

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

**Effekte von direkten Faktor-Xa-Inhibitoren auf die
Thrombozytenfunktion von Patienten mit
Vorhofflimmern**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
René M'Pembele

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Zweitgutachter: PD Dr. med. Johannes Schneppendahl

Widmung:

Auflistung eigener Publikationen:

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Circulation Research, 20. Dezember 2019: *Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa Driven Platelet Activation Via Protease Activated Receptor-1 (Petzold et al)*

Zusammenfassung:

Seit einigen Jahren werden direkte Faktor-Xa-Inhibitoren wie Rivaroxaban als Antikoagulanzen bei Vorhofflimmern empfohlen. Aktuelle Studien zeigen neben der Reduktion von Schlaganfällen zudem eine Mortalitätssenkung durch Rivaroxaban. Thrombozyten spielen eine große Rolle in der Entstehung ischämischer Ereignisse. Daher hypothesierten wir in dieser Arbeit, dass direkte Faktor-Xa-Inhibitoren Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung haben. Dazu wurden Versuche an 62 Patienten durchgeführt. Es wurden die Thrombozytenfunktion in der Lichttransmissionsaggregometrie und der Mehrfachelektrodenaggregometrie, das endogene Thrombinpotenzial (ETP) und die Thrombozytenadhäsion in einer Flusskammer unter Einnahme von Rivaroxaban sowie Apixaban gemessen. Die Freisetzung von Thromboxan aus Thrombozyten wurde nach Stimulation mit Faktor Xa (FXa) erhoben. Nach Einnahme von Rivaroxaban oder Apixaban waren die Thrombozytenaggregation, die Thrombozytenadhäsion und das ETP im Vergleich zum Ausgangswert erniedrigt. FXa konnte als potenter, direkter, dosisabhängiger Aktivator der Thrombozytenaggregation und Thromboxanbildung dargestellt werden. Dieser Effekt war unabhängig von anderen plasmatischen Gerinnungsfaktoren wie Thrombin. Die Aktivierung ließ sich dosisabhängig durch Rivaroxaban und Vorapaxar, einem PAR-1 Thrombinrezeptorantagonist, in gleichem Maße hemmen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass FXa eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Thrombozyten spielt. Diese Aktivierung bindet direkte Effekte von FXa auf PAR-1 Rezeptoren mit ein. Der Mechanismus kann durch Faktor-Xa-Inhibitoren gehemmt werden, was in einer geringeren Thrombozytenreaktivität resultiert. Patienten mit Vorhofflimmern und einem hohen Risiko für ein ischämisches Ereignis könnten daher von diesem Effekt profitieren.

Abstract:

Direct factor Xa inhibitors like Rivaroxaban are recommended to prevent stroke in patients with atrial fibrillation. Recent studies showed that therapy with Rivaroxaban not only decreases the risk of thromboembolic events, but also mortality. This might be due to other effects than the inhibition of plasmatic coagulation factors. As platelets play a major role in pathophysiology of cardiovascular events, this thesis focused on the effects of direct factor Xa inhibitors on platelet reactivity. Therefore 62 patients were enrolled in a trial. Platelet function was measured by light transmission aggregometry (LTA), multiple electrode aggregometry and endogenous thrombin potential (ETP) before and after intake of direct factor Xa inhibitors. In addition, Platelet adhesion was assessed in a flow chamber and the release of thromboxane from platelets was measured after stimulation with factor Xa (FXa). Platelet aggregation, platelet adhesion and ETP were reduced, compared to baseline, after medication with Rivaroxaban or Apixaban. We identified FXa as a potent, dose dependant activator of platelet aggregation in LTA. This effect was independent from thrombin. This activation could be inhibited dose dependently by Rivaroxaban or Vorapaxar, a thrombin receptor antagonist. Furthermore, FXa led to increased secretion of thromboxane from platelets. As conclusion this thesis could show that FXa plays a role in platelet activation. The activation is mediated by a direct activation of PAR-1 thrombin receptors on platelets. This effect can be inhibited by direct factor Xa inhibitors resulting in reduced platelet reactivity. Patients with atrial fibrillation and high cardiovascular morbidity could benefit from this effect.

Abkürzungsverzeichnis:

ADP = Adenosindiphosphat

aHT = arterielle Hypertonie

AK = Antikörper

ARA = Arachidonsäure

ASS = Aspirin

AUC = *area under the curve*

BMI = *Body Mass Index*

°C = Grad Celsius

CAT = kalibrierte automatisierte Thrombographie

CI = Konfidenz Intervall

Cm² = Quadratcentimeter

CrCl = Kreatinin-*clearance*

CRP = C-reaktives Protein

DM = Diabetes mellitus

DOAK = direkte orale Antikoagulanzen

dyn = dyne

EKG = Elektrokardiogramm

ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

ETP = endogenes Thrombinpotenzial

FII = Prothrombin

FIIa = Thrombin

FVa = aktivierter Faktor V

FVIIa = aktivierter Faktor VII

FVIII = aktivierter Faktor VIII

FIX = Faktor IX

FIXa = aktivierter Faktor IX

FX = Faktor X

FXa = aktivierter Faktor X

FXIa = aktivierter Faktor XI

FXIIa = aktivierter Faktor XII

FXIIIa = aktivierter Faktor XIII

FACS = Durchflusszytometrie mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung

GP = Glykoprotein

GPCR = G-proteingekoppelter Rezeptor

H₂O = Wasser

Hb = Hämoglobingehalt

Hkt = Hämatokrit

INR = *international normalized ratio*

KCL = Kaliumchlorid

KHK = koronare Herzkrankheit

LAA = linkes Vorhofohr

LTA = Lichttransmissionsaggregometrie

MACCE = *major adverse cardiac and cerebrovascular events*

MEA = Mehrfach-Elektroden-Aggregometrie

MFI = mittlere Fluoreszenzintensität

mg = Milligramm

MgCl₂ = Magnesiumchlorid

ml = Milliliter

μM = mikromolar

mM = millimolar

min = Minute

MoA = *maximum of aggregation*

MW = Mittelwert

NaCl = Natriumchlorid
NaHCO₃ = Natriumhydrogencarbonat
NaH₂PO₄ = Natriumdihydrogenphosphat
nM = nanomolar
No. = Anzahl
OAK= orale Antikoagulanzen
PAP = plättchenarmes Plasma
PAR = Protease aktivierter Rezeptor
pAVK = peripherarterielle Verschlusskrankheit
PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFP = plättchenfreies Plasma
PGE = Prostaglandin-E
pM = picomolar
PRP = plättchenreiches Plasma
POCT = *point of care test*
PV = Pulmonalvenen
Rpm = *rounds per minute*
S.V. = Standardabweichung
TAA = Tachyarrhythmia absoluta
TF = *tissue factor*
TM = Thrombozytenmedium
TRAP = Thrombinrezeptor aktivierendes Peptid
TXB₂ = Thromboxan B₂
VHF = Vorhofflimmern
VKA = Vitamin-K Antagonisten
vWF = von-Willebrand-Faktor
WP = gewaschene Plättchen

Inhaltsverzeichnis:

1 Einleitung	1
1.1 Die Hämostase - Gleichgewicht zwischen Thrombose und Blutung	2
1.1.1 Primäre Hämostase und Thrombozytenaktivierung.....	3
1.1.2 Sekundäre Hämostase – Ablauf der Gerinnungskaskade	5
1.2 Vorhofflimmern, eine Erkrankung des Alters - Pathophysiologie und Klassifikation	6
1.3 Die orale Antikoagulation als Mortalitätssenkende Therapie	8
1.4 Orale Antikoagulation – Substanzen und Wirkmechanismen	10
1.4.1 Vitamin-K-Antagonisten	10
1.4.2 Direkte orale Antikoagulanzen	12
1.5 Rivaroxaban – ein direkter Faktor-Xa-Inhibitor	12
1.6 Effekte von Rivaroxaban in klinischen Studien	13
1.7 Fragestellung, Hypothese und Ziele der Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Patientenkollektiv und Studiendesign	17
2.2 Material	17
2.2.1 Probengewinnung und Verarbeitung	17
2.2.2 Verwendete Substanzen	18
2.3 Methoden.....	20
2.3.1 Thrombozytenfunktionsmessung in der Lichttransmissionsaggregometrie	20
2.3.2 Durchführung der Thrombozytenfunktionsmessung in der LTA	22
2.3.3 Thrombozytenfunktionsmessung in der Mehrfach-Elektroden- Aggregometrie	22
2.3.4 Durchführung der Thrombozytenfunktionsmessung in der MEA	23

2.3.5 Durchführung der Messung der Thrombozytenadhäsion in einer kollagenbeschichteten Flusskammer	24
2.3.6 Messung des endogenen Thrombinpotenzials	25
2.3.7 Durchführung der Messung des endogenen Thrombinpotenzials	26
2.3.8 Messung von Thromboxan mittels ELISA	27
2.3.9 Messung der Expression Protease-aktivierter Rezeptoren in der Durchflusszytometrie mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung	28
2.3.10 Durchführung der Messung der Expression von PAR in der Durchflusszytometrie mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung	28
2.4 Statistische Auswertung.....	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Studienpopulation und Patientencharakteristika	31
3.1.1 Allgemeines zum Patientenkollektiv und den Patientencharakteristika	31
3.1.2 Die Studienpopulation der OAK <i>time-series</i> Gruppe	32
3.1.3 Die Studienpopulation der OAK <i>cross-sectional</i> Gruppe	33
3.1.4 Die Studienpopulation der Non-OAK Gruppe	33
3.1.5 Vergleich der Charakteristika, Komorbiditäten, Komedikation und Laborparameter	35
3.2 Experimentelle Versuchsergebnisse.....	38
3.2.1 Patienten zeigen verminderte Thrombozytenaggregation nach Rivaroxabaneinnahme	38
3.2.2 Patienten zeigen auch verminderte Thrombozytenaggregation unter Apixaban	40
3.2.3 Effekte von Rivaroxaban auf Thrombozytenfunktion sind plasmaabhängig	41
3.2.4 Rivaroxaban vermindert die Thrombozytenadhäsion in Flusskammerversuchen	43

3.2.5 Patienten zeigen vermindertes endogenes Thrombinpotenzial nach Rivaroxaban	46
3.2.6 Aktivierter Faktor X führt zu einer dosisabhängigen Thrombozytenaktivierung	47
3.2.7 Rivaroxaban hemmt Plättchenaggregation durch aktivierten Faktor X dosisabhängig	48
3.2.8 Vorapaxar hemmt Thrombozytenaggregation durch aktivierten Faktor X ebenfalls dosisabhängig	49
3.2.9 Aktivierter Faktor X fördert die Freisetzung von Thromboxan aus Thrombozyten	50
3.2.10 Rivaroxaban hat keinen Einfluss auf die PAR-1 und PAR-4 Rezeptor-expression auf Thrombozyten	51
4 Diskussion.....	52
4.1 Limitationen der Arbeit	59
4.2 Zusammenfassung und Ausblick	60
5 Literaturverzeichnis.....	63
6 Danksagungen.....	

1 Einleitung:

In Zeiten des demographischen Wandels nehmen Erkrankungen des Alters und vor allem des kardiovaskulären Systems, insbesondere in der westlichen Welt, eine immer größere Rolle ein [1, 2]. Unter anderem ist Vorhofflimmern (VHF) eine Erkrankung, deren Auftreten stark mit dem Alter korreliert [3, 4]. Durch die hohe Anzahl an Betroffenen gewinnen auch die oralen Antikoagulanzen (OAK) in der Therapie des VHF an Wichtigkeit. Diese sollen das Auftreten von akuten Erkrankungsgeschehen, wie Schlaganfällen, bei VHF verhindern. Dabei sollte die Therapie auf einer Analyse des Risiko-Nutzen-Verhältnisses fußen. Das Auftreten von Blutungsereignissen, als Risiko der Therapie mit einem Antikoagulanzen, muss stets berücksichtigt werden. Waren über Jahrzehnte hinweg Vitamin-K-Antagonisten (VKA) die Therapie der ersten Wahl, werden seit einigen Jahren vermehrt direkte orale Antikoagulanzen (DOAK) verschrieben. Diese konnten sich bei ähnlicher Schlaganfallprävention, aber deutlich patientenfreundlicherer Anwendung und überwiegend besserem Risikoprofil bewähren. Diese Vorteile finden auch in den aktuellen Leitlinien zur Therapie des VHF Berücksichtigung, die DOAKs als Erstlinientherapie zur Antikoagulation anführen [5, 6]. Die DOAKs können aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkmechanismen in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Wirkung entfalten sie entweder über die direkte Inhibition von Thrombin oder des aktivierten Faktor X (FXa), in der Endstrecke der Gerinnungskaskade. In dieser Phase gelten die beiden Faktoren als zentrale Bestandteile, deren Inhibition zu einer effektiven Antikoagulation führt. Von besonderem Interesse sind hier die DOAKs, die ihren antikoagulatorischen Effekt über die direkte Inhibition des FXa der Gerinnungskaskade vermitteln. Zugelassene und in der Klinik häufig verschriebene FXa-Inhibitoren sind Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban. In Studien konnte jedes dieser Medikamente, seine Überlegenheit gegenüber VKA zeigen [7-9].

Andere aktuelle Studien, wie die COMPASS oder ATLAS-ACS-2 TIMI-51, untersuchten zusätzlich den Benefit von Rivaroxaban bei kardiovaskulären Risikopatienten ohne VHF. Bei diesen Patienten konnte durch die additive Gabe einer niedrigeren Rivaroxabandosis, zusätzlich zur anti-aggregatorischen Therapie mit Aspirin (ASS), eine Senkung der Mortalität erreicht werden [10,

11]. Die Senkung der Mortalität war hierbei mit einem verminderten Auftreten von ischämischen Ereignissen assoziiert.

In Zusammenschau der Studienergebnisse scheint Rivaroxaban den VKA im Risiko-Nutzen-Verhältnis überlegen zu sein. Es stellt sich aber die Frage, ob für Rivaroxaban, neben seiner Wirkung auf die plasmatische Gerinnung, andere Mechanismen zur Risikoreduktion beitragen. Im Hinblick auf das neue Verständnis einer zellulären Gerinnung und deren Rolle in der Entstehung von ischämischen Ereignissen muss auch die Rolle einer erhöhten Thrombozytenreaktivität beleuchtet werden [12-15]. In dieser Arbeit wird im Folgenden eine Studie der Klinik für Kardiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf vorgestellt in der gezeigt werden konnte, dass direkte FXa-Inhibitoren, neben ihren potenten antikoagulatorischen, auch direkte antiaggregatorische Effekte aufweisen [16]. FXa und dessen Inhibition spielen hierbei eine zentrale Rolle in der Aktivierung von Thrombozyten.

1.1 Die Hämostase als Gleichgewicht zwischen Thrombose und Blutung

Die Blutgerinnung, auch Hämostase genannt, ist ein sehr komplexes System dessen Ziel es ist, bei einer Verletzung der Integrität des Gefäßsystems den übermäßigen Blutverlust durch einen schnellen Verschluss der Läsion zu verhindern. Die Hämostase sorgt somit idealerweise für das notwendige Gleichgewicht zwischen übermäßiger Gerinnbarkeit (Hyperkoagulabilität) und übermäßiger Blutungsneigung (Hypokoagulabilität) [17]. Dieses Gleichgewicht kann aus den Fugen geraten, was die Grundlage vieler pathologischer Prozesse darstellt, bietet aber auch die Möglichkeit für diverse Therapieansätze.

Die Hämostase kann in zwei Phasen unterteilt werden. In der „primäre Hämostase“ genannten ersten Phase sind die Thrombozyten als zellulärer Bestandteil der Hämostase der wichtigste Faktor. Sie bilden durch ihre Aktivierung und Aggregation an der Endothelläsion den primären Thrombus um die Läsion abzudichten [18]. Hingegen werden in der zweiten Phase der Hämostase, sekundäre Hämostase genannt, humorale Gerinnungsfaktoren aktiviert, die ihre enzymatische Wirkung in der Gerinnungskaskade entfalten. Diese resultiert in der Generierung von unlöslichem Fibrin, das sich als Netz im

primären Thrombus formiert, um diesen zu stabilisieren [17]. Die dargestellte Unterteilung der Hämostase in einen primären und sekundären Teil ist eher didaktisch aufzufassen, da sie für ein physiologisches Verständnis irreführend ist.

Vielmehr verlaufen beide Phasen der Hämostase nahezu parallel und verstärken sich gegenseitig. Hierbei kommt das zellgebundene Modell der Gerinnung, wie es von Hoffman et al beschrieben wurde, am ehesten den physiologischen Bedingungen *in-vivo* nahe [19]. In diesem Modell spielen Thrombozyten eine zentrale Rolle, auf deren Oberfläche die einzelnen Aktivierungsschritte stattfinden und kontrolliert werden. Innerhalb des Modells werden drei Phasen unterschieden: In der Initiationsphase können Gerinnungsfaktoren das Gefäßsystem verlassen und über den *Tissue-factor-pathway* (TF) geringe Mengen Thrombin außerhalb des Gefäßsystems generieren. Die Amplifikationsphase startet mit der Verletzung des Blutgefäßes, was zur Freisetzung von Thrombin führt, welches anheftende Thrombozyten aktivieren kann. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur Amplifikation und zur Aktivierung weiterer Thrombozyten. Schließlich läuft in der Propagationsphase die Gerinnungskaskade kontrolliert auf der Oberfläche der Thrombozyten ab [12, 19].

1.1.1 Primäre Hämostase und Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten sind kernlose Zellfragmente, die physiologisch in einer Anzahl von 150,000-400,000 pro μl Blut im Blutgefäßsystem zirkulieren [20, 21]. Sie werden von Megakaryozyten im blutbildenden Knochenmark abgespalten und zirkulieren ungefähr 10 Tage lang im Blutgefäßsystem, ehe sie zum größten Teil in der Milz, aber auch in der Leber, abgebaut werden [22]. Kommt es zu einer Läsion des Endothels werden Strukturen der subendothelialen Matrix freigelegt. Diese dienen als *Target*-Strukturen für Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, die die Thrombozytenadhäsion und -aktivierung vermitteln. Rezeptoren, die vor allem eine Rolle in der Plättchenadhäsion spielen, sind der Glykoproteinkomplex Ib-IX-V (GP Ib-IX-V) und das Glykoprotein VI (GPVI) [17]. GP Ib-IX-V bindet am subendothelial immobilisierten von-Willebrand-Faktor (vWF). Dieser formt mit seiner A1

Untereinheit, die an die GP Ib Domäne des GP Ib-IX-V bindet, eine Brücke zwischen Plättchen und subendotheliale Kollagen [21, 23-25]. Über diesen Mechanismus werden Thrombozyten abgebremst und ihre Adhäsion an der Läsionsstelle gefördert [23, 26]. Ein weiterer wichtiger Rezeptor für die Adhäsion ist GPVI, der direkt an exponierte Kollagenfasern bindet. Über diese Bindung wird hauptsächlich auch eine Aktivierung der Thrombozyten vermittelt [21] [26]. Durch die Aktivierung vollziehen die Thrombozyten eine Formwandlung, bei der sie stechapfelförmige Ausläufer, sogenannte Pseudopodien, ausbilden [26]. Durch die Thrombozyten-Aktivierung werden intrazelluläre Feedback-Mechanismen in Gang gesetzt, die zu einer Konformationsänderung und damit zur Aktivierung des Glykoproteinrezeptor IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) führen [17, 26]. Es kommt außerdem zur Verlagerung negativgeladener Phospholipide an die Thrombozytenoberfläche [26]. Diese präsentierten Phospholipide dienen als Verbindung zwischen primärer und sekundärer Hämostase, da sie eine hohe Affinität zu Gerinnungsfaktoren haben und diese komplexieren können [26]. Der aktivierte GPIIb/IIIa ist einer der wichtigsten Rezeptoren für die weitere Aktivierung von Thrombozyten und das Etablieren eines stabilen Thrombus. GPIIb/IIIa kann in seiner aktivierten Form z.B. vWF, Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen oder Fibrin binden und so zu einer Vernetzung unter Thrombozyten und der Thrombusbildung beitragen [17]. Thrombozyten besitzen darüber hinaus α -Granula und *dense*-Granula als Speicherort weiterer löslicher Mediatoren der Aggregation. Die Mediatoren werden durch die Aktivierung freigesetzt, um ihrerseits weitere Thrombozyten über diesen parakrinen Mechanismus zu aktivieren [27, 28]. Von Bedeutung sind in dem Zusammenhang insbesondere Substanzen wie Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan-A₂ (TXA₂), Serotonin und Prostaglandin-E₂ (PGE₂). Sie potenzieren, über für sie spezifische G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR), die Thrombozytenaktivierung [28]. Thrombin, das in der Gerinnungskaskade generiert wird, ist einer der stärksten Aktivatoren der Thrombozytenaggregation [27, 29]. Es spaltet als Protease die auf der Thrombozytenoberfläche exprimierten Protease-aktivierten-Rezeptoren (PAR) 1 und 4, welche dadurch aktiviert werden. Als GPCR setzen sie ebenfalls Signalwege in Gang, die Thrombozytenaggregation vermitteln [17, 30, 31].

1.1.2 Sekundäre Hämostase – Ablauf der Gerinnungskaskade

Die sekundäre Hämostase verfolgt das Ziel Thrombin zu generieren. Als zentraler Gerinnungsfaktor vermittelt Thrombin Thrombozytenaggregation, verstärkt die Gerinnungsaktivität über einen Feedbackmechanismus und spaltet lösliches Fibrinogen zu Fibrin [29]. Dieses kann sich netzartig organisieren, um als Grundlage für die Wundheilung die Festigung des Thrombus zu erreichen [17]. Durch eine Gewebläsion wird neben Kollagenfasern auch Gewebsthromboplastin, genannt *tissue-factor* (TF), als Membranprotein der extravaskulären Zellmatrix präsentiert. TF bindet als Kofaktor die aktivierte Form der Serinprotease VII (FVIIa) [17, 32]. Der Komplex aus TF und FVIIa ist nun in der Lage die Faktoren IX (FIX) und X (FX) in ihre aktivierte Form zu überführen (FIXa und FXa). Dieser Aktivierungsweg wird als extrinsischer Arm der Gerinnungskaskade bezeichnet. FIXa und FXa können nun auf die Oberfläche von aktivierten Thrombozyten diffundieren. Diese präsentieren auf ihrer Oberfläche negativgeladene Phospholipide, die eine Hohe Bindungsaffinität für die Serinproteasen aufweisen [32, 33]. Hier bildet der FIXa mit aktiviertem Faktor VIII (FVIIIa) als Kofaktor und FX den Tenasekomplex, der FX zu FXa spalten kann. FXa bildet an der Oberfläche der Thrombozyten mit aktiviertem Faktor V (FVa) als Kofaktor den Prothrombinasekomplex. Dieser spaltet Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa), was die Endstrecke der Gerinnungskaskade darstellt und die Rolle der zellulären Gerinnung auf der Oberfläche von Thrombozyten hervorhebt [12, 19]. FIIa initiiert mehrere Feedbackmechanismen, um seine eigene Produktion zu fördern. So spaltet er FV zu FVa des Prothrombinase Komplexes und an vWF gebundenen FVIII, der dann dissoziiert und sich als FVIIIa dem Tenasekomplex anlagert. Zudem wird durch FIIa auch Faktor XI in seine aktive Form überführt (FXIa), der weiteren FIXa produzieren kann. Die Produktion von FIXa wird auch über den intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade gefördert. Dieser führt über Präsentation von negativen Oberflächen zu einer Aktivierung von Faktor XII (FXIIa). Für diese Aktivierung werden hochmolekulares Kininogen und Präkallikrein als Kofaktoren benötigt. FXIIa spaltet Präkallikrein zu Kallikrein und verstärkt so seine eigene Synthese, im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus [33-35]. FXIIa führt dann über die Spaltung von FXI

und FIX zur gesteigerten Tenaseaktivität und damit zur Einmündung in die Endstrecke der Gerinnungskaskade [33]. Hier befinden sich mit dem FXa und FIIa die zentralen Faktoren der Gerinnungskaskade. Die Generierung von FIIa stellt zum einen durch die mögliche Thrombozytenaktivierung eine Schnittstelle zur primären Hämostase dar, zum anderen wird nach der Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin auch Faktor XIII von FIIa gespalten und aktiviert (FXIIIa). FXIIIa vernetzt als Transglutaminase im letzten Schritt die Fibrinmoleküle [36]. Dadurch kann ein stabiler Thrombus entstehen und die Gerinnung gilt als abgeschlossen.

1.2 Vorhofflimmern, eine Erkrankung des Alters - Pathophysiologie und Klassifikation

VHF ist eine Erkrankung, die mit erhöhter Morbidität und Mortalität, vor allem durch Schlaganfälle, einhergeht und in der westlichen Welt stetig an Bedeutung gewinnt [4]. So ist auch bekannt, dass VHF, unabhängig von der Therapie, ein Risikofaktor für Herzversagen oder den plötzlichen Herztod darstellt [37]. Mit einer weltweiten Prävalenz von 1-3% ist VHF die häufigste Herzrhythmusstörung [3, 6]. Die Inzidenz von VHF steigt seit Jahren, was an der besseren Detektion der Erkrankung, aber auch an einem gehäuften Auftreten von begünstigenden Risikofaktoren liegen mag [38, 39]. So kann man sagen, dass wahrscheinlich jeder vierte Erwachsene in seinem Leben an VHF erkranken wird [40]. Bekannte Risikofaktoren für das Auftreten von VHF sind Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, Adipositas, Herzinsuffizienz, Erkrankungen der Herzkranzgefäße, Niereninsuffizienz, andere strukturelle Herzerkrankungen und genetische Prädispositionen [3, 6]. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von VHF mit dem Alter zunimmt. So liegt die Prävalenz bei Individuen unter 49 Jahren bei nur 0.12-0.16%, während bei über 80-Jährigen die Prävalenz mit 10-17% angegeben wird [3]. Frauen scheinen weniger häufig betroffen zu sein als Männer, haben aber ein höheres Mortalitätsrisiko [41, 42]. Die Therapie von arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz mit ACE-Hemmern, Angiotensin-1-Rezeptor-Blockern und Betarezeptor-Blockern, scheinen das Auftreten von VHF zu verhindern [43-45]. Strukturelle Herzerkrankungen wie Klappenerkrankungen und Kardiomyopathien scheinen jedoch das Auftreten von VHF zu begünstigen [3].

In der Pathophysiologie führen diese Mechanismen zum Fortschreiten eines fibrotischen Umbaus, im Sinne eines *Remodellings*, der Vorhöfe. Diese fibrotischen Areale behindern die Integrität der Herzmuskelzellen und somit auch die physiologische Reizweiterleitung. Stattdessen wird das Auftreten von kreisenden und ungerichteten Erregungen gefördert [46, 47]. Spontane Erregungsereignisse sind in ihrer Entstehung häufig von den Pulmonalvenen (PV) ausgehend zu beobachten, die in den linken Vorhof einmünden [48]. Die ineffektive Kontraktion der Vorhöfe führt zu einer Blutstase, Thrombozytenaktivierung und damit zu einem prothrombotischen Milieu [49]. In dem Zusammenhang ist vor allem das linke Vorhofohr (LAA) als Prädilektionsstelle für Thrombenbildung bekannt. Diese Thromben können sich aus dem LAA lösen und über die linke Herzkammer und den Ausflusstrakt in die Peripherie ausgeschwemmt werden. Die Folge sind MACCE, vor allem der ischämische Schlaganfall, der durch einen thromboembolischen Verschluss kranialer und cerebraler Gefäße entsteht. Daher ist es nicht verwunderlich, dass bei 20-30% der Patienten mit ischämischen Schlaganfällen ein VHF vor, nach oder während des Schlaganfalls detektiert werden kann [50, 51]. Als weitere Komplikation kann die schnelle Überleitung des VHF, die *Tachyarrhythmia absoluta* (TAA), genannt werden. Auch eine zu langsame Überleitung, die *Bradyarrhythmia absoluta* (BAA), ist möglich. Diese führen über eine nicht ausreichende Auswurfkapazität nicht selten zu einer kardialen Dekompensation und Herzinsuffizienz, weitere Risikofaktoren für eine erhöhte Mortalität. Jedoch verläuft VHF in vielen Fällen auch asymptomatisch, sodass eine Detektion oft auch als Zufallsdiagnose im Elektrokardiogramm (EKG) erfolgen kann [52]. Im EKG zeichnet sich das VHF durch das länger als 30 Sekunden anhaltende Fehlen der P-Welle, als Korrelat einer gerichteten Vorhoferregung, und einem unregelmäßigen RR-Zacken Intervall aus [6]. Die Klassifikation des VHF erfolgt abhängig von der Dauer von Beginn bis zur Terminierung des Flimmerzustandes in fünf Gruppen. In die erste Gruppe fallen alle neudiagnostizierten Episoden von VHF. Paroxysmales VHF werden die Episoden genannt, die sich in den meisten Fällen in den ersten 48 Stunden selbst terminieren, aber bis zu 7 Tagen andauern können. VHF das länger als 7 Tage andauert wird als persistierendes VHF bezeichnet. Die letzten beiden Gruppen formen das langanhaltend persistierende VHF, welches vor einer

Intervention mehr als 1 Jahr andauert hat und das permanente VHF, das ohne Rhythmustherapie vom Patienten gut akzeptiert wird. In den meisten Fällen ist ein deutlicher Progress der Episodenlängen von paroxysmalem VHF hin zu länger andauernden Formen im Verlauf der Erkrankung zu beobachten [6].

1.3 Die orale Antikoagulation als mortalitätssenkende Therapie

In der Therapie des VHF steht, neben Frequenz und Rhythmuskontrolle, natürlich auch die Prävention von Schlaganfällen im Fokus. Hier kommen die OAK zum Einsatz, die durch effektive Antikoagulation einen Großteil der Schlaganfälle verhindern und so zu einer Lebensverlängerung beitragen können. Damit stellen sie das einzige Therapiekonzept dar, das auch die Langzeitmortalität und Morbidität der Patienten senkt. In der Vielzahl der Fälle überwiegt das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden dem Blutungsrisiko unter der Therapie mit OAK. Dennoch sollte die Risikoabwägung zwischen thromboembolischem Risiko und Blutungsrisiko bei jedem Patienten individuell erfolgen. Hierzu können verschieden Scores zur Risikostratifizierung verwendet werden. Ein bekanntes und in den europäischen Leitlinien empfohlenes Scoring-System ist der CHA₂DS₂-VASc-Score. Er stellt das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein von Kriterien wie Herzinsuffizienz, Alter, Diabetes mellitus, vorhergegangene Schlaganfälle, vaskuläre Erkrankungen und Geschlecht in einem Punktesystem dar (s. Abb.1). Bei ≥ 1 Punkt bei Männern und ≥ 2 Punkten bei Frauen ist eine OAK-Therapie indiziert und sollte durchgeführt werden.

CHA2DS2-VASc Kriterium	Punkte
Herzinsuffizienz	1
Bluthochdruck	1
Alter >75 Jahre	2
Diabetes	1
Schlaganfall oder Embolien	2
Gefäßerkrankungen	1
Alter 65-74 Jahre	1
Weibliches Geschlecht	1

Abb.1: CHA2DS2-VASc-Score: Kriterien des CHA2DS2-VASc-Scores mit zugehöriger Punkteverteilung.

Um dem gegenüber das Blutungsrisiko aufzuzeigen, kann man den HAS-BLED-Score als Hilfsmittel benutzen (s. Abb. 2). Der HAS-BLED-Score umfasst als klinische Kriterien für erhöhtes Blutungsrisiko die arterielle Hypertonie, abnormale Leber- oder Nierenfunktion, vorangegangene Schlaganfälle, auffällige Blutungsanamnese oder genetische Prädispositionen, labile *International normalized Ratio* (INR), Alter >65 Jahre und Alkohol- oder Drogenabhängigkeit.

HAS-BLED Kriterium	Punkte
Bluthochdruck	1
Leber-/Nierenfunktionsstörung	Je 1
Schlaganfall	1
Blutungsereignis	1
Labile INR	1
Alter >65 Jahre	1
Alkohol oder Drogen	Je 1

Abb.2: HAS-BLED Score: Kriterien des HAS-BLED-Scores zur Bestimmung des Blutungsrisikos mit zugehöriger Punkteverteilung.

Da es zu Überlappungen der beiden Scores kommt, wie zum Beispiel beim Alter und der arteriellen Hypertonie, sollte ein hoher HAS-BLED-Score nicht dazu führen, dass dem Patienten eine Therapie mit OAK vorenthalten wird. Hier ist vielmehr eine engmaschigere Kontrolle der Therapie von Nöten und reversible Blutungsrisiken sollten identifiziert und beseitigt werden. [5, 6]

1.4 Orale Antikoagulation – Substanzen und Wirkungsmechanismen

Man kann zwei Gruppen von OAK unterscheiden, zum einen die VKA und zum anderen die DOAKs. Die DOAKs werden weiter in die direkten FXa-Antagonisten und die direkten Thrombin-Antagonisten unterteilt.

1.4.1 Vitamin-K-Antagonisten

In die Gruppe der VKA zählen Medikamente wie Warfarin und Marcumar, deren Wirkstoff Phenprocoumon seit Jahrzehnten erfolgreich zur oralen Antikoagulation bei VHF verwendet wurde. Diese Medikamente wurden im Jahre 1948 zum ersten Mal von Karl Link synthetisiert und 1954 zur Therapie am Menschen zugelassen [53, 54]. Durch die deutliche Senkung des Schlaganfallrisikos und der Mortalität, bezeichneten sie einen Fortschritt in der

Therapie des VHF [6, 55]. VKA hemmen kompetitiv die Vitamin-K-Reduktase, ein Enzym, das dazu benötigt wird, Vitamin K in seine aktivierte Form zu überführen. In dieser Form fungiert es als Kofaktor für die γ -Glutamyl-Carboxylase. Dieses Enzym ist in der Leber für die N-terminale γ -Carboxylierung von Gerinnungsfaktoren zuständig. Die Carboxylierung wird benötigt um, unter der Anwesenheit von Kalzium, Konformationsveränderungen der Gerinnungsfaktoren und damit deren Aktivierung zu gewährleisten [56]. Dementsprechend wird durch die kompetitive Hemmung, die Produktion der prokoagulatorischen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie der antikoagulatorischen Proteine C und S in der Leber gehemmt [57]. Da der antikoagulatorische Effekt erst mit der Elimination der bereits produzierten Gerinnungsfaktoren im Blut Eintritt, benötigen VKA einige Tage bis zur maximalen Wirkung. Bis dahin überwiegt sogar der prothrombotische Effekt, da die antikoagulatorischen Proteine C und S geringere Halbwertszeiten als Prothrombin aufweisen, dessen *Clearance*-Zeit bedeutend für den Eintritt der antikoagulatorischen Wirkung ist [58, 59]. In der Therapie mit VKA stellt außerdem die geringe therapeutische Breite der Medikamente ein Problem dar. Bei der Therapie von VHF muss hierbei die INR, die den Quick-Wert, ein Marker für das extrinsische Gerinnungssystem, ins Verhältnis zu einer Standardprobe setzt, engmaschig kontrolliert werden. Bei VHF wird eine INR zwischen 2-3 als adäquate Antikoagulation im Therapiefenster angesehen. Außerhalb dieses therapeutischen Fensters erhöhen sich entweder das Thromboembolie-, oder das Blutungsrisiko. Da die Wirkung der VKA auch stark von der Einnahme anderer Medikamente und der Aufnahme Vitamin-K-haltiger Nahrungsmittel abhängig ist, müssen regelmäßige Therapiekontrollen und Dosisanpassungen erfolgen [6, 60, 61]. Nach Absetzen der VKA ist, abhängig von der Produktion neuer Gerinnungsfaktoren durch die Leber, erst nach einiger Zeit mit einer Normalisierung der INR zu rechnen. Durch die Gabe von Vitamin K kann dieser Prozess jedoch beschleunigt werden [62, 63]. Obwohl VKA weiterhin die Therapie der ersten Wahl bei mechanischem Klappenersatz darstellen, werden sie in der Therapie des VHF von den DOAKs abgelöst [5].

1.4.2 Direkte orale Antikoagulanzen

DOAKs sind Medikamente die ihre Wirkung, im Gegensatz zu den VKA, direkt an den entsprechenden Targetstrukturen ausüben. Diese Targetstrukturen können Thrombin oder FXa sein. Durch die direkte Inhibition dieser zentralen Gerinnungsfaktoren, lässt sich eine effektive Antikoagulation erreichen, die nahezu direkt nach Einnahme des jeweiligen Präparates eintritt. Andersherum verhält es sich beim Absetzen der DOAKs. Das bietet im innerklinischen Setting einen bedeutenden Vorteil gegenüber den VKA. Es sind des Weiteren keine regelmäßigen Spiegelkontrollen mit Dosisanpassungen notwendig. Allerdings sind eine Therapiekontrolle und eine Kontrolle der regelmäßigen Einnahme, wie über die INR bei VKA, kaum möglich. Wichtig für eine erfolgreiche Therapie ist dementsprechend die Sicherstellung einer ausreichenden Compliance und Schulung des Patienten, der das DOAKs regelmäßig einnehmen muss [5, 64, 65]. Eine große Metaanalyse konnte zeigen, dass alle DOAKs das Risiko von MACCE und Mortalität gegenüber den VKA bei geringerem intrakraniellm Blutungsrisiko nochmals senken können. Gastrointestinale Blutungen traten im Gegensatz dazu etwas häufiger auf [66]. Aufgrund der dargestellten Vorteile und eines besseren Risiko-Nutzen-Profiles, werden DOAKs als Erstlinientherapie für (nicht valvuläres) VHF von den Leitlinien empfohlen [5, 6]. Bei Niereninsuffizienz ist bei allen DOAKs Vorsicht geboten und wenn möglich eine Dosisanpassung durchzuführen. Verfügbare Medikamente sind, neben dem direkten Thrombininhibitor Dabigatran, die direkten FXa-Inhibitoren Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban.

1.5 Rivaroxaban – Ein direkter Faktor-Xa-Inhibitor

Rivaroxaban wird, als einer der direkten FXa-Inhibitoren, zur Therapie des nicht valvulären VHF einmal täglich in der Dosis von 20mg eingenommen. Dabei kommt es zu einer kompetitiven Hemmung des FXa und des Prothrombinasekomplexes [67]. Die Bioverfügbarkeit von Rivaroxaban ist abhängig von der gleichzeitigen Nahrungsaufnahme bei Tabletteneinnahme und variiert von 66% ohne, bis zu 100% bei gleichzeitiger Nahrungsaufnahme. Nach oraler Einnahme von Rivaroxaban in Tablettenform ist nach 1-4 Stunden mit der maximalen Wirkung, gemessen an der Anti-FXa-Aktivität, zu rechnen

[68]. Im Blutplasma besteht eine hohe reversible Plasmaeiweißbindung von 95%, wobei Albumin als Haupttransportprotein fungiert [69] [70]. Die terminale Plasmahalbwertszeit von Rivaroxaban liegt zwischen 5 und 13 Stunden, je nach Alter und Metabolismus des Patienten [69]. Die Ausscheidung von Rivaroxaban erfolgt zu 66% renal, davon zu 36% in unveränderter Form. Von diesen 36% werden 6% glomerulär filtriert und 30% über P-Glykoprotein Transporter renal sezerniert [71]. Rivaroxaban wird außerdem in der Leber, unter anderem Cytochrom-P450-3A4 abhängig und durch hydrolytische Spaltung, metabolisiert und über den Stuhl ausgeschieden. Hier finden sich ungefähr 21% metabolisiertes und 7% unmetabolisiertes Rivaroxaban, das möglicherweise auch nicht resorbiert wurde [69, 71]. Aufgrund der renalen Elimination muss bei Niereninsuffizienz eine Dosisanpassung erfolgen. So soll ab einer Creatinin-Clearance (CrCl) zwischen 30-50 ml/min die Rivaroxabandosis auf 15mg reduziert. Diese Dosis ist auch für den Bereich der CrCl von 15-29 ml/min zugelassen, welcher einer schweren Niereninsuffizienz entspricht [5].

1.6 Effekte von Rivaroxaban in klinischen Studien:

Die ROCKET-AF Studie ist eine im Jahre 2011 publizierte randomisiert kontrollierte Studie, die Rivaroxaban und VKA in Hinblick auf das Auftreten von MACCE bei 14264 Patienten mit VHF verglichen hat. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Rivaroxaban den VKA in der Prävention von Schlaganfällen und thromboembolischen Ereignissen nicht unterlegen ist. In der statistischen Auswertung aller größeren Blutungsereignisse gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Rivaroxaban und VKA, obwohl unter Rivaroxaban weniger intrakranielle Blutungen, aber dafür mehr gastrointestinale Blutungen auftraten [72]. Kardiale Vorerkrankungen, wie stattgefundene Myokardinfarkte oder die koronare Herzkrankheit (KHK), sind ein großer Risikofaktor für weitere kardiovaskuläre Ereignisse, bis hin zum kardiovaskulären Tod. Von besonderem Interesse ist, dass in der ROCKET-AF Studie unter Rivaroxaban im Trend weniger Myokardinfarkte und vor allem bei diesem Risikokollektiv insgesamt 14% weniger kardiovaskuläre Ereignisse auftraten [73]. An Patienten ohne VHF aber mit hohem kardiovaskulärem Risikoprofil, haben weitere Studien den Benefit von Rivaroxaban untersucht. Eine dieser Studien ist die ATLAS-ACS-2 TIMI-51 Studie, die als große randomisiert kontrollierte

Studie im Jahre 2012 veröffentlicht wurde. Die Studie untersuchte bei 15526 Patienten mit Zustand nach akutem Koronarsyndrom die additive Gabe von 2x täglich 2,5mg oder 5mg Rivaroxaban gegen ein Placebo. Der kombinierte primäre Endpunkt bestand im Auftreten von Tod durch kardiovaskuläre Ursachen, Myokardinfarkt und Schlaganfall. Es konnte gezeigt werden, dass Rivaroxaban das Auftreten des kombinierten primären Endpunktes, im Vergleich zum Placebo, signifikant verringern kann. Ebenfalls war die Gesamtmortalität in der Rivaroxabangruppe deutlich geringer als in der Placebogruppe. Es zeigte sich ein signifikanter Benefit für das geringere Auftreten von kardiovaskulären Toden und Myokardinfarkten, allerdings nicht für Schlaganfälle. Diese Ergebnisse spiegelten sich auch in der Subgruppenanalyse wider. Die 2,5mg Rivaroxaban reduzierten, im Gegensatz zu den 5mg Rivaroxaban, auch die alleinige kardiovaskuläre Mortalität und die Gesamtmortalität, verglichen mit dem Placebo. Beide Rivaroxabangruppen erhöhten des Weiteren das Risiko für Blutungsereignisse signifikant, wobei diese bei der 5mg Dosis häufiger auftraten. Fatale Blutungen waren in beiden Gruppen, im Vergleich zur Placebogruppe, nicht häufiger zu beobachten [10]. Die COMPASS Studie, aus dem Jahre 2017, hat die Ergebnisse aus der ATLAS-ACS-2 TIMI-51 Studie aufgegriffen, um zu untersuchen, ob ASS, Rivaroxaban oder die Kombination aus beiden Medikamenten, die optimale Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Events darstellt. Hierzu wurden 27395 Patienten in drei verschiedenen Gruppen randomisiert. Die erste Gruppe hat täglich 100mg ASS und 2x 2,5mg Rivaroxaban erhalten. Die anderen beiden Gruppen haben jeweils entweder nur 100mg ASS oder 2x 5mg Rivaroxaban erhalten. Der kombinierte Endpunkt setzte sich aus dem Auftreten von kardiovaskulärem Tod, Myokardinfarkt und Schlaganfall zusammen. Für den kombinierten primären Endpunkt zeigte die Kombination von ASS und Rivaroxaban ein signifikant geringeres Auftreten als die ASS Gruppe. Zwischen den Patienten, die mit 2x 5mg Rivaroxaban therapiert wurden, zeigte sich, den primären Endpunkt betreffend, kein Unterschied zur ASS-Gruppe. Für sekundäre Endpunkte, wie das Auftreten von Myokardinfarkten, Schlaganfällen, akute peripherarterielle Verschlüsse und kardiovaskulären Tod, wurden ebenfalls signifikante Benefits in der Gruppe mit Kombination von ASS und Rivaroxaban gesehen. In beiden Rivaroxabangruppen waren signifikant mehr

Blutungsereignisse als in der ASS Gruppe zu beobachten. Im Schaden-Nutzen-Verhältnis überwiegt jedoch der protektive Effekt der ASS + Rivaroxabangruppe im direkten Vergleich mit der ASS-Gruppe. Die Gruppe, in der die Patienten 5mg Rivaroxaban erhalten haben, war im Kosten-Nutzen-Verhältnis nicht schlechter als die ASS-Gruppe [11]. In diesem Zusammenhang hat eine große Metaanalyse, die zu einem Großteil auf die Patientenkollektive der oben genannten Studien, ROCKET-AF und ATLAS-ACS-2 TIMI-51, zurückgreift, sich näher mit dem Auftreten von Myokardinfarkten unter Rivaroxabantherapie beschäftigt. Als Kontrollgruppen wurden Patienten mit VKA-, Enoxaparin- oder Placebothherapie herangezogen. Es zeigte sich mit starker Signifikanz, dass die Einnahme von Rivaroxaban mit einem reduzierten Auftreten von Myokardinfarkten assoziiert ist [74].

1.7 Fragestellung, Hypothese und Ziele der Arbeit

Zusammenfassend kann man in den oben vorgestellten Studien eine Assoziation von Rivaroxaban und geringerer kardiovaskulärer Mortalität sehen. In einem Hochrisikokollektiv mit VHF stehen neben der Schlaganfallprophylaxe, auch die Verhinderung des Auftretens anderer kardiovaskulärer Komplikationen im Vordergrund. Ein positiver Effekt von Rivaroxaban auf das Auftreten von Myokardinfarkten konnte in der vorgestellten Metaanalyse gezeigt werden. Die zu Grunde liegenden Mechanismen erscheinen hingegen unklar. Verwunderlich erscheint ebenfalls, dass bei anderen Medikamenten, die neben Rivaroxaban auch die FXa-Aktivität beeinflussen, wie VKA oder auch Enoxaparin, diese Risikoreduktion in der Metaanalyse keineswegs in dem Umfang stattgefunden hat. Dies suggeriert, dass bei Rivaroxaban, abseits der antikoagulatorischen Wirkung, auch andere Effekte eine Rolle spielen könnten. Unter dem Verständnis, dass die Gerinnung als komplexes System zellgebunden abläuft, ist es wahrscheinlich, dass Thrombozyten auch hier eine zentrale Rolle spielen. Möglich wäre eine direkte antiaggregatorische Wirkung von Rivaroxaban auf Thrombozyten, die im Zusammenspiel mit der bekannten antikoagulatorischen Wirkung des Medikamentes die Entstehung von MACCE erschwert. Daher haben wir in der vorliegenden Arbeit folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Thrombozytenaggregation kann durch FXa am thrombozytären PAR-Rezeptor ausgelöst werden.
2. Dieser Effekt kann durch direkte FXa-Inhibitoren reduziert werden.

Das Ziel der Arbeit ist es, die Wirkung von FXa Inhibitoren auf die Thrombozytenfunktion in einem Hochrisikokollektiv zu untersuchen. Darüber hinaus soll FXa als ein Faktor der direkten Thrombozytenaktivierung zur Diskussion gestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Studiendesign

Insgesamt wurden in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikum Düsseldorf, in den Jahren 2016 bis 2018, 63 Patienten in die Studie eingeschlossen. Das Patientenkollektiv setzte sich aus 52 Patienten zusammen, die aufgrund eines diagnostizierten Vorhofflimmerns ein direktes orales Antikoagulanz (DOAK) einnehmen und 11 Patienten, die keine Antikoagulation erhalten und als Kontrollgruppe eingeschlossen wurden. In der DOAK-Gruppe konnten 37 Patienten eingeschlossen werden, die ein neu aufgetretenes Vorhofflimmern aufwiesen. Diese wurden erstmals auf ein DOAK eingestellt. Als DOAKs wurden Rivaroxaban und Apixaban verwendet. Bei diesen Patienten wurden Versuche vor und 4 Stunden nach erstmaliger Einnahme des DOAKs durchgeführt. So konnten unmittelbar eintretende Effekte des DOAKs, beispielsweise auf die Thrombozytenfunktion, dargestellt werden. Die Blutentnahme vor Einnahme des DOAKs diente hierbei als Referenzwert. Voraussetzung war, dass die Therapie mit unfraktioniertem Heparin für 4h vor der Blutentnahme pausiert wurde. Des Weiteren galten die Einnahme von thrombozytenaggregationshemmenden Medikamenten, Blutgerinnungsstörungen, sowie Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, als Ausschlusskriterien. Zudem wurden *in-vitro* Experimente in Vollblut, Plasma und Serum gesunder Probanden durchgeführt. Die Studie entspricht den ethischen Grundsätzen, die in der Deklaration von Helsinki festgehalten wurden und hat vom Ethikkomitee der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am 04.07.2014 ein positives Votum erhalten (Studiennummern 4735, 6072R).

2.2 Material:

2.2.1 Probengewinnung und Verarbeitung:

Patienten- und Probandenblut wurde durch periphervenöse Blutentnahme mit einer 21g *Butterfly*-Kanüle (BD Vacutainer® Safety-Lok™) in 2,7ml Citratvacuvetten (BD Vacutainer®) entnommen. Das Verhältnis von Citratlösung und Vollblut entsprach dabei einem Verhältnis von 1:10. Für die Versuche mussten aus den Blutproben plättchenreiches Blutplasma (PRP), plättchenarmes Blutplasma (PAP), plättchenfreies Blutplasma (PFP), oder

gewaschene Blutplättchen (WP), in weiteren Arbeitsschritten hergestellt werden. Um PRP zu erhalten, wurde das durch Citrat gerinnungsunfähige Blut bei 1200 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) zentrifugiert (Haereus; Minifuge RF). Der plättchenreiche Überstand wurde mit einer Eppendorf Research® plus Pipette abgenommen und in einem Zentrifugenröhrchen (Falcon Tube, 15ml) gesammelt. Plättchenarmes Plasma (PAP) wurde anschließend durch weitere Zentrifugation des verbliebenen Blutes bei 3000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur (Hareus; Minifuge RF) hergestellt. Auch hier wurde der Überstand wie oben beschrieben abgenommen. Um PFP zu erhalten wurde das PAP in 2ml Eppendorf-Cups umgefüllt und erneut bei 10000 x g in der Tischzentrifuge (Eppendorf 5414 R) zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde wiederum abgenommen. Um WP zu erhalten benötigte man PRP, dem Acid-Citrate-Dextrose (ACD) beigemischt wurde, bis ein pH-Wert $\leq 6,5$ vorlag. Die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte mit dem pH-Meter (*Hanna instruments pH 211 microprocessor pH-meter*). Anschließend wurden pro 10ml PRP, 5 μ l 100 μ M Prostaglandin-E1 (Cayman Chemicals Item 13010) zur Gerinnungshemmung zugegeben. Nach zehnmütiger Inkubation wurde das PRP wieder bei 3000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Hareus; Minifuge RF). Der Überstand wurde verworfen und die Thrombozyten in Thrombozytenwaschpuffer volumenäquivalent resuspendiert. Nach zweimaliger Wiederholung des Waschvorgangs, wurden die Thrombozyten, je nach Versuch, in Patientenplasma, oder alternativ in albumin- und glucosehaltigem Thrombozytenmedium (TM) resuspendiert.

2.2.2 Verwendete Substanzen:

Adenosin-5'-Diphosphat Sigma, Steinheim, Deutschland

Thrombinreceptor activating peptide (TRAP-6) Sigma, Steinheim, Deutschland

Kollagen HORM® Nycomed, Linz, Österreich

Arachidonsäure NatuTec, Frankfurt, Deutschland

PGE-1 Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA

Boviner aktivierter Faktor X (FXa) Sigma, Steinheim, Deutschland

Rivaroxaban	APExBIO, Houston, Texas USA
Vorapaxar	AbMole BioScience, Houston, Texas USA
Kollagen	Chronolog., Havertown, Pennsylvania USA
<i>Phosphate buffered saline with Calcium</i>	Sigma, Steinheim, Deutschland
<i>Phosphate buffered saline without Calcium</i>	Sigma, Steinheim, Deutschland
Bovines Albumin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Calcein-AM	Thermo-Fisher, Waltham, Massachusetts USA
ADPTest®	Roche, Basel, Schweiz
TRAPTtest®	Roche, Basel, Schweiz
ASPITest®	Roche, Basel, Schweiz
PPP-Reagent	Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande
Thrombin Calibrator	Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande
Fluo-Buffer	Stago S.A.S, Asnières sur Seine, Frankreich
Fluo-Substrate	Stago S.A.S, Asnières sur Seine, Frankreich
TXB2 AChE-Tracer	Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA
TXB2-ELISA-Antiserum	Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA
Washbuffer	Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA
Ellman's Reagent	Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA
TXB2 ELISA Standard	Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA
Paraformaldehyd 4%	
Isoton II BD FACSTFlow® Puffer	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
CD41-APC AK	Beckman Coulter, Villepinte, Frankreich
Anti-Thrombin-Receptor PE AK	Beckman Coulter, Villepinte, Frankreich

Thrombin R FITC AK	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
PAR-4 PE	Almone Labs, Jerusalem, Israel
IgG1-Mouse-APC	Beckman Coulter, Villepinte, Frankreich
IgG-Mouse-PE	Beckman Coulter, Villepinte, Frankreich
Tris-Puffer (pH 7,4): 50mM Tris-HCl	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thrombozytenmedium-Puffer (TM, pH 7,4) bestehend aus: 134 mM NaCl, 12 mM NaHCO ₃ , 2,9 mM KCl, 0,36 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 1 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O, 5 mM HEPES	

2.3 Methoden:

2.3.1 Thrombozytenfunktionsmessung in der Lichttransmissionsaggregometrie:

Die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) ist eine gängige Methode und gilt als Goldstandard zur *in-vitro* Evaluation der Thrombozytenfunktion [75]. Die Methode wurde erstmalig im Jahre 1962 von Born und O'Brien etabliert, die diese unabhängig voneinander beschrieben [76, 77]. In der LTA wird die Lichttransmission im Vorgang der Thrombozytenaggregation im Zeitverlauf dargestellt. Dazu wird eine Blutplättchensuspension, beispielsweise PRP oder WP, von einer Lichtquelle angestrahlt und die Lichttransmission von einem Detektor erfasst [78]. Dieser Wert wird zum Eichen des Aggregometers als Referenzwert verwendet und entspricht 0% Lichttransmission [78]. Um den Eichvorgang zu beenden benötigt man ein blutplättchenarmes Medium, zum Beispiel PAP, desselben Individuums. Die Lichtdurchlässigkeit des PAP entspricht hierbei 100% und damit maximaler Lichttransmission [78]. Zur Messung der Thrombozytenaggregation wird PRP verwendet, dem ein Stimulus beigemischt wird, um die Thrombozytenreaktion zu beginnen. Gängige Stimulanzen sind in diesem Zusammenhang Arachidonsäure (ARA), Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen, Epinephrin, Thrombin oder Thrombinrezeptor aktivierendes Peptid (TRAP) [75]. Mit fortschreitender Aggregation der Thrombozyten steigt die detektierte Lichttransmission im Medium. Die Lichttransmission entspricht hierbei der Aggregation und wird

graphisch als Kurve über den Zeitverlauf dargestellt (s. Abb.3). Nach Beendigung der Messung können diagnostische Parameter, wie die Maximale Aggregation (*maximum of aggregation, MoA*), in Prozent auf der Aggregationskurve abgelesen werden. Die Steigung der Aggregationskurve sowie Phänomene wie „*platelet shapechange*“ oder „*secondary wave of aggregation*“ bieten weitere Möglichkeiten zur Interpretation. Deswegen ist die LTA als Diagnostikum zum Erkennen und Differenzieren von Gerinnungsstörung und Blutplättchen-Medikamenten-Interaktionen in Klinik und Forschung von großem Wert [75, 78]. Dennoch muss man sagen, dass die Durchführung der LTA einen komplexen Vorgang darstellt, der viel Raum für Variabilität zwischen verschiedenen Untersuchern und Untersuchungszentren bietet. Das ist der Grund, warum die LTA ein wenig standardisiertes Verfahren darstellt. Neue Leitlinien haben das Ziel diese Variabilität zu minimieren und das Verfahren zu standardisieren [75, 78, 79].

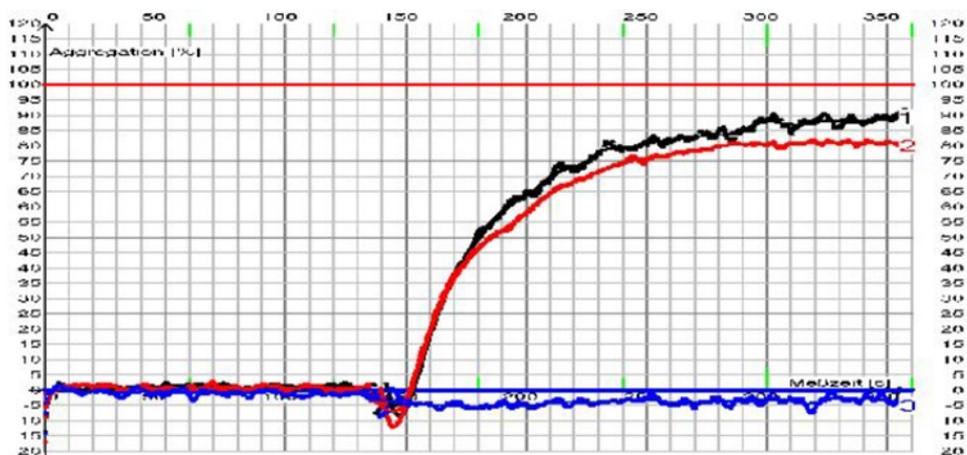


Abb.3: Graphische Darstellung der Aggregation in der LTA: Die Abbildung zeigt eine exemplarische Darstellung von drei Aggregationskurven, während der LTA mit dem AFACT 404. Auf der Y-Achse ist die Maximale Aggregation in Prozent aufgetragen. Hierbei beschreibt die blaue, durchgezogene Linie die 0% Markierung, während die obere rote Linie die 100% Markierung angibt. Auf der X-Achse ist die Aggregationszeit von 0-360 Sekunden aufgetragen. Bei 120 Sekunden wird jeweils ein Stimulus in die drei Kanäle (blau, rot und schwarz) gegeben. Die Kurven nähern sich danach, je nach Aggregationsstärke, der 100% Markierung an. Im Kanal der blauen Aggregationskurve fand keine Aggregation statt.

2.3.2 Durchführung der Thrombozytenfunktionsmessung in der LTA:

Die Thrombozytenfunktion der Patienten und gesunder Probanden wurde durch LTA in PRP, sowie auch in WP, bestimmt. Die LTA wurde mit einem LABiTec APACKT 4004 durchgeführt. Die Auswertung der Aggregationskurven erfolgte automatisiert mit der entsprechenden Software des Herstellers (APACKT LPC-Software Version 1.21c) und wurde als MoA in Prozent angegeben. Zur Eichung wurde PAP oder Albumin und glukosehaltiges TM verwendet. Für jede Aggregation wurden 50µl TM mit 200µl PRP oder WP für 4 Minuten im Wärmeblock bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Aufzeichnung der Aggregationskurve gestartet und die Probe für 2 Minuten gerührt. Danach wurde der jeweilige Stimulus in die Probe pipettiert und die Aggregation für weitere 4 Minuten aufgezeichnet. Nach insgesamt 6 Minuten wurde die Aggregationsaufzeichnung automatisch beendet. Als Stimulanzien wurden 52µg/ml FXa (Sigma F9302-50UG), 10µM *thrombin receptor activating peptide* (TRAP-6, Sigma, T1573), 10µg/ml Kollagen (NYCOMED), 20µM Adenosindiphosphat (ADP, Sigma, A5285) oder 0,5mM Arachidonsäure (ARA, NatuTec), die in Trispuffer gelöst wurde, verwendet. Die Ansätze wurden je nach Versuchsaufbau im Voraus mit Rivaroxaban (APEXBIO) oder Vorapaxar (AbMole BioScience) in verschiedenen Konzentrationen für 5-15 Minuten vorinkubiert.

2.3.3 Thrombozytenfunktionsmessung in der Mehrfach-Elektroden-Aggregometrie:

Die Mehrfach-Elektroden-Aggregometrie (MEA), auch bekannt als Impedanz-Aggregometrie, ist ein weiteres Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion. Zuerst 1980 von David C. Cardinal und Roderick J. Flower beschrieben, bietet die MEA den Vorteil, dass die Thrombozytenfunktion direkt im antikoagulierten Vollblut gemessen werden kann [80]. Im Gegensatz zur LTA sind bei der MEA also keine weiteren Aufarbeitungsschritte des Probenmaterials notwendig [80]. Das führt dazu, dass die MEA auch im klinischen Setting vermehrt als *point-of-care-test* (POCT) schnell eingesetzt werden kann [81]. Der Vorteil der Thrombozytenfunktionsmessung im Vollblut besteht darin, dass man die Thrombozytenfunktion in einer physiologischeren Umgebung evaluieren kann. Insbesondere die Rolle der Interaktionen zwischen

Thrombozyten und anderen Zellen, beispielsweise Leukozyten oder Erythrozyten, kann in der MEA miterfasst werden. Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass genau diese Zell-Zell-Interaktionen zu Problemen führen können. So konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Impedanz-Aggregometrie von der Blutplättchenanzahl und vom Hämatokrit-Wert der gemessenen Probe abhängig sind [82, 83]. Die MEA bietet den Vorteil, dass man weniger Probenmaterial im Vergleich zur LTA benötigt. In diesem Probenmaterial sind alle Thrombozyten Subpopulationen enthalten, während bei der Herstellung des PRP relativ große Thrombozyten durch Zentrifugation verloren gehen [80, 81]. Das Prinzip der MEA beruht auf der Messung der, sich unter Aggregation verändernden, Impedanz zwischen zwei Elektroden. Dazu wird eine Vollblutprobe zwischen zwei Elektroden platziert, deren negativen Oberflächen direkt von Thrombozyten bedeckt werden. Wird nun ein Stimulus beigemischt, kommt es zur weiteren Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten an den beiden Elektroden. Dadurch steigt die Impedanz zwischen den beiden Elektroden. Sie steht im Verhältnis mit der Stärke der Thrombozytenaggregation, welche dann als Kurve im Verlauf über die Zeit visualisiert werden kann [80].

2.3.4 Durchführung der Thrombozytenfunktionsmessung in MEA:

Die Thrombozytenfunktion der Patienten wurde im Impedanzaggregometer (Multiplate®) bestimmt. Die Messung erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikum Düsseldorf, innerhalb der klinischen Routine. Für die Impedanzaggregometrie wurden jeweils 300µl Citrat-antikoaguliertes Vollblut im *Roche Multiplate® Analyzer* stimuliert. Als Stimulantien wurden ADP (ADPtest®), TRAP (TRAPtest®) und ARA (ASPItest®) verwendet. Die Beimischung der Stimulantien und die Durchführung der Messung erfolgten automatisiert. Die Aufzeichnung und Auswertung der Aggregationskurven wurden durch die entsprechende Software des Herstellers ebenfalls automatisiert durchgeführt. Die Stärke der Aggregation wurde als „*area under the curve*“ (AUC) berechnet und dargestellt.

2.3.5 Durchführung der Messung von Thrombozytenadhäsion in einer kollagenbeschichteten Flusskammer:

Die Thrombozytenadhäsion, in Patienten und Probandenblut, wurde in einer mit Kollagen beschichteten Flusskammer, unter arteriellen Flussbedingungen, gemessen. Dazu wurde eine 48-Well 0-20dyn/cm² *low-shear* Platte (Fluxion Bioscience), mit 100µg/ml Kollagen (Chronolog no. 385) bei 2dyn/cm² beschichtet. Als Pumpensystem wurde das Bioflux 1000 verwendet. Nach einstündiger Inkubationszeit wurden die Kapillaren mit calcium- und magnesiumhaltiger, Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (Sigma D8662) für 10 Minuten bei 5 dyn/cm² gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungen mit 0,5% in PBS gelöstem bovinem Albumin (Serva 11924.02) bei 5 dyn/cm², über 15min Fluss und anschließender zehnminütiger Inkubationszeit abgebunden. Danach wurde mit Calcein AM (Thermo-Fisher C1430) vorinkubiertes Citrat-Vollblut, unter arteriellen Flussbedingungen, bei 10 dyn/cm² für 3 und 5 Minuten, durch die Kapillare gepumpt. Nachdem das in der Kapillare verbliebene Vollblut mit PBS (Sigma D8537) ohne Calcium- und Magnesiumzusatz bei 2 dyn/cm² ausgewaschen wurde, konnte die Thrombozytenadhäsion im Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE 2000-U) dargestellt werden (s. Abb. 4). Mit Hilfe einer hochauflösenden Kamera (Nikon DS-qi2) wurden bei einer Belichtungszeit von 500ms Bilder der Kapillaren angefertigt. Die Auswertung der Bilder wurde mit der entsprechenden Software des Herstellers durchgeführt (BioFlux Montage™) und die Thrombozytenadhäsion in Prozent quantifiziert.

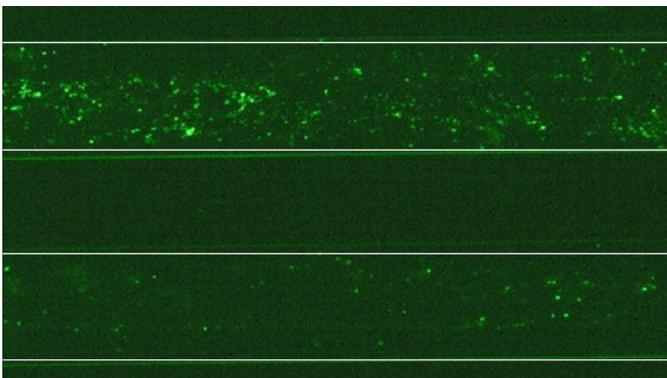


Abb.4: Thrombozytenadhäsion in einer kollagenbeschichteten Flusskammer: Das Bild zeigt die fluoreszenzmikroskopische Ansicht von zwei sich gegenüberliegende Kapillaren der Flusskammer. Die Ränder der Kapillaren wurden zur besseren Übersicht weiß markiert.

Leuchtend grün stellen sich die an der kapillären wand adhärennten Thrombozyten dar. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden diese mit Calcein markiert.

2.3.6 Messung des endogenen Thrombinpotenzials:

Das endogene Thrombinpotenzial (ETP) ist ein guter Parameter um eine umfassende Aussage über den Gerinnungsstatus eines Individuums zu erhalten [84]. Während man mit konventionellen Laborparametern nur einen Teil des Gerinnungssystems abbilden kann, kann das ETP bei mehreren Fragestellungen verwendet werden [85]. Als Beispiel sei hier der Quick-Wert angeführt, der als Laborwert das extrinsische System der Gerinnungskaskade über die TF Aktivierung beurteilt [86]. Er kann jedoch nicht die Wirkung der Antikoagulation mit Heparin oder heparinähnlichen Substanzen abbilden, da diese ihre Wirkung im intrinsischen Schenkel entfaltet [87]. Diese konventionellen Laborparameter weisen außerdem eine erheblich geringere Sensitivität als das ETP auf, da durch sie nur etwa 5% des gesamten Thrombinpotenzials abgebildet werden können [85, 88]. Bei der Messung des ETP macht man sich zu Nutze, dass Thrombin eine zentrale Funktion im Gerinnungsablauf darstellt [29]. So führt jeder prokoagulatorische Prozess, über den Weg der Gerinnungskaskade, letztendlich zur Bildung von Thrombin [29]. Zum anderen vermittelt und verstärkt Thrombin selbst auch weitere gerinnungsfördernde Prozesse [29, 88]. Hierbei spielt auch die Interaktion mit Thrombozyten eine Rolle, die Thrombinrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren [89]. Das ETP kann, je nach Fragestellung, in PRP oder PAP gemessen werden. Hierzu wird die Technik der kalibrierten automatisierten Thrombographie (CAT) verwendet, die von *Hemker et al* im Jahre 2002 beschrieben wurde [84]. Bei der CAT wird den zu messenden Proben eine bestimmte Menge eines Substrates beigemischt, das bei Spaltung durch Thrombin fluoresziert. Da das PAP oder PRP aus Citratblut gewonnen wurde, kann die Reaktion erst nach Rekalzifizierung der Probe eintreten. Da die Stärke der abgegebenen Fluoreszenz nicht linear mit der Thrombinkonzentration korreliert, ist eine Kalibrierungsmessung notwendig. In dieser Messung wird an α -2-Makroglobulin gebundenes Thrombin als Kalibrator in einer festen Konzentration eingesetzt. Dieses gebundene Thrombin kann weiterhin kleinere Substrate spalten und die resultierende Fluoreszenzkurve wird als Referenz für

die Probenmessung verwendet. Nach Rekalzifizierung des PAP oder PRP wird Thrombin generiert, was zum Anstieg der Fluoreszenz führt, die in einem Fluorometer detektiert werden kann. Das ETP wird nun anhand der Referenzkonstante, die aus der Kalibrierungsmessung entsteht, berechnet und als Fläche unter der Kurve angezeigt [84]. Aus der Kurve lassen sich mehrere Werte berechnen, die zur Interpretation des ETP verwendet werden können. Die *Lag-time* beschreibt die Zeitspanne vom Reaktionsbeginn bis zur Bildung von Thrombin [84]. Sie entspricht also der Gerinnungszeit, ist aber sehr viel sensitiver, da die gemessene Probe in der CAT verdünnt vorliegt [85]. Der „*Peak*“ beschreibt die maximale Thrombin-Konzentration, die in der Probe gemessen werden kann, während „*Time to peak*“ die Zeitspanne beschreibt, die vom Reaktionsstart an vergeht, bis die maximale Thrombin-Konzentration erreicht wird. Der „*Velocity Index*“ spiegelt das Verhältnis von „*Lag-time*“ und „*Time to Peak*“ wider [85].

2.3.7 Durchführung der Messung des endogenen Thrombinpotenzials:

Um das endogene Thrombinpotenzial (ETP) zu messen wurde zunächst PFP aus Citratblut hergestellt. Das ETP wurde im Verfahren der kalibrierten automatisierten Thrombographie (CAT; Thrombinoscope™ BV, Maastricht, Niederlande) gemessen. Hierzu wurden auf eine *96-Well-Platte* 80µl PFP pro *well* pipettiert. Anschließend wurden 20µl eines phospholipid- und „*tissue-factor*“-haltigem Reagenz (PPP-Reagent, Thrombinoscope™) hinzugefügt, um eine Thrombinbildung zu stimulieren. Um größere interindividuelle Unterschiede zwischen den Proben zu vermeiden, wurde diesen 20µl „*Thrombin Calibrator*“ (Thrombinoscope™) beigemischt und eine Kalibrierung durchgeführt. Nach zehnmütiger Inkubationszeit wurden die Proben mit einer HEPES-haltigen Lösung und einem fluoreszierenden Thrombinsubstrat vermischt (FluCa-Kit: Fluo-Buffer pH 7,35 und Fluo-Substrate; Stago S.A.S, Asnières sur Seine, Frankreich). Die eintretende Rekalzifizierung des citrathaltigen Probenmaterials bewirkte einen Start der Reaktion und die, vom Thrombinsubstrat ausgehende, Fluoreszenz konnte im Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) detektiert werden. Die Messung der Proben dauerte 45 Minuten. Das ETP wurde anschließend als *area under the curve* (AUC), von der entsprechenden Software des Herstellers (Thrombinoscope™ software;

Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande), zusammen mit anderen Parametern wie „*Velocity index*“, „*peak*“, „*time to peak*“, und „*lag-time*“ gemessen und berechnet.

2.3.8 Messung von Thromboxan B2 mittels *ELISA*

Zur Messung des im Plasma stabilen Metaboliten Thromboxan B2 (TXB2), wurde ein *ELISA* (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) der Firma Cayman-Chemicals (*Item-No.* 501020, Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA) verwendet. Das Prinzip der Messung basiert darauf, dass ein Gefäß (in diesem Fall eine 96-*well*-Platte) mit einem für TXB2-Antiserum spezifischen Antikörper (Mouse-Anti-Rabbit-IgG-coated-Plate *Item No.* 400004, Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA) beschichtet ist. Nun gibt man die zu messende Plasmaprobe, gleichzeitig mit einer TXB2 haltigen Indikatorsubstanz (TXB2 AChE-Tracer *Item No.* 401020, Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA) und dem TXB2-Antiserum (TXB2-ELISA-Antiserum *Item No.* 401022, Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA) in die Wells. Diese beiden TXB2 haltigen Flüssigkeiten konkurrieren nun um die Bindungsstelle am Antiserum, welches wiederum von den Antikörpern gebunden wird. Die TXB2 Konzentration im TXB2 haltigen Substrat ist hierbei immer konstant, während die TXB2 Konzentration in der zu messenden Probe variieren kann. Nun werden die ungebundenen TXB2 Moleküle mit einer Waschsubstanz (Washbuffer *Item No.* 400062, Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA) ausgewaschen. Die Indikatorsubstanz beinhaltet neben dem TXB2 auch ein gebundenes Enzym (Acetylcholinesterase). Ein für dieses Enzym spezifisches Substrat (Ellman's Reagent *Item No.* 400050, Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA), welches bei Spaltung fluoresziert, wird nun hinzugegeben. Die Stärke der Fluoreszenz kann nun im Photometer gemessen werden und ist umgekehrt proportional zur gebundenen Menge TXB2 aus der zu messenden Plasmaprobe. Als Referenz dient eine zuvor durchgeführte Verdünnungsreihe einer TXB2 Stammlösung (TXB2 ELISA Standard *Item No.* 419034, Cayman-Chemicals, Ann-Arbor, Michigan USA) aus dem ELISA-Kit. Die Messungen wurden nach Angaben des Herstellers des ELISA-Kits durchgeführt. Die dabei verwendeten Substanzen waren Teil des ELISA-Kits.

2.3.9 Messung der Expression Protease-aktivierter Rezeptoren in der Durchflusszytometrie mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung:

Die Durchflusszytometrie ist ein Komplexes Verfahren in der man die Anzahl von verschiedenen Zelltypen in einer Probe anhand ihrer unterschiedlichen Morphologie quantifizieren kann. Von Wolfgang Göhde im Jahre 1969 beschrieben, hat sich die Durchflusszytometrie als Methode in Wissenschaft und Medizin etabliert [90, 91]. Das Prinzip der Messung beruht auf unterschiedlichem Brechungsverhalten verschiedener Zelltypen [92]. Eine kleine Probe, beispielsweise PRP, wird durch eine feine Kapillare gesogen, in der jede einzelne Zelle durch einen Laser angestrahlt wird. Je nach Komplexität der Zelle unterscheidet sich die Lichtstreuung, die als Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht, „*forward scatter*“ und „*side scatter*“ genannt, von Detektoren erfasst werden kann [92]. Das Maß der Lichtstreuung korreliert proportional mit der Größe und der Komplexität der angestrahlten Zelle. Eine besondere Form der Durchflusszytometrie ist die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung. Hierbei können zusätzlich noch spezifischere Sortierungen der Zellen erfolgen. Man kann hierzu Antikörper (AK) benutzen, die mit einem fluoreszierenden Stoff gekoppelt sind. Diese AK können sich nun zum Beispiel gegen Oberflächenstrukturen von Zellen richten und diese somit markieren. Die Fluoreszenz wird wiederum von anderen Detektoren erfasst. Diese Technik kann man sich zu Nutze machen, wenn man die Expression von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) auf Thrombozyten messen möchte. [92]

2.3.10 Durchführung der Messung der Expression von PAR in der Durchflusszytometrie mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung:

Die Expression der Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 4 (PAR-1, PAR-4) auf Thrombozyten wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie mit fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) bestimmt. Für die Messung werden verschiedene Antikörper benötigt. Um Thrombozyten in der FACS identifizieren zu können, wurde ein CD41 Antikörper (CD41-APC AK; Beckman Coulter, Villepinte, Frankreich) verwendet, der sich gegen das auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimierte Integrin- α -IIb (CD41) richtet. Da CD41 in der untersuchten Probe ausschließlich von Thrombozyten exprimiert wird, werden

auch nur diese von dem oben genannten Antikörper markiert und vom Gerät detektiert [93]. Auf diesen menschlichen Thrombozyten werden ausschließlich zwei Formen von Thrombinrezeptoren exprimiert, die als PAR-1 und PAR-4 bezeichnet werden [31, 94]. Für die Darstellung der PAR-1 Thrombinrezeptoren in der FACS wurde der PAR-1-Antikörper SPAN12 (Anti-Thrombin-Receptor PE AK; Beckman Coulter, Villepinte, Frankreich) verwendet, der spezifisch nur an nicht aktivierte PAR-1 bindet. Außerdem wurde der unspezifische PAR-1 Antikörper ATAP2 (Thrombin R FITC AK; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) verwendet, der sowohl aktivierte als auch nicht aktivierte PAR-1 bindet. Die Darstellung der PAR-4 Rezeptoren erfolgte mit einem separaten Antikörper (PAR-4 PE; Almone Labs, Jerusalem, Israel). zusätzlich dazu wurden zwei weitere Isotypen-Anti-Körper verwendet, die dieselben Fluoreszenzspektren abdeckten wie oben genannte Antikörper, sie dienten somit als Negativkontrollen zur jeweiligen Messung (IgG1-Mouse-APC und IgG-Mouse-PE; Beckman Coulter, Villepinte, Frankreich). In Vorbereitung für die Messung wurde jeweils 1µl des jeweiligen Antikörpers auf 5µl PRP in ein Eppendorf-Cup pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten in einem Wärmeblock bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde den Proben für den Fixierungsprozess 1µl 4-prozentiges Paraformaldehyd beigemischt. Die Inkubation wurde nun für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei die Proben weiterhin vor Licht geschützt blieben. Vor der Messung im Durchflusszytometer (Gallios™ 10/3 Durchflusszytometer, Beckman Coulter), wurden die Proben mit 1 ml BD FACSFlo® Puffer verdünnt und in Messküvetten umgefüllt. Die Analyse und Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo® oder Kaluza® *Version 9.6.2* und die Rezeptorexpression wurde in Prozent quantifiziert.

2.4 Statistische Auswertung:

Statistische Analysen aller Studienergebnisse wurden mit Hilfe der Statistik-Softwares IBM SPSS®-Software (New York, USA) und GraphPad-Prism® 6 Software (GraphPad software Inc, San Diego) durchgeführt. Die Daten wurden hiermit zunächst auf Normalverteilung geprüft. Hierzu wurden Kolmogorov-Smirnov-Tests, Shapiro-Wilk-Tests, q-q-Plots und Histogramme herangezogen.

Anschließend wurden normalverteilte Daten, je nach Abhängigkeit der Variablen, mit Hilfe von gepaarten oder ungepaarten t-Tests analysiert. Bei nicht-normalverteilten Daten wurden Wilcoxon-matched t-tests bei abhängigen und Mann-Whitney-U-tests bei unabhängigen Variablen herangezogen. Es wurde ein Modell der multiplen linearen Regression verwendet, um den Einfluss von mehreren unabhängigen auf eine abhängige Variable festzustellen. Für normalverteilte Variablen werden die Ergebnisse und die deskriptiven Statistiken der erhobenen Daten als Mittelwerte mit Standardabweichung (Mean \pm SD) präsentiert. Binäre Variablen werden in der deskriptiven Statistik als absolute Anzahl mit prozentualem Anteil an der Population in Klammer (No. [%]) dargestellt. Es wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt. Somit wurden P-Werte <0.05 als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse:

3.1 Studienpopulation und Patientencharakteristika:

3.1.1 Allgemeines zum Patientenkollektiv und den Patientencharakteristika:

In diese Studie konnten insgesamt 63 Patienten, in jeweils 3 Studiengruppen eingeschlossen werden. Die erste Gruppe umfasst 37 Patienten mit neu aufgetretenem Vorhofflimmern. Von diesen wurden 31 Patienten neu mit Rivaroxaban und 6 Patienten neu mit Apixaban therapeutisch antikoaguliert. Da in dieser Gruppe Experimente in Zeitreihenanalyse durchgeführt wurden, wird sie im weiteren Verlauf als OAK *time-series* Gruppe bezeichnet. In die zweite Studiengruppe wurden 15 Patienten eingeschlossen, die aufgrund eines Vorhofflimmerns über einen längeren Zeitraum Rivaroxaban eingenommen haben. Diese Gruppe soll als Querschnittsgruppe für die Patientenpopulation dienen und wird aus daher im Folgenden als OAK *cross-sectional* Gruppe bezeichnet. In die letzte Studiengruppe wurden 11 Patienten eingeschlossen, die keine orale Antikoagulanzen einnehmen. Diese soll als Kontrollgruppe zur OAK *cross-sectional* Gruppe fungieren und wird im Folgenden als Non-OAK Gruppe bezeichnet. In allen drei Studiengruppen wurden zum einen allgemeine Charakteristika, Komorbiditäten und die Komedikation aus den, zum Zeitpunkt der Studie aktuellen, Arztbriefen und Patientenkurven erhoben. Zum anderen wurden die im Stationsalltag routinemäßig erhobenen Laborparameter ausgewertet. Als allgemeine Charakteristika wurden Alter, Geschlecht, *Body Mass Index* (BMI) und der CHA2DS2-VASc Score erfasst. Unter den Komorbiditäten wurden die koronare Herzkrankheit (KHK), die peripher arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), die Herzinsuffizienz, das Vorhofflimmern (VHF), die arterielle Hypertonie (aHT), die Hypercholesterinämie, der Diabetes mellitus (DM) und der Raucherstatus berücksichtigt. Die aktuelle Komedikation umfasste Antikoagulanzen, ACE-Inhibitoren, AT1-Rezeptor-Antagonisten, Betarezeptorblocker, Calciumrezeptor-antagonisten, Diuretika, Aldosteronrezeptorantagonisten und Statine. Unter den Laborparametern wurden Hämoglobingehalt (Hb), Hämatokrit (Hkt), Leukozyten, Thrombozyten,

Fibrinogen, Serumkreatinin und C-reaktives Protein (CRP) zusammengefasst.
(Tabelle 1)

3.1.2 Die Studienpopulation der OAK *time-series* Gruppe:

In der OAK *time-series* Gruppe weisen die Patienten ein mittleres Lebensalter von 72,41 Jahren auf, die Standardabweichung beträgt 14,16 Jahre. Von diesen Patienten gehören 23 zum männlichen Geschlecht, was einen prozentualen Anteil von 62,2% der Gesamtgruppe ausmacht. Der durchschnittliche BMI in dieser Studiengruppe beträgt 26,34 kg/m² mit einer Standardabweichung von 4,87 kg/m². Der CHA₂DS₂-VASc Score beläuft sich im Mittel in dieser Gruppe auf 4,27 Punkte mit einer Standardabweichung von 1,79 Punkten. Als Komorbiditäten weisen in dieser Gruppe 26 Patienten (70,3%) eine KHK, 4 Patienten (10,8%) eine pAVK, 7 Patienten (18,9%) eine Herzinsuffizienz, 37 Patienten ein VHF (100%), 31 Patienten (83,8%) eine aHT, 23 Patienten (62,2%) eine Hypercholesterinämie, 15 Patienten (40,5%) einen DM und 4 Patienten (10,8%) eine positive Raucheranamnese auf. In dieser Studienpopulation nehmen 37 Patienten (100%) Antikoagulanzen, 12 Patienten (32,4%) ACE-Inhibitoren, 9 Patienten (24,3%) AT₁-Rezeptorantagonisten, 30 Patienten (81,1%) Betarezeptorblocker, 10 Patienten (27%) Calciumrezeptorantagonisten, 17 Patienten (45,9%) Diuretika, 14 Patienten (37,8%) Aldosteronrezeptorantagonisten und 25 Patienten (65,6%) Statine ein. Der durchschnittliche Hb liegt in der OAK *time-series* Gruppe bei 11,89 g/dl mit einer Standardabweichung von 2,12 g/dl. Der Hkt liegt im Durchschnitt bei 36,28 % und hat eine Standardabweichung von 6,36%. Die durchschnittliche Anzahl der Leukozyten beträgt 7,49 x1000/μl mit einer Standardabweichung von 2,27 x1000/μl. Im Mittel beträgt die Thrombozytenzahl 202,97 x1000/μl und die Standardabweichung 78,63 x1000/μl. Das Fibrinogen im Serum liegt in dieser Gruppe bei 366,06 mg/dl, die Standardabweichung liegt bei 98,09 mg/dl. Das Serumkreatinin beträgt im Durchschnitt 1,18 mg/dl und das CRP 3,49 mg/dl mit einer jeweiligen Standardabweichung von 0,48 mg/dl und 5,18 mg/dl.
(Tabelle 1)

3.1.3 Die Studienpopulation der OAK *cross-sectional* Gruppe:

In der OAK *cross-sectional* Gruppe beträgt das mittlere Lebensalter 75,07 Jahre mit einer Standardabweichung von 9,32 Jahren. In dieser Gruppe befinden sich 7 Männer was einem prozentualen Anteil von 46,7% der Gruppe entspricht. Der BMI und der CHA2DS2-VASc Score betragen im Durchschnitt 27,47 kg/m² und 3,67 Punkte, die jeweilige Standardabweichung entspricht 5,88 kg/m² und 1,63 Punkten. Als Komorbiditäten weisen 7 Patienten (46,7%) eine KHK, 3 Patienten (20%) eine pAVK, 2 Patienten (14,3%) eine Herzinsuffizienz, 15 Patienten (100%) ein VHF, 13 Patienten (92,9%) eine aHT, 6 Patienten (42,9%) eine Hypercholesterinämie, 3 Patienten (21,4%) einen DM und 4 Patienten (28,6%) eine positive Raucheranamnese auf. Als Komedikation nehmen in dieser Gruppe 15 Patienten (100%) Antikoagulanzen, 6 Patienten (40%) ACE-Inhibitoren, 5 Patienten (33,3%) AT1-Rezeptorantagonisten, 11 Patienten (73,3%) Betarezeptorblocker, 6 Patienten (40%) Calciumrezeptorantagonisten, 13 Patienten (86,7%) Diuretika, 5 Patienten (33,3%) Aldosteronrezeptorantagonisten und 9 Patienten (60,0%) Statine ein. Der Hb und der Hkt betragen im Mittel in dieser Gruppe 10,81 g/dl und 35,03% mit den jeweiligen Standardabweichungen von 2,73 g/dl und 5,04%. Die Leukozyten und Thrombozytenanzahl belaufen sich durchschnittlich auf 8,17 x1000/μl und 197,87 x1000/μl mit Standardabweichungen von 1,68 x1000/μl und 60,69 x1000/μl. Die Serumparameter Fibrinogen, Kreatinin und CRP weisen Mittelwerte von 298,13 (± 83,34 mg/dl Standardabweichung), 1,16 (± 0,34 mg/dl Standardabweichung) und 3,1 (± 4,64 mg/dl Standardabweichung) auf. (Tabelle 1)

3.1.4 Die Studienpopulation der Non-OAK Gruppe:

Die Patienten der Non-OAK Gruppe haben ein durchschnittliches Lebensalter von 70,73 Jahren die Standardabweichung beträgt hier 14,01 Jahre. Von 11 Patienten sind 3 männlichen Geschlechts, was einen prozentualen Anteil von 27,3% ausmacht. BMI und CHA2DS2-VASc Score betragen im Mittel 30,11 bei 7,31 kg/m² Standardabweichung und 2,55 ± 1,64 Punkte Standardabweichung. Die Komorbiditäten belaufen sich in dieser Gruppe auf 1 Patient (9,1%) mit KHK, 2 Patienten (18,2%) mit pAVK, 9 Patienten (81,8%) mit aHT, 2 Patienten

(18,2%) mit Hypercholesterinämie, 3 Patienten (27,3%) mit DM und 2 Patienten (18,2%) mit positiver Raucheranamnese. Herzinsuffizienz und VHF treten in dieser Gruppe nicht auf. In der Gruppe nehmen 4 Patienten (36,4%) ACE-Inhibitoren, 2 Patienten (18,2%) AT1-Rezeptorantagonisten, 7 Patienten (63,6%) Betarezeptorblocker, 1 Patienten (9,1%) Calciumrezeptorantagonisten, 3 Patienten (27,3%) Diuretika und 6 Patienten (54,5%) Statine ein. Antikoagulanzen und Aldosteronantagonisten werden von keinem der Patienten in dieser Gruppe eingenommen. In Bezug auf die Laborparameter zeigt sich ein durchschnittlicher Hb von 13,37 g/dl mit einer Standardabweichung von 1,62 g/dl und ein Hkt von 40,56 % mit einer Standardabweichung von 4,35% in dieser Gruppe. Die Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten beträgt im Mittel 7,53 x1000/µl und 220,18 x1000/µl mit den jeweiligen Standardabweichungen von 2,67 x1000/µl und 56,67 x1000/µl. Fibrinogen, Kreatinin und CRP zeigen in der Non-OAK Gruppe Mittelwerte von 383,25 ± 40,20 mg/dl Standardabweichung, 1,39 ± 1,52 mg/dl Standardabweichung und 1,03 ± 1,08 mg/dl Standardabweichung. (Tabelle 1)

	OAK time-series Gruppe (N=37)	OAK cross-sectional Gruppe (N=15)	Non-OAK Gruppe (N=11)
Charakteristika			
Alter (Jahre) – MW ± S.D.	72,41 ± 14,16	75,07 ± 9,32	70,73 ± 14,01
Männliches Geschlecht– No. (%)	23 (62,2%)	7 (46,7%)	3 (27,3%)
Body Mass Index (kg/m ²) – MW ± S.D.	26,34 ± 4,87	27,47 ± 5,88	30,11 ± 7,31
CHA2DS2-VASc – MW ± S.D.	4,27 ± 1,79	3,67 ± 1,63	2,55 ± 1,64
Komorbiditäten – No. (%)			
KHK	26 (70,3%)	7 (46,7%)	1 (9,1%)
pAVK	4 (10,8%)	3 (20,0%)	2 (18,2%)
Herzinsuffizienz	7 (18,9%)	2 (14,3%)	-
Vorhofflimmern	37 (100%)	15 (100%)	-
Arterieller Hypertonus	31 (83,8%)	13 (92,9%)	9 (81,8%)
Hypercholesterinämie	23 (62,2%)	6 (42,9%)	2 (18,2%)
Diabetes mellitus	15 (40,5%)	3 (21,4%)	3 (27,3%)

Raucher	4 (10,8%)	4 (28,6%)	2 (18,2%)
Medikation – No. (%)			
Antikoagulanzen	37 (100%)	15 (100%)	-
ACE-Inhibitoren	12 (32,4%)	6 (40,0%)	4 (36,4%)
AT1-Rezeptor-Antagonisten	9 (24,3%)	5 (33,3%)	2 (18,2%)
Betarezeptor Blocker	30 (81,1%)	11 (73,3%)	7 (63,6%)
Calciumrezeptor-Antagonisten	10 (27%)	6 (40,0%)	1 (9,1%)
Diuretika	17 (45,9%)	13 (86,7%)	3 (27,3%)
Aldosteronrezeptor-Antagonisten	14 (37,8%)	5 (33,3%)	-
Statine	25 (67,6%)	9 (60,0%)	6 (54,5%)
Laborparameter - MW ± S.D.			
Hämoglobin (g/dl)	11,89 ± 2,12	10,81 ± 2,73	13,37 ± 1,62
Hämatokrit (%)	36,28 ± 6,36	35,03 ± 5,04	40,56 ± 4,35
Leukozyten (x1000/µl)	7,49 ± 2,27	8,17 ± 1,68	7,53 ± 2,67
Thrombozyten (x1000/µl)	202,97 ± 78,63	197,87 ± 60,69	220,18 ± 56,67
Fibrinogen (mg/dl)	366,06 ± 98,09	298,13 ± 83,34	383,25 ± 40,20
Kreatinin (mg/dl)	1,18 ± 0,48	1,16 ± 0,34	1,39 ± 1,52
C-reaktives Protein (mg/dl)	3,49 ± 5,18	3,1 ± 4,64	1,03 ± 1,08

Tabelle 1: Patientencharakteristika der OAK-timeseries Gruppe, OAK cross-sectional Gruppe und der Non-OAK Gruppe.

3.1.5 Vergleich der Charakteristika, Komorbiditäten, Komedikation und Laborparameter:

Im Folgenden werden die Charakteristika, Komorbiditäten, Medikationen und Laborparameter der einzelnen Gruppen verglichen. Da die Zeitreihenuntersuchungen streng nur in der OAK *time-series* Gruppe durchgeführt wurden, werden hier nur die OAK *cross-sectional* Gruppe und die Non-OAK Gruppe verglichen. Diese beiden Gruppen wurden auch experimentell gegenübergestellt. In den allgemeinen Charakteristika beider Gruppen zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Alters- und Geschlechtsverteilung, BMI und CHA2DS2-VAsc Score [Alter - OAK *cross-sectional* Gruppe: 75,07 ± 9,32 Jahre vs. Non-OAK Gruppe: 70,73 ±

14,01 Jahre, $p=0.352$; männliches Geschlecht - OAK *cross-sectional* Gruppe: 7 (46,7%) vs. Non-OAK Gruppe: 3 (27,3%), $p=0.428$; BMI - OAK *cross-sectional* Gruppe: $27,47 \pm 5,88$ kg/m² vs. Non-OAK Gruppe: $30,11 \pm 7,31$ kg/m², $p=0.407$; CHA2DS2-VASc - OAK *cross-sectional* Gruppe: $3,67 \pm 1,63$ Punkte vs. Non-OAK Gruppe: $2,55 \pm 1,64$ Punkte, $p=0.097$]. Unter den Komorbiditäten besteht ein signifikanter Unterschied bei der Auftretenshäufigkeit von VHF in beiden Gruppen [VHF - OAK *cross-sectional* Gruppe: 15 (100%) vs. Non-OAK Gruppe: 0 (0%), $p<0.0001$]. Ansonsten lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen [KHK - OAK *cross-sectional* Gruppe: 7 (46,7%) vs. Non-OAK Gruppe: 1 (9,1%), $p=0.084$; pAVK - OAK *cross-sectional* Gruppe: 3 (20,0%) vs. Non-OAK Gruppe: 2 (18,2%), $p=>0.999$; Herzinsuffizienz - OAK *cross-sectional* Gruppe: 2 (14,3%) vs. Non-OAK Gruppe: 0 (0%), $p=0.487$; aHT - OAK *cross-sectional* Gruppe: 13 (92,9%) vs. Non-OAK Gruppe: 9 (81,8%), $p=0.565$; Hypercholesterinämie - OAK *cross-sectional* Gruppe: 6 (42,9%) vs. Non-OAK Gruppe: 2 (18,2%), $p=0.234$; DM - OAK *cross-sectional* Gruppe: 3 (21,4%) vs. Non-OAK Gruppe: 3 (27,3%), $p=0.665$; Raucher - OAK *cross-sectional* Gruppe: 4 (28,6%) vs. Non-OAK Gruppe: 2 (18,2%), $p=0.661$]. Bei der Komedikation sind zwei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Zum einen werden in der OAK *cross-sectional* Gruppe mehr OAK, [OAK - OAK *cross-sectional* Gruppe: 15 (100%) vs. Non-OAK Gruppe: 0 (0%), $p<0.0001$] zum anderen mehr Diuretika als in der Non-OAK Gruppe eingenommen [Diuretika - OAK *cross-sectional* Gruppe: 13 (86,7%) vs. Non-OAK Gruppe: 3 (27,3%), $p=0.004$]. Es zeigen sich keine weiteren Unterschiede [ACE-Inhibitoren - OAK *cross-sectional* Gruppe: 6 (40,0%) vs. Non-OAK Gruppe: 4 (36,4%), $p=>0.999$; AT1-Rezeptorantagonisten - OAK *cross-sectional* Gruppe: 5 (33,3%) vs. Non-OAK Gruppe: 2 (18,2%), $p=0.658$; Betarezeptorblocker - OAK *cross-sectional* Gruppe: 11 (73,3%) vs. Non-OAK Gruppe: 7 (63,6%), $p=0.683$; Calciumrezeptorantagonisten - OAK *cross-sectional* Gruppe: 6 (40,0%) vs. Non-OAK Gruppe: 1 (9,1%), $p=0.178$; Aldosteronrezeptorantagonisten - OAK *cross-sectional* Gruppe: 5 (33,3%) vs. Non-OAK Gruppe: 0 (0%), $p=0.053$; Statine - OAK *cross-sectional* Gruppe: 9 (60,0%) vs. Non-OAK Gruppe: 6 (54,5%), $p=>0.999$]. Unter den Laborparametern treten Unterschiede bei Hb und Hkt zwischen beiden Gruppen auf. Die Patienten in der Non-OAK Gruppe haben einen signifikant höheren Hb

und Hkt [Hb - OAK *cross-sectional* Gruppe: 10,81 ± 2,73 g/dl vs. Non-OAK Gruppe: 13,37 ± 1,62 g/dl, p=0.011; Hkt - OAK *cross-sectional* Gruppe: 35,03 ± 5,04 % vs. Non-OAK Gruppe: 40,56 ± 4,35 %, p=0.007]. Ansonsten sind ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Laborparametern der Patienten der OAK *cross-sectional* Gruppe und der Non-OAK Gruppe feststellbar [Leukozyten - OAK *cross-sectional* Gruppe: 8,17 ± 1,68 x1000/µl vs. Non-OAK Gruppe: 7,53 ± 2,67 x1000/µl, p=0.461; Thrombozyten - OAK *cross-sectional* Gruppe: 197,87 ± 60,69 x1000/µl vs. Non-OAK Gruppe: 220,18 ± 56,67 x1000/µl, p=0.351; Fibrinogen - OAK *cross-sectional* Gruppe: 298,13 ± 83,34 mg/dl vs. Non-OAK Gruppe: 383,25 ± 40,20 mg/dl p=0.086; Kreatinin - OAK *cross-sectional* Gruppe: 1,16 ± 0,34 mg/dl vs. Non-OAK Gruppe: 1,39 ± 1,52 mg/dl, p=0.572; CRP - OAK *cross-sectional* Gruppe: 3,1 ± 4,64 mg/dl vs. Non-OAK Gruppe: 1,03 ± 1,08 mg/dl, p=0.161]. (Tabelle 2)

	OAK <i>cross-sectional</i> Gruppe (N=15)	Non-OAK Gruppe (N=11)	P-Wert
Charakteristika			
Alter (Jahre) – MW ± S.D.	75,07 ± 9,32	70,73 ± 14,01	0.352
Männliches Geschlecht– No. (%)	7 (46,7%)	3 (27,3%)	0.428
Body Mass Index (kg/m ²) – MW ± S.D.	27,47 ± 5,88	30,11 ± 7,31	0.407
CHA2DS2-VASc – MW ± S.D.	3,67 ± 1,63	2,55 ± 1,64	0.097
Komorbiditäten – No. (%)			
KHK	7 (46,7%)	1 (9,1%)	0.084
pAVK	3 (20,0%)	2 (18,2%)	>0.999
Herzinsuffizienz	2 (14,3%)	-	0.487
Vorhofflimmern	15 (100%)	-	<0.0001
Arterieller Hypertonus	13 (92,9%)	9 (81,8%)	0.565
Hypercholesterinämie	6 (42,9%)	2 (18,2%)	0.234
Diabetes mellitus	3 (21,4%)	3 (27,3%)	0.665
Raucher	4 (28,6%)	2 (18,2%)	0.661
Medikation – No. (%)			
Antikoagulanzen	15 (100%)	-	<0.0001
ACE-Inhibitoren	6 (40,0%)	4 (36,4%)	>0.999

AT1-Rezeptor-Antagonisten	5 (33,3%)	2 (18,2%)	0.658
Betarezeptor Blocker	11 (73,3%)	7 (63,6%)	0.683
Calciumrezeptor-Antagonisten	6 (40,0%)	1 (9,1%)	0.178
Diuretika	13 (86,7%)	3 (27,3%)	0.004
Aldosteronrezeptor-Antagonisten	5 (33,3%)	-	0.053
Statine	9 (60,0%)	6 (54,5%)	>0.999
Laborparameter - MW ± S.D.			
Hämoglobin (g/dl)	10,81 ± 2,73	13,37 ± 1,62	0.011
Hämatokrit (%)	35,03 ± 5,04	40,56 ± 4,35	0.007
Leukozyten (x1000/µl)	8,17 ± 1,68	7,53 ± 2,67	0.461
Thrombozyten (x1000/µl)	197,87 ± 60,69	220,18 ± 56,67	0.351
Fibrinogen (mg/dl)	298,13 ± 83,34	383,25 ± 40,20	0.086
Kreatinin (mg/dl)	1,16 ± 0,34	1,39 ± 1,52	0.572
C-reaktives Protein (mg/dl)	3,1 ± 4,64	1,03 ± 1,08	0.161

Tabelle 2: Patientencharakteristika der OAK cross-sectional Gruppe und der Non-OAK-Gruppe im Vergleich.

3.2 Experimentelle Versuchsergebnisse:

3.2.1 Patienten zeigen verminderte Thrombozytenaggregation nach Rivaroxabaneinnahme:

Unter der Hypothese, dass Rivaroxaban die Thrombozytenfunktion beeinflusst, wurde diese bei Patienten mit neu aufgetretenem Vorhofflimmern gemessen. Hierzu wurden Zeitreihenexperimente durchgeführt, bei denen die Thrombozytenaggregation vor und 4 Stunden nach erstmaliger Einnahme einer Rivaroxaban Einzeldosis von 20mg gemessen wurde. Die Thrombozytenaggregation wurde bei diesen Patienten in der MEA und in der LTA bestimmt.

In der MEA wurde die Thrombozytenaggregation für die Stimuli ADP, TRAP und ARA gemessen. Alle folgenden Daten weisen im Shapiro-Wilk Test eine Normalverteilung auf. Für ADP zeigen die Patienten (N=10), 4h nach Einnahme von 20mg Rivaroxaban, im Vergleich zum Ausgangswert eine signifikant erniedrigte Thrombozytenaggregation in der MEA [ADP – *before Rivaroxaban*:

28,8 ± 14,56 AUC vs. *After Rivaroxaban*: 24,7 ± 14,21 AUC, $p=0.0418$; *two-tailed paired t-test*, mean difference -4,1 AUC, CI 95% von -8,010 bis -0.1898 (N=10)] (Abb.5 A). Für TRAP ist bei den Patienten (N=9) ebenfalls eine signifikante Reduktion der Aggregation nach Einnahme von Rivaroxaban zu erkennen [TRAP - *before Rivaroxaban*: 62,0 ± 21,03 AUC vs. *After Rivaroxaban*: 52,33 ± 15,95 AUC, $p=0.0146$; *two-tailed paired t-test*, mean difference -9,667 AUC, CI 95% von -16,85 bis -2,487 (N=9)] (Abb.5 B). Auch für ARA zeigt die MEA bei den Patienten (N=9) nach Einnahme von Rivaroxaban einen signifikanten Abfall der Thrombozytenaggregation im Vergleich zur Ausgangsmessung [ARA - *before Rivaroxaban*: 23,33 ± 18,23 AUC vs. *After Rivaroxaban*: 20,0 ± 17,64 AUC, $p=0.0065$; *two-tailed paired t-test*, mean difference -3,333 AUC, CI 95% von -5,438 bis -1,228 (N=9)] (Abb.5 C).

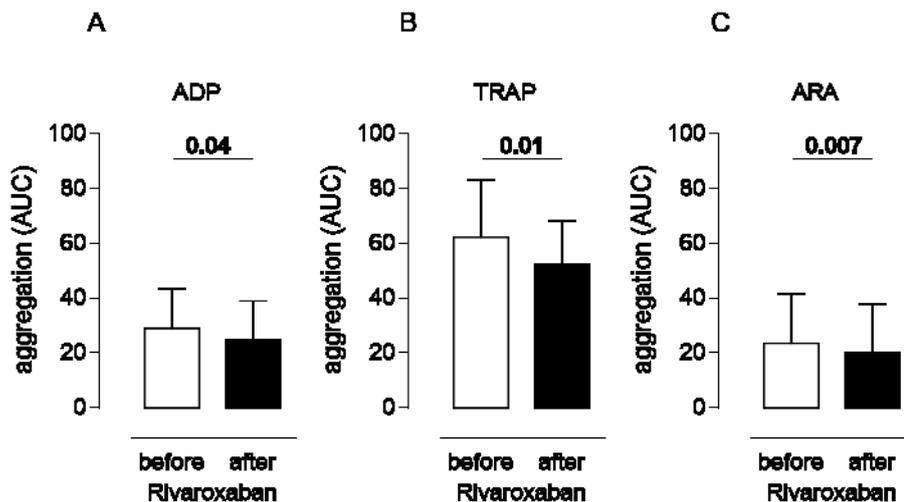


Abb. 5: Thrombozytenaggregation in der MEA vor und nach Rivaroxabaneinnahme: Die Abbildung zeigt die Thrombozytenaggregation in der MEA, vor und nach Einnahme von 20mg Rivaroxaban. Die Aggregation wurde für die Stimulanzen ADP (A), TRAP-6 (B) und ARA (C) gemessen und ist in AUC dargestellt.

In der LTA wurde die Thrombozytenaggregation für die Stimuli ADP, Kollagen und TRAP gemessen, dabei wurde ebenfalls die Normalverteilung der Daten im Shapiro-Wilk Test bestätigt. Exemplarisch sind in der Abbildung (Abb.6) für jeden Stimulus die Aggregationskurven, vor und nach Einnahme von 20mg Rivaroxaban, dargestellt. Für ADP stimulierte Thrombozyten lässt sich bei den OAK *time-series* Patienten (N=19) eine signifikant geringere Aggregation nach Einnahme von Rivaroxaban nachweisen [ADP – *before Rivaroxaban*: 49,5 ±

28,37 % MoA vs. *After Rivaroxaban*: 36,17 ± 24,08 % MoA, $p=0.0265$; *two-tailed paired t-test*, mean difference -13,33 % MoA, CI 95% von -24,91 bis -1.739 (N=19)] (Abb.6 A). Für die durch Kollagen ausgelöste Thrombozytenaggregation zeigt sich ebenfalls in der LTA eine Abnahme der Aggregation nachdem die Patienten (N=17) 20mg Rivaroxaban angenommen haben, diese ist jedoch nicht signifikant [Kollagen – *before Rivaroxaban*: 79,11 ± 37,58 % MoA vs. *After Rivaroxaban*: 60,69 ± 29,73 % MoA, $p=0.0647$; *two-tailed paired t-test*, mean difference -18,42 % MoA, CI 95% von -38,11 bis -1.263 (N=17)] (Abb.6 B). TRAP zeigte in der LTA bei den untersuchten Patienten einen signifikanten Abfall der Thrombozytenaggregation nach Rivaroxabaneinnahme [TRAP – *before Rivaroxaban*: 73,40 ± 40,18 % MoA vs. *After Rivaroxaban*: 51,68 ± 34,30 % MoA, $p=0.0394$; *two-tailed paired t-test*, mean difference -21,72 % MoA, CI 95% von -42,21 bis -1.239 (N=17)] (Abb.6 C).

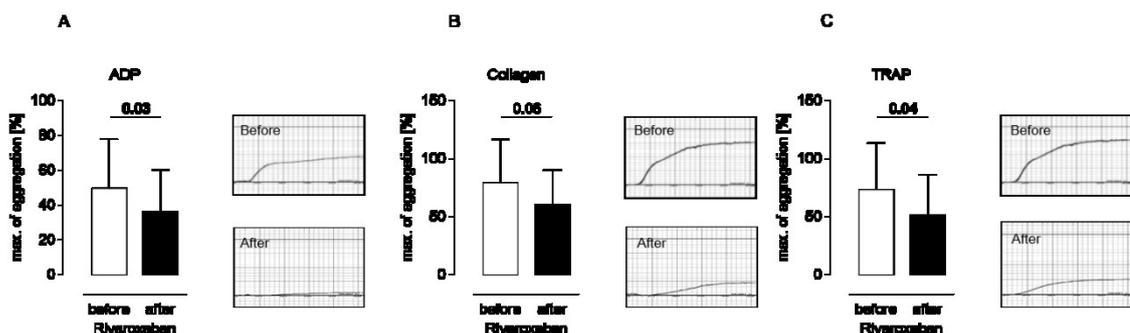


Abb.6: Thrombozytenaggregation in LTA vor und nach Rivaroxabaneinnahme: Die Abbildung zeigt die Messung der Thrombozytenaggregation, vor und nach Einnahme von 20mg Rivaroxaban. Die Aggregation wurde für die Stimulanzen ADP (A), Kollagen (B) und TRAP-6 (C) gemessen und ist als prozentuales MoA dargestellt. Exemplarisch werden für jeden Stimulus Aggregationskurven vor und nach Rivaroxabaneinnahme gezeigt.

3.2.2 Patienten zeigen auch verminderte Thrombozytenaggregation unter Apixaban:

Um einen ausschließlich durch Rivaroxaban ausgelösten Effekt auf die Thrombozytenaggregation auszuschließen, wurden in die OAK *time-series* Gruppe auch Patienten eingeschlossen die erstmalig 5mg Apixaban erhielten (N=6). Die Thrombozytenfunktionsmessung wurde bei diesen Patienten ebenfalls mit Hilfe der MEA für die Stimuli ADP, TRAP und ARA durchgeführt.

Für ADP zeigten die Patienten (N=6), nach Einnahme von Apixaban, eine signifikant niedrigere Thrombozytenaggregation im Vergleich zum Ausgangswert [ADP – *before Apixaban*: $42,17 \pm 21,73$ AUC vs. *After Apixaban*: $36,83 \pm 19,13$ AUC, $p=0.0096$; *two-tailed paired t-test, mean difference -5,333 AUC*, CI 95% von -8,696 bis -1,971 (N=6)] (Abb. 7 A). Für TRAP ist ebenfalls eine signifikant niedrigere Aggregation nach Apixabaneinnahme zu erkennen [TRAP – *before Apixaban*: $68,80 \pm 19,94$ AUC vs. *After Apixaban*: $57,40 \pm 17,78$ AUC, $p=0.0146$; *two-tailed paired t-test, mean difference -11,40 AUC*, CI 95% von -19,08 bis -3,716 (N=6)] (Abb. 7 B). Die MEA zeigte für ARA keinen signifikanten Unterschied vor und nach Einnahme von Apixaban [ARA – *before Apixaban*: $39,33 \pm 23,79$ AUC vs. *After Apixaban*: $38,00 \pm 22,24$ AUC, $p=0.7081$; *two-tailed paired t-test, mean difference -1,333 AUC*, CI 95% von -9,979 bis 7,312 (N=6)] (Abb. 7 C).

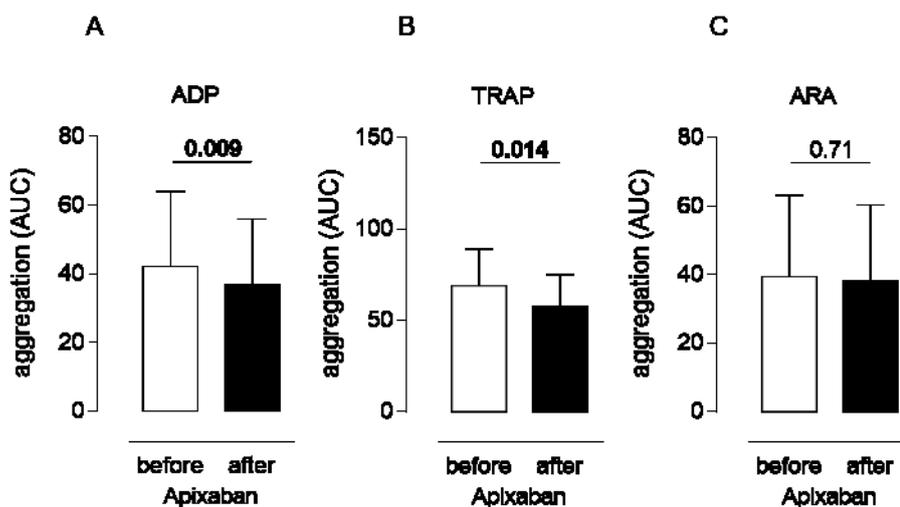


Abb.7: Thrombozytenaggregation in der MEA nach Apixabaneinnahme: Die Abbildung zeigt die Thrombozytenaggregation in der MEA, vor und nach Einnahme von 5mg Apixaban. Die Aggregation wurde für die Stimulanzen ADP (A), TRAP-6 (B) und ARA (C) gemessen und ist in AUC dargestellt.

3.2.3 Effekte von Rivaroxaban auf Thrombozytenfunktion sind Plasmaabhängig:

Unter der Fragestellung, ob der durch Rivaroxaban vermittelte Effekt auf Thrombozyten plasmaabhängig ist, wurden Zeitreihenmessungen mit Plasmaaustauschexperimenten in WP durchgeführt. Zunächst wurden aus der

gewonnenen Blutprobe, vor Rivaroxabaneinnahme, WP (WPT0) und Plasma (Plasma T0) hergestellt. 4 Stunden nach Einnahme von Rivaroxaban wurden ebenfalls WP (WPT1) und Plasma (Plasma T1) hergestellt. Danach wurde die LTA mit Kollagen für WPT0 die in Plasma T0 resuspendiert wurden, für WPT1 die in Plasma T1 resuspendiert wurden, sowie für WPT1 die in Plasma T0 resuspendiert wurden, durchgeführt. Die WPT1, resuspendiert in Plasma T1, zeigten im Gegensatz zu WPT0, resuspendiert in Plasma T0, eine signifikant niedrigere Aggregation in der LTA [Kollagen – *before Rivaroxaban*: $80,08 \pm 16,33$ % MoA vs. *After Rivaroxaban*: $69,35 \pm 18,28$ % MoA, $p=0.0077$; *two-tailed paired t-test, mean difference* -10,73 % MoA, CI 95% von -16,74 bis -4,727 (N=5)]. Hingegen steigt die Aggregation wieder signifikant an, wenn WPT1 in Plasma T0 resuspendiert werden, verglichen mit den gleichen WP resuspendiert in Plasma T1 [Kollagen – *after Rivaroxaban*: $69,35 \pm 18,28$ % MoA vs. *Plasmaswitch*: $81,31 \pm 16,73$ % MoA, $p=0.0177$; *two-tailed paired t-test, mean difference* 11,96 % MoA, CI 95% von 3,417 bis 20,51 (N=5)]. Zwischen der Ausgangsmessung, WPT0 resuspendiert in Plasma T0 und WPT1 resuspendiert im gleichen Plasma T0, zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der LTA [Kollagen – *before Rivaroxaban*: $80,08 \pm 16,33$ % MoA vs. *Plasmaswitch*: $81,31 \pm 16,73$ % MoA, $p=0.554$; *two-tailed paired t-test, mean difference* 1,228 % MoA, CI 95% von -4,058 bis 6,514 (N=5)]. (Abb. 8)

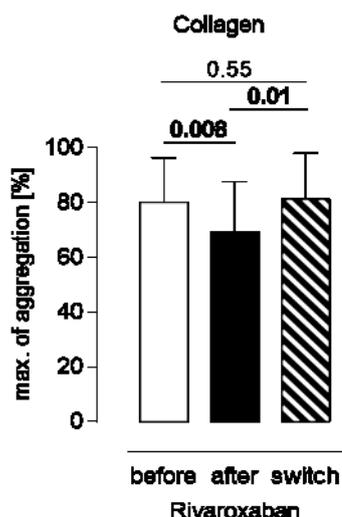


Abb.8: In der LTA gemessene Effekte von Rivaroxaban sind plasmaabhängig und reversibel: Die Abbildung zeigt die Messung der Thrombozytenaggregation vor und nach Einnahme von Rivaroxaban. Zusätzlich wurde die Thrombozytenaggregation von Thrombozyten

nach Rivaroxabaneinnahme gemessen, welche in rivaroxabannaivem Plasma resuspendiert wurden. Die Aggregation wurde in der LTA gemessen und als prozentuale MoA dargestellt.

3.2.4 Rivaroxaban vermindert die Thrombozytenadhäsion in Flusskammerversuchen:

Um die Thrombozytenadhäsion unter Rivaroxaban unter näherungsweise physiologischen Flussbedingungen zu untersuchen wurden Flusskammerexperimente durchgeführt. Hierzu wurde eine Kapillare mit Kollagen beschichtet und unter arteriellen Flussbedingungen mit Vollblut inkubiert. Die Thrombozytenadhäsion wurde nach 3 und 5 Minuten Durchfluss gemessen. Die Experimente wurden mit Vollblut der OAK *cross-sectional* Gruppe und der Non-OAK Gruppe durchgeführt und die Thrombozytenadhäsion beider Gruppen verglichen. Des Weiteren wurden auch hier Zeitreihenuntersuchungen mit Patientenvollblut aus der OAK *time-series* Gruppe vor und 4 Stunden nach erstmaliger Einnahme von Rivaroxaban durchgeführt.

Nach dreiminütigem Fluss zeigen Patienten, die mit Rivaroxaban effektiv antikoaguliert sind (N=15), im Vergleich zu Patienten ohne Antikoagulation (N=11), eine signifikant verminderte Thrombozytenadhäsion in der Flusskammer [Flusszeit 3 Minuten – Non-OAK Gruppe: $21,01 \pm 4,515$ % Thrombozytenadhäsion (N=11) vs. OAK *cross-sectional* Gruppe: $12,33 \pm 1,34$ % Thrombozytenadhäsion (N=15), $p=0.0471$, *two-tailed unpaired t-test, differences between means* $-8,680 \pm 4,147$ % Thrombozytenadhäsion, CI 95% von $-17,24$ bis $-0,1209$] (Abb. 9 A). Eine Multiple lineare Regression zeigt, dass die Einnahme von Diuretika, sowie die Höhe des HB und des HKT keinen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion nach dreiminütigem Fluss haben (Flusszeit 3 Minuten – Diuretika: $B=6.266$, Std. Fehler= 4.932 , $Beta=0.279$, $t=1.270$, $p=0.217$; HB: $B=-0.251$, Std. Fehler= 1.812 , $Beta=-0.059$, $t=0.138$, $p=0.891$; HKT: $B=0.627$, Std. Fehler= 0.858 , $Beta=0.306$, $t=0.731$, $p=0.472$) (Tabelle 3). Auch nach fünfminütigem Fluss zeigen Patienten, die mit Rivaroxaban effektiv antikoaguliert sind (N=15), im Vergleich zu Patienten ohne Antikoagulation (N=11), eine signifikant verminderte Thrombozytenadhäsion in der Flusskammer [Flusszeit 5 Minuten – Non-OAK Gruppe: $22,08 \pm 2,979$ % Thrombozytenadhäsion (N=11) vs. OAK *cross-sectional* Gruppe: $14,24 \pm 1,965$

% Thrombozytenadhäsion (N=15), $p=0.0312$, *two-tailed unpaired t-test*, differences between means $-7,839 \pm 3,425$ % Thrombozytenadhäsion, CI 95% von $-14,91$ bis $-0,7707$] (Abb. 9 B). Auch hier sind die Adhäsionsverhältnisse unabhängig von der Diuretikaehinnahme, dem Hb und dem Hkt (Flusszeit 5 Minuten – Diuretika: $B=2.261$, Std. Fehler= 4.036 , $Beta=0.120$, $t=0.560$, $p=0.581$; HB: $B=0.275$, Std. Fehler= 1.483 , $Beta=0.077$, $t=0.186$, $p=0.854$; HKT: $B=0.568$, Std. Fehler= 0.702 , $Beta=0.331$, $t=0.809$, $p=0.427$) (Tabelle 4).

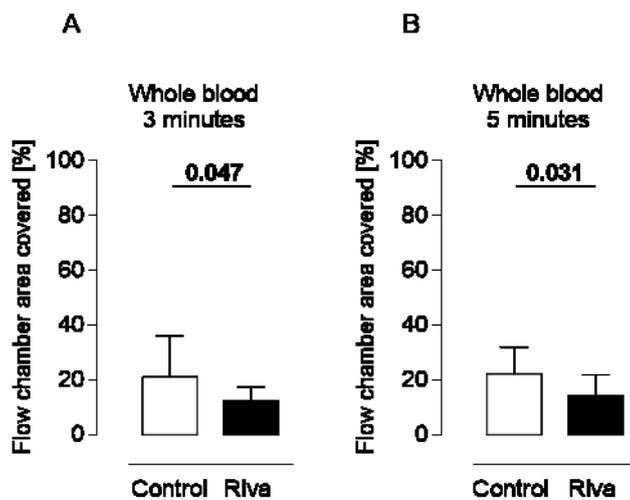


Abb.9: Messung der Thrombozytenadhäsion in kollagenbeschichteter Flusskammer: Die Abbildung zeigt die vergleichende Messung der Thrombozytenadhäsion in einer kollagenbeschichteter Flusskammer. Es werden Patienten ohne Antikoagulation Patienten mit Rivaroxabanmedikation gegenübergestellt. Die Thrombozytenadhäsion wurde für dreiminütigen Fluss (A) und fünfminütigen Fluss (B) gemessen und als prozentual bedeckter Anteil der Flusskammer dargestellt.

Multiples lineares Regressionsmodell	Koeffizienten ^a				t	Signifikanz-niveau
	Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	Beta		
	B	Std. Fehler				
(Konstante)	-8,317	18,635			-,446	,660
Diuretika	6,266	4,932	,279		1,270	,217
HB	-,251	1,812	-,059		-,138	,891
HKT	,627	,858	,306		,731	,472

a. Dependent Variable: Bioflux 3 Minuten

Tabelle 3: Multiples lineares Regressionsmodell für dreiminütigen Fluss in der Flusskammer: Es wurde der Einfluss von Diuretikaehinnahme, HB und HKT auf die

Thrombozytenadhäsion untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge nach dreiminütigem Fluss.

Koeffizienten ^a

Multiples lineares Regressionsmodell	Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	t	Signifikanzniveau
	B	Std. Fehler	Beta		
(Konstante)	-8,317	15,250		-,545	,591
Diuretika	2,261	4,036	,120	,560	,581
HB	,275	1,483	,077	,186	,854
HKT	,568	,702	,331	,809	,427

a. Abhängige Variable: Bioflux 5 Minuten

Tabelle 4: Multiples lineares Regressionsmodell für fünfminütigen Fluss in der Flusskammer: Es wurde der Einfluss von Diuretikaaufnahme, HB und HKT auf die Thrombozytenadhäsion untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge nach fünfminütigem Fluss.

In den Zeitreihenexperimenten (N=5) zeigt sich, nach dreiminütigem Fluss, ebenfalls eine signifikante Abnahme der Thrombozytenadhäsion nach Rivaroxabaneinnahme, im Vergleich zur Ausgangsmessung [Flusszeit 3 Minuten – *before Rivaroxaban*: 23,66 ± 9,477 % Thrombozytenadhäsion vs. *After Rivaroxaban*: 12,37 ± 10,64 % Thrombozytenadhäsion, p=0.0403; *two-tailed paired t-test, mean difference -11,29 % Thrombozytenadhäsion, CI 95% von -21,77 bis -0,8124 (N=5)*] (Abb. 10 A). Auch nach fünfminütigem Fluss in der Flusskammer zeigt sich bei den Patienten (N=4) eine verminderte Thrombozytenadhäsion unter Rivaroxaban, im Vergleich zum Ausgangswert [Flusszeit 5 Minuten – *before Rivaroxaban*: 17,21 ± 5,156 % Thrombozytenadhäsion vs. *After Rivaroxaban*: 8,604 ± 4,090 % Thrombozytenadhäsion, p=0.0089; *two-tailed paired t-test, mean difference -8,602 % Thrombozytenadhäsion, CI 95% von -13,10 bis -4,108 (N=4)*] (Abb. 10 B).

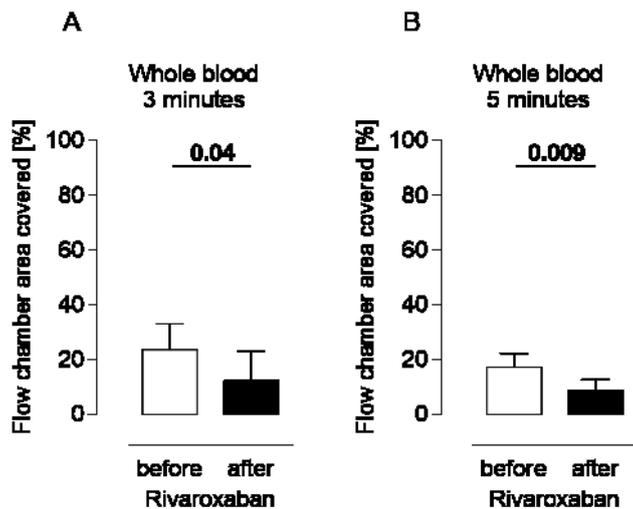


Abb. 10: Messung der Thrombozytenadhäsion in kollagenbeschichteter Flusskammer vor und nach Rivaroxabaneinnahme: Die Abbildung zeigt die Messung der Thrombozytenadhäsion in einer kollagenbeschichteten Flusskammer, vor und nach Einnahme von 20 mg Rivaroxaban. Die Thrombozytenadhäsion wurde für dreiminütigen Fluss (A) und fünfminütigen Fluss (B) gemessen und als prozentual bedeckter Anteil der Flusskammer dargestellt.

3.2.5 Patienten zeigen vermindertes endogenes Thrombinpotenzial nach Rivaroxaban:

Das endogene Thrombinpotenzial wurde bei Patienten mit neu aufgetretenem VHF in Zeitreihenexperimenten, vor und vier Stunden nach Einnahme von 20mg Rivaroxaban, bestimmt. Neben dem ETP wurden auch die dazugehörigen Parameter *peak thrombin formation*, *lag time*, *time to peak* und *velocity index* bestimmt. Die Patienten zeigen vier Stunden nach Einnahme von Rivaroxaban ein signifikant vermindertes ETP [ETP - *before Rivaroxaban*: $1567 \pm 530,5$ nM x min vs. *After Rivaroxaban*: $1085 \pm 280,0$ nM x min, $p=0.0461$; *two-tailed paired t-test*, *mean difference* -515,4 nM x min, CI 95% von -1014 bis -16,82 (N=4)] (Abb. 11 A). Die *peak thrombin formation* zeigt sich nach Rivaroxaban erniedrigt [*peak thrombin formation* - *before Rivaroxaban*: $217,0 \pm 118,7$ nM vs. *After Rivaroxaban*: $46,18 \pm 31,02$ nM, $p=0.0004$; *two-tailed paired t-test*, *mean difference* -190,1 nM, CI 95% von -268,2 bis -112,1 (N=10)] (Abb. 11 B). Die *lagtime* ist nach Einnahme von Rivaroxaban, im Vergleich zum Ausgangswert, erhöht [*lagtime* - *before Rivaroxaban*: $6,536 \pm 6,906$ min vs. *After Rivaroxaban*: $9,068 \pm 5,576$ min, $p=0.0039$; *Wilcoxon matched-pairs test*, *median of difference* 2,790 min, (N=10)] (Abb. 11 C). Der Parameter *time to*

peak ist bei Patienten nach Einnahme von Rivaroxaban erhöht [*time to peak - before Rivaroxaban*: 11,08 ± 10,01 min vs. *After Rivaroxaban*: 22,12 ± 8,911 min, p=0.002; *Wilcoxon matched-pairs test, median of difference* 13,14 min, (N=10)] (Abb. 11 D). Als letzter Parameter ist der *velocity index* bei diesen Patienten nach Einnahme von Rivaroxaban signifikant niedriger als der Ausgangswert [*velocity index - before Rivaroxaban*: 81,15 ± 67,08 nM / min vs. *After Rivaroxaban*: 6,498 ± 7,596 nM / min, p=0.002; *Wilcoxon matched-pairs test, median of difference* -81,44 nM / min, (N=10)] (Abb. 11 E).

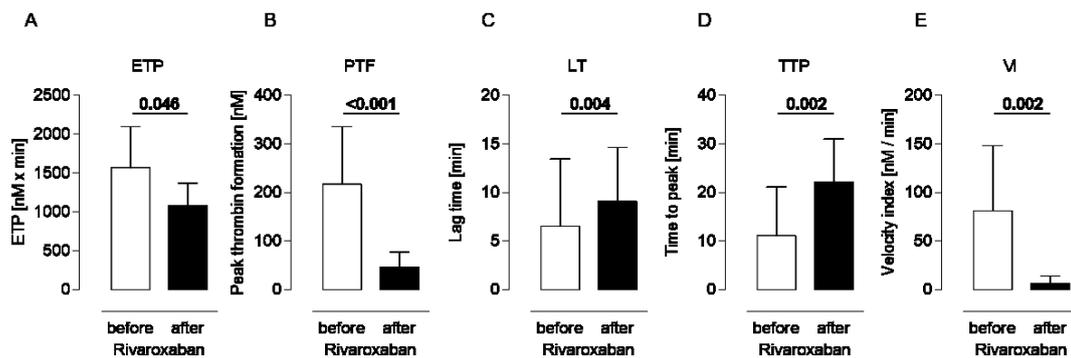


Abb. 11: Messung des endogenen Thrombinpotenzials vor und nach Rivaroxaban: Die Abbildung zeigt die Messung des ETP vor und nach Einnahme von 20mg Rivaroxaban. Es wurden das Endogene Thrombinpotenzial (A), die *peak thrombin formation* (B), die *lag time* (C), die *time to peak* (D) und der *velocity index* (E) gemessen.

3.2.6 Aktivierter Faktor X führt zu einer dosisabhängigen Thrombozytenaktivierung:

Als direkter FXa Inhibitor hemmt Rivaroxaban die Aktivität von humanen Thrombozyten. Um nun die Rolle von FXa bei der Aktivierung von Thrombozyten genauer zu untersuchen, wurden *in-vitro* Experimente mit Blut von gesunden Probanden durchgeführt. Aus dem Blut wurden WP hergestellt, um den Einfluss des koagulatorischen Systems auf die Thrombozytenaktivierung zu minimieren. Die Thrombozytenaggregation wurde nun in der LTA unter Zugabe von FXa gemessen. FXa zeigt, unter steigender Konzentration, eine konzentrationsabhängige Aktivierung von Thrombozyten in der LTA mit WP [Konzentrationswirkungskurve FXa - 13µg/ml FXa: 14,96 ± 31,44 % MoA vs. 26µg/ml FXa: 18,40 ± 34,10 % MoA vs. 39µg/ml FXa: 62,24 ±

33,30 % MoA vs. 52µg/ml FXa: $66,91 \pm 28,86$ % MoA, $p=0.0322$, *One-Way-ANOVA* (N=5)] (Abb. 12).

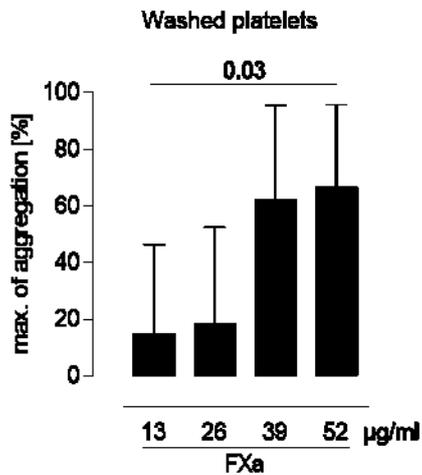


Abb. 12: Messung der Thrombozytenaggregation unter FXa-Stimulation: Die Abbildung zeigt die Messung der Thrombozytenaggregation in der LTA von WP, unter aufsteigender FXa Dosis. Die Thrombozytenaggregation wird als MoA in Prozent dargestellt.

3.2.7 Rivaroxaban hemmt Plättchenaggregation durch aktivierten Faktor X dosisabhängig:

Rivaroxaban hemmt als direkter FXa Inhibitor dessen Aktivität. Unter dieser Annahme wurden LTA Untersuchungen mit WP gesunder Probanden durchgeführt. Die Untersuchungen wurden mit unterschiedlichen Dosierungen (3pM, 100pM, 300pM) von Rivaroxaban inkubiert. Anschließend wurde die LTA mit FXa durchgeführt. Unter ansteigender Dosis von Rivaroxaban lässt sich die Thrombozytenaktivierung durch FXa dosisabhängig hemmen [Konzentrationswirkungskurve Rivaroxaban – Kontrolle: $34,54 \pm 9,981$ % MoA vs. 3pM Rivaroxaban: $9,688 \pm 9,468$ % MoA vs. 100pM Rivaroxaban: $0,5050 \pm 0,7847$ % MoA vs. 300pM Rivaroxaban: $0,0350 \pm 0,04726$ % MoA, $p<0.0001$, *One-Way-ANOVA* (N=4)] (Abb.13).

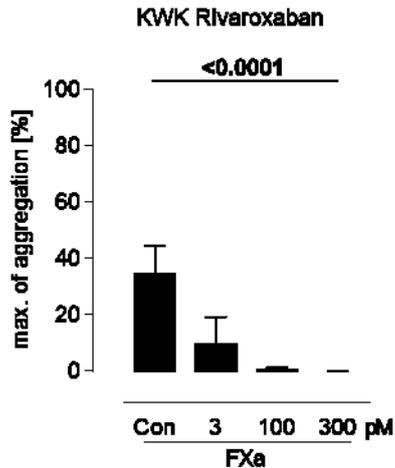


Abb.13: Konzentrationsabhängige Thrombozytenaggregation unter Rivaroxaban: Die Thrombozytenaggregation von WP wurde unter Inkubation von verschiedenen Rivaroxabankonzentrationen in der LTA gemessen und als MoA in Prozent dargestellt. Die Stimulation erfolgte mit FXa.

3.2.8 Vorapaxar hemmt Thrombozytenaggregation durch aktivierten Faktor X ebenfalls dosisabhängig:

Vorapaxar ist ein PAR-1 Inhibitor und fungiert damit als Thrombinantagonist an Thrombozyten. Da FXa die Generierung von Thrombin über die Gerinnungskaskade vermittelt, wurde die Thrombozytenaggregation durch FXa in WP unter Anwesenheit von Vorapaxar untersucht. Es wurden hierzu WP mit verschiedenen Vorapaxar Konzentrationen (30pM, 100pM, 300pM) inkubiert, um eine Konzentrations-wirkungskurve zu erhalten. Auch in dem Fall ist, unter steigender Dosis von Vorapaxar, eine zunehmende Hemmung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit zu beobachten [Konzentrationswirkungskurve Vorapaxar – Kontrolle: $46,06 \pm 26,28$ % MoA vs. 30pM Vorapaxar: $10,90 \pm 18,34$ % MoA vs. 100pM Vorapaxar: $4,405 \pm 6,743$ % MoA vs. 300pM Vorapaxar: $3,820 \pm 6,223$ % MoA, $p=0.0108$, *One-Way-ANOVA* (N=4)] (Abb. 14).

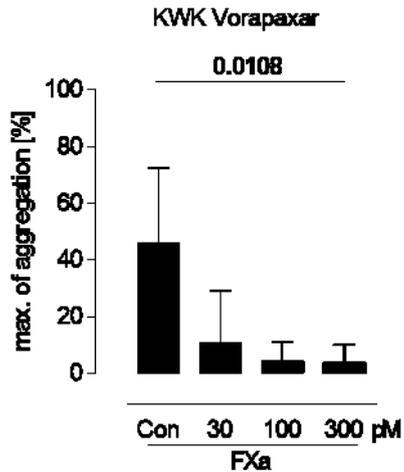


Abb.14: Konzentrationsabhängige Thrombozytenaggregation unter Vorapaxar: Die Thrombozytenaggregation von WP wurde unter Inkubation von verschiedenen Vorapaxarkonzentrationen (KWK = Konzentrationswirkungskurve) in der LTA gemessen und als MoA in Prozent dargestellt. Die Stimulation erfolgte mit FXa.

3.2.9 Aktivierter Faktor X fördert die Freisetzung von Thromboxan aus Thrombozyten

WP von gesunden Probanden wurden mit FXa stimuliert. Anschließend wurde das ausgeschüttete TXB2 mittels ELISA aus dem Überstand gemessen. Die TXB2 Konzentration war im Überstand FXa stimulierter Thrombozyten signifikant höher als in der nicht stimulierten Kontrolle [Thromboxan B2 – Kontrolle: $1,587 \pm 2,331$ ng/ml Thromboxan vs. FXa: $131,4 \pm 79,81$ ng/ml Thromboxan $p=0.0242$, *paired t-test, mean of differences 109,5 ng/ml Thromboxan, CI von 23,44 bis 195,6 (N=5)*] (Abb. 15).

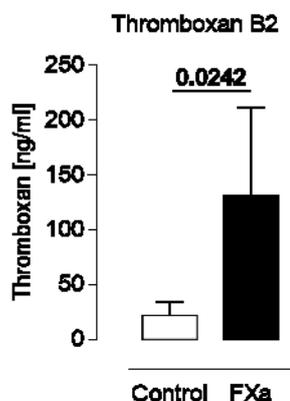


Abb.15: Messung der Thromboxankonzentration vor und nach Stimulation mit FXa: Die Abbildung zeigt die Messung von Thromboxan B2 vor und nach Stimulation mit FXa (A). Die Thromboxankonzentration ist als ng/ml aufgetragen.

3.2.10 Rivaroxaban hat keinen Einfluss auf die PAR-1 und PAR-4 Rezeptorexpression auf Thrombozyten:

Um auszuschließen, dass Rivaroxaban Einfluss auf die PAR-1 und PAR-4 Expression hat, wurde diese mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Thrombozyten gemessen. Die Messungen erfolgten vor und nach Einnahme von 20mg Rivaroxaban. Es zeigt sich, vor und nach Einnahme von Rivaroxaban, kein Unterschied in der Expression vom PAR-1 auf den Thrombozyten der Patienten [PAR-1 Rezeptorexpression – *before Rivaroxaban*: $1368 \pm 387,0$ MFI vs. *After Rivaroxaban*: $1299 \pm 313,5$ MFI $p=0,3688$, *paired t-test*, *mean of differences* -68,14 MFI, CI von -239,8 bis 103,5 (N=7)] (Abb.16 A). Die thrombozytäre Rezeptorexpression von PAR-4 zeigt ebenfalls keine signifikanten Veränderungen nach Einnahme von Rivaroxaban [PAR-4 Rezeptorexpression – *before Rivaroxaban*: $614,9 \pm 107,7$ MFI vs. *After Rivaroxaban*: $593,0 \pm 95,37$ MFI $p=0,1110$, *paired t-test*, *mean of differences* -21,86 MFI, CI von -50,48 bis 6,771 (N=7)] (Abb. 16 B).

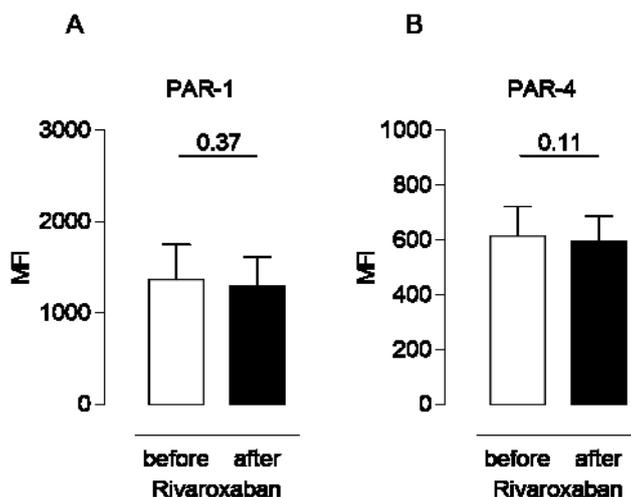


Abb. 16: Expression der Protease aktivierten Rezeptoren auf Thrombozyten nach Rivaroxaban: Die Expression der PAR-1 (A) und PAR-4 (B) Rezeptoren auf Thrombozyten wurde in der FACS vor und nach Rivaroxabaneinnahme bestimmt und als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

4 Diskussion:

Die vorliegende Dissertation stellt Ergebnisse einer Studie dar, in der Effekte von direkten FXa-Inhibitoren auf die Reaktivität von humanen Thrombozyten untersucht wurden [16]. Folgende Ergebnisse konnten gezeigt werden:

1. FXa fungiert als direkter Agonist auf Thrombozyten und löst deren Aggregation aus. Der Mechanismus involviert den PAR-1 Rezeptor.
2. Direkte FXa-Inhibitoren reduzieren die Thrombozytenreaktivität in Patienten mit VHF und *in-vitro*.
3. Die Oberflächenexpression der thrombozytären PAR-1 und PAR-4 Rezeptoren, wird durch Rivaroxaban nicht beeinflusst.

Zunächst wurde die Thrombozytenaktivität bei Patienten mit VHF, vor und nach erstmaliger Einnahme von Rivaroxaban, in zwei unterschiedlichen Verfahren gemessen. Die MEA ist ein Verfahren, in dem die Thrombozytenaggregation im Vollblut gemessen wird. Obwohl die Aggregometrie im Vollblut, als physiologisches Milieu, wünschenswert ist, können der Hämatokrit und die Thrombozytenzahl der Probe, als nicht unerhebliche Störgrößen, die Ergebnisse der Messung beeinflussen [82, 95]. Studien dazu haben eine positive Korrelation zwischen der Höhe des Hämatokrits und der Höhe der Aggregation, bei leichten Agonisten wie ADP oder ARA gesehen [82]. Hierbei könnte die vermehrte Freisetzung von ADP aus Erythrozyten relevant sein [96]. Durch die Auswahl von Zeitreihenexperimenten am gleichen Individuum wird der Einfluss dieser Störgrößen auf die Ergebnisse minimiert. Im zeitlichen Abstand von 4 Stunden zwischen den Messungen ist eine relevante Veränderung des Hämatokrits und der Thrombozytenzahl der Patienten, bei komplikationslosem Krankenhausaufenthalt, unwahrscheinlich. Dennoch wurden Hämatokrit und Thrombozytenzahl bei der zweiten Messung nicht nochmals bestimmt. Als zweite Methode wurde bei diesen Patienten die aufwändigere Methode der LTA durchgeführt. In dieser Methode wird die Thrombozytenaggregation im PRP gemessen. Sie ist unphysiologischer als die MEA, da Interaktionen zwischen verschiedenen zellulären Blutbestandteilen nicht berücksichtigt werden, dennoch stellt die LTA den Goldstandard der Thrombozytenfunktionsmessung dar. Abweichungen des Hämatokrits oder der

Thrombozytenzahl wirken sich, im Gegensatz zur MEA, innerhalb der physiologischen Grenzen nicht auf das Ergebnis der Aggregometrie aus [95]. In dieser Studie haben jedoch beide Methoden zur Thrombozytenaggregationsmessung, unabhängig voneinander, einen hemmenden Effekt von Rivaroxaban auf Thrombozyten von Patienten mit neu aufgetretenem VHF zeigen können. In der MEA war eine signifikant verminderte Aggregation nach Rivaroxabaneinnahme für alle Stimuli (ADP, ARA, TRAP) zu sehen, während in der LTA nur die ADP und TRAP induzierte Aggregation signifikant vermindert war. Die Aggregation mit Kollagen zeigt in der LTA nur einen nicht signifikanten Trend der Verminderung. Kollagen ist als starker Aktivator der Plättchenaggregation bekannt. Es ist also durchaus möglich, dass der durch Rivaroxaban vermittelte hemmende Effekt auf die Thrombozytenaggregation nicht stark genug ist, um die Thrombozytenaggregation als Reaktion auf größere Mengen Kollagen zu verhindern. Da die LTA eine wenig standardisierte Methode ist, gibt es bis jetzt keine bindenden Richtlinien für die Durchführung, vielmehr hat jedes durchführende Labor seinen eigenen Standard. Studien, die es sich zum Ziel gemacht haben, eine Standardisierung der LTA zu erreichen, empfehlen die Verwendung einer Kollagenkonzentration von 2µg/ml, während in dieser Studie eine höhere Konzentration von 10µg/ml verwendet wurde [78, 79, 97]. Dies könnte eine stärkere Aggregation auch unter Rivaroxaban begünstigt haben. Es bleibt dennoch festzuhalten, dass man eine Verminderung der Thrombozytenaktivität, schon vier Stunden nach einmaliger Einnahme von 20mg Rivaroxaban in der MEA, sowie der LTA, beobachten konnte. Es gibt einige Studien die den Einfluss von Rivaroxaban, aber auch Apixaban, auf die Thrombozytenfunktion in der MEA und der LTA untersucht haben. Die Ergebnisse sind allerdings nicht eindeutig. Einige Studien sehen keinen aggregationsvermindernden Effekt bei Patienten mit VHF, die Rivaroxaban oder andere FXa-Inhibitoren einnehmen [98-100]. Eine dieser Studien führte ebenfalls Zeitreihenexperimente bei 25 Patienten die Rivaroxaban einnahmen und 13 Patienten die Apixaban einnahmen durch. Die Messzeitpunkte waren vor morgendlicher Einnahme, 2 Stunden und 6 Stunden nach Einnahme des jeweiligen Medikaments gesetzt. Die Messung erfolgte durch die MEA im Multiplate Analyzer. Es konnte kein Einfluss der Medikamente auf die

Thrombozytenaggregation festgestellt werden [98]. Obwohl der Versuchsaufbau sehr ähnlich zur vorliegenden Studie erscheint, gibt es den Unterschied, dass Patienten mit VHF eingeschlossen wurden, die bereits Rivaroxaban oder Apixaban als Dauermedikation erhielten. In der vorliegenden Studie wurden jedoch Patienten mit neu aufgetretenem VHF erstmals auf diese Medikamente eingestellt. Möglicherweise ist die Thrombozytenfunktion durch einen Restspiegel des Medikaments, bei dauerhafter Einnahme, schon vor der ersten Messung noch beeinträchtigt, so dass der Effekt im Vergleich zum Spitzenspiegel nicht mehr so ausgeprägt ist. Es konnte dennoch eine signifikante Verminderung der Thrombingenerierung nach Einnahme von FXa-Inhibitoren festgestellt werden [98]. Eine weitere Studie an Patienten mit chronischem VHF, die 9 Patienten mit Rivaroxaban- und 12 Patienten mit Apixabanmedikation eingeschlossen hat, konnte ebenfalls keinen Effekt der Antikoagulanzen auf die Thrombozytenaggregation darstellen. Diese wurde in der Studie mittels LTA für die Stimuli ADP, Epinephrin und Collagen bestimmt. Der Messzeitpunkt für den Spitzenspiegel der Medikamente wurde hier jedoch schon 2 Stunden nach Medikamenteneinnahme festgelegt und unterscheidet sich damit von dem in dieser Dissertation beschriebenen Spitzenspiegelmesszeitpunkt von 4 Stunden nach Medikamenteneinnahme [99]. Obwohl der zeitliche Unterschied die Messergebnisse beeinflussen könnte ist festzuhalten, dass beide Messzeitpunkte im Zeitfenster der Angabe über dem Spitzenspiegel von Rivaroxaban liegen, der nach 1-4 Stunden zu erwarten ist [68]. Gleichzeitig gibt es aber wissenschaftliche Arbeiten, die bereits Effekte von FXa-Inhibitoren auf die Thrombozytenaktivierung in Patienten mit VHF darstellen konnten [101, 102]. *In-vitro* Arbeiten stellten ebenfalls einen hemmenden Effekt von FXa-Inhibitoren auf die TF vermittelte Plättchenaktivierung dar [103]. In den beiden klinischen Studien wurden jeweils 41 und 34 Patienten mit Vorhofflimmern und Rivaroxaban- oder Apixabanmedikation eingeschlossen. Die Thrombozytenfunktion wurde in beiden Studien mittels LTA für TRAP gemessen. Die Studien zeigten, dass beide FXa-Inhibitoren die Plättchenaggregation mit TRAP signifikant verringern. Ein Ergebnis, das auch in unserer Arbeit für Rivaroxaban, sowie für Apixaban in der MEA, gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse suggerieren, dass es sich nicht um einen Substanzeffekt von Rivaroxaban, sondern vielmehr um einen

Gruppeneffekt der FXa-Inhibitoren handelt. Dennoch konnte keine der beiden Studien diesen Effekt schon nach einer einmaligen Dosis nachweisen, da eine Einnahmedauer von >18 bzw. >7 Tagen vor Beginn der Messungen angestrebt wurde [101, 102]. Weitere der zu diskutierenden Experimente zeigten, dass Rivaroxaban die Minderung der Thrombozytenaggregation über einen plasmaabhängigen Effekt vermitteln muss und keine direkten Effekte auf die Thrombozyten hat. Dies lässt sich aus den Plasmaaustauschexperimenten ableiten, bei denen die geminderte Thrombozytenaggregation von WP aus Rivaroxabanpatienten, durch die Resuspension in Rivaroxaban-naivem Plasma, wieder angehoben werden konnte.

Um die Plättchenadhäsion unter physiologischeren Bedingungen zu untersuchen, wurden Experimente unter arteriellen Flussbedingungen in einer kollagenbeschichteten Flusskammer durchgeführt. Kollagen wird bei Schädigung des Gefäßendothels freigelegt und löst *in-vivo* die Adhäsion von Thrombozyten aus [104]. Im Flusskammermodell konnte eine verminderte Thrombozytenadhäsion, unter erstmaliger Einnahme von 20mg Rivaroxaban, in Zeitreihenexperimenten nachgewiesen werden. Auch im Vergleich von Patienten mit dauerhafter Rivaroxabaneinnahme und Patienten ohne Antikoagulation, konnte eine signifikant niedrigere Thrombozytenadhäsion bei Rivaroxabanpatienten nachgewiesen werden. Wenn man nun die Ergebnisse beider Experimente vergleicht stellt man fest, dass der reduzierende Effekt von Rivaroxaban auf die Thrombozytenadhäsion in den Zeitreihenexperimenten größer ist. In den Fällen erreichte man bei niedrigerer Patientenzahl schon signifikante Ergebnisse. Die Veränderungen lagen bei dreiminütigem Fluss bei 11,2% in den Zeitreihenexperimenten gegenüber 8,6% im Gruppenvergleich. Für fünfminütigen Fluss in der Kammer lagen die Werte für die Veränderung bei 8,6% und 7,8%. Eine Erklärung für die unterschiedliche Effektstärke mag sein, dass die Blutabnahme bei den Patienten der *cross-sectional* Gruppe früh morgens, vor Einnahme der täglichen Rivaroxabandosis, stattfand. Es ist hier also nur mit einer Restaktivität des Medikaments zu rechnen, die FXa-Inhibition beträgt ungefähr noch 10% [68]. Bei der *time-series* Gruppe wurden die Blutabnahmen 4 Stunden nach Einnahme der Tablette durchgeführt, hier ist die maximale Wirkung von Rivaroxaban zu erwarten [68]. Man kann also durchaus

annehmen, dass es sich bei dem hemmenden Effekt auf Thrombozyten um einen dosisabhängigen Effekt handelt. Dieses Ergebnis konnte auch in einigen Arbeiten für andere Methoden gezeigt werden [103, 105]. Eine weitere, wichtige Aussage, die man unter der Zusammenschau der Ergebnisse festhalten kann, ist, dass die verringerte Adhäsion von Thrombozyten in der Flusskammer, unabhängig vom maximalen Rivaroxabanwirkspiegel, auch im Vergleich der *cross-sectional* und der Non-OAK Gruppe gezeigt werden kann. Beim Vergleich beider Gruppen müssen jedoch noch andere Faktoren in Betracht gezogen werden, die die Thrombozytenfunktion beeinflussen können. Unter diesem Hintergrund sind Alter, Geschlecht, CRP und die Einnahme von Calciumantagonisten bekannte Faktoren deren Einfluss auf die Thrombozytenaktivität diskutiert werden [106-109]. Diese Faktoren betreffend, stellen sich in den Patientencharakteristika keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen dar. Die Faktoren in denen sich die Gruppen unterschieden (Diuretika, Hkt und Hb), hatten nach linearer Regressionsanalyse keinen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion nach drei- oder fünfminütigem Fluss. Sicherlich könnte das Vorliegen von VHF selbst ebenfalls ein Faktor sein, der die Ergebnisse zwischen der Non-OAK Gruppe (ohne VHF) und der *cross-sectional* Gruppe (mit VHF) beeinflusst. Da jedoch alle Patienten mit VHF auch das entsprechende Antikoagulanzen einnahmen, lassen sich die jeweiligen Einflüsse nicht sicher auseinanderdividieren. In der Literatur gibt es jedoch Hinweise, die einen Einfluss von VHF auf die Thrombozytenreaktivität beschreiben. So konnten Pourtau et al 2017 zeigen, dass die Thrombozytenaggregation in der LTA bei Patienten mit paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern niedriger ist als in einer Kontrollgruppe ohne VHF. Die Aggregation unterschied sich ebenfalls zwischen den beiden Patientengruppen mit VHF für TRAP. Hier zeigten Thrombozyten von Patienten mit paroxysmalen VHF ein niedrigeres Ansprechen auf TRAP induzierte Aggregation. Ursächlich scheint unter anderem eine Desensibilisierung von PAR auf Thrombozyten zu sein [110].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Rivaroxaban auf das endogene Thrombinpotenzial gemessen. Thrombin gilt als starker Aktivator der Thrombozytenaggregation und bildet somit eine Verbindung zwischen primärer und sekundärer Hämostase. Durch diese Verbindung können sich Effekte auf

das ETP auch auf die Thrombozytenfunktion auswirken. Hierzu wurde das ETP mit Hilfe der CAT bei Patienten vor und 4 Stunden nach Einnahme von 20mg Rivaroxaban gemessen. Es zeigte sich, dass das ETP und das Thrombinspitzenpiegel nach Rivaroxabaneinnahme erniedrigt sind, während die Latenzzeit bis zum Beginn der Thrombingenerierung und die Zeit bis zum Erreichen des Thrombinspitzenpiegels erhöht sind. Diese Ergebnisse sind mit einem Status der Hypokoagulabilität zu vereinbaren, wie sie bei FXa-Mangel zu erwarten sind [111, 112]. Die Recherche der aktuell vorhandenen Literatur, zum Einfluss von FXa-Inhibitoren auf das ETP, bestätigt die Ergebnisse [105, 113-116]. Graff et al haben beispielsweise bei 8 gesunden Probanden ETP und die FXa-Aktivität über einen Zeitraum von 36 Stunden nach Rivaroxabaneinnahme gemessen. Rivaroxaban wurde in einer Dosis von 5mg und 30mg verabreicht. Es wurden 4 weitere Probanden als Kontrollgruppe eingeschlossen, die ein Placebo erhielten. Das ETP wurde im Gegensatz zu unserer Arbeit aus PRP bestimmt und kann dadurch auch die Rolle der Thrombozyten bei der Generierung von Thrombin abbilden. Die Anti-FXa-Aktivität war nach 2 Stunden für beide Dosierungen am höchsten und fiel über 24 Stunden kontinuierlich ab. Nach 24h war nur bei der 30mg Dosis noch eine Anti-FXa-Aktivität zu sehen. Es konnten in dieser Studie eine signifikante dosisabhängige Verminderung des ETP und der anderen Parameter gegenüber dem Placebo gezeigt werden. Es zeigte sich, dass diese Effekte stark mit der Rivaroxabanplasmakonzentration korrelieren [105]. Eine weitere Studie von Artang et al zeigte ebenfalls eine Verminderung des ETPs für Rivaroxaban und Apixaban bei 10 gesunden Probanden. Die Korrelation mit den Plasmaspiegeln der Medikamente verhielt sich jedoch moderat. Eine starke Korrelation zeigte sich hingegen für die Thrombinspitzenpiegel in der Messung [113].

Die Hemmung des endogenen Thrombinpotenzials durch direkte Faktor-Xa-Inhibitoren ist interessant, da eine Reduktion auch zu einer verminderten Thrombozytenaktivierung durch Thrombin führen könnte. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die antiaggregatorischen Effekte von direkten FXa-Hemmern auch in vom Blutplasma separierten Thrombozyten, und damit unabhängig von Thrombin, auftreten. Hierbei scheint der aktivierte Faktor X eine zentrale Rolle in der Aktivierung von Thrombozyten zu spielen.

FXa selbst konnte unabhängig von Thrombin auch in weiteren Experimenten als direkter Auslöser der Thrombozytenaggregation in WP identifiziert werden. In der LTA konnte hierbei eine dosisabhängige Aggregation unter FXa beobachtet werden. Die Vorinkubation von WP mit Rivaroxaban hemmte die Thrombozytenaggregation ebenfalls dosisabhängig. Eine ähnliche Hemmung der Thrombozytenaggregation durch FXa wurde unter Vorinkubation der WP mit Vorapaxar erreicht. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der PAR-1 Rezeptor eine zentrale Funktion in der Aktivierung humaner Thrombozyten mit FXa hat. Es gibt Hinweise, dass FXa den PAR-1 Rezeptor auf Endothelzellen spalten und aktivieren kann [117, 118]. Diesen Mechanismus konnten wir in der Arbeit von Petzold et al in weiterführenden Experimenten auch für die PAR-1 Rezeptoren auf Thrombozyten darstellen [16]. Es wurde aufgezeigt, dass FXa, ähnlich wie Thrombin, den PAR-1 Rezeptor spalten kann, woraufhin ein Phosphoinositid-3-Kinase und Phospholipase C abhängiger „*Downstream-pathway*“ zur Thrombozytenaggregation führt [16]. Was den PAR-1 und PAR-4 Rezeptor auf humanen Thrombozyten betrifft, konnten wir in der vorliegenden Arbeit darstellen, dass die Rezeptorexpression durch Rivaroxaban nicht beeinflusst wird. Diese Ergebnisse unterstreichen ebenfalls die aufgestellte Hypothese, dass die hemmenden Effekte von Rivaroxaban auf die Thrombozytenaktivität plasmavermittelt sind. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Dabigatran, ein direkter Thrombininhibitor die Oberflächenexpression von PAR-1 Rezeptoren auf Thrombozyten erhöht [119, 120]. Eine erhöhte Thrombozytenreaktivität unter Dabigatran konnte ebenfalls in einigen Studien gezeigt werden und wird diskutiert [119, 121, 122].

Weitere Substanzen, die eine Rolle in der Plättchenaktivierung spielen und möglicherweise durch FXa-Inhibition beeinflusst werden, sind der thrombozytäre GPVI Rezeptor und Thromboxan A₂. Al-Tamimi et al konnten den Zusammenhang von prokoagulatorischen Situationen und der FXa abhängigen Ablösung („*shedding*“) des GPVI Rezeptoren von der Thrombozytenoberfläche darstellen. Die abgelösten Rezeptoren befinden sich dann in einer löslichen Form im Plasma und sind Marker für erhöhte Thrombozytenaktivität [123]. Eine Verminderung des *Sheddings* konnten Pignatelli et al bei Patienten mit VHF zeigen, die Rivaroxaban oder Apixaban

über einen Zeitraum von 3 Monaten einnahmen [124]. In letzterer Studie ist auch 11-Dehydro-Thromboxan B2 im Urin bestimmt worden. Dieses stellt das stabile Abbauprodukt von Thromboxan A2 dar, welches durch die Cyclooxygenase der Thrombozyten aus Arachidonsäure hergestellt wird. TXB2 ist demnach ein Maß für die Thrombozytenaktivierung *in-vivo* [124, 125]. Weitere Korrelationen wurden zwischen dem Thromboxan B2 Spiegel und dem Auftreten von MACCE bei Patienten mit VHF und bei Patienten unter Aspirintherapie gezeigt [126, 127]. Pignatelli et al konnten auch eine signifikante Abnahme der TXB2 Konzentration im Urin von Patienten mit VHF nachweisen, die über 3 Monate mit einem FXa-Inhibitor behandelt wurden. Unsere Arbeit stützt diese Ergebnisse insofern, dass in Folge einer Thrombozytenaktivierung mittels FXa, TXB2 ausgeschüttet wird. Demnach scheint die Thrombozytenaktivierung durch FXa stark mit der TXB2 Synthese zusammenzuhängen. Eine direkte FXa-Hemmung könnte schlussfolgernd zu einer geringeren Thrombozytenaktivierung und einer Verminderung der TXB2 Synthese führen.

4.1 Limitationen der Arbeit:

Trotz der Vielzahl der Experimente und der umfangreichen Ergebnisse, die einen eindeutigen Effekt von FXa-Inhibitoren auf die Thrombozytenaktivierung zeigen, müssen die Limitationen dieser Arbeit diskutiert werden. Zunächst muss man feststellen, dass die Anzahl der eingeschlossenen 63 Patienten für eine klinische Studie eher gering ist. Man muss jedoch sagen, dass die vorhandene Literatur zu diesem Thema auch aus kleineren Studien, oder *in-vitro* Experimenten, mit kleiner Patienten- oder Probandenzahl bestehen. Die in unserer Arbeit eingeschlossenen Patienten wurden in drei Studiengruppen zusammengefasst. Durch die unterschiedliche Gruppengröße und fehlende Randomisierung oder „*Matching*“ der Patienten, gibt es natürlich einige Unterschiede in den Patientencharakteristika zwischen den einzelnen Gruppen. Durch die Durchführung der Zeitreihenexperimente, bei denen die Ergebnisse der gleichen Patienten vor und nach Rivaroxabaneinnahme verglichen wurden, fallen die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht so stark ins Gewicht. Die *cross-sectional* Gruppe und die Non-OAK Gruppe, die in Experimenten miteinander verglichen wurden, stellten sich weitestgehend als ausgeglichen

dar. Die vorhandenen Differenzen zwischen den Gruppen hatten keine Auswirkungen auf die Ergebnisse. Dennoch wurden keine Patienten mit VHF ohne Antikoagulation eingeschlossen. Im Vergleich der beiden Gruppen lässt sich der Faktor VHF auf die Ergebnisse also schwer herausdividieren. Eine weitere Limitation dieser Studie ist, dass sie nur an einem Zentrum durchgeführt wurde und das eingeschlossene Patientenkollektiv ein Hochrisikoprofil aufweist. Somit sind die Ergebnisse möglicherweise nur bedingt auf die Gesamtpopulation der Patienten mit VHF übertragbar. Eine Endpunktanalyse konnte aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraums in dieser Studie nicht durchgeführt werden. Trotz einer Vielzahl von Methoden und Experimenten, die in der vorliegenden Studie präsentiert werden, konnten aus strukturell-organisatorischen und personellen Gründen nicht alle Experimente für alle Patienten durchgeführt werden. Dies bedingt die geringen und variierenden n-Zahlen der einzelnen Versuche. Dennoch bleibt festzuhalten, dass man auch bei diesen kleinen n-Zahlen einen signifikanten Effekt von FXa-Inhibitoren auf die Thrombozytenaktivierung darstellen konnte. Das Ergebnis lässt vermuten, dass es sich um einen stärkeren Effekt handeln könnte. Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist, dass die Anti-FXa-Aktivität und die Plasmaspiegel der FXa-Inhibitoren nicht bestimmt wurden. Trotz der standardisierten Abnahmezeitpunkte bei Stunde 0 und Stunde 4 können wir nicht sagen, ob die Medikamente ihren Wirkspiegel erreicht haben und wie hoch dieser war. Eine Korrelation der Ergebnisse der Experimente mit den Wirkspiegeln der FXa-Inhibitoren waren deshalb nicht möglich.

4.2 Zusammenfassung und Ausblick:

Bei Patienten mit VHF ist die Aktivierung von Thrombozyten beim Auftreten von Schlaganfällen und anderen kardiovaskulären Ereignissen ein zentraler Faktor. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Rivaroxaban und anderen FXa-Inhibitoren auf Thrombozyten untersucht und dargestellt. Es wurden insgesamt 62 Patienten eingeschlossen. 37 von ihnen hatten ein neu aufgetretenes VHF und wurden erstmalig auf Rivaroxaban oder Apixaban eingestellt. 15 Patienten waren über einen längeren Zeitraum mit Rivaroxaban antikoaguliert und 11 wurden Patienten ohne Antikoagulation als Kontrollgruppe eingeschlossen. Es konnte in Zeitreihenexperimenten dargestellt werden, dass

die Thrombozytenaggregation in der MEA sowie der LTA nach Rivaroxabaneinnahme abnimmt. Das endogene Thrombinpotenzial zeigte sich ebenfalls verringert, zudem ist die Thrombozytenadhäsion, die in Flusskammerversuchen gemessen wurde, nach Einnahme von Rivaroxaban verringert. In dem Zusammenhang konnte auch eine niedrigere Adhäsion bei langzeitantikoagulierten Patienten, gegenüber Patienten ohne Antikoagulation, gezeigt werden. Diese antithrombozytären Effekte scheinen jedoch nicht Substanzspezifisch zu sein, sondern zeigten sich auch unter Apixaban in der MEA. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Effekt klassenspezifisch für die FXa-Inhibitoren ist. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass FXa unabhängig von Thrombin ein potenter Auslöser der Thrombozytenaggregation ist. Dieser Effekt ist dosisabhängig und lässt sich, ebenfalls dosisabhängig, durch Rivaroxaban hemmen. Interessanterweise wies auch Vorapaxar, ein direkter Inhibitor des PAR-1 Rezeptors, ein sehr ähnliches Potenzial zur Hemmung der durch FXa stimulierten Aggregation auf. Der PAR-1 Rezeptor kann durch Thrombin auf Thrombozyten aktiviert werden, was zu einer Thrombozytenaktivierung führt. Diese Aktivierung kann auch durch FXa erfolgen. Eine verminderte FXa-Aktivität durch FXa-Inhibitoren kann eine verminderte Thrombozytenaktivierung über den PAR-1 Rezeptor erklären. Unterstützende Ergebnisse zeigen, dass der Effekt durch Rivaroxaban auf Thrombozyten reversibel und plasmaabhängig ist. Die Expression der PAR Rezeptoren 1 und 4 auf Thrombozyten bleibt von der Rivaroxabanmedikation unbeeinflusst. Obwohl auch eine Assoziation von FXa und erhöhter Thromboxanproduktion aus Thrombozyten gezeigt wurde, konnte der genaue Mechanismus in dieser Arbeit nicht dargestellt werden. Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen schließen, dass FXa-Inhibitoren über die niedrigere FXa-Aktivität die Aktivierung von Thrombozyten herabsetzen. Diese verminderte Aktivität lässt sich schon nach einer einmaligen Dosis von 20mg Rivaroxaban beobachten. Der Mechanismus involviert eine direkte Aktivierung des PAR-1 Rezeptors durch FXa. Andere Mechanismen, wie die FXa abhängige Synthese von Thromboxan, A2 und das *Shedding* von thrombozytären GPVI Rezeptoren, scheinen ebenfalls von Relevanz zu sein. Die Blockierung dieser Mechanismen durch FXa-Inhibitoren haben scheinbar Auswirkungen auf das Auftreten von ischämischen Ereignissen, von denen vor

allem Hochrisikopatienten profitieren können. Unter klinischen Gesichtspunkten stellt sich dann die Frage, welches Antikoagulanz bei der Therapie von Hochrisikopatienten mit VHF eingesetzt werden sollte. DOAKs scheinen den VKA zwar nach aktueller Studienlage überlegen, welches DOAK nun aber die optimale Therapie darstellt bleibt offen. Durch den in dieser Arbeit präsentierten Effekt auf die Thrombozytenfunktion, scheinen direkte Faktor-Xa-Inhibitoren vorteilhaft zu sein. Dem gegenüber stehen die direkten Thrombininhibitoren, für die auch eine Erhöhung der Plättchenreaktivität diskutiert wird. Perspektivisch sind jedoch größere randomisiert-kontrollierte klinische Studien notwendig, um die Thrombozytenfunktion bei Patienten mit VHF, unter Medikation mit FXa-Inhibitoren, zu untersuchen. Dabei sollte der Fokus auf der Aufschlüsselung FXa abhängiger Signalwege liegen. Auch der Vergleich von direkten FXa-Inhibitoren und direkten Thrombininhibitoren auf die Thrombozytenfunktion ist von klinischer Relevanz.

5 Literaturverzeichnis:

1. Joseph, P., et al., *Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors*. Circ Res, 2017. **121**(6): p. 677-694.
2. Chugh, S.S., et al., *Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study*. Circulation, 2014. **129**(8): p. 837-47.
3. Zoni-Berisso, M., et al., *Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective*. Clin Epidemiol, 2014. **6**: p. 213-20.
4. Chugh, S.S., et al., *Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(2): p. 371-8.
5. Steffel, J., et al., *The 2018 European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation*. Eur Heart J, 2018. **39**(16): p. 1330-1393.
6. Kirchhof, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **50**(5): p. e1-e88.
7. Halperin, J.L., et al., *Efficacy and safety of rivaroxaban compared with warfarin among elderly patients with nonvalvular atrial fibrillation in the Rivaroxaban Once Daily, Oral, Direct Factor Xa Inhibition Compared With Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation (ROCKET AF)*. Circulation, 2014. **130**(2): p. 138-46.
8. Granger, C.B., et al., *Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2011. **365**(11): p. 981-92.
9. Giugliano, R.P., et al., *Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2013. **369**(22): p. 2093-104.
10. Mega, J.L., et al., *Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome*. N Engl J Med, 2012. **366**(1): p. 9-19.
11. Eikelboom, J.W., et al., *Rivaroxaban with or without Aspirin in Stable Cardiovascular Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(14): p. 1319-1330.
12. Hoffman, M., *A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa*. Blood Rev, 2003. **17 Suppl 1**: p. S1-5.
13. Freynhofer, M.K., et al., *Platelet turnover predicts outcome after coronary intervention*. Thromb Haemost, 2017. **117**(5): p. 923-933.
14. Ibrahim, H., et al., *Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes*. J Am Coll Cardiol, 2014. **64**(20): p. 2122-9.
15. Erathi, H.V., et al., *Evaluation of On-Clopidogrel platelet reactivity overtime, SYNTAX SCORE, genetic polymorphisms and their relationship to one year clinical outcomes in STEMI patients undergoing PCI*. Minerva Cardioangiol, 2018. **66**(1): p. 16-25.
16. Petzold, T., et al., *Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa Driven Platelet Activation Via Protease Activated Receptor-1*. Circ Res, 2019.
17. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis*. Toxicol Pathol, 2011. **39**(1): p. 273-80.
18. Berndt, M.C., P. Metharom, and R.K. Andrews, *Primary haemostasis: newer insights*. Haemophilia, 2014. **20 Suppl 4**: p. 15-22.
19. Hoffman, M. and D.M. Monroe, 3rd, *A cell-based model of hemostasis*. Thromb Haemost, 2001. **85**(6): p. 958-65.

20. Kuter, D.J., *The physiology of platelet production*. Stem Cells, 1996. **14 Suppl 1**: p. 88-101.
21. Yun, S.H., et al., *Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 9060143.
22. Ghoshal, K. and M. Bhattacharyya, *Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 781857.
23. Ruggeri, Z.M., *The role of von Willebrand factor in thrombus formation*. Thromb Res, 2007. **120 Suppl 1**: p. S5-9.
24. Ruggeri, Z.M., *Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation*. J Clin Invest, 2000. **105**(6): p. 699-701.
25. Ruggeri, Z.M., et al., *Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor*. J Clin Invest, 1983. **72**(1): p. 1-12.
26. Clemetson, K.J., *Platelets and primary haemostasis*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 220-4.
27. Gremmel, T., A.L. Frelinger, 3rd, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology*. Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(3): p. 191-204.
28. Golebiewska, E.M. and A.W. Poole, *Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond*. Blood Rev, 2015. **29**(3): p. 153-62.
29. Crawley, J.T., et al., *The central role of thrombin in hemostasis*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 95-101.
30. Adams, M.N., et al., *Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors*. Pharmacol Ther, 2011. **130**(3): p. 248-82.
31. Kahn, M.L., et al., *A dual thrombin receptor system for platelet activation*. Nature, 1998. **394**(6694): p. 690-4.
32. Dahlback, B., *Blood coagulation*. Lancet, 2000. **355**(9215): p. 1627-32.
33. Smith, S.A., R.J. Travers, and J.H. Morrissey, *How it all starts: Initiation of the clotting cascade*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2015. **50**(4): p. 326-36.
34. Silverberg, M., et al., *Autoactivation of human Hageman factor. Demonstration utilizing a synthetic substrate*. J Biol Chem, 1980. **255**(15): p. 7281-6.
35. Tankersley, D.L. and J.S. Finlayson, *Kinetics of activation and autoactivation of human factor XII*. Biochemistry, 1984. **23**(2): p. 273-9.
36. Palta, S., R. Saroa, and A. Palta, *Overview of the coagulation system*. Indian J Anaesth, 2014. **58**(5): p. 515-23.
37. Kotecha, D., et al., *Efficacy of beta blockers in patients with heart failure plus atrial fibrillation: an individual-patient data meta-analysis*. Lancet, 2014. **384**(9961): p. 2235-43.
38. Sanna, T., et al., *Cryptogenic stroke and underlying atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2014. **370**(26): p. 2478-86.
39. Schnabel, R.B., et al., *50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study*. Lancet, 2015. **386**(9989): p. 154-62.
40. Heeringa, J., et al., *Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study*. Eur Heart J, 2006. **27**(8): p. 949-53.
41. Staerk, L., et al., *Atrial Fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes*. Circ Res, 2017. **120**(9): p. 1501-1517.

42. Andersson, T., et al., *All-cause mortality in 272,186 patients hospitalized with incident atrial fibrillation 1995-2008: a Swedish nationwide long-term case-control study*. Eur Heart J, 2013. **34**(14): p. 1061-7.
43. Schneider, M.P., et al., *Prevention of atrial fibrillation by Renin-Angiotensin system inhibition a meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(21): p. 2299-307.
44. Wachtell, K., et al., *Angiotensin II receptor blockade reduces new-onset atrial fibrillation and subsequent stroke compared to atenolol: the Losartan Intervention For End Point Reduction in Hypertension (LIFE) study*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(5): p. 712-9.
45. Schmieder, R.E., et al., *Reduced incidence of new-onset atrial fibrillation with angiotensin II receptor blockade: the VALUE trial*. J Hypertens, 2008. **26**(3): p. 403-11.
46. Nguyen, B.L., et al., *Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans*. Heart Rhythm, 2009. **6**(4): p. 454-60.
47. Allesie, M.A., et al., *Electropathological substrate of long-standing persistent atrial fibrillation in patients with structural heart disease: longitudinal dissociation*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2010. **3**(6): p. 606-15.
48. Haissaguerre, M., et al., *Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins*. N Engl J Med, 1998. **339**(10): p. 659-66.
49. Lim, H.S., et al., *Effect of atrial fibrillation on atrial thrombogenesis in humans: impact of rate and rhythm*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(8): p. 852-60.
50. Sposato, L.A., et al., *Diagnosis of atrial fibrillation after stroke and transient ischaemic attack: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Neurol, 2015. **14**(4): p. 377-87.
51. Wolf, P.A., R.D. Abbott, and W.B. Kannel, *Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study*. Stroke, 1991. **22**(8): p. 983-8.
52. Savelieva, I. and A.J. Camm, *Clinical relevance of silent atrial fibrillation: prevalence, prognosis, quality of life, and management*. J Interv Card Electrophysiol, 2000. **4**(2): p. 369-82.
53. *Nutrition classics from The Journal of Biological Chemistry 138:21-33, 1941. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. IV. The isolation and crystallization of the hemorrhagic agent by Harold A. Campbell and Karl Paul Link*. Nutr Rev, 1974. **32**(8): p. 244-6.
54. Pirmohamed, M., *Warfarin: almost 60 years old and still causing problems*. Br J Clin Pharmacol, 2006. **62**(5): p. 509-11.
55. Hart, R.G., L.A. Pearce, and M.I. Aguilar, *Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation*. Ann Intern Med, 2007. **146**(12): p. 857-67.
56. Hirsh, J., et al., *Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range*. Chest, 1998. **114**(5 Suppl): p. 445S-469S.
57. Kuruvilla, M. and C. Gurk-Turner, *A review of warfarin dosing and monitoring*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2001. **14**(3): p. 305-6.
58. Horton, J.D. and B.M. Bushwick, *Warfarin therapy: evolving strategies in anticoagulation*. Am Fam Physician, 1999. **59**(3): p. 635-46.

59. Esmon, C.T., et al., *Anticoagulation proteins C and S*. Adv Exp Med Biol, 1987. **214**: p. 47-54.
60. Booth, S.L., et al., *Dietary vitamin K1 and stability of oral anticoagulation: proposal of a diet with constant vitamin K1 content*. Thromb Haemost, 1997. **77**(3): p. 504-9.
61. Hirsh, J., et al., *Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range*. Chest, 2001. **119**(1 Suppl): p. 8S-21S.
62. Tsu, L.V., J.E. Dienes, and W.E. Dager, *Vitamin K dosing to reverse warfarin based on INR, route of administration, and home warfarin dose in the acute/critical care setting*. Ann Pharmacother, 2012. **46**(12): p. 1617-26.
63. Hanley, J.P., *Warfarin reversal*. J Clin Pathol, 2004. **57**(11): p. 1132-9.
64. Heidbuchel, H., et al., *Implementation of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in daily practice: the need for comprehensive education for professionals and patients*. Thromb J, 2015. **13**: p. 22.
65. Lane, D.A. and K. Wood, *Cardiology patient page. Patient guide for taking the non-vitamin K antagonist oral anticoagulants for atrial fibrillation*. Circulation, 2015. **131**(16): p. e412-5.
66. Ruff, C.T., et al., *Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2014. **383**(9921): p. 955-62.
67. Perzborn, E., et al., *In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(3): p. 514-21.
68. Kubitzka, D., et al., *Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct factor Xa inhibitor*. Clin Pharmacol Ther, 2005. **78**(4): p. 412-21.
69. Mueck, W., et al., *Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban*. Clin Pharmacokinet, 2014. **53**(1): p. 1-16.
70. Weinz, C., et al., *Pharmacokinetics of BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor--in rats and dogs*. Xenobiotica, 2005. **35**(9): p. 891-910.
71. Weinz, C., et al., *Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(5): p. 1056-64.
72. Patel, M.R., et al., *Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2011. **365**(10): p. 883-91.
73. Mahaffey, K.W., et al., *Ischaemic cardiac outcomes in patients with atrial fibrillation treated with vitamin K antagonism or factor Xa inhibition: results from the ROCKET AF trial*. Eur Heart J, 2014. **35**(4): p. 233-41.
74. Chatterjee, S., et al., *Rivaroxaban and risk of myocardial infarction: insights from a meta-analysis and trial sequential analysis of randomized clinical trials*. Coron Artery Dis, 2013. **24**(8): p. 628-35.
75. Cattaneo, M., et al., *Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(6): p. 1029.
76. Born, G.V., *Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal*. Nature, 1962. **194**: p. 927-9.

77. *Platelet aggregation: Part II Some results from a new method of study.* J Clin Pathol, 1962. **15**(5): p. 452-5.
78. Cattaneo, M., et al., *Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH.* J Thromb Haemost, 2013.
79. Hayward, C.P., et al., *Development of North American consensus guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using light transmission aggregometry.* Am J Clin Pathol, 2010. **134**(6): p. 955-63.
80. Cardinal, D.C. and R.J. Flower, *The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood.* J Pharmacol Methods, 1980. **3**(2): p. 135-58.
81. Paniccia, R., et al., *Platelet function tests: a comparative review.* Vasc Health Risk Manag, 2015. **11**: p. 133-48.
82. Bochsén, L., et al., *The influence of platelets, plasma and red blood cells on functional haemostatic assays.* Blood Coagul Fibrinolysis, 2011. **22**(3): p. 167-75.
83. Seyfert, U.T., et al., *Variables influencing Multiplate(TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals.* Platelets, 2007. **18**(3): p. 199-206.
84. Hemker, H.C., et al., *The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability.* Pathophysiol Haemost Thromb, 2002. **32**(5-6): p. 249-53.
85. Tripodi, A., *Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory.* Clin Chem, 2016. **62**(5): p. 699-707.
86. Tripodi, A., et al., *Review article: the prothrombin time test as a measure of bleeding risk and prognosis in liver disease.* Aliment Pharmacol Ther, 2007. **26**(2): p. 141-8.
87. Marlar, R.A., B. Clement, and J. Gausman, *Activated Partial Thromboplastin Time Monitoring of Unfractionated Heparin Therapy: Issues and Recommendations.* Semin Thromb Hemost, 2017. **43**(3): p. 253-260.
88. Hemker, H.C. and S. Beguin, *Phenotyping the clotting system.* Thromb Haemost, 2000. **84**(5): p. 747-51.
89. Andersen, H., et al., *Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11189-93.
90. Dittrich, W. and W. Gohde, *[Impulse fluorometry of single cells in suspension].* Z Naturforsch B, 1969. **24**(3): p. 360-1.
91. Picot, J., et al., *Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation.* Cytotechnology, 2012. **64**(2): p. 109-30.
92. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications.* Crit Rev Biotechnol, 2017. **37**(2): p. 163-176.
93. Duperray, A., et al., *Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface.* Blood, 1989. **74**(5): p. 1603-11.

94. Kahn, M.L., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 879-87.
95. Femia, E.A., et al., *Effect of platelet count on platelet aggregation measured with impedance aggregometry (Multiplate analyzer) and with light transmission aggregometry*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(12): p. 2193-6.
96. Alkhamis, T.M., R.L. Beissinger, and J.R. Chediak, *Artificial surface effect on red blood cells and platelets in laminar shear flow*. Blood, 1990. **75**(7): p. 1568-75.
97. Koltai, K., et al., *Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(8).
98. Steppich, B., et al., *Effect of the FXa inhibitors Rivaroxaban and Apixaban on platelet activation in patients with atrial fibrillation*. J Thromb Thrombolysis, 2017. **43**(4): p. 490-497.
99. Banovcin, P., Jr., et al., *Platelet Aggregation in Direct Oral Factor Xa Inhibitors-treated Patients With Atrial Fibrillation: A Pilot Study*. J Cardiovasc Pharmacol, 2017. **70**(4): p. 263-266.
100. Olivier, C.B., et al., *Dabigatran and rivaroxaban do not affect AA- and ADP-induced platelet aggregation in patients receiving concomitant platelet inhibitors*. J Thromb Thrombolysis, 2016. **42**(2): p. 161-6.
101. Nehaj, F., et al., *First Evidence: TRAP-Induced Platelet Aggregation Is Reduced in Patients Receiving Xabans*. Clin Appl Thromb Hemost, 2018. **24**(6): p. 914-919.
102. Sokol, J., et al., *First evidence: rivaroxaban and apixaban reduce thrombin-dependent platelet aggregation*. J Thromb Thrombolysis, 2018. **46**(3): p. 393-398.
103. Wan, H., et al., *An in-vitro evaluation of direct thrombin inhibitor and factor Xa inhibitor on tissue factor-induced thrombin generation and platelet aggregation: a comparison of dabigatran and rivaroxaban*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2016. **27**(8): p. 882-885.
104. Moroi, M., et al., *Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions*. Blood, 1997. **90**(11): p. 4413-24.
105. Graff, J., et al., *Effects of the oral, direct factor xa inhibitor rivaroxaban on platelet-induced thrombin generation and prothrombinase activity*. J Clin Pharmacol, 2007. **47**(11): p. 1398-407.
106. Johnson, M., E. Ramey, and P.W. Ramwell, *Sex and age differences in human platelet aggregation*. Nature, 1975. **253**(5490): p. 355-7.
107. Fiedel, B.A. and H. Gewurz, *Effects of C-reactive protein on platelet function. II. Inhibition by CRP of platelet reactivities stimulated by poly-L-lysine, ADP, epinephrine, and collagen*. J Immunol, 1976. **117**(4): p. 1073-8.
108. Skoglund, C., et al., *C-reactive protein and C1q regulate platelet adhesion and activation on adsorbed immunoglobulin G and albumin*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(5): p. 466-74.
109. Weiss, K., et al., *Influence of a single dose of calcium channel blockers on platelet function*. Platelets, 1991. **2**(1): p. 41-3.

110. Pourtau, L., et al., *Platelet function and microparticle levels in atrial fibrillation: Changes during the acute episode*. Int J Cardiol, 2017. **243**: p. 216-222.
111. Al Dieri, R., et al., *The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding*. Thromb Haemost, 2002. **88**(4): p. 576-82.
112. Hemker, H.C., R. Al Dieri, and S. Beguin, *Thrombin generation assays: accruing clinical relevance*. Curr Opin Hematol, 2004. **11**(3): p. 170-5.
113. Artang, R., et al., *Assessment of the effect of direct oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, and apixaban in healthy male volunteers using a thrombin generation assay*. Res Pract Thromb Haemost, 2017. **1**(2): p. 194-201.
114. Bertaggia-Calderara, D., et al., *Effect of Rivaroxaban on thrombin generation in vivo. A study in obese patients*. Int J Lab Hematol, 2018. **40**(1): p. e11-e14.
115. Rigano, J., et al., *Thrombin generation estimates the anticoagulation effect of direct oral anticoagulants with significant interindividual variability observed*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2018. **29**(2): p. 148-154.
116. Kim, P.Y., et al., *Mechanistic Basis for the Differential Effects of Rivaroxaban and Apixaban on Global Tests of Coagulation*. TH Open, 2018. **2**(2): p. e190-e201.
117. Schuepbach, R.A. and M. Riewald, *Coagulation factor Xa cleaves protease-activated receptor-1 and mediates signaling dependent on binding to the endothelial protein C receptor*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(2): p. 379-88.
118. Bhattacharjee, G., et al., *Factor Xa binding to annexin 2 mediates signal transduction via protease-activated receptor 1*. Circ Res, 2008. **102**(4): p. 457-64.
119. Achilles, A., et al., *Dabigatran enhances platelet reactivity and platelet thrombin receptor expression in patients with atrial fibrillation*. J Thromb Haemost, 2017. **15**(3): p. 473-476.
120. Chen, B., et al., *Characterization of thrombin-bound dabigatran effects on protease-activated receptor-1 expression and signaling in vitro*. Mol Pharmacol, 2015. **88**(1): p. 95-105.
121. Olivier, C.B., et al., *TRAP-induced platelet aggregation is enhanced in cardiovascular patients receiving dabigatran*. Thromb Res, 2016. **138**: p. 63-68.
122. Petzold, T., et al., *Oral thrombin inhibitor aggravates platelet adhesion and aggregation during arterial thrombosis*. Sci Transl Med, 2016. **8**(367): p. 367ra168.
123. Al-Tamimi, M., et al., *Coagulation-induced shedding of platelet glycoprotein VI mediated by factor Xa*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3912-20.
124. Pignatelli, P., et al., *Anti Xa oral anticoagulants inhibit in vivo platelet activation by modulating glycoprotein VI shedding*. Pharmacol Res, 2016. **113**(Pt A): p. 484-489.
125. Vesterqvist, O., *Measurements of the in vivo synthesis of thromboxane and prostacyclin in humans*. Scand J Clin Lab Invest, 1988. **48**(5): p. 401-7.

126. Pastori, D., et al., *Urinary 11-dehydro-thromboxane B2 is associated with cardiovascular events and mortality in patients with atrial fibrillation*. Am Heart J, 2015. **170**(3): p. 490-7 e1.
127. Eikelboom, J.W., et al., *Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events*. Circulation, 2002. **105**(14): p. 1650-5.

6 Danksagungen:

Der Weg ist das Ziel. Lange konnte ich mit dieser Redewendung überhaupt nichts anfangen. Das hat sich mit der Fertigstellung dieser Arbeit geändert. Denn jetzt, da ich mein großes Ziel erreicht habe, kann ich auf den Weg zurückblicken. Dieser Weg war nicht immer einfach und es gab einige Tage, an denen die Motivation vielleicht nicht ganz so groß war, wie sie vielleicht hätte sein sollen. An diesen Tagen waren es die besonderen Menschen in meinem Umfeld, die mich immer wieder dazu bewegen konnten den Weg weiter zu gehen. An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die diesen Weg mit mir gegangen sind.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Malte Kelm bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Klinik Forschung zu betreiben und Patienten für diese Arbeit einzuschließen. Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn Dr. Amin Polzin, der als Betreuer und Mentor immer fantastische Arbeit geleistet hat. Ihre Fähigkeit Leute zu motivieren und Ihr „*Mindset*“ bringen diese Arbeitsgruppe immer weiter nach vorne und so waren auch Sie der Motor, der mich immer wieder dazu angetrieben hat, meine Arbeiten fertigzustellen. Vielen Dank für Ihren Rückhalt, Ihr Vertrauen und für die überragende Betreuung über all die Jahre. Aber auch der beste Motor braucht ein gutes Getriebe, um die Kraft in eine gerichtete Bewegung umzuwandeln. Dieses Getriebe bist du Lisa – du hast als Organisationstalent immer alles auf dem Schirm und bist aus der AG nicht wegzudenken. Dein Optimismus und deine positive Energie färben ab und so hast du mich auch dazu motiviert der AG beizutreten. Auch bei dir möchte ich mich herzlich für die Betreuung und die Motivation bedanken. Die Kraft, die du jeden Tag in die AG investierst, überträgt sich direkt auf die Räder, die den AG-Karren ins Rollen bringen. Diese Räder sind wir Doktoranden: Alina, Caro, Aysel, Martin, David, Philipp, Kaje – danke für eure tatkräftige Mithilfe, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Ohne euch wären Tage (und Nächte) im Labor nicht annähernd so witzig gewesen. Alleine die Erinnerungen an das tagelange Umpipettieren und Beschriften von S1P-Proben beschert mir noch immer Albträume. Jedoch waren es genau diese Momente, die uns zusammengeschweißt haben. Wenn man über das Labor spricht, kommt man an dir nicht vorbei Kirsten – du hast mir gezeigt wie man

mit einer Pipette umgeht und hattest immer ein offenes Ohr für die experimentellen Probleme, die du auch meistens zu lösen wusstest. Vielen Dank, dass du mich so gut unterstützt und gelegentlich mit Nervennahrung versorgt hast! An dieser Stelle gilt mein Dank auch Herrn Prof. Dr. Thomas Hohlfeld, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die Experimente dieser Arbeit in den Räumlichkeiten seines Labors durchzuführen.

Wenn ich vom Ziel aus auf den Entstehungsweg dieser Dissertation zurückblicke, dürfen die wichtigsten Menschen in meinem Leben nicht fehlen. Zunächst danke ich meinem besten Freund Timm, der wahrscheinlich diese Zeilen korrigiert hat, da ich nach 13 Jahren Schule und Abitur immer noch Probleme mit der Rechtschreibung habe. Danke für deinen Rückhalt und dafür, dass du nach fast zwei Dekaden Freundschaft immer noch für mich da bist. Während unseres Roadtrips durch Australien sind die ersten Seiten dieser Arbeit zwischen Sonnenbädern am Strand und Spieleabenden mit Weißwein aus dem 5 Liter Kanister entstanden. Das werde ich nie vergessen, vielen Dank an alle, die dabei waren. Zu guter Letzt möchte ich das größte Dankeschön an meine Familie aussprechen. Danke Mama, Papa und Sidonie, dass ihr mich bei allem was ich tue so bedingungslos unterstützt und liebt. Ich weiß, dass ihr furchtbar stolz auf mich seid und hoffe, dass ich euch eines Tages all das zurückgeben kann, was ihr mir mein ganzes Leben gegeben habt. Ich liebe euch!