

Optimierung der antithrombotischen Therapie von Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit und Vorhofflimmern

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Aysel Ayhan

aus Nürnberg

Düsseldorf, August 2020

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikum
Düsseldorf, Direktor: Univ.-Prof. Dr. Malte Kelm, der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf.

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

Referent: PD Dr. med. Amin Polzin

Korreferent: Prof. Dr. Jens W. Fischer

Tag der mündlichen Prüfung:

07. Dezember 2020

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem erkläre ich, dass ich bisher noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Düsseldorf, den 25.08.2020

Aysel Ayhan

Für meine Familie und ihre unermüdliche Unterstützung!

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Petzold T, Thienel M, Dannenberg LK, Mourikis P, Helten C, **Ayhan A**, M'Pembele R, Achilles A, Trojovsky K, Konsek D, Zang Z, Regenauer R, Pircher J, Ehrlich A, Lusebrink E, Nicolai L, Stocker T, Brandl R, Roschentaler F, Strecker J, Saleh I, Spannagl M, Mayr CH, Schiller HB, Jung C, Gerdes N, Hoffmann T, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Schulz C, Kelm M & Polzin A. Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa Driven Platelet Activation Via Protease Activated Receptor-1. *Circulation research*. 2019, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315099

Der Anteil der von mir beigetragenen Arbeit für diese Publikation beträgt in etwa 20 %!

Abstract

Coronary artery Disease (CAD) is still the main cause of death in the western world. After stent implantation, antiplatelet therapy (APT) with acetylsalicylic acid (ASA) or clopidogrel is crucial. In the western world, atrial fibrillation (AF) is also a prevalent cardiovascular disease (CVD). It often results in strokes when affected people are not treated. So oral anticoagulation (OAC) therapy is indispensable for people with AF to prevent stroke. The treatment of CAD patients after stent implantation who also have an AF is complicated. It is important that these patients receive an optimal APT to prevent a thrombus due to the stent, as well as an adequate inhibition in plasmatic coagulation to prevent a stroke.

The role of the key-player thrombin in coagulation is already known. As a strong stimulus of platelet reactivity, it plays an important role in cellular aggregation. So, targeting thrombin seemed to be a good option to inhibit both, the cellular as well as the plasmatic coagulation. Unfortunately, some studies have shown that direct inhibition of thrombin leads to enhanced myocardial infarction (MI). By contrast, there were no increases or even a decrease of MI risk, when using FXa-Inhibitors.

It is not known which antiplatelet medication is optimal in combination with OAC in patients with CAD and AF. At the moment, clopidogrel is preferred. However, it is known that clopidogrel has some limitations. The other option for APT is ASA, which has been used for a long time. But it is not known if ASA has also an effect on the outcome of MI.

Hence, in this work we investigate the role of the OAC Rivaroxaban (RIVA) on platelet reactivity, as well as the effect of ASA on the outcome of MI to investigate the best option for the therapy of CVD patients with AF.

In *in-vivo* and *in-vitro* experiments, we found inhibition of platelet aggregation, platelet adhesion and thrombus formation, in RIVA treated individuals. This could be explained by the inhibition of FXa which led to a thrombin independent enhancement of platelet activation by itself. We found that the target of FXa is the protease-activated receptor 1 (PAR-1) and revealed PI3K- and PLC-pathway as the background behind this mechanism.

Furthermore, we investigated the protective effect of ASA during an AMI. ASA treated mice showed decreased infarct sizes and increased cardiac function compared to untreated controls. Additionally, ASA treatment led to less recruitment of inflammatory cells into the affected tissue, which was followed by less necrosis of the myocardium. This effect was abolished in platelet depleted mice.

The results of this work supported two important drugs of antithrombotic therapy by demonstrating additional previously unknown positive effects. Next to its anticoagulant characteristics, RIVA acts as an antiplatelet medication, which might be the reason for the decreased risk of AMI. Additionally, it was shown that ASA also improved the cardiac outcome after murine AMI.

Zusammenfassung

Koronare Herzkrankheiten (KHK) sind immer noch die Haupttodesursache der westlichen Welt. Die Thrombozytenfunktionshemmung mit Acetylsalicylsäure (ASS) oder einem P2Y₁₂-Hemmer, wie Clopidogrel, ist für die Sekundärprävention von KHK-Patienten nach Stentimplantation essentiell. Auch Vorhofflimmern (VHF) ist in den Industriestaaten ein weit verbreitetes Leiden und endet unbehandelt oftmals in einem Schlaganfall. Um dem vorzubeugen sind orale Antikoagulanzen (OAK) in der Therapie von Patienten mit VHF unverzichtbare Substanzen. Ein besonderes Augenmerk sollte insbesondere auf Patienten mit beiden Erkrankungen gelegt werden. Die Therapie von KHK-Patienten mit VHF gestaltet sich als große Herausforderung, da sowohl die Hemmung der Thrombozyten als auch die Hemmung der plasmatischen Gerinnung gewährleistet werden muss. Dabei spielt Thrombin eine Schlüsselrolle. Grund dafür ist seine stark plättchenaktivierende Eigenschaft, die für die zelluläre Gerinnung sehr wichtig ist. Ebenso groß ist dessen Funktion in der Gerinnungskaskade.

Eine direkte Hemmung von Thrombin mit Dabigatran zeigte jedoch einen Anstieg von akuten Myokardinfarkten (AMI). Im Gegensatz dazu war das Risiko eines AMI bei der Therapie mit FXa-Hemmern nicht erhöht oder sogar vermindert, sodass in dieser Arbeit die Wirkung des plasmatischen Gerinnungshemmers Rivaroxaban auf die zelluläre Gerinnung untersucht wurde.

Zudem ist bisher noch unklar, welcher Thrombozytenaggregationshemmer am besten in Kombination mit einem Nicht-Vitamin K-Antagonistischen orale Antikoagulanzen (NOAK) angewendet werden sollte. Bisher wurde Clopidogrel bevorzugt angewendet, jedoch ist dessen Wirksamkeit oftmals eingeschränkt.

Obwohl die Alternative zu dem P2Y₁₂-Hemmer ASS schon lange zur sekundären Prophylaxe verwendet wird, ist dessen Effekt auf das *Outcome* nach AMI noch nicht bekannt. Dies soll zusätzlich in dieser Arbeit geklärt werden, um eine bestmögliche Therapie für KHK-Patienten mit VHF zu ermöglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass durch RIVA die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten, sowie die Thrombusformation, durch eine direkte Hemmung des FXa, unabhängig von Thrombin, inhibiert wurde. Als Target von FXa konnte der Protease-aktivierte Rezeptor (PAR)-1 detektiert werden, welcher über die Signalwege von

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)- und Phospholipase C (PLC) zu einer Aktivierung der Thrombozyten führte.

In murinen *in-vivo* Untersuchungen wurde ein schützender Effekt von ASS im AMI nachgewiesen. Neben einer Verkleinerung der Infarktgrößen, konnte eine bessere Herzfunktion 24h post Ischämie/Reperfusion (IR) gezeigt werden. Außerdem war zu beobachten, dass nach ASS-Behandlung eine verminderte Rekrutierung von Inflammationszellen in das betroffene Gewebe stattfand. Mithilfe von Depletion der Thrombozyten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es sich dabei um einen plättchenabhängigen Effekt handelte.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit eine thrombinunabhängige antiaggregatorische Wirkung für RIVA nachgewiesen werden konnte. Dies könnte ein Grund für das geringere AMI-Risiko nach FXa-Therapie sein. Zusätzlich konnte der Nutzen des Aggregationshemmers ASS auf das kardiale *Outcome* nach Infarkt, zusätzlich zu seiner sekundärprophylaktischen Wirkung, in murine *in-vivo* Untersuchungen gezeigt werden.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	VI
Zusammenfassung	VIII
Inhaltsverzeichnis	X
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVIII
1. Einleitung	- 1 -
1.1. Koronare Herzkrankheit	- 1 -
1.2. Akuter Myokardinfarkt	- 2 -
1.3. Vorhofflimmern	- 3 -
1.4. Antithrombotische Therapie	- 4 -
1.4.1. Orale Antikoagulation	- 5 -
1.4.1.1. Vitamin K-Antagonisten	- 5 -
1.4.1.2. Neue orale Antikoagulanzen	- 6 -
1.4.1.2.1. Faktor IIa-Inhibitoren	- 7 -
1.4.1.2.2. Faktor Xa-Inhibitoren	- 7 -
1.4.1.2.3. Faktor IIa-Inhibitoren versus Faktor Xa-Inhibitoren	- 8 -
1.4.2. Antiplättchentherapie	- 10 -
1.4.2.1. Clopidogrel	- 10 -
1.4.2.2. ASS	- 10 -
1.4.2.2.1. Akuttherapie	- 10 -
1.4.2.2.2. Prävention	- 11 -
1.4.2.2.2.1. Primärprophylaxe	- 12 -
1.4.2.2.2.2. Sekundärprophylaxe	- 13 -
2. Ziel der Dissertation	- 15 -
2.1. RIVA inhibiert die Plättchenreaktivität unabhängig von Thrombin	- 15 -
2.2. ASS verbessert das kardiale <i>Outcome</i> nach AMI im Mausmodell	- 16 -
3. Patienten- und Probandenrekrutierung, Versuchstiere, Material und Methoden	- 17 -

3.1.	Patienten- und Probandenrekrutierung.....	- 17 -
3.2.	Humane Blutuntersuchungen	- 18 -
3.2.1.	Blutabnahme.....	- 18 -
3.2.2.	Multiplate® Analysen	- 19 -
3.2.3.	Lichttransmissionsaggregometrie.....	- 19 -
3.2.3.1.	Herstellung von plättchenreichem Plasma	- 19 -
3.2.3.2.	Isolierung von gewaschenen Plättchen.....	- 19 -
3.2.3.3.	Messung in der Lichttransmissionsaggregometrie	- 20 -
3.2.4.	Thrombozytenadhäsionsanalyse über die Bioflux Flusskammer	- 20 -
3.2.5.	Durchflusszytometrische Analyse humaner Proben.....	- 21 -
3.2.6.	Enzyme-linked immunosorbent assay.....	- 22 -
3.3.	Tierversuchsexperimentelle Untersuchungen	- 22 -
3.3.1.	Versuchstiere	- 22 -
3.3.2.	<i>In-vivo</i> -Induktion arterieller Thrombosen	- 23 -
3.3.3.	Experimentelle Infarktmodelle.....	- 23 -
3.3.3.1.	Ischämie-Reperfusion „open-chest“	- 23 -
3.3.3.2.	Ischämie-Reperfusion „closed-chest“	- 25 -
3.3.4.	Medikamentöse Behandlung der Versuchstiere	- 27 -
3.3.4.1.	Applikation von ASS.....	- 27 -
3.3.4.2.	Applikation des Antikörpers zur Plättchendepletion.....	- 28 -
3.3.5.	Kardiovaskuläre murine <i>in-vivo</i> Diagnostik.....	- 29 -
3.3.5.1.	Transthorakale Echokardiographie (TTE).....	- 29 -
3.3.5.2.	Elektrokardiogramm.....	- 30 -
3.3.6.	Murine <i>ex-vivo</i> -Analysen von Blut- und Gewebeproben.....	- 31 -
3.3.6.1.	Blut- und Organentnahme	- 31 -
3.3.6.2.	Histologie	- 32 -
3.3.6.2.1.	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung.....	- 32 -
3.3.6.2.2.	Immunhistologische Analysen	- 34 -
3.3.6.2.2.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	- 34 -
3.3.6.2.2.2.	MAC-2-Färbung.....	- 35 -
3.3.6.2.2.3.	Ly6G-Färbung	- 35 -
3.3.7.	Durchflusszytometrie/ FACS der murinen Immunzellen.....	- 36 -
3.3.8.	Hämatologie	- 37 -

3.4.	Statistische Analyse.....	- 37 -
4.	Ergebnisse	- 38 -
4.1.	Plättchenreaktivität unter RIVA.....	- 38 -
4.1.1.	Thrombozytenfunktion unter RIVA.....	- 38 -
4.1.1.1.	Vollblutaggregation unter RIVA.....	- 38 -
4.1.1.1.1.	Querschnittsanalyse.....	- 38 -
4.1.1.1.2.	Zeitreihenanalyse.....	- 40 -
4.1.1.2.	LTA unter RIVA.....	- 41 -
4.1.2.	Thrombozytenadhäsion unter RIVA.....	- 42 -
4.1.2.1.	Querschnittsanalyse.....	- 42 -
4.1.2.1.1.	Laminarer Fluss.....	- 42 -
4.1.2.1.2.	Pulsatiler Fluss.....	- 43 -
4.1.2.2.	Zeitreihenanalyse.....	- 44 -
4.1.2.2.1.	Laminarer Fluss.....	- 44 -
4.1.2.2.2.	Pulsatiler Fluss.....	- 44 -
4.1.3.	<i>In-vivo</i> Thrombusformation unter RIVA.....	- 45 -
4.1.3.1.	Thrombusformation.....	- 45 -
4.1.3.2.	Zeit bis zur Okklusion.....	- 46 -
4.1.3.3.	Fragmentierung des Thrombus.....	- 46 -
4.1.3.4.	Histologie des Thrombus.....	- 47 -
4.1.3.4.1.	Fibrinogen auf der Thrombusoberfläche.....	- 47 -
4.1.3.4.2.	Thrombozyten auf der Thrombusoberfläche.....	- 48 -
4.1.4.	Thrombozytenreaktivität unter Faktor Xa.....	- 48 -
4.1.4.1.	Im Vollblut.....	- 48 -
4.1.4.2.	Konzentrationsabhängige Reaktivität in gewaschenen Plättchen.....	- 49 -
4.1.4.3.	Konzentrationsabhängige Hemmung der Reaktivität mit RIVA.....	- 50 -
4.1.4.4.	Intrazelluläres Calcium-Signaling.....	- 51 -
4.1.4.5.	P-Selektin-Expression.....	- 52 -
4.1.4.6.	ICAM-2-Expression.....	- 53 -
4.1.4.7.	CD40L-Expression.....	- 54 -
4.1.5.	Veränderungen der PAR-Expression.....	- 55 -
4.1.5.1.	PAR-1.....	- 55 -
4.1.5.2.	PAR-4.....	- 56 -

4.1.6.	Direkter Effekt von FXa auf PAR-1.....	- 56 -
4.1.6.1.	Plättchenreaktivität unter Faktor Xa und Vorapaxar.....	- 57 -
4.1.6.2.	LC/MS-MS Messungen der Spalt-Produkte.....	- 57 -
4.1.7.	Intrazelluläre Signaltransduktion	- 58 -
4.1.8.	Prästimulation und Verifizierung des Signalweges.....	- 59 -
4.2.	ASS im akuten Myokardinfarkt	- 61 -
4.2.1.	Infarktgrößen unter ASS-Behandlung – im open-chest-Modell	- 61 -
4.2.2.	Herzfunktion unter ASS-Behandlung	- 62 -
4.2.3.	Infarktgrößen unter ASS-Behandlung mit und ohne Thrombozytendepletion – im closed-chest-Modell	- 64 -
4.2.4.	Hämatologische Messungen.....	- 65 -
4.2.4.1.	Blutbildmessung.....	- 65 -
4.2.4.2.	Durchflusszytometrische-Analysen.....	- 67 -
4.2.4.2.1.	Monozyten.....	- 67 -
4.2.5.	Immunhistologische Untersuchungen	- 69 -
4.2.5.1.	Inflamationsbereich unter HE-Färbung.....	- 69 -
4.2.5.2.	Makrophageneinwanderung	- 70 -
4.2.5.3.	Neutrophileneinwanderung	- 71 -
5.	Diskussion.....	- 73 -
5.1.	Plättchenreaktivität.....	- 73 -
5.1.1.	Thrombozytenaggregation.....	- 73 -
5.1.2.	Thrombozytenadhäsion	- 75 -
5.1.3.	<i>In-vivo</i> Thrombusformation	- 76 -
5.1.4.	Veränderungen der Oberflächenproteine	- 77 -
5.1.5.	Mechanismus der FXa vermittelten Thrombozytenaktivierung.....	- 78 -
5.1.5.1.	Thrombinabhängigkeit	- 78 -
5.1.5.2.	Rezeptorveränderungen.....	- 78 -
5.1.5.3.	Signalweg	- 79 -
5.2.	Thrombozytenaggregationshemmung.....	- 80 -
5.2.1.	Kardiales <i>Outcome</i> nach AMI.....	- 80 -
5.2.2.	Plättchenabhängigkeit	- 81 -
5.2.3.	Inflammation post AMI.....	- 84 -
5.3.	Limitierende Faktoren	- 86 -

6.	Zusammenfassung und Ausblick	- 88 -
7.	Literaturverzeichnis	- 90 -
8.	Chemikalien- und Materialliste	- 97 -
9.	Danksagung.....	- 107 -

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Therapieschema für die Zeit nach Myokardinfarkt nach Valgimigli et al.	5 -
Abbildung 2: Wirkmechanismus von Dabigatran schematisch dargestellt von Polzin et al. 2018	9 -
Abbildung 3: Vergleich für das Auftreten eines Myokardinfarktes anhand von verschiedenen Studien. -	9 -
Abbildung 4: Wirkmechanismus von ASS.....	12 -
Abbildung 5: Grafische Zusammenfassung RIVA.....	15 -
Abbildung 6: Grafische Zusammenfassung ASS.....	16 -
Abbildung 7: Flussdiagramm der Querschnitts- und der Zeitreihenanalyse	18 -
Abbildung 8: Aufbau einer kollagen-beschichteten Flusskammer	21 -
Abbildung 9: Schematische Abbildung der LAD-Okklusion und Fotografie des OP-Aufbaus im open-chest-Verfahren.....	24 -
Abbildung 10: Fotografie des OP-Aufbaus im closed-chest-Verfahren	27 -
Abbildung 11: Zeitschema der open-chest OP-Methode mit ASS- bzw. Vehikel-Applikation.	28 -
Abbildung 12: Zeitschema der closed-chest OP-Methode mit Applikation des Depletionsantikörpers bzw. des Vehikels mit bzw. ohne ASS.	28 -
Abbildung 13: Echokardiographische Darstellung des Herzens.	30 -
Abbildung 14: EKG-Ableitung vor und nach Infarktinduktion.....	31 -
Abbildung 15: Auf Kanüle gezogenes Herz, in welchem die LAD unterstochen ist.....	32 -
Abbildung 16: Beispiel eines TTC-gefärbten Herzschnittes.....	33 -
Abbildung 17: Vollblutaggregation von RIVA-naiven Patienten verglichen mit Patienten mit chronischer RIVA-Einnahme, stimuliert mit TRAP, Collagen und ADP	40 -
Abbildung 18: Vollblutaggregation vor und nach Ersteinnahme von RIVA, stimuliert mit ADP und TRAP-6.	41 -
Abbildung 19: LTA vor und nach Ersteinnahme von RIVA, stimuliert mit ADP, Collagen und TRAP-6. ...	42 -
Abbildung 20: Thrombozytenadhäsion von RIVA-naiven und RIVA-Patienten, gemessen in der Flusskammer bei laminaem Fluss nach 3 min.	43 -
Abbildung 21: Thrombozytenadhäsion von RIVA-naiven und RIVA-Patienten, gemessen in der Flusskammer bei pulsatilem Fluss nach 5 min.	43 -
Abbildung 22: Thrombozytenadhäsion vor und nach RIVA-Ersteinnahme, gemessen in der Flusskammer bei laminaem Fluss nach 3 min.	44 -
Abbildung 23: Thrombozytenadhäsion vor und nach RIVA-Ersteinnahme, gemessen in der Flusskammer bei pulsatilem Fluss nach 5 min.	45 -
Abbildung 24: <i>In-vivo</i> Thrombusformation in der Arteria carotis communis im Laufe der Zeit, bei einer mit Vehikel- oder RIVA-behandelten Maus.	46 -
Abbildung 25: Zeit bis zur ersten Okklusion bei Vehikel- vs. RIVA-behandelten Mäusen.	46 -

Abbildung 26: Teilchenanzahl der Thrombusfragmente in Vehikel- und RIVA-behandelter Mäuse.	- 47 -
Abbildung 27: Fibrinogen auf der Oberfläche des Thrombus von Kontrollen und RIVA-behandelten Mäusen.	- 47 -
Abbildung 28: Plättchen auf der Oberfläche des Thrombus von Vehikel- und RIVA-behandelten Mäusen.	- 48 -
Abbildung 29: Vollblutaggregation mit FXa-Stimulation.	- 49 -
Abbildung 30: Plättchenaggregation in LTA mit gewaschenen Plättchen nach Stimulation mit FXa.	- 50 -
Abbildung 31: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von RIVA gemessen in der LTA mit vorinkubierten, gewaschenen Plättchen nach Stimulation mit FXa.	- 51 -
Abbildung 32: Calciumsignaltransduktion nach Stimulation mit FXa oder TRAP-6 mit und ohne Vorinkubation mit Vorapaxar.	- 52 -
Abbildung 33: P-Selektin-Expression auf Plättchen, ohne und mit Stimulation mit FXa, gemessen durch FACS-Analysen.	- 53 -
Abbildung 34: ICAM-2-Expression auf Plättchen, ohne und mit Stimulation mit FXa, gemessen durch FACS-Analysen.	- 54 -
Abbildung 35: CD40L-Expression auf Plättchen, ohne und mit Stimulation mit FXa, gemessen durch FACS -Analysen.	- 55 -
Abbildung 36: PAR-1-Dichte ohne und mit RIVA-Behandlung.	- 56 -
Abbildung 37: PAR-4-Dichte ohne und mit RIVA-Behandlung.	- 56 -
Abbildung 38: FXa stimulierte Aggregation mit LTA nach Vorinkubation mit Vehikel oder Vorapaxar. ...	- 57 -
Abbildung 39: Spaltprodukte der Interaktion von PAR-1 mit FXa und dessen Intensität im Massenspektrometer.	- 58 -
Abbildung 40: FXa- und TRAP-6 stimulierte Aggregation in der LTA nach Vorinkubation mit PI3K-, ROCK- oder PLC-Inhibitoren.	- 59 -
Abbildung 41: Prästimulation der Plättchen mit einer subaggregatorischen Dosis von FXa. pPI3K-, DAG- und IP3-Konzentration in Plättchen gemessen im ELISA.	- 60 -
Abbildung 42: Infarktgröße ASS-behandelter Mäuse neben Kontrollen ohne ASS-Behandlung. Vergleich der präischämischen Intervention mit der Intervention vor Reperfusion.	- 61 -
Abbildung 43: Ejektionsfraktion gemessen mittels TTE bei ASS-naiven und präischämisch oder vor Reperfusionsstart mit ASS-behandelten Mäusen.	- 62 -
Abbildung 44: Herzindex gemessen mittels TTE bei ASS-naiven und präischämisch oder vor Reperfusionsstart mit ASS-behandelten Mäusen.	- 63 -
Abbildung 45: Infarktgröße ASS-behandelter Mäuse, verglichen mit Kontrollen ohne ASS-Behandlung. Daneben Infarktgrößen plättchendepletierter Mäuse, verglichen mit ASS-behandelten und gleichzeitig plättchendepletierten Mäusen.	- 64 -
Abbildung 46: Plättchenanzahl in plättchendepletierten Mäusen vor (T0) sowie 3 d nach (T1) Vor-OP und 24 h nach Induktion der Ischämie	- 65 -

Abbildung 47: Blutbildanalyse im Vergleich unbehandelter und ASS-behandelter Mäuse BL (T0), nach...	66 -
Abbildung 48: Gehalt von Monozyten und deren Anteil an inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Monozytensubgruppen in % der gesamten Leukozyten 24 h post I/R.....	68 -
Abbildung 49: Gehalt der Granulozyten, B-Lymphozyten und T-Helfer-Zellen in % der gesamten Leukozyten 24 h post I/R.	69 -
Abbildung 50: Inflammatorischer Bereich des linken Ventrikels 24h post I/R bei ASS-naiven und ASS-behandelten Mausherzen durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung kenntlich gemacht.....	70 -
Abbildung 51: Makrophageneinwanderung im linken Ventrikel 24h post I/R bei ASS-naiven und ASS-behandelten Mausherzen durch MAC-2-Antikörper gefärbt.	71 -
Abbildung 52: Neutrophileneinwanderung im linken Ventrikel 24h post I/R bei ASS-naiven und ASS-behandelten Mausherzen durch Ly6G-Antikörper gefärbt.	72 -
Abbildung 53: Schematische Darstellung des Signalwegs nach Aktivierung des PAR-1 (69).....	80 -
Abbildung 54: Mechanismus der plättchenvermittelten Leukozytenrekrutierung ohne und mit ASS ...	83 -
Abbildung 55: Schematische Darstellung des optimalen Gleichgewichts von inflammatorischen	85 -
Abbildung 56: Grafische Zusammenfassung des Mechanismus von RIVA.....	88 -
Abbildung 57: Grafische Zusammenfassung der Effekte von ASS im AMI.....	88 -
Tabelle 1: AK-Liste der verwendeten Panels der humanen FACS-Analysen.....	21 -
Tabelle 2: AK-Liste der verwendeten Panels der murinen FACS-Analysen	37 -
Tabelle 3: Patientencharakteristika der rekrutierten Patienten; Angegeben in Mittelwert \pm S.D.	39 -

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Fläche
AAR	Area at Risk
ACD	Acid-Citrate-Dextrose-Lösung
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Vorhofflimmern
AK	Antikörper
AMI	akuter Myokardinfarkt
APT	antiplatelet therapy
ASA	acetylsalicylic acid
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Angiotensin
AUC	Area under the Curve
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BL	Baseline
BSA	Bovine Serum Albumin
CAD	coronary artery Disease
Con.	Kontrolle
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie
CVD	kardiovaskuläre Erkrankungen
d	Tage
DAG	Diacylglycerine
DAPT	duale Antiplättchentherapie
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOAK	Direkte orale Antikoagulantien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion

EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
ESC	European Society of Cardiology
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
Fe	Eisen
FELASA	Federation for Laboratory Animal Science Associations
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FS	Fractional shortening
FXa	Faktor Xa
GIT	Gastrointestinaltrakt
Gp	Glykoprotein
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HKL	Herzkatheterlabor
HTPR	High on-treatment platelet reactivity
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
I.E.	Internationale Einheit
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
I/R	Ischämie/Reperfusion
inf	Infarkt
IP₃	Inositoltrisphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
LAD	left anterior descending artery
LANUV NRW	Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Lsg.	Lösung
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
LV	linker Ventrikel

m	Masse
MEA	Multiplate electrode aggregometry
MeOH	Methanol
MFI	mittleren Fluoreszenzintensität
MI	myocardial infarction
min	Minuten
MoA	Maximum of Aggregation
MRT	Magnetresonanztomografie
N₂	Stickstoff
NaCl	Kochsalz
NF	Nuklear Factor
NOAK	Nicht-Vitamin K-Antagonistischen orale Antikoagulanzen
OAC	Oral anticoagulation
OAK	orale Antikoagulanzen
OP	Operation
p.o.	Per os
PAP	plättchenarmes Plasma
PAR	Protease aktivierender Rezeptor
PBS	Dulbecco's Phosphate bufferes saline
PCI	perkutane Koronarintervention
PET	Positronen-Emissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PGE-1	Prostaglandin E1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC	Phospholipase
PRP	plättchenreiches Plasma
PSGL	P-Selektin-GP-Ligand
PSLA	parasternalen Längsachse
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBC	Erythrozyten
RIVA	Rivaroxaban
ROCK	Rho-associated protein Kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute

s	Sekunden
S.D.	Standardabweichung
SAX	kurze Achse
SPECT	Single-Photonen-Emissionstomografie
SV	Schlagvolumen
SVI	Herzindex
Tab.	Tabelle
TAVI	Aortenklappenersatz/ transcatheter aortic valve implantation
TIA	transitorische ischämische Attacke
TM	Thrombozytenmedium
TRAP-6	Thrombin Receptor Activator Peptide - 6
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazolinumchlorid
TTE	transthorakale Echokardiographie
TXA	Thromboxan A ₂
U	Units
Veh.	Vehikel
VHF	Vorhofflimmern
VKA	Vitamin-K-Antagonisten
Vol	Volumen
VORA	Vorapaxar
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WBC	Leukozyten
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WP	gewaschene Plättchen
Wt	Gewicht
ZETT	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

1. Einleitung

1.1. Koronare Herzkrankheit

Mit 17,9 Millionen Opfern weltweit führten kardiovaskuläre Erkrankungen 2016 die Liste der häufigsten Todesursachen an. (1) Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist dabei die am häufigsten auftretende Erkrankung und führt nicht selten zu einem akuten Myokardinfarkt (AMI).

Ursache der KHK ist die Bildung arteriosklerotischer Plaques in den Herzkranzgefäßen, welche für die Blutversorgung des Herzmuskels zuständig sind. Das Auftreten der Plaques kann sich in einer Durchblutungsstörung des Herzmuskels manifestieren, sodass es bei den Patienten zu einem Mangel des Sauerstoffangebotes kommen kann. (2) Dies kann folglich zu einer Angina Pectoris führen. Außerdem treten oftmals Symptome, wie Atemnot, Hypotonie, Tachykardie, Schwindel, Übelkeit oder Schweißausbrüche auf, die sich im Anfangsstadium zumeist bei Überanstrengung des Herzmuskels zeigen. Zur Diagnose einer KHK stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Neben einem Ruhe-Elektrokardiogramm (EKG) sind das Belastungs-EKG, die Computertomografie (CT)-Angiografie, die Magnetresonanztomographie (MRT), die Single-Photonen-Emissionstomographie (SPECT) oder die Positronen-Emissionstomographie (PET) Diagnosemethoden, die angewendet werden können. Dabei sollte im Vorhinein jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich um ein AMI handelt. (3) Die Behandlung des chronischen Koronarsyndroms kann über drei Säulen verlaufen. Zunächst wird dem Patienten eine konservative, nicht-medikamentöse Therapie empfohlen. Dabei stehen eine Lebensstiländerung und die Reduktion der Risikofaktoren im Vordergrund. Erste Schritte hierfür sind die Steigerung der körperlichen Fitness und die Reduktion des Gewichtes. Diese werden zumeist durch eine Verbesserung der Essgewohnheiten, wie die Reduktion von cholesterin- und zuckerreichen Lebensmitteln, sowie durch den Verzicht auf Alkohol und Nikotin, erreicht. Neben den physischen Aspekten stehen auch die psychologischen Faktoren im Fokus, sodass auch Stressreduktion und die seelische Ausgeglichenheit in den aktuellen Leitlinien angesprochen werden. (3) Als zweite Säule ist die medikamentöse Therapie der stabilen KHK eine wichtige Option im Therapieverlauf. Neben Betablockern, Lipidsenkern, Diuretika und Medikamenten, die das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) betreffen, steht die Thrombozytenaggregationshemmung im Vordergrund. Letztere spielt auch eine wesentliche Rolle in der dritten Therapieoption der KHK. Nach Revaskularisation des Gefäßes durch eine

kathetergestützte, perkutane Koronarintervention (PCI) ist die Thrombozytenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure (ASS) oder einem P2Y12-Hemmer, wie Clopidogrel, obligatorisch. (3)

1.2. Akuter Myokardinfarkt

Eine häufige Folge der KHK ist das Auftreten eines AMI. Das Risiko einen AMI zu erleiden, steigt mit dem Alter und tritt bei Männern häufiger als bei Frauen auf. Neben dem Geschlecht und dem Alter, spielen auch weitere Faktoren eine große Rolle. Eine ungesunde Lebensweise mit wenig Bewegung, einer ungesunden und cholesterinreichen Ernährung, Nikotin- und Alkoholabusus sowie einer großen Stressbelastung, können das Auftreten von AMIs begünstigen. Aber auch Vorerkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Herzrhythmusstörungen, wie zum Beispiel Vorhofflimmern (VHF) und andere kardiovaskuläre Erkrankungen, begünstigen das Risiko für das Auftreten eines AMIs. (1)

Die häufigste Ursache eines AMIs ist die Unterbrechung des Blutflusses in einem oder mehreren Herzkranzgefäßen, hervorgerufen durch einen Thrombus, der das Gefäß verschließt. Daraus resultiert eine akute Hypoxie in den Kardiomyozyten. (4) In Folge einer Plaqueruptur lösen sich die Thromben, die in eines oder mehrere Herzkranzgefäße wandern, welche in Folge nicht mehr adäquat durchblutet werden können. Aufgrund des Sauerstoffmangels im Rahmen der Ischämie kommt es zu einer Aktivierung zahlreicher Entzündungsreaktionen. Dadurch werden unter anderem Adhäsionsmoleküle aus Endothelzellen freigesetzt. Insbesondere die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, aber auch weitere Abwehrmechanismen, wie zum Beispiel eine erhöhte Thrombozytenreaktivität und der Anstieg der Aktivität von Metalloproteinasen ist die Folge davon. (5) Durch die Freisetzung von Zytokinen wird weiteres Gewebe im Umkreis zerstört, sodass es zu einer vermehrten Nekrose des Myokards kommt. Dies kann schlussendlich zu einer gestörten adäquaten Pumpleistung des Herzmuskels bis hin zum Herzstillstand führen. Die Entstehung eines AMIs ist in den meisten Fällen durch das Auftreten arteriosklerotischer Plaques und der daraus folgenden Verengung des Gefäßes bedingt. Bei einer Ruptur der Plaques, wird durch Freilegen proaggregatorischer Moleküle, wie zum Beispiel Kollagen, eine Aktivierung der Thrombozyten ausgelöst. Durch Adhäsion von Plättchen an das Endothel der Gefäße, sowie durch Aggregation mit weiteren Blutplättchen wird die primäre Hämostase sofort in Gang gesetzt. (6) Durch die Bildung des Thrombus ist jedoch die Gefahr einer Verstopfung des bereits verengten Gefäßes sehr hoch, sodass das Auftreten eines AMIs begünstigt wird. (4) Die schnellstmögliche Reperfusion mittels einer kathetergestützten, perkutanen

Koronarintervention (PCI) ist für ein gutes *Outcome* essentiell. (7, 8) In den meisten Fällen erfolgt dies mithilfe eines Stents. Dabei drückt der bekannte Ausdruck „*Time is muscle!*“ die Bedeutung der Zeit am besten aus. Auch die aktuellen Therapieleitlinien eines AMIs geben hier definierte Zeitfenster vor. Nach Eintreffen in einer Klinik mit einem Herzkatheterlabor (HKL), soll innerhalb der ersten 90 min nach erfolgter Diagnose mittels eines EKGs eine PCI erfolgen. Diese Zeit kann auf 120 min erweitert werden, wenn dann das Erreichen eines HKL ermöglicht werden kann. Wenn die Möglichkeit hierzu nicht besteht, muss eine medikamentöse Fibrinolyse eingeleitet werden. In jedem Fall ist eine schnellstmögliche Antiplättchentherapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel, notwendig. Um einen Wiederverschluss der Gefäße zu vermeiden, ist nach erfolgter Revaskularisation eine lebenslange medikamentöse Plättchenhemmung als Sekundärprophylaxe obligatorisch. (9)

1.3. Vorhofflimmern

Unter allen Herzrhythmusstörungen ist die am häufigsten auftretende Arrhythmie das VHF. (10-12) Mit rund 1,8 Millionen Erkrankten, ist bei rund 2,2 % der deutschen Bevölkerung das Leiden bekannt. Die Dunkelziffer wird jedoch weit höher geschätzt. Da die Symptome oftmals kurz auftreten und bald wieder verebben, werden sie von den Betroffenen selten beachtet oder für wenig bedrohlich wahrgenommen. Häufig verläuft diese Art von Herzrhythmusstörung auch ohne bemerkbare Symptome. Erkannt werden diese Fälle meist erst durch das Auftreten eines Schlaganfalls oder einer Thrombose. Die Risikofaktoren für VHF entsprechen zu großen Teilen denen eines AMIs. Auch hier steigt mit dem Alter und Vorerkrankungen wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus oder einer Herzinsuffizienz das Risiko an. Obwohl das alleinige Auftreten von VHF akut keinen lebensbedrohlichen Zustand darstellt, haben Patienten, die an VHF leiden, ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Schlaganfalls oder thrombotischer Ereignisse. (12)

VHF ist eine elektrophysiologische Störung des Herzens. Eine diffuse und gestörte Reizweiterleitung in den Vorhöfen führt zu einer gestörten Kontraktion der Vorhofmuskulatur, sodass die Erkrankten unter spürbarem Herzklopfen leiden. (11) Besonders im Bereich der Herzohren ist dabei die Fließgeschwindigkeit des Blutes nur noch sehr gering. (12) Hierdurch kann es leicht zur Bildung von Thromben kommen, welche in den Blutkreislauf geraten und zu ischämischen Ereignissen führen können. Daher ist es notwendig Patienten, die an VHF leiden, schnell zu diagnostizieren und zu therapieren. Die Behandlung von VHF baut auf zwei Therapiesäulen auf. Neben der Rhythmus- bzw. Frequenzkontrolle,

spielt die Antikoagulationstherapie eine wesentliche Rolle in der Behandlung von Patienten mit VHF. (10, 12)

Schwieriger gestaltet sich jedoch die Therapie von KHK Patienten, die zusätzlich an VHF leiden. Dabei muss laut den aktuellen Leitlinien unterschieden werden, ob der Patient bereits eine PCI erhalten hat oder nicht. Bei Patienten mit einer stabilen KHK und ohne erfolgter PCI ist eine Monotherapie mit einem Antikoagulans ausreichend. (3) Ein besonderes Augenmerk sollte jedoch auf die antithrombotische Therapie von Patienten mit VHF nach einer PCI gelegt werden. Aufgrund des erhöhten Risikos für Schlaganfälle ist eine adäquate Antikoagulationstherapie ebenso notwendig, wie eine effiziente Antiplättchentherapie zur Reduktion des Thromboserisikos in Folge der PCI.

1.4. Antithrombotische Therapie

Die antithrombotische Therapie spielt im Rahmen der Präventionstherapie eine essentielle Rolle für Millionen von Patienten. Dabei wird zwischen zwei Gruppen, den Antikoagulanzen und den Thrombozytenaggregationshemmern, unterschieden. Antikoagulanzen verhindern dabei die Blutgerinnung durch das Hemmen von Gerinnungsfaktoren der Gerinnungskaskade und dienen der Primärprävention gegen Schlaganfälle bei Patienten mit VHF. Auch hier kann zwischen zwei Gruppen differenziert werden. Die parenteral zu applizierenden Substanzen, wie die Heparine, sowie die oralen Antikoagulanzen. Im Gegensatz dazu vermindern Thrombozytenaggregationshemmer die Funktionalität von Blutplättchen. In den meisten Fällen werden sie in der Sekundärprävention zur Vorbeugung eines weiteren AMIs verwendet. Sowohl der Cyclooxygenase-(COX)-Hemmer ASS, als auch die verfügbaren P2Y12-Hemmer Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor oder Cangrelor, kommen in der Antiplättchentherapie zum Einsatz und können als Monotherapie oder in Kombination angewendet werden. (6)

Innerhalb der ersten zwölf Monate nach einem AMI und der PCI, ist die Therapie bestimmt durch eine duale Plättchenhemmung (DAPT). Diese besteht zumeist aus ASS und einem P2Y12-Hemmer. Bei Patienten ohne Vorhofflimmern wird diese Kombination zwölf Monate fortgeführt. (3, 13)

Bei Patienten mit VHF ist nach AMI zusätzlich zu der DAPT ein orales Antikoagulans (OAK) notwendig, sodass eine adäquate Antithrombose gewährleistet ist. (10, 14). Die Leitlinien geben hierbei eine vierwöchige Tripeltherapie mit ASS, P2Y12-Hemmer und OAK, gefolgt von weiteren elf Monaten einer Dualtherapie mit P2Y12-Hemmer und OAK und anschließender OAK Monotherapie vor. (13) Bei Patienten mit einem hohen Risiko an

ischämischen Ereignissen, kann mit der Tripeltherapie, auch über den ersten Monat hinaus, weiter therapiert werden (Abb.1). (14)

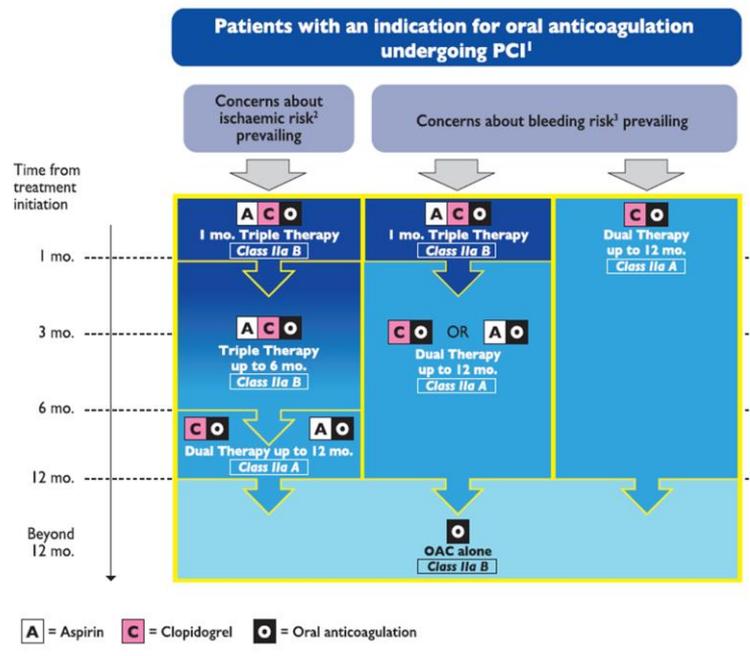


Abbildung 1: Therapieschema für die Zeit nach Myokardinfarkt nach Valgimigli et al.

ESC Empfehlungen der Antithrombotischen Medikation nach Risikogruppen (14)

1.4.1. Orale Antikoagulation

Als OAKs stehen die Vitamin K-Antagonisten (VKA), sowie die Nicht-Vitamin-K-antagonistischen oralen Antikoagulanzen (NOAK) zur Verfügung. (15, 16)

Aufgrund ihres besseren Nutzen-Risiko-Verhältnisses, hinsichtlich der Vermeidung embolischer Ereignisse und der Anzahl von Blutungen, sind NOAKs den VKA überlegen und Mittel der Wahl für die Prävention von Schlaganfällen bei Patienten mit VHF. (17-20) Bereits 2012 wurde von der *European Society of Cardiology* (ESC) die Empfehlung ausgesprochen NOAKs in der Antikoagulationstherapie von Patienten mit VHF zu bevorzugen. (21) Auch in den aktuellen Leitlinien der ESC von 2019 wird die Anwendung der NOAKs anstelle der VKA als Standardtherapie festgelegt. (3)

1.4.1.1. Vitamin K-Antagonisten

Aus der Arzneimittelklasse der VKA finden hauptsächlich drei Substanzen in der Therapie Verwendung. Das vorrangig in den USA gebräuchliche Warfarin und die in Europa eingesetzten Wirkstoffe Phenprocoumon, welches unter dem Handelsname Marcumar bekannt geworden ist, und Acenocoumarol (Sintrom). Letzteres ist jedoch auf dem deutschen

Markt nicht erhältlich. (22, 23) Die unter dem Oberbegriff „Cumarin-Derivate“ bekannten Verbindungen, greifen indirekt in die Gerinnungskaskade ein, indem sie die Carboxylierung und somit die Synthese der Faktoren II, VII, IX und X inhibieren. (23) Vitamin K ist ein wichtiger Kofaktor in der Synthese der Gerinnungsfaktoren und spielt so eine wichtige Rolle in der sekundären Hämostase. Da es nicht eigenständig im Körper gebildet werden kann, erfolgt die Aufnahme von Vitamin K beim Menschen durch die Nahrung. Besonders reich an Vitamin K ist grünes Gemüse, wie zum Beispiel Grünkohl, Blattsalate oder Brokkoli. (24)

Oral eingenommen, werden die VKA als Racemat nahezu komplett aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT) aufgenommen, wobei die Wirkstärke der beiden Enantiomere unterschiedlich ist. Auch der Metabolismus unterliegt verschiedenen Enzymen. Dabei spielen jedoch CYP 450 Enzyme eine wesentliche Rolle im Abbau der Derivate. Gerade dieser Faktor stellt die Therapie mit VKA unter schwere Bedingungen und zwingt Ärzte und Patienten zu engmaschigen Kontrollen. Sowohl interindividuelle Polymorphismen der CYP 450, als auch Interaktionen mit Lebensmitteln oder anderen Arzneimitteln können zu Veränderungen des Plasmaspiegels führen und dadurch enorme Schwankungen in der Wirksamkeit der Blutgerinnungshemmung herbeiführen. Aufgrund der äußerst geringen therapeutischen Breite ist das Risiko für unerwünschte Blutungen erhöht. (25) Aber auch der gegenteilige Effekt einer nicht wirksamen Gerinnungshemmung ist stark abhängig von einem sehr feinjustierten und empfindlichen Gleichgewicht. Daher ist sowohl für die Dosisfindung als auch für den Erhalt der optimalen Dosierung eine regelmäßige Blutkontrolle und die Ermittlung des *International Normalized Ratio* (INR)-Wertes des Patienten notwendig. (26)

1.4.1.2. Neue orale Antikoagulanzen

Im Gegensatz zu den VKA greifen NOAKs durch direkte Hemmung von Gerinnungsfaktoren in die Gerinnungskaskade ein, weshalb sie auch unter dem Synonym direkte orale Antikoagulanzen (DOAK) bekannt sind. Aufgrund ihres *Targets* können sie in zwei Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet zwischen Faktor IIa- und Faktor Xa-Hemmern. (16) Durch ihre Wirkungsweise und ihre pharmakologischen Eigenschaften zeigen diese Substanzen einige Vorteile gegenüber den VKA. Besonders das verminderte Blutungsrisiko einer NOAK-Therapie gegenüber einer Warfarin- oder Phenprocoumon-Therapie ist hervorzuheben. (16) Außerdem stellt die Dosisfindung und die erleichterte Einstellung eines stabilen Wirkspiegels, mit geringeren Wechselwirkungen, einen Vorteil von NOAKs dar. Aufgrund dessen sollen laut den aktuellen Leitlinien der ESC die NOAKs gegenüber den

VKA bevorzugt werden (3) Es wurde jedoch noch nicht geklärt, welche der verfügbaren NOAKs innerhalb der Substanzklasse überlegen sind.

1.4.1.2.1. Faktor IIa-Inhibitoren

Dabigatranetexilat, der einzige orale Faktor IIa-Hemmer ist seit 2008 in Europa unter dem Handelsnamen PRADAXA® zugelassen. Der direkte Thrombinhemmer erhielt im August 2011 die Erweiterung der Zulassung als Antikoagulans bei VHF und ist in den Dosierungen 110 mg und 150 mg erhältlich. Nach Einnahme des Prodrugs Dabigatranetexilat wird das Molekül in der Leber und im Plasma durch Hydrolyse umgewandelt und kann so Thrombin reversibel hemmen. Die Bioverfügbarkeit ist mit etwa 6,5 % zwar sehr gering, jedoch wird die maximale Plasmakonzentration nach etwa 30 min bis 2 h schnell erreicht. (6)

Im Gegensatz zu den restlichen NOAKs war für Dabigatran sehr früh ein Antidot verfügbar, welches alternativ zu einer Substitution der Gerinnungsfaktoren verabreicht werden kann. Mit dem Mittel Idarucizumab (Praxbind®) wurde im November 2015 ein humanisiertes Antikörperfragment zur Verfügung gestellt, welches intravenös appliziert, durch seine hohe Affinität zu Dabigatran, diesen abfängt und die Thrombinhemmung neutralisiert. (27)

1.4.1.2.2. Faktor Xa-Inhibitoren

In der Gruppe der Faktor Xa-Inhibitoren sind drei verschiedene Medikamente zugelassen. Rivaroxaban (Xarelto®) (RIVA) wurde 2008 auf den Markt gebracht und erlangte, als erste FXa-hemmende Substanz, die Zulassung des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). (28) 2011 erhielt, Apixaban (Eliquis®) die Zulassung der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA). (29) Im Juni 2015 ist der dritte FXa-Hemmer Edoxaban unter dem Handelsnamen Lixiana® eingeführt worden. (30)

Obwohl die FXa-Hemmer weniger Vorfälle hinsichtlich schwerer Blutungen im Vergleich zu VKA zeigten, waren Ärzte und Patienten lange misstrauisch gegenüber den relativ neuen Arzneimitteln, da lange kein Antidot zur Verfügung stand. Mit der Zulassung des Antidots für RIVA und Apixaban im Jahr 2019 wurde jedoch auch dieser Nachteil der FXa-Inhibitoren behoben. Mit Andexanet alfa (Ondexxya®) wurde das erste Mittel auf den Markt gebracht, welches bei schweren Blutungsereignissen von Patienten mit FXa-Antikoagulation appliziert werden kann und somit eine Gerinnung des Blutes wieder gewährleistet. Dabei stellt Andexanet alfa ein FXa-Analogon dar, sodass die FXa-Hemmer an diese binden und dadurch nicht mehr den natürlichen Faktor hemmen können. Aufgrund dessen ist die Funktionsfähigkeit des aktivierten FX wiederhergestellt. (31)

So kann FXa, zusammen mit FVa, wieder zur Bildung von Thrombin beitragen und die Gerinnungsfähigkeit kann wiederhergestellt werden.

1.4.1.2.3. Faktor IIa-Inhibitoren versus Faktor Xa-Inhibitoren

Die plasmatische Antikoagulation kann durch die zwei pharmakologisch unterschiedlichen Subgruppen der NOAKs, den FIIa- oder den FXa-Inhibitoren, und deren Eingreifen an den verschiedenen Punkten der Gerinnungskaskade, gehemmt werden. Als wesentliches Protein spielt dabei Thrombin eine große Rolle. Sowohl die direkte Hemmung mit Dabigatran, als auch die Hemmung von FXa und die daraus resultierenden Inhibition der Gerinnungskaskade, hat zur Folge, dass dem System weniger Thrombin zur Verfügung steht. (32) Auch auf zellulärer Ebene führt es als starker Stimulus zu einer vermehrten Aktivierung der Thrombozyten, sodass sich die Hemmung von Thrombin auch positiv auf die Thrombozytenfunktion auswirken könnte. (33, 34) Die direkte Hemmung von Thrombin durch Dabigatran zeigte jedoch gegenteilige Effekte. Bereits in der RE-LY Studie wurde ein Zusammenhang zwischen Dabigatran und einem erhöhten AMI-Risiko herausgestellt. (16, 35, 36) Diese Beobachtung wurde auch durch weitere Studien bestätigt und im Zuge einer Meta-Analyse von Artang et al. publiziert. (37) Ein möglicher Mechanismus für diesen unerwünschten Effekt wurde von Polzin et al. 2018 veröffentlicht. Hier wurde gezeigt, dass die Plättchen von Dabigatran-behandelten Patienten eine signifikante Erhöhung der Thrombozytenaggregation aufwiesen. Dies führten sie auf ein erhöhtes Expressieren der Protease-aktivierenden Rezeptoren (PAR) 1 und 4 zurück (Abb.2). (16, 35, 38)

Auch in dem Review 2018 von Polzin et al., das die Ergebnisse von sechs klinischen Studien hinsichtlich der Risiken für AMIs der angewandten NOAKs vergleicht, wurde dieser Nachteil des FIIa- Hemmers klar herausgestellt. Eingebunden wurden ausschließlich Studien, in welchen die jeweiligen Höchstdosen verabreicht wurden. Dabei war zu sehen, dass in Studien, welche FIIa-Hemmer mit VKA-Inhibitoren verglichen, die FIIa-inhibierten Patienten ein erhöhtes Auftreten von AMIs aufwiesen. Im Gegensatz dazu stellte sich heraus, dass durch die Einnahme von FXa-Hemmern das Risiko eines AMIs im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar sank (Abb.3). (16, 18-20, 35)

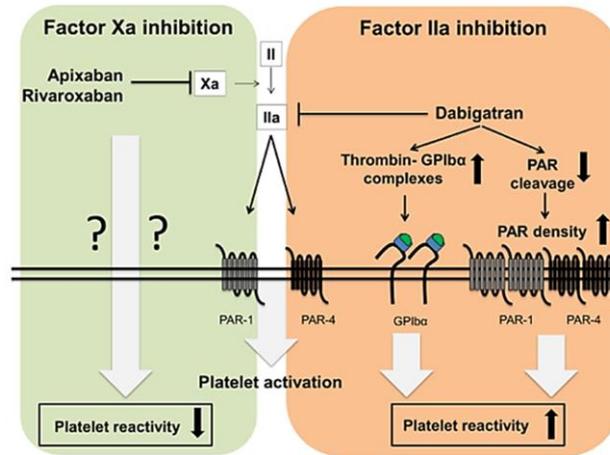


Abbildung 2: Wirkmechanismus von Dabigatran schematisch dargestellt von Polzin et al. 2018 (16, Fig.1)

Durch Dabigatran wird FIIa direkt gehemmt und steht im Gerinnungsgeschehen nicht mehr zur Verfügung. Das Fehlen von FIIa bedingt eine Erhöhung der PAR-1 und PAR-4-Dichte, was zu einer Erhöhung der Plättchenreaktivität führt. (16, 35, 38)

Wie sich in den Rocket-AF-, Aristotle- und Engage-AF-Studien zeigte, war bei Patienten mit einer FXa-Hemmer-Therapie keine Erhöhung oder teilweise sogar eine Abnahme des AMI Risikos zu beobachten (Abb.3). (18-20, 22) Ob dies mit einer Veränderung der Plättchenreaktivität in Zusammenhang steht und ob FXa-Hemmer, im speziellen RIVA, eine Schnittstelle zwischen zellulärer und plasmatischer Gerinnung aufweisen, soll in dieser Arbeit herausgestellt werden.

Table 1
Rate of myocardial infarction (MI) in NOAC landmark trials.

Study	Myocardial infarction no. (%/year)			Comparison (HR, CI95%, p-value)		
RE-LY (Connolly et al., 2009)	Dabigatran, 110 mg bd (N = 6015) 86 (0.72)	Dabigatran, 150 mg b.i.d. (N = 6076) 89 (0.74)	Warfarin (N = 6022) 63 (0.53)	Dabigatran, 110 mg vs. Warfarin 1.35 (0.98-1.87), 0.07	Dabigatran, 150 mg vs. Warfarin 1.38 (1.00-1.91), 0.048	Dabigatran, 110 mg vs. Dabigatran, 150 mg 1.02 (0.76-1.38), 0.88
Rocket-AF (Patel et al., 2011)	Rivaroxaban, 20 mg od (N = 7131) 101 (0.91)		Warfarin (N = 7133) 126 (1.12)	Rivaroxaban 20 mg o.d. vs. Warfarin 0.81 (0.63-1.06), 0.121		
Aristotle (Granger et al., 2011)	Apixaban, 5 mg bd (N = 9120) 90 (0.53)		Warfarin (N = 9081) 102 (0.61)	Apixaban 5 mg b.i.d. vs. Warfarin 0.88 (0.66-1.17), 0.37		
Engage-AF (Giugliano et al., 2013)	Edoxaban, 30 mg od (N = 7034) 169 (0.89)	Edoxaban, 60 mg od (N = 7035) 133 (0.70)	Warfarin (N = 7036) 141 (0.75)	Edoxaban 30 mg o.d. vs. Warfarin 1.19 (0.95-1.49), 0.13		
Pioneer-AF (Gibson et al., 2016)	Group 1* (N = 709) 19 (3.0)	Group 2* (N = 709) 17 (2.7)	Group 3* (N = 706) 21 (3.3)	Group 1 vs. Group 3 0.86 (0.46-1.59) 0.62		
Re-Dual (Cannon et al., 2017)	110 mg Dual Therapy Group (N = 981) 44 (4.5)	Corresponding Triple Therapy Group (N = 981) 29 (3.0)	150 mg Dual Therapy Group (N = 763) 26 (3.4)	Corresponding Triple Therapy Group (N = 764) 22 (2.9)		
				110 mg Dual Therapy Group vs. Triple Therapy Group 1.51 (0.94-2.41) 0.09		
				150 mg Dual Therapy Group vs. Triple Therapy Group 1.16 (0.66-2.04) 0.61		

* Group 1: Rivaroxaban 15 mg o.d. (10 mg o.d. in case of GFR 30-50 ml/min) + clopidogrel 75 mg o.d. (or ticagrelor 90 mg b.i.d. or prasugrel 10 mg o.d. in ≤15% of participants) for 12 months.
* Group 2: Rivaroxaban 2.5 mg b.i.d. + aspirin (75 to 100 mg o.d.) and clopidogrel 75 mg o.d. (or ticagrelor 90 mg b.i.d. or prasugrel 10 mg o.d. in ≤15% of participants) for 1, 6, or 12 months. Participants with treatment for 1 or 6 months received rivaroxaban 15 mg o.d. afterwards (or 10 mg o.d. if they had moderate renal impairment) + aspirin (75 to 100 mg o.d.) for the remainder of the 12-month treatment period.
* Group 3: Warfarin o.d. (target INR 2-3) + aspirin (75 to 100 mg o.d.) and clopidogrel 75 mg o.d. (or ticagrelor 90 mg b.i.d. or prasugrel 10 mg o.d. in ≤15% of participants) for 1, 6, or 12 months. Participants with treatment for 1 or 6 months received warfarin o.d. afterwards (target INR 2-3) + aspirin (75 to 100 mg o.d.) for the remainder of the 12-month treatment period.

Abbildung 3: Vergleich für das Auftreten eines Myokardinfarktes anhand von verschiedenen Studien durch Polzin et al. 2018

Vergleich der Studien RE-LY, Rocket-AF, Aristotle, Engage-AF, Pioneer-AF und Re-Dual bezüglich der Rate auftretender AMI in den einzelnen Gruppen. (16)

1.4.2. Antiplättchentherapie

1.4.2.1. Clopidogrel

Zur Hemmung des P2Y₁₂ Rezeptors wird in der Praxis zumeist Clopidogrel angewendet. Durch die Inhibition des P2Y₁₂ Rezeptors wird die ADP abhängige Aktivierung der Blutplättchen verhindert, sodass die zelluläre Gerinnung gehemmt wird. Als Prodrug verläuft diese Hemmung jedoch nicht über das Molekül Clopidogrel, sondern muss zunächst hepatisch durch das CYP2P19 Enzym oxidiert und hydrolysiert werden. So kann das entstandene Molekül den G-Protein gekoppelten Rezeptor irreversibel hemmen, sodass die Wirkung bis zu 7 d anhält. Aufgrund des Mitwirkens des Cytochrom P450-Systems zeigt Clopidogrel jedoch ein großes Potenzial für Neben- und Wechselwirkungen wodurch eine Limitation seiner Wirkung gegeben ist. Gemäß den aktuellen Leitlinien wird Clopidogrel daher bei Patienten mit einer stabilen KHK nur bei ASS-Unverträglichkeit oder Kontraindikation von ASS angewendet. (6)

1.4.2.2. ASS

Obwohl schon seit 1899 als Analgetikum zugelassen, dauerte es noch etwa weitere 100 Jahre bis ASS in ihrer wohl wichtigsten Funktion angewendet werden durfte. Bereits im Jahr 1977 schaffte es Aspirin in die Liste der unentbehrlichsten Arzneimittel der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Im selben Jahr erschien außerdem eine Studie, welche den positiven Effekt von Aspirin auf das Schlaganfallrisiko nachwies und dem Medikament den Weg ebnete. Der Vorteil von ASS hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit einer stabilen Angina Pectoris zeigte sich schließlich in einer 1983 veröffentlichten Studie. Es sollten noch weitere zehn Jahre vergehen, bis das niedrig dosierte ASS erstmals 1993 unter dem Namen Aspirin™ Protect für die Sekundärprophylaxe von kardiovaskulären Ereignissen zugelassen wurde. (39) Heute zählt der Wirkstoff ASS als einer der wichtigsten Arzneimittel sowohl in der Präventions-, als auch in der Akuttherapie für thrombotische Ereignisse. Als Goldstandard der Plättchenhemmung ist ASS nicht mehr aus dem Klinikalltag und dem Therapieplan von Millionen von Patienten wegzudenken. (40)

1.4.2.2.1. Akuttherapie

Im Klinikalltag ist das Verabreichen einer 300-500 mg Bolusgabe von ASS im AMI eine wichtige Therapieoption der Akutversorgung. Intravenös verabreicht, tritt die thrombozytenaggregationshemmende Eigenschaft sofort ein, sodass die Bildung von weiteren Thromben, während des Reperfusionsvorgangs vermindert werden kann.

Außerdem kann ASS akut in einer Dosierung von 500-1000 mg als Analgetikum, Antipyretikum und Antiphlogistikum verwendet werden. (6)

1.4.2.2.2. Prävention

Als Tablette vom Patienten eingenommen hemmt ASS die Thrombozytenaggregation irreversibel und kann dadurch zur Prävention für kardiovaskuläre Ereignisse angewendet werden. Dabei wird der Arzneistoff direkt über den GIT aufgenommen und überträgt seine Acetyl-Gruppe irreversibel an ein Aminosäurerest (Serin-530) der COX in Thrombozyten. (41) In niedriger Dosierung ist insbesondere die Hemmung der COX-1 betroffen, was auf die etwa 150 bis 200-fach stärkere Affinität von ASS auf diesen Subtypen zurückzuführen ist. (42) COX-1 ist ein wichtiges Enzym, sowohl für die Bildung von Prostaglandinen, die für die Schmerzweiterleitungen und Entzündungsreaktionen verantwortlich sind, als auch für die Expression des Thromboxan A₂ (TXA), das für die Aktivierung der Plättchen und der darauffolgenden Aggregation zuständig ist. (42) Durch die irreversible Inaktivierung der COX-1 mit ASS wird folglich weniger TXA gebildet. Da reife Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, ist es den Zellen nicht mehr möglich das Defizit an TXA auszugleichen, sodass der Effekt bis zum Absterben der gehemmten Thrombozyten und der Neubildung frischer Zellen gewährleistet ist. Dadurch stellt die Einnahme von niedrigdosiertem ASS, trotz ihrer kurzen Halbwertszeit von ca. 15 min, eines der wichtigsten Therapiemöglichkeiten in der Prophylaxe für thrombotische Ereignisse dar (Abb.4). (6)

Essentiell ist dabei die Überprüfung der adäquaten Hemmung der Thrombozytenfunktion in der Präventionstherapie mithilfe von Thrombozytenfunktionstests. In einer klinischen Studie zeigten Polzin et al., dass bei 18 % der ASS-therapierten Patienten, die einen Aortenklappenersatz (TAVI) erhielten, trotz Therapie keine effiziente Aggregationshemmung gegeben war. (43-46) Dieser Effekt, welcher die Bezeichnung „*high on-treatment platelet reactivity*“ (HTPR) erhielt, kann auf verschiedenste Weisen entstehen. Eine der wohl am meisten diskutierten Begründungen ist, dass die These - „*One dose fits all!*“ – nicht richtig ist. Wie Rothwell et al. 2018 zeigten, konnte gerade bei Patienten über 70 kg nicht immer eine adäquate Hemmung der Thrombozytenaggregation mit 100 mg ASS nachgewiesen werden. (47) Aber auch bei Patienten mit Begleiterkrankungen, wie Diabetes mellitus oder einer chronischen Nierenerkrankung, ist oftmals keine vollständige Aggregationshemmung gewährleistet, sodass eine Dosisanpassung empfohlen wird. Zusätzlich können auch Interaktionen mit weiteren Arzneimitteln die Wirksamkeit von ASS herabsetzen. (48)

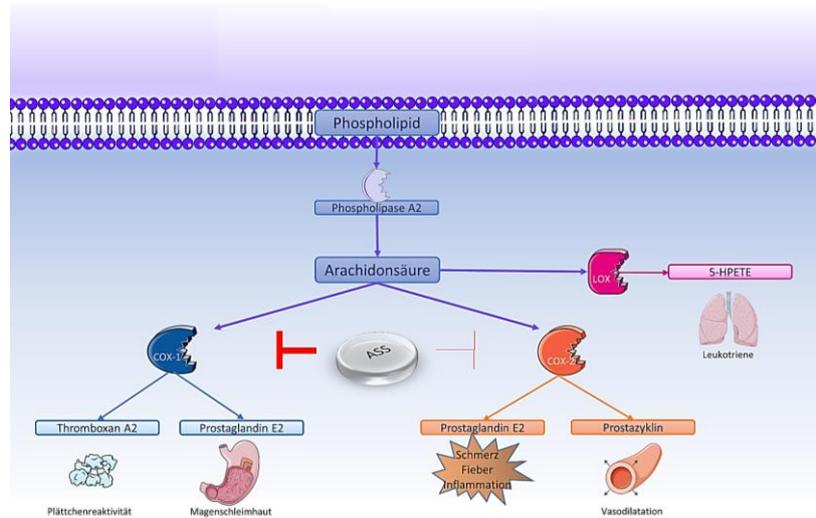


Abbildung 4: Wirkmechanismus von ASS

Die Affinität von ASS zur COX-1 ist um das 150 bis 200-fache höher als diese zur COX-2. Bei niedrig dosiertem ASS erfolgt eine relevante Hemmung somit nur an COX-1.

1.4.2.2.1. Primärprophylaxe

Als Mittel der Wahl für die Sekundärprophylaxe wurden im Lauf der Zeit immer wieder Studien durchgeführt, welche die Wirksamkeit von ASS zur Primärprophylaxe untersuchen sollten. Diese zeigten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Die aktuellsten Untersuchungen zeigten, dass bei der Primärprävention zwischen den Patienten und deren Risikofaktoren individuell entschieden werden sollte. Zu den drei größten Studien der letzten Jahre zu diesem Thema gehörten die ASCEND-, die ARRIVE- und die ASPREE-Studie. (49-54) In der ASCEND-Studie wurden jeweils 7740 Diabetes Patienten ohne kardiovaskuläre Vorerkrankung mit ASS oder einem Placebo therapiert. Dabei waren in der ASS-therapierten Gruppe signifikant weniger Herzinfarkte, Schlaganfälle, transitorisch ischämische Attacken (TIA) oder vaskulär bedingte Tode zu beobachten. Zusätzlich wurden jedoch auch erhöhte Raten an schweren Blutungen beobachtet, sodass das Nutzen-Risiko-Verhältnis für eine primärpräventive Therapie mit ASS stark abgewogen werden sollte. (49, 50) In der ARRIVE-Studie wurde der Vorteil von ASS bei Patienten mit vaskulären Risikofaktoren, wie Hypertonie oder Hypercholesterinämie, untersucht. Hier waren keine Unterschiede hinsichtlich der Prophylaxewirkung von ASS erkennbar. Lediglich die Zahlen für GI-Blutungen schlugen sich negativ auf die Seite der ASS-Gruppe nieder. (49, 51) Die ASPREE-Studie verglich die Wirkung von ASS hinsichtlich einer Primärprophylaxe bei Personen mit einem Alter über 65 Jahren bzw. über 70 Jahren. Auch hier gab es nur signifikante

Unterschiede in der Anzahl von schweren Blutungen, welche sich zum Nachteil von ASS auswirkten. (49, 52-54) So kann zusammengefasst werden, dass eine Primärprävention lediglich bei Diabetespatienten sinnvoll erscheint, jedoch aufgrund des erhöhten Risikos für starke Blutungen kritisch abgewogen werden muss. Eine generelle Präventionstherapie zum Schutz vor thrombotischen Ereignissen bei Patienten ohne Risikofaktoren erscheint bisher aufgrund des erhöhten Risikos für GI-Blutungen als nicht sinnvoll. Auch wenn ein primärpräventiver Effekt von ASS zur Prophylaxe von AMIs, mit Ausnahme von Diabetespatienten, nicht gezeigt werden konnte, ist jedoch bisher noch nicht bekannt, ob durch eine präventive ASS-Gabe der Verlauf sowie der *Outcome* bei Auftreten eines AMIs verändert werden kann.

1.4.2.2.2. Sekundärprophylaxe

Seit rund 30 Jahren besitzt ASS die Zulassung als Arzneimittel zur Sekundärprophylaxe bei kardiovaskulären Ereignissen und ischämischen Schlaganfällen. (39) Mit einer Tagesdosis von 100 mg senkt ASS das Risiko für weitere thrombotische Ereignisse. (3) Als Thrombozytenaggregationshemmer sehr wirksam, hat ASS allerdings auch gerade wegen seines Mechanismus einen großen Nachteil. Das Blutungsrisiko steigt mit der Einnahme des COX-Hemmers signifikant an. Da ASS zusätzlich zum erhöhten Blutungsrisiko eine negative Wirkung auf die Magenschleimhaut zeigt, entstehen hier vermehrt Blutungen. Diese können jedoch mit einer adäquaten Protonenpumpeninhibition reduziert werden. (55) Besonders bei Patienten mit VHF, die nach einer PCI eine Toppeltherapie aus DAPT und einem Antikoagulans erhalten, steigt das Blutungsrisiko an, sodass diese daher nach kurzer Zeit auf eine Dualtherapie mit einem Plättchenhemmer und OAK eingestellt werden sollten. (3) Empfohlen wird dabei die Kombination von Clopidogrel und OAK. Dies konnte in großen multizentrisch, randomisierten Studien, welche Tripeltherapien mit Dualtherapien verglichen, herausgestellt werden. Bereits 2013 konnte in der WOEST-Studie gezeigt werden, dass eine Dualtherapie mit einem OAK und einem P2Y12-Inhibitor, das Blutungsrisiko, im Vergleich zu einer Tripeltherapie mit OAK, P2Y12-Inhibitor und ASS, senken konnte. Gleichzeitig gab es keine signifikanten Unterschiede für das Auftreten von ischämischen Ereignissen (56). Auch in nachfolgenden Studien, wie der PIONEER AF-PCI-, (57) der RE-DUAL PCI-, (58, 59) der ENTRUST-PCI- (60) und der AUGUSTUS-Studie (61, 62), wurden Tripeltherapien mit Dualtherapien mit verschiedenen OAKs und P2Y12-Inhibitor verglichen, wobei die Autoren zu vergleichbaren Ergebnissen wie in der WOEST-Studie kamen. Es stellte sich heraus, dass sich das Risiko eines ischämischen Ereignisses in der Dualtherapie zu dem einer

Tripeltherapie mit ASS nicht veränderte, die Blutungsrate dabei jedoch signifikant verringert war. Daher wird laut ESC empfohlen, ASS nach 4 Wochen abzusetzen und die Dualtherapie mit OAK und Clopidogrel weiterzuführen. Nach weiteren 11 Monaten kann dies sogar auf eine Monotherapie mit einem OAK umgestellt werden. (3) Dabei kann auf eine Plättchenhemmung vollends verzichtet werden.

Da in den erwähnten Studien jedoch lediglich die Kombination für die Dualtherapie mit Clopidogrel und OAK geprüft wurde ist nicht klar, ob ASS ebensolche Ergebnisse aufweisen würde. Zusätzlich ist die Wirksamkeit von Clopidogrel oftmals eingeschränkt, sodass die Empfehlung für Clopidogrel nicht eindeutig geklärt ist.

Obwohl also der Verzicht von ASS auf das Risiko eines erneuten AMIs wohl keine Auswirkung zeigen konnte, weiß man jedoch bisher noch nicht, ob das Wirkungsspektrum von ASS noch weitere Effekte aufzeigt. Gerade aufgrund seiner zusätzlichen, antiinflammatorischen Eigenschaften ist ein Effekt auf den Verlauf und den *Outcome* eines AMIs denkbar. Inflammationen spielen nicht nur im akuten Infarktgeschehen eine wesentliche Rolle, sondern haben auch einen essentiellen Beitrag in der Heilungsphase des Herzmuskels nach einem Infarkt. Welchen Einfluss dabei ASS aufweist und wie die Hemmung der Blutplättchen in diesem Prozess mitwirken muss noch geklärt werden.

2.2. ASS verbessert das kardiale *Outcome* nach AMI im Mausmodell

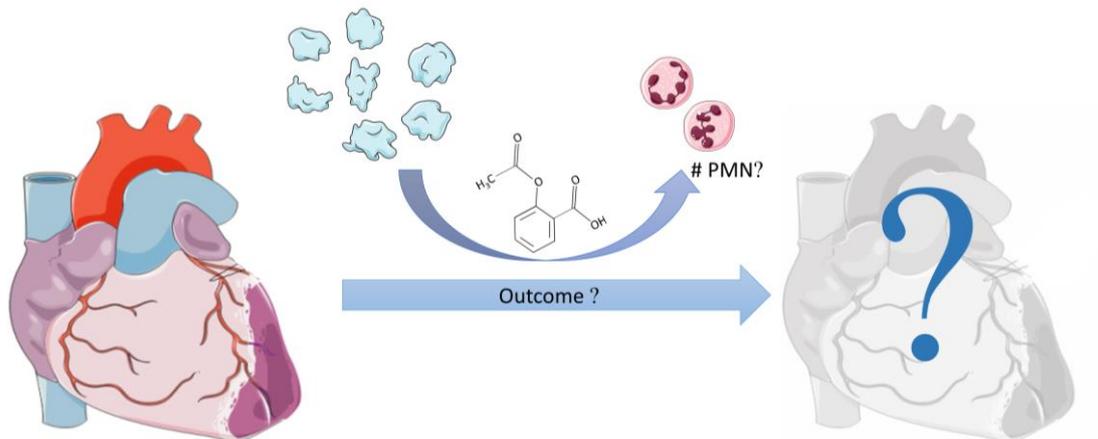


Abbildung 6: Grafische Zusammenfassung ASS

Zusätzlich soll geklärt werden, wie sich ASS im AMI auf den Infarkt und das kardiale *Outcome* auswirkt. Außerdem ist die Fragestellung des Anwendungszeitpunktes zu klären. Hat die Primärprophylaxe vor Ischämie einen anderen Effekt, als das *Loading* mit ASS unmittelbar vor Reperfusionbeginn, so wie es im Klinikalltag durchgeführt wird? Ein weiterer wichtiger Punkt, der untersucht werden soll, ist die Rolle der Thrombozyten für die herausgefundenen Effekte. Daher sollen hier folgende drei Aspekte geklärt werden:

1. Wie wirkt sich ASS im AMI auf den Infarkt aus?
2. Ist der Effekt plättchenabhängig?
3. Welche Rolle spielen weitere Entzündungsmediatoren in diesem Geschehen?

3. Patienten- und Probandenrekrutierung, Versuchstiere, Material und Methoden

3.1. Patienten- und Probandenrekrutierung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Düsseldorf (Studiennummer: 4735 und 6072R) sowie von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) genehmigt. Die Versuche entsprechen der Deklaration von Helsinki von 1975.

Für die prospektiven Querschnittsanalysen wurden Patienten mit VHF gesucht, welche aufgrund dieser bereits mit einer NOAK-Medikation therapiert wurden. Anhand einer Poweranalyse mit einer Stärke von 0,8, einem alpha-Fehler von 0,05 und einer mittleren Effektgröße von 0,5 (nach Cohen), konnte hier eine Mindestzahl von 51 Patienten errechnet werden. Zusätzlich wurden Patienten für eine Zeitreihenanalyse rekrutiert, bei welchen erstmals VHF diagnostiziert wurde, sodass der Beginn einer NOAK-Therapie notwendig war. Hierbei wurde den Patienten vor sowie 4 h nach Einnahme des FXa-Hemmers Blut entnommen. Eine mögliche Heparin-Antikoagulation wurde mindestens 4 h Stunden vor *baseline* Abnahme des Blutes gestoppt (Abb.7). Auch hier wurde mittels einer Poweranalyse eine Mindestgruppengröße bestimmt. Diese belief sich in der Zeitreihenanalyse aufgrund einer Effektstärke von 0,8, einem alpha-Fehler von 0,05 und einer mittleren Effektgröße von 0,5 (nach Cohen) auf 34 Patienten.

Ausschlusskriterien waren eine zusätzliche Antiplättchentherapie innerhalb der letzten zwei Wochen, eine Antikoagulationstherapie mit weiteren Arzneimitteln, Erkrankungen der Gerinnungskaskade, Niereninsuffizienz, hämodynamische Instabilität, Minderjährigkeit sowie fehlende Aufklärungsfähigkeit.

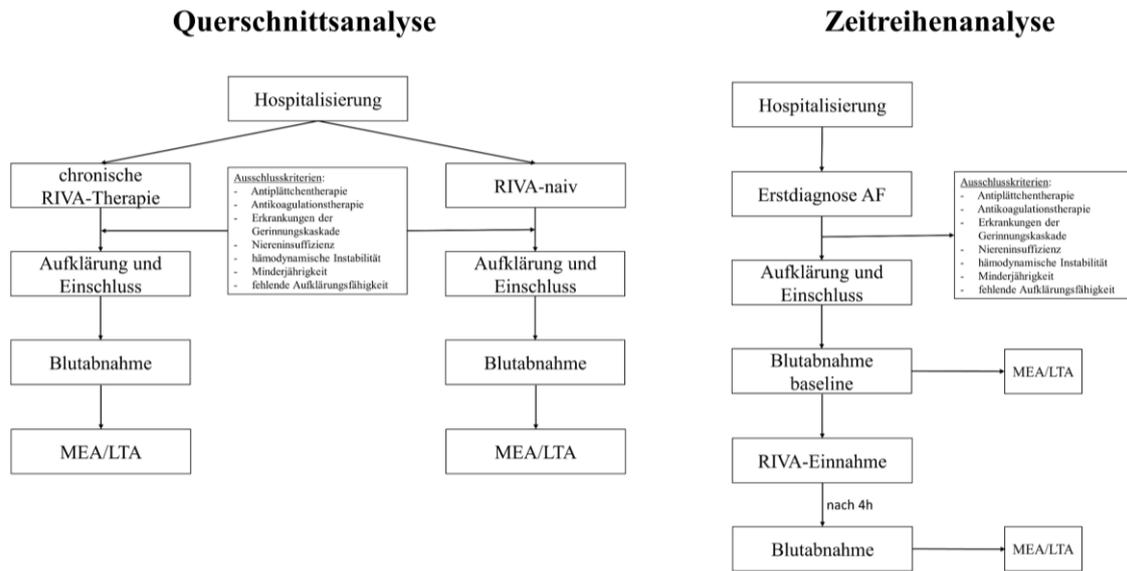


Abbildung 7: Flussdiagramm der Querschnitts- und der Zeitreihenanalyse

3.2. Humane Blutuntersuchungen

Die humanen Blutuntersuchungen dieser Arbeit wurden aus zeitlichen und logistischen Gründen mit Unterstützung einiger Mitglieder der Arbeitsgruppe erhoben.

3.2.1. Blutabnahme

Patienten, sowie gesunde Probanden wurden zunächst aufgeklärt und datenschutzrechtlich informiert. Nach Zustimmung wurde das Blut durch Punktion der Vene durch eine qualifizierte Person, mit Zuhilfenahme einer 21G Venenpunktionskanüle (BD Vacutainer® Safety-Lok™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), gewonnen. Das Blut wurde in Blutabnahmeröhrchen, welche entweder mit Natriumcitrat (BD Vacutainer®, Verdünnung 1:10, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) oder Hirudin (S-Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zur Antikoagulation versetzt waren, gesammelt und innerhalb von 30 min weiterverarbeitet. Die Lagerung und das Weiterverarbeiten des Blutes mussten dabei bei Raumtemperatur erfolgen, um eine Voraktivierung der Thrombozyten zu vermeiden.

Zur Determinierung der Thrombinaktivität wurde das Blut, welches durch Natriumcitrat antikoaguliert wurde, nochmals für 5 min mit 200 U/ml Hirudin (Hyphen Biomed) inkubiert und erst im Anschluss dazu für die Untersuchungen verwendet.

3.2.2. Multiplate® Analysen

Die Vollblutaggregation erfolgte durch die Impedanz-Aggregometrie bzw. Multiplate electrode aggregometry (MEA) am Multiplate Analyzer (Roche). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Dabei wurde zur Stimulation 6,4 μM Adenosindiphosphat (ADP), 3,2 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen bzw. 32 μM thrombin receptor activator peptide-6 (Trap-6) verwendet. (63) Für die MEA wurden die Küvetten in die dafür vorgesehenen Vorrichtungen platziert und mit den Messzellen verbunden. Nach Vorlegen der Kochsalzlösung (NaCl-Lsg) in die Küvetten, wurde die zu untersuchende Probe in die Lösung (Lsg) pipettiert und für 3 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit den jeweiligen Reagenzien, sodass die Messung beginnen konnte. Die Auswertung der Fläche unter der Kurve (AUC) erfolgte automatisch über die Software des Gerätes und wurde in Units (U) angegeben.

3.2.3. Lichttransmissionsaggregometrie

Die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) in dieser Arbeit wurde, je nach Fragestellung, sowohl mit plättchenreichem Plasma (PRP), als auch mit gewaschenen Plättchen (WP) durchgeführt.

3.2.3.1. Herstellung von plättchenreichem Plasma

Zur Gewinnung von PRP wurde das Blut 10 min bei 1200 *rounds per minute* (rpm) zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde das Plasma vorsichtig abgenommen und zum Aggregieren verwendet. Für die notwendige Kalibrierung des Aggregometers konnte, durch erneute Zentrifugation des verbliebenen Pellets im Röhrchen für 10 min bei 2400 rpm, plättchenarmes Plasma (PAP) gewonnen werden.

3.2.3.2. Isolierung von gewaschenen Plättchen

Die Isolierung der Plättchen erfolgte zunächst durch Zentrifugation des Blutes für 10 min bei 1200 rpm. Nach Abnahme des PRP, wurde dieses mit 60 $\mu\text{l/ml}$ Acid-Citrate-Dextrose (ACD)-Lösung sowie 0,5 $\mu\text{l/ml}$ einer 1 μM Prostaglandin E1-Lsg (PGE-1) versetzt. Im Anschluss wurde das Plasma bei 2400 rpm für 10 min zentrifugiert, sodass ein Thrombozytenpellet entstand. Durch Resuspendieren des Pellets, in der volumengleichen Menge des Thrombozytenwaschpuffers und erneuter Zentrifugation mit denselben Einstellungen, wurden die Plättchen von noch anhaftenden Plasmarückständen befreit. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet, in einem analogen Volumen zum vorher gewonnen Plasma, in Thrombozytenmedium (TM) resuspendiert und zum Messen verwendet.

3.2.3.3. Messung in der Lichttransmissionsaggregometrie

Da im Aggregationsverlauf im Vollblut, neben den zu untersuchenden Prozessen auch weitere Effekte, wie zum Beispiel das Ausschütten von ADP aus Erythrozyten, eine Rolle spielen kann, wurden die Aggregationsversuche zusätzlich mit der LTA in PRP oder mit WP durchgeführt. (64) Hierfür wurden zunächst 50 µl TM in die Küvette vorgelegt, mit 200 µl PRP bzw. WP versetzt und bei 37° C für 6 min vorinkubiert. Danach wurde sofort mit den jeweiligen Substanzen stimuliert. 2 min vor Stimulationsbeginn wurde die Aufzeichnung begonnen und für 360 s fortgeführt. Als Stimuli wurden 10 µM Trap-6, 2 µg/ml Kollagen, 20 µM ADP oder 35 µg/ml FXa verwendet. Je nach Versuch, wurden die Proben 5 min vor Stimulation mit 206 pM RIVA oder 100 pM Vorapaxar (VORA) vorinkubiert und gemessen. Außerdem wurden 10 µM des Phosphoinositid-3-Kinasen-Inhibitors (PI3K) LY29004, 1 µM des Phospholipase C-Inhibitors (PLC) U73122 oder 40 µM des Rho-associated protein kinase-Inhibitors (ROCK) Y27632 genutzt, um das *Downstream Signaling* zu eruieren.

3.2.4. Thrombozytenadhäsionsanalyse über die Bioflux Flusskammer

Die Thrombozytenadhäsion wurde in kollagen-beschichteten Bioflux 200 low shear Platten (Fluxion Bioscience) gemessen. Hierfür wurde 50 µl Kollagen I-Lösung (100 µg/ml Kollagen gelöst in isotonischer Glucoselösung für Kollagenverdünnungen pH 2,7-2,9 [ProChronoPar]) in das Outlet-Well einer 48-Well microfluidic low-shear Platte pipettiert und solange mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 dyn/cm² laufen gelassen, bis das innere Inlet-Well voll war. Nach 1 h Inkubationszeit, wurde die überschüssige Lösung aus den Wells entfernt und mit 200 µl Dulbecco's Phosphate buffered saline with calcium chloride and magnesium chloride (PBS) (Sigma Aldrich) gewaschen. Durch Waschen des Kanals für 10 min bei 5 dyn/cm² konnte nicht adhärentes Kollagen entfernt werden. Durch 15 min Blocken bei 5 dyn/cm² mit einer 0,5 %igen Bovine Serum Albumin-Lösung (BSA) (Albumin bovine Fraction V, SERVA) in PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ konnten unspezifische Bindungen zwischen Plättchen und Trägeroberfläche verhindert werden. Die Inlet-Wells konnten im Anschluss mit 500 µl Vollblut, in welchen die Plättchen 30 min vorher mit 4 µM Calcein AM (life technologies™) angefärbt wurden, befüllt und mit 10 dyn/cm² für 10 min durch die Kanäle laufen gelassen werden (Abb.8). Im Anschluss wurden die nicht-adhärenen Zellen durch 10 min Waschen mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ bei 10 dyn/cm² aus den Kanälen gewaschen. Es erfolgte eine sofortige Aufnahme der Kanäle mit einer Nikon DS-Qi2 Kamera bei einer 4-fachen Vergrößerung und unter FITC Bedingungen. Die Auswertung erfolgte durch das

Analyseprogramm BioFlux Montage Software der Firma Fluxion Bioscience und wurde in Fläche der adhärenierten Zellen in Prozent, im Vergleich zur gesamten Kanalfläche, angegeben.

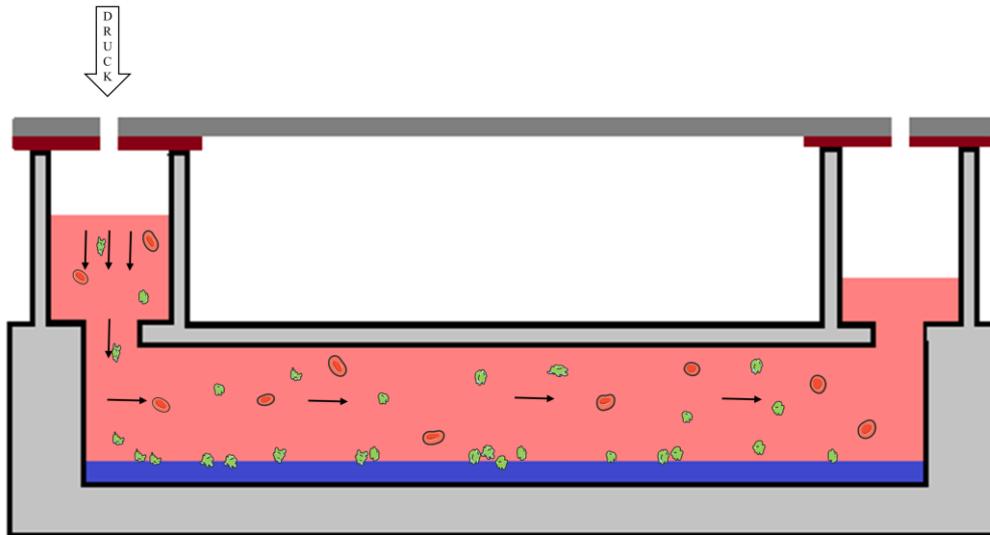


Abbildung 8: Aufbau einer kollagen-beschichteten Flusskammer

3.2.5. Durchflusszytometrische Analyse humaner Proben

Die durchflusszytometrischen Analysen der humanen Proben wurden durchgeführt um die intrazelluläre Calcium-Signaltransduktion der Plättchen, sowie die Expressionen der Oberflächenproteine und den beteiligten Rezeptoren, zu überprüfen. Hierfür wurden die Proben zunächst mit den jeweiligen konjugierten Antikörpern (Tabelle (Tab.) 1) der zu analysierenden Strukturen bzw. dem Ca^{2+} -sensitiven Marker Flou-4 (Thermo Fisher) versetzt und für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde mit den jeweiligen Agonisten, sowie mit oder ohne VORA stimuliert. Unverzüglich wurden die Proben mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und am FACS Verse (BD) vermessen. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der gewonnenen Daten mit der Software FlowJo V10 (FlowJo Software).

Tabelle 1: AK-Liste der verwendeten Panels der humanen FACS-Analysen

Panel 1	Panel 2	Panel 3
Flou-4	CD62P PE	PAR-1-FITC
	ICAM-2-BB515	PAR-4-PE
	CD40L-BV421	
	CD41-APC	

3.2.6. Enzyme-linked immunosorbent assay

Bei den *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) handelte es sich um ELISA Kits für PI3K, Diacylglycerine (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃), wobei es sich bei allen drei um direkte Sandwich ELISA handelte. Die Probengewinnung erfolgte durch Inkubation der WP mit FXa und anschließender Zentrifugation zum Gewinn eines Plättchenpellets. Dieses wurde umgehend in flüssigem Stickstoff (N₂) eingefroren und bis zur Messung bei -80° C gelagert. Für die Messungen wurden die Proben aufgetaut, im entsprechenden Volumen PBS aufgenommen und im Ultraschallbad lysiert. Anschließend wurden die ELISA nach Herstelleranweisung durchgeführt. Mithilfe des PlateReaders (FluoStar Omega BMG, Labtech) wurden im Anschluss die Absorptionen gemessen und mittels des Auswerteprogramms MARS (BMG Labtech) ausgewertet, sodass die Konzentrationen berechnet werden konnten.

3.3. Tierversuchsexperimentelle Untersuchungen

3.3.1. Versuchstiere

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) unter den Aktenzeichen AZ 84-02.04.2017.A154, AZ 84-02.04.2017.A440 genehmigt.

Für die Versuche wurden Mäuse der Wildtyplinie C57/BL/6J im Alter von 10 bis 15 Wochen und einem Körpergewicht von 22 g bis 30 g verwendet. Es wurden lediglich männliche Tiere von Janvier bzw. Jackson Laboratory bestellt und in die Versuche eingeschlossen.

Die Haltung und Pflege der Mäuse erfolgte durch das Fachpersonal in den Räumlichkeiten der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf bzw. in den Räumlichkeiten unseres Kooperationspartners Dr. Tobias Petzold der LMU. In einer Gruppengröße von fünf Tieren, in Käfigen der vorgeschriebenen Größe (Typ 3) mit Holzspänen ausgelegt und bei einer Raumtemperatur von 22° C ± 2° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % ± 10 % gehalten, stand den Tieren Futter und Wasser ad libitum frei zur Verfügung. Zum Erhalt des zirkadianen Rhythmus wurden, wie von der „Federation for Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA) gefordert, die Haltungsräume mit einem 12 h Tag-Nacht-Zyklus, mit einer halbstündigen Dämmerungsphase versehen sowie regelmäßig gereinigt und desinfiziert.

3.3.2. *In-vivo*-Induktion arterieller Thrombosen

Die *in-vivo*-Versuche zur Induktion arterieller Thrombosen sowie die darauffolgenden histologischen Untersuchungen wurden von unseren Kooperationspartnern der LMU durchgeführt und ausgewertet. Hierfür wurde den Mäusen eine Stunde vor Thromboseinduktion, eine gewichtsadaptierte Dosis von RIVA (6 mg/Kg gelöst in 1 %iger Dimethylsulfoxidlösung (DMSO)) bzw. das Vehikel per oral (p.o.) durch Schlunden verabreicht. Die Plasmaspiegel wurden eine Stunde nach Applikation in Citratblut mithilfe eines Anti-FXa-Assays (Chromogenix) untersucht. Durch Verletzung der Gefäßwand, ausgelöst über eine Applikation eines in Eisen (Fe)-(III)-chlorid getränkten Filterpapiers an die Außenwand der A. carotis communis, wurde die Thrombose induziert. Wie bereits von Pircher et al. beschrieben, erfolgte eine Aufzeichnung des Verlaufes der Thrombusbildung mithilfe der Intravitalmikroskopie. (65) Die Thrombozyten wurden durch Injektion eines Glykoprotein (Gp)Ib-DyLight 488 gebundenen Antikörpers (X488, Emfret) sichtbar gemacht und mit einem Olympus BX51WI Fluoreszenzmikroskops aufgenommen. Die Auswertung der gewonnenen Aufnahmen erfolgte verblindet mithilfe der Cell[^]R Software (Olympus).

3.3.3. Experimentelle Infarktmodelle

3.3.3.1. Ischämie-Reperfusion „open-chest“

Für die Ischämie-Reperfusion (I/R)-Operationen (OP) erfolgte eine präemptive (30 min vor OP-Beginn), subkutane Applikation des Analgetikums Temgesic (0,1 mg/kg) (Indivior, PZN:345928).

Zur Intubation wurde die Maus zunächst in einer Kammer mit 3 % Volumen (Vol) Isofluran narkotisiert, um sie dann mithilfe eines Venenverweilkatheters (Vasofix® Safety 20G, B.Braun) intubieren zu können. Nach erfolgter Intubation wurde sie auf einen beheizbaren Wärmetisch (38° C) überführt und mit sauerstoffangereicherter Raumluft und einem initial auf 3 % Vol. Isofluran eingestellte Mischung beatmet. Die Micro-Ventilations-Apparatur wurde dabei auf ein Tidalvolumen von 200 µl und eine Beatmungsfrequenz von 140 Atemzügen/min eingestellt. Nach Überprüfung einer adäquaten Narkose durch Reflexkontrolle, erfolgte eine Reduktion des Narkosemittels Isofluran auf die Erhaltungsdosis von 2 % Vol.

Zur permanenten Überwachung des Tieres erfolgten eine Temperaturkontrolle mittels Rektalsonde und die Ableitung eines EKGs.

Nach Enthaarung des Operationsbereichs mit Veet-Enthaarungscreme, wurde die Haut durch Octenisept desinfiziert.

Um die laterale Sternotomie zu beginnen, erfolgte ein 1,5 cm langer Hautschnitt vom Sternum zum linken Vorderbein. Durch vorsichtiges auseinander präparieren der Brustmuskulatur und anschließendem fixieren dieser, mit OP-Haken, konnten die Rippen freigelegt werden.

Im nächsten Schritt wurde der Brustkorb mit einem Schnitt zwischen dritter und vierter Rippe geöffnet und durch umsetzen der Haken auseinandergezogen, sodass das Herz präpariert werden konnte. Nach Entfernen des Herzbeutels wurde die linke Koronararterie (LAD) lokalisiert. Mit einem 7-0 Prolenefaden wurde unter der LAD durchgestochen und etwa bis zur Mitte des Fadens durchgezogen. Nach Entfernen der Nadel, wurden beide Fadenenden durch ein ca. 1 mm langes Polyethylenschlauch gezogen, sodass die Fadenenden parallel rechts und links fixiert werden konnten (Abb.9).

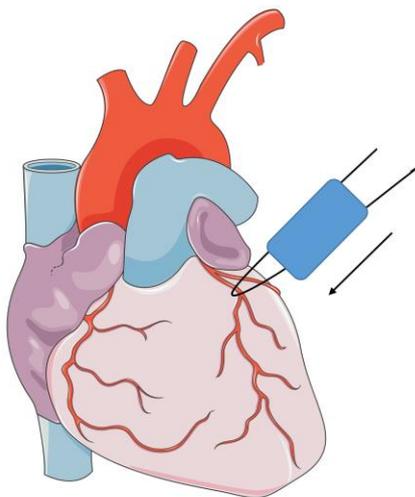


Abbildung 9: Schematische Abbildung der LAD-Okklusion und Fotografie des OP-Aufbaus im open-chest-Verfahren

Schematische Darstellung der Okklusion der LAD, bei welcher die LAD mit einem 7-0 Prolenefaden unterstochen wird. Im Anschluss werden die Fadenenden durch ein Polyethylenschlauch geführt. Durch Auseinanderziehen der Fadenenden verschließt der Schlauch durch Druckausübung die LAD und verhindert den weiteren Blutfluss durch das Gefäß. Daneben Bild des open-chest Versuchsaufbaus während der Ischämiezeit.

Durch Auseinanderziehen der Fadenenden, konnte der Blutfluss der LAD unterbrochen werden, sodass die Ischämie ausgelöst und die typische ST-Streckenhebung im EKG-Verlauf beobachtet werden konnte. Nach 30 min Ischämie, wurde die Reperfusion durch Lockern der

Fäden eingeleitet. Der Polyethylenschlauch konnte entfernt werden, wobei zur späteren Lokalisation der Einstichstellen, die Fäden locker verknotet und die Enden kurz abgeschnitten wurden.

Im Anschluss konnte der Brustkorb durch Zusammennähen des dritten und vierten Rippenbogens mit einem 5-0 Seidenfaden verschlossen werden. Dabei sollte auf ein adäquates Wiederaufpumpen der Lungenflügel, durch kurze Druckerhöhung der Beatmung, geachtet werden. Nach dem Verschließen der Muskelschichten, wurde die Hautschicht durch Knopfnähte mit einem 4-0 Prolenefaden zugenäht.

Durch Ausschleichen des Isoflurans wurde die Anästhesie beendet, sodass der Eigenatemreflex wiedereinsetzen konnte. Nach Extubation wurde die Maus bis zum völligen Erwachen mit einer Wärmelampe warmgehalten und erhielt postoperativ alle 6-8 h eine subkutane Temgesicgabe (0,1 mg/kg) über einen Zeitraum von 3 d.

3.3.3.2. Ischämie-Reperfusion „closed-chest“

Die I/R-Versuche im „closed-chest“-Verfahren erfolgten an zwei verschiedenen Tagen. Zunächst war es notwendig in einer Vor-OP die Ligatur an das Herz anzubringen, wobei hier noch keine Ischämie ausgelöst wurde. Im zweiten Teil, nach einer Regenerationszeit von 4-7 d konnte dann die Ischämie bei geschlossenem Thorax ausgelöst werden.

Analog zum „open-chest“-Verfahren, wurde die Maus analgisiert, narkotisiert und für die OP vorbereitet. Um die laterale Sternotomie zu beginnen erfolgte ein 1,5 cm langer Hautschnitt vom Sternum zum linken Vorderbein. Durch vorsichtiges auseinander präparieren der Brustmuskulatur und anschließendem fixieren dieser mit OP-Haken, wurden die Rippen freigelegt.

Durch einen Schnitt zwischen dritter und vierter Rippe, wurde der Brustkorb eröffnet und durch umsetzen der Haken auseinandergezogen, sodass das Herz präpariert werden konnte. Durch Entfernen des Herzbeutels, konnte die LAD lokalisiert werden. Mit einem 7-0 Prolenefaden wurde unter der LAD durchgestochen und etwa bis zur Mitte des Fadens durchgezogen. Nach Entfernen der Nadel, wurden beide Fadenenden durch ein Polyethylenschlauch gezogen, sodass die Fadenenden parallel rechts und links locker fixiert werden konnten.

Der Brustkorb konnte im Anschluss durch Zusammennähen des dritten und vierten Rippenbogens mit einem 5-0 Seidenfaden verschlossen werden, wobei das Ende des linken Prolenefaden links und das des Rechten, rechts des Verschlussknotens nach außen vorbei geführt wurde. Hierbei musste ebenfalls auf ein adäquates wiederaufpumpen der

Lungenflügel, durch kurze Druckerhöhung der Beatmung, geachtet werden. Im Anschluss wurde das linke Fadenende mithilfe einer Nadel, durch die linke Muskelschicht gezogen. Ebenso wurde mit dem rechten Fadenende und der rechten Muskelschicht verfahren. Nach dem Verschließen der Muskelschichten, wurden die Fadenenden an der Spitze verknötet. Mithilfe der Hautschere konnte am rechten unteren Bauchbereich eine Hauttasche gebildet werden, in welche die Fadenenden vorsichtig gelegt wurden. Im Anschluss wurde die Haut mit einem 4-0 Prolenefaden durch Knopfnähte verschlossen.

Durch Ausschleichen des Isoflurans, wurde die Anästhesie beendet, sodass der Eigenatemreflex wiedereinsetzen konnte. Nach Extubation wurde die Maus, bis zum völligen Erwachen, mit einer Wärmelampe warmgehalten und erhielt postoperativ alle 6-8 h eine subkutane Temgesic-Gabe (0,1 mg/kg) über 3 d.

Nach einer Regenerationszeit von 4-7 d wurde die Ischämie wie folgt bei einem geschlossenen Thorax ausgelöst.

Auch hier erfolgte eine präemptive, subkutane Temgesic-Injektion zur Analgesie.

Die Narkose konnte in einer Narkosekammer mit 3 % Vol. mit Isofluran angereicherter Sauerstoff-Raumluft Mischung eingeleitet werden. Nach suffizienter Narkose wurde die Maus auf einem beheizten Operationstisch (38° C) fixiert, wobei eine permanente Temperaturüberwachung mittels Analsonde, sowie eine EKG-Ableitung durchgeführt wurde. Die Beatmung und Narkose erfolgte über eine Gesichtsmaske und mit Sauerstoff angereicherter Raumluft, welche mit 2 % Vol Isofluran angereichert war.

Zum Auslösen der Ischämie wurde zunächst die Haut mit Octenisept desinfiziert. Im Anschluss wurde die Haut vorsichtig an den Nahtstellen geöffnet und auseinandergezogen. Mit einer Pinzette konnten die Fadenenden vorsichtig aus der Hauttasche befreit und rechts und links fixiert werden. Durch langsames und kontrolliertes Auseinanderziehen der Fadenenden bei gleichzeitiger Kontrolle der EKG-Ableitung konnte die Ischämie ausgelöst und für 30 min, mit einer engmaschigen Beobachtung der Temperatur und der Herzfunktion, erhalten werden (Abb.10). Im Anschluss wurde die Reperfusion durch Abschneiden der Fadenenden kurz oberhalb der Muskulatur eingeleitet. Mithilfe von Knopfnähten konnte die Haut wieder verschlossen und mit Octenisept desinfiziert werden.



Abbildung 10: Fotografie des OP-Aufbaus im closed-chest-Verfahren

Durch Ausschleichen des Isoflurans wurde die Anästhesie beendet, wobei die Maus bis zum völligen Erwachen weiterhin beatmet und gewärmt wurde. Im Anschluss wurde sie in einen frischen Käfig überführt und warmgehalten. Postoperativ erhielten alle Tiere in regelmäßigen Abständen von 6-8 h eine subkutane Temgesic-Gabe (0,1 mg/kg) zur Analgesie.

3.3.4. Medikamentöse Behandlung der Versuchstiere

3.3.4.1. Applikation von ASS

Für die Applikation von ASS wurden 170 mg ASS in 50 ml isotonischer NaCl-Lsg gelöst. Es wurden je nach Gruppe entweder 30 min vor Ischämie oder 15 min vor Reperfusionbeginn 50 µl der ASS-Lsg bzw. der reinen NaCl-Lsg intravenös in die Schwanzvene verabreicht (Abb.11).

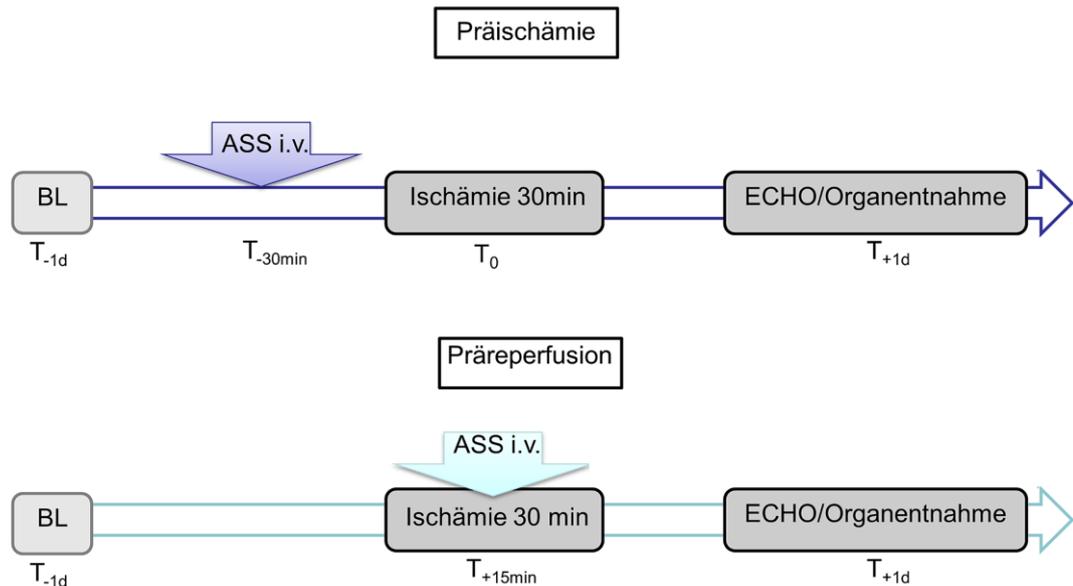


Abbildung 11: Zeitschema der open-chest OP-Methode mit ASS- bzw. Vehikel-Applikation.

Zeitstrahl über den Verlauf der open-chest I/R Versuche mit ASS-Applikation vor der Ischämie oder vor der Reperfusion.

3.3.4.2. Applikation des Antikörpers zur Plättchendepletion

Die Thrombozytendepletion der Versuchstiere erfolgte mit einem monoklonalen AK aus Ratten, welches, durch Binden an das GpIb α (CD42b) (Emfret, R300) der Mäuse, die Plättchen zerstörte. Dazu wurde die benötigte Menge des AK mit demselben Volumen an PBS verdünnt und den Mäusen in die Schwanzvene verabreicht. (66) Die Applikation des AK erfolgte gewichtsabhängig mit einer Dosis von 2 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht 1,5 h vor Ischämieinduktion (Abb.12).

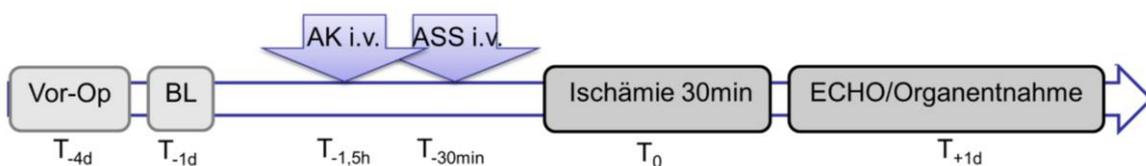


Abbildung 12: Zeitschema der closed-chest OP-Methode mit Applikation des Depletionsantikörpers bzw. des Vehikels mit bzw. ohne ASS.

3.3.5. Kardiovaskuläre murine *in-vivo* Diagnostik

3.3.5.1. Transthorakale Echokardiographie (TTE)

Zur Feststellung der Herzfunktionen, wurden 24 h vor, sowie 24 h nach der Ischämie echokardiographische Untersuchungen des Herzes, mit dem hochauflösenden Ultraschallgerät Vevo 2100 und dem 18-38 MHz Schallkopf MS400 (VisualSonics, Fujifilm), durchgeführt.

Hierfür wurden die Versuchstiere zunächst in eine Narkosekammer überführt und durch Einleiten von 3 % Vol. Isofluran zu einem Sauerstoff-Luft-Gemisch (40:60) in Narkose gelegt. Nach Erreichen einer suffizienten Anästhesie, wurde die Maus auf den beheizten Tisch (37° C) des ECHO-Stativs überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Schnauze der Maus optimal in die Narkosemaske platziert wurde. Zum Erhalt der Narkose konnte der Isofluranstrom auf 1,5 % Vol herunter gestellt werden. Im Anschluss wurden die Pfoten der Maus auf den Elektroden des Kontakt-Pads fixiert und die Temperatursonde vorsichtig rektal eingeführt und fixiert. Dadurch wurde eine permanente Überwachung der Herz- und Atemfrequenz, sowie der Temperatur gewährleistet.

Nach Entfernen der Behaarung vom Thoraxbereich der Maus, mithilfe einer Haarentfernungscreme (Veet), wurde der Bereich großzügig mit auf Körpertemperatur erwärmtem Ultraschallgel benetzt, sodass die Aufnahmen beginnen konnten.

Durch Positionieren des Schallkopfes konnten Aufnahmen der parasternalen Längsachse (PSLA), des linken Ventrikels (LV) im B- (Abb.13A) und M-Mode (Abb.13B) und der kurzen Achse (SAX)(Abb.13C) in beiden Modi, gewonnen werden. Außerdem konnte die Aufzeichnung der Flüsse des Vierkammerblickes, sowie dieser hinter der Aortenklappe mittels Doppleraufnahmen erfolgen (Abb.13D).

Nach Fertigstellung der Aufnahmen wurde die Maus vom überschüssigen Ultraschallgel befreit. Durch Ausschleichen des Isoflurans konnte die Narkose beendet und die Fixierung gelöst werden. Nach Erlangen des Bewusstseins wurde das Tier zurück in den Käfig überführt.

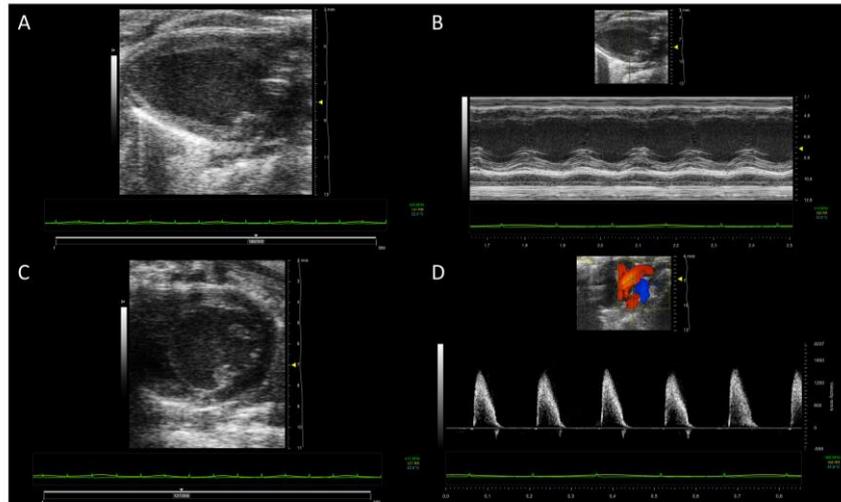


Abbildung 13: Echokardiographische Darstellung des Herzens.

- A. Parasternale Längsachse des linken Ventrikels im B-Mode.
- B. Parasternale Längsachse des linken Ventrikels im M-Mode.
- C. Kurze Achse des linken Ventrikels im B-Mode.
- D. Doppleraufnahme der Flussgeschwindigkeit hinter der Aortenklappe.

Ausgewertet wurden die Aufnahmen mit der Software VevoLab 2.2.0 (VisualSonics). Dabei konnten aus den Aufnahmen Werte für das enddiastolische sowie das endsystolische Volumen gewonnen werden. Hieraus ließen sich dann die Ejektionsfraktion (EF) und das Schlagvolumen (SV) errechnen. Außerdem konnte die Wanddicke sowie das fractional shortening (FS) über die M-Mode-Aufnahmen ermittelt werden. Durch die Doppleraufnahmen ließen sich außerdem die Blutflüsse durch die Mitralklappe, sowie die Flussgeschwindigkeit hinter der Aortenklappe darstellen.

3.3.5.2. Elektrokardiogramm

Das Ableiten eines EKGs erfolgte zur Überprüfung der Ischämie und der Kontrolle der ST-Streckenhebung während der Ischämie. Dabei erfolgte eine Dreipunkt-Ableitung durch Klemmelektroden, jeweils an beiden Vorderpfoten, sowie der rechten Hinterpfote. Die Aufnahme erfolgte durch die Programme Iox.2 bzw. LabChart Pro 7 (Abb.14).

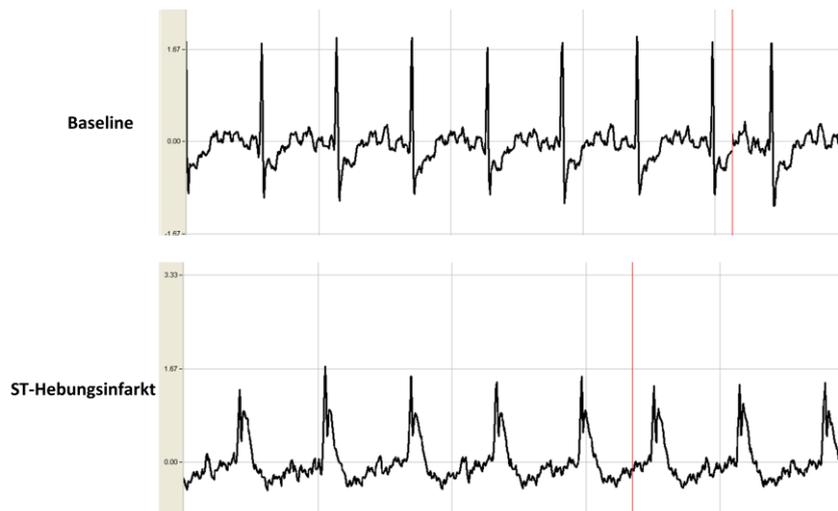


Abbildung 14: EKG-Ableitung vor und nach Infarktinduktion

3.3.6. Murine *ex-vivo*-Analysen von Blut- und Gewebeproben

3.3.6.1. Blut- und Organentnahme

Im Anschluss zu den finalen echokardiographischen Untersuchungen, erfolgte die Tötung und die gleichzeitige Blut- und Organentnahme der Tiere. Hierfür bekamen die Mäuse eine intraperitoneale (i.p.) Applikation von Ketamin (100 mg/Kg) (Ketaset® S, Zoetis, PZN:12467832) und Xylazin (10 mg/Kg) (Rompun®, Bayer, PZN:1320422) zur finalen Narkoseeinleitung. Gleichzeitig erfolgte eine Heparinisierung der Mäuse, durch i.p. Applikation von 1000 I.E. (internationale Einheit) Heparin-Natrium (25.000 I.E./5 ml Heparin-Natrium, B.Braun, PZN:9929393). Nach Überprüfen der Reflexe, wurden die Mäuse durch retroorbitales Punktieren des Venenplexus und dem daraus folgenden Verbluten euthanasiert.

Im letzten Schritt wurde der Thorax durch einen waagerechten Schnitt unterhalb des Sternums, sowie zwei vom ersten Schnitt Richtung Vorderpfoten gesetzten Schnitten geöffnet. Vorsichtig konnte das Herz mit, wenn nötig, einem ausreichenden Teil des Aortenbogens herausgenommen werden. Je nach Verwendung wurden die Herzen entweder sofort blutleer gespült und in eine PFA-Lösung zur Fixierung überführt oder für die Präparation der 2,3,5-Triphenyltetrazolinumchlorid (TTC)-Färbungen in die Kältschale gegeben.

3.3.6.2. Histologie

3.3.6.2.1. 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung

Zur Ermittlung der Infarktgrößen wurden die Herzen zunächst mit Evans-Blue perfundiert und im Anschluss mit TTC gefärbt.

Nach Entnahme des Herzens wurde es in einer auf 4° C temperierten Kaltschale in kalter 0,9 %iger NaCl-Lsg. soweit präpariert, dass es frei von Geweberesten war und nur noch die Aorta zurückblieb. Dieser wurde dann vorsichtig über eine Aortenkanüle gezogen und mit einem Doppelknoten fixiert. Im Anschluss wurde das Herz durch Spülen mit NaCl vom restlichen Blut befreit (Abb.15).

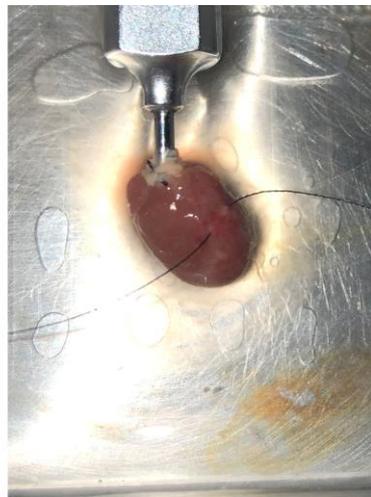


Abbildung 15: Auf Kanüle gezogenes Herz, in welchem die LAD unterstochen ist.

Herz welches zum Blutleerspülen und Kenntlichmachen der AAR mit Evans-Blue auf eine Kanüle gezogen und fixiert wurde. Mit einem 7-0 Seidefaden wurde die LAD unterstochen und vor der Färbung mit Evans-Blue wieder okkludiert.

Daraufhin konnte die LAD-Ligatur mit einem 7-0 Prolenefaden, genau an dieselbe Stelle wie zuvor, gesetzt werden. Durch das Verknoten des Fadens erfolgte der Verschluss des Gefäßes. Anschließend konnte, durch Durchpumpen einer 1 %igen Evans-Blue-Lösung durch die Kanüle, das Herzareal markiert werden, welches nicht von der Ischämie betroffen sein konnte. Die Bestimmung der „*area at risk*“ (AAR) bei Betrachtung der Schnitte, konnte somit später auf das nicht blau gefärbte Areal begrenzt werden. Nachdem das Herz mit Evans-Blue perfundiert wurde, konnte es gewogen und für mind. 1 h bei -20° C eingefroren werden. Dabei musste es zur Vermeidung von Gefrierbrand, vorher in Frischhaltefolie eingewickelt werden.

Das gefrorene Herz konnte dann, von der Spitze aufwärts, in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und gewogen werden. Die 6-7 entstandenen Schnitte wurden in vorbereitete

dunkle Eppendorffgefäße, welche die TTC-Lösung enthielten und bei 37° C in einem Thermomixer erwärmt wurden, überführt und für 5 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Herzschnitte nebeneinander auf einen Objektträger gelegt, mit einem Deckglas bedeckt, sodass sie mit einer Vergrößerung von 1:1,25 abfotografiert (Leica Fluoreszenzmikroskop DM4000 M) werden konnten.

Die Bilder wurden mit dem Programm DiskusView ausgewertet. Dabei konnte zwischen der AAR, dem nicht blaugefärbten Bereich, und dem nicht betroffenen Areal, welches durch die Evans-Blue-Lsg blau gefärbt wurde, unterschieden werden. Zusätzlich konnte durch die TTC-Färbung das abgestorbene, weiße Gewebe vom intakten, rotgefärbten Gewebe abgegrenzt werden (Abb.16).

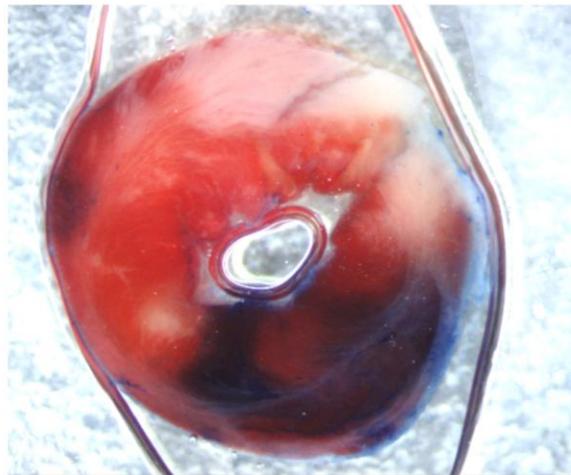


Abbildung 16: Beispiel eines TTC-gefärbten Herzschnittes.

Blau gefärbt ist der Bereich, der nicht zur AAR gezählt wird. Die AAR setzt sich zusammen aus dem weiß erscheinenden Infarktareal und der tiefrot gefärbten Fläche von noch lebender und vom Infarkt nicht betroffener Zellen.

Durch die Formel:

$$(A1 \times Wt1) + (A2 \times Wt2) + (A3 \times Wt3) + (A4 \times Wt4) + (A5 \times Wt5) + (A6 \times Wt6)$$

konnte das Gewicht des Infarktgewebes berechnet werden. Dabei gab A die Fläche des Infarktes der Schnitte 1-6 in Prozent und Wt das Gewicht des Schnittes an.

Durch

$$m(\text{inf}) / m(\text{LV}) * 100$$

ließ sich im Anschluss der Infarkt pro linken Ventrikel (LV) berechnen.

Außerdem konnte durch die Formel

$$[m(\text{LV}) - m(\text{LV Blau})] / m(\text{LV})$$

die AAR ermittelt werden. (67)

3.3.6.2.2. Immunhistologische Analysen

Für die immunhistologischen Analysen wurden die Herzen nach der Entnahme zunächst mit PBS blutleer gespült. Nachdem sie über Nacht in 4 %iger PFA-Lsg. fixiert wurden, erfolgte die Entwässerung der Organe im pharmakologischen Institut der HHU Düsseldorf, durch den Entwässerungsautomaten Tissue Tek VIP E150/E300 (Sakura Finetec). Im Anschluss konnten die Herzen in Paraffin eingebettet werden (Paraffinausgießstation EG1150H, Leica Biosystems). Nach vollkommenem Erhärten des Paraffins, wurden vom Apex aus jeweils zehn Schnitte à 5 µm im Abstand von 250 µm mithilfe des Mikrotoms (Jung Biocut 2035, Leica) gewonnen und auf Objektträger überführt. Die Schnitte wurden für mind. 24 h bis zum vollständigen trocknen liegen gelassen.

Unmittelbar vor jeder Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert. Hierfür wurden sie jeweils zweimal für 10 min in Roticlean® (CarlRoth, #1529) getaucht. Anschließend wurden sie nochmals zweimal, jedoch nur für 1 min in Roticlean® getaucht. Nachdem die Objektträger weitere zwei Bäder in 100 %igem Ethanol (EtOH) für 1 min erhielten, erfolgte dieselbe Prozedur in 96 %igem und 70 %igem EtOH. Anschließend wurden die Schnitte 1 min lang in Aqua dest. getaucht, um sie zu rehydrieren. Sowohl das Anfertigen der Schnitte als auch die Färbungen und Auswertungen dieser wurden dankenswerterweise mithilfe der medizinischen Doktoranden Kajetan Trojovsky und Samantha Ahlbrecht durchgeführt.

3.3.6.2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Nachdem die Herzschnitte entparaffiniert und rehydriert wurden, wurden sie für 1 min in eine Hämatoxylin-Lösung nach Gill II getaucht. Im Anschluss wurden die Schnitte zum nachbläuen für 10 min unter fließendes Leitungswasser gelegt.

Daraufhin wurden sie für 30 s in eine 1 %ige Eosin Y-Lsg. getaucht. Anschließend konnte man die Schnitte, durch Tauchen für je 30 s in je zwei Lösungen von 95 %igem und 100 %igem EtOH, dehydrieren. Daraufhin erfolgten nochmals zwei Bäder in Roticlean® für je 30 s. Jeweils zwei Tropfen Eindeckmedium (Eukitt®, Fluka) wurden auf die Schnitte pipettiert, damit mit einem Deckglas luftblasenfrei eingedeckelt werden konnte. Zum vollständigen Trocknen mussten die Präparate mindestens eine Nacht unter dem Abzug abdampfen. Im Anschluss konnten die Schnitte mit einer 2,5-fachen Vergrößerung abfotografiert und mit ImageJ (Wayne Rasband) ausgewertet werden.

3.3.6.2.2.2. MAC-2-Färbung

Die Einwanderung von Makrophagen ist ein Grad der Inflammationsreaktion, welche durch die MAC-2-Färbung sichtbar gemacht werden sollte.

Hierfür wurden die Schnitte nach dem Entparaffinieren für 10 min in eine 3 %ige Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂) in Methanol (MeOH) getaucht. Im Anschluss dazu wurden sie drei Mal für je 1 min mit PBS gewaschen. Jeweils eines der zwei Schnitte pro Objektträger, wurde dann mit 50 µl einer 0,25 µg/ml Verdünnung des MAC-2-Antikörpers (Cedarline, #CL8942AP) in 3 %igem Ziegen Serumlösung, bzw. dem Negativ-Kontrollantikörper (Jackson Immuno, #012-000-002) derselben Verdünnung bedeckt und für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde drei Mal jeweils 1 min mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (Sigma, #B7139) wurde dann in einer Verdünnung von 5 µg/ml auf beide Proben aufgebracht und erneut lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte mit 50 µl einer 4 µg/ml verdünnten Streptavidin-Lösung (Dianova, Jackson Immuno, #016-030-034) bedeckt und ein weiteres Mal für 45 min inkubiert. Erneut wurde drei Mal mit PBS gewaschen, sodass mit der Entwicklung der Färbung begonnen werden konnte. Hierfür wurden alle 15 s vier Tropfen der Entwicklungslösung aufgeträufelt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte einmal mit Aqua dest. gewaschen. Nach einem Bad von 20 s in Hämalun GILL II-Lösung und dem nachbläuen von 5 min unter fließendem Leitungswasser, wurden die Schnitte zweimal jeweils 30 s in frische Lösungen von 70 %igem, 96 %igem und 100 %igem EtOH, sowie zwei Mal für dieselbe Zeit in Roticlear® getaucht. Sofort wurden die Schnitte mit Eukitt® bedeckt und luftblasenfrei mit einem Deckglas belegt. Nach einer angemessenen Trocknungszeit von mindestens 24 h bis zum vollkommenen Aushärten, wurden die Schnitte bei einer Vergrößerung von 2,5 abfotografiert und mit der Software ImageJ ausgewertet.

3.3.6.2.2.3. Ly6G-Färbung

Auch die Migration neutrophiler Granulozyten spielt eine wichtige Rolle in inflammatorischen Prozessen, sodass diese mit der Ly6G-Färbung sichtbar gemacht wurden. Analog zur MAC-2-Färbung wurden auch hier die Schnitte nach dem Entparaffinieren für 10 min in eine 3 %ige H₂O₂-Lsg. in MeOH getaucht und im Anschluss drei Mal für je 1 min mit PBS gewaschen. Je ein Schnitt, der auf den Objektträgern befindlichen Schnitte, wurde dann mit 50 µl einer 0,25 µg/ml Verdünnung des Ly6G-Antikörpers (Abcam, ab25377) in 3 %igem Ziegen Serumlösung bzw. dem Negativ-Kontrollantikörper (Jackson Immuno, #012-000-002) derselben Verdünnung bedeckt und für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurde drei Mal, jeweils für 1 min, mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (Sigma, #B7139) wurde dann in einer Verdünnung von 5 µg/ml auf beide Proben aufgebracht und erneut lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte mit 50 µl einer 4 µg/ml verdünnten Streptavidin-Lösung (Dianova, Jackson Immuno, #016-030-034) bedeckt und ein weiteres Mal für 45 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligen waschen mit PBS konnte mit der Entwicklung der Färbung begonnen werden. Hierfür wurden alle 15 s vier Tropfen der Entwicklungslösung aufgeträufelt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde einmal mit Aqua dest. gewaschen. Nach einem Bad von 20 s in Hämalaun GILL II-Lösung und 5 min nachbläuen unter fließendem Leitungswasser, wurden die Schnitte zweimal jeweils 30 s in frische Lösungen von 70 %igem, 96 %igem und 100 %igem EtOH, sowie zwei Mal für dieselbe Zeit in Roticlear® getaucht. Sofort wurden die Schnitte mit Eukitt® bedeckt und luftblasenfrei mit einem Deckglas belegt. Nach einer angemessenen Trocknungszeit von mindestens 24 h bis zum vollkommenen Aushärten, wurden die Schnitte bei einer Vergrößerung von 2,5 abfotografiert und mit der Software ImageJ ausgewertet.

3.3.7. Durchflusszytometrie/ FACS der murinen Immunzellen

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden an dem Gerät FACS Verse der Firma BD durchgeführt.

Hierfür wurden aus den heparinisierten Blutproben der Versuchstiere zunächst die Leukozyten isoliert. Zur Vorbereitung der Isolation war die Herstellung einer Pufferlösung aus PBS, 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 2 % fetales Kälberserum (FCS) nötig. Das Vollblut wurde bei 300 G für 10 min bei 4° C zentrifugiert und im Anschluss vom Plasma befreit. Die Erythrozyten (RBC), sowie der Buffycoat wurden in 3 ml Ammoniumchlorid-Lösung aufgenommen und 5 min zum Lysieren inkubiert. Nach dem Verdünnen mit 10 ml Pufferlösung wurde, wie zuvor beschrieben, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RBC wurden weitere zweimal lysiert und im Anschluss einmal mit Puffer gewaschen.

Nach Aufnahme der Zellen in PBS wurde die Lösung aliquotiert und jeweils mit 25 µl FCR-Blocking-Solution (1:25 Verdünnung) und 1 µl ZombiAK versetzt. Nach 30 min Inkubationszeit bei 4° C im Dunkeln, erfolgte ein weiterer Zentrifugations- und Waschschrift. Daraufhin wurden die Antikörpermischungen (je 1:100 Verdünnung) (Tab.2) in jeweils ein Eppi pipettiert und für weitere 30 min bei 4° C inkubiert.

Nach einem weiteren Zentrifugations- und Waschvorgang, konnten die Proben in 200 µl FACS Flow (BD) aufgenommen und vermessen werden. Dabei wurden jeweils 10000 Events pro Probe aufgezeichnet. Die jeweiligen Anteile der Zellpopulationen konnten im Nachhinein mithilfe der Software FlowJo (FlowJo Software) bestimmt werden.

Tabelle 2: AK-Liste der verwendeten Panels der murinen FACS-Analysen

Panel 1	Panel 2
CD45 BV	CD45 PECy7
CD3 APC	CD11b Per-CP-Cy5.5
CD4 Per-CP- Cy5.5	F4/80 PE
CD8 APC Cy7	Ly6g FITC
CD19 FITC	Ly6c V450

3.3.8. Hämatologie

Die hämatologischen Untersuchungen erfolgten an dem Hämatologiegerät scil Vet abc (Scil Vet), welches uns von der ZETT der HHU Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurde. Für die Untersuchungen wurden den Versuchstieren zwei Tropfen Blut retroorbital entnommen und in EDTA beschichteten MiniCollect® Tubes gesammelt. Die Messungen verliefen nach Herstelleranweisung, sodass die gewonnenen Daten übertragen und ausgewertet werden konnten.

3.4. Statistische Analyse

Die erhobenen Rohdaten wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.) bearbeitet und zu Grafen verarbeitet. Aus den Einzelwerten wurden Mittelwerte berechnet und mit der Standardabweichung (S.D.) dargestellt. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden passend zur Zugehörigkeit als gepaarter oder ungepaarter t-Test berechnet. Der Vergleich zwischen mehr als zwei Gruppen untereinander wurde durch Zuhilfenahme des One-way ANOVA-Tests durchgeführt.

Für die Signifikanzprüfungen wurden Werte bis einschließlich 0,05 als positive Signifikanz bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Plättchenreaktivität unter RIVA

4.1.1. Thrombozytenfunktion unter RIVA

Für die Darstellung der Plättchenreaktivität unter dem Einfluss von RIVA wurde die Aggregationsfähigkeit der Proben mit verschiedenen Stimuli betrachtet. Es wurde mit ADP, Collagen und TRAP-6 stimuliert.

4.1.1.1. Vollblutaggregation unter RIVA

Zunächst wurde die Aggregation im Vollblut, welches mit Hirudin antikoaguliert wurde, mittels des MEA (Multiplate® Analyser, Roche) gemessen.

4.1.1.1.1. Querschnittsanalyse

Für die Querschnittsanalysen wurden Patienten mit einer bestehenden RIVA-Therapie, sowie RIVA-naive Patienten rekrutiert (Tab. 3).

4. Ergebnisse

Tabelle 3: Patientencharakteristika der rekrutierten Patienten; Angegeben in Mittelwert \pm S.D.

	OAK Zeitreihenanalyse Gruppe (N=37)	OAK Querschnittsanalyse Gruppe (N=53)	Kontrolle Gruppe (N=52)
Eigenschaften			
Alter (Jahren) –mean \pm S.D.	72.41 \pm 14.16	70.94 \pm 11.69	61.77 \pm 17.46
Männlich – Anzahl (%)	23 (62.2 %)	25 (47.2 %)	11 (21.2 %)
CHA2DS2-VASc – mean \pm S.D.	4.27 \pm 1.79	3.25 \pm 1.65	1.95 \pm 1.43 ^κ
Komorbiditäten – Anzahl (%)			
Vorhofflimmern	37 (100 %)	53 (100 %)	0 (0 %)
Raucher	4 (10.8 %)	11 (20.8 %)	5 (9.6 %)
CAD	26 (70.3 %)	13 (24.5 %)	3 (5.8 %) ^κ
pAVK	4 (10.8 %)	3 (5.7 %)	4 (7.7 %) ^κ
Herzfehler ^b	7 (18.9 %)	4 (7.5 %)	- ^κ
Hypertension	31 (83.8 %)	41 (77.4 %)	20 (38.5 %) ^κ
Hypercholesterinämie	23 (62.2 %)	18 (34.0 %)	8 (15.4 %) ^κ
Diabetes mellitus II	15 (40.5 %)	7 (13.2 %)	5 (9.6 %) ^κ
Medikation – Anzahl (%)			
Antikoagulation	37 (100 %)	53 (100 %)	0 (0 %)
ACE-Inhibitoren	12 (32.4 %)	20 (37.7 %)	4 (7.7 %) ^κ
AT1-Rezeptor-Antagonisten	9 (24.3 %)	18 (34 %)	3 (5.8 %) ^κ
Betablocker	30 (81.1 %)	46 (86.8 %)	10 (19.2 %) ^κ
Calciumrezeptor-Antagonisten	10 (27 %)	13 (24.5 %)	3 (5.8 %) ^κ
Diuretika	17 (45.9 %)	32 (60.4 %)	5 (9.6 %) ^κ
Aldosteronrezeptor-Antagonisten	14 (37.8 %)	14 (26.4 %)	- ^κ
Statine	25 (67.6 %)	22 (41.5 %)	10 (19.2 %) ^κ
Laborparameter - mean \pm S.D.			
Hämoglobin (g/dl)	11.89 \pm 2.12	12.65 \pm 2.49	13.71 \pm 1.53
Leukozyten (x1000/ μ l)	7.49 \pm 2.27	7.64 \pm 2.39	7.02 \pm 2.05
Thrombozyten (x1000/ μ l)	202.97 \pm 78.63	217.85 \pm 64.68	234.78 \pm 65.52
Fibrinogen (mg/dl)	366.06 \pm 98.09	298.13 \pm 83.34	- ^κ
Kreatinin (mg/dl)	1.18 \pm 0.48	1.12 \pm 0.29	1.02 \pm 0.76 ^κ
CRP (mg/dl)	3.49 \pm 5.18	2.00 \pm 4.04	0.89 \pm 1.08 ^κ

ACE= Angiotensin converting enzyme; AT=Angiotensin; CRP=C-reaktives Protein

^bHerzfehler wurde definiert als Ejektionsfraktion <40 %

^κ wurde nicht für alle Patienten bestimmt, für die Berechnung der Mittelwerte wurden die existierenden Einzelwerte verwendet, die fehlenden Werte wurden als nicht-vorhandene Werte verrechnet.

Bei der Stimulation mit ADP zeigte sich ein deutlicher Trend einer Reduktion der Aggregation in RIVA-Patienten. Die Aggregation fiel von einer AUC von $77,79 \text{ U} \pm 17,31 \text{ U}$ ($n = 19$) auf eine AUC von $68,28 \text{ U} \pm 15,5 \text{ U}$ ($n = 25$) ($p = 0,0621$) ab.

Mit der Stimulation von Collagen und TRAP-6 zeigten sich hier signifikante Abnahmen in der Aggregationsrate. Bei Collagen-Stimulation fiel die AUC von $85,16 \text{ U} \pm 15,95 \text{ U}$ ($n = 19$) auf $66,06 \text{ U} \pm 11,92 \text{ U}$ ($n = 17$) ($p = 0,0003$). Bei der Stimulation mit TRAP-6 reduzierte die RIVA-Behandlung die durchschnittliche AUC von $125,4 \text{ U} \pm 18,64 \text{ U}$ ($n = 19$) auf $102,5 \text{ U} \pm 25,02 \text{ U}$ ($n = 17$) ($p = 0,0035$) signifikant (Abb.17).

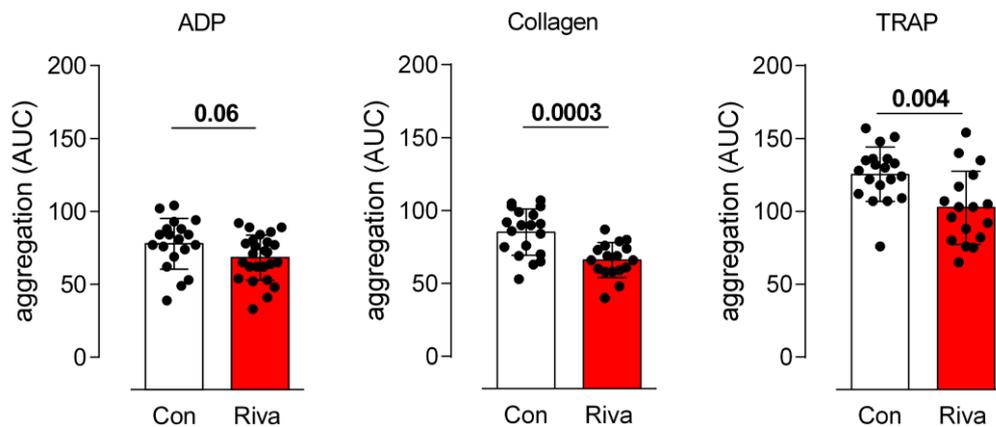


Abbildung 17: Vollblutaggregation von RIVA-naiven Patienten verglichen mit Patienten mit chronischer RIVA-Einnahme, stimuliert mit TRAP, Collagen und ADP

ADP stimulierte Vollblutaggregation: Con vs. RIVA $77,79 \text{ U} \pm 17,31 \text{ U}$ vs. $68,28 \text{ U} \pm 15,5 \text{ U}$, $n = 19$ vs. 25 , $p = 0,0621$; Collagen stimulierte Vollblutaggregation: Con vs. RIVA: $85,16 \text{ U} \pm 15,95 \text{ U}$ vs. $66,06 \text{ U} \pm 11,92 \text{ U}$, $n = 19$ vs. 17 , $p = 0,0003$; TRAP-6 stimulierte Vollblutaggregation: Con vs. RIVA: $125,4 \text{ U} \pm 18,64 \text{ U}$ vs. $102,5 \text{ U} \pm 25,02 \text{ U}$, $n = 19$ vs. 17 , $p = 0,0035$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.1.1.1.2. Zeitreihenanalyse

Da individuelle und krankheitsspezifische Einflüsse, wie zum Beispiel Herz-Rhythmus-Störungen, auf die Reaktivität der Plättchen einen großen Einfluss haben können, (68) wurden weitere Versuche durchgeführt, in welcher die Aggregation im Verlauf einer RIVA-Einnahme bei demselben Patienten untersucht wurde. Dadurch konnten die reinen Veränderungen der Plättchenfunktionen nach RIVA-Einnahme herausgestellt werden. Hierfür wurden Patienten akquiriert, welche die Erstdiagnose für VHF erhielten und mit RIVA neu therapiert werden sollten (Tab. 3). Es zeigte sich, dass das Blut, 4 h nach der initialen Gabe von RIVA, signifikant niedrigere Aggregationen aufwies, als vor der RIVA-Behandlung. Bei der Stimulation mit ADP fiel der Wert von $28,8 \text{ U} \pm 14,56 \text{ U}$ ($n = 10$) auf $24,7 \text{ U} \pm 14,21 \text{ U}$

(n = 10) (p = 0,0418). Die TRAP-6 Stimulation ließ die Reaktivität von 62,00 U ± 21,03 U (n = 9) auf 52,33 U ± 15,95 U sinken (p = 0,0146) (Abb.18).

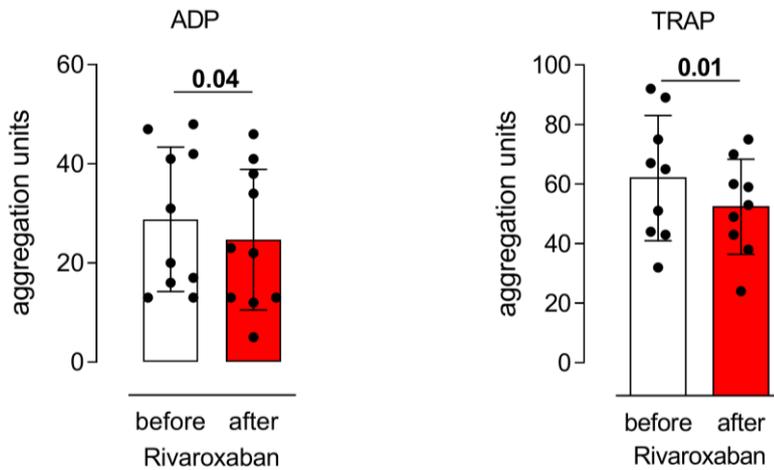


Abbildung 18: Vollblutaggregation vor und nach Ersteinnahme von RIVA, stimuliert mit ADP und TRAP-6.

ADP stimulierte Vollblutaggregation vor vs. nach RIVA-Einnahme: 28,8 U ± 14,56 U vs. 24,7 U ± 14,21 U, n = 10, p = 0,0418; TRAP-6 stimulierte Vollblutaggregation vor vs. nach RIVA-Einnahme: 62,00 U ± 21,03 U vs. 52,33 U ± 15,95 U, n = 9; p = 0,0146; angegeben in Mittelwert ± S.D.

4.1.1.2. LTA unter RIVA

Auch in den Aggregationsmessungen mit der LTA zeigten sich signifikant kleinere Aggregationsmaxima in den Blutproben 4 h nach RIVA-Gabe für alle drei Stimuli (ADP: 49,50 % ± 28,37 % zu 36,17 % ± 24,08 %, n = 19/19, p = 0,0265; Collagen: 72,62 % ± 27,24 % zu 60,69 % ± 29,73 %, n = 16/16, p = 0,0130; TRAP-6: 73,40 % ± 40,18 % zu 51,68 % ± 34,30 %, n = 13/13, p = 0,0394) (Abb.19).

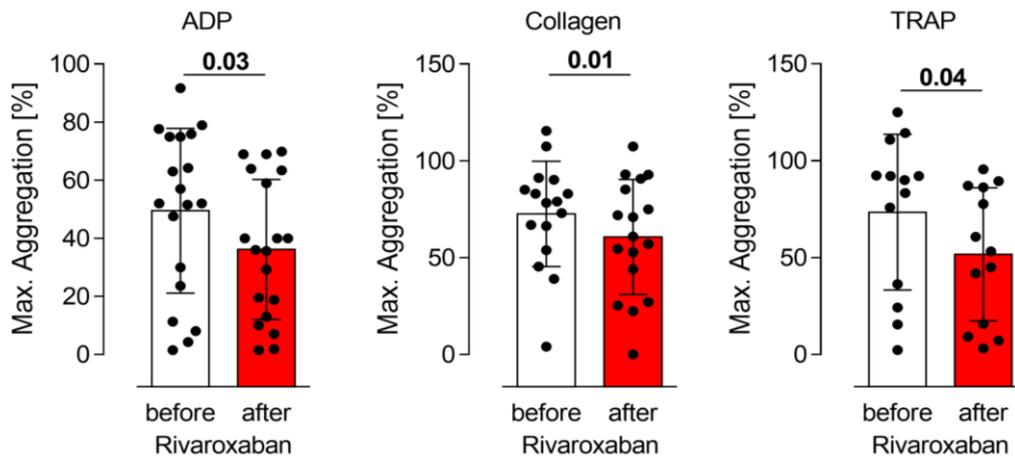


Abbildung 19: LTA vor und nach Ersteinnahme von RIVA, stimuliert mit ADP, Collagen und TRAP-6.

ADP stimulierte Aggregation in der LTA vor vs. nach RIVA-Einnahme: $49,50 \% \pm 28,37 \%$ vs. $36,17 \% \pm 24,08 \%$, $n = 19$, $p = 0,0265$; Collagen stimulierte Aggregation in der LTA vor vs. nach RIVA-Einnahme: $72,62 \% \pm 27,24 \%$ vs. $60,69 \% \pm 29,73 \%$, $n = 16$, $p = 0,0130$; TRAP-6 stimulierte Aggregation in der LTA vor vs. nach RIVA-Einnahme: $73,40 \% \pm 40,18 \%$ vs. $51,68 \% \pm 34,30 \%$, $n = 13$; $p = 0,0394$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.1.2. Thrombozytenadhäsion unter RIVA

Neben der Aggregationsfähigkeit spielte auch die Adhäsion der Thrombozyten eine große Rolle zur Beschreibung der Reaktivität von Thrombozyten. Hierfür wurde der Beginn der Thrombusformation unter physiologischeren Bedingungen in der Flusskammer, unter normierten Scherkräften dargestellt. Über Collagen beschichtete Flusskammern wurden dabei für 3 min bzw. 5 min bei 10 dyn/cm^2 mit Calcein AM gefärbtes Vollblut, mit laminarem bzw. pulsatilem Fluss, laufen gelassen. Anschließend konnte die Fläche, auf welcher die fluoreszierenden Plättchen adhärirt waren, bestimmt werden.

4.1.2.1. Querschnittsanalyse

4.1.2.1.1. Laminarer Fluss

Im Patientenkollektiv, welches mit RIVA behandelt wurde, ist bei einer kurzen laminaren Fließzeit von 3 min, im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein Trend zu einer kleineren Adhäsionsflächen auszumachen (Con. vs. RIVA: $3437 \mu\text{m}^2 \pm 3191 \mu\text{m}^2$ zu $2558 \mu\text{m}^2 \pm 1543 \mu\text{m}^2$; $n = 9/15$, $p = 0,3708$) (Abb.20).

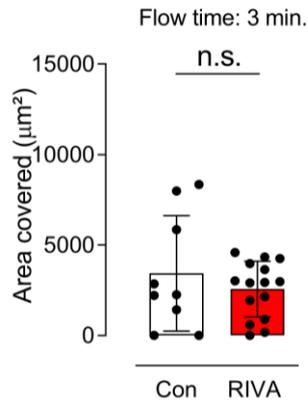


Abbildung 20: Thrombozytenadhäsion von RIVA-naiven und RIVA-Patienten, gemessen in der Flusskammer bei laminarem Fluss nach 3 min.

Im Bioflux gemessene Thrombozytenadhäsion auf collagenbeschichteten Platten bei Con. vs. RIVA-Patienten: $3437 \mu\text{m}^2 \pm 3191 \mu\text{m}^2$ vs. $2558 \mu\text{m}^2 \pm 1543 \mu\text{m}^2$; $n = 9$ vs. 15 , $p = 0,3708$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.1.2.1.2. Pulsatiler Fluss

Bei einem pulsatilen Fluss und einer Fließzeit von 5 min zeigten sich hier schon signifikante Unterschiede zu Gunsten der RIVA-Patienten. Die Fläche, die von Thrombozyten bedeckt war, betrug in der mit Riva-behandelten Gruppe signifikant kleinere Werte, als die in der Kontrollgruppe (Con. vs. RIVA: $5464 \mu\text{m}^2 \pm 2473 \mu\text{m}^2$ vs. $3156 \mu\text{m}^2 \pm 2042 \mu\text{m}^2$; $n = 8/16$, $p = 0,0234$) (Abb.21).

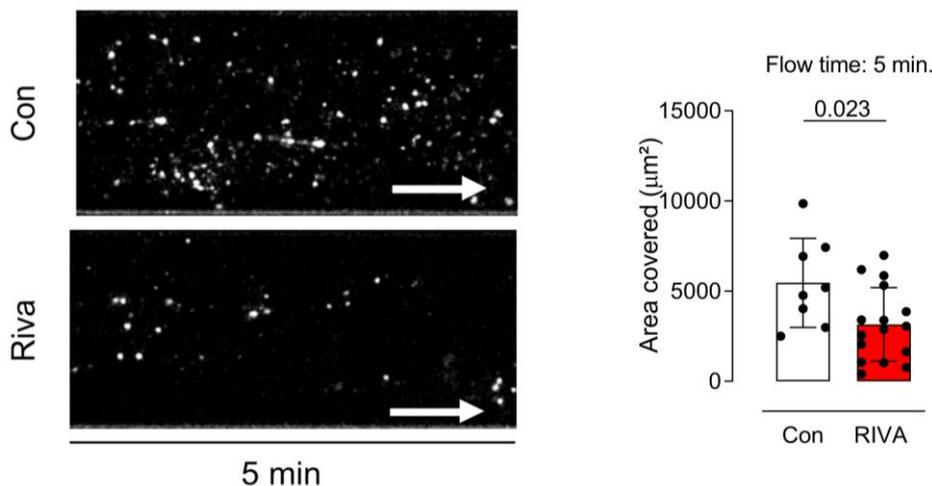


Abbildung 21: Thrombozytenadhäsion von RIVA-naiven und RIVA-Patienten, gemessen in der Flusskammer bei pulsatilem Fluss nach 5 min.

Im Bioflux gemessene Thrombozytenadhäsion auf collagenbeschichteten Platten bei Con. vs. RIVA-Patienten: $5464 \mu\text{m}^2 \pm 2473 \mu\text{m}^2$ vs. $3156 \mu\text{m}^2 \pm 2042 \mu\text{m}^2$, $n = 8$ vs. 16 , $p = 0,0234$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.1.2.2. Zeitreihenanalyse

Auch hier wurden die Versuche, analog zu den Aggregationsversuchen, bei Patienten mit Ersteinnahme des FXa-Hemmers vor und 4 h nach RIVA-Einnahme durchgeführt, um individuelle Effekte auszuschließen.

4.1.2.2.1. Laminarer Fluss

Dabei zeigten sich eindeutige Verringerungen in den Proben, welche post RIVA-Behandlung entnommen wurden. Hier sanken die Flächen der adhärenierten Thrombozyten bei laminarem Fluss von $4216 \mu\text{m}^2 \pm 1263 \mu\text{m}^2$ auf $2108 \mu\text{m}^2 \pm 1002 \mu\text{m}^2$ ($n = 4/4$; $p = 0,0089$) (Abb.22).

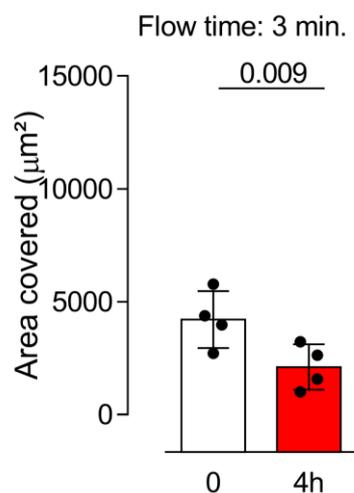


Abbildung 22: Thrombozytenadhäsion vor und nach RIVA-Ersteinnahme, gemessen in der Flusskammer bei laminarem Fluss nach 3 min.

Im Bioflux gemessene Thrombozytenadhäsion auf collagenbeschichteten Platten vor vs. nach RIVA-Einnahme: $4216 \mu\text{m}^2 \pm 1263 \mu\text{m}^2$ vs. $2108 \mu\text{m}^2 \pm 1002 \mu\text{m}^2$, $n = 4$ vs. 4 , $p = 0,0089$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.1.2.2.2. Pulsatiler Fluss

Dies ist auch bei 5 min pulsatilem Fluss zu sehen. Der mit Plättchen bedeckte Bereich betrug hier vor der RIVA-Einnahme $5798 \mu\text{m}^2 \pm 2322 \mu\text{m}^2$ und fiel dann signifikant auf $3031 \mu\text{m}^2 \pm 2607 \mu\text{m}^2$ ($n = 5/5$; $p = 0,0403$) ab (Abb.23).

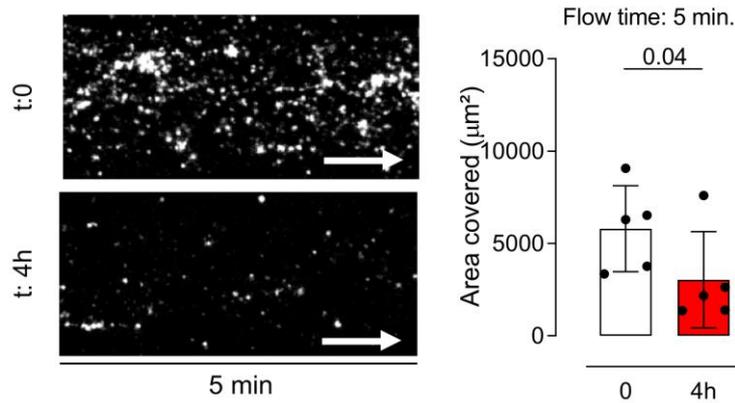


Abbildung 23: Thrombozytenadhäsion vor und nach RIVA-Ersteinnahme, gemessen in der Flusskammer bei pulsatilem Fluss nach 5 min.

Im Bioflux gemessene Thrombozytenadhäsion auf collagenbeschichteten Platten vor vs. nach RIVA-Einnahme: $5798 \mu\text{m}^2 \pm 2322 \mu\text{m}^2$ vs. $3031 \mu\text{m}^2 \pm 2607 \mu\text{m}^2$, $n = 5$ vs. 5 , $p = 0,0403$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.1.3. *In-vivo* Thrombusformation unter RIVA

Zusätzlich zu den humanen *in-vitro*-Analysen, wurde die Thrombusformation *in-vivo* bei Mäusen untersucht. Hierfür führten die Kooperationspartner der Arbeitsgruppe um Dr. med. Petzold aus der LMU folgende Versuche durch. Untersucht wurden zwei Versuchsgruppen, wovon eine Gruppe RIVA und die andere lediglich das Lösungsmittel in welchem RIVA gelöst wurde, verabreicht bekam. Die Applikation erfolgte p.o. über eine Gavage der Substanzen. Nach Induktion einer Verletzung der Arteria carotis communis durch Applikation eines mit Fe-(III)-chlorid getränkten Gewebes, wurden Aufzeichnungen der Thrombusformation mithilfe eines Intravitalmikroskops durchgeführt.

4.1.3.1. Thrombusformation

Die Thrombusformation bei RIVA-behandelten Mäusen zeigte in der Untersuchung mittels Intravitalmikroskopie sichtbare Unterschiede in der Bildungsgeschwindigkeit und der Thrombusgröße nach 60 min (Abb.24).

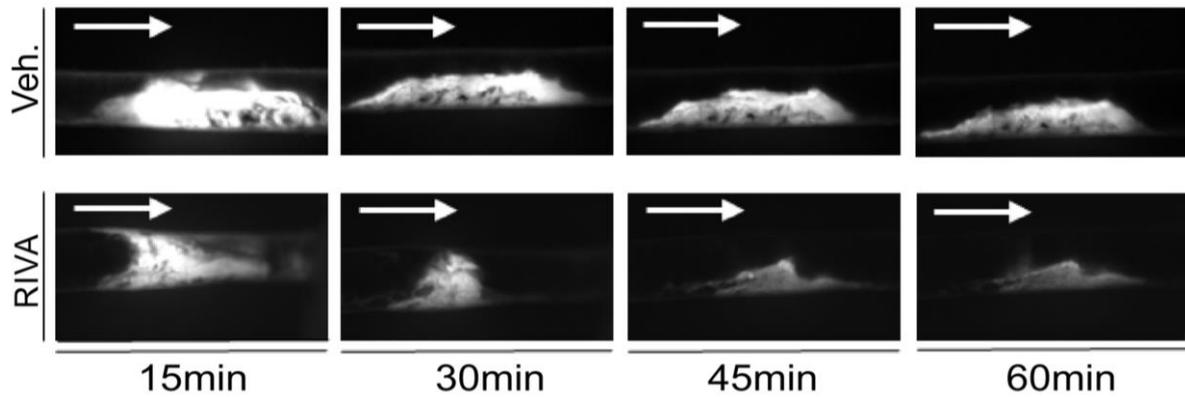


Abbildung 24: In-vivo Thrombusformation in der Arteria carotis communis im Laufe der Zeit, bei einer mit Vehikel- oder RIVA-behandelten Maus.

Intravitalmikroskopische Untersuchung der Thrombusformation im Verlauf einer Stunde. (Daten und Abb, zur Verfügung gestellt von Petzold et al.)

4.1.3.2. Zeit bis zur Okklusion

In der Zeit bis zur ersten Okklusion war ein deutlicher Trend bei RIVA-behandelten Mäusen zu sehen. Bei diesen kommt es mit durchschnittlich $1822 \text{ s} \pm 1571 \text{ s}$ statt $769 \text{ s} \pm 682 \text{ s}$ zu späteren Okklusionen als bei den Vergleichstieren ($n = 12/10$; $p = 0,06$) (Abb.25).

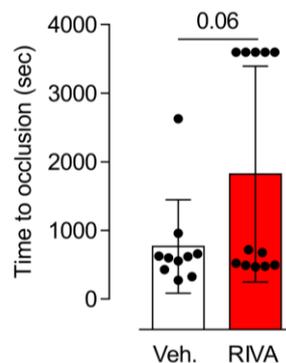


Abbildung 25: Zeit bis zur ersten Okklusion bei Vehikel- vs. RIVA-behandelten Mäusen.

Gemessene Zeit bis zur ersten Okklusion der Arteria carotis communis bei Vehikel vs. RIVA-behandelter Mäuse: $769 \text{ s} \pm 682 \text{ s}$ vs. $1822 \text{ s} \pm 1571 \text{ s}$, $n = 10$ vs. 12 , $p = 0,06$; angegeben in Mittelwert \pm S.D. (Daten und Abb, zur Verfügung gestellt von Petzold et al.)

4.1.3.3. Fragmentierung des Thrombus

Bei der Anzahl der Thrombusfragmente, welche sich lösten, sah man mit $2,1$ Teilchen pro $h \pm 1,04$ zu $5,0$ Teilchen pro $h \pm 2,0$, eine signifikante Erhöhung der Fragmentanzahl in der Versuchsgruppe, welche mit RIVA geschlundet wurde ($n = 11/7$; $p < 0,001$) (Abb.26).

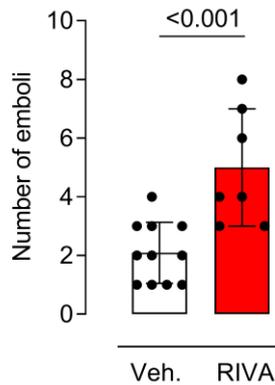


Abbildung 26: Teilchenanzahl der Thrombusfragmente in Vehikel- und RIVA-behandelter Mäuse.

Fragmentzahl der sich pro h vom Thrombus lösender Teilchen, bei Veh vs. RIVA- behandelte Mäuse: 2,1 Teilchen pro h \pm 1,04 vs. 5,0 Teilchen pro h \pm 2,0, n = 11 vs. 7; $p < 0,001$; angegeben in Mittelwert \pm S.D. (Daten und Abb, zur Verfügung gestellt von Petzold et al.)

4.1.3.4. Histologie des Thrombus

Betrachtet man die gewonnenen Thromben genauer, unter histologischen Aspekten, waren auch hier große Unterschiede zwischen den Gruppen zu sehen.

4.1.3.4.1. Fibrinogen auf der Thrombusoberfläche

Im Vergleich der Thromben auf den Fibrinogenanteil, waren bei den unbehandelten Mäusen mit einem Flächenanteil von durchschnittlich 46,24 % \pm 10,30 %, wesentlich höhere Fibrinogenbereiche, als bei den RIVA-behandelten Tieren, zu sehen (29,02 % \pm 11,38 %, n = 5/7; $p = 0,023$) (Abb.27).

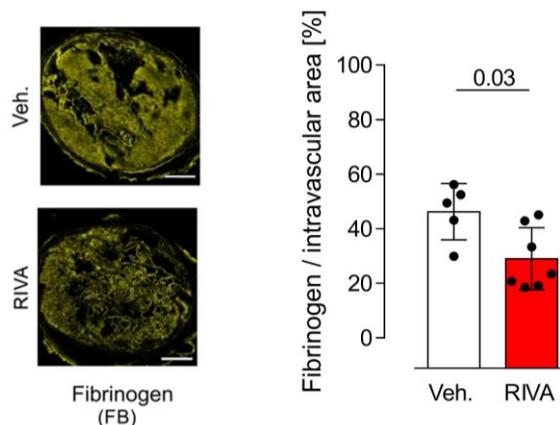


Abbildung 27: Fibrinogen auf der Oberfläche des Thrombus von Kontrollen und RIVA-behandelten Mäusen.

Thrombus, in welcher das Fibrinogen angefarbt wurde; prozentualer Anteil der gefärbten Fläche bei Veh. vs. RIVA-behandelter Mäuse: 46,24 % \pm 10,30 % vs. 29,02 % \pm 11,38 %, n = 5 vs. 7, $p = 0,023$; angegeben in Mittelwert \pm S.D. (Daten und Abb, zur Verfügung gestellt von Petzold et al.)

4.1.3.4.2. Thrombozyten auf der Thrombusoberfläche

Bei Betrachtung der Thrombusoberfläche hinsichtlich der Adhäsion von Plättchen, war auch hier eine signifikante Reduktion der Fläche bei RIVA-behandelten Tieren zu verzeichnen (Con. vs. RIVA: 44,78 % ± 3,22 % vs. 31,95 % ± 9,34 %; n = 5/7; p = 0,016).

In der Überlagerung der einzelnen histologisch gefärbten und abfotografierten Bilder, war im Vergleich eindeutig zu erkennen, dass der Thrombus bei RIVA-behandelten Tieren eine höhere Porosität aufwies (Abb.28).

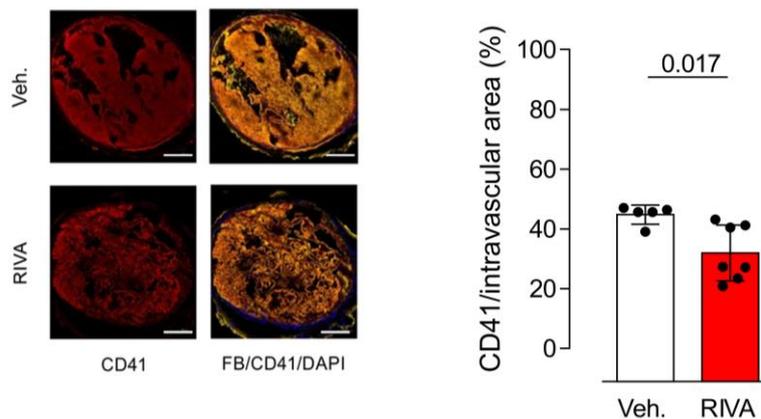


Abbildung 28: Plättchen auf der Oberfläche des Thrombus von Vehikel- und RIVA-behandelten Mäusen.

Abbildung des Thrombus, in welcher die Plättchen angefärbt wurden; prozentualer Anteil der gefärbten Fläche bei Vehikel- vs. RIVA-behandelter Mäuse: 44,78 % ± 3,22 % vs. 31,95 % ± 9,34 %, n = 5 vs. 7, p = 0,016 angegeben in Mittelwert ± S.D; Daneben Überlagerung der Abbildungen. (Daten und Abb, zur Verfügung gestellt von Petzold et al.)

4.1.4. Thrombozytenreaktivität unter Faktor Xa

Weiterhin wurde untersucht, ob die bisher gefundenen Effekte von RIVA auf die FXa-inhibierenden Eigenschaften zurückzuführen waren, sodass im Folgenden die Reaktivität der Thrombozyten in Anwesenheit von FXa überprüft werden konnte.

4.1.4.1. Im Vollblut

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die AUC, gemessen am Multiplate®, für welches Blut freiwilliger Probanden hergenommen wurde, nach Hinzugabe von 10 µg/ml FXa signifikant anstieg und es zu einer Aktivierung der Thrombozyten durch FXa kam. (Veh. vs. FXa: 18,25 U ± 9,95 U vs. 22,75 U ± 11,15 U; n = 4/4; p = 0,023) (Abb.29).

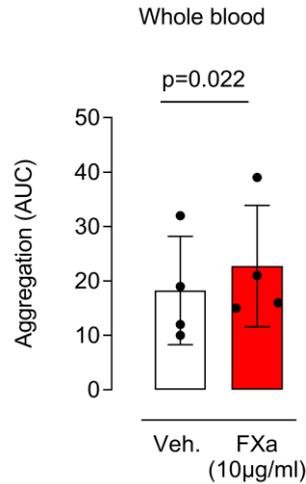


Abbildung 29: Vollblutaggregation mit FXa-Stimulation.

Vehikel vs. FXa stimulierte Vollblutaggregation: $18,25 \text{ U} \pm 9,95 \text{ U}$ vs. $22,75 \text{ U} \pm 11,15 \text{ U}$, $n = 4$ vs. 4, $p = 0,023$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.1.4.2. Konzentrationsabhängige Reaktivität in gewaschenen Plättchen

Dass die Reaktivität der Plättchen, abhängig von der Konzentration von FXa war, sollte anhand einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) gezeigt werden. Um einen möglichen Einfluss von im Plasma vorhandenen Proteinen oder Ähnlichem auszuschließen, wurden die Versuche mittels der LTA in WP durchgeführt. Bei der Stimulation der Plättchen mit einer FXa-Konzentration von 13 ng/ml betrug das Maximum der Aggregation (MoA) $14,96 \% \pm 31,44 \%$. Diese stieg mit Erhöhung der Konzentration von FXa weiter an. So führten die FXa-Konzentrationen von 26 ng/ml, 39 ng/ml und 52 ng/ml zu einer MoA von $18,40 \% \pm 34,10 \%$, $62,24 \% \pm 33,30 \%$ und $66,91 \% \pm 28,86 \%$ ($n = 5$; $p = 0,0322$) (Abb.30).

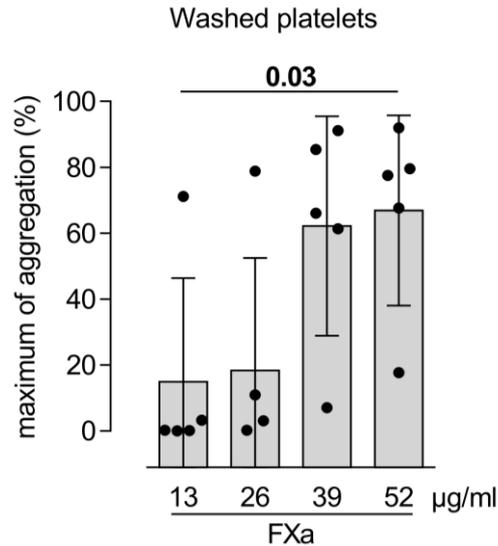


Abbildung 30: Plättchenaggregation in LTA mit gewaschenen Plättchen nach Stimulation mit FXa.

FXa-stimulierte Aggregation in LTA mit 13 µg/ml, 26 µg/ml, 39 µg/ml oder 52 µg/ml FXa: 14,96 % ± 31,44 % vs. 18,40 % ± 34,10 % vs. 62,24 % ± 33,30 % vs. 66,91 % ± 28,86 %, n = 5, p = 0,0322; angegeben in Mittelwert ± S.D.; Signifikanz berechnet durch one-way Anova-Test

4.1.4.3. Konzentrationsabhängige Hemmung der Reaktivität mit RIVA

Auch die Hemmung der Aggregation, konnte durch eine Konzentrationserhöhung des FXa-Inhibitors RIVA erhöht werden. Dies wurde anhand einer KWK von RIVA, ebenfalls in gewaschenen Plättchen, gezeigt. Dabei betrug das MoA ohne RIVA 34,54 % ± 9,98 % und fiel mit steigender RIVA-Konzentration ab (3 pM RIVA: MoA = 9,69 % ± 9,47 %; 100 pM RIVA: MoA = 0,51 % ± 0,78%; 300 pM RIVA: MoA = 0,04 % ± 0,05 %; n = 4; p < 0,0001) (Abb.31).

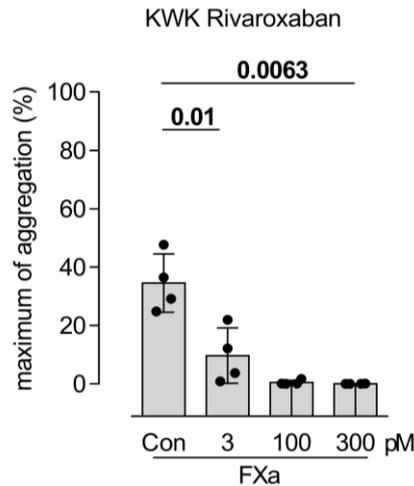


Abbildung 31: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von RIVA gemessen in der LTA mit vorinkubierten, gewaschenen Plättchen nach Stimulation mit FXa.

Konzentrationsabhängige Hemmung der FXa-stimulierten (35 µg/ml) Aggregation in der LTA: 34,54 % ± 9,98 % vs. 9,69 % ± 9,47 % vs. 0,51 % ± 0,78 % vs. 0,04 % ± 0,05 %; n = 4, p < 0,0001; angegeben in Mittelwert ± S.D.; Signifikanz berechnet durch one-way Anova-Test.

4.1.4.4. Intrazelluläres Calcium-Signaling

Für die Untersuchung des Signalweges wurde die Ca²⁺-Freisetzung aus Plättchen nach Stimulation mit 32 µM TRAP-6 oder 10 µg/ml FXa zu zwei Zeitpunkten bestimmt. Nach Stimulation wurde die durchflusszytometrische Messung 60 s und 120 s später durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass nach einer Stimulation der Plättchen mit dem starken Stimulus TRAP-6, das Ca²⁺-Signal im Vergleich zu unstimulierten Proben rasch von 0,245 % ± 0,070 % auf 88,55 % ± 3,48 % stark anstieg, um dann nach 120 s wieder auf 47,74 % ± 6,79 % abzufallen. Eine vorherige Inhibition des PAR-1 mit VORA, hemmte diese Reaktion, sodass nach 60 s nur noch ein Signal von 4,58 % ± 2,37 % (n = 4; p ungehemmt vs. gehemmt < 0,01) zu beobachten war und nach 120 s weiter auf 3,73 % ± 1,44 % abfiel.

Eine Stimulation mit 10 µg/ml FXa führte zwar nicht zu einer sehr starken Aktivierung der Plättchen und dadurch zu keinem vergleichbar hohen Anstieg des Ca²⁺-Signals, wie der starke PAR-1-Stimulator TRAP-6. Aber mit einem Signal von 15,18 % ± 3,35 % war trotzdem eine Aktivierung der Plättchen und das Freiwerden von intrazellulärem Calcium zu beobachten. Auch hier fiel nach 120 s die Ca²⁺-Freisetzung wieder ab und erreicht einen Wert von 7,87 % ± 2,01 %. Die Inkubation mit VORA im Vorhinein, führte analog zur TRAP-6-Stimulation zu einer starken Reduktion des Signals, sodass nach 60 s nur noch ein 0,723 %iger ± 0,302 % Anteil an Ca²⁺ positiven Zellen zu messen war (n = 4; p ungehemmt vs. gehemmt < 0,01). Diese fiel im Laufe der Zeit weiter ab und war nach 120 s mit 0,483 % ± 0,218 % nur noch minimal messbar (Abb.32).

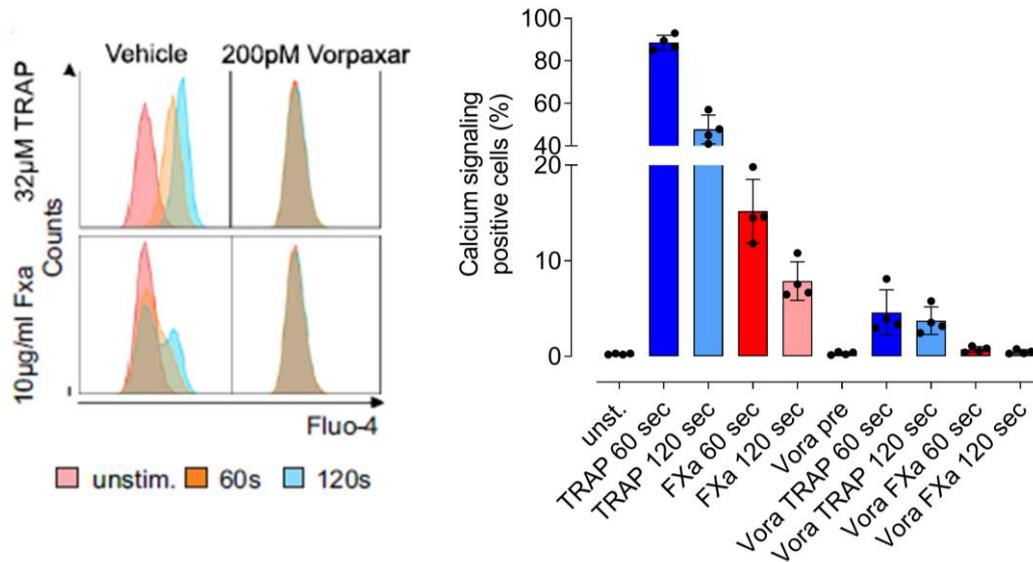


Abbildung 32: Calciumsignaltransduktion nach Stimulation mit FXa oder TRAP-6 mit und ohne Vorinkubation mit Vorapaxar.

Durchflusszytometrische Analysen des Ca^{2+} -Signals ohne Stimulation, mit TRAP-6- ($32 \mu\text{M}$) oder FXa-Stimulation ($10 \mu\text{g/ml}$) und deren Inhibition mit 200 pM Vorapaxar: unstimuliert $0,245 \% \pm 0,070 \%$; TRAP-6 60 s: $88,55 \% \pm 3,48 \%$; TRAP-6 120 s: $47,74 \% \pm 6,79 \%$; FXa 60 s: $15,18 \% \pm 3,35 \%$; FXa 120 s: $7,87 \% \pm 2,01 \%$; VORA unstimuliert: $0,318 \% \pm 0,163 \%$; VORA TRAP-6 60 s: $4,58 \% \pm 2,37 \%$; VORA TRAP-6 120 s: $3,73 \% \pm 1,44 \%$; VORA FXa 60 s: $0,723 \% \pm 0,302 \%$; VORA FXa 120 s: $0,483 \% \pm 0,2185 \%$, $n = 4$; p (TRAP-6 60 s vs. VORA TRAP-6 60 s) $< 0,01$; p (FXa 60 s vs. VORA FXa 60 s) $< 0,01$; angegeben in Mittelwert \pm S.D. (Daten und Abb, zur Verfügung gestellt von Petzold et al.)

4.1.4.5. P-Selektin-Expression

Durch die Aktivierung von Thrombozyten werden Oberflächenproteine exprimiert, welche durch FACS Analysen quantifiziert werden konnten. Auch hier zeigten sich konzentrationsabhängige Veränderungen. In den Kontrollproben, ohne FXa-Stimulation, betrug der Anteil an P-Selektin-positiven Zellen $3,70 \% \pm 0,99 \%$. Die Anwesenheit von $0,3 \text{ nM}$ FXa führte zu einer Erhöhung der P-Selektin-Expression auf $6,09 \% \pm 0,58 \%$. Diese stieg weiter an, wenn die Konzentration von FXa auf 3 nM und 30 nM erhöht wurde. Dabei erhöhte sich der Anteil an positiven Zellen für den Oberflächenmarker auf $14,16 \% \pm 0,09 \%$ bzw. $94,48 \% \pm 0,79 \%$ ($n = 5$; $p < 0,0001$) (Abb.33).

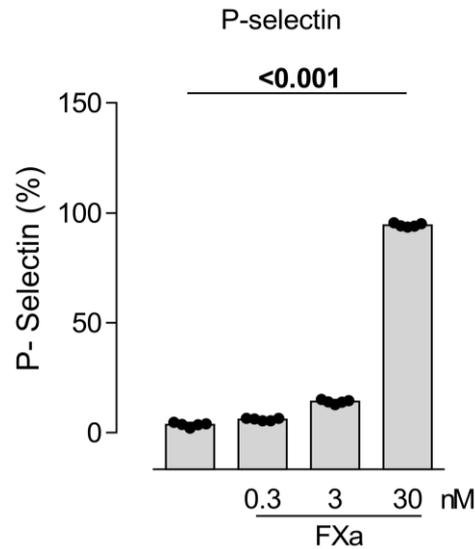


Abbildung 33: P-Selektin-Expression auf Plättchen, ohne und mit Stimulation mit FXa, gemessen durch FACS-Analysen.

Expression von P-Selektin nach FXa Stimulation (0,3 nM, 3 nM oder 30 nM) gemessen mittels Durchflusszytometrie: 3,70 % ± 0,99 % vs. 6,09 % ± 0,58 % vs. 14,16 % ± 0,09 % vs. 94,48 % ± 0,79 %, n = 5, p < 0,001; angegeben in Mittelwert ± S.D.; Signifikanz berechnet durch one-way Anova-Test

4.1.4.6. ICAM-2-Expression

Ein weiteres Oberflächenprotein, welches bei der Aktivierung der Plättchen hoch exprimiert wird, ist das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-2. Auch hier führte eine Erhöhung der FXa-Konzentration zu einer signifikanten Steigerung der Expression an der Oberfläche der Blutplättchen. Im Vergleich zu den Kontrollproben ohne Stimulation, stiegen die Werte bei einer 0,3 nM Zugabe von FXa auf 1,11 % ± 0,085 %. Bei einer Erhöhung der FXa-Konzentration auf 3 nM stieg die Expression auf 1,26 % ± 0,075 % und erreichte bei der Stimulation mit 30 nM FXa eine ICAM-2-Expression von 3,54 % ± 1,21 % (n = 5; p < 0,0001) (Abb.34).

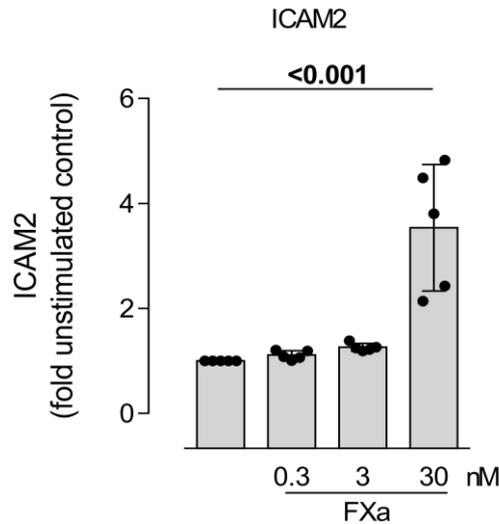


Abbildung 34: ICAM-2-Expression auf Plättchen, ohne und mit Stimulation mit FXa, gemessen durch FACS-Analyses.

Expression von ICAM-2 nach FXa-Stimulation (0,3 nM, 3 nM oder 30 nM) gemessen mittels Durchflusszytometrie: 1 % ± 0,0 % vs. 1,11 % ± 0,08 % vs. 1,26 % ± 0,075 % vs. 3,54 % ± 1,21 %, n = 5, p < 0,001; angegeben in Mittelwert ± S.D.; Signifikanz berechnet durch one-way Anova-Test

4.1.4.7. CD40L-Expression

Das Membranprotein CD40L dient als Ligand des CD40-Proteins für antigenpräsentierende Zellen. Auch hier zeigten sich Hochregulierungen nach Aktivierung der Plättchen mit FXa. Das Stimulieren mit 0,3 nM FXa erhöhte die Expression von 1,00 % auf 1,11 % ± 0,19 %. Bei einer Erhöhung der FXa-Konzentration um das Zehnfache, erhöhte sich die Expression des Membranproteins mit 1,64 % ± 0,07 % mäßig. Die Konzentrationserhöhung des FXa auf 30 nM zeigte hingegen einen starken Anstieg der CD40L-positiven Plättchen, sodass ein Anteil von 7,91 % ± 2,32 % erreicht wurde (n = 5; p < 0,0001) (Abb.35).

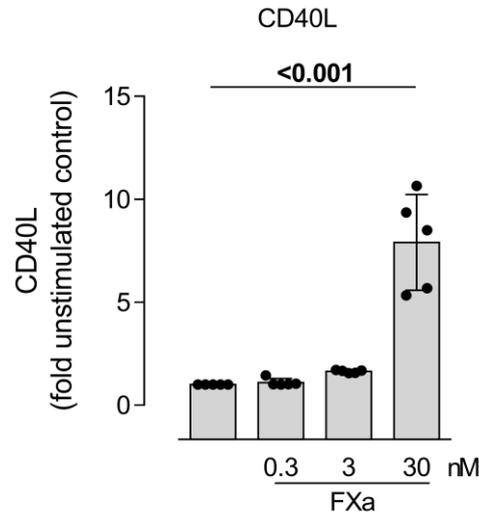


Abbildung 35: CD40L-Expression auf Plättchen, ohne und mit Stimulation mit FXa, gemessen durch FACS -Analysen.

Expression von CD40L nach FXa-Stimulation (0,3 nM, 3 nM oder 30 nM) gemessen mittels Durchflusszytometrie: 1,00 % ± 0,0 % vs. 1,11 % ± 0,19 % vs. 1,64 % ± 0,07 % vs. 7,91 % ± 2,32 %, n = 5, p < 0,001; angegeben in Mittelwert ± S.D.; Signifikanz berechnet durch one-way Anova-Test

4.1.5. Veränderungen der PAR-Expression

Wie bereits durch Achilles et al. gezeigt wurde, führte die Behandlung von Patienten mit dem FII-Hemmer Dabigatran, zu einer Erhöhung der Expression des PAR-1 bzw. PAR-4. (35) Ob dieser Effekt auch bei der Hemmung von FXa auftritt, wurde mithilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen geprüft.

4.1.5.1. PAR-1

Anhand der gemessenen Werte stellten sich bei der Behandlung mit RIVA jedoch keine Unterschiede in der PAR-1-Expression heraus. Mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von $1299 \pm 313,5$ war die Dichte des PAR-1 auf nahezu demselben Wert, wie die der Kontrollproben, die eine MFI von $1368 \pm 387,0$ (n = 7; p = 0,36) aufwiesen (Abb.36).

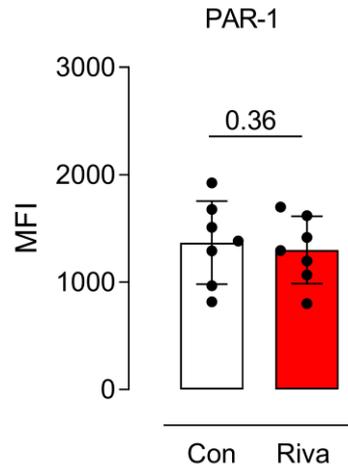


Abbildung 36: PAR-1-Dichte ohne und mit RIVA-Behandlung

PAR-1-Expression auf den Plättchen, gemessen in der Durchflusszytometrie: Con. vs. RIVA $1368 \pm 387,0$ vs. $1299 \pm 313,5$, $n = 7$, $p = 0,36$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.1.5.2. PAR-4

Auch die Expression des PAR-4 blieb mit einer MFI von $614,9 \pm 107,7$ zu $593,0 \pm 95,37$ im Vergleich zwischen Kontrolle und RIVA-Behandlung, nahezu auf demselben Level ($n = 7$; $p = 0,11$) (Abb.37).

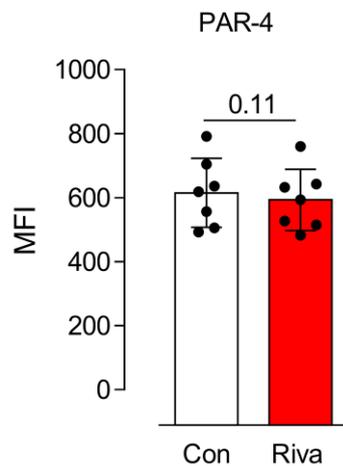


Abbildung 37: PAR-4-Dichte ohne und mit RIVA-Behandlung

PAR-4-Expression auf Plättchen, gemessen in der Durchflusszytometrie: Con. vs. RIVA: $614,9 \pm 107,7$ vs. $593,0 \pm 95,37$, $n = 7$, $p = 0,11$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.1.6. Direkter Effekt von FXa auf PAR-1

Obwohl kein Einfluss auf die Expression der PAR-1 bestand, war jedoch ein direkter Effekt auf diese zu beobachten.

4.1.6.1. Plättchenreaktivität unter Faktor Xa und Vorapaxar

VORA ist ein direkter PAR-1-Antagonist. Es zeigte sich, dass eine Vorbehandlung mit VORA den plättchenaktivierenden Effekt des FXa herabsetzte. Bei einer konstanten Stimulation von FXa sank der MoA-Wert dabei bei einer Konzentration von 30 pM VORA von 46,06 % \pm 26,28 % auf 10,90 % \pm 18,34 %. Die Erhöhung der VORA-Konzentration auf 100 pM bzw. 300 pM, ließ die Aggregation weiter auf 4,41 % \pm 6,74 % bzw. 3,82 % \pm 6,22 % sinken (n = 4; p = 0,01). Dadurch ließ sich zeigen, dass FXa über eine direkte Aktivierung des PAR-1 zu einer Aktivierung der Plättchen fähig war (Abb.38).

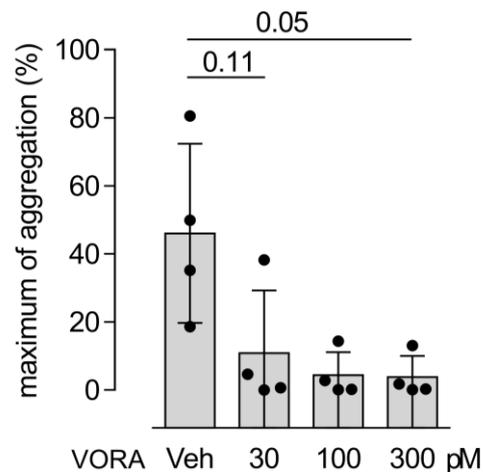


Abbildung 38: FXa stimulierte Aggregation mit LTA nach Vorinkubation mit Vehikel oder Vorapaxar.

Konzentrationsabhängige Hemmung der FXa-stimulierten Aggregation. Vehikel vs. 30 pM vs. 100 pM vs. 300 pM Vorapaxar: 46,06 % \pm 26,28 % vs. 10,90 % \pm 18,34 % vs. 4,41 % \pm 6,74 % vs. 3,82 % \pm 6,22 %; angegeben in Mittelwert \pm S.D.; Signifikanz berechnet durch one-way Anova-Test.

4.1.6.2. LC/MS-MS Messungen der Spalt-Produkte

Für die Darstellung der Bindungsstellen, an welcher FXa mit dem PAR-1 in Wechselwirkung trat, wurden, mithilfe von LC/MS-MS, Untersuchungen durchgeführt, in welcher nach den Spaltprodukten gesucht wurde. Hierbei wurde der extrazelluläre Teil des PAR-1-Peptids, der für die Aktivierung des Rezeptors zuständig war, synthetisiert und mit FXa versetzt. Im Anschluss konnten die Produkte aufgrund ihrer Größe und Eigenschaften in der LC/MS-MS aufgetrennt und identifiziert werden. Dabei stellte sich die Bindung zwischen Arginin, an der Stelle 41 der PAR-1-Proteinkette, und dem benachbarten Serin⁴² als Angriffspunkt des FXa heraus. Demgegenüber waren keine Interaktionen zwischen FXa und dem PAR-4 zu beobachten (Abb.39).

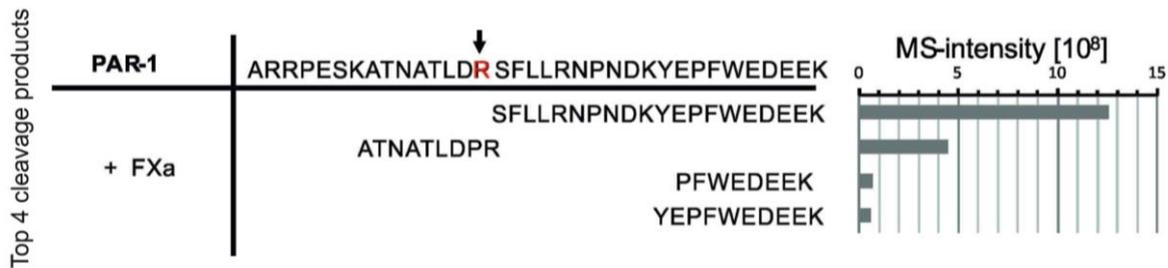


Abbildung 39: Spaltprodukte der Interaktion von PAR-1 mit FXa und dessen Intensität im Massenspektrometer.

Synthetisierte extrazelluläre Proteinkette des PAR-1, versetzt mit FXa und anschließender Messung der Spaltprodukte in der Massenspektrometrie. Gefundener Angriffspunkt entspricht Arg⁴¹-Ser⁴². (69) (Daten und Abb, zur Verfügung gestellt von Petzold et al.)

4.1.7. Intrazelluläre Signaltransduktion

Um weitere Informationen zum Signalweg von FXa zu erhalten, wurden einige bekannte intrazelluläre Enzyme gehemmt. Dadurch konnte durch Veränderungen in der Aggregationsfähigkeit herausgestellt werden, welche Signalwege bei einer Stimulation mit FXa beteiligt waren. Bei der Hemmung der PI3K fiel die MoA bei FXa-Stimulation von $68,34 \% \pm 28,19 \%$ in der Kontrollgruppe auf $50,18 \% \pm 41,66 \%$ ($n = 6$; $p = 0,03$) in den PI3K-inhibierten Proben ab. Die Hemmung der ROCK führte zu keiner Veränderung der Aggregation (MoA= $65,72 \% \pm 29,8 \%$; $n = 6$; $p = 0,54$). In Anwesenheit des PLC-Inhibitors zeigte sich wiederum eine signifikant verminderte Aggregation von $20,54 \% \pm 31,97 \%$ ($n = 6$; $p = 0,02$). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Enzyme PI3K und PLC eine wesentliche Rolle in der Aktivierung der Thrombozyten mit FXa spielten.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Versuche mit dem bekannten PAR-1-Agonisten TRAP-6 wiederholt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition der PI3K und der PLC eine signifikant reduzierte Aggregation zu beobachten war. Die alleinige TRAP-6-Stimulation führte dabei zu einer durchschnittlichen Aggregation von $39,89 \% \pm 33,21 \%$. Diese fiel bei der Inhibition der PI3K auf $22,79 \% \pm 19,92 \%$ ($n = 5$; $p = 0,02$) ab. Die Inhibition von ROCK veränderte auch hier nichts an der Intensität der Aggregation. Diese blieb mit $44,75 \% \pm 28,46 \%$ etwa auf demselben Level, wie die Kontrolle. Ebenso wie in der FXa-Stimulation, sank die Aggregation nach PLC-Inhibition auf $24,70 \% \pm 23,50 \%$ ab ($n = 5$, $p = 0,05$) (Abb.40).

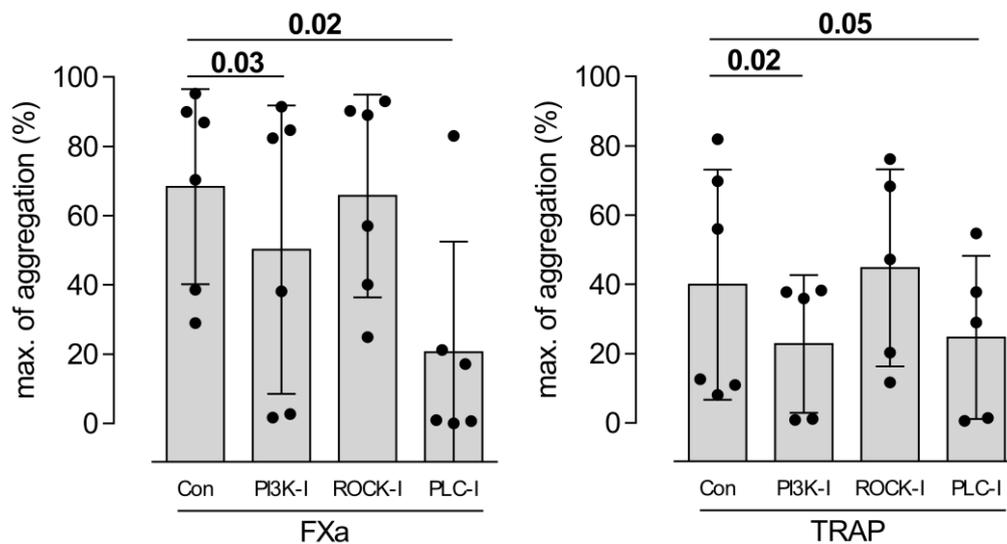


Abbildung 40: FXa- und TRAP-6 stimulierte Aggregation in der LTA nach Vorinkubation mit PI3K-, ROCK- oder PLC-Inhibitoren.

Durch Inhibition verschiedener Enzyme determinierter Signalwege, die bei einer PAR-1-Stimulation mit FXa oder TRAP-6 beteiligt waren. Con. vs. PI3K-I. vs. ROCK-I. vs. PLC-I. bei FXa Stimulation: $68,34 \% \pm 28,19 \%$ vs. $50,18 \% \pm 41,66 \%$ vs. $65,72 \% \pm 29,8 \%$ vs. $20,54 \% \pm 31,97 \%$, $n = 6$, $p(\text{Con vs. PI3K-I}) = 0,03$, $p(\text{Con vs. PLC-I}) = 0,02$; Con. vs. PI3K-I. vs. ROCK-I. vs. PLC-I. bei TRAP-6 Stimulation: $39,89 \% \pm 33,21 \%$ vs. $22,79 \% \pm 19,92 \%$ vs. $44,75 \% \pm 28,46 \%$ vs. $24,70 \% \pm 23,50 \%$, $n = 5$, $p(\text{Con vs. PI3K-I}) = 0,02$, $p(\text{Con vs. PLC-I}) = 0,05$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.1.8. Prästimulation und Verifizierung des Signalweges

Für die weitere Untersuchung des Signalweges, wurde eine Prästimulation der Plättchen, durch Zugabe einer subaggregatorischen Konzentration von FXa durchgeführt. Die MoA stieg dabei, im Vergleich zur Kontrolle ohne Stimulus, von $4,95 \% \pm 8,42 \%$ auf nur $14,09 \% \pm 10,08 \%$ ($n = 4$; $p = 0,24$). Durch Zentrifugation wurden die Plättchen im Anschluss isoliert, sodass die Konzentration der phosphorylierten PI3K, sowie die DAG- und IP3-Level bestimmt werden konnten. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede in den PI3K- sowie DAG-Konzentrationen. Der phosphorylierte PI3K-Wert stieg im Vergleich zur Kontrolle von $214,1 \text{ pg/ml} \pm 8,17 \text{ pg/ml}$ auf $240,30 \text{ pg/ml} \pm 19,02 \text{ pg/ml}$ ($n = 4$; $p = 0,034$). Die DAG-Level erhöhten sich signifikant von $30,37 \text{ pg/ml} \pm 7,83 \text{ pg/ml}$ auf $35,83 \text{ pg/ml} \pm 5,83 \text{ pg/ml}$ ($n = 4$; $p = 0,042$). Auch die IP3-Konzentration erhöhte sich signifikant. ($73,00 \text{ pg/ml} \pm 7,55 \text{ pg/ml}$ vs. $78,67 \text{ pg/ml} \pm 9,018 \text{ pg/ml}$; $n = 3$; $p = 0,042$). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die FXa-stimulierte Aggregation, über die PI3K- und den PLC-Signalwege verliefen (Abb.41).

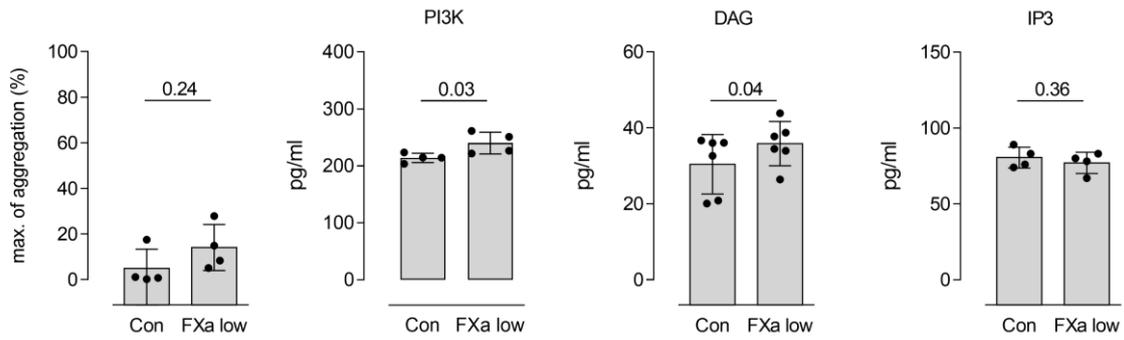


Abbildung 41: Prästimulation der Plättchen mit einer subaggregatorischen Dosis von FXa. pPI3K-, DAG- und IP3-Konzentration in Plättchen gemessen im ELISA.

FXa stimulierte Aggregation in der LTA mit einer subaggregatorischen Konzentration von FXa; Con vs. FXa: 4,95 % ± 8,42 % vs. 14,09 % ± 10,08 %, n = 4, p = 0,24; phosphorylierte PI3K-Anteil in Plättchen nach Prästimulation mit FXa: 214,1 pg/ml ± 8,17 pg/ml vs. 240,30 pg/ml ± 19,02 pg/ml, n = 4, p = 0,034; DAG-Gehalt in Plättchen nach Prästimulation: 30,37 pg/ml ± 7,83 pg/ml vs. 35,83 pg/ml ± 5,83 pg/ml, n = 4, p = 0,042; IP3-Gehalt in Plättchen nach Prästimulation: 73,00 pg/ml ± 7,55 pg/ml vs. 78,67 pg/ml ± 9,018 pg/ml; n = 3; p = 0,042; angegeben in Mittelwert ± S.D.

4.2. ASS im akuten Myokardinfarkt

4.2.1. Infarktgrößen unter ASS-Behandlung – im open-chest-Modell

Ob ASS im AMI einen Einfluss auf die Infarktgröße und das *Outcome* hat und ob der Zeitpunkt der Applikation hier eine Rolle spielt, sollte durch Vergleichen einer Versuchsgruppe mit ASS- bzw. Vehikel-Applikation 30 min vor Ischämie-Induktion und einer Versuchsgruppe mit ASS- bzw. Vehikel-Applikation 15 min vor Reperfusion gezeigt werden. Dabei zeigte sich, dass ASS in beiden Fällen, sowohl in der Präventionstherapie vor Ischämie als auch in der Akuttherapie, während des Infarktgeschehens, eine Reduktion der Infarktgrößen zur Folge hatte. Die Fläche des Infarktareals verringerte sich bei der präischämischen Gruppe von 38,89 % ± 8,22 % Infarkt (Inf) pro AAR auf 27,02 % ± 4,53 % Inf/AAR signifikant (n = 6/7; p = 0,0071). Ebenso positiv wirkte sich aber auch eine Bolusinjektion von ASS im Laufe des Infarktes vor der Reperfusion aus. Hier war ein Abfall des Infarktareals von 43,94 % ± 9,16 % auf 34,16 % ± 6,80 % zu beobachten (n = 5/8; p = 0,049) (Abb.42).

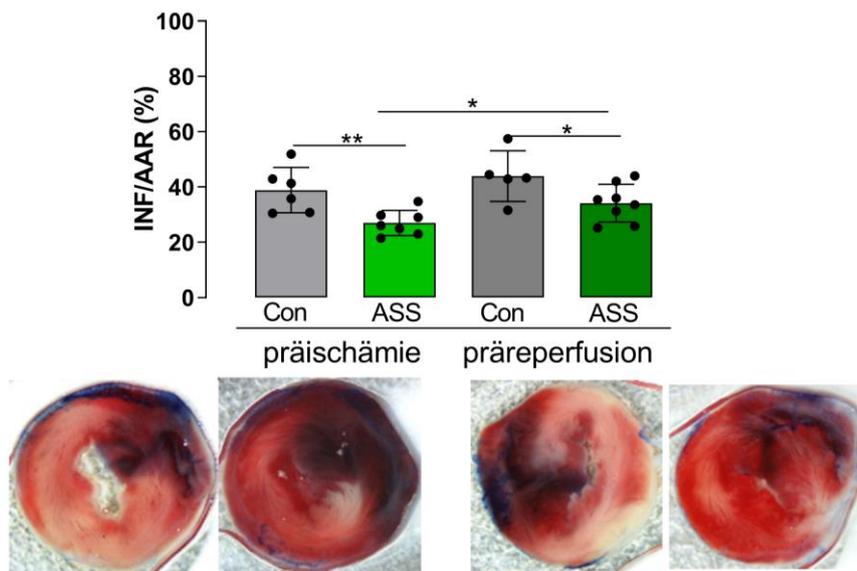


Abbildung 42: Infarktgröße ASS-behandelter Mäuse neben Kontrollen ohne ASS-Behandlung. Vergleich der präischämischen Intervention mit der Intervention vor Reperfusion.

Infarktgrößen ASS-behandelter Mäuse im open-chest I/R Verfahren. Con. vs. ASS vor Ischämie: 38,89 % ± 8,22 % Inf/AAR vs. 27,02 % ± 4,53 % Inf/AAR, n = 6 vs. 7, p = 0,0071; Con. vs. ASS vor Reperfusion: 43,94 % ± 9,16 % vs. 34,16 % ± 6,80 %, n = 5 vs. 8, p = 0,049; angegeben in Mittelwert ± S.D. Repräsentative Bilder der Evans-Blue und TTC-gefärbten Mausherzen von links nach rechts: Kontrolle Präischämie, ASS-behandelt Präischämie, Kontrolle Applikation vor Reperfusion, ASS-Behandlung vor Reperfusion.

4.2.2. Herzfunktion unter ASS-Behandlung

Neben den Infarktgrößen waren auch die Veränderungen der Herzfunktionen wichtige Marker des *Outcomes*. Für die Darstellung dieser, wurden echokardiographische Bilder angefertigt und ausgewertet. Nach AMI sank die Herzleistung erwartungsgemäß im Vergleich zu den Basalwerten, welche 24 h vor der Ischämie aufgezeichnet wurden, ab. Eine Behandlung von ASS führte allerdings zu einer geringeren Verschlechterung der Herzfunktion nach 24 h Reperfusionzeit. Bei der Betrachtung der EF fiel der Wert in der Kontrollgruppe der präischämischen Applikation von 54,47 % ± 4,37 % auf 37,84 % ± 3,39 % (n = 5; p = 0,0018). In der ASS-behandelten-Gruppe fiel er hingegen nur von 56,07 % ± 7,43 % auf 49,86 % ± 9,35 % (n = 5; p = 0,1990). Vergleicht man hierbei die beiden post-ischämischen Funktionen miteinander, war somit eine signifikant verbesserte EF in der ASS-Gruppe zu sehen (p = 0,0269). Analog dazu war auch derselbe Effekt in der Gruppe mit ASS-Behandlung vor Reperfusion zu beobachten (p = 0,0308). Hier fiel die Funktion in der Kontrollgruppe von 51,42 % ± 9,34 % auf 37,65 % ± 5,84 % (n = 9; p = 0,0014) und in der ASS-Gruppen von 55,17 % ± 4,91 % auf nur 44,78 % ± 6,51% (n = 8; p = 0,0070) ab (Abb.43).

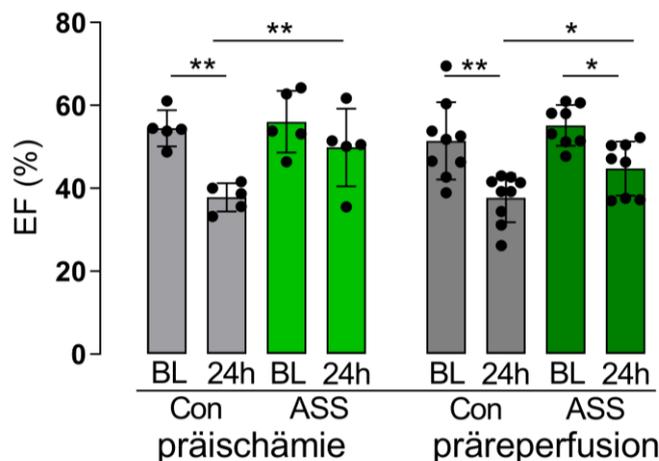


Abbildung 43: Ejektionsfraktion gemessen mittels TTE bei ASS-naiven und präischämisch oder vor Reperfusionstart mit ASS-behandelten Mäusen.

Änderungen der EF bei open-chest I/R operierten Mäusen Baseline (BL) vs. post I/R bei Kontrollen der ASS-Behandlung vor Ischämie: 54,47 % ± 4,37 % vs. 37,84 % ± 3,39 %, n = 5, p = 0,0018; BL vs. post I/R ASS-Behandlung vor Ischämie: 56,07 % ± 7,43 % vs. 49,86 % ± 9,35 %, n = 5, p = 0,1990; p(post I/R Con. vs. post I/R ASS) = 0,0269; BL vs. post I/R Con. nach Reperfusiongruppe: 51,42 % ± 9,34 % vs. 37,65 % ± 5,84 %, n = 9, p = 0,0014; BL vs. ASS-Behandlung vor Reperfusion: 55,17 % ± 4,91 % vs. 44,78 % ± 6,51 %, n = 8, p = 0,0070; p(post I/R Con vs. post I/R ASS-Behandlung) = 0,0308; angegeben in Mittelwert ± S.D.

Auch bei der Betrachtung des Herzindex (SVI), welches sich aus dem Schlagvolumen und der Körperoberfläche der Tiere zusammensetzt, zeigten sich bei den ASS-behandelten Tieren, unabhängig vom Applikationszeitpunkt, verbesserte Leistungen im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollgruppen. Präischämisch zeigte sich ein Wert von $1,019 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,2788 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ ($n = 5$; $p = 0,0204$) und fiel nach 24 h auf $0,498 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,1195 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ in der Kontrollgruppe der Tiere, die die Applikation 30 min vor Ischämie erhielten. In der ASS-Gruppe zu diesen Tieren war ein Abfall von $1,128 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,3047 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ auf $0,7774 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,2427 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ ($n = 5$; $p = 0,0303$) zu messen. Dies ergab einen signifikant besseren SVI in der ASS-behandelten Gruppe ($p = 0,0497$). Entsprechendes ergab sich bei den Untersuchungen der Präreperfusion-Gruppe. Bei den Kontrollen ergaben sich Werte von $0,7791 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,2257 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ vor und $0,4810 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,0998 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ nach Ischämie ($n = 9$; $p = 0,0063$). Hingegen in der ASS-Gruppe fiel der Wert von ursprünglich $0,9574 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,1341 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ auf $0,6308 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,1313 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ nach Ischämie ($n = 9$; $p = 0,0002$) ($p = 0,0150$) (Abb.44).

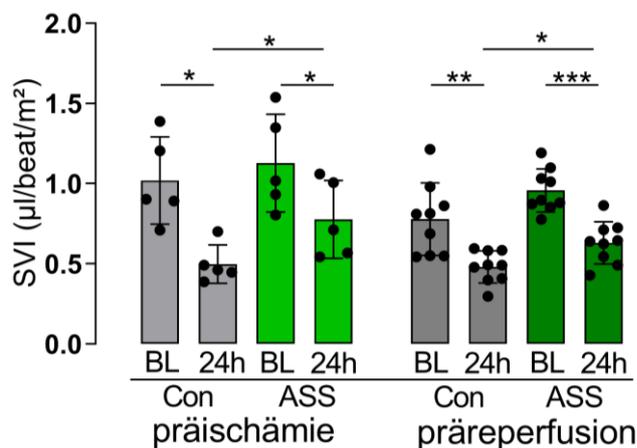


Abbildung 44: Herzindex gemessen mittels TTE bei ASS-naiven und präischämisch oder vor Reperfusionstart mit ASS-behandelten Mäusen.

Änderungen der SVI bei open-chest I/R operierten Mäusen. Baseline (BL) vs. post I/R bei Kontrollen der ASS vor Ischämie: $1,019 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,2788 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ vs. $0,498 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,1195 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$, $n = 5$, $p = 0,0204$; BL vs. post I/R ASS vor Ischämie: $1,128 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,3047 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ vs. $0,7774 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,2427 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$, $n = 5$, $p = 0,0303$; $p(\text{post I/R Con. vs. post I/R ASS}) = 0,0497$; BL vs. post I/R Con. Präreperfusiongruppe: $0,7791 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,2257 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ vs. $0,4810 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,0998 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$; $n = 9$, $p = 0,0063$; BL vs. ASS vor Reperfusion: $0,9574 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,1341 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$ vs. $0,6308 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2 \pm 0,1313 \mu\text{l}/\text{beat}/\text{m}^2$, $n = 9$, $p = 0,0002$; $p(\text{post I/R Con vs. post I/R ASS}) = 0,0150$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.

4.2.3. Infarktgrößen unter ASS-Behandlung mit und ohne Thrombozytendepletion – im closed-chest-Modell

Eine Abhängigkeit von Thrombozyten der bisher gefundenen Effekte von ASS, sollte durch weitere Versuche, in welcher die Versuchsmäuse von ihren Thrombozyten depletiert wurden und diese somit im AMI keinen Einfluss mehr nehmen konnten, festgestellt werden. Da eine Operation am offenen Herzen im thrombozytendepletierten Zustand zum Tod der Tiere durch verbluten führen würde, wurden diese Versuche im closed-chest I/R-Modell durchgeführt. Dadurch war es möglich den Tieren, die durch i.v. Applikation des AK im Vorfeld depletiert wurden, bei geschlossenem Thorax die Ischämie zu induzieren. Als *Proof of Concept* wurde hier zunächst überprüft, ob die bisher erzielten Ergebnisse auch durch diese Methode reproduziert werden konnten. Auch mit der closed-chest Methode konnte eine signifikante Reduktion der Infarktgröße in der ASS-Gruppe gezeigt und die bisherigen Erkenntnisse bestätigt werden (Con. vs. ASS: 64,64 % Inf/AAR \pm 9,29 % vs. 47,19 % Inf/AAR \pm 13,46%; n = 7/6; p = 0,0186).

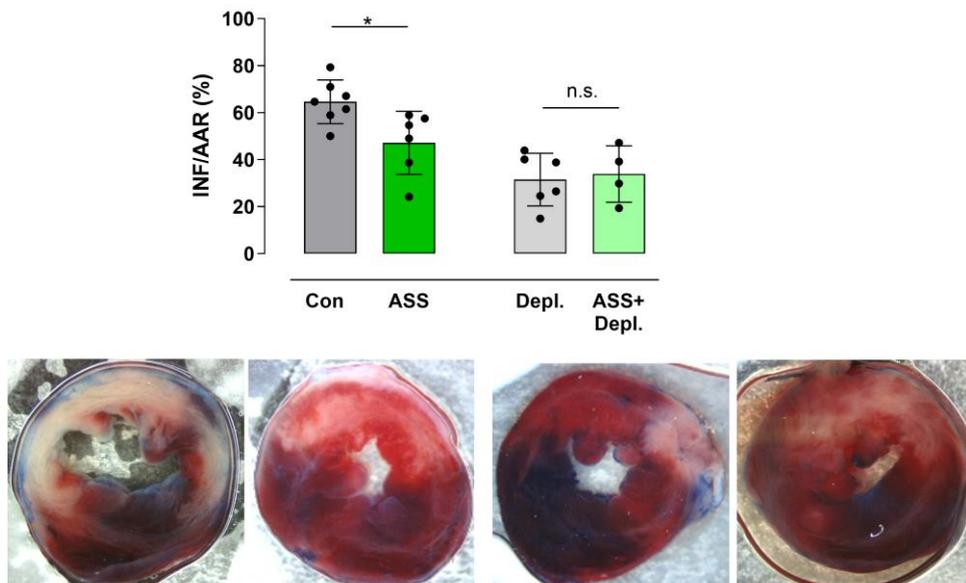


Abbildung 45: Infarktgröße ASS-behandelter Mäuse, verglichen mit Kontrollen ohne ASS-Behandlung.

Daneben Infarktgrößen plättchendepletierter Mäuse, verglichen mit ASS-behandelten und gleichzeitig plättchendepletierten Mäusen.

Infarktgrößen ASS-behandelter Mäuse im closed-chest I/R Verfahren. Con. vs. ASS vor Ischämie: 64,64 % Inf/AAR \pm 9,29 % vs. 47,19 % Inf/AAR \pm 13,46 %, n = 7 vs. 6, p = 0,0186; Infarktgrößen thrombozytendepletierter Mäuse ohne und mit ASS-Behandlung vor Ischämie: 31,51 % Inf/AAR \pm 12,01 % vs. 33,91 % Inf/AAR \pm 12,01 %, n = 6 vs. 4, p = 0,7555); angegeben in Mittelwert \pm S.D. Repräsentative Bilder der Evans-Blue und TTC gefärbten Mäuserherzen von links nach rechts: Kontrolle Präischämie, ASS-behandelt Präischämie, plättchendepletiert, plättchendepletiert und ASS-behandelt Präischämie.

Bei einer Thrombozytendepletion zeigten sich hingegen keine Unterschiede der Infarktgrößen zwischen ASS-behandelten und unbehandelten Tieren. Hier blieb die Fläche des abgestorbenen Bereichs von $31,51\% \text{ Inf/AAR} \pm 12,01\%$ bei ASS-naiven Tieren auf nahezu demselben Level, wie bei den ASS-behandelten Tieren mit $33,91\% \text{ Inf/AAR} \pm 12,01\%$ ($n = 6/4$; $p = 0,7555$). Da bei den plättchendepletierten Tieren, keine weitere Reduktion der Infarktgröße mit einer Behandlung von ASS gezeigt werden konnte, konnte somit die Plättchenabhängigkeit des ASS-Effektes bestätigt werden (Abb.45).

4.2.4. Hämatologische Messungen

4.2.4.1. Blutbildmessung

Zur Überprüfung der erfolgreichen Thrombozytendepletion, wurde den Versuchstieren eine geringe Menge Blut entnommen, sodass eine Blutbilduntersuchung durchgeführt werden konnte. Dabei konnte die Depletion der Thrombozyten der Versuchstiere überprüft werden. Vor der Vor-OP, ebenso wie 3 d nach dieser, befanden sich die Plättchenzahlen mit $1239 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 45,32 \times 10^3/\text{mm}^3$ bzw. $1763 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 224,3 \times 10^3/\text{mm}^3$ im Normbereich der Mäuse. Nach der Applikation des Antikörpers fiel die Anzahl der Thrombozyten hingegen auf $37,43 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 8,94 \times 10^3/\text{mm}^3$ ab ($n = 7$; $p < 0,0001$) (Abb. 46).

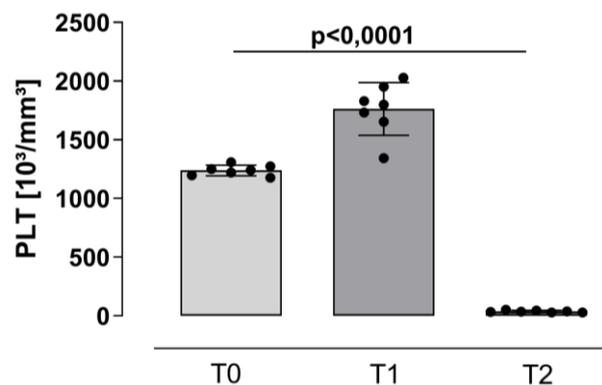


Abbildung 46: Plättchenanzahl in plättchendepletierten Mäusen vor (T0) sowie 3 d nach (T1) Vor-OP und 24 h nach Induktion der Ischämie

Nachweis über die Wirksamkeit des Depletionsantikörpers durch Blutbildmessungen der behandelten Tiere vor der Vor-OP (T0) vs. zwischen Vor-OP (T1) und Ischämie vs. 24 h nach Ischämie (T2): $1239 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 45,32 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $1763 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 224,3 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $37,43 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 8,94 \times 10^3/\text{mm}^3$, $n = 7$, $p < 0,0001$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.; Signifikanz berechnet durch one-way Anova-Test.

Außerdem zeigten die Blutbilder auch Unterschiede bezüglich der weiteren Blutzellen. Während die Anzahl der weißen Blutkörperchen (WBC) ihr Maximum bei unbehandelten Tieren 24 h nach AMI erreichten ($5,28 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 1,316 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $7,350 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm$

1,897 x 10³/mm³ vs. 8,317 x 10³/mm³ ± 1,454 x 10³/mm³, n = 8), blieb die Anzahl dieser in der ASS-behandelten Gruppe nahezu gleich (5,800 x 10³/mm³ ± 1,149 x 10³/mm³ vs. 5,250 x 10³/mm³ ± 0,9418 x 10³/mm³ vs. 5,000 x 10³/mm³ ± 1,545 x 10³/mm³, n = 6). Der Vergleich der Leukozyten Anzahl nach AMI zeigte eine signifikant geringere Menge in der ASS-behandelten Gruppe (p = 0,0087).

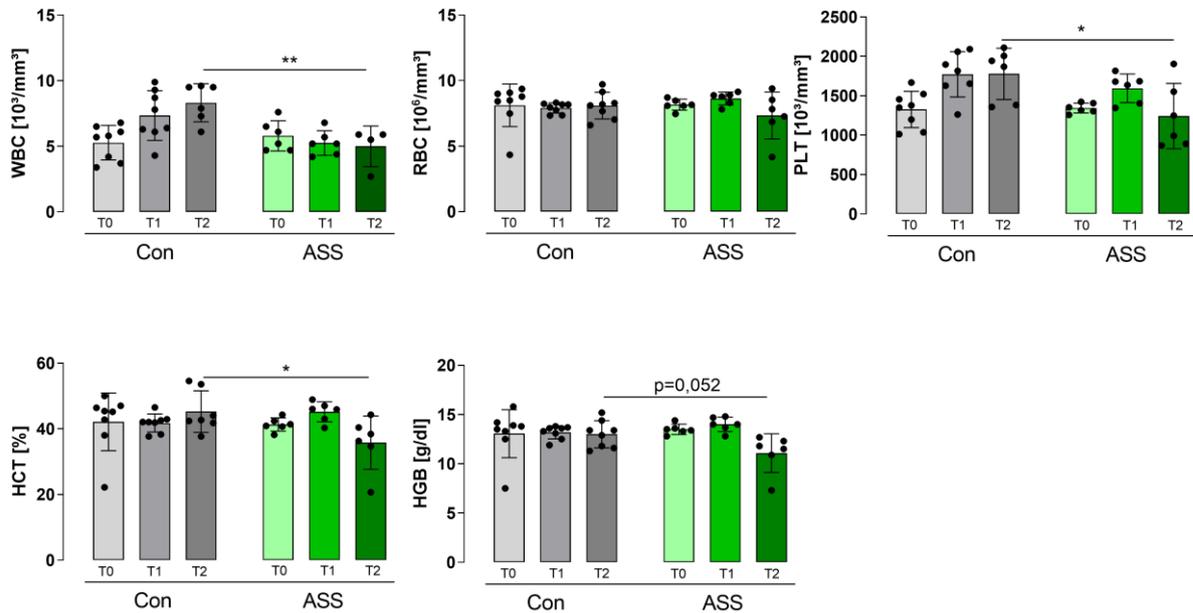


Abbildung 47: Blutbildanalyse im Vergleich unbehandelter und ASS-behandelter Mäuse BL (T0), nach Vor-OP (T1) und 24h post Ischämie (T2)

WBC Con.: T0 = 5,28 x 10³/mm³ ± 1,316 x 10³/mm³, T1 = 7,350 x 10³/mm³ ± 1,897 x 10³/mm³, T2 = 8,317 x 10³/mm³ ± 1,454 x 10³/mm³, n = 8; ASS: T0 = 5,800 x 10³/mm³ ± 1,149 x 10³/mm³, T1 = 5,250 x 10³/mm³ ± 0,9418 x 10³/mm³, T3 = 5,000 x 10³/mm³ ± 1,545 x 10³/mm³, n = 6; p(T2) = 0,0087; RBC Con.: T0 = 8,120 x 10³/mm³ ± 1,629 x 10³/mm³, T1 = 7,915 x 10³/mm³ ± 0,3884 x 10³/mm³, T2 = 8,094 x 10³/mm³ ± 1,021 x 10³/mm³, n = 8; ASS T0 = 8,162 x 10³/mm³ ± 0,4254 x 10³/mm³, T1 = 8,637 x 10³/mm³ ± 0,4884 x 10³/mm³; T2 = 7,343 x 10³/mm³ ± 1,795 x 10³/mm³, n = 6; p(T2) = 0,339; PLT Con.: T0 = 1327 x 10³/mm³ ± 230,9 x 10³/mm³, T1 = 1772 x 10³/mm³ ± 287,5 x 10³/mm³, T2 = 1778 x 10³/mm³ ± 325,9 x 10³/mm³, n = 8; ASS: T0 = 1343 x 10³/mm³ ± 63,2 x 10³/mm³, T1 = 1594 x 10³/mm³ ± 181,4 x 10³/mm³, T2 = 1243 x 10³/mm³ ± 414,4 x 10³/mm³, n = 6; p(T2) = 0,0321; HCT Con.: T0 = 42,13 % ± 8,77 %, T1 = 41,76 % ± 2,76 %, T2 = 45,26 % ± 6,35 %, n = 8; ASS: T0 = 41,32 % ± 2,02 %, T1 = 45,18 % ± 3,06 %; T2 = 35,80 % ± 8,12 %, n = 6; p(T2) = 0,0380; HGB Con.: T0 = 13,06 % ± 2,44 %, T1 = 13,19 % ± 0,67 %, T2 = 13,00 % ± 1,39 %, n = 8; ASS: T0 = 13,50 % ± 0,52 %, T1 = 14,00 % ± 0,73 %, T2 = 11,08 % ± 1,96 %, n = 6; p(T2) = 0,0522; angegeben in Mittelwert ± S.D.;

Gleichzeitig blieb die Anzahl der RBC im Verlauf und auch zwischen den Gruppen relativ konstant. Lediglich die Anzahl der RBCs, nach Ischämie in der ASS-behandelten Gruppe, war geringfügig niedriger, was sich auf einen größeren Blutverlust zurückführen lassen konnte ($8,120 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 1,629 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $7,915 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0,3884 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $8,094 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 1,021 \times 10^3/\text{mm}^3$, n = 8 in den Kontrollen vs. $8,162 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0,4254 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $8,637 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0,4884 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $7,343 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 1,795 \times 10^3/\text{mm}^3$, n = 6). (Abb.47)

Bei der Betrachtung der Plättchen Anzahl hingegen, konnte wieder ein signifikanter Abfall der Anzahl nach AMI beobachtet werden (Kontrolle: $1327 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 230,9 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $1772 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 287,5 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $1778 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 325,9 \times 10^3/\text{mm}^3$, n = 8; ASS: $1343 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 63,2 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $1594 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 181,4 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. $1243 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 414,4 \times 10^3/\text{mm}^3$, n = 6; p(Con T₂ vs. ASS T₂) = 0,0321) (Abb.47).

Gleiche Ergebnisse zeigten auch die Messergebnisse des Hämatokrit. Auch hier fielen die Werte postischämisch in der ASS-Gruppe signifikant ab (Kontrolle: $42,13 \% \pm 8,77 \%$ vs. $41,76 \% \pm 2,76 \%$ vs. $45,26 \% \pm 6,35 \%$, n = 8; ASS: $41,32 \% \pm 2,02 \%$ vs. $45,18 \% \pm 3,06 \%$ vs. $35,80 \% \pm 8,12 \%$, n = 6; p(Con T₂ vs. ASS T₂) = 0,0380).

Zwar zeigten die Ergebnisse der Blutuntersuchungen hinsichtlich des Hämoglobins keine Signifikanzen, allerdings war ein eindeutiger Trend in den Werten nach AMI zu sehen. Hier zeigte sich eine Reduktion des Hämoglobins in der ASS-behandelten Gruppe (Kontrolle: $13,06 \% \pm 2,44 \%$ vs. $13,19 \% \pm 0,67 \%$ vs. $13,00 \% \pm 1,39 \%$, n = 8; ASS: $13,50 \% \pm 0,52 \%$ vs. $14,00 \% \pm 0,73 \%$ vs. $11,08 \% \pm 1,96 \%$, n = 6; p(con T₂ vs. ASS T₂) = 0,0522) (Abb.47).

4.2.4.2. Durchflusszytometrische-Analysen

Für die Darstellung eines Differentialblutbildes, konnten Ergebnisse aus durchflusszytometrischen Untersuchungen verwendet werden.

4.2.4.2.1. Monozyten

Monozyten spielen eine essentielle Rolle im Inflammationsprozess des lebenden Organismus, sodass diese in den FACS-Analysen untersucht wurden. Hier stellten sich große Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den, mit ASS-behandelten Tieren, heraus. Die Anzahl der Monozyten sank signifikant von $6,23 \% \pm 0,90 \%$ auf $2,16 \% \pm 0,43 \%$ (n = 2/6; p < 0,0001) (Abb.48)

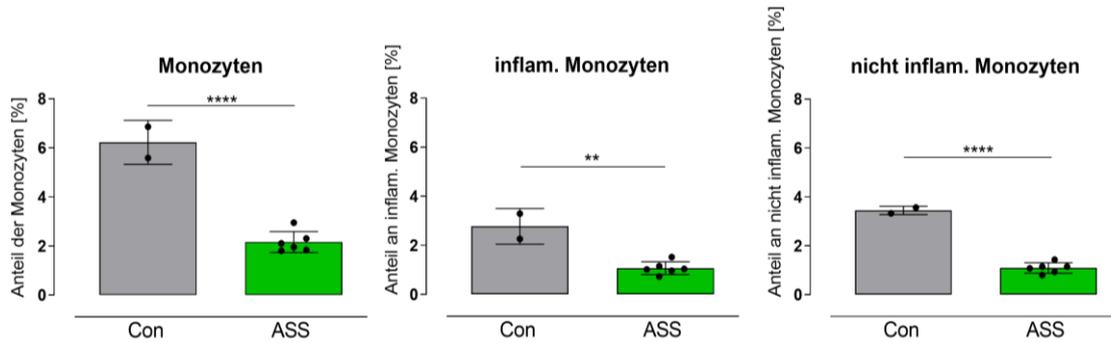


Abbildung 48: Gehalt von Monozyten und deren Anteil an inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Monozytensubgruppen in % der gesamten Leukozyten 24 h post I/R.

Prozentualer Anteil der Monozyten zur Gesamtleukozytenzahl der Kontrollen vs. ASS-behandelter Mäuse: 6,23 % ± 0,90 % vs. 2,16 % ± 0,43 %, n = 2 vs. 6; p < 0,0001; Prozentualer Anteil der inflammatorischen Monozyten zur Gesamtleukozytenzahl der Kontrollen vs. ASS-behandelter Mäuse: 2,78 % ± 0,73 % vs. 1,07 % ± 0,26 %, n = 2 vs. 6; p = 0,0015; Prozentualer Anteil der nicht inflammatorischen Monozyten zur Gesamtleukozytenzahl der Kontrollen vs. ASS-behandelter Mäuse: 1,09 % ± 0,21 % vs. 3,45 % ± 0,17 %, n = 2 vs. 6, p < 0,0001; angegeben in Mittelwert ± S.D.;

Dabei lag der Anteil der inflammatorischen Monozyten im Verhältnis zur gesamt Leukozytenzahl bei 2,78 % ± 0,73 % in der Kontrollkohorte und bei nur 1,07 % ± 0,26 % in der ASS-Gruppe (n = 2/6; p = 0,0015). Auch bei den nicht inflammatorischen Monozyten war mit 1,09 % ± 0,21 % in der ASS-Gruppe ein signifikant kleinerer Anteil, im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit 3,45 % ± 0,17 %, zu verzeichnen (n = 2/6, p < 0,0001) (Abb.48).

Des Weiteren wurden in den durchflusszytometrischen Analysen auch die Anzahl der gesamten Granulozyten bestimmt. Diese stiegen prozentual zu den Leukozyten in der ASS-Gruppe signifikant von 13,52 % ± 6,31 % auf 48,65 % ± 11,34 % stark an (n = 2/6, p = 0,0069) (Abb.49).

Weitere wichtige Rollen in der Immunantwort spielen die B-Lymphozyten, sodass auch diese in den FACS-Analysen untersucht wurden. Hier zeigte sich in den ASS-behandelten Tieren mit 24,85 % ± 8,45 % ein signifikant niedrigerer Anteil an B-Lymphozyten, als in der Vergleichsgruppe mit 44,76 % ± 2,62 % (n = 2/6; p = 0,0202).

Ebenso verhielt es sich mit den T-Helfer-Zellen. Auch hier war ein niedrigerer Anteil in der mit ASS-behandelten Gruppe zu sehen. Dieser betrug nur 7,89 % ± 1,83 %, wobei die Kontrollgruppe noch 12,37 % ± 3,32 % T-Helfer-Zellen aufweisen konnte (n = 2/6; p = 0,044) (Abb.49).

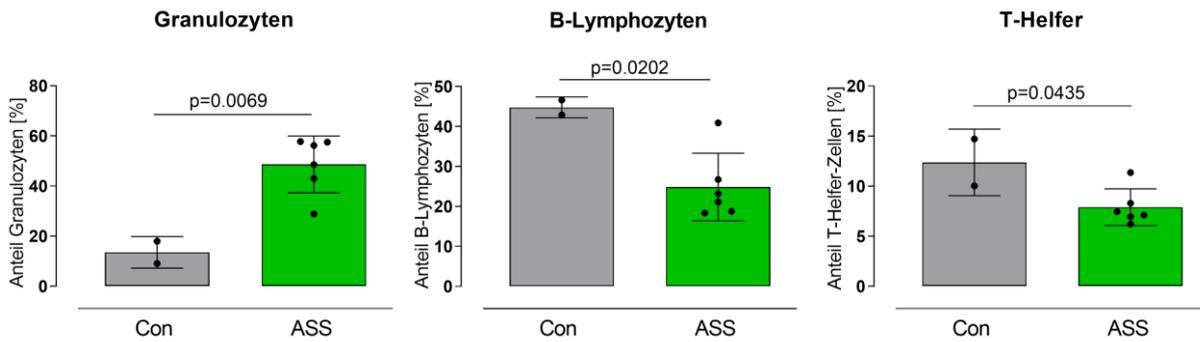


Abbildung 49: Gehalt der Granulozyten, B-Lymphozyten und T-Helfer-Zellen in % der gesamten Leukozyten 24 h post I/R.

In FACS Analysen bestimmter Anteil an Granulozyten, B-Lymphozyten und T- Helfer-Zellen an der Gesamtzahl der Leukozyten von Kontrollen und ASS-behandelten Mäusen. Granulozyten Kontrollen vs. ASS: 13,52 % ± 6,31 % vs. 48,65 % ± 11,34 %, n = 2 vs. 6, p = 0,0069. B-Lymphozyten Kontrollen vs. ASS: 44,76 % ± 2,62 % vs. 24,85 % ± 8,45 %, n = 2/6; p = 0,0202; T-Helfer-Zellen Kontrollen vs. ASS: 12,37 % ± 3,32 % vs. 7,89 % ± 1,83 %, n = 2 vs. 6; p = 0,044. angegeben in Mittelwert ± S.D.;

4.2.5. Immunhistologische Untersuchungen

4.2.5.1. Inflammationsbereich unter HE-Färbung

Mit der HE-Färbung wurden in den Herzschnitten krankhafte Veränderungen des Myokards sichtbar gemacht, sodass eine Übersicht der entzündeten Bereiche dargestellt werden konnte. In der ASS-behandelten Gruppe waren dabei, mit durchschnittlich 1,05 % ± 1,53 % des linken Ventrikels, kleinere Bereiche betroffen, als in der Kontrollgruppe. Hier betrug der Bereich, der positiv gefärbt war 11,37 % ± 14,13 % (n = 5/5; p = 0,144) (Abb.50).

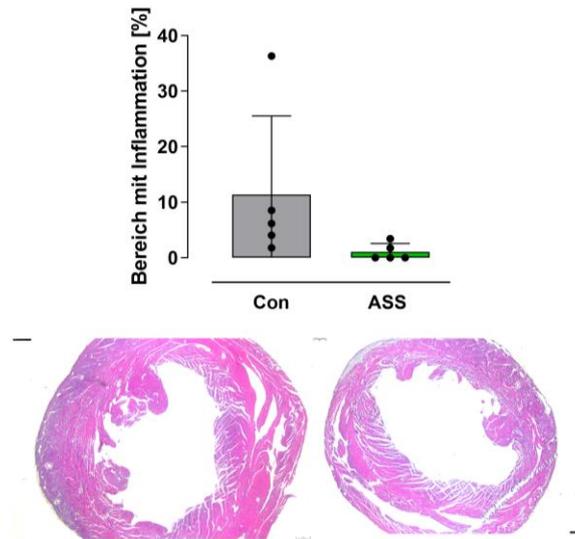


Abbildung 50: Inflammatorischer Bereich des linken Ventrikels 24h post I/R bei ASS-naiven und ASS-behandelten Mauserzen durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung kenntlich gemacht.

HE positive Fläche bei Kontrollen vs. ASS-behandelten Mäusen: $11,37 \% \pm 14,13 \%$ vs. $1,05 \% \pm 1,53 \%$, $n = 5$ vs. 5 ; $p = 0,144$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.; Repräsentative Bilder der HE-gefärbten Herzen.

4.2.5.2. Makrophageneinwanderung

Die Makrophageneinwanderung in das beschädigte Gewebe wurde mithilfe eines MAC2-AK sichtbar gemacht und zeigte an, in welchen Bereichen des Herzes Inflammationsprozesse stattgefunden hatten und wo eine Immunantwort des Organismus begonnen hatte. Bei den ASS-behandelten Mäusen war die Makrophageneinwanderung mit $3,55 \% \pm 1,30 \%$ um ca. die Hälfte niedriger, als in der Vergleichsgruppe ohne ASS ($6,18 \% \pm 2,33 \%$) ($n = 6/6$; $p = 0,0366$) (Abb.51).

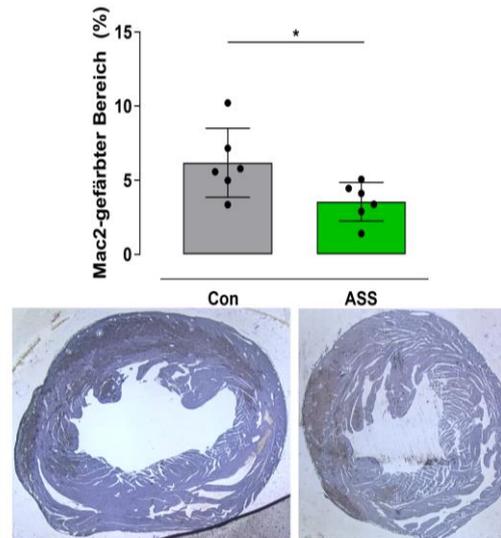


Abbildung 51: Makrophageneinwanderung im linken Ventrikel 24h post I/R bei ASS-naiven und ASS-behandelten Mauserzen durch MAC-2-Antikörper gefärbt.

MAC-2 positiver Bereich von Kontrollen vs. ASS-behandelten Mäusen: $6,18 \% \pm 2,33 \%$ vs. $3,55 \% \pm 1,30 \%$, $n = 6$ vs. 6 , $p = 0,0366$; angegeben in Mittelwert \pm S.D.; Repräsentative Bilder der MAC-2-gefärbten Herzen.

4.2.5.3. Neutrophileneinwanderung

Auch die Einwanderung der Neutrophilen in das Gewebe spielt eine essentielle Rolle in Inflammationsprozessen. Die in das Gewebe eingewanderten Neutrophilen wurden mit einer immunhistologischen Färbung mithilfe eines Ly6G-AK sichtbar gemacht. Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. In der Kontrollgruppe lag der Anteil an migrierten Neutrophilen bei $7,95 \% \pm 1,12 \%$. Der linke Ventrikel der ASS-Gruppe war hingegen mit nur $5,76 \% \pm 1,47 \%$ eingewanderten, neutrophilen Granulozyten, signifikant weniger betroffen ($n = 7/5$; $p = 0,015$) (Abb.52).

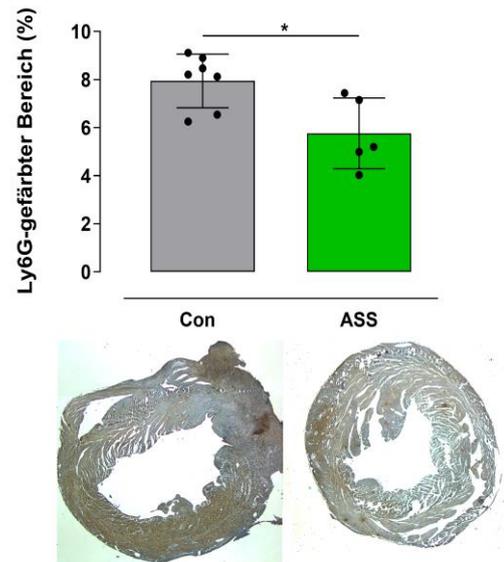


Abbildung 52: Neutrophileneinwanderung im linken Ventrikel 24h post I/R bei ASS-naiven und ASS-behandelten Mauserzen durch Ly6G-Antikörper gefärbt.

Ly6G-positiver Bereich von Kontrollen vs. ASS-behandelten Mäusen: 7,95 % ± 1,12 % vs. 5,76 % ± 1,47 %, n = 7 vs. 5; p = 0,015. angegeben in Mittelwert ± S.D.; Repräsentative Bilder der MAC-2-gefärbten Herzen.

5. Diskussion

5.1. Plättchenreaktivität

5.1.1. Thrombozytenaggregation

NOAKs spielen bei Risikopatienten, wie zum Beispiel bei Personen mit nicht-valvulärem VHF, eine wesentliche Rolle in der Präventionstherapie zur Vorbeugung eines Schlaganfalls. (14) Insbesondere die Therapie von Patienten mit VHF und gleichzeitiger KHK erfordert Aufmerksamkeit, da sowohl eine optimal Antiplättchentherapie als auch eine effiziente Antikoagulation notwendig ist. Hierfür stehen verschiedene Präparate zur Verfügung, deren Wirkung jedoch große Unterschiede aufweisen. So konnte in Studien gezeigt werden, dass die Anzahl der ischämischen Ereignisse in verschiedenen therapierten Gruppen sehr gegensätzlich war. Beispielsweise zeigte sich, dass eine Antikoagulation mit Dabigatran statt eines VKA zu einem signifikant höheren Risiko für AMIs führte. (16, 36, 70) Die Publikation von Achilles et al. konnte hierfür die gesteigerte Plättchenreaktivität bei Einnahme von Dabigatran ausmachen. Obwohl Dabigatran als direkter Hemmer des starken Aggregationsstimulus Thrombin wirkt, scheint die Aggregation dadurch nicht gehemmt, sondern im Gegenteil, sogar gesteigert zu werden. Dies führte die Arbeitsgruppe aus Düsseldorf auf die gesteigerte Expression der Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4 zurück. (35)

Im Gegensatz zu Dabigatran ließ sich in drei großen Studien zeigen, dass die FXa-Inhibitoren keine Erhöhung des AMI-Risikos oder sogar eine Reduktion dieser hervorriefen. (22) In dieser Arbeit wurde nach dem Mechanismus, auf den diese Effekte beruhen, gesucht und beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass durch FXa eine direkte Stimulierung der Thrombozyten hervorgerufen wird. Durch Hemmung des FXa mit RIVA konnte folglich sowohl die Thrombozytenaggregation (Abb.17-19), als auch die Adhäsion (Abb.20-23) herabgesetzt werden. Außerdem war eine verminderte Thrombusformation unter arteriellen Flussbedingungen bei RIVA-Behandlung sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* zu beobachten (Abb.24). Es konnte des Weiteren herausgestellt werden, dass dies über eine Thrombin unabhängige, FXa-vermittelte Aktivierung des PAR-1 zu erklären ist (Abb.36).

Obwohl RIVA, als FXa-Hemmer, die Koagulation des Blutes über das Eingreifen in die sekundäre Hämostase inhibiert, war bisher nicht vollständig geklärt, welche Wirkung es auf die Thrombozytenfunktion hat. Bisherige Studien waren sich hier nicht einig und kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. (71-74) In ihren Untersuchungen, welche 2015 veröffentlicht

wurde, zeigten Zemer-Wassercrug et al. keine Veränderungen und teils sogar Erhöhungen der Plättchenreaktivität nach RIVA-Anwendung. Dabei verglichen sie die Aggregation von Patienten mit nicht-valvulärem VHF, vor und mind. 7 d nach RIVA-Einnahme, welches im Vollblut mithilfe der MEA gemessen wurde. Bei einer Stimulation mit ADP und TRAP, zeigten sich hier keine Unterschiede in den Aggregationsraten. Eine Arachidonsäureinduzierte Aggregationsmessung zeigte sogar einen Anstieg dieser. (74) Ähnliche Ergebnisse zeigte die Gruppe um Steppich et al., die ebenfalls in Messungen via MEA keine signifikanten Unterschiede in der Aggregation von Patienten mit RIVA bzw. Apixaban feststellen konnten. Hier wurden, zu jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten, Blutproben von Patienten entnommen und verglichen, die bereits eine mindestens vier wöchige Therapie mit RIVA bzw. Apixaban durchgeführten hatten. Gewonnen wurde das Blut dabei vor der morgendlichen Einnahme der Tablette, sowie jeweils 2 h und 6 h danach. (71) Da die Arbeitsgruppe in ihrer Studie jedoch keinen Vergleich mit RIVA-naiven Patienten involviert hatte und lediglich die Aggregationsveränderungen von Patienten mit bestehender chronischer RIVA-Einnahme verglichen, konnten hier lediglich Aufschlüsse auf Schwankungen in der Plättchenreaktivität im Verlauf zwischen den Einnahmezeitpunkten gezogen werden. Auch Bánovčín et al. konnten zeigen, dass bei Patienten mit VHF vor und 2 h nach RIVA- bzw. Apixaban-Einnahme, keine signifikanten Unterschiede in der Aggregation aufgezeigt werden konnten. Die in der LTA gemessenen Proben wurden von Patienten entnommen, welche mind. 5 d unter Aufsicht das Medikament eingenommen hatten. (75) Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Zemer-Wassercrug et al., Steppich et al. und Bánovčín et al., berichteten Perzborn et al. in ihrer Publikation 2015 von einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Aggregationsfähigkeit mit RIVA. Sie konnten zeigen, dass mit RIVA-behandelte Plättchen gesunder Probanden, mit steigender RIVA-Konzentration eine steigende Inhibition der Aggregation in der Tissue-Faktor-induzierten LTA aufwies. (73) Nehaj et al. konnten diese Ergebnisse 2018 in Studien mit Patienten, welche RIVA bzw. Apixaban erhielten, reproduzieren. Die TRAP-6-induzierte LTA zeigte hier, analog zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen, eine Senkung der Plättchenreaktivität 2 h nach RIVA- bzw. Apixaban-Einnahme. (72)

Zusätzlich wurden diese Ergebnisse, durch die Resultate einiger klinischer Studien gestützt, in welchen das geringere Auftreten von AMIs in NOAK-behandelten Patienten aufgezeigt wurde. (16, 61, 76, 77)

Schon geringe Dosen von RIVA zeigten dabei einen Effekt auf die Plättchenfunktion und ließen sich mit dem Anstieg der RIVA-Konzentration noch verstärken. Bereits 2012 wurde in

der Atlas ACS 2-TIMI 51-Studie gezeigt, dass die Therapie mit 2,5 mg RIVA zweimal täglich zusätzlich zu der standardisierten Antiplättchentherapie, bei Patienten nach einem akuten Koronarsyndrom, einen Abfall des AMI-Risikos im Vergleich zur Placebo-Gruppe aufwies. (78) Ein sekundärpräventiver Effekt von RIVA konnte zusätzlich in der COMPASS-Studie gezeigt werden. 2017 wurde von Eikelboom et al. mithilfe dieser Studie gezeigt, dass die Therapie von Patienten mit einer stabilen arteriosklerotischen Gefäßerkrankung mit 2,5 mg zweimal täglich keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl von AMIs, Schlaganfällen oder kardiovaskulären Toden, verglichen mit denen einer ASS-Therapie, zeigte. Ein signifikant niedrigeres Risiko zeigte sich jedoch mit der Kombination der beiden Substanzen. (79) Auch Borst et al. konnten die synergistische Wirkung von RIVA zu einer DAPT zeigen. Hier senkte niedrig dosiertes RIVA, zusätzlich zu ASS und einem P2Y12-Inhibitor, die Thrombozytenreaktivität weiter ab. (80) Obwohl diese Effekte nur noch sehr klein waren, hatten sie nichtsdestotrotz einen Einfluss auf das Risiko von thromboembolischen Ereignissen, welche mit der Senkung der Plättchenreaktivität ebenfalls sanken. (69)

5.1.2. Thrombozytenadhäsion

Bevor ein AMI auftritt, beginnt der Prozess der Thrombusbildung. Durch Verletzungen der verkalkten und weniger elastischen Gefäßwände, können Endothelzellen aktiviert werden. Auf der Oberfläche dieser sowie auf der von prokoagulierenden Thrombozyten, beginnen verschiedene Reaktionen. (81, 82) Durch Verletzung der Gefäßwand wird Kollagen freigelegt, sodass vorbeifließende Blutplättchen, durch Komplexbildungen mit dem Kollagen und dem auf den Plättchen befindlichen von-Willebrand-Faktor (vWF), stark gebremst werden. Dadurch ist es möglich, dass das GPVI, welches sich ebenfalls auf der Oberfläche der Thrombozyten befindet, in Wechselwirkung mit dem Kollagen tritt und intrazellulär die Synthese und Freisetzung von Plättchenaktivatoren, wie zum Beispiel von TXA und ADP, gestartet werden. (83) Durch die Aktivierung der Plättchen wird Tissue factor freigesetzt, wodurch FVII aktiviert werden kann. FVIIa wirkt hingegen selber, in Kombination mit dem freiwerdenden Tissue factor, als katalytisches Enzym für die Aktivierung des FX zum FXa. (32, 84) Mithilfe von FXa kann nun die Generierung von Thrombin stattfinden, welches als starker Stimulus für die Aktivierung von Plättchen dient. Dadurch sind diese in der Lage, an die verletzte Stelle des Gefäßes zu adhären und mit dem Wundverschluss zu beginnen. Wie beschrieben konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass zusätzlich eine FXa-stimulierte Aktivierung der Thrombozyten, losgelöst vom Thrombin, stattfindet und es daher zu einer Erhöhung der Adhäsion kommt. Ob dieser Effekt ebenfalls durch RIVA aufgehoben

werden konnte, konnte durch Versuche mithilfe einer Durchflusskammer gezeigt werden. Ebenso wie in den Aggregationsversuchen, wurden auch hier vergleichbare Effekte beobachtet. Die Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten wurde von RIVA beeinflusst, sodass die Fläche des mit Collagen beschichteten Kanals bei Patienten, welche RIVA erhielten, weniger stark von Plättchen adhärirt wurde, als die der Kontrollpatienten (Abb.20-23). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse konnten auch in dem von Alvarez et al. publizierten Artikel produziert werden. In den Versuchen der Arbeitsgruppe, in welcher die Thrombozytenadhäsion auf einer mit Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (human umbilical vein endothelial cells/HUVEC) beschichteten Platte nach Inkubation mit RIVA untersucht wurde, zeigte ebenfalls eine verminderte Adhäsion. Ebenso wurde eine Erhöhung der Adhäsion von Plättchen auf HUVECs nach FXa-Behandlung gezeigt. (85)

5.1.3. *In-vivo* Thrombusformation

Neben den *in-vitro* Versuchen, konnten die positiven Effekte von RIVA auch in murinen *in-vivo* Untersuchungen bestätigt werden. Durch die Behandlung mit RIVA, zeigten sich nach Thrombusinduktion weniger schnelle Bildungen von Thromben (Abb.24), sowie eine geringere Stabilität dieser (Abb.28). Ähnliche Effekte konnten auch schon Wagner et al. mithilfe eines anderen Modells zeigen. Hier wurde bei wildtyp Mäusen der Thrombus durch eine photochemische Reaktion induziert. Zunächst erhielten die Versuchstiere dabei eine Lösung von Rose Bengal, sowie verschiedene Konzentrationen von Rivaroxaban. Im Anschluss wurde der Thrombus mithilfe eines Lasers induziert und der Verlauf der Thrombusbildung konnte über 60 min beobachtet werden. Auch hier zeigten sich Unterschiede in der Größe des Thrombus. Während das Gefäß, in der mit Vehikel-behandelten Gruppe, keinen Blutfluss mehr zeigte, war in den mit RIVA-behandelten Tieren noch ein Fluss messbar. (86) Außerdem zeigten Pircher et al. vergleichbare Ergebnisse bei Untersuchungen mit ASS-behandelten Mäusen, welche mit derselben Methode, wie in dieser Arbeit verwendet, behandelt wurden. (87)

Bei genauerer Betrachtung der gebildeten Thromben, unter histologischen Aspekten, konnte außerdem festgestellt werden, dass die Behandlung mit RIVA zu einer geringeren Beteiligung von Fibrinogen führte. Diese Ergebnisse deckten sich auch mit den vorher beschriebenen Ergebnissen, der in dieser Arbeit durchgeführten Adhäsionsversuche. Die histologische Darstellung von Fibrinogen zeigte, dass die Thrombusprobe der RIVA-behandelten Tiere weniger von dem Glykoprotein durchzogen war, als die Thromben der Vergleichstiere (Abb.27).

Auch der Vergleich der Thrombozytenmenge, welche an der Thrombusbildung beteiligt war, zeigte signifikante Unterschiede. Die Untersuchung der entnommenen Thromben aus der Maus enthielten weniger Plättchen, als die der Vergleichsgruppe (Abb.28). Analog dazu konnte man dieselbe Beobachtung bei Thromben, welche aus Patienten mit einer bestehenden ASS-Therapie gewonnen wurden, machen. (88)

Es konnten herausgestellt werden, dass die RIVA-Behandlung die Dichte der Thromben verringerte. Die untersuchten Thromben von RIVA-behandelten Tieren zeigten eine sehr viel größere Porosität und weniger kompakte Struktur im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Dadurch scheint es auch nicht zu verwundern, dass die Thromben dieser Tiere in sehr viele Fragmente zerfielen (Abb.25), welche allerdings dadurch in der Größe sehr viel geringer waren (Abb.26).

5.1.4. Veränderungen der Oberflächenproteine

Eine wichtige Rolle in der Plättchenreaktivität, spielen auch diverse Oberflächenproteine. Kleinste Veränderungen dieser zeigten bereits eine Reduktion der harten Endpunkte, wie den Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse, AMIs oder Stent-Thrombosen. (89) Auch hier zeigten sich bei der Stimulation mit FXa, signifikante Unterschiede in der Expression der verschiedenen Membranproteine. Untersucht wurde dabei die Expression von P-Selektin (Abb.33) sowie die Proteinexpression von ICAM-2 (Abb.34) und CD40L (Abb.35), die eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Plättchen und Immunzellen spielen. Besonders P-Selektin und CD40L sind bedeutende Biomarker zur Bestimmung der Thrombozytenreaktivität. Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen der Thrombozyten konnte man einen Zuwachs der Expression für alle drei Oberflächenproteine nach Stimulation mit FXa beobachten. Erhöhte CD40L-Werte, der Ligand des Oberflächenproteins CD40 auf Immunzellen, konnten schon bei Patienten mit Arteriosklerose beobachtet werden. Diese führten durch ihre Interaktion mit CD40 zu einer Aktivierung des Nuklear Faktors (NF)- κ B, wodurch Inflammationsreaktionen ausgelöst werden können. (90) Als wichtiges Oberflächenprotein auf Endothelzellen spielt P-Selektin eine essentielle Rolle in der primären Hämostase. Aber auch auf der Oberfläche von Plättchen ist P-Selektin zu finden. Hier wird es für die Wechselwirkung mit Leukozyten exprimiert und stellt einen essentiellen Marker für die Aktivierung der Thrombozyten dar. Durch die Expression von P-Selektin, kann dieses Oberflächenprotein in Wechselwirkung mit seinen Liganden, P-Selektin-GP-Ligand-1 (PSGL-1), treten. Dabei wurde die P-Selektin-vermittelte

Leukozytenrekrutierung über Plättchen, als eine der wichtigsten Inflammationsmechanismen im AMI, herausgestellt. (91)

5.1.5. Mechanismus der FXa vermittelten Thrombozytenaktivierung

5.1.5.1. Thrombinabhängigkeit

Wie bereits beschrieben greift RIVA als FXa-Hemmer direkt in die Gerinnungskaskade ein. Hierfür fängt es FXa ab, sodass dieser nicht mehr als Enzym für die katalytische Aktivierung von Prothrombin zum starken Aktivierungsstimulus Thrombin zur Verfügung stehen kann. (92) So wäre auch das Zurückführen des aggregationshemmenden Effekts auf die fehlende Verfügbarkeit von Thrombin denkbar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch ein davon gänzlich unabhängiger, direkter Effekt von FXa auf die Thrombozyten herausgestellt werden. Zunächst war eine Beteiligung von Thrombin in den Versuchen nicht möglich, da die gewonnenen Blutproben in Hirudin beschichteten Blutröhrchen aufgefangen und dadurch antikoaguliert wurden. Das verfügbare Thrombin konnte durch Wechselwirkung mit dem Hirudin abgefangen und somit für weitere Reaktionen entzogen werden. (93) Außerdem konnten die Aggregationshemmenden Eigenschaften von RIVA auch in Versuchen mit gewaschenen, isolierten Plättchen nachgewiesen werden. Hierbei wurden die Plättchen lediglich in einem Puffer aus Glucose und Salzen aufgenommen, sodass das Mitwirken von Thrombin auch hier ausgeschlossen werden konnte (Abb.31). Diese Ergebnisse deckten sich auch mit schon bereits bestehender Literatur. (94, 95)

5.1.5.2. Rezeptorveränderungen

Anders als bei der Dabigatran-Therapie, wo eine Erhöhung der Rezeptordichte von PAR-1 und PAR-4, gezeigt werden konnte, (35) waren bei Patienten mit RIVA-Therapie keine Veränderungen der Rezeptordichte zu beobachten (Abb.36, 37). Eine fehlende Beteiligung des PAR-4 wurde auch schon vorher beschrieben und deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. (94, 95)

Bei Betrachtung des PAR-1 war, bezüglich der Rezeptordichte bei RIVA-Behandlung, zwar ebenfalls keine Veränderung zu sehen, es konnte jedoch ein direkter Effekt auf den PAR-1 ausgemacht werden. Zunächst wurde gezeigt, dass mit VORA, einem bekannten PAR-1-Inhibitor, der aktivierende Effekt von FXa, ebenso wie mit RIVA, wieder außer Kraft gesetzt werden (Abb.38). Damit war es möglich zu zeigen, dass sowohl VORA als auch RIVA, die FXa-induzierte Plättchenaktivierung hemmen konnten, was bewiesenermaßen zu geringeren thrombotischen Ereignissen bei KHK-Patienten führte. (33, 96, 97) Klinisch zeigte jedoch die

Hemmung des PAR-1 durch VORA erhöhte Raten für schwere Blutungen, (96) während hingegen eine antithrombotische Therapie mit RIVA (2,5 mg zweimal täglich) kombiniert mit einer Antiplättchentherapie zwar erhöhte Blutungsraten auftraten, diese jedoch weniger tödlich waren und zusätzlich ein vermindertes AMI Risiko aufwies. (78, 79)

Die direkte Wechselwirkung zwischen dem PAR-1 und FXa konnte außerdem bewiesen werden, indem die Verbindung Arg⁴¹-Ser⁴¹ als Angriffspunkt der extrazellulären Kette des Rezeptors durch FXa bestimmt werden konnte (Abb.39). Dabei stellt diese Position ebenfalls die Stelle der Proteinkette dar, an welcher die chemische Spaltung durch Thrombin erfolgt. (98)

5.1.5.3. Signalweg

Nachdem gezeigt wurde, dass die Plättchenaktivierung von FXa, ebenso wie die Stimulation der Plättchen mit Thrombin, über eine Aktivierung des PAR-1 verläuft, war jedoch noch nicht geklärt, über welchen Signalweg der Mechanismus weiter verläuft. Durch Inhibition einzelner wichtiger Proteine der verschiedenen Signalwege, stellte sich heraus, dass die Enzyme PI3K sowie PLC eine wesentliche Rolle im Geschehen spielten (Abb.40). (34) Beide Signalwege wurden bereits in der Vergangenheit als mögliche Wege der Aktivierung von Plättchen identifiziert. (99, 100) Zur Unterstützung der gefundenen Signalwege, wurden zusätzlich Plättchen durch subaggregatorische Konzentrationen von FXa vorstimuliert um daraus die exprimierten Signaltransduktoren in den Plättchen zu bestimmen. (101) Eine Erhöhung der DAG- und PI3K-Level zeigten, dass die Aktivierung des PAR-1 über eine Transduktion der PLC- und PI3K-Signalkaskade verlaufen musste (Abb.41).

Da die Inhibition von PLC neben der Signalinhibition des PAR-1, aber auch durch Hemmung weiterer autokriner Signalwege, die Plättchenreaktivität beeinflussen könnte, stellte diese Methode keine spezifische Untersuchung dar und erbrachte lediglich einen Anhaltspunkt. Dieses Ergebnis konnte zusätzlich, durch die Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Signalstärke nach Stimulation der Thrombozyten mit FXa, gestützt werden. Auch hier zeigte sich durch steigende Ca²⁺-Intensitäten nach Stimulation und dem Aufheben des Effektes durch Vorinkubation mit VORA, dass der Signalweg über PLC eine wichtige Rolle spielen musste (Abb.32). (34)

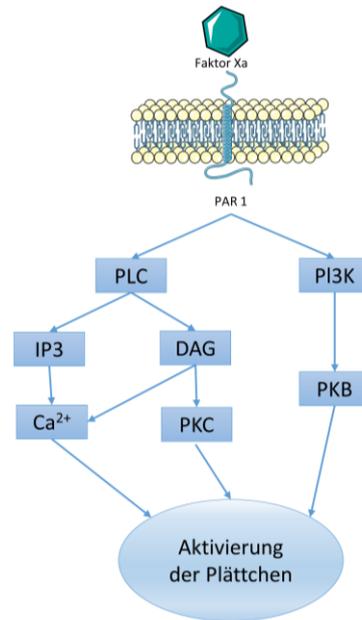


Abbildung 53: Schematische Darstellung des Signalwegs nach Aktivierung des PAR-1 (69)

So konnte gezeigt werden, dass RIVA eine gute und risikoarme Therapiemöglichkeit für die Thrombozytenaggregationshemmung darstellt, dessen Mechanismus unabhängig zu den gängigen Medikamenten der Antiplättchentherapie über die Inhibition von FXa und der daraus fehlenden Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR-1 verläuft (Abb.53). Da RIVA neben der gezeigten Eigenschaft der Aggregationshemmung, zusätzlich antithrombotische Eigenschaften aufweist, stellt es eine optimale Therapiemethode für KHK-Patienten mit VHF nach AMI dar.

5.2. Thrombozytenaggregationshemmung

5.2.1. Kardiales *Outcome* nach AMI

Zusätzlich zu der Antikoagulationstherapie wird in den aktuellen Leitlinien für Patienten mit VHF nach PCI eine Thrombozytenaggregationshemmung für ein Jahr empfohlen. (3) Dabei wird hier auf Grund der Studienlage eine Empfehlung für Clopidogrel ausgesprochen. Da jedoch in allen verfügbaren Studien lediglich die Dualtherapie eines OAKs mit Clopidogrel gegenüber einer Tripeltherapie mit den beiden Stoffen und ASS verglichen wurde, kann kein eindeutiger Vorteil von P2Y12-Hemmern gegenüber ASS nachgewiesen werden. (56-58, 60, 62)

Im Klinikalltag gehört es zur Routine bei Patienten, mit einer bevorstehenden PCI, mit einem *Loading* von ASS und einem P2Y12-Hemmer zu beginnen. Dies wurde bisher durchgeführt,

um den Patienten vor weiteren ischämischen Ereignissen zu schützen. Ob ASS dabei, neben seiner präventiven Wirkung, auch einen Effekt auf die Ischämie und den *Outcome* nach einem AMI hat, ist bisher noch nicht untersucht worden und war bis dato noch unklar. Eine Reduktion des Infarktareals oder verbesserte Herzfunktionen konnten bisher noch nicht als Vorteil von ASS gewertet werden. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigten jedoch eindeutig positive Effekte von ASS auf das kardiale *Outcome* nach AMI. Eine ASS-Therapie zeigte durchgehend bessere Herzfunktionen, geringere Infarktareale, sowie geringere Inflamationsprozesse in den betroffenen Bereichen. Dadurch könnte in Zukunft die Diskussion, um die Frage nach einer ASS-Behandlung in der Ischämie mit zusätzlichen Punkten für ASS ergänzt werden.

Die signifikant verringerten Infarktgrößen in ASS-behandelten Mäusen zeigten, dass durch den Thrombozytenaggregationshemmer, im AMI weniger kardiales Gewebe nekrotisch wurde und zu Grunde ging (Abb.42). Dies könnte beim Menschen, bei welchen eine Reduktion des Infarktareals über das Überleben entscheiden kann, große Verbesserungen hinsichtlich der Sterberate zeigen. (102) Dabei war der Zeitpunkt der ASS-Gabe nicht von großer Bedeutung. Die Versuche, in welchen ASS vor der Reperfusion gegeben wurde, spiegelten die Vorgehensweise im Klinikalltag wider, in welcher Patienten mit einem AMI eine Bolusgabe von ASS vor PCI erhalten. Es zeigten sich sowohl in dieser Versuchsgruppe als auch in der Gruppe, welche ASS bereits vor dem Auftreten der Ischämie erhielten, was eine Präventionstherapie widerspiegeln sollte, signifikante Verkleinerungen der Infarktgrößen sowie verbesserte Herzfunktionen. Natürlich sollte es auch hier notwendig sein, eine Abwägung bezüglich des Blutungsrisikos durchzuführen. Denn was zusätzlich mithilfe der Blutbilder gesehen werden konnte, war ein Abfall des Hämoglobin- und Hämatokrit-Wertes in der mit ASS-intervenierten Kohorte (Abb.47), was auf eine erhöhte Blutungsneigung bzw. einen erhöhten Blutverlust zurückzuführen war.

5.2.2. Plättchenabhängigkeit

Aktiviert Plättchen spielen eine zentrale Rolle im AMI und sind die ersten Zellen, die in das Gewebe einwandern. (103) Bereits 3 h nach Ischämie können Thrombozyten in das infarzierte Myokard einwandern. (104) Doch deren Rolle wird in der Literatur gegensätzlich beschrieben. Einerseits, konnte gezeigt werden, dass sich die Applikation von Plättchengel in das betroffene Gewebe, positiv auf das *Outcome* nach I/R bei Ratten auswirkte (105) und eine Verbesserung des ventrikulären *Remodelings* nach AMI durch Plättchen stattfand. (103) Andererseits zeigten Liu et al. aber auch, dass eine höhere Neigung zu Rupturen der

Gefäßwand durch Plättchen verursacht wurden und es gleichzeitig zu gesteigerten Inflammationen kam. (103) Durch Ausschütten verschiedener Inflammationsmediatoren war es den Thrombozyten möglich, Inflammationsprozesse in Gang zu setzen und beispielsweise Monozyten oder neutrophile Granulozyten in das betroffene Areal zu rekrutieren (106). Aufgrund der Unterversorgung des Myokards mit Sauerstoff, konnte es zu postischämischen Inflammationsprozessen kommen, welche ihrerseits zu einem Untergang weiterer Gewebezellen führen konnten. Bereits in den ersten 3 h, während der Akutphase, migrierten Thrombozyten in das infarzierte Areal des Myokards und bestimmten somit die frühe Phase der Inflammation. (103, 104) Unter anderem spielte dabei auch das Sphingolipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) eine große Rolle (107). Bereits Egom et al. konnten zeigen, dass nach AMI ein Anstieg der S1P-Konzentration zu verzeichnen war. (108) Neben seiner kardioprotektiven Eigenschaft, (109) zeigte S1P ebenso die Fähigkeit ein Mediator für Entzündungsprozesse im Zusammenspiel von Plättchen und WBC zu sein. Die Freisetzung dieses starken Vermittlers von Inflammationen kann aus RBC, WBC und Endothelzellen, aber auch thromboxanabhängig aus Plättchen erfolgen. (110) Mit der Hemmung der Plättchenreaktivität durch ASS, war es daher möglich die Interaktionen zwischen Thrombozyten und WBC zu inhibieren, sodass bereits in der Akutphase geringere Inflammationsprozesse ausgelöst werden konnten (107, 111). Aber auch das, aus den aktivierten Plättchen ausgeschüttete TXA, könnte sich negativ auf die Infarktgröße auswirken. Durch TXA kommt es zu einer Vasokonstriktion der Gefäße. Zusätzlich kommt es durch die Aktivierung der Thrombozyten zu weiteren Bildungen von Thromben und Mikrothromben, welche in Kombination mit den durch TXA verengten Gefäßen, weitere kleine Ischämien und daraus resultierende Gewebeschäden zur Folge haben können. (112) Zusätzlich zur Rekrutierung von WBC und deren Einfluss auf die Inflammationsprozesse, haben die Plättchen aber auch selbst einen großen Einfluss auf die Entzündungsreaktionen. Durch Ausschütten von Mikrovesikeln, Exosomen oder auch Apoptosekörpern kann die Inflammation zusätzlich verstärkt werden. (112) All diese thrombozytenabhängigen Prozesse können durch ASS und seine thrombozytenfunktionshemmende Wirkung herabgesetzt und die Infarktgröße dadurch verkleinert werden.

Es wäre aber ebenso denkbar, dass die Reduktion der Infarktareale durch einen rein antiinflammatorischen Effekt, aufgrund der COX-2-Hemmung durch ASS (6) zu erklären wäre und somit die Plättchen keinerlei Einfluss auf die verminderten Inflammationsprozesse bzw. die reduzierten Infarktgrößen hätten. Dies konnte jedoch durch die Depletion der Thrombozyten der Versuchstiere mithilfe eines Antikörpers geklärt werden. So konnte die

Rolle der Thrombozyten im AMI untersucht und ein möglicher Zusammenhang zwischen der Plättchenhemmung durch die ASS-Therapie und dem verbesserten *Outcome* dargestellt werden. Dabei wurde eindeutig gezeigt, dass Thrombozyten eine wesentliche Rolle in den Entzündungsprozessen spielten. Durch die Depletion der Thrombozyten sank die Infarktgröße drastisch ab. Ein Vergleich der Infarktgrößen von plättchendepletierten Mäusen mit und ohne ASS zeigte dabei jedoch keine Unterschiede (Abb.45), sodass die Wirksamkeit einer ASS-Therapie im Wesentlichen abhängig von der Anwesenheit der Thrombozyten war. So konnte gezeigt werden, dass durch ASS die Folgeschäden eines AMIs durch Hemmung der Plättchenreaktivität herabgesetzt wurden.

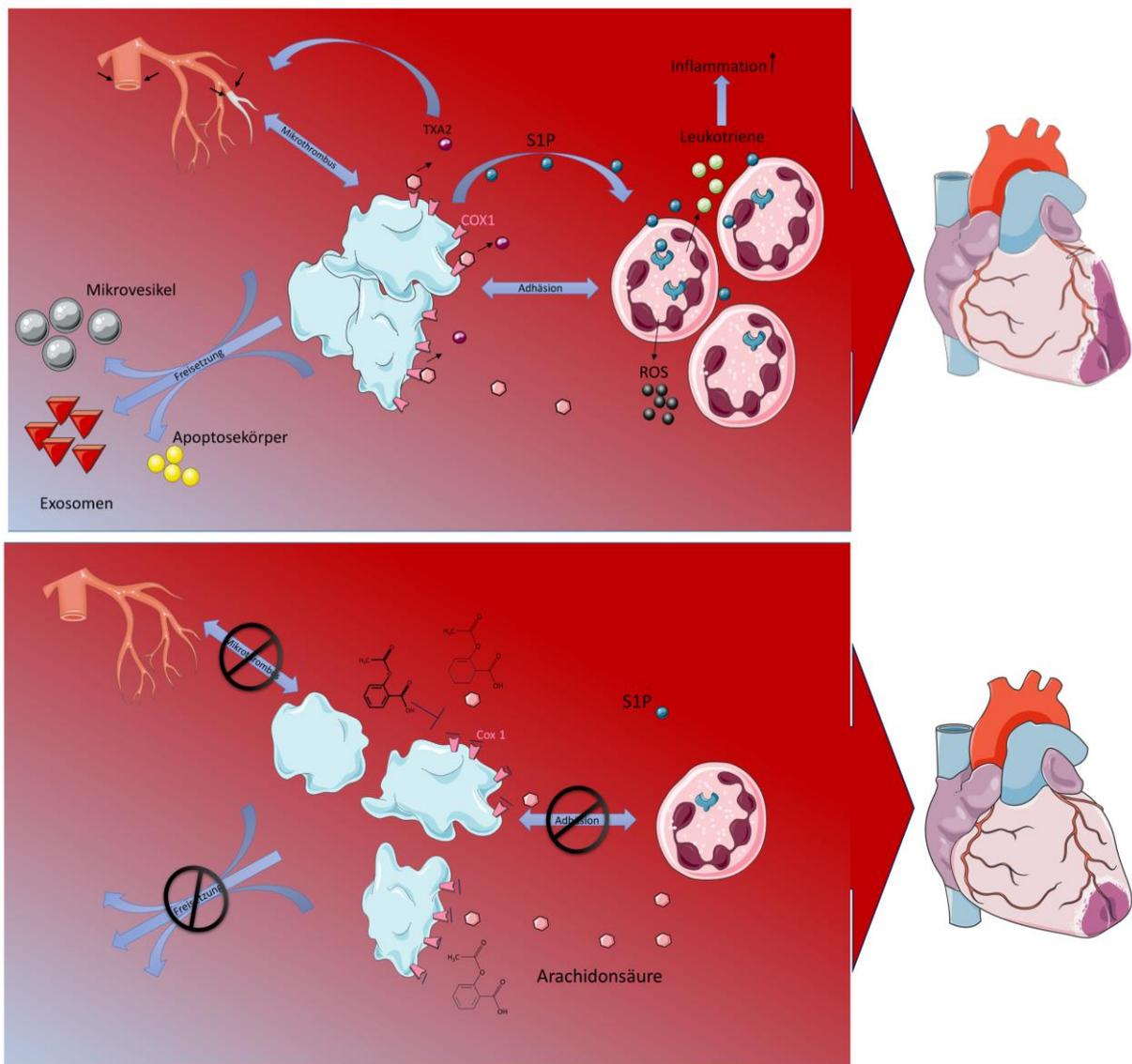


Abbildung 54: Mechanismus der plättchenvermittelten Leukozytenrekretion ohne und mit ASS

5.2.3. Inflammation post AMI

Neben Thrombozyten spielen auch die Leukozyten eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen und haben einen essentiellen Beitrag in der Heilungsphase. Besonders die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten haben hier einen wesentlichen Einfluss auf die Immunantwort. (111) Während in den ersten 4 h der Ischämie die Neutophilen in das Myokard einwandern und ihr Maximum nach 24 h erreichen, benötigt die Migration der Monozyten etwa 24 h. Man unterscheidet dabei zwischen zwei Arten von Monozyten. In den ersten 1-4 d werden hauptsächlich die proinflammatorischen Monozyten/Ly6C^{high} freigesetzt. Diese setzen unter anderem proteolytische Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies frei (ROS), was zu einem Untergang noch lebender Kardiomyozyten führt und dadurch eine Vergrößerung der Wunde zur Folge hat. Im weiteren Verlauf, nach etwa 4 d, steigt der Anteil der nicht-inflammatorischen Monozyten/Ly6C^{low}. Diese Zellen sind für die Reparatur und die Regeneration der Wunde zuständig. (113, 114) Besonders in der ersten Phase, in welcher die proinflammatorischen Monozyten vorkommen, ist ein sehr fein austariertes Gleichgewicht der Monozyten für die optimale Heilung notwendig. Weder ein Zuviel noch ein Zuwenig von inflammatorischen Monozyten wirkt sich positiv auf die Inflammation aus, was Nahrendorf et al. sehr anschaulich in ihrer Publikation von 2011 zeigten (Abb. 55). (115) Die Wirksamkeit einer antiinflammatorischen Therapie auf die Infarktgröße konnte auch schon vorher gezeigt werden. (114) Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führte eine Hemmung der Thrombozytenfunktion zu einer reduzierten Rekrutierung von Monozyten (Abb.48), was kleinere Infarktgrößen zur Folge hatte. Dabei war mithilfe von FACS-Analysen zu sehen, dass sowohl die Gesamtzahl der Monozyten als auch deren proinflammatorischer Anteil nach ASS-Behandlung geringer als die der Kontrollgruppe war. Gleichzeitig ist ein Anstieg des Granulozytenanteils zur gesamt Leukozytenzahl zu beobachten. Dies war jedoch schon seit längerem bekannt. Eine ASS-induzierte Eosinophilie und das daraus folgende Auftreten von Asthma, einer bekannten Nebenwirkung von ASS, konnte auf diese Eigenschaft des Arzneimittels zurückgeführt und beschrieben werden, sodass aufgrund dessen auch ein Anstieg des Granulozytenanteils zu erklären wäre (Abb.49). (116, 117) Zusätzlich konnte anhand der Blutbilder festgestellt werden, dass in den mit ASS-behandelten Mäusen keine nennenswerten Erhöhungen der gesamten WBC zu beobachten waren. Demgegenüber stieg die der Kontrollgruppe nach I/R an und erreichte einen signifikant höheren Wert, als die der ASS-behandelten Gruppe, was insgesamt für eine gesteigerte Immunreaktion spricht.

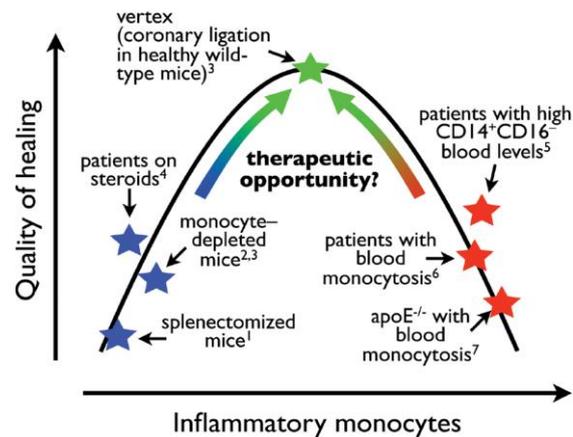


Abbildung 55: Schematische Darstellung des optimalen Gleichgewichts von inflammatorischen Monozyten zur Qualität der Heilung, 2011 dargestellt von Nahrendorf et al. (115)

Ein Vergleich der Herzen unter histologischen Aspekten, zeigte auch hier große Unterschiede zwischen den ASS-behandelten- und den Kontrollgruppen. Mithilfe der HE-Färbung konnte eine Übersichtsfärbung durchgeführt werden, in welcher gezeigt werden konnte, dass in den unbehandelten Tieren ein größerer Bereich von Inflammationen, als bei den mit ASS-behandelten Tieren, betroffen war (Abb.50). Die Rekrutierung von Makrophagen stellt einen der wichtigsten Mechanismen in Inflammationsprozessen dar. Durch Chemokine werden Monozyten aus dem Blut, in das betroffene Gewebe angelockt und differenzieren sich weiter zu Makrophagen aus. (115) Diese sorgen im entzündeten Gewebe, durch Phagozytose, für die Beseitigung von apoptotischen Zellen und können selber durch Ausschütten zahlreicher weiterer Chemokine zu einer Verstärkung des Inflammationsprozesses führen. (115) Dadurch zeigt ein hohes Maß von eingewanderten Makrophagen in das Infarktareal, eine stärkere Entzündungsrate, was folglich zu einem verstärkten Abbau des betroffenen Gewebes führt. Mithilfe immunhistologischer Untersuchungen der entnommenen Herzen konnte dies Kennlich gemacht werden. Dabei konnte man erkennen, dass das infarzierte Gewebe durch Behandlung mit ASS signifikant weniger von Makrophagen durchzogen war als die Herzen un behandelter Tiere (Abb.51).

Auch die neutrophilen Granulozyten haben im Inflammationsprozess einen wichtigen Einfluss auf die Immunantwort. Die Einwanderung dieser Zellen führt zu einem verstärkten Abbau vom Gewebe und dadurch zu schlechteren Herzfunktionen nach AMI. (111) Die Untersuchungen der Herzschnitte nach dem Markieren der Granulozyten mit einem Ly6G AK, stellten klar heraus, dass eine ASS-Behandlung im Infarkt, 24 h nach Ischämie eine signifikant geringe Anzahl an Neutrophilen zeigte, als die Herzschnitte, der mit Vehikel-behandelten Mäuse (Abb.52).

Dadurch konnte eindeutig gezeigt werden, dass durch eine ASS-Behandlung insgesamt eine geringere Immunantwort nach AMI erfolgt und das Herz im Nachhinein von einer geringeren Nekrose und dadurch geringeren Narbenbildung betroffen war.

5.3. Limitierende Faktoren

Die größte Limitierung der humanen Versuche dieser Dissertation ist die Akquise der Patientenzahlen. Zunächst ist die Größe der einzelnen Gruppen zwischen 37 und 53 relativ klein. Anhand der berechneten Poweranalysen ergeben die durchgeführten Studien jedoch gute und repräsentative Ergebnisse, zur Darstellung eines Effektes von RIVA auf die Plättchenreaktivität. Das Erreichen signifikanter Effekte, auch in Gruppen mit kleineren Größen, stellt zusätzlich die Relevanz des Effektes heraus und unterstreicht einen möglichen klinischen Nutzen, der hieraus gezogen werden kann. Des Weiteren sind bei jeder patientenbezogenen Studie weitere Einflüsse von bestehenden Nebenerkrankungen auf die Plättchenfunktion zu bedenken. Dennoch zeigten sich die Effekte auch in der durchgeführten Zeitreihenanalyse, in welcher interindividuelle Unterschiede umgangen werden.

Eine Limitierung der *in-vivo* Versuche ist in der Verwendung von Versuchstieren zu sehen. Aufgrund der sehr komplexen Vorgänge eines AMIs und der biochemischen und physikalischen Prozesse im lebenden Organismus, welche einen Einfluss auf den Verlauf der Thrombusbildung nehmen können, war es unabdingbar die durchgeführten Versuche *in-vivo* mithilfe von Tierversuchen durchzuführen. Da im Verlauf der Entwicklung eines Thrombus zahlreiche Zellpopulationen, Proteine und Mediatoren eine Rolle spielen, ist es nicht möglich eine einwandfreie Darstellung anhand von Zellkulturen durchzuführen. Ebenso würden diese Faktoren bei der Verwendung isolierter Gefäße fehlen. Zusätzlich sind durch die einfache Handhabung, sowie die kostengünstige Haltung, die murinen *in-vivo* Untersuchungen eine gute Alternative, um schnell erste Ergebnisse zu erhalten. Die Durchführung von Tierexperimenten stellt daher eine wichtige Methode dar, um die Grundlage für weiterführende translationale Studien zu erhalten. Neben einem großen organisatorischen und zeitlichen Aufwand bei der Patientenrekrutierung von klinischen Studien, ist zusätzlich der größte Nachteil dieser Methode, der Allgemeinzustand der Patienten. Die Untersuchungen dieser zumeist multimorbiden Patienten sind kompliziert, sodass die Erforschung von Pathomechanismen im Tiermodell eine ideale Methode für diese Zwecke darstellt.

Daher musste für die Darstellung der *in-vivo* Thrombusformation auf murine Versuche zurückgegriffen werden. Obwohl dies eine sehr gute und leicht zu realisierende Alternative darstellte, muss jedoch auch erwähnt werden, dass die physiologischen Eigenschaften

zwischen Mensch und Maus doch zu unterscheiden sind. Besonders in der Expression der PAR gibt es große artenspezifische Unterschiede. Während auf den Plättchen von Menschen PAR-1 und PAR-4 zu finden sind, befindet sich auf denen von Mäusen PAR-3 und PAR-4. Hinsichtlich der Funktion von Thrombozyten gibt es jedoch, trotz unterschiedlicher Größe und Anzahl, keine großen Unterschiede zwischen Mensch und Maus. (118)

Auch in den Stoffwechselprozessen von Menschen und Mäusen sind artspezifische Unterschiede bekannt. Hervorzuheben ist hier die Geschwindigkeit der Stoffwechselprozesse. Einer der auffälligsten Unterschiede der Versuchstiere zum Menschen ist die Geschwindigkeit der Herzschläge pro min. Während der Puls beim Menschen ca. 80 Schläge in der min beträgt, erreicht eine Maus bis zu 600 Schläge pro min.

Obwohl also die Stoffwechselprozesse bei Mäusen um ein wesentliches höher als beim Menschen sind, stimmen die Prozessvorgänge dennoch größtenteils dem des Menschen überein. Trotzdem ist es unablässig, die erzielten Ergebnisse in klinischen Studien auf Ihre Übertragbarkeit am Patienten zu prüfen. Außerdem wurden bisher nur die Auswirkungen auf die Akutphase und das *Outcome* nach 24 h Reperfusion untersucht. Um Aussagen über die langfristige Regeneration zu machen, bedarf es noch weiteren Untersuchungen, die eine längere Beobachtung der Versuchstiere mit sich bringt.

100pM weit unterhalb der im Patienten erreichten Konzentration, die etwa bei 422-787 pM liegen. (119, 120) Anhand dieser und der übrigen Ergebnisse kann die klinische Relevanz, welche die wichtige Rolle der FXa-Inhibitoren in der Thromboseprophylaxe von Risikopatienten veranschaulicht, gezeigt werden.

Zusätzlich wurde der Nutzen einer ASS-Therapie im AMI untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch ASS eine plättchenabhängige Reduktion der Infarktgrößen, eine Verbesserung der Herzfunktion, sowie eine verminderte Immunantwort nach AMI auftrat. Weitere Untersuchungen auf langfristige Folgen sollten hier noch folgen, sodass die vollständige und langfristige Wirksamkeit von ASS für die Primärprävention hinsichtlich des verbesserten *Outcomes* nach AMI vollkommen geklärt werden kann. Außerdem sind zusätzliche klinische Studien notwendig, um die Ergebnisse aus den murinen Untersuchungen im Menschen zu reproduzieren und zu bestätigen.

7. Literaturverzeichnis

1. WorldHealthOrganization. Cardiovascular Diseases 2019 [Available from: <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/>].
2. Hamm C. Was genau ist eigentlich eine KHK 2010 [Available from: <https://www.herzstiftung.de/KHK.html>].
3. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2019.
4. HarvardHealthPublishing. Heart Attack (Myocardial Infarction) 2019 [Available from: https://www.health.harvard.edu/a_to_z/heart-attack-myocardial-infarction-a-to-z].
5. Fang L, Moore XL, Dart AM, Wang LM. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J Geriatr Cardiol*. 2015;12(3):305-12.
6. Mutschler E. Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. 10., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed. Stuttgart: WVG; 2013. XXIII, 1197 S. p.
7. Bonzel T, Erbel R, Hamm CW, Levenson B, Neumann FJ, Rupprecht HJ, et al. [Percutaneous coronary interventions (PCI)]. *Clin Res Cardiol*. 2008;97(8):513-47.
8. Zeus T, Ketterer U, Leuf D, Dannenberg L, Bonner F, Wagstaff R, et al. Safety of percutaneous coronary intervention in patients with acute ischemic stroke/transient ischemic attack and acute coronary syndrome. *Clin Res Cardiol*. 2016;105(4):356-63.
9. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119-77.
10. Zeymer U, Zahn R. [Antithrombotic therapy and atrial fibrillation. Dual or triple therapy after acute coronary syndrome and stent?]. *Herz*. 2014;39(7):814-8.
11. Zimetbaum P. Atrial Fibrillation. *Ann Intern Med*. 2017;166(5):ITC33-ITC48.
12. KompetenznetzVorhofflimmernE.V. VOLKSKRANKHEIT VORHOFFLIMMERN IN DEUTSCHLAND 2018 [Available from: <https://www.kompetenznetz-vorhofflimmern.de/de/vorhofflimmern/patienteninformation-vorhofflimmern/volkskrankheit-vorhofflimmern-deutschland>].
13. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*. 2017.
14. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*. 2018;39(3):213-60.
15. Dannenberg L, Zako S, Mourikis P, Veulemans V, Kelm M, Zeus T, et al. Oral Anticoagulation Therapy and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis: Factor Xa versus Factor IIa Inhibition? *Pharmacology*. 2019;104(3-4):212-4.

16. Polzin A, Dannenberg L, Wolff G, Helten C, Achilles A, Hohlfeld T, et al. Non-vitamin K oral anticoagulants (NOAC) and the risk of myocardial infarction: Differences between factor IIa and factor Xa inhibition? *Pharmacol Ther.* 2019;195:1-4.
17. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2009;361(12):1139-51.
18. Giugliano RP, Ruff CT, Braunwald E, Murphy SA, Wiviott SD, Halperin JL, et al. Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2013;369(22):2093-104.
19. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2011;365(11):981-92.
20. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2011;365(10):883-91.
21. Members ATF, Camm AJ, Lip GYH, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: An update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *EP Europace.* 2012;14(10):1385-413.
22. Polzin A, Dannenberg L, Wolff G, Helten C, Achilles A, Hohlfeld T, et al. Non-vitamin K oral anticoagulants (NOAC) and the risk of myocardial infarction: Differences between factor IIa and factor Xa inhibition? *Pharmacol Ther.* 2018;195:1-4.
23. Rishavy MA, Hallgren KW, Wilson L, Singh S, Runge KW, Berkner KL. Warfarin alters vitamin K metabolism: a surprising mechanism of VKORC1 uncoupling necessitates an additional reductase. *Blood.* 2018;131(25):2826-35.
24. PharmazeutischeZeitung. Vitamin K und seine Funktionen im Körper 2004 [Available from: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/inhalt-31-2004/pharm7-31-2004/>].
25. Verhoef TI, Redekop WK, Daly AK, van Schie RM, de Boer A, Maitland-van der Zee AH. Pharmacogenetic-guided dosing of coumarin anticoagulants: algorithms for warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Br J Clin Pharmacol.* 2014;77(4):626-41.
26. Frohn LP. Wirkstoff-Lexikon: Marcumar (Phenprocoumon) DAZ.online2020 [Available from: <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2020/05/14/marcumar-phenprocoumon#comments>].
27. Bischoff M. ANTIDOT IDARUCIZUMAB - „Airbag“ für das NOAK Dabigatran. *Deutsches Ärzteblatt* 2016;19:946.
28. PharmazeutischeZeitung. Rivaroxaban als neuer Standard 2019 [Available from: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/rivaroxaban-als-neuer-standard/>].
29. PharmazeutischeZeitung. Apixaban|Eliquis®|20|2011 2015 [Available from: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/arzneistoffe/daten/2011/apixabaneliquisr202011/>].
30. PharmazeutischeZeitung. Edoxaban|Lixiana®|20|2015 2016 [Available from: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/arzneistoffe/daten/2015/edoxabanlixianar202015/>].
31. PharmazeutischeZeitung. Xarelto- und Eliquis-Antidot zugelassen 2019 [Available from: <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2019/05/07/xarelto-und-eliquis-antidot-zugelassen>].
32. Rao LV, Rapaport SI. Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(18):6687-91.
33. Tricoci P, Huang Z, Held C, Moliterno DJ, Armstrong PW, Van de Werf F, et al. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2012;366(1):20-33.

34. Vilahur G, Gutierrez M, Arzanauskaitė M, Mendieta G, Ben-Aicha S, Badimon L. Intracellular platelet signalling as a target for drug development. *Vascul Pharmacol*. 2018;111:22-5.
35. Achilles A, Mohring A, Dannenberg L, Grandoch M, Hohlfeld T, Fischer JW, et al. Dabigatran enhances platelet reactivity and platelet thrombin receptor expression in patients with atrial fibrillation. *J Thromb Haemost*. 2017;15(3):473-6.
36. Brambatti M, Darius H, Oldgren J, Clemens A, Noack HH, Brueckmann M, et al. Comparison of dabigatran versus warfarin in diabetic patients with atrial fibrillation: Results from the RE-LY trial. *Int J Cardiol*. 2015;196:127-31.
37. Artang R, Rome E, Nielsen JD, Vidaillet HJ. Meta-analysis of randomized controlled trials on risk of myocardial infarction from the use of oral direct thrombin inhibitors. *Am J Cardiol*. 2013;112(12):1973-9.
38. Polzin A, Dannenberg L, Wolff G, Zeus T, Kelm M, Petzold T. Increased risk of myocardial infarction with dabigatran etexilate: Fact or fiction? A critical meta-analysis from integrating randomized controlled trials and real-world studies: Wine or spritzer? *Int J Cardiol*. 2018;270:82.
39. BayerAG. Aspirin™ - überraschend vielseitig 2019 [Available from: <https://www.bayer.de/de/aspirin.aspx>].
40. Fuster V, Sweeny JM. Aspirin: a historical and contemporary therapeutic overview. *Circulation*. 2011;123(7):768-78.
41. Schror K, Rauch BH. Aspirin and lipid mediators in the cardiovascular system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015;121(Pt A):17-23.
42. Schror K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost*. 1997;23(4):349-56.
43. Polzin A, Schleicher M, Seidel H, Scharf RE, Merx MW, Kelm M, et al. High on-treatment platelet reactivity in transcatheter aortic valve implantation patients. *Eur J Pharmacol*. 2015;751:24-7.
44. Polzin A, Dannenberg L, Sophia Popp V, Kelm M, Zeus T. Antiplatelet effects of clopidogrel and aspirin after interventional patent foramen ovale/ atrium septum defect closure. *Platelets*. 2016;27(4):317-21.
45. Polzin A, Afzal S, Balzer J, Rassaf T, Kelm M, Zeus T. Platelet reactivity in MitraClip patients. *Vascul Pharmacol*. 2016;77:54-9.
46. Dannenberg L, Mourikis P, Naguib D, Zako S, Helten C, M'Pembale R, et al. Antiplatelet effects of aspirin and clopidogrel after left atrial appendage (LAA) occluder implantation. *Int J Cardiol*. 2019;275:95-100.
47. Rothwell PM, Cook NR, Gaziano JM, Price JF, Belch JFF, Roncagliani MC, et al. Effects of aspirin on risks of vascular events and cancer according to bodyweight and dose: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2018;392(10145):387-99.
48. Mourikis P, Zako S, Dannenberg L, Helten C, Naguib D, Hohlfeld T, et al. Aspirin antiplatelet effects are associated with body weight. *Vascul Pharmacol*. 2019:106635.
49. Schror K, Nitschmann S. [Importance of acetylsalicylic acid in primary prevention : ASCEND, ARRIVE and ASPREE as well as a meta-analysis by Rothwell et al.]. *Internist (Berl)*. 2019;60(2):209-16.
50. Group ASC, Bowman L, Mafham M, Wallendszus K, Stevens W, Buck G, et al. Effects of Aspirin for Primary Prevention in Persons with Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 2018;379(16):1529-39.
51. Gaziano JM, Brotons C, Coppolecchia R, Cricelli C, Darius H, Gorelick PB, et al. Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2018;392(10152):1036-46.

52. McNeil JJ, Nelson MR, Woods RL, Lockery JE, Wolfe R, Reid CM, et al. Effect of Aspirin on All-Cause Mortality in the Healthy Elderly. *N Engl J Med.* 2018;379(16):1519-28.
53. McNeil JJ, Wolfe R, Woods RL, Tonkin AM, Donnan GA, Nelson MR, et al. Effect of Aspirin on Cardiovascular Events and Bleeding in the Healthy Elderly. *N Engl J Med.* 2018;379(16):1509-18.
54. McNeil JJ, Woods RL, Nelson MR, Reid CM, Kirpach B, Wolfe R, et al. Effect of Aspirin on Disability-free Survival in the Healthy Elderly. *N Engl J Med.* 2018;379(16):1499-508.
55. Schror K. Why we should not skip aspirin in cardiovascular prevention. *Hamostaseologie.* 2016;36(1):33-43.
56. Dewilde WJ, Oirbans T, Verheugt FW, Kelder JC, De Smet BJ, Herrman JP, et al. Use of clopidogrel with or without aspirin in patients taking oral anticoagulant therapy and undergoing percutaneous coronary intervention: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet.* 2013;381(9872):1107-15.
57. Gibson CM, Mehran R, Bode C, Halperin J, Verheugt FW, Wildgoose P, et al. Prevention of Bleeding in Patients with Atrial Fibrillation Undergoing PCI. *N Engl J Med.* 2016;375(25):2423-34.
58. Cannon CP, Gropper S, Bhatt DL, Ellis SG, Kimura T, Lip GY, et al. Design and Rationale of the RE-DUAL PCI Trial: A Prospective, Randomized, Phase 3b Study Comparing the Safety and Efficacy of Dual Antithrombotic Therapy With Dabigatran Etexilate Versus Warfarin Triple Therapy in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation Who Have Undergone Percutaneous Coronary Intervention With Stenting. *Clin Cardiol.* 2016;39(10):555-64.
59. Cannon CP, Bhatt DL, Oldgren J, Lip GYH, Ellis SG, Kimura T, et al. Dual Antithrombotic Therapy with Dabigatran after PCI in Atrial Fibrillation. *N Engl J Med.* 2017;377(16):1513-24.
60. Vranckx P, Valgimigli M, Eckardt L, Tijssen J, Lewalter T, Gargiulo G, et al. Edoxaban-based versus vitamin K antagonist-based antithrombotic regimen after successful coronary stenting in patients with atrial fibrillation (ENTRUST-AF PCI): a randomised, open-label, phase 3b trial. *The Lancet.* 2019;394(10206):1335-43.
61. Lopes RD, Vora AN, Liaw D, Granger CB, Darius H, Goodman SG, et al. An open-Label, 2 x 2 factorial, randomized controlled trial to evaluate the safety of apixaban vs. vitamin K antagonist and aspirin vs. placebo in patients with atrial fibrillation and acute coronary syndrome and/or percutaneous coronary intervention: Rationale and design of the AUGUSTUS trial. *Am Heart J.* 2018;200:17-23.
62. Lopes RD, Heizer G, Aronson R, Vora AN, Massaro T, Mehran R, et al. Antithrombotic Therapy after Acute Coronary Syndrome or PCI in Atrial Fibrillation. *N Engl J Med.* 2019;380(16):1509-24.
63. Diagnostics R. Multiplate analyzer, Operator's Manual. 2.0 ed2016.
64. Polzin A, Helten C, Dannenberg L, Mourikis P, Naguib D, Achilles A, et al. Platelet Reactivity in Patients on Aspirin and Clopidogrel Therapy Measured by a New Bedside Whole-Blood Assay. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2019;73(1):40-7.
65. Pircher J, Czermak T, Ehrlich A, Eberle C, Gaitzsch E, Margraf A, et al. Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation. *Nat Commun.* 2018;9(1):1523.
66. Emfret. Antibodies for Platelet Depletion in Mice In: Co.KG eAG, editor. 2014.
67. Jones SP, Girod WG, Palazzo AJ, Granger DN, Grisham MB, Jour'dHeuil D, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. *Am J Physiol.* 1999;276(5):H1567-73.
68. Kamath S, Chin BS, Blann AD, Lip GY. A study of platelet activation in paroxysmal, persistent and permanent atrial fibrillation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002;13(7):627-36.

69. Petzold T, Thienel M, Dannenberg LK, Mourikis P, Helten C, Ayhan A, et al. Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa Driven Platelet Activation Via Protease Activated Receptor-1. *Circ Res*. 2019.
70. Dans AL, Connolly SJ, Wallentin L, Yang S, Nakamya J, Brueckmann M, et al. Concomitant use of antiplatelet therapy with dabigatran or warfarin in the Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy (RE-LY) trial. *Circulation*. 2013;127(5):634-40.
71. Steppich B, Dobler F, Brendel LC, Hessling G, Braun SL, Steinsiek AL, et al. Effect of the FXa inhibitors Rivaroxaban and Apixaban on platelet activation in patients with atrial fibrillation. *J Thromb Thrombolysis*. 2017;43(4):490-7.
72. Nehaj F, Sokol J, Ivankova J, Mokan M, Kovar F, Stasko J, et al. First Evidence: TRAP-Induced Platelet Aggregation Is Reduced in Patients Receiving Xabans. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018;24(6):914-9.
73. Perzborn E, Heitmeier S, Laux V. Effects of Rivaroxaban on Platelet Activation and Platelet-Coagulation Pathway Interaction: In Vitro and In Vivo Studies. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2015;20(6):554-62.
74. Zemer-Wassercug N, Haim M, Leshem-Lev D, Orvin KL, Vaduganathan M, Gutstein A, et al. The effect of dabigatran and rivaroxaban on platelet reactivity and inflammatory markers. *J Thromb Thrombolysis*. 2015;40(3):340-6.
75. Banovcin P, Jr., Skornova I, Samos M, Schnierer M, Bolek T, Kovar F, et al. Platelet Aggregation in Direct Oral Factor Xa Inhibitors-treated Patients With Atrial Fibrillation: A Pilot Study. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017;70(4):263-6.
76. Lee CJ, Gerds TA, Carlson N, Bonde AN, Gislason GH, Lamberts M, et al. Risk of Myocardial Infarction in Anticoagulated Patients With Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(1):17-26.
77. Lopez-Lopez JA, Sterne JAC, Thom HHZ, Higgins JPT, Hingorani AD, Okoli GN, et al. Oral anticoagulants for prevention of stroke in atrial fibrillation: systematic review, network meta-analysis, and cost effectiveness analysis. *BMJ*. 2017;359:j5058.
78. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, et al. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012;366(1):9-19.
79. Eikelboom JW, Connolly SJ, Bosch J, Dagenais GR, Hart RG, Shestakovska O, et al. Rivaroxaban with or without Aspirin in Stable Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(14):1319-30.
80. Borst O, Munzer P, Alnaggar N, Geue S, Tegtmeier R, Rath D, et al. Inhibitory mechanisms of very low-dose rivaroxaban in non-ST-elevation myocardial infarction. *Blood Adv*. 2018;2(6):715-30.
81. Ivanciu L, Krishnaswamy S, Camire RM. New insights into the spatiotemporal localization of prothrombinase in vivo. *Blood*. 2014;124(11):1705-14.
82. Ivanciu L, Stalker TJ. Spatiotemporal regulation of coagulation and platelet activation during the hemostatic response in vivo. *J Thromb Haemost*. 2015;13(11):1949-59.
83. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:92-104.
84. Brambilla M, Rossetti L, Zara C, Canzano P, Giesen PLA, Tremoli E, et al. Do methodological differences account for the current controversy on tissue factor expression in platelets? *Platelets*. 2018;29(4):406-14.
85. Alvarez E, Paradela-Dobarro B, Raposeiras-Roubin S, Gonzalez-Juanatey JR. Protective, repairing and fibrinolytic effects of rivaroxaban on vascular endothelium. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(2):280-91.

86. Wagner NM, Dressel T, Schafer K, Konstantinides S. Effect of the factor Xa inhibitor rivaroxaban on arterial thrombosis in wild-type and apolipoprotein E-deficient mice. *Thromb Res.* 2012;130(5):793-8.
87. Pircher J, Fochler F, Czermak T, Mannell H, Kraemer BF, Wornle M, et al. Hydrogen sulfide-releasing aspirin derivative ACS14 exerts strong antithrombotic effects in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(12):2884-91.
88. Fuijkschot WW, Groothuizen WE, Appelman Y, Radonic T, van Royen N, van Leeuwen MA, et al. Inflammatory cell content of coronary thrombi is dependent on thrombus age in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J Cardiol.* 2017;69(1):394-400.
89. Thomas MR, Wijeyeratne YD, May JA, Johnson A, Heptinstall S, Fox SC. A platelet P-selectin test predicts adverse cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes treated with aspirin and clopidogrel. *Platelets.* 2014;25(8):612-8.
90. Ahmadsefi M, Lievens D, Weber C, von Hundelshausen P, Gerdes N. Immune-mediated and lipid-mediated platelet function in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2015;26(5):438-48.
91. Herter JM, Rossaint J, Zarbock A. Platelets in inflammation and immunity. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1764-75.
92. Krishnaswamy S. The transition of prothrombin to thrombin. *J Thromb Haemost.* 2013;11 Suppl 1:265-76.
93. Nowak G, Schror K. Hirudin--the long and stony way from an anticoagulant peptide in the saliva of medicinal leech to a recombinant drug and beyond. A historical piece. *Thromb Haemost.* 2007;98(1):116-9.
94. Wong PC, Seiffert D, Bird JE, Watson CA, Bostwick JS, Giancarli M, et al. Blockade of protease-activated receptor-4 (PAR4) provides robust antithrombotic activity with low bleeding. *Sci Transl Med.* 2017;9(371).
95. Posma JJ, Grover SP, Hisada Y, Owens AP, 3rd, Antoniak S, Spronk HM, et al. Roles of Coagulation Proteases and PARs (Protease-Activated Receptors) in Mouse Models of Inflammatory Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(1):13-24.
96. Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, Ameriso SF, Dalby AJ, Fish MP, et al. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1404-13.
97. Magnani G, Bonaca MP, Braunwald E, Dalby AJ, Fox KA, Murphy SA, et al. Efficacy and safety of vorapaxar as approved for clinical use in the United States. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(3):e001505.
98. Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW. Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:67.
99. Chen Z, Li T, Kareem K, Tran D, Griffith BP, Wu ZJ. The role of PI3K/Akt signaling pathway in non-physiological shear stress-induced platelet activation. *Artif Organs.* 2019;43(9):897-908.
100. Guidetti GF, Canobbio I, Torti M. PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis. *Adv Biol Regul.* 2015;59:36-52.
101. Rahman SM, Eichinger CD, Hlady V. Effects of upstream shear forces on priming of platelets for downstream adhesion and activation. *Acta Biomater.* 2018;73:228-35.
102. Rutsch W. *Fortschritte in der Kardiologie.* . Schaper W. GMG, editor. Heidelberg: Steinkopff-Verlag; 1982.
103. Liu Y, Gao XM, Fang L, Jennings NL, Su Y, Q X, et al. Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(4):834-41.
104. Ziegler M, Alt K, Paterson BM, Kanellakis P, Bobik A, Donnelly PS, et al. Highly Sensitive Detection of Minimal Cardiac Ischemia using Positron Emission Tomography Imaging of Activated Platelets. *Sci Rep.* 2016;6:38161.

105. Cheng K, Malliaras K, Shen D, Tseliou E, Ionta V, Smith J, et al. Intramyocardial injection of platelet gel promotes endogenous repair and augments cardiac function in rats with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(3):256-64.
106. Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost.* 2015;114(3):449-58.
107. Ulrych T, Bohm A, Polzin A, Daum G, Nusing RM, Geisslinger G, et al. Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation. *J Thromb Haemost.* 2011;9(4):790-8.
108. Egom EE, Mamas MA, Chacko S, Stringer SE, Charlton-Menys V, El-Omar M, et al. Serum sphingolipids level as a novel potential marker for early detection of human myocardial ischaemic injury. *Front Physiol.* 2013;4:130.
109. Levkau B. HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications. *Front Pharmacol.* 2015;6:243.
110. Polzin A, Rassaf T, Bohm A, Luth A, Kleuser B, Zeus T, et al. Aspirin inhibits release of platelet-derived sphingosine-1-phosphate in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013;170(2):e23-4.
111. Schrottmaier WC, Kral JB, Badrnya S, Assinger A. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb Haemost.* 2015;114(3):478-89.
112. Ziegler M, Wang X, Peter K. Platelets in cardiac ischaemia/reperfusion injury: a promising therapeutic target. *Cardiovasc Res.* 2019;115(7):1178-88.
113. Peet C, Ivetic A, Bromage DI, Shah AM. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2019.
114. Steffens S, Montecucco F, Mach F. The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury. *Thromb Haemost.* 2009;102(2):240-7.
115. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation.* 2010;121(22):2437-45.
116. Isogai S, Hayashi M, Yamamoto N, Morishita M, Minezawa T, Okamura T, et al. Upregulation of CD11b on eosinophils in aspirin induced asthma. *Allergol Int.* 2013;62(3):367-73.
117. Maidment I, Williams C. Drug-induced eosinophilia 2000 [Available from: <https://www.pharmaceutical-journal.com/cpd-and-learning/learning-article/drug-induced-eosinophilia/20000049.article?firstPass=false>].
118. Jirouskova M, Shet AS, Johnson GJ. A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *J Thromb Haemost.* 2007;5(4):661-9.
119. Mueck W, Stampfuss J, Kubitzka D, Becka M. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(1):1-16.
120. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, et al. [2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS]. *Kardiol Pol.* 2016;74(12):1359-469.

8. Chemikalien- und Materialliste

I. Versuchstiere

Art	Linie	Lieferant	Alter	Geschlecht
Maus	C57BL/6J	Janvier	11-15 Wochen	männlich

II. Tierfutter

Futter	Hersteller	Artikelnummer
Standard Futter	Ssniff	

III. Medikamente

Handelsname	Inhaltsstoff	Hersteller	PZN	Dosierung
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Dexpanthenol	Bayer	1578675	-
Heparin-Natrium 25.000 I.E./5ml	Heparin-Natrium	B.Braun	9929393	1000 I.E.
Isofluran-Piramal®	Isofluran	Piramal Healthcare	9714675	1,5-2 Vol %
Isoton. NaCl-Lösung 0,9%	NaCl	Fresenius Kabi	809090	-
Ketaset® S	Ketamin	Zoetis	12467832	100 mg/Kg
Rompun®	Xylazin	Bayer	1320422	10 mg/Kg
Temgesic®	Buprenorphin	Indivior	345928	0,05-0,1 mg/Kg

IV. Chemikalien

Name	Hersteller	Artikelnummer
2,3,5-Triphenyltetrazolinum-chlorid	Sigma	T8877
Acetylsalicylsäure	Sigma	A5376
ADP Reagenz	Sigma	A2754
ADP-Test	Roche	8847550190
Ammoniumchlorid-Lyse-Puffer	Apotheke UKD	-
Aquasonic 100	Parker Laboratories	01-50
Bacillol®	Bode	973380
Bovine serum albumin (BSA) (Albumin bovine Fraction V)	SERVA	11924.
Calcein, AM	life technologies™	C1430
Collagen chronopar	Chronolog	70220
Collagenreagenz Horm	Takeda	1130630
Di-Natrium-hydrogenphosphat- dihydrat	Merck	106342
Di-Natrium-hydrogenphosphat- monohydrat	Merck	106346
Dulbecco's Phospate Buffered Saline with CaCl₂/ MgCl₂	Sigma	D8662
Dulbecco's Phospate Buffered Saline without CaCl₂/ MgCl₂	Sigma	D8537
Elektroden-creme	Gello	-
Entellan®	Merck	1.07961.0100
Ethanol 70%	VWR	84858.290
Ethanol 96%	VWR	20905.296
Ethanol absolut	VWR	20821.330
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma	E7889
Eukitt®	Fluka	03989
Evans Blau	Fluka	46160
FACSFlow™	BD	342003

FACSTM Clean	BD	340345
Fetales Bovine Serum	ThermoFisher	A3160802
Hämatoxylin-Lösung	Merck	1.05174.1000
Isot. Kochsalzlösung	Fresenius Kabi	808765
Isotonische Glucose Lösung für collagen Verdünnungen pH 2.7-2.9	ProChronoPar	11924.02
LY-294,002 hydrochlorid (PI3K-I)	Sigma	L9908
Med. Gase	Linde	
Octenisept®	Schülke & Mayr	03853401
Paraffin	Carl Roth	CN48.2
Paraformaldehyd-Lösung 4% in PBS	Alfa Aesar	J19943
PGE-1	Cayman Chemical Companie	13010.1
Pikro-Siriusrot-Lösung	Morphisto	13422.00500
Rivaroxaban	APE xBio	A4338
ROCK-Inh (Y-27632)	Sigma	SCM075
Roticlean®	CarlRoth	1529
Sterilium®	Bode	975512
Stickstoff flüssig	Linde	
Trap-6	Sigma	T1573
Trap-Test	Roche	8847509190
U-73122 hydrat (PLC-Inh)	Sigma	U6756
Veet Haarentfernungs-Creme	Reckitt Benckiser	7768307
Vorapaxar	Abmole	M3123
Wasser dest.	Millipor	-
Xylol	VWR	28973.328

V. Puffer

Puffer	Zusammensetzung		Hersteller
ACD	74,8mM	Trisodiumcitrat x2 H ₂ O	Merck
	65mM	Citronensäure	Merck
	111mM	Glukose x H ₂ O	Merck
FACS Puffer	2mM	EDTA	Sigma
	2%	FCS	ThermoFisher
	in	PBS	
Thrombozytenmedium	134mM	NaCl	Merck
	12mM	NaHCO ₃	Merck
	2,9mM	KCl	Merck
	0,36mM	NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	Merck
	1mM	MgCl ₂ x6H ₂ O	Merck
	5mM	HEPES	Sigma
	pH 7,4		
Thrombozytenwaschpuffer	113mM	NaCl	Merck
	4mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck
	24mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck
	4mM	KH ₂ PO ₄	Merck
TTC Puffer	Puffer 1:		
	12,2g	Na ₂ HPO ₄ auf 1L H ₂ O	Merck
	Puffer 2:		
	6g	NaH ₂ PO ₄	Merck
	8:2	Puffer 1+Puffer 2	
	pH=7,4		

VI. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller	Artikelnummer
3M Transpore™	3M	1527-1
Bioflux 200 low-shear 48 well Platten	Fluxion Bioscience	FL-910-0004
Butterfly G21	BD Vacutainer® Safety-Lok™	3200162
Cellstar PP Schraubverschluss Röhren, 15 ml	Greiner Bio-One	188241
Cellstar PP Schraubverschluss Röhren, 50 ml	Greiner Bio-One	227261
Cellstar® Zellkulturschälchen	Greiner Bio-One	628 160
Citratröhren	BD Vacutainer®	3223418
Cleanisept® Wipes	Dr.Schumacher	00-208-D100
Deckgläser	Engelbrecht	K12460
Dispensertip	VWR	3217261
Einbettkästen		47-1600-00
Einwegskalpell No.11	Feather®	200130011
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 mL	Eppendorf	0030120086
ES-Kompressen	Hartmann	407 853
FACS Röhren	Sarstedt	551.579.002
Frischhaltefolie	-	-
Glas Pasteurpipetten	Brand GmbH + Co	7477 20
Hirudinröhren	Sarstedt	41.959.001
Kuvetten apact	LABiTec	40.613.0005
Messzellen Multiplate	Roche	06675590001
Micro-Touch® Nitra-Tex®	Ansell	700113
Mikrotomklinge	Feather®	207500002

MiniCollect® Tube	Greiner Bio-One	450474
Objektträger	Engelbrecht	111001.
PE 10-Schlauch	Reichert Chemietechnologie	
Pipettenspitzen 10/20µl	StarLab	S1120-3810
Pipettenspitzen 1000µl	StarLab	S1122-1830
Pipettenspitzen 200µl	StarLab	S1120-8810
Pipettenspitzen Multiplate	Roche	6675638001
Rasierklingen	Wilkinson	
Reaktionsgefäß 1,5 ml braun	Eppendorf	211-2135
Spatel	VWR	231-2176P
Superfrost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser	OTS
Wägeschalen	VWR	611-9168
Wattestäbchen	Nobamed	974202
Wattestäbchen groß	MaiMed®	71010
Wypall Tücher	Wypall	3227171
Zelletten® Zellstofftupfer	Lohmann & Rauscher	13 356

VII. Antikörper

Antikörper	Konjugat	Hersteller	Verdünnung	Artikelnummer
CD11b	PerCP-Cy5.5	BD	1:100	550993
CD19	FITC	BioLegend	1:100	152404
CD3	APC	BioLegend	1:100	100312
CD4	PerCP-Cy5.5	BD	1:100	550954
CD45	Pe-Cy7	BioLegend	1:100	103210
CD45	BV	BioLegend	1:100	103134
CD8	APC-Cy7	Miltenyi	1:100	130-102-305
Depletion	--	Emfret	2 µg/g	R300
F4/80	PE	BioLegend	1:100	123110
FC-Block	--	Miltenyi	1:10	130-092-575

Ly6c	V450	BD	1:100	560594
Ly6g	FITC	BioLegend	1:100	127606
Ly6G Färbung		abcam		Ab25377
MAC 2 Färbung		Cedarline		CL8942AP
PAR-1 AK (F2R)	FITC	Alomone Labs		APR-031-F
PAR-4 AK (F2RL3)	FITC	Alomone Labs		APR-034-F
P-Selectin AK	BV 421	BD	1:100	564037
Zombie Aqua™	V500	BioLegend	1:100	423102

VIII. ELISA

Material	Hersteller	Artikelnummer
ELISA DAG	LS-Biosciences	LS-F10645-1
ELISA IP3	LS-Biosciences	LS-F10644-1
ELISA PL3K	MyBioSpources	MBS167579-96

IX. Operationsbesteck

Instrument	Hersteller	Artikelnummer
Feinpinzette	FST	11274-20
Feinschere	FST	14088-10
Großer Magnetstand	FST	18200-02
Hautschere	FST	14575-11
Kleine Basisplatte	FST	18200-03
Kleiner Magnetstand	FST	18200-01
Mikronadelhalter	FST	12075-12

Mikroschere	FST	15001-08
Nadelhalter	FST	12500-12
Splitterpinzette	FST	11051-10
Wundhaken breit	FST	18200-11
Wundhaken schmal	FST	18200-10
Wundhakendrähte	FST	18200-05

X. Nahtmaterial

Material	Hersteller	Artikelnummer
Prolene™ 7-0 (0.5 Ph.Eur.)	Ethicon®	EH7405
Prolene™ 5-0 (1 Ph.Eur.)	Ethicon®	EH7231
Seraflex® 5/0	Serag Wiessner	IC108000
Seraflex® 7/0	Serag Wiessner	IO051391
PERMA-HAND™ Seide 4-0 (1.5 Ph.Eur.)	Ethicon®	683H

XI. Spritzen und Kanülen

Material	Hersteller	Artikelnummer
Aortenkanüle für Langendorff	Hugo Sachs	73-2816
Eclipse™ Needle 25G	BD	305760
Injekt	B.Braun	
Injekt® 2, 5, 10, 20 ml	B.Braun	4606027V, 4606051V, 4606108V, 4606205V
Mini-Spike®	B.Braun	4550242
Omnican®F 1ml	B.Braun	9161502
Omnifix®-F Luer Solo 1ml	B.Braun	9161406V
Vasofix® Safety 20G	B.Braun	4268113S-01

XII. Geräte

Gerät	Hersteller
Apact	LabiTec
Beheizter Operationstisch für Kleintiere	Harvard Apparatus
Bioflux	Fluxion Bioscience
biofluxpumpe	Fluxion Bioscience
Bruker 9.4 T AVANCE III WB NMR-Spektrometer	Bruker
ECG Amplifier Type 689	Hugo Sachs
FACSVerse	BD
Feinwaage	Sartorius
FluoStar Omega BMG Labtech	FluoStar Omega BMG Labtech
Hämatologiegerät scil Vet abc Plus+	Scil Vet
KL 1500 LCD Lichtquelle	Leica
Kühlplatte EG1150C	Leica Biosystems
Leica DFC450 C	Leica Microsystems
Leica Fluoreszenzmikroskop DM4000 M	Leica Microsystems
Lichtmikroskop MZ9.5	Leica Microsystems
M1025 Systems (Vitalparameter)	SA Instruments
Mikrotom Jung Biocut 2035	Leica
Mikrowaage	Sartorius
Minivent	Harvard Apparatus
Multiplate® Analyzer	Roche
Nikon DS-Qi2 Camera	Nikon
Paraffinausgießstation EG1150H	Leica Biosystems
Pipetten, Reference	Eppendorf
PowerLab 8/30	ADInstruments
Rasiergerät Favorita II Typ GT109	Aesculap
Rollerpumpe	Isma Tec
Rotlichtquelle	Beurer
Thermometer Testo 108	Testo AG

Thermomixer 5436	Eppendorf
Tissue Tek VIP E150/E300	Sakura Finetek
Uni Protect Klimaschrank	ZoonLab
UNO Microventilator UMV-03	UNO BV
UNO Vaporizer Sigma Delta	UNO BV
Vevo2100	Visual Sonics
Vortex	VWR
Wasserbad E100	Lauda
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Mikro 200 R	Hettich
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich

XIII. Software

Software	Hersteller	Anwendungsgebiet
Bioflux Montage	Fluxion Bioscience	Bioflux software Auswertung
Bioflux software	Fluxion Bioscience	Bioflux Einstellungen
Diskus view	Hilgers – Technisches Büro	TTC Planimetrie
FACSuite™	BD	FACS messung
FlowJo_V10	FlowJo software	FACS analyse
graphPad Prism6	Graphpad Software, Inc.	Statistik
ImageJ	Wayne Rasband	Planimetrische Auswertung
Iox.2	EMKA	Elektrokardiogramm
LabChart Pro 7	ADInstruments	Elektrokardiogramm
LASX	Leica	Histologie Kamera
MARS	BMG Labtech	ELISA Auswertung
Software Apact	Software Apact	Software Apact
VevoLab 2.2.0	VisualSonics	Echokardiographie

9. Danksagung

Ein großer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. med. Amin Polzin für die Unterstützung und den Input meiner Arbeit und die Betreuung während der Zeit als Doktorandin.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer für seine Funktion als Mentor und die Begutachtung dieser Arbeit.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Malte Kelm für die Möglichkeit meine Doktorarbeit und die dazugehörigen Experimente im kardiologischen Labor des Universitätsklinikums Düsseldorf durchzuführen und die finanziellen Mittel hierfür zur Verfügung zu stellen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Carolin Helten, Alina Achilles, René M'Pembele, Philipp Mourikis, Kajetan Trojovsky, Samantha Ahlbrecht und Daniel Konsek für die Unterstützung und die Hilfe mit den Experimenten bedanken. Frau Stefanie Becher möchte ich für Ihre Unterstützung zum Erlernen der Tierexperimente danken. Außerdem geht mein Dank an Frau Dr. med. Lisa K. Dannenberg für die Supervision der Aufgaben und die Revision des Manuskripts.

Bei Dr. med. Tobias Petzold und dessen Arbeitsgruppe möchte ich mich herzlich für die Zusammenarbeit und das Zurverfügungstellen Ihrer Daten bedanken.

Ein riesen Dankeschön zudem auch an meine Kolleginnen und Kollegen, die mich großartig im kardiologischen Labor aufgenommen haben und dabei zu Freunden wurden.

Meinen Freunden und meiner Familie gebührt der größte Dank! Sie hatten allzeit ein offenes Ohr für mich und standen mir stets mit Rat und Tat beiseite. Insbesondere bedanke ich mich bei Julia für ihre Hilfe und ihre jahrelange Freundschaft.

Den wichtigsten Menschen in meinem Leben möchte ich ganz besonders Danken! Genannt werden muss hier meine Cousine Serap, die stets ein Vorbild für mich war. Vielen Dank auch an meine Schwester Aysun. Ein besonders großes Dankeschön für ihre Hilfe, ihre mentale Unterstützung und ihr riesen Herz an meine kleinen Schwester Neslihan. Sie konnte mich mit ihrer Positivität aus jedem Tief ziehen und motivieren.

Mein größter Dank gehört jedoch meinen Eltern, deren Unterstützung, die größte Hilfe und deren Stolz mein größter Antrieb waren. Vielen Dank dafür und für Alles!