

Aus der Hämatologisch-Onkologischen Schwerpunktpraxis
am Isartor, München
apl. Prof. Dr. med. Petro E. Petrides

**Untersuchungen zur Thromboseentstehung bei Patienten mit chronisch
myeloproliferativen Neoplasien**



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

vorgelegt von

Jan Tauscher

aus

Oberstdorf

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Petro E. Petrides

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Fiegl
Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schramm
Priv. Doz. Dr. Christian Straka

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2012

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	7
Einleitung.....	9
1.1 Die Hämatopoese.....	9
1.2 Erworbene Störungen der Hämatopoese.....	10
1.3 Polycythaemia vera.....	12
1.4 Primäre Thrombozythämie.....	12
1.5 Hinführung zum Thema.....	14
1.6 Fragestellungen.....	20
Teil 1: Hydroxyurea-induzierte Oszillationen bei Patienten mit Polycythaemia vera.....	21
1. Material und Methoden.....	21
1.1 Patienten.....	21
1.2 Lomb-Periodogramm.....	21
2. Ergebnisse.....	23
2.1 Merkmale der Patienten.....	23
2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse.....	24
2.2.1 Analyse unter HU-Therapie.....	24
2.2.2 Analyse nach Absetzen der HU-Therapie.....	30
2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	33
3. Diskussion.....	35
Teil 2: Beeinflussung der Thrombusbildung durch Aspirin bei Primärer Thrombozythämie.....	39
1. Material und Methoden.....	39
1.1 Patienten.....	39
1.2 Kontrollgruppe.....	39
1.3 Material.....	39
1.3.1 Geräte.....	39
1.3.2 Reagenzien, Puffer, Lösungen.....	40
1.3.3 Softwareprogramme.....	40
1.3.4 Sonstige Materialien.....	41
1.4 Methoden.....	41
1.4.1 Beschichtung der Kapillarwand mit Kollagen.....	41
1.4.2 Blutentnahme und Fluoreszierung der Thrombozyten.....	42
1.4.3 Durchführung des Versuches.....	43
1.4.4 Bearbeitung der gesammelten Daten.....	44
1.5 Analyse und Auswertung der Daten.....	44
1.6 Verwendbarkeit der Daten.....	45
2. Ergebnisse.....	46
2.1 Patientencharakteristika.....	46
2.2 Charakteristika der Studien-Kontrollgruppe.....	46
2.3 Blutbildanalysen der Patienten und der Kontrollgruppe.....	47
2.4 Verwendbarkeit der RTTP-Messergebnisse.....	48
2.5 Vergleich der Patienten mit der Kontrollgruppe.....	49
2.6 Einfluss der JAK2V617F-Mutation auf die Thrombusbildung.....	52
2.7 Einfluss des Thrombozytenwertes.....	52
2.8 Einfluss des Hämatokritwertes.....	54
2.9 Einfluss des Leukozytenwertes.....	56
2.10 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	58
3. Diskussion.....	59
Literaturverzeichnis.....	63
Lebenslauf.....	70
Veröffentlichungen.....	71
Danksagung.....	72
Anhang.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung von Polycythaemia vera und Primärer Thrombozythämie.....	14
Tabelle 2: Messsysteme zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik.....	19
Tabelle 3: Die 12 identifizierten Patienten.....	23
Tabelle 4: Lomb-Analyse der Thrombozyten und Leukozyten unter Therapie mit HU.....	25
Tabelle 5: Graphische Darstellung der Oszillationen unter HU-Therapie.....	26
Tabelle 6: Lomb-Analyse des Hämatokrits und des Hämoglobinwertes unter HU-Therapie.....	29
Tabelle 7: Lomb-Analyse des Erythrozytenwertes und des MCV unter HU-Therapie.....	29
Tabelle 8: Lomb-Analyse der Thrombozyten und Leukozyten nach Absetzen der HU-Therapie.....	30
Tabelle 9: Graphische Darstellung der Fluktuationen nach Absetzen der HU-Therapie.....	31
Tabelle 10: Übersicht über alle 12 oszillierenden Patienten.....	34
Tabelle 11: Übersicht über alle bisher publizierten PV-Patienten mit HU induzierten Oszillationen.....	38
Tabelle 12: Bestandteile des RTTP.....	40
Tabelle 13: Charakteristika der Studien-Patienten mit Primärer Thrombozythämie.....	46
Tabelle 14: Charakteristika der Studien-Kontrollgruppe.....	47
Tabelle 15: Blutbildanalyse der PT-Patienten am Untersuchungstag.....	47
Tabelle 16: Blutbildanalysen der Kontrollgruppe am Untersuchungstag.....	48
Tabelle 17: Verwendbarkeit der Messungen	49
Tabelle 18: Übersicht des durchschnittlichen thrombotischen Potentials im Vergleich mit der Kontrollgruppe.....	50
Tabelle 19: Einfluss der JAK2V617F Mutation auf das durchschnittliche thrombotische Potential.....	52
Tabelle 20: Korrelation des Thrombozytenwertes für 100s-1.....	53
Tabelle 21: Korrelation des Thrombozytenwertes für 600s-1.....	53
Tabelle 22: Korrelation des Thrombozytenwertes für 1600s-1.....	54
Tabelle 23: Korrelation des Hämatokritwertes für 100s-1.....	55
Tabelle 24: Korrelation des Hämatokritwertes für 600s-1.....	55
Tabelle 25: Korrelation des Hämatokritwertes für 1600s-1.....	56
Tabelle 26: Korrelation des Leukozytenwertes für 100s-1.....	56
Tabelle 27: Korrelation des Leukozytenwertes für 600s-1.....	57
Tabelle 28: Korrelation des Leukozytenwertes für 1600s-1.....	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Hämatopoese.....	9
Abbildung 2: Fluktuation.....	10
Abbildung 3: Ideale Oszillation.....	10
Abbildung 4: Oszillation in der Realität.....	10
Abbildung 5: Januskinasen vermittelte Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren.....	11
Abbildung 6: Lokalisation der Mutationen in Exon 14 (V617F) bzw. Exon 12 des JAK2-Gens.	11
Abbildung 7: Modell der Thrombusbildung.....	15
Abbildung 8: Tierexperimentelles Model der Thrombusbildung.....	16
Abbildung 9: Der RTTP.....	40
Abbildung 10: Präparation der Kapillaren.....	41
Abbildung 11: Schematischer Versuchsaufbau.....	42
Abbildung 12: Vergleich PT-Patienten mit Kontrollgruppe bei 100s-1	50
Abbildung 13: Vergleich PT-Patienten mit Kontrollgruppe bei 600s-1.....	50
Abbildung 14: Vergleich PT-Patienten mit Kontrollgruppe bei 1600s-1.....	50
Abbildung 15: Repräsentative Beispiele einzelner RTTP-Messungen.....	51
Abbildung 16: Vergleich der JAK2V617F-Mutation bei 100s-1.....	52
Abbildung 17: Vergleich der JAK2V617F-Mutation 600s-1	52
Abbildung 18: Vergleich der JAK2V617F-Mutation bei 1600s-1.....	52
Abbildung 19: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten bei 100s-1.....	53
Abbildung 20: Korrelation des Thrombozytenwertes der Kontrollgruppe bei 100s-1.....	53
Abbildung 21: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 100s-1.....	53
Abbildung 22: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten bei 600s-1.....	53
Abbildung 23: Korrelation des Thrombozytenwertes der Kontrollgruppe bei 600s-1.....	53
Abbildung 24: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 600s-1.....	53
Abbildung 25: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten bei 1600s-1.....	54
Abbildung 26: Korrelation des Thrombozytenwertes der Kontrollgruppe bei 1600s-1.....	54
Abbildung 27: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 1600s-1.....	54
Abbildung 28: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten bei 100s-1.....	55
Abbildung 29: Korrelation des Hämatokritwertes der Kontrollgruppe bei 100s-1.....	55
Abbildung 30: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe bei 100s-1.....	55
Abbildung 31: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten bei 600s-1.....	55
Abbildung 32: Korrelation des Hämatokritwertes der Kontrollgruppe bei 600s-1.....	55
Abbildung 33: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe bei 100s-1.....	55
Abbildung 34: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten bei 1600s-1.....	56
Abbildung 35: Korrelation des Hämatokritwertes der Kontrollgruppe bei 1600s-1.....	56
Abbildung 36: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 1600s-1.....	56
Abbildung 37: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten bei 100s-1.....	56
Abbildung 38: Korrelation des Leukozytenwertes der Kontrollgruppe bei 100s-1.....	56
Abbildung 39: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 100s-1.....	56
Abbildung 40: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten bei 600s-1.....	57
Abbildung 41: Korrelation des Leukozytenwertes der Kontrollgruppe bei 600s-1.....	57
Abbildung 42: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 600s-1.....	57
Abbildung 43: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten bei 1600s-1.....	57
Abbildung 44: Korrelation des Leukozytenwertes der Kontrollgruppe bei 1600s-1.....	57
Abbildung 45: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 1600s-1.....	57

Zusammenfassung

Thromboembolische Ereignisse stellen die wesentlichste, weil vital bedrohliche, Komplikation der Polycythaemia vera und Primärer Thrombozythämie als Hauptvertreter der chronisch myeloproliferativen Neoplasien (CMPN) dar.

Hydroxyurea, ein zytoreduktives Standardmedikament in der Therapie der Polycythaemia vera, blockiert über die Hemmung der Ribonukleotidreduktase in hämatopoetischen Stammzellen die Produktion von Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten. Bei einzelnen Patienten mit Polycythaemia vera wurden in der Vergangenheit extreme periodische Schwankungen der Thrombozyten (und zum Teil auch der Leukozyten) unter der Therapie mit Hydroxyurea beschrieben. Mit diesem Phänomen beschäftigt sich der erste Teil der hier vorgelegten Arbeit. In der CMPN-Datenbank der Hämatologisch-Onkologischen Schwerpunktpraxis (Prof. Dr. med. Petro E. Petrides, München) wurde nach Patienten gesucht, bei denen o.g. Schwankungen mit periodischer Regelmäßigkeit der Thrombozytenwerte und anderer Blutzellreihen auffällig waren und ob während dieser Schwankungen thromboembolische und/oder hämorrhagische Komplikationen auftraten. Durch das Lomb-Periodogramm, einer speziellen Version der Fourier-Spektral-Analyse, wurde die Periodizität der Patienten analysiert.

Es wurden 12 Patienten mit einer Polycythaemia vera identifiziert, bei denen Oszillationen der Thrombozyten mit einer durchschnittliche Zyklusdauer von 28,6 Tage nachgewiesen werden konnten. Von diesen 12 Patienten hatten zusätzlich 5 Patienten ebenfalls Oszillationen der Leukozyten (durchschnittliche Zyklusdauer 27,8 Tage). Keine Oszillationen wurden hingegen nachgewiesen für Hämatokrit-, Hämoglobin-, Erythrozyten- und MCV-Wert. Auslöser dieser Oszillationen ist Hydroxyurea, da bei allen Patienten das Auftreten der Oszillationen mit der Einnahme von HU in zeitlichem Zusammenhang bestand. Zudem führte bei fast allen Patienten eine Beendigung der Therapie mit Hydroxyurea auch zu einem Ende der Oszillationen.

Das Risiko der Oszillationen scheint eher gering zu sein, da es in dem hier vorgestellten Patientenkollektiv in dem langen Beobachtungszeitraum dieser Studie nicht zu Blutungen oder thromboembolischen Ereignissen gekommen ist, was das derzeit gültige Konzept unterstreicht, dass die Entstehung einer Thrombose ein multifaktorielles Geschehen ist.

Die genaue Kaskade, welche zu letztendlich zu einer Thrombose in den Patienten mit einer CMPN führt, ist noch nicht bekannt. Daher ist nach wie vor schwierig, das Risiko einer Thrombose bei dieser Patientengruppe durch ex-vivo-Untersuchungen abzuschätzen. Acetylsalicylsäure (Aspirin) ist das Standardmedikament zur Primärprophylaxe bei Patienten mit Primärer Thrombozythämie. Durch Aspirin kann zwar das Risiko des Auftretens von thromboembolischen Komplikationen gesenkt werden, es ist aber kein vollständiger Schutz erreichbar, da einzelne Patienten auch unter dieser Therapie Thrombosen entwickeln. Durch eine für jeden Patienten individuell ermittelte Neigung zur Thrombusbildung könnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob für den einzelnen Patienten eine medikamentöse Therapie überhaupt nötig bzw. ausreichend ist. Bis dato ist allerdings kein solcher Test verfügbar.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich deshalb mit einem neuen Testgerät: in einem Pilotprojekt mit kleiner Fallzahl wurden Patienten mit Primärer Thrombozythämie unter Aspirin-Dauertherapie mit einem Prototyp (Real Time Thrombosis Profiler [RTTP]) untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurde der RTTP erstmals zur klinischen Anwendung an Patienten herangezogen. Untersucht wurden der Einfluss von Aspirin auf Patienten mit Primärer Thrombozythämie im

Zusammenfassung

Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe, der Einfluss des genetischen Markers der CMPN, der JAK2^{V617F}-Mutation, sowie der Einfluss von Thrombozyten, Leukozyten sowie des Hämokrits.

Zur Durchführung der Untersuchung mittels des RTTP wird eine Blutprobe mit einem Antikoagulans sowie einem Farbstoff zur Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten versehen. Anschließend wird das so präparierte Blut durch eine Glaskapillare geleitet und mit einer Kamera aufgezeichnet, ob bzw. wie schnell sich ein Thrombus bildet. Großer Vorteil des RTTP ist die Möglichkeit, unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten einzustellen, womit arterielle und venöse Strömungsbedingungen simuliert werden können.

Die vorgelegte Untersuchung stellt eine Pilotstudie zur Anwendbarkeit dieses Gerätes im klinischen Alltag dar. Die Ergebnisse belegen die potentielle Anwendbarkeit, die jedoch in weiteren Studien belegt werden muss:

Die Behandlung mit Aspirin reicht nach dieser Studie mit dem RTTP nicht aus, um die Thrombusbildung bei Patienten mit Primärer Thrombozythämie auf das wesentlich niedrigere Niveau der Kontrollgruppe zu normalisieren. Außerdem ist die JAK2^{V617F}-Mutation nicht für das höhere Risiko einer Thrombose verantwortlich. Auch werden Thrombosen bei Patienten mit Primärer Thrombozythämie nicht von einem einzigen Faktor, wie der Thrombozytose, Leukozytose, erhöhtem Hämokritwert oder dem JAK2^{V617F}-Mutationstatus, hervorgerufen, sondern durch das Zusammenspiel von mehreren teilweise noch unbekanntem Einflussgrößen.

Gegenüber anderen Methoden bietet der RTTP die Möglichkeit, Thrombozyten in einer Blutprobe bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten zu beobachten. Somit wird ein sich weiter an die physiologischen Verhältnisse im menschlichen Körper angenähertes Testsystem geboten, da so venöse und arterielle Verhältnisse imitiert werden können. Dazu kommt, dass der RTTP Vollblut nutzt, welches im Gegensatz zu plättchenreichem Plasma eine physiologische Methode ist. Nachteil ist die bisher noch fehlende Vergleichsmöglichkeit von Studienergebnissen. Weitere Studien werden nötig sein, um Thrombozytenfunktionstests wie den RTTP zu optimieren und damit dann ein individuelles Therapieschema für Patienten mit Thrombozytosen zu entwickeln, welches das Risiko für ein thromboembolisches Ereignis reduziert.

Einleitung

Die chronisch myeloproliferativen Neoplasien (CMPN) umfassen nach der aktuellen WHO-Klassifikation von 2008 als Hauptvertreter die Polycythaemia vera (PV), die primäre bzw. essentielle Thrombozythämie (PT bzw. ET) und die primäre Myelofibrose (PMF)¹. Es handelt sich bei diesen Krankheitsbildern um quantitative und qualitative Störungen der Hämatopoese.

1.1 Die Hämatopoese

Die Hämatopoese findet im Knochenmark statt und garantiert die kontinuierliche Versorgung mit Blutzellen des Menschen. Es werden durch Zellteilungen und zunehmende Differenzierung aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen die reifen Blutzellen - z.B. Thrombozyten, Erythrozyten und die verschiedenartigen Leukozyten - gebildet (Abbildung 1)².

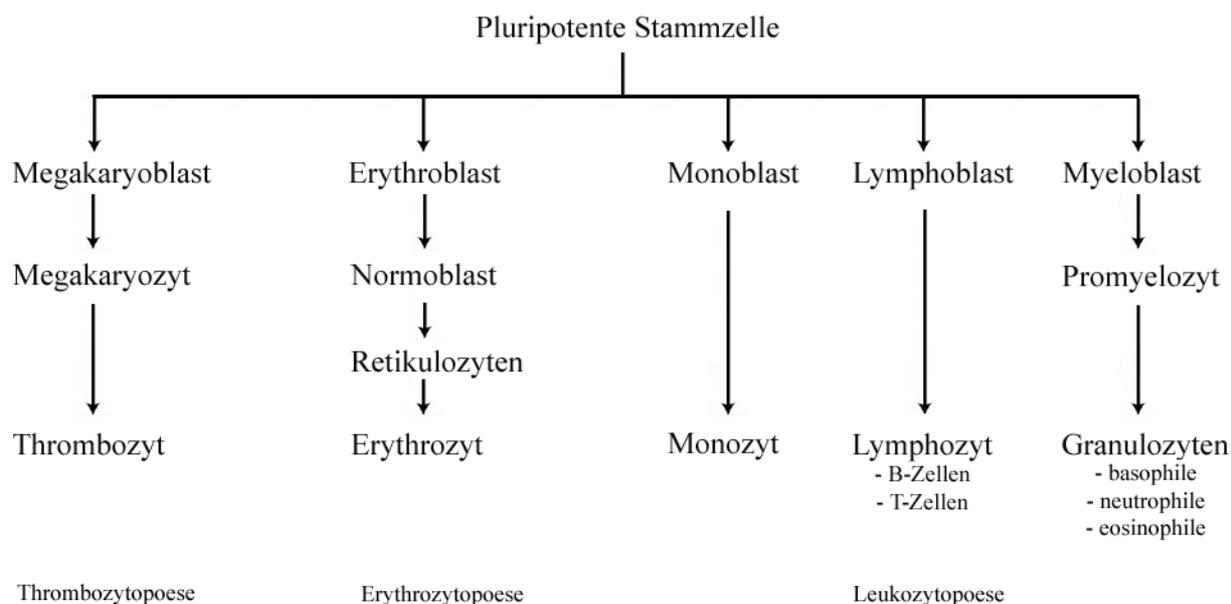


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Hämatopoese

Ein Überangebot bzw. eine Unterversorgung an Blutzellen hat für den menschlichen Körper unter Umständen weitreichende Folgen, die u.a. den Sauerstofftransport, die Immunabwehr, aber auch die rheologischen Eigenschaften des Blutes beeinflussen³. Daher wird die Zellzahl unter physiologischen Bedingungen in relativ konstanten Grenzen gehalten. Allerdings schwanken bei jedem Menschen die Zahlen der Blutzellen ständig, was als Fluktuation bezeichnet wird (Abbildung 2). Wenn solche Schwankungen mit einer eindeutigen Frequenz f eine regelmäßige Zyklusdauer aufweisen, werden diese als Oszillation bezeichnet (Abbildung 3 und 4)^{4,5,6}. Häufig ist es schwierig, nur anhand von Graphen zwischen Fluktuationen und Oszillation zu unterscheiden, in vielen Fällen

1.1 Die Hämatopoese

ist dies nur durch eine mathematische Analyse möglich.

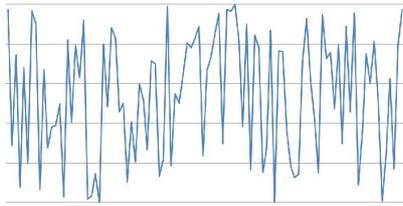


Abbildung 2: Fluktuation

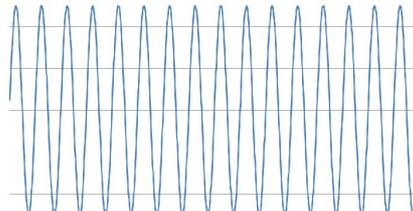


Abbildung 3: Ideale Oszillation

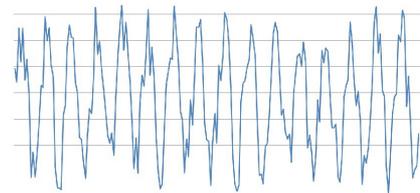


Abbildung 4: Oszillation in der Realität

Die Regulation der Hämatopoese erfolgt abhängig vom Zelltyp im Wesentlichen über Erythropoietin (Erythrozyten), Thrombopoietin (Thrombozyten) oder Interleukin-3 und G-CSF⁷.

Morley et. al haben ein Modell entwickelt, nach dem die Hämatopoese ein tatsächliches oder potentielles System von Oszillationen auf Grund von negativen Feedback-Schleifen ist⁶. Negative Feedback-Kreisläufe sind nicht nur fähig, Oszillationen zu produzieren, sondern sind auch eine Grundvoraussetzung für stabile Oszillationen^{8,9}. Für die Produktion von Thrombozyten gilt Thrombopoietin als Mediator der Feedback-Schleifen zwischen Thrombozyten im Blut und Megakaryozyten im Knochenmark¹⁰. Eine ähnliche Rolle wurde für G-CSF für die Produktion neutrophiler Leukozyten gezeigt¹¹.

Über den Mechanismus der Entstehung von Fluktuationen bzw. Oszillationen von Blutzellen ist nur wenig bekannt. Vor mehr als zwanzig Jahren berichteten von Schulthess und Gessner über Oszillationen mit niedriger Amplitude von Thrombozyten mit einer Zyklusdauer von 28,3 Tagen in sieben von zehn Versuchspersonen, allerdings erfolgte keine genaue mathematische Analyse¹². Für neutrophile Leukozyten wurde eine Zykluslänge von 14-23 Tagen bei acht von elf gesunden, männlichen Probanden festgestellt¹³. In den jeweils anderen Versuchspersonen konnte keine Oszillation festgestellt werden. Diese Oszillationen können auch bei hämatologischen Erkrankungen auftreten: mindestens zwei Untersuchungen über spontane Oszillationen der Thrombozyten in Patienten mit Polycythaemia vera sind beschrieben^{14,15}. Dieses Phänomen wurde auch bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) beobachtet⁴.

1.2 Erworbene Störungen der Hämatopoese

Durch erworbene Mutationen einer Stammzelle des Knochenmarks können Polyzythämien und Thrombozythämien entstehen. Beide stellen dynamische Krankheiten dar, d.h. sie können ihren klinischen Phänotyp ändern - sie können ineinander oder in seltenen Fällen auch in eine Leukämie übergehen. Im Jahre 2005 wurde mit der JAK2^{V617F}-Mutation die erste krankheitsassoziierte Mutation für oben genannte Erkrankungen entdeckt^{17,18,19,20,21}. Die JAK2 (Januskinase 2) ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, die an der Signaltransduktion verschiedener Zytokine (unter anderem des Erythropoietin- und G-CSF-Rezeptors) beteiligt ist. Diese erworbene Mutation verstärkt die Aktivität der JAK2 und führt damit zu Erythropoietin-unabhängigem Wachstum der Erythrozytenvorstufen (Abbildung 5, aus²²).

Praktisch alle Patienten mit Polycythaemia vera weisen eine Mutation im JAK2^{V617F}-Gen 14 bzw. Exon 12 auf (Abbildung 6, aus²²)²³. Bei der Primären Thrombozythämie ist die JAK2^{V617F}-Mutation etwa bei 50% der Patienten nachweisbar. Da eine veränderte JAK2-Kinase nicht nur die Proliferation, sondern auch die Funktion von Zellen beeinflussen kann, wird das Thromboserisiko möglicherweise durch JAK2-induzierte Veränderungen von Oberflächenproteinen der PV-

1.2 Erworbene Störungen der Hämatopoese

Erythrozyten bzw. Granulozyten bestimmt²⁴.

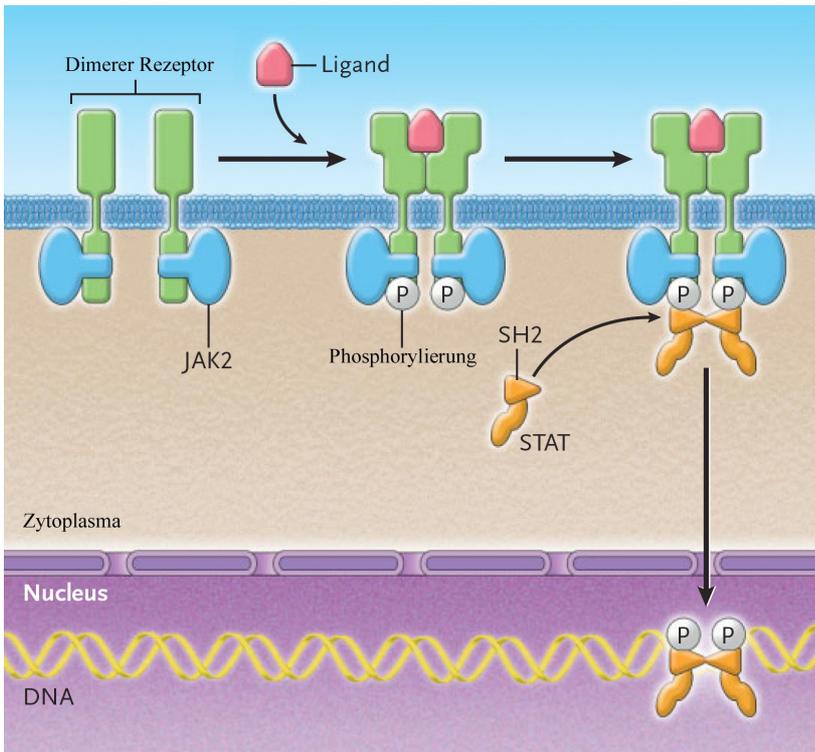


Abbildung 5: Januskinasen vermittelte Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren.

Nach Bindung eines Liganden wie Erythropoietin dimerisiert der Rezeptor, was die Phosphorylierung durch das JAK2-Protein triggert. Dadurch kommt es zur Bindung von STAT-Proteinen, die ebenfalls phosphoryliert werden und nach Dissoziation als Dimere in den Zellkern gelangen, wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken (aus²²).

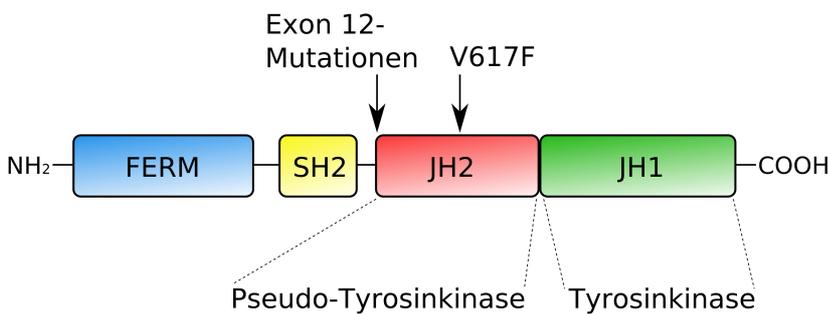


Abbildung 6: Lokalisation der Mutationen in Exon 14 (V617F) bzw. Exon 12 des JAK2-Gens.

Die JH1-Domäne enthält die Tyrosinkinase-Aktivität von JAK2; die JH2-Domäne enthält eine Pseudokinase, d.h. dieser Proteinanteil wirkt nicht als Enzym, sondern als Inhibitor des JAK2-Proteins. V617F markiert das mutierte Kodon im Exon 14. Die Mutationen im Exon 12 liegen am Übergang zwischen den Domänen SH2 und JH2 (aus²²).

1.3 Polycythaemia vera

Definition/Inzidenz Polycythaemia vera (PV) ist eine heterogene Stammzellerkrankung, die vor allem durch eine Erhöhung der Erythrozyten, aber auch der Thrombozyten und Leukozyten, gekennzeichnet ist²⁵. In Schweden beträgt zum Beispiel die jährliche Inzidenz der PV 2,8 pro 100.000 Einwohner²⁶. In Deutschland liegen keine epidemiologischen Daten vor.

Ursache Die Ursache der Erkrankung ist unbekannt, die Krankheit ist fast immer erworben, kann aber in sehr seltenen Fällen auch angeboren sein. Praktisch alle Patienten mit PV weisen eine Mutation in Exon 14 des JAK2^{V617F}-Gens bzw. eine Mutation in Exon 12 auf²³.

Komplikationen/Symptome Die gefürchtetsten, weil potentiell vital bedrohlichen, Komplikationen der PV sind die Thromboembolien, die bei Patienten mit PV mit einer Häufigkeit von 28,7% (arteriell) bzw. 13,7% (venös) auftreten²⁷. Im arteriellen System kommt es vor allem zu Transitorischen Ischämischen Attacken (10,3%), Myokardinfarkt (8,9%), Apoplex (8,9%) und peripheren Thrombosen (5,5%). Im venösen System kann es zu tiefen (8,2%) oder oberflächlichen (6,1%) Venenthrombosen, Lungenembolien (2,4%) oder auch Portalvenenverschlüssen kommen²⁷. Weitere Symptome bzw. Komplikationen einer PV können u.a. sein: Hämorrhagien, Hepato-/Splenomegalie, aquagener Pruritus, Kopfschmerzen, Tinnitus, Hyperurikämie und Erythromelalgien¹.

Therapie Die Therapie besteht aus Aderlassen zur Prophylaxe der Thrombosen²⁵. Nach den Ergebnissen der ECLAP Studie wird zusätzlich Aspirin in niedriger Dosis (50-100mg pro Tag) empfohlen, sofern keine Kontraindikationen vorliegen²⁸. Allerdings wird diese Therapieempfehlung kontrovers diskutiert²⁹. Eine erythrozytensenkende Therapie durch Medikamente ist dann sinnvoll, wenn ein thromboembolisches Ereignis trotz Aspirin-Therapie aufgetreten ist, wenn eine Hämatokritsenkung durch Aderlassbehandlung nicht möglich ist oder wenn eine symptomatische Splenomegalie festzustellen ist¹. Zur Verfügung stehen in Deutschland derzeit Medikamente wie Hydroxyurea (Syrea®, Litalir®) oder (pegyliertes) Interferon-alpha (IntronA®, Roferon®, Pegasys®, PEG-Intron®). Nur noch in seltenen Fällen werden Alkeran oder Busulphan eingesetzt, da deren Leukämierisiko mittlerweile als gesichert gilt.

Langzeitverlauf Die Polycythaemia vera kann in eine akute Leukämie oder Myelofibrose übergehen. Das 20-Jahres-Risiko eines Übergangs in eine akute Leukämie beträgt 15%, in eine postpolyzythämische Myelofibrose nach einer anderen Studie 10%. Nach dieser retrospektiven Studie liegt die mittlere Lebenserwartung bei unter 50-jährigen Patienten bei über 23 Jahren³⁰. Allerdings hatten von diesen Patienten 73% Pipobroman erhalten, das heute wegen seines Leukämierisikos ebenfalls nicht mehr empfohlen wird.

1.4 Primäre Thrombozythämie

Definition/Inzidenz Die Primäre Thrombozythämie (PT) ist eine heterogene Stammzellerkrankung, die vor allem durch eine Erhöhung der Thrombozyten gekennzeichnet ist, welche primär durch die quantitative und qualitative Störung der Megakaryopoese hervorgerufen wird. Die Megakaryozyten sind vermehrt, vergrößert und hyperploid mit hirschgeweihartigen Zellkernen. Typisch ist eine dauerhafte Erhöhung der Thrombozytenwerte auf über 450.000/ μ l³¹. Im Gegensatz

1.4 Primäre Thrombozythämie

zur Polycythaemia vera ist bei der Primären Thrombozythämie die JAK2^{V617F}-Mutation nur etwa bei 50% der Patienten nachweisbar³². Inzidenz-Werte schwanken von 0,21 (Nordisrael) bis 2,4 (USA) pro 100.000 Einwohner^{33,34}. In Deutschland liegen bisher keine epidemiologischen Daten vor.

Ursache Die auslösende Ursache der Primären Thrombozythämie ist unbekannt. Nach epidemiologischen Studien in Italien haben Friseure, Landwirte und Elektriker ein erhöhtes Risiko, an einer PT zu erkranken, möglicherweise ist dies auf den Umgang mit Haarfärbemitteln, Pestiziden und Magnetfeldern zurückzuführen³⁵.

Komplikationen/Symptome Bei Diagnosestellung sind 50-70% der Patienten asymptomatisch. Symptome bzw. Komplikationen einer Primären Thrombozythämie können unter anderem sein: Abgeschlagenheit, Abnahme der Leistungsfähigkeit, Schwindel, Benommenheit, Erythromelalgien, rezidivierende vorübergehende monokuläre Seh-, Gangstörungen, Dysarthrie, Kopfschmerzen, Migräne, Fallneigung, Hemiparesen, Krampfanfälle sowie Schwangerschaftskomplikationen (erhöhte Rate spontaner Aborte und Plazentainfarkte)³¹. Das Risiko einer Thrombose bei Patienten mit Primärer Thrombozythämie beträgt 6,6% pro Patientenjahr im Vergleich zur Kontrollpopulation mit 1,2%³⁶. Es sind im arteriellen System vor allem cerebrale (62%) und kardiale (11%) Thrombosen zu finden, es kommen aber auch distale Gefäßverschlüsse (27%) durch Thromben vor³⁶. Im venösen System sind in absteigender Reihenfolge Thrombophlebitis (43%), Mesenterialinfarkte sowie Milz-Infarkte (29%), eine tiefe Venenthrombose (14%) und cerebrale Infarkte (14%) zu beobachten. Einige Patienten weisen auch ein erhöhtes Risiko für Blutungen (9-14%) auf^{38,39}.

Therapie Die meisten Patienten mit PT erhalten nach Erstdiagnose eine antiaggregierende Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin, 100 mg/Tag) zur Primärprophylaxe⁴⁰. Eine hämorrhagische Diathese stellt eine Kontraindikation dar. Außerdem ist zu beachten, dass Aspirin bei Patienten mit PT leichter als bei anderen Patienten Blutungskomplikationen hervorrufen kann³⁶. Durch ASS kann zwar das Risiko des Auftretens von thromboembolischen Komplikationen gesenkt werden, es ist aber kein vollständiger Schutz erreichbar.

Ab einem Alter von 60 Jahren, nach Thrombosen oder bei steigenden Thrombozytenwerten wird eine zytoreduktive Therapie empfohlen. Es wird nach wie vor kontrovers diskutiert, ab welchem Thrombozytenwert mit einer zytoreduktiven Behandlung begonnen werden soll - 1,0 oder 1,5 Millionen/ μ l. Als Medikamente für eine solche Therapie stehen Hydroxyurea, Anagrelid (Xagrid®, Thromboreductin®) und (pegyliertes) Interferon-alpha zur Verfügung^{38,39,41}.

Langzeitverlauf Bei adäquater Therapie ist bei Patienten mit primärer Thrombozythämie die Lebenserwartung nicht wesentlich eingeschränkt verglichen mit einer gesunden Population³⁰, allerdings kann es durch Gefäßkomplikationen zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität kommen. Des Weiteren ist ein Übergang in eine Myelofibrose oder akute Leukämie (0,5-1%) möglich⁴².

1.4 Primäre Thrombozythämie

Tabelle 1: Gegenüberstellung von Polycythaemia vera und Primärer Thrombozythämie

Die WHO-Diagnose einer Polycythaemia vera wird gestellt, wenn entweder beide Hauptkriterien und ein Nebenkriterium erfüllt sind, oder das erste Hauptkriterium und zwei Nebenkriterien erfüllt sind. Eine PT liegt vor, wenn alle 4 Kriterien erfüllt werden^{1,43}.

CML = chronischen myeloischen Leukämie, cIMF = chronische idiopathische Myelofibrose, MDS= myelodysplastisches Syndrom

	Polycythaemia vera	Primäre Thrombozythämie
Diagnosekriterien	<u>Hauptkriterien:</u> - Hb > 18,5 g/dl (Männer) bzw. 16,5 g/dl (Frauen) - JAK2 ^{V617F} -Mutation bzw. JAK2 Exon 12 Mutation <u>Nebenkriterien:</u> - EPO-Spiegel im Serum < Referenzbereich - Knochenmarkspunktion: gemessen am Patientenalter Hyperzellularität - in vitro Bildung endogener erythroider Kolonien mit Steigerung aller drei Reihen	- Thrombozyten anhaltend > 450.000/μl - Knochenmarkshistologie mit vergrößerten, reifen Megakaryozyten (hirschgeweihartige Kerne) - Ausschluss einer PV, CML, cIMF, MDS - Nachweis der JAK2 ^{V617F} oder MPL-Mutation oder bei fehlendem Nachweis einer JAK2 ^{V617F} -Mutation: kein Hinweis für reaktive Thrombozytose
Mutation	JAK2 ^{V617F} (95%) bzw. JAK2 Exon 12 (5%)	JAK2 ^{V617F} -Mutation (50%)
Komplikationen/Symptome	Thromboembolische, Splenomegalie, aquagener Pruritus, erhöhte Blutungsneigung, Erythromelalgien, u.a.	Thromboembolische, erhöhte Blutungsneigung, TIAs
Langzeitrisiko	Myelofibrose, Leukämien	
Therapie	ASS, Aderlass, HU, Anagrelid, Interferon-alpha	ASS, Anagrelid, HU, Interferon-alpha
Prognose	Gut bei effektiver Prävention der thromboembolischen Ereignisse	

1.5 Hinführung zum Thema

Thromboembolische Ereignisse stellen also die wesentlichste, weil vital bedrohliche, Komplikation der chronisch myeloproliferativen Neoplasien dar. Deshalb dient die Therapie vor allem der primär und sekundär Prävention dieser Komplikation.

Verschiedene Pathomechanismen führen zu diesen Komplikationen: Während sich die häufigeren arteriellen Thromben vor allem aus Thrombozyten zusammensetzen und sich bei hohem Blutfluss formieren, enthalten die venösen Thromben im Gegensatz dazu weniger Thrombozyten, aber mehr Fibrin und eingeschlossene Erythrozyten⁴⁴. Die genaue Kaskade, welche zu einer Thrombose bei CMPN-Patienten führt, ist noch nicht bekannt.

Studien im Tiermodell haben ergeben, dass zwei unterschiedliche Signalwege, die zum Teil parallel aber auch allein arbeiten, zu einer Aktivierung der Thrombozyten und damit zur Bildung eines Thrombus führen (Abbildungen 7 und 8)^{45,46,47,48}. In einem dieser Wege initiiert (freigelegtes) subendothelial gelegenes Kollagen die Aktivierung der Thrombozyten, in den anderen Thrombin (Abbildung 7, aus⁴⁸). Die Bildung von Thrombin wird vom Tissue Factor eingeleitet, einem an der Blutgerinnung beteiligtem Protein. Die Bildung eines Thrombus ist ein dynamischer Prozess, in dem Thrombozyten an den entstehenden Thrombus festwachsen und sich andere wiederum von ihm lösen. Großen Einfluss auf die Thrombusbildung haben Scherkräfte, Flussgeschwindigkeit und

1.5 Hinführung zum Thema

Turbulenzen⁴⁸.

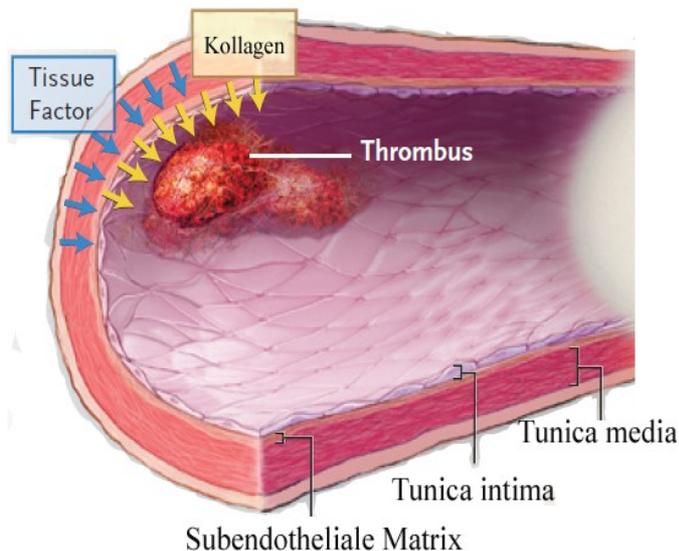


Abbildung 7: Modell der Thrombusbildung

(aus 48)

Thromboembolische Komplikationen bei den CMPN können in jedem Alter, Geschlecht oder bei jeder Thrombozytenzahl auftreten. Während einige Patienten keine thromboembolischen Ereignisse bei hohen Thrombozytenzahlen haben, entwickeln andere Patienten bereits bei gering erhöhten Werten eine Thrombose⁴⁹.

Hydroxyurea wird als zytoreduktives Standardmedikament in der Therapie der Polycythaemia vera verwendet. Es wirkt in hämatopoetischen Stammzellen über die Hemmung der Ribonukleotidreduktase, die Nukleotide in ihre jeweiligen Desoxynukleotide reduziert⁵⁰. Dies führt zu einer Hemmung der DNA-Synthese, wodurch die Produktion von Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten blockiert wird. Unter der Therapie mit Hydroxyurea wurde bei einzelnen Patienten mit Polycythaemia vera in der Vergangenheit extreme periodische Schwankungen der Thrombozyten (und zum Teil auch der Leukozyten) beschrieben^{4,51,52,53}.

Wie oben beschrieben, schwanken die Blutzellen beim Menschen täglich, was als Fluktuation bezeichnet wird. In einzelnen Fällen sind nun allerdings extreme periodische Schwankungen, d.h. Auslenkungen, welche mit einer eindeutigen Frequenz f eine regelmäßige Zyklusdauer aufwiesen, unter Therapie mit Hydroxyurea bei CMPN-Patienten beschrieben worden^{4,51,52,53}. Der erste Teil der hier vorgelegten Arbeit untersucht dieses Phänomen der periodischen Schwankungen der Thrombozyten und zum Teil auch der Leukozyten, was zum einen der Grund für diese Oszillationen ist und zum anderen, ob es bei niedrigen und hohen Thrombozytenzahlen vermehrt zu Thrombosen oder Blutungen kommt.

1.5 Hinführung zum Thema

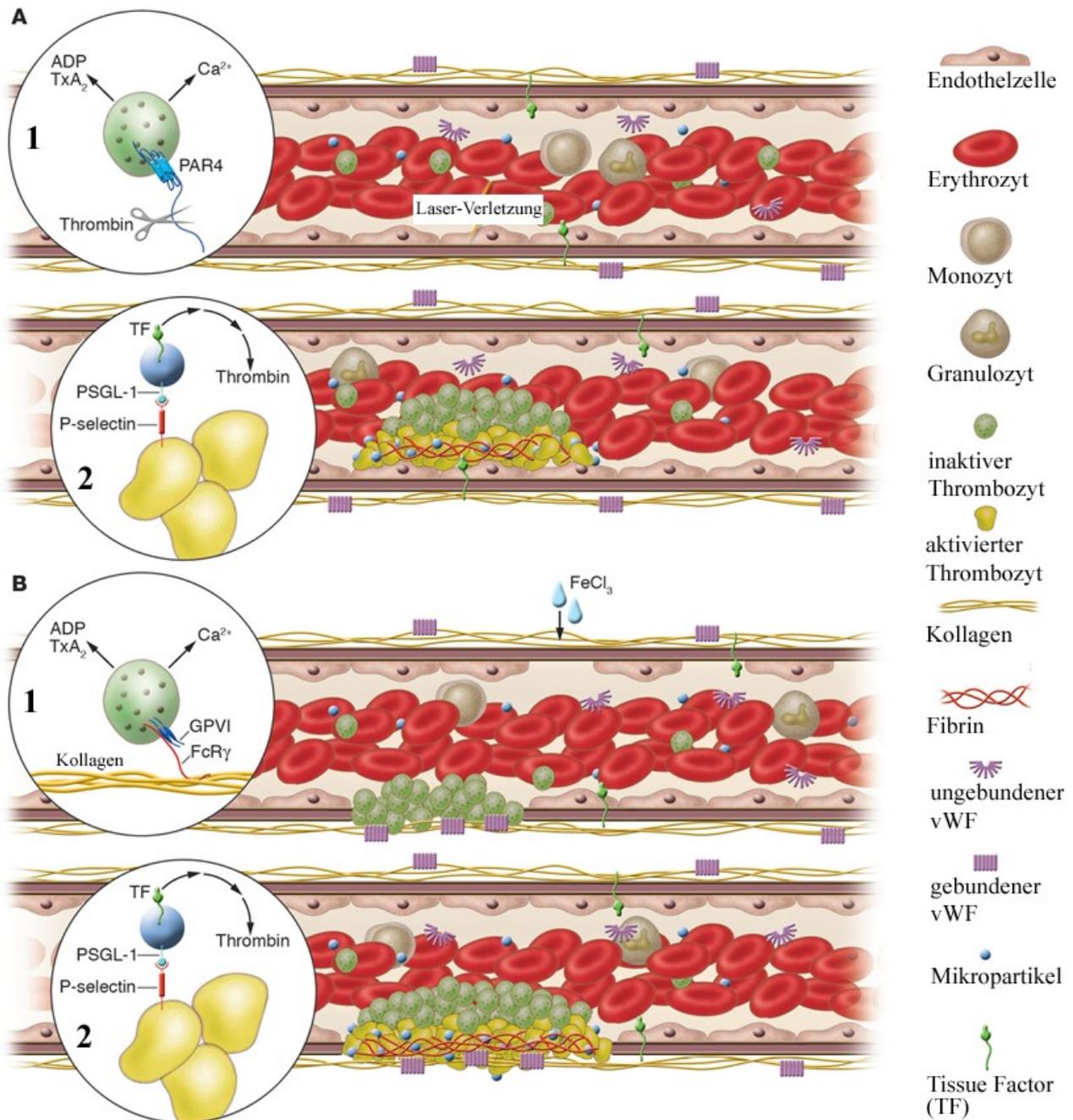


Abbildung 8: Tierexperimentelles Model der Thrombusbildung

Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten und Granulozyten zirkulieren im Blut, während endotheliale Zellen an der Gefäßwand anliegen. Plasmaproteine, wie von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibrinogen und andere Gerinnungsfaktoren sind ebenfalls in der Zirkulation zu finden. **A)** Auf eine Laser induzierte Verletzung der Gefäßwand vermittelt vWF die Interaktion zwischen Thrombozyten und dem Endothel. Tissue Factor (TF) in der Gefäßwand führt zu der Bildung von Thrombin. Thrombin aktiviert (Mäuse)-Thrombozyten durch den PAR4-Rezeptor (A-1). Aktivierte Thrombozyten gehen mit Calcium eine Reaktion ein und führen zu einer Freisetzung von ADP und Thromboxan A₂ (TxA₂), was die Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten und somit die Bildung eines Thrombus beschleunigt. Diese Thrombozyten exprimieren P-Selectin, PSGL-1 exprimierende Leukozyten-Mikropartikel und Tissue Factor akkumulieren im Thrombus durch die Interaktion von P-Selectin mit PSGL-1 (A-2). Die Konzentration von Tissue Factor initiiert die Koagulation, die Bildung von mehr Thrombin und die Vergrößerung des Fibringerinnsels. **B)** An einer oxidativen Verletzung der Gefäßwand durch Eisenchlorid wird das Endothel und somit die subendotheliale Matrix freigelegt. Thrombozyten interagieren mit der Matrix durch GPIIb-V-IX und α_{IIb}β₃ auf der Thrombozytenmembran sowie Kollagen und vWF in der Matrix. An Kollagen bindendes Glykoprotein VI (GPVI) wird für die Thrombozyten Aktivierung benötigt, aktivierte Thrombozyten gehen mit Calcium eine Reaktion ein und führen zu einer Freisetzung von ADP und Thromboxan A₂ (B-1), was die Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten und somit die Bildung eines Thrombus beschleunigt. Diese Thrombozyten exprimieren P-Selectin, PSGL-1 exprimierende Mikropartikel und Tissue Factor akkumulieren im Thrombus durch die Interaktion von P-Selectin mit PSGL-1 (B-2). Die Konzentration von Tissue Factor initiiert die Koagulation, die Bildung von mehr Thrombin und die Vergrößerung des Fibringerinnsels (aus⁴⁷).

1.5 Hinführung zum Thema

Die Herausforderung in der Therapie der chronisch myeloproliferativen Erkrankungen besteht darin, Thrombosen zu verhindern, ohne aber das Risiko für einen Übergang in eine Myelofibrose bzw. akute Leukämie zu erhöhen - es wird gegenwärtig diskutiert, ob Hydroxyurea das Leukämierisiko erhöht. Bisher war es schwierig, das Risiko einer Thrombose bei dieser Patientengruppe durch ex-vivo-Untersuchungen abzuschätzen. Auch bestehen nach wie vor kontroverse Auffassungen über Zeitpunkt und Art der Einleitung einer Therapie. Deswegen erhalten Patienten häufig eine Therapie, die sie nicht benötigen bzw. von der sie möglicherweise einen Schaden erfahren. Wie bereits erwähnt, ist das häufigste Medikament Aspirin zur Primärprophylaxe. Dieses kann bei Patienten mit Primärer Thrombozythämie (und Polycythaemia vera) zu schweren Blutungen führen³⁶. Die Nebenwirkungen von Aspirin sind vielfältig: Ulkusneigung mit (okkulten) Blutungen, Hemmung der Harnsäuresekretion, Nierenschädigung, Schwindel, Kontraktionshemmung des Uterus und „Aspirin-Asthma“⁵⁴. Durch Aspirin kann zwar das Risiko des Auftretens von thromboembolischen Komplikationen gesenkt werden, es ist aber kein vollständiger Schutz erreichbar, da einzelne Patienten auch unter dieser Therapie Thrombosen entwickeln. Auch gilt es zu bedenken, dass die Patienten häufig eine (womöglich unnötige) lebenslange Therapie erhalten, bei der oftmals die Nebenwirkungen der Medikamente schwerwiegender sind als die Krankheit selbst. Durch eine für jeden Patienten individuell ermittelte Neigung zur Thrombusbildung kann evtl. eine Aussage darüber getroffen werden, ob für den einzelnen Patienten eine medikamentöse Therapie überhaupt nötig bzw. ausreichend ist.

Das Abschätzen eines Thromboserisikos stellt die größte Herausforderung für die behandelten Ärzte dar. Derzeit sind die methodischen Möglichkeiten, das Risiko des Auftretens einer Thrombose abzuschätzen, begrenzt. Höheres Alter (> 60 Jahre), Adipositas, Schwangerschaft und Postpartalperiode, Therapie mit oder Blockade von Sexualhormonen (Kontrazeptiva und Hormonersatztherapien), Operationen, Immobilität, aktive Karzinome, systemische Infektionen sowie bereits stattgefundene thromboembolische Komplikationen werden als dispositionelle Risikofaktoren herangezogen, aber als „der“ Marker sind sie nicht tauglich⁵⁵. Laborchemisch wird des Weiteren eine Thrombophiliediagnostik durchgeführt, um angeborene oder erworbene Hämostasedefekte wie zum Beispiel das Antiphospholipidsyndrom, Antithrombin 3-, Protein-C-, Protein-S-Mangel oder eine APC-Resistenz zu erkennen⁵⁶.

Einfache Thrombozytenfunktionstests sind die standardisiert gemessene Blutungszeit nach Duke bzw. nach Ivy oder der Rumpel-Leede-Test^{57,58}. Allerdings wird diese in-vivo-Blutungszeit heute nicht mehr empfohlen, da sie zwar physiologische Ergebnisse liefert, aber die Nachteile durch Mangel an Sensitivität und Unspezifität, sowie eine hohe Variabilität überwiegen^{57,59} (Tabelle 2).

Es wird seit langem diskutiert, ob eine Funktionsstörung der Thrombozyten zu dem erhöhten Risiko eines thromboembolischen Ereignisses der Patienten mit einer CMPN beiträgt⁶⁰. Daher wurde die Funktion der Thrombozyten in den letzten Jahren verstärkt untersucht, indem unterschiedliche Techniken der Aggregometrie oder anderer Methoden, wie zum Beispiel der Platelet Function Analyzer (PFA-100), in Patienten mit einer CMPN untersucht wurden, um die Patienten zu identifizieren, die über ein erhöhtes Risiko für ein Thrombose verfügen^{61,62,63,64,65}.

Ein Thrombozytenfunktionstest ist der PFA-100, bei dem eine kollagenbeschichtete Membran das geschädigte Endothel imitiert⁶⁶. In eine Messzelle wird Citratblut mit hohen Scherkräften durch eine Öffnung in der Membran angesaugt, wobei die Membran zusätzlich mit den Stimulatoren ADP oder Epinephrin (Adrenalin) beschichtet ist. Als Maß für die Thrombozytenfunktion gilt die Zeit bis zum Verschluss der Öffnung durch den sich bildenden Thrombozytenthrombus, wobei die maximale

1.5 Hinführung zum Thema

Messzeit sich auf 300 Sekunden beläuft. Beeinflussbar ist das Ergebnis der Messung beispielsweise durch erniedrigte Werte des von-Willebrand-Faktors bzw. die Einnahme von Aspirin⁶⁷. Der PFA-100 ist ein weltweit verfügbarer, nützlicher diagnostischer Test, der sich in der in-vivo Thrombozytenfunktionsdiagnostik etabliert hat⁶⁸. Er kann für eine Vielzahl von klinischen Situationen angewendet werden: Störungen des von-Willebrand-Faktors, erblich bedingte oder erworbene Krankheiten der Thrombozytenfunktion, sowie die Kontrolle der Wirksamkeit von Medikamenten wie zum Beispiel Aspirin^{69,70,71,72}. Allerdings ist noch nicht vollständig geklärt, wie sich die Aussagekraft des PFA-100 mit Thrombozytenwerten von $> 500.000/\mu\text{l}$ oder einem Hämatokrit von $> 50\%$ verhält, welche Charakteristika der CMPN sind⁶².

Eine neuere Methode ist die Messung der Thrombozytenaggregation, die in zwei prinzipielle Methoden unterteilt werden kann: die Impedanzaggregometrie und die Licht-Transmissions-Aggregometrie (LTA)^{73,74,75,76}. Die Impedanzaggregometrie (Multiple Electrode Aggregometry, Abk. MEA, im Handel verfügbare Geräte Chrono-log® Aggregometer, Muiltplate®) basiert auf den Methoden der Impedanzaggregometrie nach Cardinal, einem 1979 vorgestellten Verfahren zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik im Vollblut^{77,78}. Kürzlich hat eine Arbeitsgruppe das Verfahren der MEA auf Patienten mit CMPN angewendet⁶⁴. Zur Aggregation wurden die Agonisten Arachidonsäure, ADP sowie TRAP-6 (Thrombin Receptor Activating Peptide) eingesetzt.

Die Thrombozytenaggregation ist in mehreren Studien für die Begutachtung von CMPN-Patienten eingesetzt worden^{61,79}. Auch wurde die Aggregometrie verwendet, die Wirksamkeit von Aspirin zu überprüfen^{80,81}. Obwohl diese Methode vergleichsweise alt und weit verbreitet ist, hat sie doch mehrere Nachteile, die zu einem großen Teil aus einer fehlenden Standardisierung stammen⁸². Verschiedene ADP-Agonisten führen zu unterschiedlichen Ergebnissen, und unterschiedliches Kollagen führen zu unterschiedlichen Antworten der Aggregation.

Eine weitere Methode zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik ist die Durchflusszytometrie, welche zum Nachweis eines hereditären Defektes und von immunologisch vermittelten Thrombozytopenien sowie durch die Bestimmung von retikulierten Thrombozyten für eine Differenzierung zwischen einer Störung der Thrombozytenbildung und einer verbrauchsbedingten Thrombozytopenie verwendet werden kann^{59,83}. Auch möglich ist eine Bestimmung des Effekts von Clopidogrel auf die Thrombozyten⁸⁴. Vorteil der Durchflusszytometrie ist die geringe Menge an benötigtem Blut (5 μl) sowie die Unabhängigkeit vom Thrombozytenwert, was den Einsatz auch bei Thrombozytopenien ermöglicht⁸⁵. Nachteile sind der hohe Kostenfaktor für Material, die zwingend notwendig schnelle Verarbeitung der Blutprobe und das Fehlen einer Kontinuität zwischen den einzelnen Modellen, die für die Durchflusszytometrie eingesetzt werden⁸³.

Die Suche nach dem einen oder mehreren Risikofaktoren, welche eine therapierelevante Aussagekraft haben, ist daher noch nicht beendet. Auch wurde bis dato kein wirklich praktikabler Test gefunden, der Risikopatienten klar identifiziert⁸⁷. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich deshalb mit einem neuen Testgerät: in einem Pilotprojekt mit kleiner Fallzahl wurden Patienten mit Primärer Thrombozythämie unter Aspirin-Dauertherapie mit einem Prototyp (Real Time Thrombosis Profiler [RTTP]) untersucht. Die Firma Portola Pharmaceuticals Inc. in San Francisco (USA) hat dieses Gerät entwickelt, welches dort ursprünglich zur Testung von Stoffen, die die Bildung von Thromben beeinflussen können, verwendet wird. Für die vorliegende Arbeit wurde der RTTP erstmals zur klinischen Anwendung an Patienten zur Verfügung gestellt.

1.5 Hinführung zum Thema

Tabelle 2: Messsysteme zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Name	Testsystem	Handelsname (Auswahl)	Blutprobe	Bsp. für verwendete Agonisten	Prinzip
Licht-Transmissions-Aggregometrie (LTA) ⁸⁶	„Born-Aggregation“	Behring Coagulation Timer	plättchenreiches Plasma	Arachidonsäure, ADP	Photometrische Messung der Veränderung der Lichttransmission nach Zusatz eines Thrombozytenaktivators.
Vollblutaggregometrie ^{73,77}	Rapid Platelet Function Analyser	VerifyNow™	Zitratantikoaguliertes Vollblut oder Heparin	Arachidonsäure (ASS-Messzelle), ADP und Prostaglandin E1 (Clopidogrel-Messzelle)	Aktivierte Thrombozyten binden an fibrinogenbeschichtete Partikel
	Impedanzaggregometrie (=MEA)	Chrono-log® Aggregometer, Multiplate®	Hirudin antikoaguliertes Vollblut	ADP, Collagen, Epinephrin	Messung des elektronischen Widerstands zwischen Elektroden, die in Vollblut eingebracht werden.
In-vitro Blutungszeit ⁶⁶	PFA-100		Zitratantikoaguliertes Vollblut	ADP oder Epinephrin	Eine Kollagenbeschichtete Membran imitiert das geschädigte Endothel
In-vivo Blutungszeit ^{57,58}	Test nach Duke	/	in-vivo	keine	Eine Wunde wird mit einer Lanzette gesetzt, alle 15 sek. werden die Blutropfen abgesaugt. Die Blutungszeit gibt die Zeit zwischen dem Stich und dem Sistieren der Blutung in Minuten an.
	Rumpel-Leede-Test	/	in-vivo	keine	Eine Blutdruckmanschette wird 10 mmHg über dem diastolischen Druck aufgepumpt, diese Stauung wird über 5 min gehalten. Test ist positiv, wenn unterhalb der Stauung vermehrt Petechien auftreten
Durchflusszytometrische Thrombozytenanalyse ⁸³	Flusszytometrie		Zitratantikoaguliertes Vollblut, plättchenreiches Plasma	ADP, Arachidonsäure, Kollagen, Epinephrin	Emissionen von optischen Signalen. Zusätzlich kann man mit gestreutem Licht Fluoreszenzen messen (monoklonale Antikörper)

Zur Durchführung der Untersuchung mittels des RTTP wird eine abgenommene Blutprobe mit einem Antikoagulans sowie einem Farbstoff zur Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten versehen. Anschließend wird das so präparierte Blut durch eine Glaskapillare geleitet und mit einer Kamera aufgezeichnet, ob bzw. wie schnell sich ein Thrombus bildet. Großer Vorteil des RTTP ist die Möglichkeit, unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten einzustellen, womit arterielle und venöse Strömungsbedingungen simuliert werden können.

1.6 Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Periodische Thrombozyten- und Leukozytenfluktuationen unter HU- Therapie:
 - a) Wie häufig ist dieses Phänomen in einer deutschen Patientenkohorte?
 - b) Wie können die Fluktuationen erklärt werden?
 - c) Treten während dieser Schwankungen thromboembolische und hämorrhagische Komplikationen auf?

2. Klinische Anwendbarkeit eines Thrombusbildungsanalysegerätes (RTTP) zur Abschätzung des Thromboserisikos:
 - a) Welchen Einfluss hat Aspirin auf die Thrombusbildung von PT-Patienten im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe?
 - b) Beeinflusst die JAK2^{V617F}-Mutation bei PT-Patienten die Thrombusbildung?
 - c) Welchen Einfluss haben Thrombozyten-, Leukozyten- und Hämatokritwert auf die Thrombusbildung?

Teil 1: Hydroxyurea-induzierte Oszillationen bei Patienten mit Polycythaemia vera

1. Material und Methoden

1.1 Patienten

In der 310 Patienten umfassenden CMPN-Datenbank der Hämatologisch-Onkologischen Schwerpunktpraxis (Prof. Dr. med. Petro E. Petrides, München, Stand März 2008) wurde nach Patienten mit Polycythaemia vera und Primärer Thrombozythämie gesucht, bei denen eine periodische Regelmäßigkeit der Thrombozytenwerte und anderer Blutzellreihen auffällig waren. Diese Datenbank beinhaltet sowohl Patienten, welche in diesem Referenzzentrum behandelt werden, oder sich zur Einholung einer Zweitmeinung vorstellten.

Die PV bzw. PT wurde entweder nach den Kriterien der Polycythaemia Vera Study Group (PVSG) oder nach den Kriterien der WHO von 2001 bzw. 2008 diagnostiziert, abhängig davon, wann die Erstdiagnose gestellt worden war^{43,88}. Nach der Entdeckung der JAK2^{V617F}-Mutation wurden alle Patienten auf diese Mutation hin untersucht.

Bei den Patienten, die eine periodische Regelmäßigkeit der Thrombozyten aufwiesen, wurden folgende Parameter untersucht: niedrigster und höchster Thrombozytenwert, CMPN der Patienten (PV oder PT), Therapie (Dosis, Dauer der Einnahme, unterschiedliche Handelsnamen). Des Weiteren wurden die anderen Blutzellreihen, also niedrigster und höchster Leukozyten- und Erythrozytenwert, durchschnittliche Leukozyten- und Erythrozytenzahl, sowie Hämoglobin-, Hämatokrit- und MCV-Wert analysiert. Ebenfalls wurden Alter, Geschlecht und Status der JAK2^{V617F}-Mutation, klinische Komplikationen wie Blutungen und thromboembolische Ereignisse dokumentiert.

1.2 Lomb-Periodogramm

Um die Fluktuationen besser zu verstehen, wurde eine mathematische Analyse der Periodizität durchgeführt, mit der das Frequenzspektrum nach dem Lomb-Periodogramm berechnet wird. Das Lomb-Periodogramm ist eine spezielle Version der Fourier-Spektral-Analyse, die dazu benutzt werden kann, ungleichmäßig gesammelte Daten zu analysieren. Auch kann die Lombanalyse dazu verwendet werden, Oszillationen mit niedriger Amplitude zu entdecken, welche visuell sonst nicht erkennbar sind. Diese Technik hat ihren Ursprung in der Astronomie, wo sie für die Spektral-Analyse von Pulsaren verwendet wird⁸⁹. Für die Untersuchung der Fluktuationen von Blutzellen wurde sie von Bennett und Grunwald eingeführt⁴. Für die Berechnung durch das Lomb-Periodogramm wurde für diese Arbeit ein auf PERL (Practical Extraction and Report Language) basiertes Auswertungstool programmiert. Dieses Auswertungstool hat alle Blutbilder der Patienten, welche in der institutseigenen Datenbank vorhanden waren, auf Oszillationen mittels dem Lomb-Periodogramm analysiert. Der Quelltext des Lomb-Periodogramm stammt von George B. Moody und war unter der GNU General Public License frei erhältlich - Quelltext siehe Anhang^{90,91}.

1.2 Lomb-Periodogramm

Wo immer es möglich war, wurde die Periodizität vor, während und nach der Einnahme von Hydroxyurea und auch nach einem Wechsel der Therapie auf andere Medikamente untersucht.

2. Ergebnisse

2.1 Merkmale der Patienten

Aus der Gruppe von 310 Patienten wurden zwölf Patienten identifiziert (7w/5m), die starke Schwankungen der Thrombozyten aufwiesen. Die Patienten hatten alle unterschiedliche Amplituden (Tabelle 3). Bei all diesen Patienten war eine Polycythaemia vera diagnostiziert worden, bei keinem Patienten mit o.g. Schwankungen konnte eine Primäre Thrombozythämie nachgewiesen werden. Alle Patienten wurden mit HU behandelt. Alle zwölf Patienten waren positiv auf die JAK2^{V617F}-Mutation getestet worden. Bei fünf dieser zwölf Patienten konnte ebenfalls Schwankungen der Leukozyten beobachtet werden.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose betrug das mittlere Alter 54,5 Jahre (22-73), mittlerer Hämoglobinwert 17,4g/dl (12,2-22,1), mittlerer Hämatokrit 54,2 (44,1-66,7), mittlere Erythrozytenzahl $7,3 \times 10^{12}/l$ (5,8-9,9), mittlere Thrombozytenzahl $519 \times 10^9/l$ (281-1125), und mittlere Leukozytenzahl $13,3 \times 10^9/l$ (7,0-28,0). Aus den Patientenakten ergab sich kein Hinweis darauf, dass die Patienten nicht wie verordnet ihre Medikation einnahmen.

Tabelle 3: Die 12 identifizierten Patienten

Patient	Geschlecht	Erstdiagnose (ED)	Alter bei ED	Thrombozyten		Leukozyten	
				Niedrigster Wert	Höchster Wert	Niedrigster Wert	Höchster Wert
		[Jahr]	[Jahre]	[x10 ⁹ /l]		[x10 ⁹ /l]	
1	w	2001	22	21	1417	3,1	14,0
2	w	2005	53	68	1690	6,9	33,3
3	w	2001	73	71	1145	3,1	29,1
4	w	1996	52	104	1420	1,9	6,9
5	m	1998	65	46	1122	4,5	38,2
6	m	1999	55	116	598	10,5	21,7
7	w	2003	42	136	1385	8,6	21,6
8	m	1990	44	27	4900	4,3	30,1
9	m	2001	61	189	1162	5,4	10,2
10	m	2003	60	21	1495	4,3	12,4
11	w	2006	58	140	530	6,5	9,4
12	w	2005	54	116	989	5,5	16,4

2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse

Die Thrombozyten fluktuierten zwischen einem Minimum von $21 \times 10^9/l$ und einem Maximum von $4900 \times 10^9/l$, die Leukozyten zwischen einem Minimum von $1,9 \times 10^9/l$ und einem Maximum von $38,2 \times 10^9/l$ (Tabelle 3).

2.2.1 Analyse unter HU-Therapie

Die Fluktuationen der Blutzellen wurden zunächst auf Oszillationen durch das Lomb-Periodogramm während der Therapie mit Hydroxyurea analysiert. Tabelle 4 zeigt diese Analyse für die Thrombozyten und Leukozyten in tabellarisierter Form, Tabelle 5 in graphischer Darstellung. Tabelle 6 zeigt die Analyse des Hämatokrits und des Hämoglobinwertes und Tabelle 7 die des Erythrozytenwertes und des MCV.

In Deutschland sind zwei verschiedene Hydroxyurea-Medikamente zugelassen: Syrea® (Medac, Wedel) und Litalir® (BMS, München) zugelassen. Unter der Therapie mit beiden Präparaten wurden die Oszillationen festgestellt - Patienten 1,3,4,6,10 nahmen Litalir®, die restlichen Syrea® ein. Die tägliche Dosis von Hydroxyurea variierte von 0,5-3,5 g/Tag.

In der großen Mehrzahl der zwölf Patienten begannen die Oszillationen unmittelbar nach der Einnahme von Hydroxyurea begannen (alle Patienten bis auf eins und acht). Bei Patient 1 begannen die Oszillationen der Thrombozyten und Leukozyten erst nach einer Verzögerung von zwölf Monaten nach Einnahme von Hydroxyurea. Bei Patient 8 traten die Oszillationen nach sechsjähriger HU-Einnahme erst nach einer Splenektomie auf.

Während der Dauer der Oszillationen (25,5 Patientenjahre) wurden keine thromboembolische oder Blutungen beobachtet.

2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse

Tabelle 4: Lomb-Analyse der Thrombozyten und Leukozyten unter Therapie mit HU

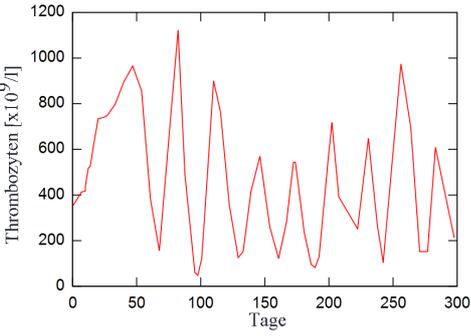
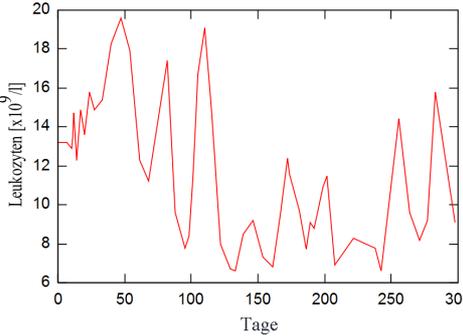
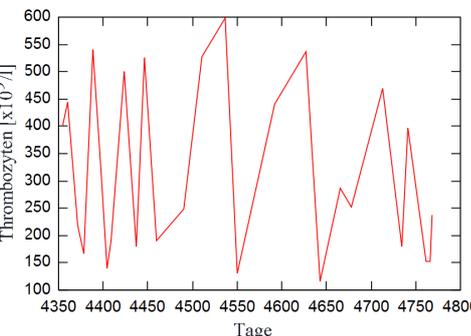
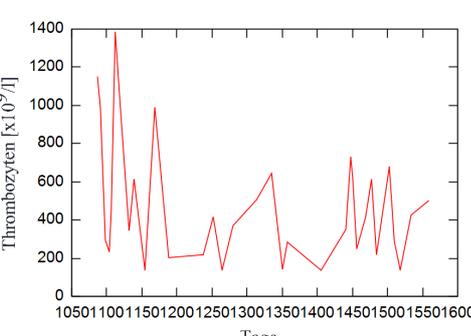
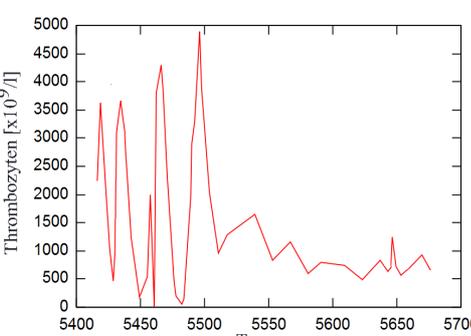
Patient	Thrombozyten				Leukozyten			
	Niedrigster Wert	Höchster Wert	Haupt-Frequenz	Zykluslänge	Niedrigster Wert	Höchster Wert	Haupt-Frequenz	Zykluslänge
	[x10 ⁹ /l]		[1/Tage]	[Tage]	[x10 ⁹ /l]		[1/Tage]	[Tage]
1	21	1417	0,040000	28	3,1	14,0	0,037900	26
2	68	1690	0,036885	27	6,9	33,3	0,037568	27
3	71	1145	0,033505	29	3,1	29,1	0,000271	3686
4	104	1420	0,034637	29	1,9	6,9	0,034637	29
5	46	1122	0,033557	30	4,5	38,2	0,034072	29
6	116	598	0,033293	30	10,5	21,7	0,007630	130
7	136	1385	0,035941	28	8,6	21,6	0,001586	630.67
8	27	4900	0,031746	31	4,3	30,1	0,023810	42
9	189	1162	0,035354	28	5,4	10,2	0,027778	36
10	21	1495	0,034351	29	4,3	12,4	0,034733	28
11	140	530	0,036260	28	6,5	9,4	0,007634	131
12	116	989	0,037634	27	5,5	16,4	0,005376	18

2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse

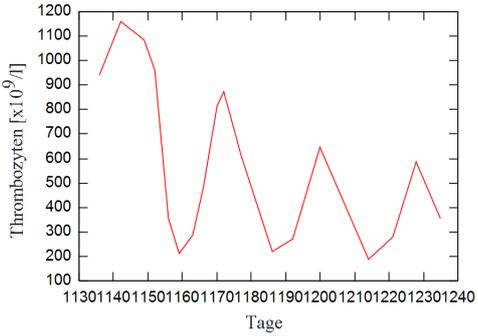
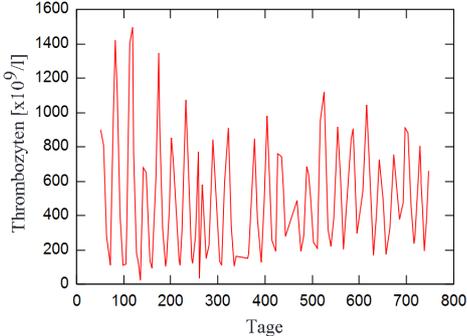
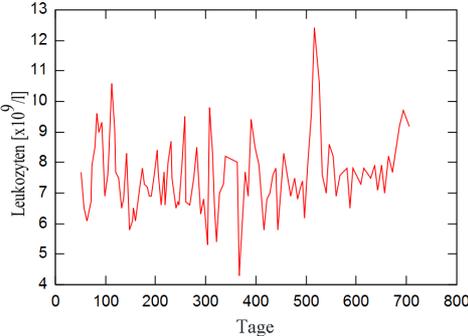
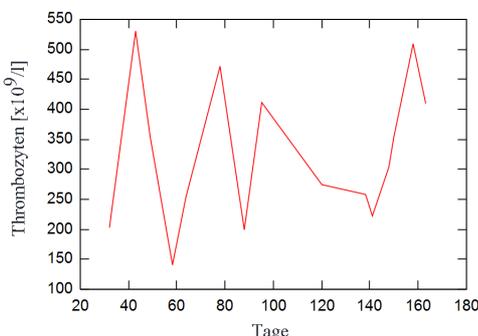
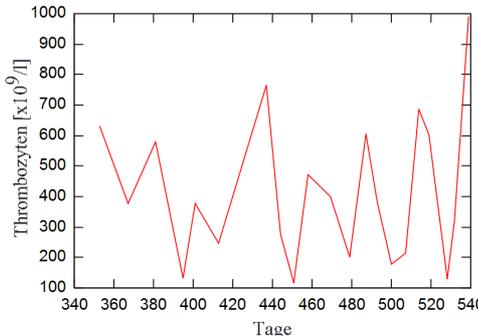
Tabelle 5: Graphische Darstellung der Oszillationen unter HU-Therapie

Patient	Thrombozyten	Leukozyten
1		
2		
3		Keine Oszillationen
4		

2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse

5		
6		Keine Oszillationen
7		Keine Oszillationen
8		Keine Oszillationen

2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse

<p>9</p>		<p>Keine Oszillationen</p>
<p>10</p>		
<p>11</p>		<p>Keine Oszillationen</p>
<p>12</p>		<p>Keine Oszillationen</p>

2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse

Tabelle 6: Lomb-Analyse des Hämatokrits und des Hämoglobinwertes unter HU-Therapie

n.v. = nicht verfügbar

Patient	Hämatokrit				Hämoglobin			
	Niedrigster Wert	Höchster Wert	Haupt-Frequenz	Zykluslänge	Niedrigster Wert	Höchster Wert	Haupt-Frequenz	Zykluslänge
	[%]		[1/Tage]	[Tage]	[g/dl]		[1/Tage]	[Tage]
1	26,9	44,5	0,001043	958,66	8,60	14,20	0,001043	958,66
2	30,0	64,5	0,000273	3660,00	12,40	20,30	0,000455	2196,02
3	27,0	50,0	0,001357	736,80	9,80	15,30	0,001222	818,67
4	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	11,10	17,50	0,000544	1837,60
5	39,2	62,0	0,003454	1375,33	12,70	18,70	0,000787	1269,54
6	44,9	51,2	0,000173	5777,34	11,90	17,20	0,002077	481,45
7	44,0	51,0	0,007400	135,14	4,10	14,20	0,001586	630,67
8	25,7	60,0	0,034211	29,23	8,20	13,50	0,001316	760,00
9	38,0	45,0	0,012626	79,20	11,50	13,20	0,010101	99,00
10	19,2	54,6	0,000668	1497,00	10,50	17,60	0,000932	1073,00
11	28,2	54,3	0,000770	1298,00	11,50	15,70	0,006772	147,66
12	31,9	49,0	0,004952	201,94	6,90	10,40	0,028226	35,43

Tabelle 7: Lomb-Analyse des Erythrozytenwertes und des MCV unter HU-Therapie

n.v. = nicht verfügbar

Patient	Erythrozyten				MCV			
	Niedrigster Wert	Höchster Wert	Haupt-Frequenz	Zykluslänge	Niedrigster Wert	Höchster Wert	Haupt-Frequenz	Zykluslänge
	[x10 ¹² /l]		[1/Tage]	[Tage]	[µm ³]		[1/Tage]	[Tage]
1	3,2	7,6	0,001055	948,0	69,0	96,0	0,000348	2876,00
2	8,5	18,5	0,000000	1155,8	48,3	94,5	0,000591	1689,23
3	5,0	7,2	0,000000	460,5	58,0	74,0	0,003676	272,00
4	2,4	13,3	0,000000	9188,0	42,0	119,0	0,000108	9187,97
5	4,5	9,2	0,000000	1375,3	44,3	103,0	0,000485	2063,00
6	5,3	8,3	0,000000	3466,4	85,3	98,7	0,000362	2761,60
7	4,3	7,7	0,003700	270,3	82,0	90,8	0,009091	110,00
8	2,5	3,9	0,002632	380,0	93,0	103,4	0,001316	760,00
9	5,3	6,7	0,123038	396,0	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse

10	3,5	5,2	0,000932	1073,0	81,0	104,7	0,000668	1497,00
11	3,4	7,2	0,000770	1298,0	65,0	91,5	0,108594	92,09
12	3,1	5,5	0,140843	201,9	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

2.2.2 Analyse nach Absetzen der HU-Therapie

Anschließend wurde die Lomb-Analyse bei neun Patienten einen Monat nach Beendigung der Therapie mit Hydroxyurea durchgeführt. Drei Patienten waren zum Zeitpunkt der Therapie immer noch unter Therapie mit Hydroxyurea und konnten somit nicht weiter analysiert werden (Patienten 2,4 und 7). Für alle übrigen Patienten wurde das Lomb-Periodogramm für die Thrombozyten und Leukozyten für den Zeitabschnitt nach Absetzen der Medikation mit Hydroxyurea durchgeführt (Tabelle 8 zeigt die Analyse in tabellarisierter Form, Tabelle 9 die graphische Darstellung).

In 7 von 9 Patienten führte eine Beendigung der Therapie mit Hydroxyurea auch zu einem Ende der Oszillationen, welches nach einem Medikamentenwechsel zu Anagrelid (Patienten 1, 3, 10 und 12) oder Myeleran (Patienten 5 und 8) bzw. komplettes Absetzen der myelosuppressiven Therapie (Patient 6) zu sehen war. Die Oszillationen der Patienten 9 und 11 verschwanden langsam trotz weitergeführter Therapie mit Hydroxyurea. Die Zeit bis zum kompletten Verschwinden der Oszillationen kann mehrere Monate betragen, wie Patient 1 zeigt: auch nach dem Wechsel zu Anagrelid waren die Oszillationen erst nach neun Monaten nicht mehr nachzuweisen, wenn auch stets mit einer kleineren Amplitude als unter Therapie mit Hydroxyurea.

Tabelle 8: Lomb-Analyse der Thrombozyten und Leukozyten nach Absetzen der HU-Therapie

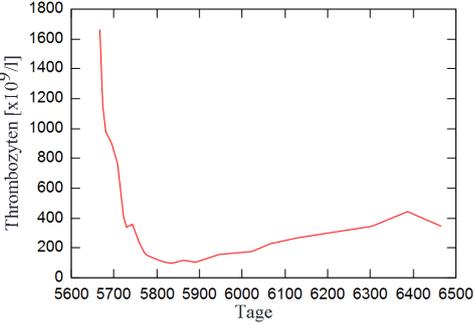
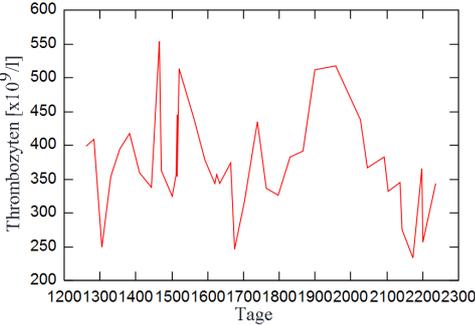
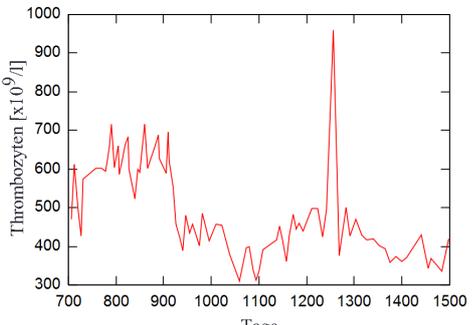
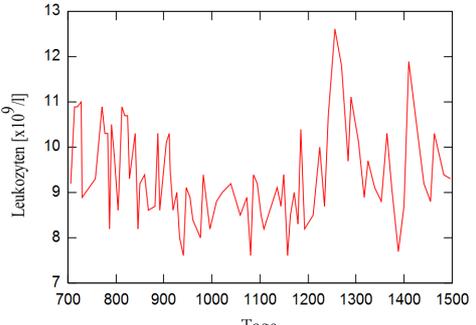
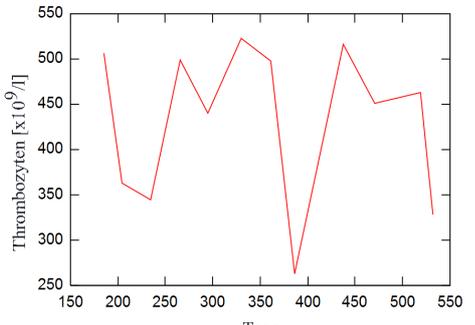
Patient	Thrombozyten				Leukozyten			
	Niedrigster Wert	Höchster Wert	Haupt-Frequenz	Zykluslänge	Niedrigster Wert	Höchster Wert	Haupt-Frequenz	Zykluslänge
	[x10 ⁹ /l]		[1/Tage]	[Tage]	[x10 ⁹ /l]		[1/Tage]	[Tage]
1	47	0	0,000174	5760,00	4,8	35,9	0,000174	0
2	Weiterhin Therapie mit Hydroxyurea mit Oszillationen							
3	52	587	0,001145	873,60	9,0	28,0	0,000237	4228,01
4	Weiterhin Therapie mit Hydroxyurea mit Oszillationen							
5	54	740	0,000281	3562,66	4,5	38,2	0,000108	9227,99
6	238	1180	0,000185	5405,99	15,1	44,5	0,000010	0
7	Weiterhin Therapie mit Hydroxyurea mit Oszillationen							
8	100	441	0,001357	737,00	6,6	17,7	0,001357	737
9	233	554	0,002053	487,00	5,0	8,4	0,016427	60,88
10	311	959	0,002528	395,50	7,6	12,6	0,001580	632,8
11	263	523	0,012248	81,65	7,1	9,2	0,002882	347
12	656	967	0,007709	129,71	13,2	19,6	0,012115	82,55

2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse

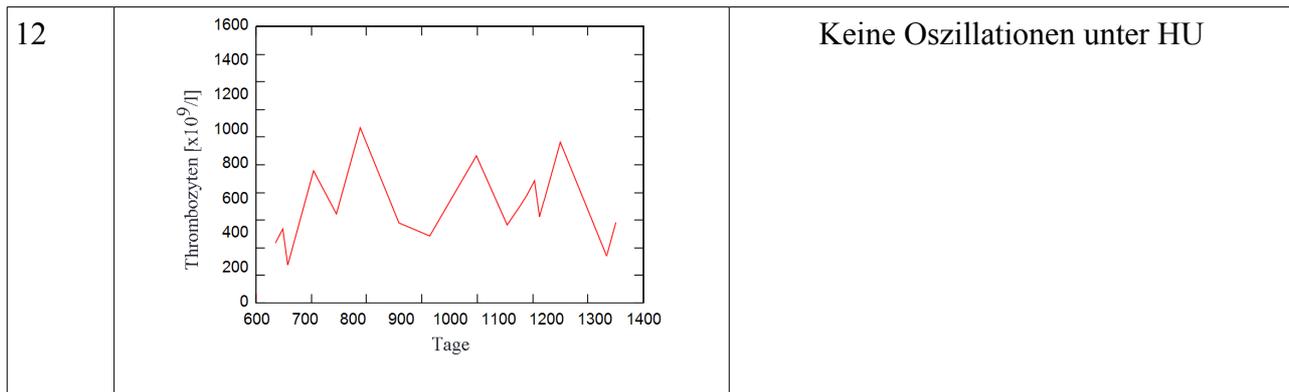
Tabelle 9: Graphische Darstellung der Fluktuationen nach Absetzen der HU-Therapie

Patient	Thrombozyten	Leukozyten
1		
2	Weiterhin Oszillationen	
3		Keine Oszillationen unter HU
4	Weiterhin Oszillationen	
5		
6		Keine Oszillationen unter HU

2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse

7	Weiterhin Oszillationen	
8		Keine Oszillationen unter HU
9		Keine Oszillationen unter HU
10		
11		Keine Oszillationen unter HU

2.2 Analyse der Patienten durch die Lomb-Analyse



2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus einer Gruppe von 310 Patienten wurden 12 Patienten identifiziert, bei denen Oszillationen der Thrombozyten nachgewiesen werden konnten. Alle 12 Patienten hatten eine JAK2^{V617F}-positive Polycythaemia vera. Die durchschnittliche Zyklusdauer war 28,6 Tage (27-30). Von diesen 12 Patienten hatten zusätzlich 5 Patienten ebenfalls Oszillationen der Leukozyten mit einer durchschnittlichen Zyklusdauer von 27,8 Tagen (26-29). Keine Oszillationen wurden nachgewiesen für Hämatokrit-, Hämoglobin-, Erythrozyten- und MCV-Wert. Die Amplitude der Thrombozyten und Leukozyten variierte bei jedem Patienten, wie auch von Patient zu Patient.

Bei zehn der zwölf Patienten begannen die Oszillationen unmittelbar nach der Einnahme von Hydroxyurea. Bei sieben von neun Patienten verschwanden die Oszillationen nach dem Ende der Einnahme von Hydroxyurea, wobei dies bei einem Patienten erst nach zwölf Monaten zu beobachten war.

Bei sieben von neun Patienten führte eine Beendigung der Therapie mit Hydroxyurea (durch Medikamentenwechsel zu Anagrelid oder Myleran bzw. komplettes Absetzen der myelosuppressiven Therapie) auch zu einem Verschwinden der Oszillationen. Aber auch hier gibt es Ausnahmen: bei zwei Patienten verschwanden die Oszillationen langsam trotz weitergeführter Therapie mit Hydroxyurea. Die Oszillationen traten unabhängig vom Herstellerpräparat auf.

Die Patienten wurden über insgesamt 76 Patientenjahre beobachtet. Die durchschnittliche Beobachtungszeit betrug 84 Monate (18-125), von denen 20 Jahre unter Medikation mit Hydroxyurea zu verzeichnen sind. Die mittlere Einnahmezeit von Hydroxyurea betrug 19,5 Monate (4-120).

Während der Dauer der Oszillationen (25,5 Patientenjahre) wurden keine thromboembolische oder Blutungen beobachtet. Die tägliche Dosis von Hydroxyurea variierte von 0,5-3,5 g/Tag.

Tabelle 10 fasst die Ergebnisse zusammen.

2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 10: Übersicht über alle 12 oszillierenden Patienten

Alle Patienten waren positiv auf die JAK2^{V617F}-Mutation getestet worden; Männliche Patienten: 5,6,8,9,10; weibliche Patienten 1-4,7,11-12. Patienten 1,3,4,6,10 nahmen Litalir®, die anderen Syrea®. Mathematische Analyse durch das Lomb-Periodogramm der Thrombozyten und Leukozyten. Ebenfalls gezeigt werden Beginn, Ende und Dauer der Oszillationen, ebenso Dauer der HU-Einnahme, Dosis und totale Beobachtungsdauer.

Patient	PLT-Zyklus	WBC-Zyklus	Beginn der Oszillationen	Ende der Oszillationen durch	Dauer der HU- Einnahme	Dauer der Oszillationen	HU Dosis	Totale Beobachtungsdauer
	[Tage]	[Tage]			[Monate]	[Monate]	[g/Tag]	[Monate]
1	28	26	nach HU Einnahme mit 12monatiger Verzögerung	Anagrelid nach 9monatiger Verzögerung	36	23	0,5–2,0	101
2	27	27	Sofort nach HU Einnahme	Weiterhin Oszillationen	40	40	1,0–2,0	48
3	29		Sofort nach HU Einnahme	Anagrelid	4	4	1,0–2,0	96
4	30	29	Sofort nach HU Einnahme	Weiterhin Oszillationen	120	120	1,0–2,0	125
5	30	29	Sofort nach HU Einnahme	Busulphan	10	10	0,5–3,5	120
6	30		Sofort nach HU Einnahme	Ende der HU Therapie	15	15	1,0–2,0	96
7	27		Sofort nach HU Einnahme	Weiterhin Oszillationen	48	48	1,0–2,0	48
8	30		Nach Splenektomie	Busulphan	8	8	1,0–2,0	108
9	28		Sofort nach HU Einnahme	Einen zusätzlichen Aderlass	21	4	0,5–1,0	72
10	29	28	Sofort nach HU Einnahme	Anagrelid	21	21	1,0–2,0	48
11	28		Sofort nach HU Einnahme	Ohne erkennbaren Grund	18	6	1,0	18
12	27		Sofort nach HU Einnahme	Anagrelid	7	7	0,5–1,0	36

3. Diskussion

Die systematische Analyse einer Patientendatei hat zur Identifikation von 12 Patienten mit Polycythaemia vera geführt, welche unter Therapie mit Hydroxyurea Oszillationen der Thrombozyten und zum Teil der Leukozyten aufgewiesen haben. Damit handelt es sich um die größte im internationalen Schrifttum publizierte Kohorte (Tabelle 11)⁹². Die hohe Zahl von identifizierten Patienten mit Oszillationen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass eine hohe Anzahl von Blutbildern zur Verfügung stand. Allerdings sind nicht nur eine hohe Anzahl, sondern auch irreguläre Abstände erforderlich, um eine Oszillation von einer Fluktuation unterscheiden zu können. Wie in Kapitel 1.1 gezeigt, ist es oftmals unmöglich, an Hand von Graphen eine Unterscheidung zwischen Fluktuationen und Oszillationen zu treffen.

Zwei mathematische Parameter können in diesen Patienten unterschiedlich sein: Länge der Periode (Zykluslänge) und Amplitude der Oszillationen. Buckley et. al untersuchten im Jahr 2000 die Thrombozytenwerte von 3789 Individuen, um intra- und interindividuelle Unterschiede festzustellen⁹³. Das Ergebnis war zum einen, dass Thrombozytenwerte in jedem Individuum in sehr engen Grenzen konstant gehalten werden, und zum anderen, dass eine Amplitudenänderung von mehr als 98.000/ μ l in einem Menschen mit einer geschätzten Wahrscheinlichkeit von kleiner 1:1000 auftritt. Von den Autoren wurde die These aufgestellt, dass jeder Mensch seinen eigenen Referenzbereich hat, in dem sich die Thrombozytenwerte bewegen. Im Gegensatz dazu war die beobachtete Amplitude der Thrombozyten der zwölf hier vorgestellten Patienten deutlich größer – nicht selten größer 1 Mio./ μ l.

Oszillationen können nur entdeckt werden, wenn bei Patienten Blutbildanalysen in Zeitintervallen erfolgen, die außerhalb der typischen Periodendauer von 28 Tagen liegen. Die Chancen, eine Oszillation zu entdecken sind daher höher, wenn die Patienten in irregulären Zeitabständen zu Kontrolluntersuchungen einbestellt werden. Empfehlenswert wären Kontrollen in fünftägigem Abstand über drei Monate, um eine Oszillation durch die Lombanalyse zu entdecken. Da oftmals eine regelmäßige Kontrolle erfolgt, ist die Häufigkeit der Oszillationen wahrscheinlich höher als bisher festgestellt. Daher kann keine Aussage über die Häufigkeit der durch Hydroxyurea induzierten Oszillationen getroffen werden.

Hydroxyurea triggert diese Oszillationen in dieser Patientenkohorte, da keine spontanen Oszillationen beobachtet worden waren. Ebenfalls sind nach Absetzen von HU keine weiteren Oszillationen beobachtet worden. Aber es gibt hierbei Ausnahmen: bei einem Patienten begannen die Oszillationen der Thrombozyten und Leukozyten erst nach einer Verzögerung von zwölf Monaten nach Einnahme von Hydroxyurea. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Autoren bei einem Patienten mit Polycythaemia vera und zwei CML Patienten beobachtet^{4,52,94}. Bei einem anderen Patienten traten die Oszillationen nach sechsjähriger HU-Einnahme erst nach einer Splenektomie auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine Fehlfunktion der Milz zu den Oszillationen bei nicht splenektomierten Patienten beiträgt.

Hydroxyurea greift in die DNA-Synthese ein, indem es die Ribonukleotidreduktase in hämatopoetischen Stammzellen hemmt⁵⁰. Dieses Enzym reduziert die 2'-Hydroxyl-Gruppe der Ribose. Dadurch erreichen viele Zellen die Mitose zur selben Zeit, womit eine partielle Synchronisation bewirkt wird. Für diesen Zweck wird Hydroxyurea in Experimenten mit Gewebekulturen verwendet⁹⁵. Diese Synchronisation erhöht die Chancen für eine Oszillation, da

3. Diskussion

sich ein größerer Anteil der Zellen gleichzeitig vermehrt bzw. abgebaut wird. Möglicherweise wird dadurch auch bei einzelnen Individuen eine Synchronisation erreicht, was zu Oszillationen führt.

Interessanterweise sind Hydroxyurea-induzierte Oszillationen von Thrombozyten und Leukozyten bisher nur bei Patienten mit Polycythaemia vera, aber nicht bei Patienten mit Primärer Thrombozythämie beobachtet worden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Ribonukleotidreduktase ein eisenhaltiges Enzym darstellt⁵⁰. Im Knochenmark von PV-, aber nicht von PT-Patienten, sind die Eisenspeicher häufig entleert⁹⁶. Im Gegensatz zu Patienten mit einer Primären Thrombozythämie findet sich bei Patienten mit einer Polycythaemia vera regelmäßig ein krankheitsassoziierter Eisenmangel. Da die Reduktase ein eisenabhängiges Enzym ist, könnte ein Eisenmangel zu einer Störung der Enzymfunktion führen.

Alle Patienten sind Träger der JAK2^{V617F}-Mutation. Bis auf einen Patienten bei Burthem et al, welcher positiv auf die JAK2^{V617F}-Mutation getestet worden war, ist in der Literatur keine Angabe über den Mutationsstatus bei den oszillierenden Patienten zu finden, da die übrigen Artikel vor der Entdeckung der JAK2^{V617F}-Mutation erscheinen worden waren⁵¹.

Da HU der Auslöser für diese Oszillationen ist, ist eine Möglichkeit Hydroxyurea abzusetzen und, sofern vertretbar, auf eine Therapie mittels Aderlass, Aspirin oder Anagrelid umzustellen. Im Gegensatz zu Hydroxyurea hat Anagrelid keine Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen, sondern wirkt als Inhibitor der Produktion von Megakaryozyten⁹⁷. Aber auch diese Strategie wirkt nicht bei allen Patienten⁵³.

Wenn eine HU-Therapie trotz Oszillationen beibehalten werden soll, gibt es mehrere Strategien um diese zu verringern bzw. zu verhindern. Nach Angabe anderer Autoren nehmen bei einigen Patienten die Oszillationen spontan ab, wenn die Dosis von Hydroxyurea konstant gehalten wird⁵². Bei keinem der hier beschriebenen zwölf Patienten war diese Strategie jedoch erfolgreich.

Wenn Oszillationen unter der Therapie mit Hydroxyurea auftreten, besteht dann die Indikation zu einer Änderung der Behandlung? Der Referenzbereich für Thrombozyten liegt zwischen 150.000–450.000 / μ l, allerdings ist der Bereich, in dem eine normale Gerinnung funktioniert, viel größer, 50.000 – 600.000 / μ l^{98,99}. Niedrige Thrombozytenwerte unter 20.000 / μ l erhöhen das Blutungsrisiko, hohe Thrombozytenwerte können mit einem erhöhten Thrombose – aber auch Erkrankungsrisiko verbunden sein¹⁰⁰. Eine Leukozytopenie kann eine Infektion begünstigen, eine Leukozytose wird in den Zusammenhang mit einem erhöhten Thromboserisiko gebracht¹⁰¹. Da in der beschriebenen Patientenkohorte weder bei hohen noch bei niedrigen Werten diesbezüglich Komplikationen auftraten, scheint die Komplikationsrate eher gering zu sein. Die Thrombozyten waren im Rahmen der Oszillationen häufig über 1 Mio./ μ l – dies belegt die klinische Beobachtung, dass für die Entstehung einer Thrombose bei Patienten mit einer Polycythaemia vera die Höhe des Thrombozytenwertes nicht entscheidend beiträgt, sondern dass der Hämatokrit der wichtigste Risikofaktor ist. Auf der anderen Seite haben zwei Autoren Patienten beschreiben, bei denen während der Thrombozytosephase eine erhöhte Blutungsneigung und eine digitale Ischämie auftraten^{4,52}.

Oszillationen wurden unter Therapie mit Hydroxyurea sowohl in Thrombozyten wie auch in Leukozyten gezeigt, aber nicht bei Erythrozyten. Eine mögliche Erklärung ist die unterschiedliche Lebensdauer der Thrombozyten (acht Tage), Leukozyten (acht bis zehn Tage) und Erythrozyten (einhundert-zwanzig Tage)^{102,103,104}. Thrombozyten und Leukozyten werden schneller produziert und

3. Diskussion

abgebaut, was eine Oszillation wahrscheinlicher macht. Man kann aber nicht ausschließen, dass Retikulozyten als Vorläufer der Erythrozyten ebenfalls oszillieren, da sie eine kürzere Lebensdauer haben. Retikulozytenwerte standen aber nicht zur Verfügung.

3. Diskussion

Tabelle 11: Übersicht über alle bisher publizierten PV-Patienten mit HU induzierten Oszillationen

Übersicht über alle 8 Patienten, über die in der Literatur berichtet worden sind und die in dieser Arbeit vorgestellten 12 Patienten. Bis auf einen Patienten bei Burthem et al, welcher positiv auf die JAK2^{V617F}-Mutation getestet worden war, ist in der Literatur ist keine Angabe über den Mutationsstatus bei den oszillierenden Patienten zu finden, da die übrigen Artikel vor der Entdeckung der JAK2^{V617F}-Mutation erschienen worden waren. Alle eigenen Patienten sind positiv auf die JAK2^{V617F}-Mutation getestet worden. Patienten Tauscher 1,3,4,6,10 nahmen Litalir®, die anderen Syrea®, in der Literatur war keine Angabe über den Handelsnamen gemacht worden.

Patient	Thrombozyten-Zyklus	Oszillation weiterer Zellreihe	Beginn der Oszillationen	Ende der Oszillationen durch	Dauer der HU- Einnahme	Dauer der Oszillationen	HU Dosis	Totale Beobachtungsdauer	Niedrigster Thrombozytenwert	Höchster Thrombozytenwert	Klinik
	[Tage]				[Monate]	[Monate]	[g/Tag]	[Monate]	[x 10 ⁹ /l]	[x 10 ⁹ /l]	
Burthem ⁵¹	28	nein	Sofort nach HU Einnahme	Kein Ende, aber durch eine konstante Dosis konnte eine starke Verminderung der Amplitude erreicht werden	nb	nb	nb	nb	200	800	Nicht beschrieben
Tefferi 1 ⁵³	28-30	nein	Sofort nach HU Einnahme	Ende der Therapie von HU, es musste wegen Unverträglichkeit von Anagrelid bzw. Interferon alpha wieder begonnen werden; dann erneute Oszillationen			0-3		50	1412	Nicht beschrieben
Tefferi 2	28-30	nein	Nicht beschrieben	Nicht beschrieben			0-3		35	1400	Nicht beschrieben
Steensma 1 ⁵²	30	nein	Sofort nach HU Einnahme	Anagrelid	20	20	0,5-3	20	93	1479	Nicht beschrieben
Steensma 2	30	WBC	Sofort nach HU Einnahme	Kein Ende, aber durch eine konstante Dosis konnte eine starke Verminderung der Amplitude erreicht werden	10	10	0-1,5	10	34	573	Nicht beschrieben
Steensma 3	20-30	nein	2 Jahre nach HU- Einnahme	Kein Ende, aber durch eine konstante Dosis konnte eine starke Verminderung der Amplitude erreicht werden	30	10	0,5-3	30	300	1400	Digitale Ischämie während Thrombozytose
Steensma 4	30	nein	80 Wochen nach HU- Einnahme	Weiterhin Oszillationen	27	2,5	0-2	27	30	800	Blutungsneigung während Thrombozytose
Bennet ⁴	29	WBC	Sofort nach HU Einnahme	Anagrelid	31	31	0-2	33	202	588	Nicht beschrieben
Tauscher 1	28	WBC	nach HU Einnahme mit 12 monatiger Verzögerung	Anagrelid nach 9monatiger Verzögerung	36	23	0,5-2	101	21	1417	keine
Tauscher 2	27	WBC	Sofort nach HU Einnahme	Weiterhin Oszillationen	40	40	1-2	48	68	1690	keine
Tauscher 3	29	nein	Sofort nach HU Einnahme	Anagrelid	4	4	1-2	96	71	1145	keine
Tauscher 4	30	WBC	Sofort nach HU Einnahme	Weiterhin Oszillationen	120	120	1-2	125	104	1420	keine
Tauscher 5	30	WBC	Sofort nach HU Einnahme	Busulphan	10	10	0,5-3,5	120	46	1122	keine
Tauscher 6	30	nein	Sofort nach HU Einnahme	Ende der HU Therapie	15	15	1-2	96	116	598	keine
Tauscher 7	27	nein	Sofort nach HU Einnahme	Weiterhin Oszillationen	48	48	1-2	48	136	1385	keine
Tauscher 8	30	nein	Nach Splenektomie	Busulphan	8	8	1-2	108	27	4900	keine
Tauscher 9	28	nein	Sofort nach HU Einnahme	Einen zusätzlichen Aderlass	21	4	0,5-1	72	189	1162	keine
Tauscher 10	29	WBC	Sofort nach HU Einnahme	Anagrelid	21	21	1-2	48	21	1495	keine
Tauscher 11	28	nein	Sofort nach HU Einnahme	Ohne erkennbaren Grund	18	6	1	18	140	530	keine
Tauscher 12	27	nein	Sofort nach HU Einnahme	Anagrelid	7	7	0,5-1	36	116	989	keine

Teil 2: Beeinflussung der Thrombusbildung durch Aspirin bei Primärer Thrombozythämie

1. Material und Methoden

1.1 Patienten

In die Studie wurden 12 Patienten mit primärer Thrombozythämie aufgenommen. Folgende Einschlusskriterien waren gültig: Mindestalter 18 Jahre, die primäre Thrombozythämie musste je nach Datum der Erstdiagnose durch die Empfehlungen der Polycythaemia Study Group (PVSG) oder durch die Kriterien der WHO von 2001 bzw. die nach Entdeckung der JAK2^{V617F}-Mutation überarbeiteten WHO-Kriterien von 2008 gesichert sein^{43,88,105}. Alle Patienten nahmen lediglich einen Thrombozytenaggregationshemmer (Aspirin, 100 mg/Tag) ein. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer begutachtet und genehmigt (Ethik-Kommission-Nummer 08045). Eine entsprechende Patientenversicherung wurde abgeschlossen.

1.2 Kontrollgruppe

Für die Kontrollgruppe standen 10 freiwillige, erwachsene gesunde Probanden aus der deutschen Allgemeinbevölkerung zur Verfügung. Ausschlusskriterien waren eine bestehende Blutungsneigung, eine bestehende Medikation, insbesondere Thrombozytenaggregationshemmer, positive Anamnese auf thromboembolische Ereignisse sowie Krankheiten, die die Blutgerinnung beeinflussen können.

1.3 Material

1.3.1 Geräte

- RTTP (Real Time Thrombosis Profiler): Der RTTP besteht aus einem Metall-Gehäuse, an dem seitlich eine Spritzen-Pumpe aus Metall befestigt ist. In dem Gehäuse befinden sich eine Fluoreszenz-Mikroskop-Kamera sowie eine Lichtdiode, mit der angefärbte Thrombozyten mit Licht mit einem Spektralmaximum bei 530 nm und einer Halbwertsbreite bei 35 nm sichtbar gemacht werden. Gesteuert wird der RTTP über eine speziell programmierte Software. Ein PC ist via VGA-Kabel und Firewire-Kabel mit dem RTTP verbunden (Bestandteile siehe Tabelle 12).
- Personal Computer mit MS Windows XP
- ABX Micros CRP 200, Firma Horiba-ABX
- Wasserbad mit Thermometer

1.3 Material

Tabelle 12: Bestandteile des RTTP

	<p>A Schalter für Strom B Schalter für Temperatur C Schalter für Spritzen-Pumpe D Schalter für X, Y und Z Achse E Temperaturanzeige und -kontrolle F Spritzen-Pumpe G Fluoreszenz-Mikroskop-Kamera H Heizplatte</p>
<p>Abbildung 9: Der RTTP</p>	
<p>RTTP:</p>	<p>Portola Pharmaceuticals Inc., San Francisco, CA, USA</p>
<p>Fluoreszenz-Mikroskop-Kamera:</p>	<p>Sony XCD X-710 mit Fluoreszenzfilter, Chroma Technologies, Rockingham, Vermont, VA, USA</p>
<p>Lichtdiode:</p>	<p>Luxeon V, Lumileds Lighting, San Jose, CA, USA</p>
<p>Spritzen-Pumpe:</p>	<p>Harvard Apparatus, Boston, Massachusetts, USA</p>

1.3.2 Reagenzien, Puffer, Lösungen

- Kollagenlösung der Firma Chrono-log Corporation, Havertown, PA, USA; in Deutschland Vertrieb durch die Firma Probe & go Labordiagnostica GmbH, 54317 Osburg (1 mg/ml; native Kollagenfibrillen Typ I aus Pferdesehen in einer isotonischen Glukoselösung mit pH 2,7)
- Isotonische Glukoselösung (pH = 2,7)
- Thrombozytenaggregationshemmer PRT054034 (Faktor Xa-Hemmstoff)
- Fluoreszenzmarker Rhodamin 6G
- Bikarbonat-Puffer (Puffer C) (130 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 2,5 mM CaCl₂ ° 2 H₂O, 0,9 mM MgCl ° 6H₂O)

1.3.3 Softwareprogramme

- MS Excel 2007
- Softwaresteuerung des RTTP (speziell entwickelt von Portola Inc.)
- Auswertungsprogramm 'Sticky' der vom RTTP aufgezeichneten Daten (speziell entwickelt von Portola Inc.)
- GraphPad Prism v4.03

1.3.4 Sonstige Materialien

- 15 ml Falcon Reagenzglas
- 8 ml Falcon Reagenzglas
- 10 ml Spritze (Durchmesser 14,5 mm)
- Spritzenaufsatz
- Plastikschlauch (0,76 mm x 1,65 mm)
- Schmetterlingskanüle Butterfly (19G)
- 200 μ m x 2 cm Glaskapillaren der Firma Vitrocom

1.4 Methoden

1.4.1 Beschichtung der Kapillarwand mit Kollagen

24 Stunden vor dem eigentlichen Versuch werden die Glaskapillaren präpariert, die das Gefäß simulieren. Typ I Kollagen wird mit einer isotonischen Glukoselösung 1:1 verdünnt. Anschließend werden die Glaskapillarwände (200 μ m x 2 cm, Firma Vitrocom) mit dieser Mischung beschichtet: Pro Kapillare werden 40 μ l dieser Kollagenlösung (Mischung A) aus 20 μ l Kollagen und 20 μ l isotonischer Glukoselösung benötigt.

Vor dem Beschichten der Kapillarwand mit der Kollagenlösung wird das einzutauchende Ende der Kapillare mit einem schwarzen Punkt markiert - dieses Ende wird als das distale Ende bezeichnet. Durch Eintauchen der Kapillare in die Kollagenlösung steigt diese bis zum anderen (proximalen) Ende auf, die Kapillarinnenwand ist somit beschichtet (Abbildung 10-1). Anschließend werden die so präparierten Kapillaren zusammen mit einem kleinen nassen Schwamm zur Vermeidung einer Austrocknung für 16 Stunden in einem lichtgeschütztem Kästchen bei Raumtemperatur gelagert (Abbildung 10-2).

Nach Ablauf der 16 Stunden werden die Kollagen-beschichteten Kapillaren geleert, indem das distale Ende auf Saugpapier gehalten wird, um die sich in der Kapillare befindliche (überschüssige) Kollagenlösung zu entfernen (Abbildung 10-3). Damit ist die Glaskapillare für den Versuch vorbereitet.

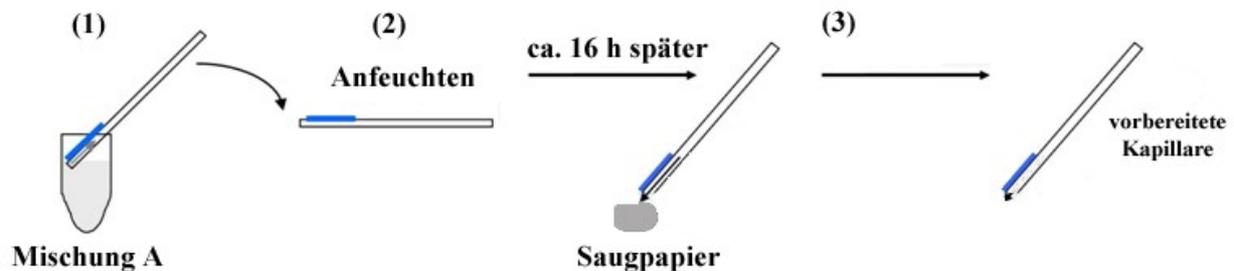


Abbildung 10: Präparation der Kapillaren

1.4.2 Blutentnahme und Fluoreszierung der Thrombozyten

Mit Einschalten des RTTP wird der Behälter für die Blutprobe auf 37°C erwärmt. Es werden zwei 15 ml Falcon Reagenzgläser bereitgestellt, wobei später in jedes 10 ml Blut gefüllt wird. In jedes dieser Reagenzgläser werden 340µl PRT054034 gegeben, einem von Portola Pharmaceuticals Inc. hergestellten Faktor Xa-Hemmer zur Antikoagulation.

Durch eine Blutentnahme mittels Schmetterlingskanüle Butterfly (19G) werden 20 ml Blut gewonnen – die Mindestmenge für den Versuch beträgt 12,7 ml Blut, die restliche Menge wurde für mögliche Wiederholungen der Versuche bei etwaigen Fehlern als „Vorrat“ abgenommen. Jeweils 10 ml werden sofort in die vorbereiteten 15 ml Falcon Reagenzgläser gegeben. Gleichzeitig mit der Blutentnahme wurde bei jedem Patienten ein Blutbild erstellt.

Anschließend werden die Blutproben mit dem Fluoreszenzmarker Rhodamin 6G versehen (10 µl Rhodamin für 10 ml Blut) und für 25 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nun wird das distale Ende der vorbereiteten Kapillare mittels eines Plastikschauchs (Länge 20 cm, Durchmesser 0,76 mm x 1,65 mm) verbunden und anschließend das freie Ende des Schlauchs über den Adapter mit einer 10 ml Spritze verbunden (Abbildung 11-A). Dadurch wird ein Unterdruck erzeugt, wodurch das Blut vom proximalen zum distalen Ende gesogen wird. Die Geschwindigkeit, mit der die Spritzenpumpe arbeitet, ist variabel und kann durch die Software des PCs verändert werden (Abbildung 11-B). Auch das proximale Ende der Kapillare wird mit einem Plastikschauch (Länge 25 cm, Durchmesser 0,76 mm x 1,65 mm) verbunden.

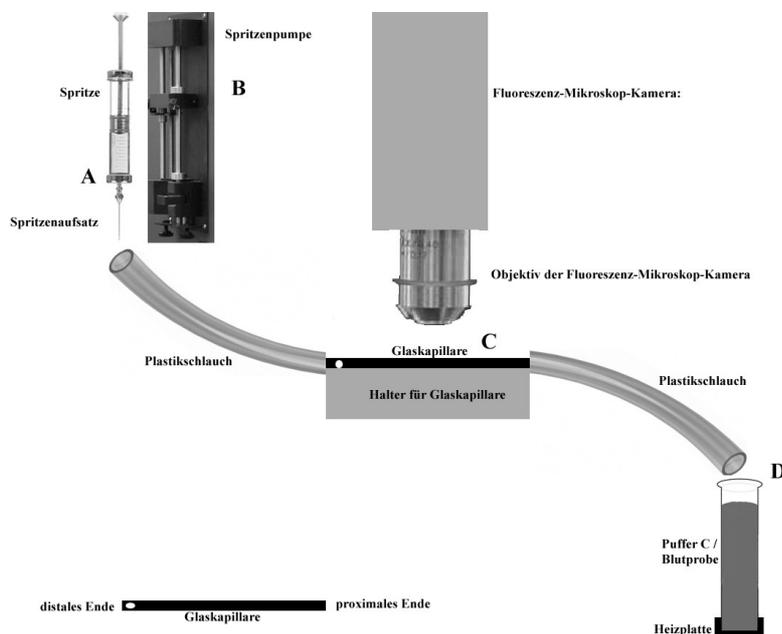


Abbildung 11: Schematischer Versuchsaufbau

Nun wird die Kapillare in der herausnehmbaren Halterung des RTTP fixiert, so dass die Beobachtungsfläche der Kamera 7 mm von dem proximalen Ende der Kapillare beginnt ist. Die Kamera zeichnet eine Fläche von 360 x 270 µm auf. Danach wird die Halterung im RTTP befestigt (Abbildung 11-C).

Das proximale Schlauchende wird zunächst in ein 8 ml Falcon Reagenzglas gehalten, das mit einem Bikarbonat-Puffer gefüllt ist (Abbildung 11-D). Am PC, der den RTTP steuert, sind in der Steuerungssoftware nun einige Einstellungen zu tätigen. Zunächst ist das 'Gain Setting' auf 650 zu setzen. Damit wird die Lichtempfindlichkeit für das Experiment eingestellt. Danach wird für das Experiment folgende Beschriftung eingegeben:

- 1. Zeile: Datum (JJJJ-MM-TT)
- 2. Zeile: PT_ (Studien ID)
- 3. Zeile: 001 - XXX (Patientennummer)
- 4. Zeile: Flussrate (100, 600 oder 1600)
- 5. Zeile: Aktuelle Medikation

Als nächstes wird der Spritzendurchmesser der 10 ml Spritze (in diesem Fall 14,5 mm) und die Flussrate von 1,27 ml/min in das Programm eingegeben.

Danach wird das System gestartet, wodurch der Bikarbonat-Puffer in einem Probenvorlauf über das proximale Schlauchende in die Glaskapillare und über das distale Plastikschlauchende in die 10 ml Spritze gelangt. Dadurch werden möglicherweise vorhandenen Luftblasen entfernt. Sollte dies nicht gelingen, müssen diese durch Überdruck entfernt oder die Kapillare ausgetauscht werden.

1.4.3 Durchführung des Versuches

Nach Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten wird eine 2ml Blutprobe in ein 8 ml Reagenzglas pipettiert. Nach Abklemmen des Plastikschlauches durch eine Kocherklemme wird der Schlauch in das Blutröhrchen gehalten. Anschließend wird dieses Falcon Reagenzglas in die Halterung für Blutproben am RTTP gesteckt, welche für genau diese 8 ml Falcon Reagenzgläser entworfen worden ist (Abbildung 11-D). In die Halterung ist eine Heizplatte integriert, die die Blutprobe während der Zeit des Versuches weiterhin auf 37° C hält. Anschließend wird die Klemme gelöst und der Versuch mit der Flussrate von 0,1 ml/min (entsprechend 100s^{-1} , venöse Verhältnisse) gestartet.

Danach wird das Experiment am PC gestartet, die Kamera beginnt mit der Aufzeichnung. Zur optimalen Betrachtung der Thrombozyten kann die Kamera mit drei Drehknöpfen in 3 Richtungen positioniert bzw. fokussiert werden.

Das Experiment wird durch zwei Möglichkeiten beendet: entweder verschließt ein oder (mehrere) Thromben die Kapillare. Dies erkennt man in der Steuerungssoftware durch ein zunehmendes 'Rotwerden' des Kameraausschnittes. Alternativ wird das Experiment durch das Erreichen der festgelegten Maximalzeit beendet. Die maximale Zeitdauer des Versuchs mit 0,1 ml/min ist auf 420 Minuten festgelegt.

Sobald eine dieser Möglichkeiten eingetreten ist, werden die Blutprobe mit der Kapillare sowie dem Schlauchsystem und die 10 ml Spritze aus den jeweiligen Halterungen entfernt und in geeignete Abfallbehälter gegeben.

Anschließend wird das Experiment mit den anderen Flussgeschwindigkeiten von 0,5ml/min (arterielle Verhältnisse, 600s^{-1}) und 1,27 ml/min (moderat stenosierte arterielle Verhältnisse, 1600s^{-1}) wiederholt. Die Menge des benötigten Blutes variiert mit der Flussrate: Für die Flussrate 0,5 ml/min

benötigt man 4 ml Blut und für 1,27 ml/min 8 ml. Die Maximalzeiten sind ebenfalls unterschiedlich. Bei 0,1 ml/min und 0,5 ml/min wurde die maximale Zeit auf 420 Sekunden festgelegt, für 1,27 ml/min auf 350 Sekunden.

An das Experiment schließt sich die Bearbeitung der Daten am PC an.

1.4.4 Bearbeitung der gesammelten Daten

Die Software am PC legt pro Experiment einen Ordner an, in der sich eine Textdatei sowie die jeweiligen Bilder im Tif-Format befinden. Pro Sekunde wird ein Bild erstellt und damit eine Bilddatei erzeugt. Außer den bereits genannten Parametern werden noch folgende aufgezeichnet:

- frame number (Bildnummer)
- time/s (Zeit/Sekunde)
- shutter time/s (Belichtungszeit)
- shutter value (Belichtungswert)
- gain value (Verstärkungsgrad)
- mean pixel value (mittlerer Pixel Wert)
- sum (Summe)
- volume total (aufaddierte Volumen)

Die für die Auswertung und Analyse entscheidenden Parameter sind 'frame number' (zugehörige Bilddatei) sowie 'mean pixel value' (im Bild gemessene Helligkeit).

1.5 Analyse und Auswertung der Daten

Die Nachbearbeitung der Versuche erfolgt mit dem Programm 'Sticky'. Dieses Programm wurde von Portola Pharmaceuticals für die Auswertung von Experimenten mit dem RTTP entwickelt. Die Dateien des jeweiligen Experiments werden in Sticky geladen und aufgearbeitet, wobei zuerst eine Grundlinie (Baseline) erzeugt wird, um einen besseren Filter für die Messungen zu bekommen. Die vielen Einzelbilder werden dann zu einem Film im SWF Format (Adobe Flash®) verarbeitet. Dieser Film lässt sich mit den meisten Browsern (zum Beispiel Internet Explorer der Firma Microsoft) ansehen. Außerdem wird aus den gesammelten Dateien eine weitere Tabelle mit 2 Spalten angelegt. Die erste Spalte umfasst die Zeit in Sekunden, die zweite Spalte das mittlere Thrombus-Volumen pro Fläche. Die Ablagerung der fluoreszierten Thrombozyten an der Kollagenoberfläche wurde in realer Zeit durch das Fluoreszenz-Mikroskop des RTTP gemessen: „*Endpoint thrombosis*” (Größe der Thromben zum Zeitpunkt $t=300$ Sekunden, ausgedrückt durch “*Mean Fluorescent Intensity/Area of coverage*”) und Rate des Thrombuswachstums (“*individual rate of platelet deposition*”) als Maßeinheit für das thrombotische Potential für jedes Individuum¹⁰⁶.

Diese Textdatei lässt in einem Tabellenkalkulationsprogramm wie zum Beispiel Microsoft Excel laden und graphisch auftragen. Für die statistische Auswertung wurden sowohl MS Excel 2007 wie auch GraphPad Prism v4.03 verwendet (unpaired, 2-tailed Students t-test, OLS (ordinary least square)).

1.6 Verwendbarkeit der Daten

Alle Blutproben wurden mit dem ABX Gerät analysiert (Thrombozyten-, Erythrozyten-, Hämoglobin- und Leukozytenwert, Hämatokrit, Höhe von MCH, MCV und MCHC) und anschließend der Analyse mit dem RTTP unterzogen. Bevor aber die statistische Auswertung stattfand, wurde das Ergebnis jeder Messung in allen drei Flussgeschwindigkeiten einer Qualitätskontrolle unterzogen. Diese Kontrolle beinhaltete das Begutachten der Videos, und es wurden so einige Messungen nicht für die statistische Auswertung zugelassen, bei denen eine Leckage/Bruchstelle der Kapillare, Luftblasen oder eine longitudinale Bewegung der Kapillare während des Versuchs aufgetreten war.

2. Ergebnisse

2.1 Patientencharakteristika

Das Alter der Patienten lag zwischen 38 und 92 Jahren. 8 Patienten waren weiblichen, 4 Patienten männlichen Geschlechts. Die JAK2^{V617F}- Mutation war bei 5 der 12 Patienten nachgewiesen worden. Alle Patienten nahmen lediglich Aspirin 100mg/Tag ein (Tabelle 13). Mehrere Patienten mussten auf Grund des Alters (Patienten 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12) bzw. wegen stattgefundener thromboembolischer Ereignisse (Patient 11) eine zytoreduktive Therapie erhalten, diese wurde allerdings von den Patienten abgelehnt.

Tabelle 13: Charakteristika der Studien-Patienten mit Primärer Thrombozythämie

m=männlich, w=weiblich,				
Patient	Alter	Geschlecht	JAK2 ^{V617F} -Mutation	Thromboseanamnese
PT_01	43	w	positiv	negativ
PT_02	38	m	negativ	negativ
PT_03	57	w	negativ	negativ
PT_04	48	w	negativ	negativ
PT_05	63	w	positiv	negativ
PT_06	74	w	positiv	negativ
PT_07	55	w	negativ	negativ
PT_08	65	m	negativ	negativ
PT_09	66	w	positiv	negativ
PT_10	69	m	positiv	negativ
PT_11	79	m	negativ	positiv
PT_12	92	w	negativ	negativ

2.2 Charakteristika der Studien-Kontrollgruppe

Das durchschnittliche Alter betrug 38 Jahre (25-65). 2 Probanden waren weiblichen, 8 Patienten männlichen Geschlechts. Die Kontrollgruppe nahm über 3 Tage ASS 100 mg/Tag ein, am 4. Tag erfolgte die Messung mittels RTTP (Tabelle 14).

2. Ergebnisse

Tabelle 14: Charakteristika der Studien-Kontrollgruppe

<i>m=männlich, w= weiblich;</i>		
Proband	Alter [Jahre]	Geschlecht
K_01	29	m
K_02	29	m
K_03	59	m
K_04	29	m
K_05	29	m
K_05	26	m
K_07	25	w
K_08	65	m
K_09	24	m
K_10	65	w

2.3 Blutbildanalysen der Patienten und der Kontrollgruppe

Gleichzeitig mit der Blutentnahme von 20 ml wurde bei jedem Patienten ein Blutbild erstellt. Die Blutbilder der Patienten mit primärer Thrombozythämie siehe Tabelle 15, die Blutbilder der Kontrollgruppe siehe Tabelle 16.

Tabelle 15: Blutbildanalyse der PT-Patienten am Untersuchungstag

WBC = Zahl der Leukozyten, RBC = Zahl der Erythrozyten, PLT = Zahl der Thrombozyten, Hb = Hämoglobin, HKT = Hämatokrit, MCV = mittleres korpuskuläres Volumen, MCH = mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt, MCHC=Mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration;								
Patient	WBC	RBC	PLT	HB	HKT	MCV	MCH	MCHC
	[x10 ⁹ /l]	[x10 ¹² /l]	[x10 ⁹ /l]	[g/dl]	[%]	[µm ³]	[pg]	[g/dl]
PT_01	9,3	6,24	810	13,5	43,7	73	21,7	31,0
PT_02	7,0	5,24	1340	13,4	42,2	81	25,5	31,7
PT_03	4,6	4,07	1576	11,7	35,3	87	28,6	33,0
PT_04	4,3	4,00	620	11,9	35,5	89	29,6	33,4
PT_05	9,9	4,51	618	12,3	37,9	84	27,3	32,5
PT_06	10,1	6,48	933	14,1	47,5	73	23,0	31,4
PT_07	6,2	4,95	1684	13,8	43,3	88	27,9	31,8
PT_08	5,7	4,40	990	12,4	37,4	85	28,1	33,0
PT_09	7,7	5,43	868	12,0	38,5	71	31,0	31,1
PT_10	6,7	5,67	745	15,9	49,0	86	28,1	32,5

2. Ergebnisse

PT_11	6,2	4,49	571	13,6	41,3	92	30,4	33,0
PT_12	4,8	3,58	516	11,1	33,9	95	30,9	32,6
Mittelwert	6,6	4,92	939	12,9	40,5	83,7	27,6	32,3
Bereich	4,3-10,1	3,58-6,48	516-1684	11,1-15,9	33,9-49	71-95	21,7-31,0	31,0-33,4

Tabelle 16: Blutbildanalysen der Kontrollgruppe am Untersuchungstag

WBC = Zahl der Leukozyten, RBC = Zahl der Erythrozyten, PLT = Zahl der Thrombozyten, HB = Hämoglobin, HKT = Hämatokrit, MCV = mittleres korpuskuläres Volumen, MCH = mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt, MCHC = Mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration;								
Patient	WBC	RBC	PLT	HB	HKT	MCV	MCH	MCHC
	[x10 ⁹ /l]	[x10 ¹² /l]	[x10 ⁹ /l]	[g/dl]	[%]	[µm ³]	[pg]	[g/dl]
K_01	5,8	5,50	204	15,0	46,7	85	27,4	32,2
K_02	7,4	5,92	281	16,0	51,4	87	27,0	31,1
K_03	4,7	5,68	184	15,7	49,5	87	27,6	31,6
K_04	7,1	5,18	222	15,4	44,0	85	30,1	34,1
K_05	6,8	5,40	259	16,3	48,0	88	30,1	32,1
K_06	5,2	5,42	244	15,1	47,0	87	27,8	32,1
K_07	3,7	4,18	258	12,2	37,2	89	29,1	32,6
K_08	5,0	5,20	195	15,2	45,9	88	29,3	33,2
K_09	5,6	5,34	227	15,7	48,1	90	29,5	37,7
K_10	6,0	4,86	271	14,3	42,8	88	29,4	33,4
Mittelwert	5,73	5,27	234,5	15,1	46,1	87,4	28,7	33,0
Spannweite	3,7-7,4	4,18-5,92	184-281	12,2-16,3	37,2-51,4	85-90	27,0-30,1	31,1-37,7

2.4 Verwendbarkeit der RTTP-Messergebnisse

Alle 22 verfügbaren Blutproben – 10 Probanden der Kontrollgruppe und 12 Patienten – wurden mit dem ABX Gerät analysiert. Nach Analyse mittels RTTP wurde die oben beschriebene Qualitätsüberprüfung durchgeführt. Die für die statistische Auswertung zugelassenen Messungen finden sich in Tabelle 17.

2. Ergebnisse

Tabelle 17: Verwendbarkeit der Messungen

Fließgeschwindigkeit	Patientengruppe (16 Patienten)		Kontrollgruppe (10 Probanden)	
	Verwendbar	Anzahl	Verwendbar	Anzahl n
100s ⁻¹	PT_01, PT_02, PT_03, PT_04, PT_05, PT_06, PT_07, PT_08, PT_09, PT_10, PT_11, PT_12.	n =12	K_01, K_03, K_04, K_05, K_06, K_07, K_08, K_09, K_10.	n = 9
600s ⁻¹	PT_01, PT_02, PT_03, PT_04, PT_05, PT_06, PT_07, PT_08, PT_09, PT_10, PT_11, PT_12.	n = 12	K_01, K_02, K_04, K_05, K_06, K_07, K_08, K_09, K_10.	n = 9
1600s ⁻¹	PT_01, PT_02, PT_03, PT_05, PT_06, PT_08, PT_09, PT_10, PT_12.	n = 9	K_01, K_02, K_04, K_05, K_06, K_07, K_08, K_09, K_10.	n = 9

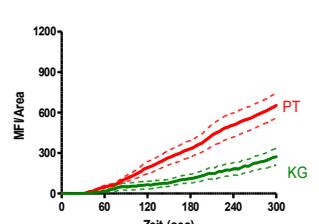
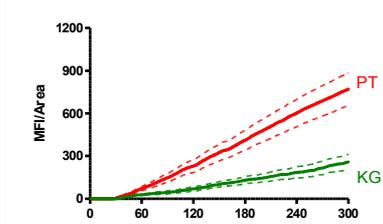
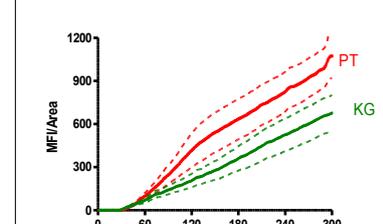
2.5 Vergleich der Patienten mit der Kontrollgruppe

Bei allen drei Flussgeschwindigkeiten bilden die Patienten größere Thromben (Endpoint thrombosis) in allen drei Flussgeschwindigkeiten als die Kontrollgruppe (Tabelle 18). Die Rate des Thrombuswachstums ist ebenfalls bei allen Patienten höher.

2. Ergebnisse

Tabelle 18: Übersicht des durchschnittlichen thrombotischen Potentials im Vergleich mit der Kontrollgruppe

Graphische Darstellung: Vergleich der PT-Patienten mit der Kontrollgruppe bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten. Wiedergegeben als durchschnittliches thrombotisches Potential. MFI/Area = Mean Fluorescent Intensity/Area of coverage; KG = Kontrollgruppe; PT = Patienten mit Primärer Thrombozythämie, n=Anzahl; Mittelwert (mean) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

Thrombusbildung	100s ⁻¹ (venöse Flussgeschwindigkeit)			600s ⁻¹ (arterielle Flussgeschwindigkeit)			1600s ⁻¹ (arterielle Flussgeschwindigkeit bei leichter Stenose)		
	PT-Patienten (n=12)	Kontrollgruppe (n=9)	P-Wert	PT-Patienten (n=12)	Kontrollgruppe (n=9)	P-Wert	PT-Patienten (n=9)	Kontrollgruppe (n=9)	P-Wert
Endpunkt	622 ± 87	272,9 ± 61	p=0,0094	781,2 ± 112,7	260,4 ± 53,4	p=0,0016	1122 ± 148,5	677,1 ± 112	p=0,0314
Rate	2,6 ± 0,3	1,2 ± 0,2	p=0,0053	2,9 ± 0,4	1,2 ± 0,2	p=0,0052	4,2 ± 0,5	2,8 ± 0,5	p=0,0525
Graphische Darstellung	 <p>Abbildung 12: Vergleich PT-Patienten mit Kontrollgruppe bei 100s⁻¹</p>			 <p>Abbildung 13: Vergleich PT-Patienten mit Kontrollgruppe bei 600s⁻¹</p>			 <p>Abbildung 14: Vergleich PT-Patienten mit Kontrollgruppe bei 1600s⁻¹</p>		

Eine repräsentative visuelle Darstellung einer Messung des RTTP findet sich in Abbildung 15: Es wird die Thrombusbildung der Patienten (Patienten PT 5,15,8; Abbildung 15-1) mit der der Kontrollgruppe (HV 5,7,8; Abbildung 15-2) bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten verglichen.

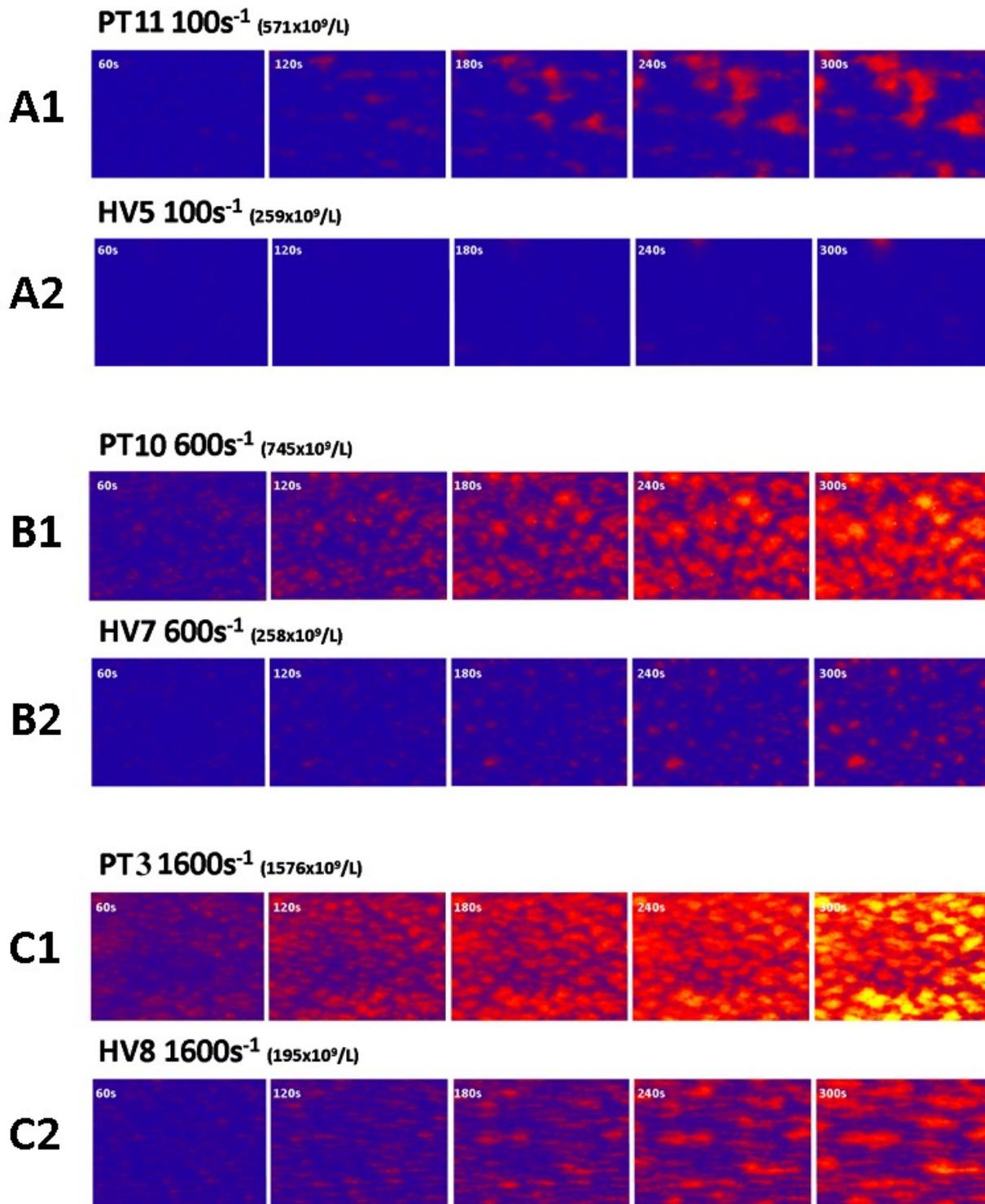


Abbildung 15: Repräsentative Beispiele einzelner RTTP-Messungen

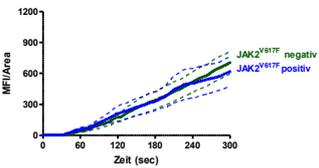
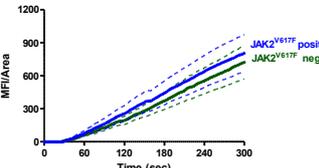
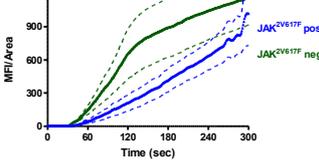
Vergleich der Thrombusbildung einzelner Patienten (PT 5,15,8) mit einzelnen Probanden der Kontrollgruppe (HV [=healthy volunteer] 5,7,8) bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten (A-100s⁻¹, B-600s⁻¹ und C-1600s⁻¹). Die Bilder wurden jeweils nach 60, 120, 180, 240 und 300 Sekunden aufgenommen. Thrombozytenwerte in Klammern.

2. Ergebnisse

2.6 Einfluss der JAK2^{V617F}-Mutation auf die Thrombusbildung

Die Patienten mit JAK2^{V617F}-Mutation wurden mit den Patienten ohne JAK2^{V617F}-Mutation verglichen: die JAK2^{V617F}-Mutation hatte keinen Einfluss auf die Thrombusgröße bzw. -Bildung (Tabelle 19).

Tabelle 19: Einfluss der JAK2^{V617F}-Mutation auf das durchschnittliche thrombotische Potential

Thrombus- bildung	100s ⁻¹ (venöse Flussgeschwindigkeit)			600s ⁻¹ (arterielle Flussgeschwindigkeit)			1600s ⁻¹ (leicht stenosierte arterielle Flussgeschwindigkeit)		
	JAK2 ^{V617F} negativ (n=7)	JAK2 ^{V617F} positiv (n=5)	P-Wert	JAK2 ^{V617F} negativ (n=7)	JAK2 ^{V617F} positiv (n=5)	P-Wert	JAK2 ^{V617F} negativ (n=4)	JAK2 ^{V617F} positiv (n=5)	P-Wert
Endpunkt	620 ± 145	625 ± 100	0,98	809 ± 167	697 ± 130	0,62	1097 ± 226	1141 ± 212	0,89
Rate	2,5 ± 0,5	2,7 ± 0,4	0,84	3,2 ± 0,6	2,4 ± 0,5	0,37	4,1 ± 0,6	4,4 ± 0,9	0,79
Graphische Darstellung	 <p>Abbildung 16: Vergleich der JAK2^{V617F}-Mutation bei 100s⁻¹</p>			 <p>Abbildung 17: Vergleich der JAK2^{V617F}-Mutation 600s⁻¹</p>			 <p>Abbildung 18: Vergleich der JAK2^{V617F}-Mutation bei 1600s⁻¹</p>		

2.7 Einfluss des Thrombozytenwertes

Nur bei der Flussgeschwindigkeit von 600s⁻¹ konnte eine direkte Korrelation zwischen der Höhe des Thrombozytenwertes und der Thrombusbildung nachgewiesen werden. Die Korrelationen des Thrombozytenwertes in Bezug auf den Endpunkt nach 300 Sekunden sind in den Tabellen 20, 21 und 22 für die drei gemessenen Flussgeschwindigkeiten zu finden.

2. Ergebnisse

Tabelle 20: Korrelation des Thrombozytenwertes für $100s^{-1}$

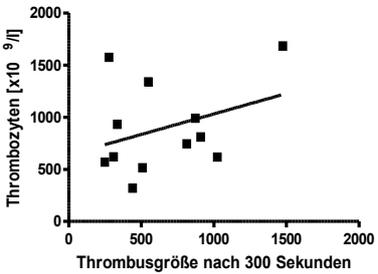
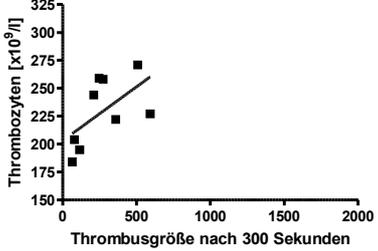
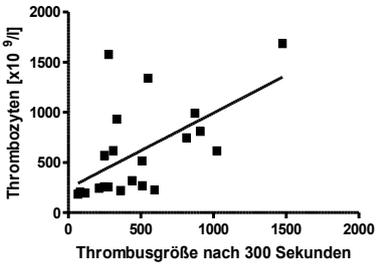
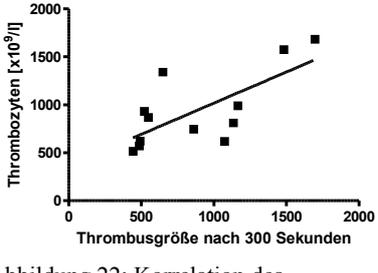
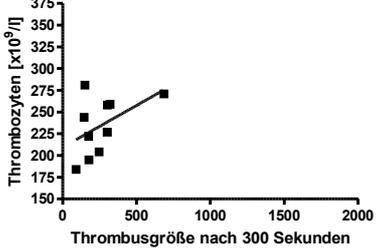
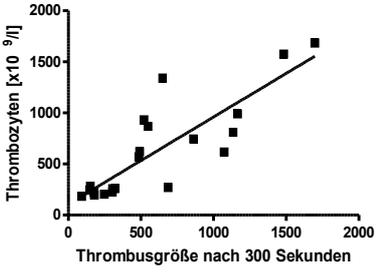
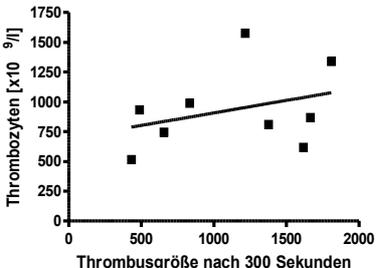
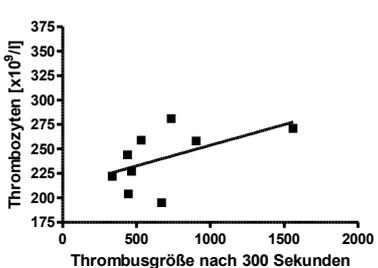
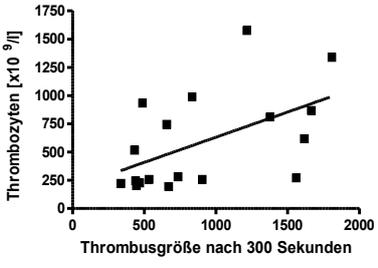
p= p-Wert, r^2 = Determinationskoeffizient;		
Patienten (n=12)	Kontrollgruppe (n=9)	Patienten und Kontrollgruppe
 <p>Abbildung 19: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten bei $100s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 20: Korrelation des Thrombozytenwertes der Kontrollgruppe bei $100s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 21: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei $100s^{-1}$</p>
p = 0,28	p = 0,10	p = 0,63
$r^2 = 0,12$	$r^2 = 0,33$	$r^2 = 0,33$

Tabelle 21: Korrelation des Thrombozytenwertes für $600s^{-1}$

p= p-Wert, r^2 = Determinationskoeffizient;		
Patienten (n=12)	Kontrollgruppe (n=9)	Patienten und Kontrollgruppe
 <p>Abbildung 22: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten bei $600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 23: Korrelation des Thrombozytenwertes der Kontrollgruppe bei $600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 24: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei $600s^{-1}$</p>
p = 0,01	p = 0,15	P < 0,0001
$r^2 = 0,50$	$r^2 = 0,2388$	$r^2 = 0,71$

2. Ergebnisse

Tabelle 22: Korrelation des Thrombozytenwertes für $1600s^{-1}$

p= p-Wert, r^2 = Determinationskoeffizient;		
Patienten (n=9)	Kontrollgruppe (n=9)	Patienten und Kontrollgruppe
 <p>Abbildung 25: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten bei $1600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 26: Korrelation des Thrombozytenwertes der Kontrollgruppe bei $1600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 27: Korrelation des Thrombozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei $1600s^{-1}$</p>
p = 0,38	p = 0,14	p = 0,24
$r^2 = 0,102$	$r^2 = 0,281$	$r^2 = 0,27$

2.8 Einfluss des Hämatokritwertes

Es konnte keine Korrelation in allen drei Flussgeschwindigkeiten nachgewiesen werden. Die Korrelationen des Hämatokritwertes in Bezug auf den Endpunkt nach 300 Sekunden sind in den Tabellen 23, 24 und 25 für die drei gemessenen Flussgeschwindigkeiten zu finden.

2. Ergebnisse

Tabelle 23: Korrelation des Hämatokritwertes für $100s^{-1}$

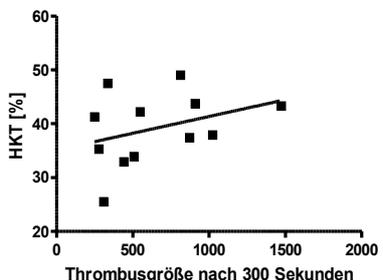
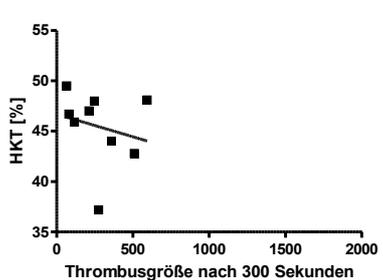
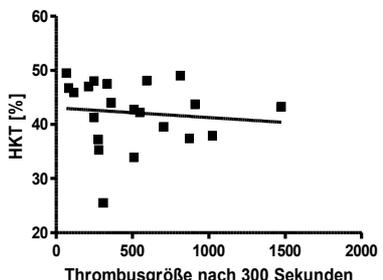
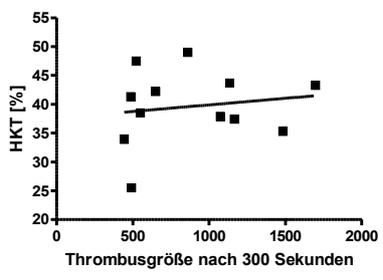
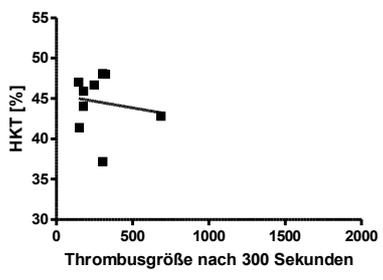
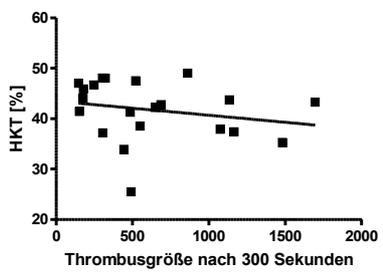
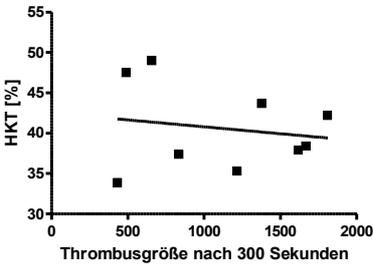
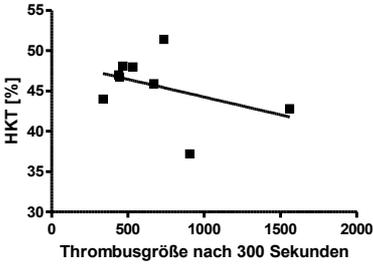
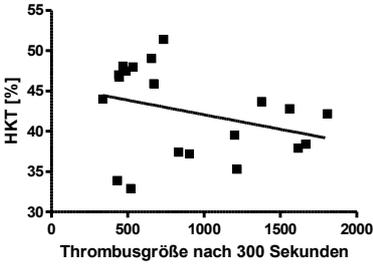
HCT = Hämatokritwert, p= p-Wert, r^2 = Determinationskoeffizient;		
Patienten (n=12)	Kontrollgruppe (n=9)	Patienten und Kontrollgruppe
 <p>Abbildung 28: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten bei $100s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 29: Korrelation des Hämatokritwertes der Kontrollgruppe bei $100s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 30: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe bei $100s^{-1}$</p>
p = 0,26	p = 0,56	p = 0,64
$r^2 = 0,123$	$r^2 = 0,049$	$r^2 = 0,011$

Tabelle 24: Korrelation des Hämatokritwertes für $600s^{-1}$

HCT = Hämatokritwert, p= p-Wert, r^2 = Determinationskoeffizient;		
Patienten (n=12)	Kontrollgruppe (n=9)	Patienten und Kontrollgruppe
 <p>Abbildung 31: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten bei $600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 32: Korrelation des Hämatokritwertes der Kontrollgruppe bei $600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 33: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe bei $600s^{-1}$</p>
p = 0,63	p = 0,69	p = 0,34
$r^2 = 0,023$	$r^2 = 0,022$	$r^2 = 0,046$

2. Ergebnisse

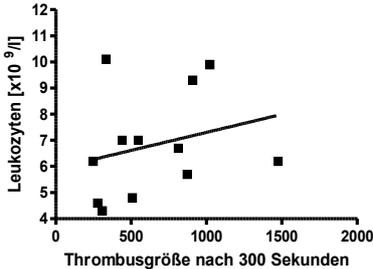
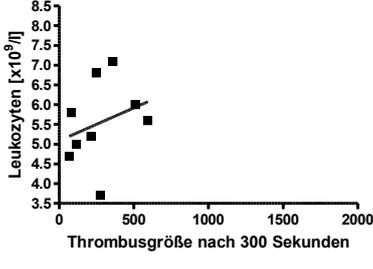
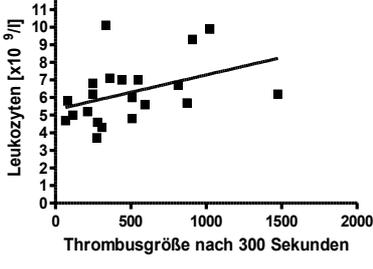
Tabelle 25: Korrelation des Hämatokritwertes für $1600s^{-1}$

HKT = Hämatokritwert, p= p-Wert, r^2 = Determinationskoeffizient;		
Patienten (n=9)	Kontrollgruppe (n=9)	Patienten und Kontrollgruppe
 <p>Abbildung 34: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten bei $1600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 35: Korrelation des Hämatokritwertes der Kontrollgruppe bei $1600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 36: Korrelation des Hämatokritwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei $1600s^{-1}$</p>
p = 0,65	p = 0,27	p = 0,81
$r^2 = 0,029$	$r^2 = 0,168$	$r^2 = 0,18$

2.9 Einfluss des Leukozytenwertes

Es konnte keine Korrelation in allen drei Flussgeschwindigkeiten nachgewiesen werden. Die Korrelationen des Leukozytenwertes in Bezug auf den Endpunkt nach 300 Sekunden sind in den Tabellen 26, 27 und 28 für die drei gemessenen Flussgeschwindigkeiten zu finden.

Tabelle 26: Korrelation des Leukozytenwertes für $100s^{-1}$

p= p-Wert, r^2 = Determinationskoeffizient;		
Patienten (n=12)	Kontrollgruppe (n=9)	Patienten und Kontrollgruppe
 <p>Abbildung 37: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten bei $100s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 38: Korrelation des Leukozytenwertes der Kontrollgruppe bei $100s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 39: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei $100s^{-1}$</p>
p = 0,415	p = 0,443	p = 0,068
$r^2 = 0,07$	$r^2 = 0,08$	$r^2 = 0,17$

2. Ergebnisse

Tabelle 27: Korrelation des Leukozytenwertes für $600s^{-1}$

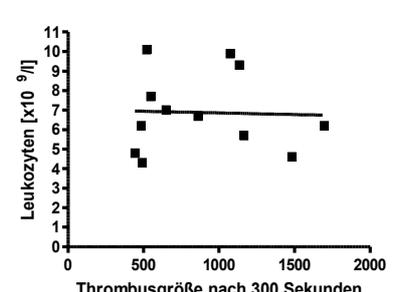
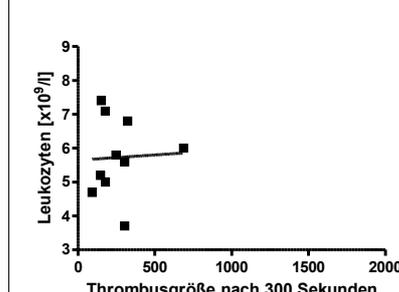
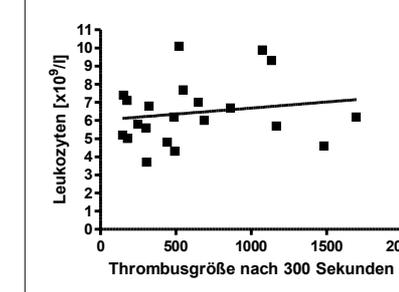
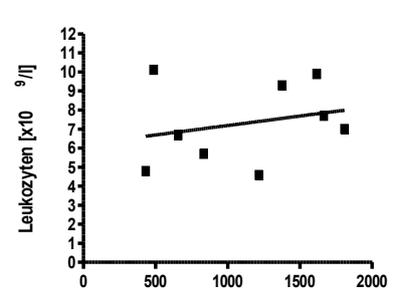
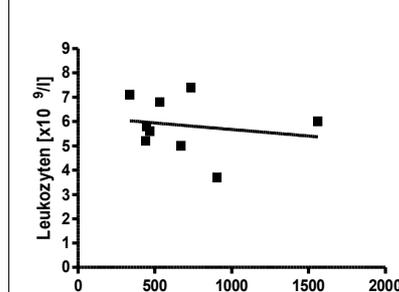
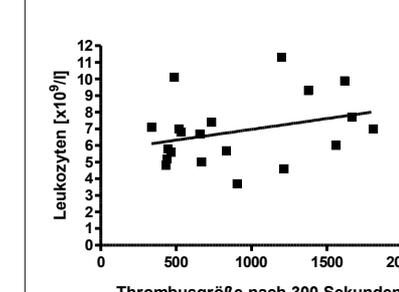
p= p-Wert, r^2 = Determinationskoeffizient;		
Patienten (n=12)	Kontrollgruppe (n=9)	Patienten und Kontrollgruppe
 <p>Abbildung 40: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten bei $600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 41: Korrelation des Leukozytenwertes der Kontrollgruppe bei $600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 42: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei $600s^{-1}$</p>
p = 0,91	p = 0,90	p = 0,45
$r^2 = 0,012$	$r^2 = 0,002$	$r^2 = 0,032$

Tabelle 28: Korrelation des Leukozytenwertes für $1600s^{-1}$

p= p-Wert, r^2 = Determinationskoeffizient;		
Patienten (n=9)	Kontrollgruppe (n=9)	Patienten und Kontrollgruppe
 <p>Abbildung 43: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten bei $1600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 44: Korrelation des Leukozytenwertes der Kontrollgruppe bei $1600s^{-1}$</p>	 <p>Abbildung 45: Korrelation des Leukozytenwertes der PT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei $1600s^{-1}$</p>
p = 0,51	p = 0,65	p = 0,23
$r^2 = 0,063$	$r^2 = 0,03$	$r^2 = 0,087$

2.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Patienten mit Primärer Thrombozythämie unter Therapie mit Aspirin 100 mg/Tag bilden größere Thromben mit höherer Geschwindigkeit bei allen drei Flussgeschwindigkeiten als die Kontrollgruppe, die ebenfalls Aspirin erhalten hatten.

Auf der anderen Seite hatten weder die JAK2^{V617F}-Mutation noch der Hämatokrit oder der Leukozytenwert einen Einfluss auf die Thrombusbildung.

Hinsichtlich des Thrombozytenwertes wurde nur bei der Flussgeschwindigkeit 600s⁻¹ (arterielle Verhältnisse) eine Korrelation zwischen der Höhe des Thrombozytenwertes und dem thrombotischen Potential nachgewiesen.

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird mit dem RTTP erstmalig eine Weiterentwicklung der Perfusionskammern als Thrombose-Modell verwendet. Die ersten dieser Kammern wurden vor mehr als drei Jahrzehnten entwickelt, um die Entstehung von Thromben bzw. einer Thrombose beim Menschen unter definierten Scherbedingungen zu erforschen¹⁰⁷. Seit dieser Zeit sind die Kammern weiterentwickelt worden, um diesen Prozess besser verstehen zu können^{108,109}. Das gemeinsame Charakteristikum dieser Methode ist die Möglichkeit, Thrombozyten-Interaktionen mit einer thrombogenen Oberfläche mit antikoaguliertem oder mit nicht-antikoaguliertem Vollblut zu untersuchen.

Durch den Einsatz dieser Modelle wurden neue Erkenntnisse über die Mechanismen vererbbarer Krankheiten gewonnen, die mit einer Thrombozytenpathologie einhergehen, wie zum Beispiel das von-Willebrand-Syndrom oder ein Defizit von Glykoprotein IIb/IIIa (Glanzmann-Thrombasthenie). Des Weiteren wurde die Rolle von Koagulationsfaktoren für Thrombuswachstum und -stabilität erforscht¹¹⁰.

Die meisten der thrombozytenwirksamen Medikamente, die für die Behandlung einer akuten Thrombose oder zur Prävention eines thromboembolischen Ereignisses eingesetzt werden, haben bei Verwendung dieser Testsysteme eine antithrombotische Wirkung gezeigt, zum Beispiel Eptifibatid (Integrillin®) oder Clopidogrel (Plavix®) und Acetylsalicylsäure^{111,112}. Ein großer Vorteil der Perfusionskammern ist, dass die Entstehung der Thrombusbildung zunächst von der Thrombogenität der Oberfläche reguliert wird, die dem Blutfluss ausgesetzt ist. Dann kommt die Thrombozytenaktivierung im größer werdenden Thrombus hinzu, die die Rekrutierung weiterer zirkulierender, aber noch nicht aktivierter, Thrombozyten fördert, womit auch die Stabilität der Thrombozyten untereinander miteinbezogen wird. Dadurch werden die fördernden Faktoren und die Inhibitoren der Thrombozyten-Adhäsion, -aktivierung sowie Thrombuswachstum, und -stabilität sowie die Kombination dieser untereinander dargestellt.

Der hier verwendete Prototyp RTTP kombiniert die Fähigkeiten der intravitalen Mikroskopie mit denen der Perfusionskammern. Er nutzt die Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten und bietet so die Möglichkeit, die Kinetik der Thrombusbildung in Echtzeit zu begutachten. Die Testung erfolgt dadurch, dass eine Blutprobe über eine mit Kollagen I präparierte thrombogenische Oberfläche geleitet wird. Das für diese Studie verwendete Testmaterial besteht im Gegensatz zu anderen Thrombozytenfunktionstests aus Vollblut, bei denen thrombozytenreiches Plasma verwendet wird (zum Beispiel LTA, Durchflusszytometrie). Bis jetzt größter Nachteil von Messsystemen wie dem RTTP ist die durch die fehlende Verfügbarkeit erschwerte bzw. fehlende Standardisierung und damit Vergleichbarkeit von Studienergebnissen, der relativ hohe Kostenfaktor, die zeitaufwendigen Messungen sowie die Notwendigkeit von geschultem Personal. Da der RTTP nur als Prototyp verfügbar, sind bis dato keine größeren Untersuchungen zur Validität dieser Methode erfolgt.

Die in der Einleitung beschriebenen Testsysteme unterschieden sich bei den verwendeten Blutproben. Die (zum Beispiel durch ADP oder Kollagen) induzierte Thrombozyten-Aggregationsmessung verwendet Vollblut oder häufiger thrombozytenreiches Plasma (PRP). Um PRP zu gewinnen, wird eine Vollblutprobe bei geringer G-Zahl zentrifugiert. Um eine Blutgerinnung zu verhindern, enthält die Blutprobe meist 3,8 % Natriumzitrat oder Heparin. Das so gewonnene PRP besteht somit aus Blutplasma und einer hohen Zahl von Thrombozyten, jedoch praktisch keinen anderen Blutzellen. Vielfach wird dann das PRP einer zusätzlich einer Prozedur unterzogen, um die Thrombozytenzahl anzupassen, was der Thrombozytenaktivierung weiter

3. Diskussion

schadet⁸². Damit handelt es sich also um eine unphysiologische Methode, da die Thrombozyten isoliert im Plasma vorliegen. Dadurch werden unter anderem die Interaktionen mit den anderen Blutzellen und die höheren Scherkräfte im Vollblut nicht berücksichtigt⁵⁹. Zudem wird durch die Zentrifugation eine erhebliche Menge an Thrombozyten vernichtet, vor allem besonders große und junge Thrombozyten⁸⁴. Die Verwendung von Vollblut vermeidet die Zentrifugation und erleichtert somit die Standardisierung, allerdings wird bei den meisten Methoden eine zitratantikoagulierte Blutprobe verwendet. Daher stellen die Testergebnisse nicht die in-vivo-Verhältnisse wieder, nachdem Thrombozyten Kalziumionen benötigen, welche aber durch Citrat gebunden werden¹¹³. In den meisten Testsystemen wird jedoch zitratantikoaguliertes Blut verwendet, wie zum Beispiel im oben beschriebenen PFA-100. Außerdem ist in-vitro die Situation der Thrombozyten eine andere, denn direkt nach der Blutentnahme verändern die Thrombozyten ihre Form, wobei dieser Prozess zeit- und temperaturabhängig ist: in Citrat-Blut oder PRP haben bei Raumtemperatur 30 Minuten nach Blutentnahme 70% aller Thrombozyten Pseudopodien¹¹⁴. Außerdem scheint es, dass die Thrombozyten in PRP leichter aggregieren als in-vivo. Im Gegensatz analysiert der RTTP Vollblut ohne Zentrifugation, was einen deutlich physiologischeren Ansatz darstellt, außerdem wird die Probe sofort nach der Inkubationszeit von 25 Minuten der Analyse zugeführt. Dies erklärt, warum für diese Pilotstudie nur eine begrenzte Anzahl an Patienten zur Verfügung stand.

Weitere Einflussgrößen sind in der Präanalytik zu finden: Art der Blutentnahme, Abnahmezeitpunkt, Zeit zwischen Blutentnahme und Analyse, Transport und Lagerung, sowie Lagerungs- und Messtemperatur. Diese Einflussgrößen gelten sicher für alle Testsysteme, allerdings fehlt hier nach wie vor eine Standardisierung. Des Weiteren gibt es eine große Variabilität von bis zu 30%, wenn die Thrombozytenaggregation zwischen Laboratorien verglichen wird¹¹⁵.

Cesar et al. haben 2005 eine Studie vorgestellt, in der die Messungen der Thrombozytenaggregation bei 55 Patienten mit Primärer Thrombozythämie und 26 gesunden Probanden durch PFA-100 und (LTA-)Aggregometrie verglichen wurden¹¹⁶. Der Vergleich beider Testsysteme zeigte, dass bei 10 Patienten mit pathologischen Ergebnissen in der Aggregometrie diese nicht durch den PFA-100 entdeckt wurden. Umgekehrt wurden bei 11 Patienten, welche im PFA-100 abnormale Ergebnisse aufwiesen, diese nicht durch die Aggregometrie entdeckt. Insgesamt hatten 4 Patienten ein normales Ergebnis in beiden Testsystemen. Dies zeigt, dass beide Tests derzeit für eine individuelle Risikoeinschätzung (noch) nicht zu verwenden sind.

Der RTTP bietet die Möglichkeit der Visualisierung und damit eine Quantifizierung der Thrombus-Adhäsion und -größe, was nicht zuletzt deshalb wichtig ist, da die Thrombozyten bei diesen Patienten morphologische Besonderheiten im Vergleich zu Gesunden aufweisen. 99% der Patienten mit Primärer Thrombozythämie haben sowohl größere wie auch kleinere Thrombozyten, wobei einzelne Thrombozyten die Größe von Erythrozyten erreichen. Diese morphologischen Veränderungen machen sich auch physiologisch bemerkbar, d.h. Thrombozyten reagieren normal auf Acetylsalicylsäure, aber zeigen eine verzögerte Antwort auf Adenosindiphosphat (ADP), Epinephrin und Kollagen.

Wesentliches Ergebnis der Studie ist, dass Patienten mit Primärer Thrombozythämie größere Thromben bei allen drei Flussgeschwindigkeiten bilden als die Kontrollgruppe. Außerdem war die Thrombusbildung in allen drei untersuchten Flussgeschwindigkeiten auch schneller. Dies belegt die klinische Beobachtung, dass eine antiaggregierende Therapie mit Aspirin in vielen Fällen zur effektiven Behandlung der PT nicht ausreicht. Interessanterweise war dieser Effekt bei venösen und arteriellen Flussgeschwindigkeiten zu beobachten.

Da sich die Höhe des Thrombozytenwertes individuell erheblich unterscheiden kann und sich auch im Verlauf der Krankheit verändert, wurde untersucht, inwieweit die Höhe des Thrombozytenwertes und das thrombotische Potenzial korrelieren. Erwartungsgemäß fand sich eine Korrelation in der Geschwindigkeit des Thrombus-Wachstums und der Thrombusgröße bei der arteriellen Flussgeschwindigkeit (600s^{-1}). Diese Korrelation war allerdings bei der Flussgeschwindigkeit von 1600s^{-1} nicht zu finden. Grund dafür könnte ein bei vielen Patienten beschriebener sekundärer von-Willebrand-Faktor-Mangel sein¹¹⁷. Auch konnte im venösen System keine Korrelation nachgewiesen werden, auch wenn man hier einen direkten Einfluss auf Grund von rheologischen Prinzipien erwartet hätte.

Da Thrombosen aber bei Patienten mit Primärer Thrombozythämie sowohl im arteriellen wie auch im venösen System auftreten, muss es außer den Thrombozyten noch weitere Faktoren geben, die einen Einfluss auf die Bildung einer Thrombose haben. Auch wenn die Höhe der Thrombozyten in dem hier vorgestellten Modell per se nicht mit dem Risiko einer Thrombose in allen drei Flussgeschwindigkeiten korreliert, unterstützen die hier erhobenen Daten das derzeit gängige Konzept, dass eine zytoreduktive Therapie das Auftreten von thromboembolischen Ereignissen reduzieren sollte. Die Beantwortung der Frage, inwieweit eine Änderung der ASS Dosierung (Erhöhung bzw. Erniedrigung) die Thrombusbildung beeinflusst, war nicht möglich, da die Ethikkommission diesem Studienkonzept widersprochen hatte.

Als ein weiterer Faktor wird derzeit die Rolle der JAK2^{V617F}-Mutation diskutiert, welche bei etwa 50% der PT Patienten nachweisbar ist^{118,119,120}. Da eine veränderte JAK2-Kinase auch in Thrombozyten vorkommt, wird dadurch möglicherweise auch das Thromboserisiko erhöht. Mehrere klinische Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen dem JAK2 Status und dem Auftreten einer Thrombose belegen^{121,122} was allerdings von anderen Untersuchungen bestritten wurde^{21,34,123,124}. Allerdings zeigten Kravlovics et. al das die Patienten mit der Mutation eine wesentlich längere Krankheitsdauer hatten und auch wesentlich älter waren¹²⁴. Beide Faktoren könnten also auch mit dafür verantwortlich sein, dass diese Gruppe ein höheres Thromboserisiko aufweist. In dieser Arbeit konnte experimentell kein signifikanter Unterschied zwischen positivem und negativem JAK2^{V617F}-Mutationstatus hergestellt werden. In den o.g. Studien wurden weitere Faktoren gefunden: die JAK2 positive Gruppe wies eine wesentlich höhere Hämoglobin-Konzentration zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf, auch ein höherer Leukozytenwert wurde zu diesem Zeitpunkt beobachtet.

Verschiedene Autoren gehen davon aus, dass die Anwesenheit der JAK2-Mutation eine Leukozytose begünstigt und weiter, dass ein hoher Leukozytenwert ein Risikofaktor für die Entstehung einer Thrombose ist¹²². Auch spielt der Leukozytenwert nach dieser Studie eher bei unbehandelten Niedrig-Risiko Patienten eine Rolle als bei behandelten Hoch-Risiko Patienten. Eine mögliche Erklärung für diesen pathophysiologischen Mechanismus, der den Zusammenhang zwischen Leukozytose und Thrombose erklärt, ist, dass bei Patienten mit einer CMPN die neutrophilen Granulozyten in aktivierten Zustand zirkulieren und so in der Lage sind, die Thrombozyten in einem dynamischen adhäsiven Prozess zu binden^{125,126}. Dazu kommt, dass eine Leukozytose möglicherweise bei inflammatorischen Prozessen in atherosklerotischen Plaques eine Rolle spielt und so die Wahrscheinlichkeit eines thromboembolischen Ereignisses erhöht wird^{127,128}. Ein weiterer Hinweis für den Zusammenhang zwischen einer Leukozytose und dem Auftreten einer Thrombose ist die Tatsache, dass Patienten, die eine Behandlung mit dem zytoreduktiven Medikament Hydroxyurea plus Aspirin erfahren haben, eine niedrigere Rate an arteriellen

3. Diskussion

Thrombosen hatten, als Patienten die mit Anagrelid plus Aspirin eingestellt waren⁸⁷. Dies kann daran liegen, dass Hydroxyurea zytoreduktiv auf alle 3 Zellreihen wirkt, während im Gegensatz dazu Anagrelid nur auf die megakaryozytäre Zellreihe Einfluss hat. In der hier vorgestellten Studie konnte weder für den Hämatokrit- noch den Leukozytenwert eine Korrelation nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

1. Petrides PE. CMPE 2008 - Aktuelle Empfehlungen zu Diagnostik und Therapie chronisch myeloproliferativer Erkrankungen. München. 2008.
2. Whichard ZL, Sarkar CA, Kimmel M, Corey SJ. Hematopoiesis and its disorders: a systems biology approach. *Blood*. 2010;115(12):2339-2347.
3. Siegel FP, Petrides PE. Congenital and acquired polycythemia. *Dtsch Arztebl Int*. 2008;105(4):62-68.
4. Bennett M, Grunwald AJ. Hydroxyurea and periodicity in myeloproliferative disease. *Eur. J. Haematol*. 2001;66(5):317-323.
5. von Schulthess GK, Gessner U. Oscillating platelet counts in healthy individuals: experimental investigation and quantitative evaluation of thrombocytopoietic feedback control. *Scand J Haematol*. 1986;36(5):473-9.
6. Morley A, King-Smith EA, Stohlman FJ. Oscillatory nature of hemopoiesis. New York Grune and Stratton, Inc. 1970.
7. Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag GmbH; 2002. 6 korrigierte Auflage:879-947.
8. Kaufman M, Thomas R. Emergence of complex behaviour from simple circuit structures. *C. R. Biol*. 2003;326(2):205-214.
9. Gouzé J-L. Positive and negative circuits in dynamical systems. *J. Biol. Systems*. 1998;6:11-15.
10. Kuter DJ, Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood*. 1995;85(10):2720-2730.
11. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008;112(4):935-945.
12. von Schulthess GK, Gessner U. Oscillating platelet counts in healthy individuals: experimental investigation and quantitative evaluation of thrombocytopoietic feedback control. *Scand J Haematol*. 1986;36(5):473-479.
13. Morley AA. A neutrophil cycle in healthy individuals. *Lancet*. 1966;2(7475):1220-1222.
14. Kojima K, Fujii N, Omoto E, u. a. Cyclic thrombocytopenia and polycythemia vera. *Ann. Hematol*. 2003;82(1):61-63.
15. Morley A. Blood-cell cycles in polycythemia vera. *Australas Ann Med*. 1969;18(2):124-126.
16. Rane SG, Reddy EP. Jaks, stats and src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*. 2002;21(21):3334-3358.
17. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, u. a. A unique clonal jak2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-1148.
18. Jones AV, Kreil S, Zoi K, u. a. Widespread occurrence of the jak2 v617f mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106(6):2162-2168.
19. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, u. a. A gain-of-function mutation of jak2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med*. 2005;352(17):1779-1790.
20. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, u. a. Activating mutation in the tyrosine kinase jak2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-397.
21. Zhao R, Xing S, Li Z, u. a. Identification of an acquired jak2 mutation in polycythemia vera. *J. Biol. Chem*. 2005;280(24):22788-22792.

22. Petrides P, Siegel F, Tauscher J. Neue Aspekte der JAK2-positiven chronischen myeloproliferativen Erkrankungen - kommt nach der diagnostischen nun auch die therapeutische Revolution? *InFoOnkologie*. 2007;(10):510-513.
23. Scott LM, Tong W, Levine RL, u. a. Jak2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007;356(5):459-468.
24. Wautier M-P, El Nemer W, Gane P, u. a. Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by laminin alpha5 chain and lu/bcam. *Blood*. 2007;110(3):894-901.
25. Kutti J, Ridell B. Epidemiology of the myeloproliferative disorders: essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Pathol. Biol.* 2001;49(2):164-166.
26. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, u. a. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative jak2v617f assessment reveal a strong association between clonality and jak2v617f in pv but not et/mmm, and identifies a subset of jak2v617f-negative et and mmm patients with clonal hematopoiesis. *Blood*. 2006;107(10):4139-4141.
27. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, u. a. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(10):2224-2232.
28. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, u. a. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 2004;350(2):114-124.
29. Spivak J. Daily aspirin--only half the answer. *N. Engl. J. Med.* 2004;350(2):99-101.
30. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, u. a. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am. J. Med.* 2004;117(10):755-761.
31. Petrides PE. Primary thrombocythemia: diagnosis and therapy. *Med. Klin. (Munich)*. 2006;101(8):624-634.
32. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, u. a. Jak2v617f mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *British Journal of Haematology*. 2005;131(2):208.
33. Griesshammer M. Risk factors for thrombosis and bleeding and their influence on therapeutic decisions in patients with essential thrombocythemia. *Semin. Thromb. Hemost.* 2006;32(4 Pt 2):372-380.
34. Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to jak2 v617f mutation status. *Haematologica*. 2007;92(1):135.
35. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br. J. Haematol.* 2005;128(3):275-290.
36. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, u. a. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J. Clin. Oncol.* 1990;8(3):556-562.
37. Griesshammer M, Struve S, Barbui T. Management of philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders in pregnancy. *Blood Rev.* 2008;22(5):235-245.
38. Petrides PE. Anagrelide: what was new in 2004 and 2005? *Semin. Thromb. Hemost.* 2006;32(4 Pt 2):399-408.
39. Samuelsson J, Hasselbalch H, Bruserud O, u. a. A phase ii trial of pegylated interferon alpha-2b therapy for polycythemia vera and essential thrombocythemia: feasibility, clinical and biologic effects, and impact on quality of life. *Cancer*. 2006;106(11):2397-2405.
40. De Stefano V, Za T, Rossi E, u. a. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*.

- 2008;93(3):372-380.
41. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, u. a. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 1995;332(17):1132-1136.
 42. Abdulkarim K, Girodon F, Johansson P, u. a. Aml transformation in 56 patients with ph- mpd in two well defined populations. *Eur. J. Haematol.* 2009;82(2):106-111.
 43. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 world health organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia.* 2008;22(1):14-22.
 44. Michiels JJ, Berneman ZN, Schroyens W, Van Vliet HHD. Pathophysiology and treatment of platelet-mediated microvascular disturbances, major thrombosis and bleeding complications in essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *Platelets.* 2004;15(2):67-84.
 45. Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B, Furie BC. Glycoprotein vi-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood.* 2006;107(10):3902-3906.
 46. Mangin P, Yap CL, Nonne C, u. a. Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet gpvi/fcrgamma deficiency. *Blood.* 2006;107(11):4346-4353.
 47. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J. Clin. Invest.* 2005;115(12):3355-3362.
 48. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(9):938-949.
 49. Regev A, Stark P, Blickstein D, Lahav M. Thrombotic complications in essential thrombocythemia with relatively low platelet counts. *Am. J. Hematol.* 1997;56(3):168-172.
 50. Yarbrow JW. Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin. Oncol.* 1992;19(3 Suppl 9):1-10.
 51. Burthem J, Chaudhry MS. Hydroxycarbamide associated platelet count oscillations in a patient with polycythaemia vera. a case report and review of the literature. *Platelets.* 2008;19(3):234-235.
 52. Steensma DP, Harrison CN, Tefferi A. Hydroxyurea-associated platelet count oscillations in polycythemia vera: a report of four new cases and a review. *Leuk. Lymphoma.* 2001;42(6):1243-1253.
 53. Tefferi A, Elliott MA, Kao PC, u. a. Hydroxyurea-induced marked oscillations of platelet counts in patients with polycythemia vera. *Blood.* 2000;96(4):1582-1584.
 54. Roth GJ, Calverley DC. Aspirin, platelets, and thrombosis: theory and practice. *Blood.* 1994;83(4):885-898.
 55. Encke A, Haas S, Krauspe R. Stationäre und ambulante Thromboembolieprophylaxe in der Chirurgie und der perioperativen Medizin - interdisziplinäre Leitlinie. *Phlebologie.* 2003; (32):164-9.
 56. Moerchel C, Kroeger K. Prophylaxe tiefer Bein- und Beckenvenenthrombose. (Dtsch Arztebl 2007; 104(42);):
 57. Harrison P. Assessment of platelet function in the laboratory. *Hämostaseologie.* 2009;29(1):25-31.
 58. Maurin N. Rational hemostatic screening. *Med. Klin. (Munich).* 1999;94(3):165-169.
 59. Wolf Z, Mani H, Lindhoff-Last E. Stellenwert der Thrombozytenfunktionsdiagnostik. *Internist.* 2010;51(9):1095-1108.
 60. Holme S, Murphy S. Platelet abnormalities in myeloproliferative disorders. *Clin. Lab. Med.* 1990;10(4):873-888.
 61. Avram S, Lupu A, Angelescu S, Olteanu N, Mut-Popescu D. Abnormalities of platelet aggregation in chronic myeloproliferative disorders. *J. Cell. Mol. Med.* 2001;5(1):79-87.
 62. Tsantes AE, Mantzios G, Giannopoulou V, u. a. Monitoring aspirin treatment in patients with thrombocytosis: comparison of the platelet function analyzer (pfa)-100 with optical aggregometry. *Thromb. Res.* 2008;123(1):100-107.

63. Yamamoto K, Sekiguchi E, Takatani O. Abnormalities of epinephrine-induced platelet aggregation and adenine nucleotides in myeloproliferative disorders. *Thromb. Haemost.* 1984;52(3):292-296.
64. Robier C, Neubauer M, Sternad H, u. a. Evaluation of platelet function and pharmacological platelet inhibition in patients with myeloproliferative disorders using multiple electrode aggregometry. *Thromb. Res.* 2010;126(3):232-237.
65. Manoharan A, Gemmell R, Brighton T, u. a. Thrombosis and bleeding in myeloproliferative disorders: identification of at-risk patients with whole blood platelet aggregation studies. *Br. J. Haematol.* 1999;105(3):618-625.
66. Favalaro EJ. Clinical utility of the pfa-100. *Semin. Thromb. Hemost.* 2008;34(8):709-733.
67. Chakroun T, Gerotziafas G, Robert F, u. a. In vitro aspirin resistance detected by pfa-100 closure time: pivotal role of plasma von willebrand factor. *Br. J. Haematol.* 2004;124(1):80-85.
68. Harrison P. The role of pfa-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br. J. Haematol.* 2005;130(1):3-10.
69. Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, u. a. Evaluation of the pfa-100 system in the diagnosis and therapeutic monitoring of patients with von willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 1999;82(1):35-39.
70. Cattaneo M, Lecchi A, Agati B, Lombardi R, Zighetti ML. Evaluation of platelet function with the pfa-100 system in patients with congenital defects of platelet secretion. *Thromb. Res.* 1999;96(3):213-217.
71. Escolar G, Cases A, Viñas M, u. a. Evaluation of acquired platelet dysfunctions in uremic and cirrhotic patients using the platelet function analyzer (pfa-100): influence of hematocrit elevation. *Haematologica.* 1999;84(7):614-619.
72. Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, u. a. Monitoring of aspirin (asa) pharmacodynamics with the platelet function analyzer pfa-100. *Thromb. Haemost.* 2000;83(2):316-321.
73. Malinin A, Pokov A, Spergling M, u. a. Monitoring platelet inhibition after clopidogrel with the verifynow-p2y12® rapid analyzer: the verify thrombosis risk assessment (veritas) study. *Thrombosis Research.* 2007;119(3):277-284.
74. Ott C, Lardi E, Schulzki T, Reinhart WH. The influence of erythrocyte aggregation on induced platelet aggregation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010;45(2-4):375-382.
75. Hamel-Jolette A, Dunn M, Bédard C. Plateletworks: a screening assay for clopidogrel therapy monitoring in healthy cats. *Can J Vet Res.* 2009;73(1):73-76.
76. Hanke AA, Roberg K, Monaca E, u. a. Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (multiplate). *Eur. J. Med. Res.* 2010;15(5):214-219.
77. Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb. Haemost.* 2006;96(6):781-788.
78. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods.* 1980;3(2):135-158.
79. Raman BK, Van Slyck EJ, Riddle J, u. a. Platelet function and structure in myeloproliferative disease, myelodysplastic syndrome, and secondary thrombocytosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 1989;91(6):647-655.
80. Harrison P, Segal H, Blasbery K, u. a. Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. *Stroke.* 2005;36(5):1001-1005.
81. Malinin AI, Atar D, Callahan KP, McKenzie ME, Serebruany VL. Effect of a single dose aspirin on platelets in humans with multiple risk factors for coronary artery disease. *Eur. J.*

- Pharmacol.* 2003;462(1-3):139-143.
82. Breddin HK. Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets.* 2005;16(3-4):151-158.
 83. Linden MD, Frelinger AL, Barnard MR, u. a. Application of flow cytometry to platelet disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 2004;30(5):501-511.
 84. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular vasp phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb. Haemost.* 1999;82(3):1145-1152.
 85. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, u. a. European working group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb. Haemost.* 1998;79(5):885-896.
 86. Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *J. Thromb. Haemost.* 2008;6(4):677-683.
 87. Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood.* 1999;93(2):417-424.
 88. 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(1):29-39.
 89. Lomb NR. Least-squares frequency analysis of unequally spaced data. *Astrophys Space Sci.* 1976;39(2):447-462.
 90. Laguna P, Moody GB, Mark RG. Power spectral density of unevenly sampled data by least-square analysis: performance and application to heart rate signals. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1998;45(6):698-715.
 91. Moody GB. Spectral analysis of heart rate without resampling. *Proceedings of Computers in Cardiology Conference.* 1993;715-718.
 92. Tauscher J, Siegel F, Petrides PE. Hydroxyurea induced oscillations in twelve patients with polycythemia vera. *Haematologica.* 2010;95(7):1227-1229.
 93. Buckley MF, James JW, Brown DE, u. a. A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count. *Thromb. Haemost.* 2000;83(3):480-484.
 94. Hirayama Y, Sakamaki S, Tsuji Y, Matsunaga T, Niitsu Y. Cyclic platelet and leukocyte count oscillation in chronic myelocytic leukemia regulated by the negative feedback of transforming growth factor beta. *Int. J. Hematol.* 2003;77(1):71-74.
 95. Chang HL, Baserga R. Time of replication of genes responsible for a temperature-sensitive function in a cell cycle-specific ts mutant from a hamster cell line. *J. Cell. Physiol.* 1977;92(3):333-343.
 96. Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood.* 2002;100(13):4272-4290.
 97. Petrides PE, Gisslinger H, Steurer M, u. a. Pharmacokinetics, bioequivalence, tolerability, and effects on platelet counts of two formulations of anagrelide in healthy volunteers and patients with thrombocythemia associated with chronic myeloproliferation. *Clin Ther.* 2009;31(2):386-398.
 98. Giles C. The platelet count and mean platelet volume. *Br. J. Haematol.* 1981;48(1):31-37.
 99. Bain BJ. Platelet count and platelet size in males and females. *Scand J Haematol.* 1985;35(1):77-79.
 100. Michiels JJ, Berneman ZN, Schroyens W, Van Vliet HHDM. Pathophysiology and treatment of platelet-mediated microvascular disturbances, major thrombosis and bleeding complications

- in essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *Platelets*. 2004;15(2):67-84.
101. Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, u. a. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and jak2 mutation status. *Blood*. 2007;109(6):2310-2313.
 102. Harker LA, Roskos LK, Marzec UM, u. a. Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood*. 2000;95(8):2514.
 103. Bautista AP, Buckler PW, Towler HM, Dawson AA, Bennett B. Measurement of platelet life-span in normal subjects and patients with myeloproliferative disease with indium oxine labelled platelets. *Br. J. Haematol*. 1984;58(4):679-687.
 104. Krishnan SM, Dixit NM. Estimation of red blood cell lifespan from alveolar carbon monoxide measurements. *Transl Res*. 2009;154(1):15-17.
 105. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, u. a. Proposals and rationale for revision of the world health organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007;110(4):1092-1097.
 106. Gurbel PA, Bliden KP, Antonino MJ, u. a. The effect of elinogrel on high platelet reactivity during dual antiplatelet therapy and the relation to cyp 2c19*2 genotype: first experience in patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8(1):43-53.
 107. Baumgartner HR. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition, and formation of mural thrombi. *Microvasc. Res*. 1973;5(2):167-179.
 108. Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation*. 1992;86(6 Suppl):III74-85.
 109. Sakariassen KS, Turitto VT, Baumgartner HR. Recollections of the development of flow devices for studying mechanisms of hemostasis and thrombosis in flowing whole blood. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2:1681-1690.
 110. Sakariassen KS, Hanson SR, Cadroy Y. Methods and models to evaluate shear-dependent and surface reactivity-dependent antithrombotic efficacy. *Thromb. Res*. 2001;104(3):149-174.
 111. Lev EI, Hasdai D, Scapa E, u. a. Administration of eptifibatid to acute coronary syndrome patients receiving enoxaparin or unfractionated heparin: effect on platelet function and thrombus formation. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2004;43(6):966-971.
 112. Cadroy Y, Bossavy JP, Thalamas C, u. a. Early potent antithrombotic effect with combined aspirin and a loading dose of clopidogrel on experimental arterial thrombogenesis in humans. *Am Heart Assoc*; 2000.
 113. Bouchard BA, Tracy PB. Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr. Opin. Hematol*. 2001;8(5):263-269.
 114. Abbate R, Favilla S, Boddi M, Costanzo G, Prisco D. Factors influencing platelet aggregation in whole blood. *Am. J. Clin. Pathol*. 1986;86(1):91-96.
 115. Cannon CP, McCabe CH, Borzak S, u. a. Randomized trial of an oral platelet glycoprotein iib/iiiia antagonist, sibrifiban, in patients after an acute coronary syndrome: results of the timi 12 trial. thrombolysis in myocardial infarction. *Circulation*. 1998;97(4):340-349.
 116. Cesar JM, de Miguel D, García Avello A, Burgaleta C. Platelet dysfunction in primary thrombocythemia using the platelet function analyzer, pfa-100. *Am. J. Clin. Pathol*. 2005;123(5):772-777.
 117. Turitto VT, Weiss HJ, Baumgartner HR. Platelet interaction with rabbit subendothelium in von willebrand's disease: altered thrombus formation distinct from defective platelet adhesion. *J. Clin. Invest*. 1984;74(5):1730-1741.
 118. Austin SK, Lambert JR. The jak2 v617f mutation and thrombosis. *Br. J. Haematol*.

- 2008;143(3):307-320.
119. Hexner EO. Jak2 v617f: implications for thrombosis in myeloproliferative diseases. *Curr. Opin. Hematol.* 2007;14(5):450-454.
120. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, u. a. Jak2v617f mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *British Journal of Haematology.* 2005;131(2):208.
121. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, u. a. Jak2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br. J. Haematol.* 2005;131(2):208-213.
122. Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, u. a. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J. Clin. Oncol.* 2008;26(16):2732-2736.
123. Heller PG, Lev PR, Salim JP, u. a. Jak2v617f mutation in platelets from essential thrombocythemia patients: correlation with clinical features and analysis of stat5 phosphorylation status. *Eur. J. Haematol.* 2006;77(3):210-216.
124. Kralovics R, Teo S-S, Buser AS, u. a. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the v617f mutation of jak2. *Blood.* 2005;106(10):3374-3376.
125. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp. Hematol.* 2005;33(5):523-530.
126. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, u. a. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the jak2 mutational status. *Haematologica.* 2006;91(2):169-175.
127. Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA, u. a. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke.* 2004;35(5):1147-1152.
128. Collier BS. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25(4):658-670.

Lebenslauf

Name	Jan Tauscher
Geburtsdatum	29.10.79
Geburtsort	Oberstdorf
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1986 - 1990	Grundschule Oberstdorf
1990 - 1999	Gertrud-von-le-Fort-Gymnasium Oberstdorf
Juni 1999	Abitur

Universität

2001 - 2008	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Dezember 2008	Staatsexamen in München
Januar 2009	Approbation als Arzt

Promotion

Januar 2007 - August 2011	Doktorarbeit bei Prof. Dr. med. Petro E. Petrides, Hämatologisch-onkologische Schwerpunktpraxis, München
---------------------------	--

Beruf

seit August 2009	Assistenzarzt der Inneren Abteilung, Krankenhaus Oberstdorf
------------------	---

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Tauscher J, Siegel F, and Petrides PE. Hydroxyurea induced oscillations in twelve patients with polycythemia vera. *Haematologica* 2010; 95:1227-1229.

Gillian Stephens*, Jan Tauscher*, Patrick Andre, Fabian P. Siegel, David R. Phillips and Petro E. Petrides. Sub-optimal inhibition of thrombus formation ex vivo by aspirin in Primary Thrombocythemia. Submitted. *These authors contributed equally to this work and are listed in alphabetical order

Übersichtsarbeit

Petrides PE, Siegel F, Tauscher J. Neue Aspekte der JAK2-positiven chronischen myeloproliferativen Erkrankungen. *InFoOnkologie* 2007;10:510- 513.

Poster-Präsentationen

Stephens G*, Tauscher J*, Siegel F, Phillips DR, Andre P and Petrides PE. Sub-Optimal Inhibition of Thrombus Formation by Aspirin (as measured by RTTP analysis) In Primary Thrombocythemia. 52nd ASH Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology, December 4-7, 2010, Orlando, FL, USA. *These authors contributed equally to this work and are listed in alphabetical order

Abstracts:

Tauscher J, Siegel FP, Petrides PE. Oscillations of Platelets and Leukocytes in Patients With Polycythemia Vera Under Treatment With Hydroxyurea: Analysis of 5 Individuals From Germany. *Haematologica* 2007; 92(s1): 397-398.

Siegel FP, Tauscher J, Petrides PE. Bleeding Risk in ET Patients With a Platelet Count of More Than 1.5 Million per microliter: A Mandatory Criterium For The Initiation of Cytoreductive Therapy? *Haematologica* 2007; 92(s1): 528.

Danksagung

Bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Dieser Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Petro E. Petrides, der mir dieses Thema zur Bearbeitung überließ und mir damit den Einstieg in die Grundlagenforschung ermöglichte. Insbesondere möchte ich mich für die exzellente Betreuung und die Schaffung idealer Arbeitsbedingungen bedanken.

Bei meinem Mitdoktoranden Fabian P. Siegel bedanke ich mich für die stetige Unterstützung, die motivierenden und kreativen Gespräche und für die gemeinsam erlebte Zeit.

CMPE e.V. übernahm die Reisekosten nach San Francisco zum Erlernen der Handhabung des RTTP und während der Versuche die Kosten der verschiedenen Reagenzien. Vielen Dank hierfür.

Portola Pharmaceuticals Inc. danke ich für die Bereitstellung des RTTP. Für die immer tatkräftige Hilfe per Email bei Fragen hinsichtlich der technischen Durchführung danke ich Gillian Stephens.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Hämatologisch-Onkologischen Schwerpunktpraxis am Isartor für ihre große Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglichten und mich auch danach zu jeder Zeit unterstützen.

Anhang

1. PERL Programm

```
#!/usr/bin/perl
use DBI;
use Time::Local;
use HTML::Entities;

$database = 'xxxx';
$dbuser = 'xxxx';
$dbpasswd = 'xxxx';

# -----
# input GET data

$query_string = $ENV{'QUERY_STRING'};

## @arguments = split /&/, $ARGV[0];
@arguments = split /&/, $query_string;
%args = ();

foreach $i (@arguments) {
    ($var, $value) = split /=/, $i, 2;
    $args{$var} = $value;
}

if ((exists $args{patientid})) {
    overview($args{patientid}, $args{startdate}, $args{stopdate}, $args{datasource})
} else {
    overview(0,0,0);
}

exit(0);

sub overview {
    my $patient_id = shift;
    my $startdate = shift;
    my $stopdate = shift;
    my $datasource = shift;

    my $table;
    my $field_patient_id;
```

Anhang

```
my $field_date;
my $field_type;
my $field_value;
my $type_wbc;
my $type_plt;
my $type_hb;
my $type_ery;
my $type_mcv;
my $type_hkt;
my $type_mch;
my $type_mchc;
my $type_mpv;
my $type_lym;
my $type_mon;
my $type_gra;
my $type_pdw;
my $type_pct;

if ( $datasource == 1 ) {
    $table = "pvcycle";
    $field_patient_id = "patient_id";
    $field_date = "date";
    $field_type = "type";
    $field_value = "value";

    $type_wbc = "WBC";
    $type_plt = "PLT";
    $type_hb = "HB";
    $type_ery = "ERYS";
    $type_mcv = "MCV";
    $type_hkt = "HKT";
}

if ( $datasource == 2 ) {
    $table = "cycle_records";
    $field_patient_id = "patient_id";
    $field_date = "date";
    $field_type = "type";
    $field_value = "value";

    $type_wbc = "WBC";
    $type_plt = "PLT";
    $type_hb = "HB";
    $type_ery = "ERYS";
```

Anhang

```
Stype_mcv = "MCV";
Stype_hkt = "HCT";
}

if ( $datasource == 3 ) {
Stable = "hemresults";
Sfield_patient_id = "PTID";
Sfield_date = "DateRcvd";
Sfield_type = "Test";
Sfield_value = "Result";

Stype_wbc = "WBC";
Stype_plt = "PLT";
Stype_hb = "HB";
Stype_ery = "RBC";
Stype_mcv = "MCV";
Stype_hkt = "HCT";
Stype_mch = "MCH";
Stype_mchc = "MCHC";
Stype_mpv = "MPV";
Stype_lym = "LYM#";
Stype_mon = "MON#";
Stype_gra = "GRA#";
Stype_pdw = "PDW";
Stype_pct = "PCT";
}

print STDOUT "Content-type: text/html\n\n";
print STDOUT <<EOF;
<!DOCTYPE html PUBLIC "-//W3C//DTD HTML 4.01//EN">
<html>
<head>
<title>Analysis - Polycythemia Vera Cycles</title>
<link rel="stylesheet" type="text/css" href="/css/default.css" media="screen" title="default">
<style type="text/css">
body, div, span, p, h1, h2, h3, ul, li, a, td, th, select, input, textarea { font-family: Arial, Helvetica, Swiss, Futura, sans-serif;}
body, p, ul, li, a, h3, th, td { font-size: 10pt; color: #000000;}
h1 { font-weight: bold; font-size: 12pt; color: #000000; margin-bottom: 8px; text-decoration: none;}
h2 { font-weight: bold; font-size: 11pt; color: #000000; margin-top: 16px; margin-bottom: 8px; text-decoration: none;}
h3 { font-weight: bold; text-decoration : none;}
th { font-weight: bold; text-align: left;}

a:link { font-weight: normal; color:#0000E0; text-decoration:none }
a:visited { font-weight: normal; color:#0000E0; text-decoration:none }
```

Anhang

```
a:hover { font-weight: normal; color:#E00000; text-decoration:none }
a:active { font-weight: normal; color:#E00000; text-decoration:underline }
a:focus { font-weight: normal; color:#E00000; text-decoration:underline }

</style>
</head>
<body>
<div id="header">
  <h1>Analysis - PV Cycles</h1>
</div>
EOF
#####
print STDOUT "<h3>Overview</h2>\n";
print STDOUT " <p>\n";
print STDOUT " <form action="/analysis.pl" method="get" style="width:70%; margin-left:auto; margin-right:auto">\n";
print STDOUT " <p>table:<br><input name="datasource" type="text" size="30" maxlength="30" value="$datasource"></p>\n";
print STDOUT " <p>patientid:<br><input name="patientid" type="text" size="30" maxlength="30" value="$patient_id"></p>\n";
print STDOUT " <p>startdate:<br><input name="startdate" type="text" size="30" maxlength="40" value="$startdate"></p>\n";
print STDOUT " <p>stopdate:<br><input name="stopdate" type="text" size="30" maxlength="40" value="$stopdate"></p>\n";
print STDOUT " <p><input type="submit" value=" Absenden " "></p>\n";
print STDOUT " </form>\n";
print STDOUT "<hr>\n";
print STDOUT " <p>\n";
print STDOUT " Patient ID: $patient_id<br>\n";
print STDOUT " Period: $startdate - $stopdate\n";
print STDOUT " </p>\n";
displayanalysis("Platelet Overview", "overview", $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("Platelet", $type_plt, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("Hematocrit", $type_hkt, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("WBC", $type_wbc, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("Hemoglobin", $type_hb, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("Erythrocytes", $type_ery, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("MCV", $type_mcv, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("MCH", $type_mch, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("MCHC", $type_mchc, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("MPV", $type_mpv, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("LYM#", $type_lym, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("MON#", $type_mon, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("GRA#", $type_gra, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("PDW", $type_pdw, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
displayanalysis("PCT", $type_pct, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);
print STDOUT "<br><br>";
print STDOUT "</p>";
print STDOUT "<hr>\n";
```

Anhang

```
print STDOUT "<div id=\"footer\">\n";
print STDOUT " 2007 by Jan Tauscher, Fabian Siegel, Petro E. Petrides\n";
print STDOUT "</div>\n";
print STDOUT "</body>\n";
return;
    }
#####
# analyse ($stype, patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value)
#####
sub analyse {
    my $stype = shift;
    my $patient_id = shift;
    my $startdate = shift;
    my $stopdate = shift;
    my $table = shift;
    my $field_patient_id = shift;
    my $field_date = shift;
    my $field_type = shift;
    my $field_value = shift;

    my $datafile = "tables/$stype.$$txt";
    my $lombfile = "tables/$stype.$$lomb.txt";

    my $maxrecordeddate_days;
    my $minrecordeddate_days;
    my $stopdate_days;
    my $startdate_days;
    my $zenith;
    my $nadir;

    my $dbh = DBI->connect("dbi:mysql:$database",$dbuser,$dbpasswd)
        or die "Couldn't connect to database: " . DBI->errstr;
    ### determine first date
    my $analysis_sth = $dbh->prepare("SELECT MAX($field_date),MIN($field_date),
MAX(TO_DAYS($field_date)),MIN(TO_DAYS($field_date)),TO_DAYS(?)-MIN(TO_DAYS($field_date)),TO_DAYS(?)-
MIN(TO_DAYS($field_date)) FROM `$table` WHERE ($field_patient_id=?)")
        or die "Couldn't prepare statement: " . $dbh->errstr;
    $analysis_sth->execute($stopdate, $startdate, $patient_id);
    my @data = $analysis_sth->fetchrow_array();
    $maxrecordeddate    = $data[0];
    $minrecordeddate    = $data[1];
    $maxrecordeddate_days = $data[2];
    $minrecordeddate_days = $data[3];
    $stopdate_days     = $data[4];
    $startdate_days    = $data[5];
```

Anhang

```
if ( $type eq "overview" )
{
    $type = "PLT";
    $stopdate = $maxrecordeddate;
    $startdate = $minrecordeddate;
}

my $analysis_sth = $dbh->prepare("SELECT TO_DAYS($field_date)-?, $field_value FROM `stable` WHERE ($field_patient_id=? and
$field_type=? and $field_date>=? and $field_date<=?) order by $field_date")
    or die "Couldn't prepare statement: " . $dbh->errstr;

$analysis_sth->execute($minrecordeddate_days,$patient_id,$type,$startdate,$stopdate);
# print STDOUT "$startdate,$patient_id,$type,$startdate,$stopdate";

my $numoflines=0;
$zenith = -1;
$nadir = 1000000000;
open(DAT,">$datafile") || die("Cannot Open File");

while (my @data = $analysis_sth->fetchrow_array()) {
    $data[1]=~ s/^\./;

    if ( $zenith < $data[1] ) {
        $zenith = $data[1];
    }
    if ( $nadir > $data[1] ) {
        $nadir = $data[1];
    }
    print DAT "$data[0] $data[1]\n";
    $numoflines = $numoflines +1;
}
close(DAT);
if ( $numoflines > 0 ) {
    system "./lomb $datafile > $lombfile";
}
return ($numoflines, $datafile, $lombfile, $startdate_days, $stopdate_days, $zenith, $nadir, $maxrecordeddate, $minrecordeddate);
}
#####
# percent ($value)
#####
sub percent {
    my $value = shift;
    return int($value*1000+0.5)/10;
}
#####
```

Anhang

```
# send_data_to_gnuplot ($datafile, $flag, $nameofchart); + evtl. $startdate_days, $stopdate_days
#####
sub send_data_to_gnuplot
{
  my $datafile = shift;
  my $flag = shift;
  my $nameofchart = shift;
  my $startdate_days = shift;;
  my $stopdate_days = shift;
  my $gnuplot = "/usr/bin/gnuplot";
  my $color=1;
  my $pngoutputfile = $datafile;
  $pngoutputfile=~ s/txt/png/;
  $pngoutputfile=~ s/tables/images/;
  my $pdfoutputfile= $pngoutputfile.".svg";
  my $x=0.8;
  my $y=0.8;
  my $xlabel = "days";
  my $graphtype = "lines";
  if ($flag eq "data") {
    $xlabel = "days";
    $graphtype = "lines";
  }
  if ($flag eq "lomb") {
    $xlabel = "1/days";
    $graphtype = "impulses";
  }
  open (GNUPLOT, "|$gnuplot");
  print GNUPLOT <<gnuplot_Commands_Done;
  set term png
  set output "$pngoutputfile"
  set size $x, $y
  set title "$nameofchart"
  set xlabel "$xlabel"
  set ylabel "$type"
  set nozeroaxis
  set noyzeroaxis
  set border
  set nogrid
  set nokey
gnuplot_Commands_Done
  if ( $flag eq "overview" ) {
    print GNUPLOT "set arrow from $startdate_days,0 to $startdate_days,1500 linetype 3 nohead\n";
    print GNUPLOT "set arrow from $stopdate_days,0 to $stopdate_days,1500 linetype 3 nohead\n";
```

Anhang

```
}
  print GNUPLOT "plot \"$datafile\" with $graphtype $color\n";
print GNUPLOT "set terminal svg size 600 480 dynamic\n";
print GNUPLOT "set output \"$pdfoutputfile.tmp\"\n";
print GNUPLOT "plot \"$datafile\" with $graphtype $color\n";
close (GNUPLOT);
system "sed -f gnuplotxml.sed $pdfoutputfile.tmp >$pdfoutputfile";
return $pngoutputfile;
}
#####
# determine_frequency($datafile,$days_analysed)
#####
sub determine_frequency
{
  my $datafile = shift;
  my $days_analysed = shift;
  open(DAT, $datafile) || die("Could not open file $datafile!");
  @raw_data=<DAT>;
  close(DAT);
  my $mainpower = 0;
  my $mainfrequency = 0;
  foreach $line (@raw_data)
  {
    chop($line);
    ($frequency,$power)=split(/\t,$line);
    if ( $power>$mainpower )
    {
      $mainpower = $power;
      $mainfrequency = $frequency;
    }
  }
}
print STDOUT " <tr><td>main frequency:</td><td> $mainfrequency 1/days</td></tr>\n";
print STDOUT " <tr><td>Power</td><td>$mainpower</td></tr>\n";
if ( $mainfrequency != 0 ) {
  print STDOUT " <tr><td>Periodicity</td><td> ".round(1/$mainfrequency,2)." days ";
  if ( $days_analysed < (1/$mainfrequency) ) {
    print STDOUT "<em>(no periodicity detected)</em>";
  }
  print STDOUT "</td></tr>\n";
}
return;
}
#####
# round ($value,$digits)
```

Anhang

```
#####
sub round {
  my $value = shift;
  my $digits = shift;
  return (int($value*(10 ** $digits) + .5))/(10 ** $digits);
}
#####
# displayanalysis ($name, $type, $patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value)
#####
sub displayanalysis {
  my $name = shift;
  my $type = shift;
  my $patient_id = shift;
  my $startdate = shift;
  my $stopdate = shift;
  my $table = shift;
  my $field_patient_id = shift;
  my $field_date = shift;
  my $field_type = shift;
  my $field_value = shift;
  my $numofvalues = 0;
  my $datafile = "";
  my $lombfile = "";
  my $startdate_days;
  my $stopdate_days;
  my $zenith;
  my $nadir;
  my $maxrecordeddate;
  my $minrecordeddate;

  ($numofvalues, $datafile, $lombfile, $startdate_days, $stopdate_days, $zenith, $nadir, $maxrecordeddate, $minrecordeddate) = analyse($type,
$patient_id, $startdate, $stopdate, $table, $field_patient_id, $field_date, $field_type, $field_value);

  print STDOUT "<hr>\n";
  print STDOUT "<h3>$name</h3>\n";
  print STDOUT "<p>\n";
  print STDOUT " Recorded period: $minrecordeddate - $maxrecordeddate<br>\n";
  print STDOUT " Displayed period: $startdate - $stopdate<br>\n";
  print STDOUT " in days: $startdate_days - $stopdate_days<br>\n";

  if ( $numofvalues > 0 ) {
    if ( $type eq "overview" ) {
      my $dataimagefile = send_data_to_gnuplot($datafile, "overview", $name, $startdate_days, $stopdate_days);
      print STDOUT "<a href=\"$dataimagefile.svg\"><img src=\"$dataimagefile\" border=\"0\"></a><br>\n";
      print STDOUT "<a href=\"$datafile\">Download $name raw data (csv)</a><br>\n";
    }
  }
}
```

```
} else {
  my $dataimagefile = send_data_to_gnuplot($datafile, "data", $name);
  my $lombimagefile = send_data_to_gnuplot($lombfile, "lomb", ($name." - Lomb analysis"));

  print STDOUT "<a href=\"\$dataimagefile.svg\"><img src=\"\$dataimagefile\" border=\"0\"></a>\n";
  #print STDOUT "<object data=\"\$dataimagefile.svg\" type=\"image/svg+xml\" style=\"width:15cm; height: 15cm\">\n";
  #print STDOUT "  <a href=\"\$dataimagefile.svg\"><img src=\"\$dataimagefile\" border=\"0\"></a>\n";
  #print STDOUT "</object>\n";
  print STDOUT "<a href=\"\$lombimagefile.svg\"><img src=\"\$lombimagefile\" border=\"0\"><br>\n";
  #print STDOUT "<object data=\"\$lombimagefile.svg\" type=\"image/svg+xml\" style=\"width:15cm; height: 15cm\">\n";
  #print STDOUT "  <a href=\"\$lombimagefile.svg\"><img src=\"\$lombimagefile\" border=\"0\"></a>\n";
  #print STDOUT "</object><br>\n";
  print STDOUT "<a href=\"\$datafile\">Download $name raw data (csv)</a><br>\n";
  print STDOUT "<a href=\"\$lombfile\">Download $name lomb analysis (csv)</a><br>\n";
  print STDOUT "<table border=\"0\">\n";
  print STDOUT "  <tr><td>days analysed</td><td>.(\$stopdate_days-$startdate_days).</td></tr>\n";
  print STDOUT "  <tr><td>Zenith</td><td>$zenith</td></tr>\n";
  print STDOUT "  <tr><td>Nadir</td><td>$nadir</td></tr>\n";
  determine_frequency($lombfile, $stopdate_days-$startdate_days);
  print STDOUT "</table>\n";
}
} else {
  print STDOUT "no data available<br>\n";
}
print STDOUT "</p>\n";
return;
}
```

2. Lomb-Analyse-Programm

Lomb periodogram of real data - Copyright (C) 1992-2010 George B. Moody

This program is free software; you can redistribute it and/or modify it under the terms of the GNU General Public License as published by the Free Software Foundation; either version 2 of the License, or (at your option) any later version.

This program is distributed in the hope that it will be useful, but WITHOUT ANY WARRANTY; without even the implied warranty of MERCHANTABILITY or FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. See the GNU General Public License for more details.

You should have received a copy of the GNU General Public License along with this program; if not, write to the Free Software Foundation, Inc., 59 Temple Place - Suite 330, Boston, MA 02111-1307, USA.

You may contact the author by e-mail (george@mit.edu) or postal mail (MIT Room E25-505A, Cambridge, MA 02139 USA). For updates to this software, please visit PhysioNet (<http://www.physionet.org/>).

The default input to this program is a text file containing a sampled time series, presented as two columns of numbers (the sample times and the sample values). The intervals between consecutive samples need not be uniform (in fact, this is the most significant advantage of the Lomb periodogram over other methods of power spectral density estimation). This program writes the Lomb periodogram (the power spectral density estimate derived from the input time series) on the standard output.

The original version of this program was based on the algorithm described in Press, W.H, and Rybicki, G.B., *Astrophysical J.* 338:277-280 (1989). It has been rewritten using the versions of this algorithm presented in *Numerical Recipes in C* (Press, Teukolsky, Vetterling, and Flannery; Cambridge U. Press, 1992).

This version agrees with 'fft' output (amplitude spectrum up to the Nyquist frequency with total power equal to the variance); thanks to Joe Mietus. */

Anhang

```
#include <stdio.h>
#include <math.h>
#ifdef __STDC__
#include <stdlib.h>
#else
extern void exit();
#endif

#ifdef BSD
# include <string.h>
#else /* for Berkeley UNIX only */
# include <strings.h>
# define strchr index
#endif

static long lmaxarg1, lmaxarg2;
#define LMAX(a,b) (lmaxarg1 = (a),lmaxarg2 = (b), (lmaxarg1 > lmaxarg2 ? \
    lmaxarg1 : lmaxarg2))

static long lminarg1, lminarg2;
#define LMIN(a,b) (lminarg1 = (a),lminarg2 = (b), (lminarg1 < lminarg2 ? \
    lminarg1 : lminarg2))

#define MOD(a,b) while (a >= b) a -= b
#define MACC 4
#define SIGN(a,b) ((b) > 0.0 ? fabs(a) : -fabs(a))
static float sqrg;
#define SQR(a) ((sqrg = (a)) == 0.0 ? 0.0 : sqrg*sqrg)
#define SWAP(a,b) tempr=(a);(a)=(b);(b)=tempr

char *pname;
float pwr;

void fasper(x, y, n, ofac, hifac, wk1, wk2, nwk, nout, jmax, prob)
float x[], y[];
unsigned long n;
float ofac, hifac, wk1[], wk2[];
unsigned long nwk, *nout, *jmax;
float *prob;
{
    void avevar(), realft(), spread(), error();
    unsigned long j, k, ndim, nfreq, nfreqt;
    float ave, ck, ckk, cterm, cwt, den, df, effm, expy, fac, fndim, hc2wt,
        hs2wt, hypo, pmax, sterm, swt, var, xdif, xmax, xmin;

    *nout = 0.5*ofac*hifac*n;
    nfreqt = ofac*hifac*n*MACC;
    nfreq = 64;
    while (nfreq < nfreqt) nfreq <<= 1;
    ndim = nfreq << 1;
    if (ndim > nwk)
        error("workspaces too small\n");
    avevar(y, n, &ave, &var);
    xmax = xmin = x[1];
    for (j = 2; j <= n; j++) {
        if (x[j] < xmin) xmin = x[j];
        if (x[j] > xmax) xmax = x[j];
    }
    xdif = xmax - xmin;
    for (j = 1; j <= ndim; j++) wk1[j] = wk2[j] = 0.0;
    fac = ndim/(xdif*ofac);
    fndim = ndim;
    for (j = 1; j <= n; j++) {
        ck = (x[j] - xmin)*fac;
        MOD(ck, fndim);
        ckk = 2.0*(ck++);
        MOD(ckk, fndim);
        ++ckk;
        spread(y[j] - ave, wk1, ndim, ck, MACC);
        spread(1.0, wk2, ndim, ckk, MACC);
    }
    realft(wk1, ndim, 1);
    realft(wk2, ndim, 1);
    df = 1.0/(xdif*ofac);
```

Anhang

```
pmax = -1.0;
for (k = 3, j = 1; j <= (*nout); j++, k += 2) {
    hypo = sqrt(wk2[k]*wk2[k] + wk2[k+1]*wk2[k+1]);
    hc2wt = 0.5*wk2[k]/hypo;
    hs2wt = 0.5*wk2[k+1]/hypo;
    cwt = sqrt(0.5+hc2wt);
    swt = SIGN(sqrt(0.5-hc2wt), hs2wt);
    den = 0.5*n + hc2wt*wk2[k] + hs2wt*wk2[k+1];
    cterm = SQR(cwt*wk1[k] + swt*wk1[k+1])/den;
    sterm = SQR(cwt*wk1[k+1] - swt*wk1[k])/(n - den);
    wk1[j] = j*df;
    wk2[j] = (cterm+sterm)/(2.0*var);
    if (wk2[j] > pmax) pmax = wk2[*jmax = j];
}
expy = exp(-pmax);
effm = 2.0*(nout)/ofac;
*prob = effm*expy;
if (*prob > 0.01) *prob = 1.0 - pow(1.0 - expy, effm);
}

void spread(y, yy, n, x, m)
float y, yy[];
unsigned long n;
float x;
int m;
{
    int ihi, ilo, ix, j, nden;
    static int nfac[11] = { 0, 1, 1, 2, 6, 24, 120, 720, 5040, 40320, 362880 };
    float fac;
    void error();

    if (m > 10)
        error("factorial table too small");
    ix = (int)x;
    if (x == (float)ix) yy[ix] += y;
    else {
        ilo = LMIN(LMAX((long)(x - 0.5*m + 1.0), 1), n - m + 1);
        ihi = ilo + m - 1;
        nden = nfac[m];
        fac = x - ilo;
        for (j = ilo + 1; j <= ihi; j++) fac *= (x - j);
        yy[ihi] += y*fac/(nden*(x - ihi));
        for (j = ihi-1; j >= ilo; j--) {
            nden = (nden/(j + 1 - ilo))*(j - ihi);
            yy[j] += y*fac/(nden*(x - j));
        }
    }
}

void avevar(data, n, ave, var)
float data[];
unsigned long n;
float *ave, *var;
{
    unsigned long j;
    float s, ep;

    for (*ave = 0.0, j = 1; j <= n; j++) *ave += data[j];
    *ave /= n;
    *var = ep = 0.0;
    for (j = 1; j <= n; j++) {
        s = data[j] - (*ave);
        ep += s;
        *var += s*s;
    }
    *var = (*var - ep*ep/n)/(n-1);
    pwr = *var;
}

void realft(data, n, isign)
float data[];
unsigned long n;
```

Anhang

```
int isign;
{
    void four1();
    unsigned long i, i1, i2, i3, i4, np3;
    float c1 = 0.5, c2, h1r, h1i, h2r, h2i;
    double wr, wi, wpr, wpi, wtemp, theta;

    theta = 3.141592653589793/(double)(n>>1);
    if (isign == 1) {
        c2 = -0.5;
        four1(data, n>>1, 1);
    } else {
        c2 = 0.5;
        theta = -theta;
    }
    wtemp = sin(0.5*theta);
    wpr = -2.0*wtemp*wtemp;
    wpi = sin(theta);
    wr = 1.0 + wpr;
    wi = wpi;
    np3 = n+3;
    for (i = 2; i <= (n>>2); i++) {
        i4 = 1 + (i3 = np3 - (i2 = 1 + (i1 = i + i - 1)));
        h1r = c1*(data[i1] + data[i3]);
        h1i = c1*(data[i2] - data[i4]);
        h2r = -c2*(data[i2] + data[i4]);
        h2i = c2*(data[i1] - data[i3]);
        data[i1] = h1r + wr*h2r - wi*h2i;
        data[i2] = h1i + wr*h2i + wi*h2r;
        data[i3] = h1r - wr*h2r + wi*h2i;
        data[i4] = -h1i + wr*h2i + wi*h2r;
        wr = (wtemp = wr)*wpr - wi*wpi + wr;
        wi = wi*wpr + wtemp*wpi + wi;
    }
    if (isign == 1) {
        data[1] = (h1r = data[1]) + data[2];
        data[2] = h1r - data[2];
    } else {
        data[1] = c1*((h1r = data[1]) + data[2]);
        data[2] = c1*(h1r - data[2]);
        four1(data, n>>1, -1);
    }
}

void four1(data,nn,isign)
float data[];
unsigned long nn;
int isign;
{
    unsigned long n, mmax, m, j, istep, i;
    double wtemp, wr, wpr, wpi, wi, theta;
    float tempr, tempi;

    n = nn << 1;
    j = 1;
    for (i = 1; i < n; i += 2) {
        if (j > i) {
            SWAP(data[j], data[i]);
            SWAP(data[j+1], data[i+1]);
        }
        m = n >> 1;
        while (m >= 2 && j > m) {
            j -= m;
            m >>= 1;
        }
        j += m;
    }
    mmax = 2;
    while (n > mmax) {
        istep = mmax << 1;
        theta = isign*(6.28318530717959/mmax);
        wtemp = sin(0.5*theta);
```

Anhang

```
wpr = -2.0*wtemp*wtemp;
wpi = sin(theta);
wr = 1.0;
wi = 0.0;
for (m = 1; m < mmax; m += 2) {
    for (i = m; i <= n; i += istep) {
        j = i + mmax;
        tempr = wr*data[j] - wi*data[j+1];
        tempi = wr*data[j+1] + wi*data[j];
        data[j] = data[i] - tempr;
        data[j+1] = data[i+1] - tempi;
        data[i] += tempr;
        data[i+1] += tempi;
    }
    wr = (wtemp = wr)*wpr - wi*wpi + wr;
    wi = wi*wpr + wtemp*wpi + wi;
}
mmax = istep;
}
}

FILE *ifile;
float *x, *y, *wk1, *wk2;
long nmax = 512L; /* Initial buffer size (must be a power of 2). Note that input() will increase this value as
repeated doubling, depending on the length of the input series. */ necessary by

main(argc, argv)
int argc;
char *argv[];
{
    char *prog_name();
    float prob;
    int aflag = 1, i, sflag = 0, zflag = 0;
    unsigned long n, nout, jmax, maxout, input();
    void help(), zeromean();

    pname = prog_name(argv[0]);
    for (i = 1; i < argc; i++) {
        if (*argv[i] == '-') switch (*(argv[i]+1)) {
            case 'h': /* print help and exit */
                help();
                exit(0);
                break;
            case 's': /* smooth output */
                sflag = 1;
                break;
            case 'P': /* output powers instead of amplitudes */
                aflag = 0;
                break;
            case 'z': /* zero-mean the input */
                zflag = 1;
                break;
            case '0': /* read data from standard input */
                ifile = stdin;
                break;
            default:
                fprintf(stderr, "%s: unrecognized option %s ignored\n",
                    pname, argv[i]);
                break;
        }
    }
    else if (i == argc-1) { /* last argument: input file name */
        if ((ifile = fopen(argv[i], "rt")) == NULL) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open %s\n", pname, argv[i]);
            exit(2);
        }
    }
}
if (ifile == NULL) {
    help();
    exit(1);
}
```

Anhang

```
/* Read input. */
n = input();

/* Zero-mean the input if requested. */
if (zflag) zeromean(n);

/* Compute the Lomb periodogram. */
fasper(x-1, y-1, n, 4.0, 2.0, wk1-1, wk2-1, 64*nmax, &nout, &jmax, &prob);

/* Write the results. Output only up to Nyquist frequency, so that the results are directly comparable to those obtained using conventional methods. The normalization is by half the number of output samples; the sum of the outputs is (approximately) the mean square of the inputs. Note that the Nyquist frequency is not well-defined for an irregularly sampled series. Here we use half of the mean sampling frequency, but the Lomb periodogram can return (less reliable) estimates of frequency content for frequencies up to half of the maximum sampling frequency in the input. */

maxout = nout/2;
if (sflag) { /* smoothed */

    pwr /= 4;

    if (aflag) /* smoothed amplitudes */
        for (n = 0; n < maxout; n += 4)
            printf("%g\t%g\n", wk1[n],
                sqrt((wk2[n]+wk2[n+1]+wk2[n+2]+wk2[n+3])/(nout/(8.0*pwr))));

    else /* smoothed powers */
        for (n = 0; n < maxout; n += 4)
            printf("%g\t%g\n", wk1[n],
                (wk2[n]+wk2[n+1]+wk2[n+2]+wk2[n+3])/(nout/(8.0*pwr)));

}
else { /* oversampled */

    if (aflag) /* amplitudes */
        for (n = 0; n < maxout; n++)
            printf("%g\t%g\n", wk1[n], sqrt(wk2[n]/(nout/(2.0*pwr))));

    else /* powers */
        for (n = 0; n < maxout; n++)
            printf("%g\t%g\n", wk1[n], wk2[n]/(nout/(2.0*pwr)));

}

free(x);
free(y);
free(wk1);
free(wk2);

exit(0);
}

char *prog_name(s)
char *s;
{
    char *p = s + strlen(s);

#ifdef MSDOS
    while (p >= s && *p != '\\ && *p != ':') {
        if (*p == '.')
            *p = '\0'; /* strip off extension */
        if ('A' <= *p && *p <= 'Z')
            *p += 'a' - 'A'; /* convert to lower case */
        p--;
    }
#else
    while (p >= s && *p != '/')
        p--;
#endif
    return (p+1);
}

void error(s)
char *s;
```

Anhang

```
{
    fprintf(stderr, "%s: %s\n", pname, s);
    exit(1);
}

static char *help_strings[] = {
    "usage: %s [ OPTIONS ...] INPUT-FILE\n",
    " where INPUT-FILE is the name of a text file (use '-' to read the standard", " input) containing a sampled time series, presented as two columns of", "
    numbers (the sample times and the sample values). The intervals between", " consecutive samples need not be uniform. The standard output is the
    Lomb", " periodogram (a frequency spectrum derived from the time series, in two" " columns (frequency and amplitude), normalized such that the
    total power", " between zero and the Nyquist frequency (based on the mean sampling" " frequency) is equal to the variance of the input. If the units
    of sample", " times are seconds, the units of the frequencies are Hz.",
    " OPTIONS may be any of:",
    "-h    Print on-line help.",
    "-P    Generate a power spectrum (print squared amplitudes).",
    "-s    Produce smoothed output.",
    "-z    Zero-mean the input data.",
    NULL
};

void help()
{
    int i;

    (void)fprintf(stderr, help_strings[0], pname);
    for (i = 1; help_strings[i] != NULL; i++)
        (void)fprintf(stderr, "%s\n", help_strings[i]);
}

/* Read input data, allocating and filling x[] and y[]. The return value is the number of points read.

This function allows the input buffers to grow as large as necessary, up to the available memory (assuming that a long int is large enough to address
any memory location). */

unsigned long input()
{
    unsigned long npts = 0L;

    if ((x = (float *)malloc(nmax * sizeof(float))) == NULL ||
        (y = (float *)malloc(nmax * sizeof(float))) == NULL ||
        (wk1 = (float *)malloc(64 * nmax * sizeof(float))) == NULL ||
        (wk2 = (float *)malloc(64 * nmax * sizeof(float))) == NULL) {
        if (x) (void)free(x);
        fclose(ifile);
        error("insufficient memory");
    }

    while (fscanf(ifile, "%f%f", &x[npts], &y[npts]) == 2) {
        if (++npts >= nmax) { /* double the size of the input buffers */
            float *xt, *yt, *w1t, *w2t;
            unsigned long nmaxt = nmax << 1;

            if (64 * nmaxt * sizeof(float) < nmax) {
                fprintf(stderr,
                    "%s: insufficient memory, truncating input at row %lu\n",
                    pname, npts);
                break;
            }
            if ((xt = (float *)realloc(x, nmaxt * sizeof(float))) == NULL) {
                fprintf(stderr,
                    "%s: insufficient memory, truncating input at row %lu\n",
                    pname, npts);
                break;
            }
            x = xt;
            if ((yt = (float *)realloc(y, nmaxt * sizeof(float))) == NULL) {
                fprintf(stderr,
                    "%s: insufficient memory, truncating input at row %lu\n",
                    pname, npts);
                break;
            }
            y = yt;
        }
    }
}
```

Anhang

```
if ((w1t = (float *)realloc(wk1,64*nmaxt*sizeof(float))) == NULL){
    fprintf(stderr,
        "%s: insufficient memory, truncating input at row %lu\n",
        pname, npts);
    break;
}
wk1 = w1t;
if ((w2t = (float *)realloc(wk2,64*nmaxt*sizeof(float))) == NULL){
    fprintf(stderr,
        "%s: insufficient memory, truncating input at row %lu\n",
        pname, npts);
    break;
}
wk2 = w2t;
nmax = nmaxt;
}
}

fclose(ifile);
if (npts < 1) error("no data read");
return (npts);
}

/* This function calculates the mean of all sample values and subtracts it from each sample value, so that the mean of the adjusted samples is zero. */

void zeromean(n)
unsigned long n;
{
    unsigned long i;
    double ysum = 0.0;

    for (i = 0; i < n; i++)
        ysum += y[i];
    ysum /= n;
    for (i = 0; i < n; i++)
        y[i] -= ysum;
}
```