrolase) versetzten Blutproben innerhalb einer Gruppe. Die Versuche wurden mit gesunden Spendern als auch mit Patienten mit primärer Thrombozytose durchgeführt.

Zunächst wurden die Versuche mit gesunden Spendern durchgeführt. Dabei zeigte die Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten nach sieben Minuten Blutperfusion unter der Scherraten von  $800 \text{ s}^{-1}$  eine prozentuale aggregatbedeckten Kollagenfläche von 28,8% im Vergleich zu der Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten mit 13,5%. Unter der Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  erreicht die Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten eine prozentual bedeckte Kollagenoberfläche von 32,4%, die mehrfach zentrifugierten Thrombozyten 15,0%. Unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  zeichnet sich bereits 4 Minuten nach Beginn der Perfusion in der Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten eine Sättigungskurve mit einer maximalen Flächenbelegung von 32,0% ab, die Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten erreicht noch eine prozentuale Flächenbelegung von 9,1%.

Die methodenbedingte Störgröße wurde ebenfalls in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose durchgeführt. Die Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten erreicht unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  eine aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von 33,0% im Vergleich zu den mehrfach zentrifugierten

Thrombozyten mit einer Fläche von 9,6%. Unter der Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  zeigt sich eine prozentuale Fläche der nicht zentrifugierten Thrombozyten von 28,1%, in der Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten eine prozentuale Fläche von 4,9%. Auffallend ist die sehr niedrige prozentuale Fläche in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$ . Nach fünf Minuten erreicht die aggregatbedeckte Fläche in der Gruppe der nicht zentrifugierten Thrombozyten einen Wert von 2,8%. Proben, welche mehrfach zentrifugiert wurden erreichen hingegen nur noch einen Wert von 1,4%.

Die Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose als auch der gesunden Spender zeigt, unter allen Scherraten, einen linearen Kurvenverlauf. Die Kinetik des Aggregatwachstums der mehrfach zentrifugierten Proben entspricht der Kinetik der nicht zentrifugierten Proben allerdings mit signifikant geringeren prozentualen Aggregationsflächen. Aufgrund der Tatsache, dass eine Reduktion der aggregatbedeckten Kollagenoberfläche unter allen Scherraten zu beobachten ist, lässt sich ein scherratenunabhängiges Geschehen vermuten. Somit ist anzunehmen, dass die Zentrifugation und die Zugabe des reversiblen Thrombozytenaggregationshemmers Einfluss auf die Thrombozyten nimmt. Während der Zentrifugation wirken mechanische Kräfte auf die Thrombozyten ein. Diese mechanischen Kräfte üben einen aktivierenden Effekt auf die Thrombozyten aus, und es werden vermutlich aktivierungsabhängige Mediatoren wie ADP freigesetzt. Eine spontane Aggregation der Thrombozyten, die üblicherweise einer Aktivierung folgt, wird jedoch aufgrund der Zugabe des reversiblen Thrombozytenaggregationshemmers verhindert. Während der spontanen Aktivierung durch die Zentrifugation setzen die Thrombozyten Mediatoren frei, welche im weiteren Verlauf insbesondere während des Flussexperimentes fehlen. Dies könnte die reduzierte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten, welche mehrfach zentrifugiert wurden, erklären.

Die Zugabe des transient wirkenden Thrombozyteninhibitors als auch die Zentrifugation lassen sich als methodenbedingte Störgrößen unter allen Scherraten in einem statistisch signifikanten Ausmaß erkennen und müssen in der weiteren Beurteilung berücksichtigt werden.

Bemerkenswert ist, dass die mehrfach zentrifugierten Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose im Flussexperiment eine wesentlich geringere Tendenz zur Aggregatbildung aufweisen als die mehrfach zentrifugierten Thrombozyten der gesunden Spender. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Thrombozyten der Patienten die vorangehenden Präparationsschritte der Zentrifugation und die Zugabe des reversiblen Thrombozytenaggregationshemmers weniger gut tolerieren. Dies mag an dem in der Literatur bereits beschriebenen Phänomen der spontanen Aggregation und Desaggregation von Mikrothromben in der Mikrozirkulation bei Patienten mit primärer Thrombozytose liegen (Michielis et al., 2006). Diese vorausgehende „Beanspruchung“, welche die Thrombozyten bereits in der Blutzirkulation der Patienten erfahren, könnte die Aktivierbarkeit der Thrombozyten einschränken und somit zu einer noch geringeren Fähigkeit zur Ausbildung von Aggregaten führen.

### **5.2.2.3 Einfluss krankheitsspezifischer Veränderungen einzelner Komponenten von Patienten mit primärer Thrombozytose auf die Aggregation**

#### **5.2.2.3.1 Aspekt der Thrombozytenzahl im Vollblut**

Der Vergleich zwischen nicht zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender und von Patienten mit primärer Thrombozytose zeigt unter der Scherrate  $800\text{ s}^{-1}$  und  $1500\text{ s}^{-1}$  trotz mehrfach erhöhten Thrombozytenwerten in der Gruppe der Patienten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Daher stellte sich die Frage was passieren würde, wenn gesunde Spender ebenso hohe Thrombozytenwerte aufweisen wie sie bei Patienten mit primärer Thrombozytose zu finden sind. Um die Konstellation der hohen Thrombozytenzahlen in der Blutzirkulation der Patienten mit primärer Thrombozytose nachzustellen, wurden Proben gesunder Spender in vitro aufbereitet und die Thrombozytenzahl auf supranormale Werte eingestellt. Dazu waren mehrfach Zentrifugationsschritte und die Zugabe von Apyrase (ADP-Dihydrolase) notwendig, welche in vorangehenden Untersuchungen als Störgrößen verifiziert wurden. Für die Auswertung wurden mehrfach zentrifugierte Thrombozyten der gesunden Spender als Vergleichswerte herangezogen, da diese Gruppe vor dem Flussexperiment den gleichen Präparationsschritten unterlag. Die Thrombozytenwerte der Vergleichsgruppe der

gesunden Spender lagen im Normalbereich. Für den Vergleich wurden die prozentual bedeckten Kollagenoberflächen der Proben gesunder Spender mit mehrfach zentrifugierten Thrombozyten im Normalbereich der Aggregatfläche von gesunden Spendern mit in vitro hergestellten supranormalen Thrombozytenwerten gegenübergestellt. Unter der Scherrate  $800\text{ s}^{-1}$  erreichen die Proben gesunder Spender mit supranormalen Thrombozytenzahlen bereits nach 4 Minuten eine aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von 31,2% im Vergleich zu den Proben gesunder Spender mit Thrombozyten im Normalbereich von 7,4% ( $p < 0,05$ ). Ein ähnliches Bild zeigt sich nach 4 Minuten unter der Scherrate von  $1500\text{ s}^{-1}$ , hier erreichen die Proben mit supranormalen Thrombozyten eine aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von 30,0% im Vergleich zu den Proben mit Thrombozyten im Normalbereich mit 9,2% ( $p < 0,05$ ). Auch unter der Scherrate von  $4000\text{ s}^{-1}$  zeigt die Gruppe der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender mit Werten im Supranormalbereich mit 14,8% im Vergleich zu mehrfach zentrifugierte Thrombozyten im Normalbereich mit 9,1% ebenfalls die Tendenz einer verstärkten Aggregatformierung.

Die verstärkte Tendenz der Aggregation in einem kürzeren Zeitintervall, wie sie in den Proben mit supranormalen Thrombozytenwerten zu sehen ist, kann mit dem Prinzip der scherratenabhängigen Aggregation von Klose et al. aus dem Jahre 1973 erklärt werden. Dieser beschreibt, dass bei höheren Scherraten häufiger Thrombozyten aufeinander treffen als bei niedrigeren Scherraten und die dabei erhöhte Kollision von Thrombozyten zu einer verstärkten Aggregatbildung führt. In unseren Flussversuchen tritt eine vermehrte Aggregation unter allen Scherraten auf. Dies ist durch den vermehrten Antransport der Thrombozyten zu erklären. In unserem Fall ist dieses vermehrte Aufeinandertreffen der Thrombozyten nicht durch eine hohe Scherrate, sondern durch die erhöhte Thrombozytenzahl verursacht. Auf diese Weise treffen hier häufiger Thrombozyten auf die thrombogene Oberfläche, können daran adhären und Aggregate bilden. Andererseits besteht zudem eine erhöhte Kontaktmöglichkeit zwischen bereits adhären Thrombozyten und noch im Blutstrom „vorbeifließenden“ Thrombozyten. Der vermehrte Antransport von Thrombozyten auf einer thrombogenen Oberfläche beziehungsweise bereits adhären und aktivierten Thrombozyten, führt bei gesunden Spendern zu einer vermehrten Adhäsion und Aggregation.



In unseren Flussexperimenten konnte gezeigt werden, dass durch die in vitro Konzentration der Thrombozyten gesunder Spender auf supranormale Werte, wie sie bei Patienten mit primärer Thrombozytose zu finden sind, es deutlich schneller zu einer prozentual größeren bedeckten Flächen führt. Dies zeigt, dass die prozentuale aggregatbedeckte Kollagenoberfläche in der Gruppe der gesunden Spender von der Thrombozytenzahl abhängig ist. In Folge würde man auch bei Patienten mit primärer Thrombozytose eine verstärkte Aggregationsfähigkeit oder eine schnellere Aggregatformierung vermuten. Als klinische Konsequenz würde man bei supranormalen Thrombozytenzahlen ein erhöhtes Thromboserisiko erwarten.

Tatsächlich jedoch findet sich unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  und  $1500 \text{ s}^{-1}$  der nicht zentrifugierten Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose trotz der erhöhten Thrombozytenzahl, eine prozentuale Fläche die der Gruppe der der gesunden Spender mit Thrombozytenzahlen im Normalbereich entspricht. Unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  zeigt sich sogar eine zehnfach kleinere Fläche. Dies lässt einen kompensatorischen Mechanismus bei Patienten mit primärer Thrombozytose vermuten, der eine überschießende Hämostase verhindert. Als kompensatorischer Mechanismus ist der Mangel an von Willebrand Faktor in Patienten mit primärer Thrombozytose zur körpereigenen Thromboseprophylaxe bekannt (Ruggeri, 2002). Da dieser Mangel an von Willebrand Faktor hinsichtlich der sich ständig ändernden Thrombozytenzahlen bei Patienten mit primärer Thrombozytose - im Sinne eines Adaptationsvorganges - immer in Veränderung steht, könnten bei Verzögerungen im Kompensationsmechanismus eine Blutungs- als auch Thromboseneigung resultieren. Im weiteren Sinne kann auch die Blutungsneigung bei supranormalen Thrombozytenzahlen damit erklärt werden. Der Körper reduziert bei hohen Thrombozytenzahlen die Produktion des von Willebrand Faktors im Sinne eines kompensatorischen Mechanismus zurück - im Extremfall resultiert eine Blutungsneigung aufgrund des von Willebrand Faktor Mangels.

### 5.2.2.3.2 Einfluss von Acetylsalicylsäure auf die Aggregation

Da unser ausgewähltes Patientenkollektiv unter dem Einfluss der prophylaktischen Therapie mit Acetylsalicylsäure steht, stellt sich die Frage welche Auswirkung dieses thrombozytenwirksame Medikament auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten nimmt. Zur Beurteilung des Einflusses der Acetylsalicylsäure wurden in-vitro Flusseexperimente mit Thrombozyten gesunder Spender durchgeführt. Die gesunden Spender nahmen drei Tage vor dem Flusseexperiment täglich 100 mg Acetylsalicylsäure ein. In der Auswertung wird das Aggregatwachstums von mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich, mehrfach zentrifugierter Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Einnahme von Acetylsalicylsäure und nicht zentrifugierter Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose miteinander verglichen.

Unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  zeigt sich nach 4 Minuten in der Gruppe der gesunden Spender mit Thrombozyten im Supranormalbereich eine prozentual aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von 31,2%, in der Gruppe der gesunden Spender mit supranormalen Thrombozytenzahlen und Einnahme von Acetylsalicylsäure reduziert sich die prozentuale Fläche auf 17,1%. Im Vergleich dazu steht die der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose. Hier sind die Thrombozytenzahlen im supranormalen Bereich und stehen unter dem Einfluss der prophylaktisch dosierten Acetylsalicylsäure. Diese Gruppe erreicht eine prozentuale Fläche von 23,1%. Unter der Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  erreicht die Gruppe der gesunden Spender mit Thrombozytenwerten im Supranormalbereich eine aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von 30,0%, welche durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure auf eine prozentuale Fläche von 19,8% gesenkt werden kann. Die prozentuale aggregatbedeckte Kollagenoberfläche in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose liegt bei 15,0%. Unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  lässt sich der Einfluss der Acetylsalicylsäure in der Gruppe der gesunden Spender ebenfalls hinsichtlich der prozentual bedeckten Aggregatfläche beobachten. Die prozentual bedeckte Kollagenoberfläche liegt in dieser Gruppe bei 6,4%, im Vergleich dazu die der Gruppe der gesunden Spender mit supranormalen Thrombozytenkonzentrationen ohne Acetylsalicylsäure mit einer Fläche von 15,0%.

Die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose liegt hier lediglich bei 2,0%.

Diese Flusseexperimente über Kollagen zeigen, dass Blutproben gesunder Spender, in welchen die Thrombozytenzahlen *in vitro* auf supranormale Werte „aufkonzentriert“ wurden, durch einen erhöhten Antransport von Thrombozyten zunehmend Aggregate ausbilden. Es werden trotz der methodenbedingten Störgrößen aggregatbedeckte Flächen erreicht, welche weit über den Flächen der mehrfach zentrifugierten Thrombozyten von gesunden Spender mit Thrombozytenwerten im Normbereich liegen. Durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure jedoch, kann diese prozentual bedeckte Fläche auch, trotz der supranormalen Thrombozytenzahl und des hohen Antransports an Thrombozyten, gesenkt werden. Unter den Scherraten  $800\text{ s}^{-1}$  und  $1500\text{ s}^{-1}$  sind die prozentualen Flächen der Gruppen der gesunden Spender unter Acetylsalicylsäure und der Patienten mit primärer Thrombozytose gleichzusetzen. Auffallend ist die prozentual sehr geringe Aggregatfläche der Patienten mit primärer Thrombozytose unter der Scherrate von  $4000\text{ s}^{-1}$  im Vergleich zu den gesunden Spendern unter Acetylsalicylsäure. Dies ist unseres Erachtens mit dem zusätzlichen von Willebrand Faktor Mangel zu erklären, der unter der Scherrate  $4000\text{ s}^{-1}$  relevant wird.

Zu der ausgewerteten verminderten aggregatbedeckten Kollagenoberfläche unter dem Einfluss der Acetylsalicylsäure ist während des Flusseperiments und auf den exemplarischen Bildern des Flusseperiments unter allen Scherraten eine optische Veränderung der Aggregatformierung zu erkennen. In der Gruppe der gesunden Spender nach Einnahme von Acetylsalicylsäure zeigt sich eine eher flächenhafte und weniger dreidimensionale Ausbildung der Aggregate. Dies steht im Gegensatz zu den exemplarischen Bildern der Gruppen der gesunden Spender mit Thrombozytenwerten im Supranormalbereich ohne Acetylsalicylsäure-Einnahme, welche Aggregate mit einem stark dreidimensionalen Wachstum zeigen. Zudem kann während des Flusseperimentes ein verstärktes „Abreißen“ von Aggregatanteilen bestehender Aggregate beobachtet werden, was unseres Erachtens für eine verminderte Stabilität der Aggregate spricht.

Diese Veränderungen bezüglich der Aggregatformierung als auch der Stabilität der Aggregate lassen sich durch die Pharmakodynamik von Acetylsalicylsäure erklären. Acetylsalicylsäure hemmt die Cyclooxygenase-1 irreversibel, wodurch die

Thrombozyten bei Kontakt mit prothrombotischen Oberflächen bei folgender Aktivierung weniger Thromboxan A2 produzieren (M. Cattaneo, 2004). Mit der Synthesehemmung von Thromboxan A2 ist der Amplifikationsprozess der Aggregation gestört und die Formierung von Aggregaten vermindert. Durch die „low-dose“ Acetylsalicylsäuregabe wird die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten gemäß unseren Flussexperimenten allerdings nicht komplett blockiert sondern nur reduziert. Diese spezielle Wirkung einer „low-dose“ Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenaggregation wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. Dementsprechend wies die Arbeitsgruppe Aktas et al. im Tiermodell unter einer „low-dose“ Acetylsalicylsäuretherapie eine reduzierte Oberflächenbedeckung mit Aggregaten in in-vitro Flussversuchen nach. Die Aggregatablagerungen wurden kleiner bemessen und zudem wurde eine leichte Instabilität dieser Thromben nachgewiesen. Laut den Forschungsergebnissen dieser Arbeitsgruppe wird erst durch eine hochdosierte Acetylsalicylsäuregabe, welche einen GPIIb/IIIa-Rezeptorabbau auf der Oberfläche der Thrombozyten verursacht, die Adhäsionsfähigkeit und die anschließende Aggregation vollständig blockiert (B. Aktas, 2005).

In unseren Flussexperimenten mit gesunden Spendern und in vitro eingestellten supranormalen Thrombozytenwerten konnten unter allen untersuchten Scherraten durch die niedrigdosierte Therapie mit Acetylsalicylsäure die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche reduziert werden. Da die Thrombozyten trotz der antiaggregatorischen Wirkung von Acetylsalicylsäure noch in der Lage sind - wenn auch in einer geringeren Ausprägung - Aggregate zu formieren, kann man davon ausgehen, dass eine primäre Hämostase in vivo unter Acetylsalicylsäure noch möglich ist. Das beobachtete „Abreißen“ von Aggregatanteilen wird von uns ebenfalls durch Acetylsalicylsäure verursachte Instabilität von Aggregaten gedeutet und kann in vivo durchaus eine verlängerte Blutungszeit beziehungsweise eine erschwerte Blutstillung verursachen.

Zu diskutieren gilt es allerdings, ob die Beobachtungen die bezüglich des Aggregationsverhaltens der Thrombozyten gesunder Spender nach Einnahme von Acetylsalicylsäure gefunden wurden, auch bei Patienten mit primärer Thrombozytose zutreffend sind. Die biochemischen Veränderungen in den Thrombozyten durch die irreversible COX-1 Hemmung finden sicherlich auch in den

Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose statt. Desweiteren ist zu berücksichtigen, dass die Patienten mit primärer Thrombozytose mit einerseits supranormalen Thrombozytenwerten zusätzlich eine veränderte Multimerenverteilung des von Willebrand Faktors aufweisen (Budde et al. 2010). Die veränderte Multimerenverteilung spiegelt sich in unseren Flussexperimenten unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  wieder, da die Multimere des von Willebrand Faktors hier an enormer Bedeutung für die Adhäsion und der anschließenden Aggregation gewinnen. Hier ist die prozentual aggregatbedeckte Kollagenoberfläche trotz der supranormalen Thrombozytenzahlen geringer als in der Gruppe der gesunden Spender mit in vitro hergestellten supranormalen Thrombozytenwerten unter Einnahme von Acetylsalicylsäure. Dies zeigt sich vermutlich so eindrücklich, da sowohl die Multimere des von Willebrand Faktors fehlen als auch die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten durch die Acetylsalicylsäure gesenkt wird. In vivo kann dies in einer verlängerten Blutungszeit beziehungsweise einer Blutungstendenz Ausdruck finden. Aufgrund dessen ist der Nutzen einer prophylaktischen Acetylsalicylsäure-Therapie in der Literatur kontrovers diskutiert (Larrán AA. et al, 2010; Landolfi R., 2006), da durch die prophylaktische Therapie mit Acetylsalicylsäure ein bestehendes Blutungsrisiko noch weiter verstärkt werden könnte.

Auch unserer Meinung nach ist im Allgemeinen nicht festzulegen, ob Patienten mit primärer Thrombozytose eine erhöhtes Thromboserisiko oder eine erhöhtes Blutungsrisiko aufweisen. Frühere Studien belegen, dass dies in Abhängigkeit der Erhöhung der Thrombozytenzahl einzustufen ist. Bei Patienten mit primärer Thrombozytose deren Thrombozytenzahlen nur leicht über dem Normbereich liegen, ist von einem erhöhten Thromboserisiko auszugehen. Bei Patienten, die allerdings die Grenze von  $1.000.000 \text{ Thrombozyten}/\mu\text{l}$  überschreiten, besteht trotz der hohen Thrombozytenzahl eher eine Blutungstendenz (Michiels, 2006). In unserem Patientenkollektiv zeigen alle Patienten Thrombozytenwerte von über  $1.000.000/\mu\text{l}$  und standen zum Zeitpunkt unserer Experimente zudem unter einer langjährigen prophylaktischen Therapie mit Acetylsalicylsäure. Klinisch und anamnestisch fanden sich allerdings weder Hinweise auf eine Blutungstendenz noch für thromboembolische Ereignisse.

Im Falle unserer Ergebnisse stellt sich allerdings nun die Frage, ob die tägliche prophylaktische Verabreichung von 100 mg Acetylsalicylsäure in diesem Patientenkollektiv notwendig ist oder ob durch die Therapie eine wesentliche iatrogen verursachte Erhöhung des Blutungsrisikos stattfindet.

Unter der Scherrate von  $800 \text{ s}^{-1}$  und  $1500 \text{ s}^{-1}$  ist jeweils die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche der Patienten mit primärer Thrombozytose als auch die der gesunden Spender mit supranormalen Thrombozyten unter Acetylsalicylsäure deutlich unter der prozentualen Fläche der gesunden Spender mit supranormalen Thrombozytenzahlen ohne Acetylsalicylsäure. Dies zeigt, dass die prophylaktische Gabe von Acetylsalicylsäure die Aggregation teilweise, jedoch nicht komplett hemmt. In Anbetracht der supranormalen Thrombozytenzahl bei Patienten mit primärer Thrombozytose und der in unseren Ergebnissen nachgewiesenen prozentual erhöhten aggregatbedeckten Flächen bei gesunden Spendern mit supranormalen Thrombozyten ohne antiaggregatorische Therapie scheint die prophylaktische Gabe von Acetylsalicylsäure durchaus von Nutzen.

Unter beiden Scherraten ist die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche der Patienten mit primärer Thrombozytose unter therapeutischer Einnahme von Acetylsalicylsäure und der Gruppe der gesunden Spender mit in vitro hergestellten supranormalen Thrombozytenwerten unter Acetylsalicylsäure-Einfluss jeweils etwa gleich ausgeprägt, sodass unseres Erachtens unter niedrigen Scherraten einzig der Einfluss von Acetylsalicylsäure nachgewiesen wird und dieser Einfluss in beiden Gruppen gleiche Auswirkungen hat.

Unter diesen Gesichtspunkten ist eine antiaggregatorische Therapie mit Acetylsalicylsäure positiv zu bewerten, da von einem erhöhten Thromboserisiko auszugehen ist und dieses Risiko durch Acetylsalicylsäure gesenkt wird.

In allen Gruppen findet sich unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  eine enorm reduzierte Aggregatfläche. In der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose findet sich nur noch eine aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von 2%. Höhere Scherraten finden sich laut Literaturangaben physiologischer Weise in Arteriolen, allerdings aber auch in pathologisch veränderten, verengten Gefäßen (Ruggeri, zit. n. Hemostasis and Thrombosis, Colman et al., 2001). Im Falle von verengten Gefäßen kann eine Reduktion der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten eine Anlagerung der Thrombozyten an bestehende Plaques verhindern. Daher kann man annehmen,

dass Patienten mit koronarer Herzkrankheit oder Erkrankungen mit thrombotisch-embolischem Risiko von einer Reduktion der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten und demzufolge einer Senkung des Thromboserisikos profitieren können. Das Risikoprofil des Patienten ist jedoch individuell abzuwägen, da andererseits kleine Arteriolen, wie sie zum Beispiel im arteriellen Endstromgebiet von Organen und im Gehirn vorkommen, physiologischerweise ebenfalls hohe Strömungsgeschwindigkeiten aufweisen.

Demzufolge ist aufgrund unserer Untersuchungen bei allen Patienten eine individuelle Risikoabschätzung bezüglich des Thrombose- bzw. Hämorrhagierisikos, wie sie auch von der WHO vorgeschlagen wird, durchzuführen und dementsprechend zu therapieren.

#### **5.2.2.4 Ersatz einzelner Komponenten des Blutes von Patienten mit primärer Thrombozytose durch die entsprechende Komponente gesunder Spender**

Aufgrund der Tatsache, dass verschiedene Komponenten des Blutes Einfluss auf die primäre Hämostase nehmen, wurden die Thrombozyten und das Plasma unter Flussbedingungen getrennt voneinander untersucht. In der Literatur werden zum einen Veränderungen der Multimere des von Willebrand Faktors beschrieben, die wir bei unseren Patienten ebenfalls nachweisen konnten. Zum anderen stellt sich die Frage, ob eventuelle Veränderungen der Thrombozyten verstärkt Einfluss auf die Aggregation unter Flussbedingungen nehmen. In unseren Flussexperimenten wurde jeweils eine möglicherweise veränderte Komponente durch die äquivalente Komponente eines gesunden Spenders ersetzt.

##### **5.2.2.4.1 Ersatz der Patiententhrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender**

Zunächst führten wir Flussexperimente durch, in welchen die Thrombozyten der Patienten durch Thrombozyten gesunder Spender ersetzt wurden. Das Augenmerk dieses Experimentes liegt auf dem morphologischen Korrelat etwaiger Veränderungen der prokoagulatorisch wirksamen Proteinen und Faktoren im Blutplasma. Die Thrombozytenwerte dieser in vitro hergestellten Proben lagen dabei im Normbereich. Diese Proben wurden den Proben gesunder Spender und den

Proben von Patienten mit primärer Thrombozytose jeweils mit mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gegenübergestellt.

Die Scherraten  $800\text{ s}^{-1}$  und  $1500\text{ s}^{-1}$  zeigen, dass sich bei Ersatz der Thrombozyten in dem Blut der Patienten durch Thrombozyten gesunder Spender die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche im Vergleich zu der Gruppe der gesunden Spender als auch zu der der Patienten mit primärer Thrombozytose enorm vergrößert. Die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche übersteigt die Gruppe der gesunden Spender in einem signifikanten Unterschied. Nach sieben Minuten zeigt sich in der Gruppe der Patienten, in welcher die Thrombozyten durch Thrombozyten gesunder Spender ersetzt wurden unter der Scherrate von  $800\text{ s}^{-1}$  eine aggregatbedeckte Kollagenoberfläche von 21,2% im Vergleich zu den mehrfach zentrifugierten Proben der gesunden Spender mit 13,5% und der Patienten mit primärer Thrombozytose mit 9,6%. Eine ähnliche Kinetik zeigt sich unter der Scherrate von  $1500\text{ s}^{-1}$ . Nach sieben Minuten beträgt hier die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche der Proben gesunder Spender 15,0%, der Patienten mit primärer Thrombozytose 4,9% und in der Gruppe der Patienten in welcher die Thrombozyten durch die gesunder Spender ersetzt wurden 26,1%. Unter der Scherrate von  $4000\text{ s}^{-1}$  fällt die aggregatbedeckte Fläche aller Gruppen über das Zeitintervall hin betrachtet wie erwartet niedriger als unter den anderen Scherraten aus. Die aggregatbedeckte Fläche in der Gruppe der Patientenproben in welcher die Thrombozyten durch die gesunder Spender ersetzt wurden liegt jedoch bei 7,3% und zeigt im Vergleich zu der aggregatbedeckten Fläche der Gruppe der gesunden Spendern mit 9,1% keine statistisch signifikante Differenz. Die aggregatbedeckte Fläche der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose ist mit 1,5% statistisch signifikant kleiner.

Werden die Thrombozyten in der Patientenprobe durch Thrombozyten gesunder Spender ersetzt, so steigt unter der Scherrate  $800\text{ s}^{-1}$  und  $1500\text{ s}^{-1}$  die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche über die der gesunden Spender. Dies deutet darauf hin, dass das Patientenplasma Komponenten enthält, welche im Normalplasma nicht beziehungsweise in geringerer Konzentration vorhanden sind. Diese Veränderung im Patientenplasma veranlasst die Thrombozyten der gesunden Spender in dem Plasma der Patienten zu einer verstärkten Aggregation. In der



Literatur wird bei Patienten mit primärer Thrombozytose eine erhöhte Proteolyse und demzufolge eine relative Verschiebung der Multimere des von Willebrand Faktors hin zu den kleineren Multimeren beschrieben (Budde et al, 2010). Man könnte vermuten, dass die verstärkt proteolytisch entstandenen kleineren Multimere eine Erklärung für die überschießende Reaktion sein könnten. Da diese Reaktion allerdings nur unter niedrigen Scherraten zu finden ist, kann diskutiert werden, ob durch den Mangel der großen von Willebrand Faktor - Multimere nicht andere Adhäsionsproteine verstärkt beziehungsweise kompensatorisch produziert werden.

Bei Betrachtung der Kinetik des Aggregatwachstums der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose unter der Scherrate von  $4000 \text{ s}^{-1}$  wird die Notwendigkeit der großen Multimere des von Willebrand Faktors bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten (Ruggeri, 2001) verdeutlicht. Werden die Thrombozyten der Patienten jedoch durch Thrombozyten gesunder Spender ersetzt, steigt die prozentuale Aggregatfläche auf 7,5% und es findet eine Annäherung an die Aggregatfläche der Gruppe der gesunden Spender mit 9,1% statt. Würde jedoch einzig ein Mangel an von Willebrand Faktor vorliegen, könnte unseres Erachtens die prozentuale Aggregatfläche durch den Ersatz der Thrombozyten nicht in diesem Ausmaß gesteigert werden. Dies deutet darauf hin, dass neben der beschriebenen veränderten Multimerenzusammensetzung des von Willebrand Faktors, die sich insbesondere unter höheren Scherraten bemerkbar macht, eine Veränderung an den Thrombozyten vorliegen muss. Dieser Effekt wird zum Teil sicherlich durch den Einfluss von Acetylsalicylsäure auf den Thrombozyten der Patienten verursacht.

Jedoch auch eine Veränderung des Integrins  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , welches für die stabile Adhäsion verantwortlich ist, könnte zu einer reduzierten aggregatbedeckten Fläche führen (Ruggeri, 2004). In unseren durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose eine signifikant geringere Ausprägung des Integrins  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  im Vergleich zu gesunden Spendern festgestellt. Hierbei ist zu erwähnen, dass für die durchflusszytometrische Untersuchung die Thrombozytenzahlen in beiden Gruppen auf im Normbereich liegende Werte eingestellt wurden, damit der Aspekt der supranormalen Thrombozyten keinen Einfluss auf die Messungen nimmt.

Unseres Erachtens kann die geringere Ausprägung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  als thrombozytäre Ursache gesehen werden, welche zusammen mit dem von Willebrand Faktor Mangel für die geringgradige Ausprägung der Aggregate in der Gruppe der Patienten unter der Scherrate  $4000\text{ s}^{-1}$  verantwortlich ist. Bei Ersatz der Thrombozyten durch die der gesunden Spender findet eine gesteigerte Aggregation statt. Die prozentuale Aggregationsfläche nähert sich der Aggregationsfläche in der Gruppe der gesunden Spender an, wird diese allerdings aufgrund des von Willebrand Faktor Mangels nicht erreichen.

#### **5.2.2.4.2 Ersatz des Patientenplasmas und der Erythrozyten durch Plasma und Erythrozyten gesunder Spender**

Werden das Patientenplasma und die Erythrozyten durch die entsprechenden Komponenten gesunder Spender ersetzt und der Versuch mit einer Scherrate von  $800\text{ s}^{-1}$  durchgeführt, sind zwischen den untersuchten Gruppen, der Patienten mit primärer Thrombozytose, der Patientengruppe in welcher das Plasma durch gesundes Plasma ersetzt wurde und der Gruppe der gesunden Probanden, keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Unter der Scherrate von  $1500\text{ s}^{-1}$  übersteigt die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche in der Patientenprobe mit dem Plasma gesunder Spender mit 8,4% die Fläche der Gruppe der Patienten mit 4,9%. Die Gruppe der gesunden Spender zeigt mit 15,0% prozentual gesehen die größte Fläche. Unter der Scherrate von  $4000\text{ s}^{-1}$  zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Durch den Ersatz des Plasmas und der Erythrozyten in der Patientenprobe konnte die aggregatbedeckte Kollagenoberfläche dieser Gruppe unter allen drei Scherraten nicht über die prozentuale Fläche der gesunden Spender gesteigert werden. Es findet lediglich eine Annäherung der Werte für die Flächen statt. Durch den Ersatz des Plasmas und der Erythrozyten der Patienten durch entsprechende Komponenten gesunder Spender zeigt sich jedoch unter allen Scherraten eine deutliche Anhebung im Vergleich zu der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose.

Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose zusätzlich eingeschränkt ist. Dies kann

zum einen durch den Mechanismus der spontanen Aggregation und Desaggregation in der Endstrombahn der Patienten mit primärer Thrombozytose gesehen werden (Michielis et al, 2006). Die Thrombozyten werden durch diesen Prozess funktionell verbraucht und sind im Folgenden weniger reagibel sowie unempfindlicher hinsichtlich Aktivierung und Aggregation (Bellucci, 2006). Desweiteren könnte ein Rezeptordefekt der Thrombozyten vermutet werden, was im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen geprüft und diskutiert wurde. Zudem ist der Aspekt der Prophylaxe mit Acetylsalicylsäure nicht zu vernachlässigen. Durch den Wirkmechanismus von Acetylsalicylsäure, der letztendlich zu einer geringeren Thromboxansynthese führt, kann die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten eingeschränkt sein.

#### **5.2.1.6 Schlussfolgerung hinsichtlich der Aggregation**

Bezüglich des Aggregationsvermögens in der Gruppe der Patienten mit primärer Thrombozytose kann im Vergleich zu gesunden Spendern zunächst ein statistisch signifikanter Unterschied unter höheren Scherraten gefunden werden. Dies lässt sich auf eine veränderte Zusammensetzung der Multimere des von Willebrand Faktors, die in unserem Patientenkollektiv nachweisbar ist, zurückführen (Budde et al, 2010). Patienten mit primärer Thrombozytose zeigen außerdem eine reduzierte Reagibilität der Thrombozyten. Diese verminderte Reagibilität wird in der Literatur durch spontane Aggregation und Desaggregation in der Gefäßperipherie unseres Körpers erklärt (Bellucci, 2006, Michielis, 2006). Unseren Ergebnissen nach ist das verminderte Aggregationsvermögen neben der reduzierten Reagibilität das morphologische Korrelat der verminderten Expression des thrombozytären  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors auf den Thrombozyten der Patienten mit primärer Thrombozytose. Denkbar wäre neben einer verminderten Expression auch ein „shedding“ des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure. Diese quantitative Veränderung des Rezeptors sehen wir, trotz der veränderten Plasmaproteine hin zu einem erhöhten prothrombotischen Potential, bei Kontakt mit einer thrombogenen Oberfläche als ursächlich für die geringere Ausbildung von Aggregaten an.

Zudem haben wir das Patientenplasma als auch die Thrombozyten getrennt voneinander hinsichtlich der Thrombozytenaggregation beurteilt. Dabei zeigen

unsere Untersuchungen, dass das Patientenplasma unter niedrigen Scherraten prokoagulatorisch verändert ist und dementsprechend mit Thrombozyten gesunder Spender zu einer verstärkten Aggregation führt. Die Kombination des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptormangels mit prokoagulatorischem Plasma bei Patienten mit primärer Thrombozytose unter niedrigen Scherraten ist unseres Erachtens als „physiologische Kompensation“ für Patienten mit primärer Thrombozytose zu werten. Auf diese Weise wird das in unseren Untersuchungen bestehende Thromboserisiko bei supranormalen Thrombozytenzahlen und intakter plasmatischer Gerinnung gesenkt.

Unter höheren Scherraten lässt sich die Veränderungen der Multimere des von Willebrand Faktors mittels Beurteilung der Aggregationsfläche bei Flussversuchen über Kollagenoberflächen visualisieren. Dabei ist der prokoagulatorische Effekt des Plasmas der Patienten nicht mehr nachweisbar, beziehungsweise die Plasmaproteine, welche unter niedrigen Scherraten für eine „scheinbar“ unauffällige Aggregation sorgten, können unter hohen Scherraten zwischen Thrombozyten und thrombogener Oberfläche nicht mehr agieren (Ruggeri, 2001).

Hinsichtlich der antiaggregatorischen Therapie mit Acetylsalicylsäure konnten wir bei gesunden Spendern mit in vitro „aufkonzentrierten“ supranormalen Thrombozytenwerten feststellen, dass die Einnahme von Acetylsalicylsäure die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten deutlich eingeschränkt. Diese inkomplette Hemmung der Aggregation ist durch die irreversible und selektive Hemmung der Cyclooxygenase 1 und der konsekutiven geringeren Produktion von Thromboxan A2 verursacht (Smith, 1971). Es stellt sich nun hierbei die Frage, ob die Ergebnisse der gesunden Spender auf die Patienten mit primärer Thrombozytose zu übertragen sind. Die in der Literatur beschriebene Blutungstendenz bei Patienten mit primärer Thrombozytose in Assoziation mit Thrombozytenwerten über 1.000.000/ $\mu$ l (Michielis et al, 2006) lässt sich bei unseren Patienten weder anamnestisch noch klinisch bestätigen.

Hinsichtlich niedriger Scherraten, unter welchen das Patientenplasma unseren Ergebnissen nach eher prokoagulatorische Effekte aufweist, ist eine Thromboseprophylaxe mit Acetylsalicylsäure durchaus als sinnvoll zu erachten. In Gefäßbereichen mit höheren Scherraten, wie sie im Körper in stenosierten Gefäßen

aber auch physiologischerweise in Arteriolen vorkommen, bewirkt die Veränderung der Multimerenverteilung des von Willebrand Faktors und die zusätzliche Gabe von Acetylsalicylsäure eine deutlich geringere Ausbildung von Aggregaten. Im Falle einer Blutung könnte es hier zu einer verlängerten Blutungszeit und zu damit verbundenen ausgeprägten Komplikationen kommen. Ist im Gegensatz dazu das Risiko einer Thrombose beziehungsweise einer Embolie bei einem Patienten erhöht, würde der Patient von einer Reduktion der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten profitieren. Demzufolge gilt es bei Diagnosestellung einer primären Thrombozytose kritisch abzuwägen, welchen Risiken der Patient mit und ohne Acetylsalicylsäure ausgesetzt ist und dazu mit Hilfe der Kriterien der WHO ein individuelles Risikoprofil zu erstellen sowie danach zu therapieren und die Patienten engmaschig zu betreuen.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Patienten mit Essentieller Thrombozythämie und Polyzythämia vera zeigten trotz Thrombozytenkonzentrationen über 1.000.000/ $\mu\text{l}$  in unseren Flussexperimenten bezüglich des Aggregationsvermögens unter niedrigen Scherraten bis 1500  $\text{s}^{-1}$  im Vergleich zu gesunden Probanden mit normaler Thrombozytenkonzentration keine statistisch signifikanten Unterschiede. Unter hohen Scherraten bis 4000  $\text{s}^{-1}$  weisen sie jedoch trotz supranormaler Thrombozytenwerte eine deutlich reduzierte Aggregation an Kollagen auf. Als mögliche Ursache konnten wir sowohl einen Verlust der grossen Multimere des von Willebrand Faktors als auch eine reduzierte Expression des Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Rezeptors der Thrombozyten identifizieren.

Für einen direkten Vergleich der Thrombozytenfunktion von Patienten mit primärer Thrombozytose und gesunden Spendern bei gleicher im Normbereich eingestellter Thrombozytenkonzentration tauschten wir im Patientenplasma die Thrombozyten. Dabei fand sich insbesondere unter niedrigen Flussgeschwindigkeiten von 800-1500  $\text{s}^{-1}$  eine vermehrte Aggregation mit gesunden Thrombozyten gegenüber Thrombozyten von Patienten. Dies bestätigte auch unter funktionellen Aspekten die mit Durchflusszytometrie gefundene geringere Ausprägung des  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  - Rezeptors auf Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose.

Flussexperimente von gesunden Spendern mit in vitro eingestellten supranormalen Thrombozytenwerten zeigen bereits nach wenigen Minuten eine maximale Aggregatfläche unabhängig von der Flussgeschwindigkeit. Durch Einnahme von Acetylsalicylsäure konnte bei diesen gesunden Probanden die aggregatbedeckte Fläche unter allen Scherraten jeweils um etwa die Hälfte reduziert werden. Dies legt den Rückschluss nahe, dass bei Patienten mit primärer Thrombozytose ohne die prophylaktische Therapie mit Acetylsalicylsäure eine überschießende Hämostase und ein erhöhtes Thromboserisiko bestehen.

In dieser Arbeit wird die Bedeutung der Interaktion des von Willebrand Faktors mit Thrombozyten unter physiologischen Gegebenheiten als auch unter defizitären Bedingungen im Rahmen der Polyzythämia vera und der Essentiellen Thrombozythämie verdeutlicht. Der Nutzen der prophylaktischen Therapie mit

Acetylsalicylsäure bei Patienten mit primärer Thrombozytose wurde kritisch evaluiert und ist unseren Ergebnissen nach indiziert.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

Aktas B, Pozgajova M, Bergmeier W, Sunnarborg S, Offermanns S, Lee S, Wagner DD, Niesswandt B. Aspirin induces platelet receptor shedding via ADAM17 (Tace). *J of Biological Chemistry* 2005; 280 (48): 39716-39722

Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Pérez-Andreu V, Hernández-Boluda JC, Ayats R, Salvador C, Muntanola A, Bellosillo B, Vicente C, Hernandez-Nieto L, Burgaleta C, Xicoy B, Besses C. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood* 2010; 116 (8):1205-10

Ania BJ, Suman VJ, Sobell JL, Codd MB, Silverstein MN, Melton LJ. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents, 1935-1989. *Am J Hematol* 1994; 47: 89-93

Arya M, Anvari B, Romo GM et al. Ultralarge multimeres of von Willebrand factor forms spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezer. *Blood* 2002; 99: 3971-7

Barbui T, Barosi G, Grossi A et al. Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica* 2004; 89: 215-232

Barosi G, Besses C, Birgegard G et al. A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group. *Leukemia* 2007; 21: 277-280

Bauer M, Maschberger P, Quek L, Briddon SJ, Dash D, Weiss M, Watson SP, Siess W. Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. Src-kinases mediate integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 inside-out signalling during shape change. *Thromb Haemost.* 2001; 85(2): 331-40

Bellucci S, Michiels JJ. The Role of JAK2 V617F Mutation, Spontaneous Erythropoiesis and Megakaryocytopoiesis, Hypersensitive Platelets, Activated Leukocytes, and Endothelial Cells in the Etiology of Thrombotic Manifestation in Polycythemia vera and Essential Thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32: 391-398.

Berglund S, Zettervall O. Incidence of polycythemia vera in a defined population. *Eur J Haematol.* 1992; 48: 20-26

Bienkowska J, Cruz M, Atiemo A, Handlin R, Liddington R. The von Willebrand Factor A3 domain does not contain metal ion dependent adhesion site motif. *J Biol Chem.* 1997; 272: 25162-7



- Bilgrami S, Greenberg BR. Polycythemia rubra vera. *Sem Onc*. 1995; 22: 307-326
- Bruhn H, Schambeck C, Hach-Wunderle V. Hämostaseologie für die Praxis 2007; Schattauer Verlag
- Budde U, Scharf RE, Franke P, Hartmann-Budde K, Dent J, Ruggeri ZM. Elevated Platelet Count as a Cause of Abnormal von Willebrand Factor Multimer Distribution in Plasma. *Blood* 1993; 82(6): 1749-1757.
- Campbell PJ, Green AR. Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005; 201-208
- Carli PM. Epidemiology of polycythemia vera in Cote d'Or (Burgundy). *Nouv Rev Fr Hematol* 1994; 36: 147-9.
- Carr ME, Carr SL. Fibrin structure and concentration alter clot elastic modulus but do not alter platelet mediated force development. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6(1):79–86.
- Cattaneo M. Aspirin and Clopidogrel: Efficacy, Safety, and the Issue of Drug Resistance. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 1980–1987
- Colombi M, Radaelli F, Zocchi L, Maiolo AT. Thrombotic and hemorrhagic complications in essential thrombocythemia. A retrospective study of 103 patients. *Cancer* 1991; 67: 2926-2930.
- Coller BS, Beer JH, Scudder LE, Steinberg MH. Collagen – platelet interactions: evidence for a direct interaction of collagen with platelet GPIa/IIa and an indirect interaction with platelet GPIIb/IIIa mediated by adhesive proteins. *Blood* 1989; 74: 182-192
- Colman, Hirsh, Marder, Clowes, George, Ruggeri ZM, Platelet-Vessel Wall Interactions in Flowing Blood, *Hemostasis and Thrombosis* 2001, 4. Ausgabe, Kapitel 40, S. 684 – 698.
- Cortellazo S, Finazzi G, Ruggeri M et al. Hydroxyurea for patients with essential thombozythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 1132-1136
- Covic L, Gresser AL, Kuliopulus. A biphasic kinetics of activation and signalling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry* 2000; 39: 5458-5467
- Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; 6: 372-375
- Donadelli R, Orje JN, Capoferri C, Remuzzi G, Ruggeri ZM. Size regulation of von Willebrand factor-mediated platelet thrombi by ADAMTS-13 in flowing blood. *Blood* 2006; 107: 1943-50

Emsley J, Cruz M, Handlin R, Liddington R. Crystal structure of the von Willebrand Factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 1998; 273: 10396-10401

Landolfi R, Marchioli R, Patrono C. Mechanisms of bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1997;78:617-21

Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Boiret-Dupré N, Skoda RC, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006; 6: 1865-1867

Fabris F, Randi ML. Essential Thrombocythemia: past and present. *Intern Emerg Med* 2009; 4: 381-388

Federici AB, Bader R, Pagani S et al. Binding of von Willebrand factor to glycoprotein Ib and IIb/IIIa complex: affinity is related to multimeric size. *Br J Haematol* 1989; 73: 93-9

Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 1981; 58: 916-919

Finazzi G, Ruggeri M, Rodeghiero F et al. Second malignancies in patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med* 2005; 332: 1132-1136

Fowler, WE, Fretto, LJ (1989) Electron microscopy of von Willebrand factor. In Zimmermann TS, Ruggeri ZM, eds. *Coagulation and Bleeding Disorders. The Role of Factor VIII and von Willebrand Factor*. New York: Dekker, 1989: 181-93

Furlan M, Robles R, Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996; 87:4223-4234.

Gaehtgens P, Will G, Schmidt F. Comparative rheology of nucleated and non-nucleated red blood cells. II. Rheological properties of avian red cells suspensions in narrow capillaries. *Pflugers Arch.*1981; 390(3): 283-287

Gawaz M. *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronärer Herzerkrankung*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1999

van Genderen PJ, Leenknecht H, Michiels JJ, Budde U. Acquired von Willebrand disease in myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 1996; 22 Suppl 1: 79-82

Van Genderen PJ, Budde U, Michiels JJ, van Strik R, van Vliet HH. The reduction of large von Willebrand factor multimers in plasma in essential thrombocythaemia is related to the platelet count. *Br J Haematol.* 1996; 4: 962-965.

Van Genderen PJ, Lucas IS, van Strik R, Vuzevski VD, Prins FJ, van Vliet HH, Michiels JJ. Erythromelalgia in essential thrombocythemia is characterized by platelet activation and endothelial cell damage but not by thrombin generation. *Thromb Haemost*. 1996; 76(3): 333-338

Van Genderen PJ, Michiels JJ. Erythromelalgia: a pathognomonic microvascular thrombotic complication in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23 (4): 357-63

Gilbert HS. Modern treatment strategies in polycythemia vera. *Semin Hematol*. 2003; 40(1): 26-29.

Griesshammer M. Risk factors and their influence on therapeutic decisions in patients with essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 372-80

Griesshammer M, Bangerter M, van Vliet HH. Aspirin in essential thrombocythemia: status quo and quo vadis. *Semin Thromb Hemostas* 1997; 23: 371-377

Griesshammer M, Gisslinger H, Heimpel H (Korr.), Lengfelder E, Reiter A. Chronische myeloproliferative Erkrankungen. Leitlinie chronische myeloproliferative Erkrankungen, Stand: 24. November 2006, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie

Griesshammer M, Lengfelder E, Döhner K, Kvasnicka HM, Thiele J, Heimpel H. Essenzielle Thrombozythämie. *Deutsches Ärzteblatt* 2007; 2341-2346

Gugliotta L, Bulgarelli S, Tieghi A, Asioli S, Gardini G, Vianelli N et al. Bone marrow biopsy and aspirate evaluation in 90 patients with essential thrombocythemia treated with PEG Interferon alpha-2b. Preliminary results. *Blood* 2004; ASH abstract 1523

Harrison C. Essential thrombocythemia: challenges and evidence-based management. *Br J Haematol* 2005; 130: 153-165

Hemker HC, van Rijn JL, Rosing J, van Dieijen G, Bevers EM, Zwaal RF. Platelet membrane involvement in blood coagulation. *Blood Cells* 1983; 9(2): 303-317

Herold G et al. (2009) Innere Medizin - Herold. 88-91

Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet Activation and Blood Coagulation. *Thromb Haemost* 2002; 88: 186-193).

Italiano JE Jr, Patel-Hett S, Hartwig JH. Mechanics of proplatelet elaboration, *J Thromb Haemost* 2007; 5: 18-23

Jackson S P, Nesbitt W S, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1602-1612

Johansson P, Kutti J, Andreasson B, Safai-Kutti S, Vilen L, Wedel H, Ridell B. Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative 38 (Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden, during 1983-99. *J Intern Med* 2004; 256: 161-165

- Jung SM, Moroi M. Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin  $\alpha(2)\beta(1)$ . *J Biol Chem* 2000; 275: 8016-8026
- Kaushansky K. On origin of the chronic myeloproliferativ disorders: it makes all sense. *Blood* 2005; 105: 4187-4190
- Kehrel BE. Blutplättchen: Biochemie und Physiologie, Schattauer 2003, *Hämostaseologie* 23: 149–58
- Klippel S, Strunck E, Temerinac S, Bench AJ, Meinhardt G, Mohr U, Leichtle R, Green AR, Griesshammer M, Heimpel H, Pahl HL. Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis. *Blood* 2003; 102: 3569-3574
- Von der Kwast TH, Stel HV, Cristen E, Bertina RM, Veerman EC. Localization of factor VIII-procoagulant antigen: an immunhistological survey of the human body using monoclonal antibodies. *Blood* 1986; 67: 222-7.
- Landolfi R, Cipriani MC, Novarese L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: pathogenetic mechanismus and prevention. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006; 19 (3): 617-33
- van der Lelie J, von dem Borne AK. Platelet volume analysis für differential diagnosis of thrombocytosis. *J Clin Pathol.* 1986; 39: 129-133
- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I., Praloran V, Boiret-Dupré N, Skoda RC, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006; 6: 1865-1867
- Lu X, Levine R, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, Gilliland DG. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2 V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 18962-18967
- Lutze G, Breyer J, Zawka B. Wissenswertes zur Gerinnung, 2.Auflage, Roche Diagnostics GmbH 1999; 46-47: 178-191
- Mazzucato M et al. Characterization of the initial  $\alpha$ -thrombin interaction with glycoprotein Iba in relation to platelet activation. *J Biol Chem.*1998; 273: 1880-1887
- Mazzucato M, Pradella P, Cozzi MR, De Marco L, Ruggeri ZM. Sequential cytoplasmatic calcium signals in a 2-stage activation process induced by the glycoprotein Iba $\alpha$  mechanoreceptor. *Blood* 2002; 100: 2793-800
- Mazurier C, Meyer D. Molecular basis of von Willebrand disease. *Baillier's clinical Haematology* 1996; 9(2): 229-239
- McNally RJ, Rowland D, Roman E, Cartwright RA. Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol Oncol* 1997; 15: 173-189

Mendolicchio GL, Ruggeri ZM. New perspective on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol* 2005; 42: 5-14

Michelson, A.D. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87, 4925-36

Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, Finazzi G, Budde U, van Vliet HH. The paradox of platelet activation and impaired function: platelet-von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32(6): 589-604

Mitus AJ, Barbui T, Shulman LN, Rosenthal DS, Viero P, Cortelazzo S, Schafer AI. Hemostatic complications in young patients with essential thrombocythemia. *Am J Med* 1990; 88: 371-375

Moake JL, Rudy CK., Troll JH et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982; 307: 1432-5.

Morgenstern E. Human platelets morphology/ultrastructure. *Platelets and their factors. Handbook of experimental pharmacology.* Berlin, Deutschland: Springer Verlag 1997; 27-60.

Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997; 34: 29-39

Nesbitt W S, Mangin P, Salem HH and Jackson SP. The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med* 2006; 84: 989-995

Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C & Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9208-12

Padilla A, Moake JL, Bernardo A et al. P-Selektin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood* 2004; 103: 2150-2156.

Pearson TC, Messinezy M, Westwood N, Green AR, Bench AJ, Huntly BJ, Navecha EP, Barbui T, Finazzi G. A Polycythemia Vera Updated: Diagnosis, Pathobiology, and Treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2000; 51-68

Petrides P, Siegel F. Thrombotic complications in essential thrombocythemia (ET): Clinical facts and biochemical riddles. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 36 (3): 379-84.

Petitt, R.M., Silverstein, M.N., Petrone, M.E. Anagrelide for control of thrombocythemia in polycythemia and other myeloproliferative disorders. *Semin Hematol* 1997; 34: 51-54

Pötzsch B, Madlener K. Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie. Springer Verlag 2010, 2. Auflage.

Randi ML, Fabris F, Girolami A. Thrombocytosis in young people: evaluation of 57 cases diagnosed before the age of 40. *Blood* 1990; 60: 233-237

Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol* 2002; 190: 7-20

Reininger AJ: Thrombusformation im Blutfluss, zitiert nach: Pötzsch B, Madlener K. Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie. Springer Verlag 2010, 2. Auflage, S. 73 - 80

Reininger AJ. VWF attributes – impact on thrombus formation. *Thrombosis research* 2008; 122 Suppl. 4: 9-13

Reininger AJ, Heijnen HFG, Schumann H, Specht H, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 2006; 107 (9): 3537-3545.

Ruggeri ZM. Platelet and von Willebrand factor interactions at the vessel wall. *Hämostaseologie* 2004; 24(1): 1-11

Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine* 2002; 8 (11)

Ruggeri ZM. Structure and Function of von Willebrand Factor. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 576-584

Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 1997; 78: 611-616.

Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1335 – 1342

Ruggeri ZM, Dent JA, Saldivar E. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood* 1999; 94: 172-178

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion Mechanism in Platelet Function. *Circ Res.* 2007; 100: 1673-1685

Sack U, Tárnok A, Rothe G: Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie. Basel, Karger, 2007, S. 27-70

Sanderson HM, Heptinstall S, Vickers J, Lösche W. Studies on the effects of agonists and antagonists on platelet shape change and platelet aggregation in whole blood. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7: 245-248

Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94: 657-666.

Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84: 289-97

Schmidt R., Lang F., Thews G., *Physiologie des Menschen*.

Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7899-7903

Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signalling in platelets. *Blood* 2004; 104: 1606-1615

Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 7345-52

Smith JB and Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol* 1971; 231: 235-237.

Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood* 2002; 100: 4272-4290

Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, Marchetti M: Chronic myeloproliferative Disorders. ASH Education Book, January 1, 2003 vol. 2003 no. 1: 200-224

Staerk J, Kallin A, Demoulin JB, Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK1 and TYK2 activation by homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross talk with IGF1 receptor. *J Biol Chem* 2005; 280: 41893-41899

Thiele J, Kvasnicka H. Chronic myeloproliferative disorders: a pathologist's view, in Petrides PE, Pahl H (Eds.), *Molecular Basis of Chronic Myeloproliferative Disorders*, Springer Publ., New York, 2004, S. 15-27.

Thiele J, Kvasnicka HM. Chronic myeloproliferative disorders. The new WHO classification. *Pathologe* 2001; 22: 429-443

Tomokiyo K, Kamikubo Y, Hanada T, Araki T, Nakatomi Y, Ogata Y, Jung SM, Nakagaki T, Moroi M. von Willebrand factor accelerates platelet adhesion and thrombus formation on a collagen surface in platelet-reduced blood under flow conditions. *Blood* 2005; 105(3): 1078-1084.

Toth O, Calatzis A., Penz S, Losonczy H and Siess W. Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006; 96: 781-788.

Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 1996;87: 4235-4244.

Turitto VT, Weiss HJ, Zimmermann TS, Sussmann II. Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. *Blood* 1985; 65: 823-831

Westin J, Granerus G, Weinfeld A, Wetterquist H. Histamine metabolism in polycythaemia vera. *Scand J Haematol* 1975; 15: 45-57

Vardiman JW, Brunning RD, Harris NL, Pierre R, Thiele J, Imbert M, Brunning RD, Flandrin G, Bain B. Chapter 1: Chronic Myeloproliferative Disease 2001; S. 15-44. In: Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Vardiman, J.W. (Eds) World Health Organization of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue IARC Press, Lyon

Varughese KI, Celikel R and Ruggeri Z.M. Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain. *Curr Protein Pept Sci* 2002; 3: 301-312

Wagner D. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 217-246



## 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Vorherrschende Scherraten in verschiedenen Abschnitten des Gefäßsystems</i>	30
<i>Abbildung 2: Bedeutung der Plasmaproteine unter verschiedenen Scherraten</i>	31
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung des Blutflusses in einem intakten Blutgefäß</i>	41
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung der Flusskammer mit den Einzelkomponenten</i>	50
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Flusskammer</i>	51
<i>Abbildung 6: Schematische Darstellung der Reflexion-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie</i>	43
<i>Abbildung 7: Beispielhafte Auswertung einer durchflusszytometrischen Analyse</i>	56
<i>Abbildung 8: Exemplarische Darstellung des Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf einer mit von Willebrand Faktor Antigen beschichteten Oberfläche</i>	59
<i>Abbildung 9 - 10: Graphische Darstellung der prozentualen Adhäsionsfläche von Thrombozyten auf einer mit von Willebrand Faktor Antigen beschichteten Oberfläche</i>	
<i>Abbildung 9: Scherrate <math>1500 \text{ s}^{-1}</math></i>	60
<i>Abbildung 10: Scherrate <math>10.000 \text{ s}^{-1}</math></i>	60
<i>Abbildung 11: Durchflusszytometrischer Nachweis der mittleren Fluoreszenzintensität der GP IIb/IIIa Rezeptoren auf Thrombozyten im Vollblut</i>	62
<i>Abbildung 12: Durchflusszytometrischer Nachweis der mittleren Fluoreszenzintensität der GP Ib- Rezeptoren Komplex auf Thrombozyten im Vollblut</i>	63
<i>Abbildung 13: Durchflusszytometrischer Nachweis von P-Selektin auf Thrombozyten vor und nach Stimulation mit TRAP im Vollblut.</i>	64
<i>Abbildung 14: Durchflusszytometrischer Nachweis von Phosphatidylserin auf Thrombozyten vor und nach Stimulation mit TRAP im Vollblut.</i>	65
<i>Abbildung 15 - 20: Einfluss methodenbedingter Störgrößen auf die Aggregation - Vergleich von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Probanden auf Kollagen unter Strömungsbedingungen</i>	
<i>Abbildung 15: Aggregationsverhalten unter der Scherrate <math>800 \text{ s}^{-1}</math></i>	67
<i>Abbildung 16: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate <math>800 \text{ s}^{-1}</math></i>	68
<i>Abbildung 17: Aggregationsverhalten unter der Scherrate <math>1500 \text{ s}^{-1}</math></i>	69
<i>Abbildung 18: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate <math>1500 \text{ s}^{-1}</math></i>	70
<i>Abbildung 19: Aggregationsverhalten unter der Scherrate <math>4000 \text{ s}^{-1}</math></i>	71
<i>Abbildung 20: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate <math>4000 \text{ s}^{-1}</math></i>	72
<i>Abbildung 21: Exemplarische Darstellung der aggregatbedeckten Kollagenoberfläche im Flussexperiment mit nicht zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender unter der Scherrate <math>4000 \text{ s}^{-1}</math> nach 4 Minuten (A) und 5 Minuten (B)</i>	73

Abbildung 22: Aggregationsverhalten von nicht zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender unter den verschiedenen Scherraten. Vergleich von statistisch prozentual ähnlich bedeckten Kollagenoberflächen unabhängig von der Zeitkomponente \_\_\_\_\_ 74

Abbildung 23 - 28: Einfluss methodenbedingter Störgrößen auf die Aggregation - Vergleich von nicht zentrifugierten und mehrfach zentrifugierten Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose auf Kollagen unter Strömungsbedingungen

Abbildung 23: Aggregationsverhalten unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 75

Abbildung 24: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 76

Abbildung 25: Aggregationsverhalten unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 77

Abbildung 26: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 78

Abbildung 27: Aggregationsverhalten unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 77

Abbildung 28: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 80

Abbildung 29 - 30: Aggregationsverhalten gesunde Probanden versus Patienten mit primärer Thrombozytose

Abbildung 29: Exemplarische Darstellung des Aggregationsverhaltens unter den Scherraten  $800 \text{ s}^{-1}$ ,  $1500 \text{ s}^{-1}$  und  $4000 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 82

Abbildung 30: Kinetik des Aggregatwachstums unter den Scherraten  $800 \text{ s}^{-1}$ ,  $1500 \text{ s}^{-1}$  und  $4000 \text{ s}^{-1}$ . \_\_\_\_\_ 83

Abbildung 31 - 39: Patientenspezifische Einflussfaktoren auf die Aggregation

Abbildung 31 - 33: Untersuchung des Einflusses der Thrombozytenkonzentration bei gesunden Spendern

Abbildung 31: Thrombozyten im Normalbereich im Vergleich zu Thrombozyten mit Konzentrationen im Supranormalbereich unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 85

Abbildung 32: Thrombozyten im Normalbereich im Vergleich zu Thrombozyten mit Konzentrationen im Supranormalbereich unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 86

Abbildung 33: Thrombozyten im Normalbereich im Vergleich zu Thrombozyten mit Konzentrationen im Supranormalbereich unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 88

Abbildung 34 - 39: Untersuchung des Einflusses von Acetylsalicylsäure auf Thrombozyten gesunder Spender

Abbildung 34: Exemplarische Darstellung des Aggregationsverhaltens nicht zentrifugierter Thrombozyten von Patienten, mehrfach zentrifugierter Thrombozyten mit supranormalen Werte gesunder Spender und mehrfach zentrifugierte Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 90

Abbildung 35: Kinetik des Aggregatwachstums nicht zentrifugierter Thrombozyten der Patienten, mehrfach zentrifugierter Thrombozyten mit supranormalen Werten gesunder Spender und Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 90

Abbildung 36: Exemplarische Darstellung des Aggregationsverhaltens nicht zentrifugierter Thrombozyten von Patienten, mehrfach zentrifugierter Thrombozyten mit supranormalen Werte in der Gruppe gesunde Spender und mehrfach zentrifugierte Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 91

Abbildung 37: Kinetik des Aggregatwachstums nicht zentrifugierter Thrombozyten der Patienten, mehrfach zentrifugierter Thrombozyten mit supranormalen Werten gesunder Spender und Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 92

Abbildung 38: Exemplarische Darstellung des Aggregationsverhaltens nicht zentrifugierter Thrombozyten von Patienten, mehrfach zentrifugierter Thrombozyten mit supranormalen Werte gesunder Spender und mehrfach zentrifugierte Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 93

Abbildung 39: Kinetik des Aggregatwachstums nicht zentrifugierter Thrombozyten der Patienten, mehrfach zentrifugierter Thrombozyten mit supranormalen Werten gesunder Spender und Thrombozyten gesunder Spender im Supranormalbereich unter Acetylsalicylsäure unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 93

Abbildung 40 - 45: Einfluss der einzelnen Komponenten der primären Hämostase auf die Aggregation

Abbildung 40 - 42: In vitro Ersatz der Thrombozyten in der Patientenprobe durch Thrombozyten gesunder Spender im Vergleich zu mehrfach zentrifugierten Thrombozyten gesunder Spender und zu mehrfach zentrifugierten Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose

Abbildung 40: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 96

Abbildung 41: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 97

Abbildung 42: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 98

Abbildung 43 - 45: In vitro Ersatz des Patientenplasmas und der Erythrozyten durch Komponenten gesunder Probanden im Vergleich zu mehrfach zentrifugierte Thrombozyten gesunder Spender und zu mehrfach zentrifugierten Thrombozyten von Patienten mit primärer Thrombozytose

Abbildung 43: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate  $800 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 964

Abbildung 44: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 100

Abbildung 45: Kinetik des Aggregatwachstums unter der Scherrate  $4000 \text{ s}^{-1}$  \_\_\_\_\_ 101

Abbildung 46: Charakteristische elektrophoretische Auftrennung der von Willebrand Multimere eines Normalplasmapools in 1,6 % igem Agarosegel \_\_\_\_\_ 102

## 9. ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

Abb.	Abbildung
ACD	Acid Citrate Dextrose
ADAMTS-13	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motif
ADP	Adenosindiphosphat
ANAG	Anagrelid
ATP	Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CD	cluster of differentiation
CIMF	chronische ideopathische Myelofibrose
CMPE	Chronisch myeloproliferative Erkrankung
CML	Chronisch myeloische Leukämie
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
ET	Essentielle Thrombozythämie
F VIII	Gerinnungsfaktor VIII
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (fluorescens activated cell sorting)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSS	Forwärts-Scatter
GP	Glykoprotein
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HU	Hydroxyurea
INF	Interferon alpha
Ig	Immunglobulin
JAK2	Januskinase 2
KCL	Kaliumchlorid
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität

Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
OCS	open canalicular system
OMF	Osteomyelofibrose
PAR	Protease aktiverter Rezeptor
PDGF	platelet derived growth factor
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>1</sub>
P-PACK	Chloromethylketontrifluoroacetat
PPP	thrombozytenarmes Plasma, platelet poor plasma
PRP	thrombozytenreiches Plasma, platelet rich plasma
PRV-1	Polyzythämia rubra vera - 1
PV	Polyzythämia vera
RIKM	Reflex-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie
SCS	surface connected canalicular system
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	Seitwärts-Scatter
TRAP 6	Thrombinrezeptoraktivator
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	World Health Organisation

Da	Dalton
dl	Deziliter
g	Gramm
k	Kilo
IU	Internationale Units
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
s <sup>-1</sup>	inverse Sekunden
U/l	Units/Liter
U/m	Umdrehungen/Minute
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
μ	Mikro
μm	Mikrometer
°	Grad
%	Prozent

## **10. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei allen Bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herzlichst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. A.-J. Reiningger bedanken für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die ausserordentlich gute Zusammenarbeit. Ich bedanke mich für die stetige Unterstützung, die wertvollen Diskussionen und die schönen Gespräche während der gesamten Zeit.

Herrn Prof. Dr. med. P. Petrides danke ich für die Mithilfe und Zusammenarbeit hinsichtlich der Patientenrekrutierung.

Besonderer Dank gilt auch Frau M. Napoleone, die mir während der gesamten Zeit zur Seite stand und mich technisch und fachlich sehr unterstützt hat.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Immungenetik, dem Team der Zellseparation und den Mitarbeitern der Transfusionsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern für die Unterstützung, die aufmunternden Gespräche und die gute Zusammenarbeit.