

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Steffen Massberg

PROTHROMBOTISCHE WIRKUNG VON DABIGATRAN WÄHREND DER ARTERIELLEN THROMBOSE

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

vorgelegt von
Manuela Thienel
aus Gräfelfing
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Steffen Massberg
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila Prof. Dr. med. Thomas M. Schiele Prof. Dr. med. Bernd Engelmann
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Tobias Petzold
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	27.07.2017

Für meine Eltern in Liebe und Dankbarkeit.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Vorhofflimmern	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Klassifizierung	1
1.1.3 Genese	2
1.1.4 Bedeutung von Vorhofflimmern	2
1.1.5 Pathogenese thromboembolischer Ereignisse unter Vorhofflimmern	3
1.1.6 Einfluss von Vorhofflimmern auf die Thrombozytenaktivität	4
1.1.7 Einfluss der verschiedenen Vorhofflimmer-Subtypen auf die Entstehung thromboembolischer Ereignisse	5
1.1.8 Risikostratifizierung für das Auftreten thromboembolischer Ereignisse mittels CHA ₂ DS ₂ -VASc Score	6
1.2 Therapiekonzepte bei Vorhofflimmern	7
1.2.1 Symptom-kontrollierende Therapie	7
1.2.2 Orale Antikoagulation zur Prävention von thromboembolischen Ereignissen bei Vorhofflimmern	8
1.3 Dabigatran etexilate	12
1.3.1 Indikationen	12
1.3.2 Dosierung von Dabigatran etexilate zur Prävention von thromboembolischen Ereignissen bei Vorhofflimmern	12
1.3.3 Wirkmechanismus	13
1.3.4 Pharmakokinetik und -dynamik	13
1.3.5 Effizienz und Sicherheit	14
1.4 Mechanismus der arteriellen Thrombose	16
2 Zielsetzung der Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 In vitro Versuche	19
3.1.1 Patienteneinschluss	19
3.1.2 Prozedere	19
3.1.3 Labortechnische Blutanalysen	20
3.1.4 Bestimmung der Thrombinmenge im Plasma mittels Immunoblotting	23
3.1.5 Quantifizierung des aktiven Thrombins	24
3.1.6 Impedanzaggregometrie	25
3.1.7 Durchflusszytometrische Versuche	25
3.1.8 Flusskammerversuche	27
3.2 In vivo Versuche	30
3.2.1 Mausmodelle	30
3.2.2 Prämedikation	31
3.2.3 Murine Blutentnahme	31

3.2.4	Carotis-Ligatur-Modell	32
3.2.5	Carotis-Denudation mittels Drahtmodell	32
3.3	Statistische Auswertung	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Patientenkollektiv	34
4.2	Thrombozytenaktivität unter statischen Bedingungen	36
4.3	Plättchenadhäsion und Thrombusformation unter Flussbedingungen	38
4.4	Thrombusformation auf humanem Plaquematerial	44
4.5	Gerinnung unter Dabigatran	47
4.6	Rolle der GPIIb/IIIa-Thrombin Interaktion unter Dabigatran auf die Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung	50
5	Diskussion	57
5.1	Plättchenaktivität unter Dabigatran	57
5.2	Verstärkte Thrombusformation unter Dabigatran	57
5.2.1	Einfluss von Dabigatran unter statischen Bedingungen	57
5.2.2	Einfluss von Dabigatran unter Flussbedingungen	58
5.3	Rolle der GPIIb/IIIa-Thrombin Interaktion	61
5.3.1	Thrombinbildung unter Dabigatran	61
5.3.2	Thrombin-induzierte Plättchenaktivierung	61
5.3.3	GPIIb/IIIa-Thrombin Interaktion	62
5.4	Limitationen der Studie	63
5.5	Klinische Relevanz	65
5.6	Ausblick	66
6	Literaturverzeichnis	69
7	Zusammenfassung	83
8	Summary	84
9	Danksagung	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AUC	Area under the curve
CrCl	Creatinine Clearance
CRP	Collagen-related Peptide
DCF	2,7-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EKG	Elektrokardiographie
F1 + 2	Prothrombinfragmente 1 und 2
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HSA	Humanes Serumalbumin
INR	International Normalized Ratio
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
RE-LY Studie	Randomized Evaluation of Long-term Anticoagulant Therapy Studie
TAT	Thrombin-Antithrombin III Komplex
TRAP	Thrombinrezeptor Aktivator Protein-6
VKA	Vitamin-K-Antagonist
vWF	von-Willebrand-Faktor

1 EINLEITUNG

1.1 VORHOFFLIMMERN

1.1.1 DEFINITION

Vorhofflimmern ist eine supraventrikuläre Herzrhythmusstörung, die gekennzeichnet ist durch eine unkoordinierte Erregungsbildung in den Atrien. Eine hämodynamisch wirksame Vorhofkontraktion ist aufgrund der hohen Frequenz von 350 - 600 pro Minute nicht mehr möglich. In der Regel erfolgt die Diagnose im Ruhe- oder Langzeit-EKG, wo so genannte „Flimmerwellen“ - Oszillationen, die in Größe, Morphologie und Frequenz variieren und sich kaum von der isoelektrischen Grundlinie absetzen - normale P-Wellen ersetzen. Die QRS-Komplexe erscheinen dabei abhängig von der atrioventrikulären Überleitung, dem Tonus des vegetativen Nervensystems und dem Vorhandensein von akzessorischen Leitungsbahnen in unregelmäßigen Abständen (1).

1.1.2 KLASSIFIZIERUNG

Es gibt zahlreiche Klassifizierungssysteme, die Vorhofflimmern aufgrund seines zeitlichen Verlaufs, seiner Ätiologie oder nach elektrophysiologischen Eigenschaften in Untergruppen einteilen (2). In den Leitlinien der „European Society of Cardiology“ wird empfohlen, grundsätzlich zwischen einem erstmalig aufgetretenen Vorhofflimmern und einem rekurrenten Verlauf zu unterscheiden. Jeder Patient, der sich zum ersten Mal mit Vorhofflimmern vorstellt, wird unabhängig von der Dauer der Arrhythmie oder der Schwere der eventuell begleitenden Symptome als Patient mit „erstmalig diagnostiziertem Vorhofflimmern“ bezeichnet. Bei Wiederauftreten der Arrhythmie wird zwischen paroxysmale, persistierendem und permanentem Vorhofflimmern unterschieden. „Paroxysmal“ ist Vorhofflimmern dann, wenn es innerhalb von 48 Stunden spontan terminiert. Geschieht dies nicht oder ist eine Konversion in den Sinusrhythmus nur durch medikamentöse oder elektrische Kardioversion zu erreichen, spricht man von „persistierendem Vorhofflimmern“. Als „permanent“ wird Vorhofflimmern dann bezeichnet, wenn eine Konversion in

den Sinusrhythmus entweder nicht mehr möglich ist oder nicht mehr gewünscht wird (3).

1.1.3 GENESE

Die pathophysiologischen Hintergründe von Vorhofflimmern sind vielfältig und multifaktoriell bedingt. Nach aktuellem Stand der Wissenschaft lassen sich elektrophysiologisch zwei Hauptmechanismen für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern abgrenzen. Zum einen wurden ektope atriale Foci identifiziert, die häufig in den Pulmonalvenen, seltener in der Vena cava superior oder in der Marshall Vene lokalisiert sind, und durch hochfrequente elektrische Entladungen die Entstehung von Vorhofflimmern induzieren können (4-6). Zum anderen konnten schon in den 1960er Jahren durch Moe et al. (7) multiple kreisende Erregungswellen in den Atrien beobachtet werden, die durch Reentry-Kreisläufe zur Persistenz der Rhythmusstörung führen. Diese als „multiple-wavelet Hypothese“ bezeichnete Theorie beschreibt zirkulierende Erregungsfronten, die sich in den Atrien ausbreiten, sich in Tochterwellen teilen und gegenseitig aufrechterhalten.

1.1.4 BEDEUTUNG VON VORHOFFLIMMERN

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung und betrifft etwa 1 - 2 % der Allgemeinbevölkerung (8, 9). Die Prävalenz steigt dabei altersabhängig auf über 10 % bei den über 80-Jährigen (10). Wie die Daten der Framingham Studie zeigen, beläuft sich das Lebenszeitrisiko im Alter von 40 Jahren auf 26 % für Männer und 23 % für Frauen, was bedeutet, dass einer von vier Personen im Laufe seines Lebens an Vorhofflimmern erkranken wird (11). In den letzten Jahrzehnten konnte ein deutlicher Anstieg der Inzidenz, Prävalenz und der mit Vorhofflimmern-assoziierten Mortalität beobachtet werden. Schätzungen zu Folge werden diese Zahlen in den nächsten Jahren aufgrund des demographischen Wandels und der Überalterung der Gesellschaft noch weiter ansteigen (9, 12, 13).

Innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte stieg die Anzahl der Krankenhauseinweisungen aufgrund von Vorhofflimmern unabhängig von möglichen Veränderungen der bekannten Risikofaktoren um 60 % an (14). Für das öffentliche Gesundheitssystem stellt dies eine immense finanzielle Belastung dar. Pro Patient belaufen sich die Therapiekosten auf etwa 3000 Euro jährlich, und bezogen auf die gesamte Europäische Union entstehen pro Jahr Kosten von etwa zehn Milliarden Euro (15).

Der Grund hierfür ist, dass Vorhofflimmern mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert ist. Im Vergleich zu Personen ohne Vorhofflimmern ist das Mortalitätsrisiko unabhängig von anderen Grunderkrankungen und Risikofaktoren bei Männern mit Vorhofflimmern 1,5-fach, bei Frauen 1,9-fach erhöht (16). Außerdem wird diese Arrhythmieform von einer Vielzahl von Komplikationen begleitet, unter denen thromboembolische Ereignisse und eine verminderte Herzleistung besonders zu nennen sind (17, 18). So zeigen die Daten der Framingham-Studie, dass bei Patienten mit Vorhofflimmern das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden fast fünfmal so hoch ist wie in einer Vergleichsgruppe ohne Vorhofflimmern. Das Risiko steigt dabei altersabhängig: Während es im fünften Lebensjahrzehnt noch 1,5 % beträgt, liegt es bei den über 80-Jährigen bei 23,5 %. Insgesamt werden etwa 15 - 25 % aller ischämischen Schlaganfälle durch Vorhofflimmern verursacht (17, 19, 20). Dabei kommt hinzu, dass die durch Vorhofflimmern verursachten Insulte in der Regel schwerer sind und mit einer deutlich schlechteren Prognose einhergehen (21, 22).

1.1.5 PATHOGENESE THROMBOEMBOLISCHER Ereignisse unter Vorhofflimmern

Das erhöhte Thromboembolie Risiko wird durch mehrere Faktoren bedingt. Zum einen führt die fehlende systolische Vorhofkontraktion zur Blutstase in den Atrien. So konnten verminderte Flussgeschwindigkeiten im linken Vorhof mit vermehrter Thrombusbildung und spontanem Echokontrast, ein Phänomen, das bei langsamer Blutflussgeschwindigkeit auftritt und auf verstärkte Interaktion zwischen Erythrozyten und Fibrinogen hinweist, in Verbindung gebracht werden

(23-25). Hinzu kommt, dass Vorhofflimmern eine fortschreitende Dilatation der Vorhöfe induzieren kann, die dann wiederum das Stase-Risiko erhöht (26). Wie Di Tullio et al. zeigen konnten, ist die Größe des linken Atriums ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung eines ischämischen Apoplexes. So beträgt die adjustierte Odds Ratio 1,47 pro Anstieg des linksatrialen Volumenindex um 10 mm / 1,7 m² Körperoberfläche (27).

Eine weitere Ursache für die erhöhte Thromboembolie Neigung sind strukturelle Endokardveränderungen. So zeigte sich in der Autopsie von Vorhofflimmerpatienten, deren Todesursache ein zerebraler Insult war, makroskopisch ein eher „raues Endokard“, vereinbar mit ödematösen und fibrösen Wandverdickungen. Unter dem Mikroskop konnten in vielen Fällen wandständige Thromben und kleine Endothelläsionen festgestellt werden (28). Hypertrophie und Nekrose von Herzmuskelzellen, Infiltrationen durch mononukleäre Zellen sowie ein gestörter Auf- und Umbau der extrazellulären Matrix mit abnormer Plasmakonzentration von Kollagen-Abbauprodukten, Metalloproteasen und ihren Inhibitoren tragen zu dem mit Vorhofflimmern assoziierten prothrombotischen Milieu bei (29-31).

Eine weitere wichtige Rolle in der intravaskulären Thrombogenese kommt den Proteinen der Gerinnungskaskade zu. Die erhöhte koagulatorische Aktivität zeigt sich durch erhöhte Plasmaspiegel von Thrombin-Antithrombin III Komplexen oder Prothrombinfragmenten 1 + 2, die bei der Freisetzung von Thrombin aus Prothrombin entstehen (32, 33). Zudem finden sich Zeichen eines erhöhten Fibrin-Umsatzes (34-36) und eine veränderte fibrinolytische Aktivität mit erhöhten Plasmakonzentrationen von Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (37).

1.1.6 EINFLUSS VON VORHOFFLIMMERN AUF DIE THROMBOZYTENAKTIVITÄT

In wie weit die Funktion der Thrombozyten durch Vorhofflimmern beeinflusst wird, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Es konnte zwar in einigen Studien eine erhöhte Plättchenaktivität festgestellt werden, teilweise wurde dies jedoch auf zugrunde liegende Komorbiditäten zurückgeführt. So konnten

Choudhury et al. zeigen, dass das Blut von Vorhofflimmerpatienten signifikant höhere Werte von P-Selectin, einem Aktivitätsmarker, und Thrombozyten-Mikropartikeln aufweist als gesunde Kontrollen im Sinusrhythmus. Im Vergleich zu Patienten mit ähnlichen Komorbiditäten und Sinusrhythmus war dieser Unterschied jedoch nicht mehr feststellbar (38, 39). Dies deutet daraufhin, dass die beobachtete Thrombozytenaktivierung eher durch kardiovaskuläre Grunderkrankungen als durch die Arrhythmie bedingt ist. Im Gegensatz dazu zeigten Akar et al., dass die Induktion von Vorhofflimmern nicht allerdings von tachykardem Sinusrhythmus bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern, die sich einer Radiofrequenzablation unterzogen und zum Zeitpunkt der Untersuchung Sinusrhythmus aufwiesen, innerhalb weniger Minuten zu einer intrakardialen Plättchenaktivierung führt (40). Zudem konnte in einer anderen Studie, die sechs Monate nach erfolgreicher Radiofrequenzablation und Persistenz des Sinusrhythmus die Expression von P-Selectin und Glykoprotein IIb/IIIa untersuchte, eine signifikant verminderte Plättchenaktivierung im Vergleich zum Ausgangswert vor Ablation festgestellt werden (41).

1.1.7 EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN VORHOFFLIMMER-SUBTYPEN AUF DIE ENTSTEHUNG THROMBOEMBOLISCHER EREIGNISSE

Auch der Einfluss der verschiedenen Vorhofflimmer-Subtypen auf das Risiko, ein thromboembolisches Ereignis zu entwickeln, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einigen Studien wurde beobachtet, dass die Art der atrialen Rhythmusstörung keinen Einfluss auf die Inzidenz von ischämischen Schlaganfällen hat und eventuell bestehende Unterschiede vor allem durch Komorbiditäten bedingt werden (42-45). In anderen klinischen Studien weisen Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern im Vergleich zu Patienten mit persistierendem oder permanentem Vorhofflimmern ein geringeres Schlaganfallrisiko auf (46, 47). So konnten Vanassche et al. kürzlich zeigen, dass persistierendes und permanentes Vorhofflimmern auch nach Adjustierung anderer Risikofaktoren mit einem fast doppelt so hohen Schlaganfallrisiko einhergeht als paroxysmales Vorhofflimmern (48).

1.1.8 RISIKOSTRATIFIZIERUNG FÜR DAS AUFTRETEN THROMBOEMBOLISCHER EREIGNISSE MITTELS CHA₂DS₂-VASc SCORE

Das individuelle Risiko für die Entwicklung einer Thromboembolie bei Patienten mit Vorhofflimmern wird von verschiedenen Risikofaktoren und Komorbiditäten bestimmt (49). Der 2009 entwickelte CHA₂DS₂-VASc Score hilft, bei Patienten mit Vorhofflimmern das individuelle Risiko für die Entwicklung eines Schlaganfalls abzuschätzen. Bei diesem Risikoscore werden ein vorangegangener Schlaganfall oder eine Transitorisch ischämische Attacke und ein Patientenalter von mindestens 75 Jahren als Hauptrisikofaktoren definiert, die mit einem höheren Schlaganfallrisiko einhergehen. Als zusätzliche Risikofaktoren gelten eine bestehende Herzinsuffizienz oder linksventrikuläre Dysfunktion (Ejektionsfraktion < 40 %), ein arterieller Hypertonus, ein Diabetes mellitus, eine atherosklerotische Gefäßerkrankung (vorangegangener Herzinfarkt, periphere arterielle Verschlusskrankheit oder schwere Verkalkung der Aorta), ein Patientenalter zwischen 65 und 74 Jahren und ein weibliches Geschlecht. Die Abkürzungen der englischen Begriffe für diese Risikofaktoren ergeben das Akronym CHA₂DS₂-VASc.

Für jeden Hauptrisikofaktor werden zwei Punkte vergeben, für jeden weiteren Risikofaktor ein Punkt (50). Die Summe der erreichten Punkte dient der Risikostratifizierung, wobei null Punkte mit einem äußerst niedrigen Schlaganfallrisiko einhergehen. Ein Punkt wird mit einem intermediären Risiko von 1,3 % pro Jahr verbunden und zwei oder mehr Punkte mit einem hohen Risiko von 2,2 - 15,2 % pro Jahr (51). Die „European Society of Cardiology“ empfiehlt deshalb, alle Patienten mit einem CHA₂DS₂-VASc Score von zwei oder mehr Punkten antikoagulatorisch, zum Beispiel mit einem Vitamin-K-Antagonisten, zu behandeln. Patienten mit einem intermediären Risiko sollten nach Abwägung des individuellen Blutungsrisikos sowie Einbeziehung des Patientenwillens ebenfalls eine orale Antikoagulation erhalten. Frauen mit einem Alter unter 65 Jahren ohne weitere Risikofaktoren benötigen dagegen keine antikoagulatorische Therapie. Wenn eine antikoagulatorische Therapie durch den Patienten abgelehnt wird, kann eine antithrombozytäre Therapie mit Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel erwogen werden. Bei Patienten mit einem

CHA₂DS₂-VASc Score von null wird keine antikoagulatorische Therapie empfohlen (3, 52).

1.2 THERAPIEKONZEPTE BEI VORHOFFLIMMERN

Das klinische Management von Patienten mit Vorhofflimmern umfasst zwei Hauptziele: Einerseits eine Besserung der Symptomatik mittels Frequenzregulierung oder Rhythmuskontrolle und andererseits die Prävention von thromboembolischen Ereignissen durch eine orale Antikoagulation.

1.2.1 SYMPTOM-KONTROLLIERENDE THERAPIE

Grundsätzlich wird eine Rhythmus-erhaltende Therapie, bei der eine Konversion in den Sinusrhythmus angestrebt wird, von einer Frequenz-kontrollierenden Therapie, bei der lediglich eine Regulierung der Ventrikelfrequenz verfolgt wird, unterschieden. Wie in der AFFIRM - (Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management) Studie gezeigt werden konnte, besteht zwischen beiden Therapiestrategien kein Unterschied bezüglich der Mortalität (53). Eine Frequenzkontrolle wird in der Regel durch Gabe von Betablockern, Digitalisglykosiden und Ca²⁺-Antagonisten vom Verapamil- oder Diltiazemtyp erreicht. In seltenen Fällen kann eine AV-Knotenablation mit anschließender Schrittmacherimplantation notwendig sein. Eine Konversion in den Sinusrhythmus kann entweder durch eine externe elektrische Kardioversion oder medikamentös durch Klasse 1C Antiarrhythmika wie Propafenon und Flecainid, Amiodaron, Dronedaron und Sotalol durchgeführt werden. Zudem besteht die Möglichkeit einer kompletten Isolation der Pulmonalvenen mittels Katheterablation oder chirurgische Verfahren wie die Maze-Operation (1, 3).

1.2.2 ORALE ANTIKOAGULATION ZUR PRÄVENTION VON THROMBOEMBOLISCHEN EREIGNISSEN BEI VORHOFFLIMMERN

Angeichts des erhöhten Thromboembolie Risikos unter Vorhofflimmern ist bei Patienten mit einem CHA₂DS₂-VASc Score von einem oder mehr Punkten eine orale Antikoagulation zur Prävention von thromboembolischen Ereignissen indiziert.

Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten

Lange Zeit waren Vitamin-K-Antagonisten, wie Phenprocoumon oder Warfarin die einzigen oralen Blutgerinnungshemmer, die zur Prävention von Schlaganfällen und systemischen Thromboembolien bei Vorhofflimmern eingesetzt wurden. Im Gegensatz zu einer Plättchen-hemmenden Therapie, die nur eine etwa 20-prozentige Risikoreduktion bewirkt, vermindern Vitamin-K-Antagonisten das Risiko für die Entstehung eines Schlaganfalls um zwei Drittel (54).

Sie hemmen die hepatische Synthese der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren und wirken dadurch indirekt antikoagulatorisch. Physiologischerweise wird reduziertes Vitamin K bei der γ -Carboxylierung dieser Faktoren als Cofaktor benötigt. Hierbei wird es zu inaktivem Vitamin-K-Epoxid oxidiert und im Anschluss wieder zu Vitamin K reduziert. Vitamin-K-Antagonisten unterbrechen diesen Zyklus, indem sie das Enzym VKORC1 (Vitamin-K-Epoxid-Reduktase-Complex 1), das diese Reduktion katalysiert, hemmen. Auf diese Art beeinflussen sie die Vitamin-K-abhängige Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X und der antikoagulatorisch wirksamen Proteine C und S (55-57)

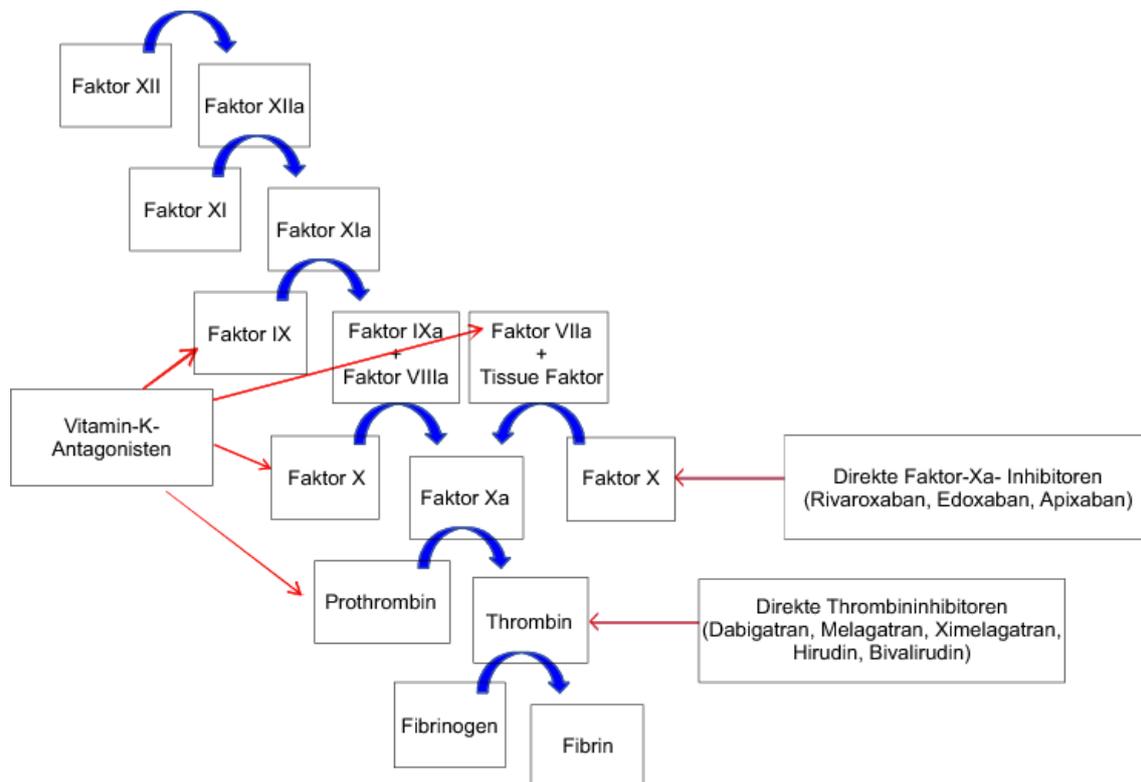
Aufgrund ihres Wirkmechanismus und der komplexen Pharmakokinetik weisen sie allerdings zahlreiche Arznei- und Nahrungsmittelinteraktionen auf. So potenzieren zum Beispiel einige Antibiotika und Antiarrhythmika wie Amiodaron oder Propafenon die gerinnungshemmende Wirkung von Vitamin-K-Antagonisten. Andere Medikamente wie zum Beispiel Mercaptopurine und stark Vitamin-K-haltige Nahrungsmittel vermindern dagegen die Wirkung (58). Hinzu kommt, dass der antikoagulatorische Effekt inter- und intraindividuell aufgrund

von genetischen Polymorphismen (59, 60) und diversen akuten und chronischen Krankheitszuständen wie Leberinsuffizienz (61) stark variieren kann.

Um eine adäquate Antikoagulation zu gewährleisten, muss daher auch bei gut eingestellten Patienten mindestens alle drei bis vier Wochen mittels venöser Blutentnahme die Prothrombinzeit kontrolliert und die Wochendosis dementsprechend angepasst werden (62). Dennoch konnte eine Metaanalyse von van Walraven et al. 2006 zeigen, dass der INR-Wert eines Durchschnittspatienten nur etwa zwei Drittel der Zeit im therapeutischen Bereich liegt (63). Den Rest der Zeit befindet er sich über oder unter diesem Bereich und der Patient ist einem damit verbundenen höheren Risiko für thromboembolische oder hämorrhagische Ereignisse ausgesetzt (64).

Neue orale Antikoagulantien

In den letzten Jahren wurden daher große Anstrengungen unternommen, neue Gerinnungshemmer zu entwickeln, die die mit Vitamin-K-Antagonisten verbundenen Nachteile und Einschränkungen nicht oder zumindest nur in verminderter Form mit sich bringen. Im Gegensatz zu Vitamin-K-Antagonisten handelt es sich bei den neuen oralen Antikoagulantien um spezifische Inhibitoren einzelner Gerinnungsfaktoren. Die maximale Wirkung tritt im Gegensatz zu Vitamin-K-Antagonisten innerhalb weniger Stunden ein und klingt mit Halbwertszeiten von 9 - 17 Stunden relativ rasch wieder ab. Aufgrund der engen Dosis-Wirkungs-Korrelation ist ein Monitoring bei keinem der neuen Gerinnungshemmern notwendig. Neben den direkten Faktor-Xa-Inhibitoren Rivaroxaban, Edoxaban und Apixaban ist hier die Gruppe der direkten Thrombininhibitoren, zu denen Dabigatran, Melagatran, Ximelagatran, Argatroban, Bivalirudin und Hirudin gezählt werden, zu nennen (65-69).

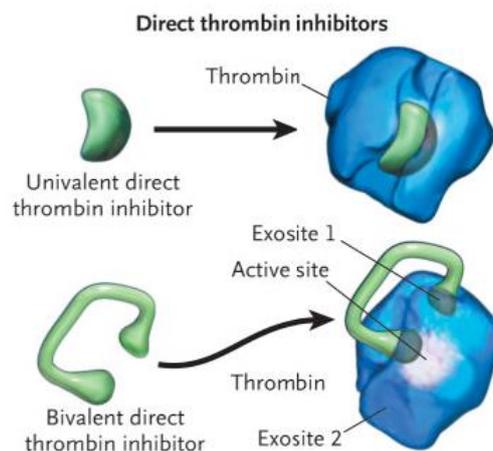


Zusatzabbildung 1: Schematischer Überblick über die plasmatische Gerinnungskaskade und die Angriffspunkte der Antikoagulantien. Vitamin-K-Antagonisten hemmen die Synthese der Gerinnungsfaktoren VII, IX, X und Thrombin. Dabigatran, Melagatran, Ximelagatran, Hirudin und Bivalirudin sind direkte Thrombininhibitoren. Rivaroxaban, Edoxaban und Apixaban sind Vertreter der direkten Faktor-Xa-Inhibitoren (modifiziert nach Mantha et al. (70)).

Direkte Thrombininhibitoren

Direkte Thrombininhibitoren binden spezifisch an das Thrombinmolekül und hemmen so im Gegensatz zu Heparin, das eine Thrombinhemmung nur in Verbindung mit Antithrombin III bewirkt, direkt die Interaktion mit seinen Substraten. Aufgrund seiner zentralen Rolle im Gerinnungssystem stellt die Serinprotease Thrombin einen wichtigen Ansatzpunkt zur Antikoagulation dar. Es katalysiert die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin und reguliert über die Faktoren V, VIII und XI seine eigene Bildung im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus. Durch Aktivierung von Faktor XIII katalysiert Thrombin die Quervernetzung der neugebildeten Fibrinfasern (71). Zudem stellt es über verschiedene Thrombinrezeptoren auf der Plättchenoberfläche, wie die Protease-aktivierten Rezeptoren-1 und -4 und das Glykoprotein GPIIb einen potenten Thrombozytenaktivator dar (72, 73).

Neben dem aktiven katalytischen Zentrum besitzt Thrombin zwei zusätzliche Substratbindungsstellen: Exosite 1 liegt direkt neben dem aktiven Zentrum und dient als Andockstelle für verschiedene Substrate wie Fibrin. Exosite 2 stellt die Heparin-Bindungsdomäne dar (74). Während Heparin nur freies, nicht-gebundenes Thrombin hemmen kann, inaktivieren direkte Thrombininhibitoren auch Fibrin-gebundenes Thrombin (75). Prinzipiell unterscheidet man bivalente Thrombininhibitoren, die an Exosite 1 und das katalytische Zentrum binden, von univalenten Thrombininhibitoren, die ausschließlich mit dem katalytischen Zentrum interagieren. Zur Gruppe der bivalenten Thrombininhibitoren werden Hirudin und Bivalirudin gezählt. Argatroban, Melagatran, Ximelagatran und Dabigatran gehören zu den univalenten Thrombininhibitoren.



Zusatzabbildung 2: Wirkmechanismus der direkten Thrombininhibitoren. Direkte Thrombininhibitoren binden spezifisch an das Thrombinmolekül und hemmen so im Gegensatz zu Heparin unabhängig von Antithrombin III direkt die Interaktion mit seinen Substraten. Während univalente Thrombininhibitoren wie Dabigatran (oben) dabei lediglich mit dem katalytischen Zentrum interagieren, binden bivalente direkte Thrombininhibitoren (unten) an das katalytische Zentrum und an Exosite 1. (Reproduced with permission from Massachusetts Medical Society (76))

Im Gegensatz zu Hirudin, Bivalirudin, Argatroban und Melagatran, die intravenös oder subkutan verabreicht werden, können Ximelagatran und Dabigatran oral gegeben werden (76). Da Ximelagatran aufgrund von

Lebertoxizität 2006 vom Markt genommen wurde (77), ist Dabigatran aktuell der einzige orale direkte Thrombininhibitor, der zur Prävention von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei Vorhofflimmern zugelassen ist.

1.3 DABIGATRAN ETEXILATE

1.3.1 INDIKATIONEN

Dabigatran etexilate (Pradaxa®, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG) wurde im März 2008 durch die EU-Kommission zur Primärprävention von venösen thromboembolischen Ereignissen nach elektivem chirurgischen Hüft- oder Kniegelenkersatz für den europäischen Markt zugelassen. Im August 2011 erfolgte die Zulassungserweiterung zur primären Prävention von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei erwachsenen Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern und mindestens einem weiteren Risikofaktor, wie ein vorausgegangener Schlaganfall oder eine transitorische ischämische Attacke, ein Patientenalter von mindestens 75 Jahren, eine bestehende Herzinsuffizienz mit einer NYHA Klasse \geq II, einem Diabetes mellitus oder einer arteriellen Hypertonie. Seit Juni 2014 ist Dabigatran zusätzlich zur Behandlung tiefer Venenthrombosen und Lungenembolien sowie zur Prävention von rezidivierenden tiefen Venenthrombosen und Lungenembolien bei Erwachsenen zugelassen (78, 79).

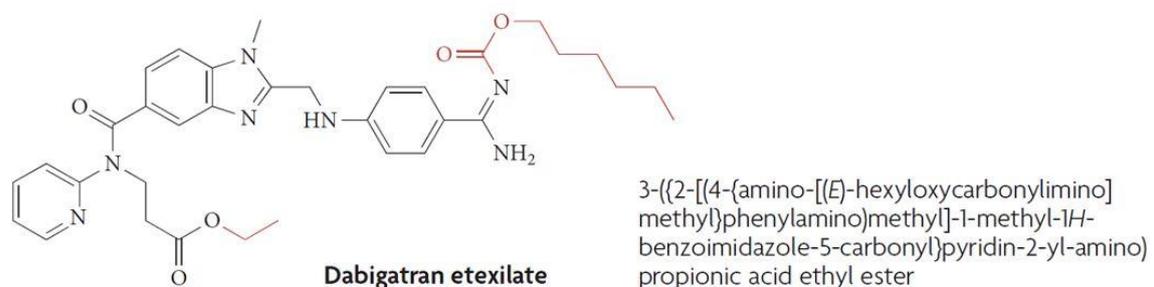
1.3.2 DOSIERUNG VON DABIGATRAN ETEXILATE ZUR PRÄVENTION VON THROMBOEMBOLISCHEN EREIGNISSEN BEI VORHOFFLIMMERN

Zur Prävention von thromboembolischen Ereignissen bei nicht-valvulärem Vorhofflimmern wird Dabigatran etexilate in einer Dosis von 150 mg zweimal täglich eingenommen. Laut Fachinformation durch den Hersteller kann bei Patienten mit einem erhöhten Blutungsrisiko aufgrund von einem Alter über 75 Jahren, einem Körpergewicht unter 50 kg oder einer eingeschränkten Nierenfunktion mit einer Kreatinin-Clearance unter 50 ml/min eine

Dosisanpassung auf 110 mg zweimal täglich erwogen werden. Bei Patienten mit schwer beeinträchtigter Nierenfunktion und einer Kreatinin-Clearance unter 30 ml/min ist eine Behandlung mit Dabigatran kontraindiziert (79).

1.3.3 WIRKMECHANISMUS

Dabigatran ist ein univalenter, reversibler Thrombininhibitor, der sowohl freies als auch Fibrin-gebundenes Thrombin selektiv und unabhängig von Antithrombin III hemmt (80). Der Wirkstoff wurde basierend auf der Röntgenkristallstruktur des Peptid-ähnlichen Thrombininhibitors NAPAP (N-alpha-(2-Naphthylsulfonylglycyl)-4-Amidinophenylalanin-Piperidin) entwickelt. Dabigatran enthält ähnlich der Leitstruktur NAPAP eine Benzamidingruppe, das zentrale Gerüst bildet ein 1, 2, 5 – trisubstituiertes Benzimidazol. Über unpolare, hydrophobe Interaktionen und dadurch, dass es eine ionische Bindung zwischen seiner Benzamidingruppe und Aspartat 189 eingeht, kann es direkt an das katalytische Zentrum des Thrombinmoleküls binden (81).



Zusatzabbildung 3: Strukturformel von Dabigatran etexilate (Reproduced with permission from Nature Publishing Group (82)). Die Estergruppen (in rot dargestellt) werden nach der enteralen Resorption durch Serin-Esterasen abgespalten.

1.3.4 PHARMAKOKINETIK UND -DYNAMIK

Der eigentliche Wirkstoff Dabigatran ist stark hydrophil und kann im Darm nicht resorbiert werden. Er wird deswegen mit Hilfe zweier Estergruppen neutralisiert und als Prodrug Dabigatran etexilate verabreicht. Nach der enteralen

Resorption werden diese Gruppen durch Serin-Esterasen abgespalten, so dass nach ein bis zwei Stunden die Plasmaspitzenkonzentration erreicht wird (83). Die maximale Bioverfügbarkeit beträgt hierbei 6,5 %. Die Eliminationshalbwertszeit liegt dosisunabhängig bei 14 - 17 Stunden, wobei über 80 % renal ausgeschieden werden und die restlichen 20 % über die Leber eliminiert werden (84). Infolgedessen stellt eine stark eingeschränkte Nierentätigkeit ab einer Kreatinin-Clearance von weniger als 30 ml/min eine Kontraindikation dar, da sonst eine Dabigatran-Akkumulation mit deutlich erhöhten Wirkspiegeln droht (85). Eine moderate Leberinsuffizienz (Child Pugh Klassifikation B) scheint dagegen keinen nennenswerten Effekt auf die Pharmakokinetik oder –dynamik des Medikaments zu haben (86).

1.3.5 EFFIZIENZ UND SICHERHEIT

Die 2009 veröffentlichte RE-LY Studie (Randomized Evaluation of Long-term Anticoagulant Therapy) (66) untersuchte die Effizienz und Sicherheit von Dabigatran im Vergleich zu Warfarin. In der Studie wurden 18 113 Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern aus 44 Ländern eingeschlossen und entweder in einen Therapiearm mit Warfarin (Dosis adaptiert, INR 2,0 – 3,0) oder mit Dabigatran in einer 2 x 110 mg oder 2 x 150 mg Dosis randomisiert. Bezogen auf die Inzidenz von thromboembolischen Ereignissen zeigten sich eine Gleichwertigkeit von Dabigatran in der niedrigeren Dosierung von 110 mg und eine Überlegenheit mit einer Abnahme an Apoplexen in der höheren Dosierung von 150 mg. Die Blutungsrate war dabei unter Dabigatran 2 x 110 mg geringer und unter Dabigatran 2 x 150 mg ähnlich hoch wie unter Therapie mit Warfarin.

Überraschenderweise zeigte sich allerdings in beiden Dosierungen ein leicht erhöhtes Risiko für Myokardinfarkte. Während unter Warfarin 0,53 % der Patienten pro Jahr einen Herzinfarkt erlitten, lag die jährliche Inzidenz bei 0,72 % unter 2 x 110 mg Dabigatran und bei 0,74 % unter 2 x 150 mg Dabigatran. Das relative Risiko war damit in der 2 x 150 mg Dabigatrangruppe um 38 % signifikant erhöht. In einer Re-Analyse der RE-LY Studie, die 2010 ebenfalls von Connolly et al. (87) publiziert wurde, konnten die Autoren weitere vier

symptomatische und 28 stumme Myokardinfarkte identifizieren. Nach Einbeziehung dieser neuen Ergebnisse war das Risiko, unter Dabigatran einen Myokardinfarkt zu entwickeln im Vergleich zu Warfarin mit einer relativen Risikoerhöhung von 29 % unter 2 x 110 mg Dabigatran und von 27 % unter 2 x 150 mg Dabigatran immer noch, wenn auch nicht mehr signifikant, erhöht.

Andere randomisierte klinische Studien, die Dabigatran zur Vermeidung einer tiefen Venenthrombose nach Implantation einer Knieprothese (RE-MODEL 2007 (88)), zur Behandlung einer tiefen Venenthrombose (RE-COVER 2009 (89)) und als Zusatzantikoagulanz während einer perkutanen Koronarintervention (RE-DEEM 2011 (90)) untersuchten, zeigten ebenso eine Häufung von Myokardinfarkten bei Dabigatran-behandelten Patienten. Eine Metaanalyse von Uchino et Hernandez (91), die die Daten von 30 514 Patienten aus sieben verschiedenen Studien einbezog, ergab eine Erhöhung des relativen Risikos um 33 % und des absoluten Risikos um 0,27 %, was in anderen Studien bestätigt werden konnte (92-95). Artang et al. zeigten 2013 in einer Metaanalyse, die Follow-up Daten der RE-LY Studie sowie zweier zusätzlichen klinischen Studien auswertete, eine noch deutlichere Erhöhung des relativen Risikos von 41 %, verbunden mit einer Number needed to treat von 188 Patienten um einen zusätzlichen Myokardinfarkt unter Dabigatran zu beobachten (96).

Obwohl die Rate an Myokardinfarkten bezogen auf die Größe der Studienpopulationen insgesamt gering ist und trotz der deutlichen Überlegenheit von Dabigatran gegenüber Vitamin-K-Antagonisten bezüglich der Prävention von Schlaganfällen, der Gesamtmortalität und des Blutungsrisikos (97), ist es unklar, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen dem beobachteten Anstieg an Myokardinfarkten und einer Therapie mit Dabigatran besteht.

In diesem Zusammenhang muss geklärt werden, ob Dabigatran atherothrombotische Ereignisse auslöst oder sie weniger effektiv verhindert als Vitamin-K-Antagonisten (98). Dale et al. (99) konnten kürzlich zeigen, dass die Thrombinbildung im Plasma von Warfarinpatienten deutlich stärker gehemmt wird als in Plasma, zu dem Dabigatran hinzugegeben wurde. Ähnliche

Ergebnisse fanden sich in einer Studie von Vranckx et al. (100), die die Thrombinentstehung während einer perkutanen Koronarintervention in Patienten verglich, die periprozedural zusätzlich zu einer dualen Plättchenhemmung mit Dabigatran oder unfraktioniertem Heparin behandelt wurden. Dennoch ist der Einfluss von Dabigatran auf das komplexe Zusammenspiel der Thrombozyten und des Gerinnungssystems während der arteriellen Thromboseentstehung unzureichend verstanden.

1.4 MECHANISMUS DER ARTERIELLEN THROMBOSE

Hauptauslöser für die Entstehung eines akuten Myokardinfarkts ist der Verlust der Endothelintegrität durch die Erosion oder Ruptur eines instabilen atherosklerotischen Plaques. Die damit verbundene Exposition von thrombogenen, subendothelialen Matrixproteinen wie Kollagen, Von-Willebrand-Faktor (vWF) oder Laminin an die Komponenten des Gerinnungssystems führt binnen Sekunden zur Plättchenrekrutierung und –adhäsion an der Läsionsstelle. Die Thrombozytenaktivierung erfolgt hierbei in einem komplexen, mehrstufigen Prozess, der durch die Interaktion der GPIb(α) Komponente des Glykoproteins GPIb-GPV-GPIX auf den Thrombozyten mit Kollagen-gebundenem vWF initiiert wird (101). Diese Verbindung ist jedoch transient und führt lediglich zu einer initialen Dezelleration und langsamen Rollen der Blutplättchen auf der Läsion, was weiteren Oberflächenrezeptoren ermöglicht, ebenfalls Verbindungen mit den exponierten Matrixproteinen einzugehen. Eine zentrale Rolle kommt hier dem Glykoprotein GPVI zu, das eine stabile, direkte Verbindung mit Kollagen bilden kann (102). Diese Bindung führt zur Freisetzung verschiedener Thrombozytenaktivatoren wie Thromboxan-A₂ oder ADP sowie von prokoagulatorischen Molekülen wie Fibrinogen, P-Selectin oder vWF. Zudem initiiert die Kollagen-GPVI Bindung die Aktivierung von Adhäsionsrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche (103). Essentiell für die Plättchenaggregation ist hierbei das Integrin α IIb β 3, das über seinen Hauptliganden Fibrinogen eine Quervernetzung von benachbarten

Thrombozyten ermöglicht (104). Die Sekretion prothrombotischer Granula sowie die Exposition thrombogener Oberflächenphospholipide auf den Thrombozyten führt gemeinsam mit aus dem Plaque sowie Plasma stammenden Tissue Factor zu einer Gerinnungsaktivierung und Fibrinbildung, die zur Stabilisierung sowie Organisation der gebildeten Thrombozytenaggregate beiträgt und zur Thrombusformation führt (105).

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ziel meiner Arbeit ist, den Einfluss von Dabigatran auf die Thrombozytenfunktion, deren Adhäsion und Aktivierung zu untersuchen. Zudem soll die Rolle von Dabigatran auf die Entstehung von arteriellen Thrombosen analysiert werden.

Daher haben wir die Plättchenfunktion von Patienten mit non-valvulärem Vorhofflimmern und einer oralen Antikoagulation mit Dabigatran oder Vitamin-K-Antagonisten sowie gesunden Kontrollen ohne antikoagulatorische Therapie mittels Impedanzaggregometrie und durchflusszytometrischen Versuchen unter Ruhebedingungen analysiert. Desweiteren wurde die Plättchenadhäsion und Thrombusformation unter arteriellen Flussbedingungen auf Kollagenbeschichteten Oberflächen *in vitro* sowie in zwei murinen Modellen der arteriellen Thrombose *in vivo* untersucht. Um den *in vivo* ablaufenden Pathomechanismen der arteriellen Thrombose möglichst nahe zu kommen, wurde zusätzlich die Plättchenadhäsion auf humanem Plaquematerial unter arteriellen Flussraten analysiert.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 IN VITRO VERSUCHE

3.1.1 PATIENTENEINSCHLUSS

In der Zeit zwischen September 2012 und Januar 2016 wurden Patienten mit Vorhofflimmern unter bestehender oraler Antikoagulation, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in stationärer oder ambulanter Behandlung am Deutschen Herzzentrum München beziehungsweise in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der Universität München befanden, rekrutiert. Für den Einschluss in die Studie mussten folgende Kriterien erfüllt werden: Mindestalter von 18 Jahren, elektrokardiographisch gesichertes nicht-valvuläres Vorhofflimmern oder Vorhofflattern und eine aufgrund dessen bestehende antikoagulatorische Therapie mit Dabigatran in einer zweimal täglich Dosis von 150 mg (n = 31) oder eine Vitamin-K-Antagonistherapie mit einem zuletzt gemessenen INR-Wert von 2 – 3 (n = 42).

Die Ausschlusskriterien umfassten: Eine Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern wie Azetylsalizylsäure und ADP-Rezeptorblocker, eine Antikoagulation mit Heparin innerhalb der letzten 14 Tage, pathologische Veränderungen des Blutbilds (Hämoglobinwert unter 10 g/dl, Thrombozytenzahl unter 100×10^9 Zellen/l oder über 800×10^9 Zellen/l), Tumorerkrankung oder eine bekannte Niereninsuffizienz mit einer Kreatinin-Clearance unter 30 ml/min.

Als Kontrollgruppe wurden gesunde Freiwillige eingeschlossen, die weder antikoagulatorisch noch Plättchen-hemmend behandelt wurden (n = 20).

3.1.2 PROZEDERE

Die Patienten wurden über den Ablauf und den wissenschaftlichen Hintergrund der Studie informiert und gaben ihr schriftliches freiwilliges Einverständnis zur Blutentnahme und die Erlaubnis zur Einsicht in ihre Krankenakte. Die Studie wurde nach den Prinzipien der Declaration of Helsinki durchgeführt. Es wurden

zu jedem Patienten Daten über das Alter, das Geschlecht sowie die Art der atrialen Rhythmusstörung (paroxysmales, persistierendes oder permanentes Vorhofflimmern beziehungsweise typisches oder atypisches Vorhofflattern) erhoben. Informationen zu Vor- oder Begleiterkrankungen wie eine bestehende Herz-, Leber- und Niereninsuffizienz, eine bekannte koronare Herzerkrankung, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, ein vorangegangener Apoplex beziehungsweise eine transitorische ischämische Attacke wurden ermittelt. Das individuelle Risiko für die Entwicklung einer Thromboembolie wurde bei jedem Patienten mit Hilfe des CHA₂DS₂-VASc Scores abgeschätzt.

Jedem Patienten wurden mittels 19 G Butterflys nach kurzer Venenstauung (Multifly Kanüle, Sarstedt) Blut aus der Kubitalvene entnommen. Die Abnahme erfolgte in handelsübliche Röhrchen (S-Monovette®, Sarstedt), die zur Antikoagulation mit EDTA (Ethylendiamintetraacetat, durchschnittliche Endkonzentration von 1,6 mg EDTA/ml Blut), 3,1% Trisodiumcitrat (Endkonzentration 1 Teil Citrat und 9 Teile Blut), Hirudin (0,045 mg/ml Blut) beziehungsweise Silikat-Gerinnungsaktivator beschichtet waren.

3.1.3 LABORTECHNISCHE BLUTANALYSEN

Die Analyse von peripherem Blutbild (Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobingehalt, Hämatokritbestimmung), Gerinnungsparameter (Prothrombinzeit, aktivierte partielle Thromboplastinzeit, Thrombinzeit), Kreatininkonzentration im Serum, Glutamat-Pyruvat-Transaminase Werte und der Dabigatranspiegel im Plasma wurden in den Routinelaboren des Deutschen Herzzentrums München beziehungsweise des Klinikums der Universität München nach Standardverfahren durchgeführt.

Blutbild

Das periphere Blutbild wurde in EDTA-antikoaguliertem Blut mit Hilfe eines vollautomatischen Hämozytometers (Sysmex) bestimmt.

Klinische Chemie

Zur Gewinnung von Plasma wurden die Blutproben bei 2000 g für die Dauer von 10 Minuten zentrifugiert. Die Kreatininwerte im Plasma wurden mit einem kinetischen Farbttest nach der Jaffé-Methode mit einem Cobas C501 Analyzer (beides Roche) bestimmt. In alkalischer Lösung bildet Kreatinin mit Pikrat gelb-rot gefärbte Komplexe, wobei die Bildungsgeschwindigkeit des Farbstoffes direkt proportional zur Kreatininkonzentration im Plasma ist.

Die Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) erfolgte mit Hilfe eines Pyridoxalphosphat-Aktivierungsassay und eines Cobas C501 Analyzer (beides Roche). Das Enzym GPT wird für die Reaktion von L-Alanin und 2-Oxoglutarat benötigt. Hierbei entsteht Pyruvat, das unter Umwandlung von NADH zu NAD⁺ zu Lactat reduziert wird. Die katalytische Aktivität von GPT ist proportional zur Oxidationsgeschwindigkeit von NADH zu NAD⁺ und kann durch eine Messung der Extinktionsabnahme bestimmt werden.

Gerinnungsparameter

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) wurde mit dem Pathromtin SL Reagenz (Siemens) am BCS Analysegerät (Behring Coagulation System, Siemens) bestimmt. In diesem Assay liegt der Referenzwert für gesunde Erwachsene zwischen 26 und 36 Sekunden. Eine Antikoagulation mit Dabigatran verlängert die aPTT (106). Zudem wurde die Thrombinzeit über ein BC-Thrombin-Reagenz (Siemens) bestimmt. Der Referenzbereich wurde vom Hersteller bei gesunden Erwachsenen mit einem Wert unter 21 Sekunden angegeben. Die Prothrombinzeit wurde mit Hilfe des Dade® Innovin® Reagenz (Siemens) gemessen.

Bestimmung des Dabigatranspiegels

Zur Bestimmung des Dabigatranplasmaspiegels wurde die verdünnte Thrombinzeit mit einem Hemoclot® Thrombin Inhibitor Gerinnungstest von Hyphen Biomed gemessen. Diese Methode beruht auf der Hemmung einer definierten Menge Thrombin durch direkte Thrombininhibitoren. Zur

Bestimmung von Dabigatran wurde das verdünnte Probenplasma mit gepooltem Normplasma versetzt. Die Gerinnung wurde anschließend durch Zugabe einer konstanten Menge von Thrombin ausgelöst. Die gemessene Zeit bis zur Thrombusbildung ist dabei direkt proportional zur Konzentration von Dabigatran im Testplasma. Der Messbereich für Dabigatran im Plasma liegt zwischen 30 und 500 ng/ml.

Prothrombinfragmente 1 und 2

Bei der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin durch den Prothrombinase-Komplex werden die Prothrombinfragmente 1 und 2 (F1+2) proteolytisch abgespalten. Sie geben Auskunft über das Ausmaß der Thrombinbildung. Ihre Quantifizierung erfolgte mittels Enzymimmunoassay (Enzygnost F1+2® monoclonal, Siemens). Bei gesunden Erwachsenen liegt der Referenzbereich zwischen 69 und 229 pmol/l.

Thrombin/Antithrombin III - Komplexe

Antithrombin III, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 58 kDa, ist der wichtigste physiologische Gerinnungshemmer. Es gehört der Superfamilie der Serinprotease-Inhibitoren an und hemmt die Wirkung von Thrombin und der Gerinnungsfaktoren IXa, Xa, XIa und XIIa indem es einen Enzym-Inhibitor-Komplex bildet (107). Im Plasma ist der Großteil des gebildeten Thrombins an Antithrombin III gebunden. Diese Thrombin/Antithrombin III – Komplexe (TAT) ermöglichen einen Rückschluss auf die Menge des ursprünglich gebildeten Thrombins und wurden ebenfalls über einen Enzymimmunoassay (Enzygnost® TAT micro, Siemens) nach dem Sandwich-ELISA-Prinzip quantifiziert. Laut Hersteller liegt der Referenzbereich bei gesunden Erwachsenen (5. bis 95. Perzentile) unter 2,0 bis 4,2 µg/l.

D-Dimer - Werte

Als D-Dimere werden Spaltprodukte des Fibrins bezeichnet, die während der Fibrinolyse entstehen und so Rückschlüsse auf die Gerinnungsaktivierung zulassen. Die Werte wurden mit Hilfe eines Innovance® D-Dimer Reagenz am BCS Analysegerät (beides Siemens) bestimmt.

3.1.4 BESTIMMUNG DER THROMBINMENGE IM PLASMA MITTELS IMMUNOBLOTTING

Die Bestimmung der Thrombinmenge im Plasma erfolgte mittels Immunoblotting. Die Patientenplasmen (1 µl) wurden hierfür mit fünffach konzentriertem Lämmli-Puffer (10 % w/v SDS, 10 mM β-Mercaptoethanol, 20 % v/v Glycerol, 0,2 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,05 % w/v Bromophenolblau; alle Komponenten von Sigma-Aldrich) zu je vier Teilen Plasma und einem Teil Lämmli-Puffer versetzt und zur Proteindenaturierung für fünf Minuten auf 95° C erhitzt. Die denaturierten Proteine wurden anschließend in einer mit SDS-Puffer (Novex Tris-Glycine SDS Running Buffer 10X; Life Technologies) gefüllten Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 120 V über ein vorgefertigtes, kommerziell erwerbliches Gradientengel (Novex 4 -20 % Tris-Glycine Mini Protein Gels; 1,5 mm, 10 wells, Life Technologies) anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine, die als negativ geladene SDS-Proteinkomplexe vorliegen, durch Anlegen einer elektrischen Spannung senkrecht zur Laufrichtung des Gels auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm Porengröße; Life Technologies) übertragen, um sie für die nachfolgende Immundetektion für Antikörper zugänglich zu machen. Ein Transfer-Sandwich bestehend aus Membran, Gel und zwei umgebenden Schichten von mit Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapier-Stapeln (Semi-dry Blotting Buffer Kit for Western Blotting; Serva) wurde für 30 Minuten mit einer Stromstärke von 150 mA in einem Semi-dry-Blotter (Sigma-Aldrich) geblottet.

Zunächst wurde die Membran mit 5 % Milchpulver gelöst in TBST-Puffer geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Im Anschluss erfolgte die

Inkubation der Membran mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen Thrombin (1:1000; ab92621; Abcam). Zur Signalerfassung wurde ein HRP- (horse radish peroxidase) markierter Sekundär-Anti-Kaninchen Antikörper (1:5000; Thermo Scientific) sowie ein Chemilumineszenz ECL Western Blotting Substrat (Thermo Scientific) verwendet. Das durch die Peroxidase erzeugte Chemilumineszenz-Signal wurde mit einem Autoradiographiefilm (Typ Fuji Super RX, UV / blauempfindlich, 13 x 18 cm; A. Hartenstein) detektiert.

Nach Entfernung des Thrombin-Antikörpers mittels Stripping Puffer (Restore Western Stripping Buffer; Thermo Scientific) wurde die Blotting-Membran mit einem polyklonalen Kaninchen Antikörper gegen Albumin (1:40000; Cell signalling) getestet, um eine gleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Banden sicherzustellen.

Die relativen Thrombinwerte wurden mittels Densitometrie mit Hilfe der ImageJ Software (National Institutes of Health, Maryland) bestimmt.

3.1.5 QUANTIFIZIERUNG DES AKTIVEN THROMBINS

Die Bestimmung der Thrombinaktivität erfolgte nach dem Sandwich-ELISA-Verfahren (enzyme-linked immunosorbent assay). Hierfür wurde ein Oligobind® Thrombin activity assay (American Diagnostica) verwendet. Die Patientenplasmen werden dabei mit dem reversiblen Thrombin Inhibitor Argatroban (Thrombin Blood Collection Tubes; American Diagnostica) stabilisiert und auf eine 96-Well-Platte aufgetragen, die mit einem spezifischen Thrombin-bindenden DNA-Aptamer beschichtet wurde. DNA-Aptamere bestehen aus kurzen DNA-, RNA- oder Peptidabschnitten, sind einzelsträngig und können ein Molekül aufgrund ihrer spezifischen räumlichen Struktur binden (108). Das hier verwendete bivalente DNA-Aptamer HD1-22 bindet mit einer hohen Affinität an die beiden Exosites 1 und 2 des Thrombinmoleküls, wobei das katalytische Zentrum des Enzyms frei zugänglich bleibt (109). Nach einem Waschvorgang, wurde ein fluorogenes Thrombinsubstrat, das durch das immobilisierte Enzym umgesetzt wird, hinzugegeben. Die Veränderung der Fluoreszenz wurde mit einem Fluorescence Plate Reader (Safire, Tecan Group

AG) bei 360_[ex] /460_[em] nm 20 Minuten nach Beginn der Reaktion gemessen. Die mittlere Thrombinaktivität in den als Triplikat angelegten Patientenplasmen wurde anhand von mitgelieferten Standardproben bestimmt.

3.1.6 IMPEDANZAGGREGOMETRIE

Plättchenaggregation und Thrombusformation im Vollblut wurden durch Impedanzaggregometrie mit Hilfe eines Multiplate Analyzers (Dynabyte Medical) untersucht. Bei diesem Verfahren wird die Thrombozytenaggregation durch eine Veränderung des elektrischen Widerstandes zwischen den beiden Elektroden in der Versuchsküvette gemessen. Das mit Hirudin antikoagulierte Blut wurde hierfür mit Adenosindiphosphat (6,4 µmol) und Thrombinrezeptor Aktivator Proteine-6 (TRAP-6; 32 µmol; beides Roche) stimuliert. Die Aggregation über die Zeit wurde als Area under the curve (AUC) ermittelt.

3.1.7 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE VERSUCHE

Die Durchflusszytometrie stellt eine Möglichkeit zur Typisierung einzelner Zellen auf der Grundlage ihrer Streulichteigenschaften dar. Anhand von Antikörpern, die mit Fluorochromen markiert sind und an Membranproteine auf der Zelloberfläche binden, können sowohl Zelltyp als auch Aktivierungszustand genauer bestimmt werden. Zur Charakterisierung der Thrombozyten der Patienten haben wir folgende Antikörper verwendet: CD42b ist Teil des von-Willebrand-Faktor Rezeptors. Anti-CD62P bindet an P-Selectin, das bei der Aktivierung der Thrombozyten aus den α-Granula freigesetzt und auf der äußeren Plasmamembran exponiert wird. PAC-1 bindet an aktiviertes Integrin αIIbβ3, das nach einem Konformationswechsel in einem entfalteten Zustand vorliegt.

Für die Versuchsdurchführung wurde humanes Citratblut beziehungsweise Heparin-versetztes Mausblut mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 (137 mM NaCl; 2,8 mM KCl; 12 mM NaHCO₃; 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES [N-2 Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid], 5,5 mM Glucose) 1:100

verdünnt und für 15 Minuten mit den genannten Antikörpern (s.u.) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Bestimmung der Plättchenreaktivität wurden die Proben mit den Plättchenagonisten Thrombin (0,05 U/ml; 0,1 U/ml und 1 U/ml, Sigma-Aldrich), ADP (1 mmol und 5 mmol; Sigma-Aldrich) und Collagen-related Peptide (CRP, 0,1 µg/ml; 1 µg/ml und 10 µg/ml; Prof. Watson, Cambridge, UK) stimuliert. Im Anschluss wurden die Proben in einem FACS Calibur Durchflusszytometer (BD Biosciences) analysiert. Die Rohdaten wurden mit Hilfe der FlowJo Software Version 9.6.2 (Tree Star) analysiert.

Verwendete anti-humane Fluorochrom-markierte Antikörper

Protein	Färbung	Klon	Hersteller	Konz.
CD42b (Glykoprotein Ib)	PE	HIP1	BD Biosciences	1:100
PAC-1 (Aktives Integrin α IIb β 3A)	FITC	PAC-1	BD Biosciences	1:100
CD62P (P-Selectin)	PE	AC1.2	BD Biosciences	1:100
IgG1-Maus Isotyp Kontrolle	PE	X40	BD Biosciences	1:100
IgM-Maus Isotyp Kontrolle	FITC	G155-228	BD Biosciences	1:100

Verwendete anti-murine Fluorochrom-markierte Antikörper

Protein	Färbung	Klon	Hersteller	Konz.
CD62P (P-Selectin)	FITC	RB40.34	BD Pharmingen	1:100
IgG1-Ratte Isotyp Kontrolle	FITC	eBRG1	eBioscience	1:100

3.1.8 FLUSSKAMMERVERSUCHE

Als Hauptauslöser für die Entstehung einer akuten arteriellen Thrombose gilt die Ruptur eines atheromatösen Plaques und die damit verbundene Exposition von hoch thrombogenen, subendothelialen Matrixproteinen innerhalb eines Gefäßes. Dies führt innerhalb weniger Sekunden zur Plättchenrekrutierung und –adhäsion an die Läsionsstelle. Da Flusskammerversuche ein sehr gutes Instrument zur Analyse der Pathomechanismen während der arteriellen Thromboseentstehung darstellen (110), perfundierten wir Blut unter arteriellen Wandscherraten über Slides, die mit Kollagen und humanem Plaquematerial beschichtet wurden.

Vorbereitung der Blutproben

Citrat-antikoaguliertes Blut wurde über 15 Minuten mit 0,01 % (Endkonzentration) Rhodamin 6G Chloride (Life Technologies) bei 37° C im Dunkeln inkubiert. Die folgenden Antikörper und Reagenzien wurden wie angegeben hinzugefügt: Anti-CD42b-Maus Antikörper (20 µg/ml; Vm16d, Thermo Scientific), Anti-Maus IgG1 Isotyp Kontroll-Antikörper (20 µg/ml; CT6, Abcam), rekombinantes Hirudin (26 µg/ml; Refludan[®], Celgene), Anti-GPIIb Antikörper 6B4 (5 µg/ml, Prof. Hans Deckmyn, Leuven, Belgien) oder PAR-1 Antagonist (2,5 µM SCH79797, Abcam). Um das durch das Natriumcitrat in der Monovette gehemmte Gerinnungssystem zu reaktivieren, wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn 6 mM Kalziumchlorid zu jeder Blutprobe gegeben. Damit wurde eine freie Kalziumkonzentration von etwa 0,5 mM erreicht.

Flusskammerversuche auf Kollagen

Die Flusskammern (µ-Slide VI 0.1, Ibidi) wurden mit 250 µg/ml fibrillärer Kollagenlösung (Kollagenreagens Horm, Nycomed) beschichtet und für 60 Minuten bei 37° C in 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit 200 µl PBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline, without calcium chloride and magnesium chloride, Biochrom) wurden die Blutproben

mit Hilfe eines Spritzenpumpensystems (KDS 100 Syringe Pump, KD Scientific Inc.) für eine und drei Minute über die Flusskammern perfundiert. Hierfür wurde eine Wandscherrate von 1000 /s gewählt, was einer arteriellen Scherrate *in vivo* entspricht (111). Im Anschluss wurden die Kammern drei Minuten mit PBS gespült.

Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Axiovert 100 beziehungsweise Axiovert 200 Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH), das mit einem Achroplan 10 x 0,25 Objektiv und einer HRc-Axiocam Kamera (Zeiss) ausgestattet ist, aufgenommen. Bei jedem Versuch wurden je zwei Bilder aus dem proximalen, mittleren und distalen Bereich der Flusskammer in einer Auflösung von 1300 x 1030 Pixel aufgenommen.

Von jedem der drei Flusskammerbereiche wurde ein repräsentatives Bild zur Analyse ausgewählt und mit Hilfe des open-source Programms ImageJ (National Institutes of Health, Maryland) in ein 8-bit-Graustufenbild umgewandelt. Zwei repräsentative, sich nicht überlappende Regionen, die etwa 37 % des gesamten Bildes ausmachten und nicht am äußeren Rand der Flusskammer lagen, wurden für die Auswertung ausgewählt. Um Unterschiede in der Färbequalität zwischen den einzelnen Versuchen zu kompensieren, wurden Helligkeit und Kontrast der Bilder angepasst.

Anschließend wurde die von Thromben bedeckte Oberfläche mit Hilfe der ImageJ Software bestimmt und als arbiträre Einheit (arbitrary units, a.u.) beziehungsweise als Prozentsatz der Gesamtoberfläche angegeben. Für eine differenzierte und dynamische Analyse der Thrombusbildung auf Kollagen wurden die gebildeten Thrombozytenaggregate in drei Größenkategorien eingeteilt, welche die frühen, intermediären und späten Stadien der Thrombusformation in unserem *in vitro* Modell repräsentieren. Kleine Events mit einer Größe von unter 25 a.u.² enthalten einzelne Thrombozyten und frühe, kleine Aggregate. Plättchenaggregate mit einer Größe von über 200 a.u.² repräsentieren komplexere Aggregate und Thromben. Plättchenaggregate mit einer Größe von 25 a.u.² bis 200 a.u.² wurden als intermediär klassifiziert.

Flusskammerversuche auf humanem Plaquematerial

Um die klinische Relevanz unserer Versuche zu erhöhen, führten wir zusätzlich Flusskammerversuche auf humanem Plaquematerial durch. Die hierfür benötigten atherosklerotischen Plaques wurden Patienten, die sich aufgrund einer hochgradigen Stenose der Arteria Carotis einer Endarteriektomie unterzogen, im Ganzen entnommen. Die Patienten gaben hierfür ihre schriftliche freiwillige Einverständnis und die Versuche wurden nach den ethischen Leitlinien der Declaration of Helsinki und nach Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Alle Plaque-beschichteten Flusskammern wurden von Janina Jamasbi (Labor Professor Siess, München) vorbereitet und freundlicherweise zur weiteren Versuchsdurchführung zur Verfügung gestellt. Plaquehomogenisate (100 mg Feuchtgewicht/ml) von 5 Patienten wurden jeweils vermischt, um Plaque Pools zu erhalten, die dann als Aliquote bei – 80° C aufbewahrt wurden. Das Plaquehomogenisat wurde anschließend in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS mit 0,1 % Humanem Serum Albumin (HSA; Sigma-Aldrich) gelöst und auf die Glascoverslips (Coverslips for sticky-Slides, Ibidi) aufgetragen. Die Flusskanäle (sticky-Slide I 0.1 Luer, Ibidi) wurden mit 4 % HSA in PBS geblockt um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Nachdem Flusskanal und das mit Plaque beschichtete Deckglas zusammengefügt wurden, wurde die Flusskammer je eine Minute mit PBS und 4 % HSA in PBS gespült und zehn Minuten inkubiert (110, 112, 113).

Anschließend wurden die Blutproben wie oben beschrieben mit einer arteriellen Wandscherrate von 1000 /s für drei Minuten durch die Plaque-beschichteten Flusskammern perfundiert. Alle 5 Sekunden nach Beginn des Blutflusses wurden von einer repräsentativen Region (839 µm x 645 µm), die nicht am äußeren Rand der Flusskammer lag, Bilder aufgenommen. Nach Adjustierung von Helligkeit und Kontrast wurde die von Thromben bedeckte Oberfläche mit Hilfe der ImageJ Software bestimmt und als arbiträre Einheit (arbitrary units, a.u.) beziehungsweise als Prozentsatz der Gesamtoberfläche angegeben. Für Videos wurden die Bilder in AVI-Format Dateien mit einer Frame Rate von 12 Bildern/Sekunde umgewandelt.

3.2 IN VIVO VERSUCHE

3.2.1 MAUSMODELLE

Wildtyp-Mäuse

Für die *in vivo* Versuche wurden C57BL/6 Wildtyp-Mäuse von The Jackson Laboratory verwendet. Es wurden grundsätzlich nur 10-12 Wochen alte weibliche Tiere verwendet. Alle Tierversuche wurden nach Genehmigung (Aktenzeichen 55.2.1.54-2532-182-11) durch die Regierung von Oberbayern (München, Deutschland) durchgeführt. Die Vorbereitung der Tiere inklusive Prämedikation mit Dabigatran, VKA bzw. Vehikel sowie die Auswertung der Versuche erfolgten dabei durch die Promovendin. Die Tieroperationen per se (Carotis-Ligatur-Modell und Carotis-Denudation mittels Drahtmodell) wurden von Dr. med. vet. Ildiko Konrad, Dr. med. vet. Annekathrin Eckart und Dr. med. vet. Irene Schubert durchgeführt.

IL4R/GPIIb α tg chimäre Mäuse

Um die Bedeutung der Thrombin-Plättchen Interaktion unter Dabigatrantherapie zu untersuchen wurden IL4R/GPIIb α tg chimäre Mäuse verwendet. Hierfür wurden 6×10^6 Knochenmarkszellen von mutierten Spendermäusen, deren Megakaryozyten beziehungsweise Thrombozyten ein IL4Ra/GPIIb α tg Fusionsprotein exprimieren, in die Vena Cauda von subletal bestrahlten Wildtyp-Mäusen injiziert. Auf den Blutplättchen dieser GPIIb α defizienten Mäuse ist die extrazelluläre Domäne des Glykoproteins GPIIb α durch die extrazelluläre Domäne des humanen IL-4 Rezeptors ersetzt, wobei die intrazelluläre GPIIb α -Domäne funktionsfähig bleibt. Mäuse, die dieses mutierte IL4R/GPIIb α tg Fusionsprotein tragen, entwickeln kein klassisches Bernhard-Soulier Syndrom, das mit einer stark verringerten Thrombozytenzahl und erhöhtem Thrombozytenvolumen einhergeht. Sie zeigen einen Blutungsphänotyp wie er in GPIIb α null Mäusen beobachtet wird (114).

3.2.2 PRÄMEDIKATION

Die Tiere wurden entweder mit Dabigatran oder Vitamin-K-Antagonisten antikoaguliert. Dabigatran-behandelten Mäusen wurde 30 Minuten vor Versuchsbeginn eine Einmaldosis Dabigatran etexilate (37,5 mg/kg KG; Boehringer Ingelheim) über eine Magensonde appliziert. Lauer et al. korrelierten gängige Gerinnungstests mit der Aktivität von Gerinnungsfaktoren in Mäusen, denen Dabigatran in verschiedener Dosierung von 37,5 mg/kg KG bis 112,5 mg/kg KG appliziert wurde. Da eine Dabigatrandosis von 37,5 mg/kg KG zu einer aPTT Verlängerung führte, wie sie in Dabigatran-behandelten Patienten beobachtet wird, wählten wir für unsere *in vivo* Versuche diese Dosierung (115). Das Dabigatrangranulat wurde mit einem Mörser zerstoßen und in 1 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) aufgelöst.

VKA-antikoagulierte Tiere erhielten eine gewichtsadaptierte Dosis von 2 mg/kg KG am ersten Tag und am zweiten Tag 1,5 mg/kg KG Marcumar (MEDA Pharma). Die Applikation des in PBS gelösten Marcumar erfolgte dabei über eine Magensonde analog zur Dabigatran-Applikation. Da die antikoagulatorische Wirkung von Marcumar aufgrund des Wirkmechanismus, der auf einer Reduktion der Vitamin-K abhängigen Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X beruht, erst verzögert einsetzt, war eine zweimalige Marcumargabe nötig.

Kontrolltiere wurden mit einer alleinigen Gabe der Lösungssubstanz DMSO (1 % in steriler, physiologischer Kochsalzlösung) vorbehandelt.

Einem Teil der C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurde 30 Minuten nach Dabigatran beziehungsweise DMSO Applikation 2,5 mg/kg KG Xia.B2 Anti-GPIIb α Fab Fragmente (Emfret Analytics; Pierce Fab Preparation Kit, Thermo Scientific) zur Inhibierung der vWF-GPIIb α Interaktion intravenös verabreicht (116).

3.2.3 MURINE BLUTENTNAHME

Die Blutentnahme der Spendertiere erfolgte durch intrakardiale Punktion in Vollnarkose. Das so gewonnene Blut wurde mit Trisodiumcitrat (aus S-

Monovette®, Sarstedt; 170 µl 3,1% Trisodiumcitrat und 830 µl Blut) antikoaguliert. Anschließend wurden die Spendertiere schmerzfrei durch zervikale Dislokation getötet. Die Bestimmung der aPTT und Prothrombinzeit erfolgten wie weiter oben beschrieben.

3.2.4 CAROTIS-LIGATUR-MODELL

Mittels Carotis-Ligatur-Modell nach Massberg et al. (102) wurde ein kurzzeitiger arterieller Verschluss herbeigeführt. Die rechte Arteria Carotis communis der anästhesierten Tiere wurde hierfür in ihrem Verlauf freipräpariert und mit einem Faden für einen Zeitraum von fünf Minuten kräftig ligiert, was zu einer Endothelläsion und zur Exposition von extrazellulären Matrixproteinen führt. Anschließend wurden den Tieren 200×10^6 (in 250 µl) DCF-markierte (2,7-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat, Molecular Probes) Thrombozyten von Spendertieren über einen Katheter in die Vena Jugularis infundiert. Die Adhäsion der einzelnen Plättchen und die Aggregatbildung wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop Axiotechvario 100 HD (Zeiss) mit einem 20X (NA 0,95) Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss), das an eine digitale Kamera (ORCA-ER, Hamamatsu Photonics) angeschlossen wurde, beobachtet. Alle Videoaufnahmen wurden mit Hilfe des Bildanalyseprogramms Cell^{AR} (Olympus) analysiert. Die Zahl der adhärenenten Plättchen an der Läsionsstelle wurde als Prozentsatz der adhärenenten Plättchen der mit Dabigatran-behandelten Tiere zum Fünf-Minuten-Zeitpunkt angegeben. Die Analyse der Plättchenadhäsion und –aggregation wurde Auswerter verblindet durchgeführt.

3.2.5 CAROTIS-DENUDATION MITTELS DRAHTMODELL

Eine Endothelzelldenudation der Arteria Carotis mittels Drahtmodell wurde wie von Lindner et al. beschrieben (117) durchgeführt. Hierfür wurde die rechte Arteria Carotis communis freipräpariert und über eine kleine Inzision in die Arteria Carotis interna unter Blutleere ein Angioplastiedraht (Floppy® II Guide Wire 0,36 mm, Guidant Corporation) circa 1cm weit in das Lumen der Arteria

Carotis communis vorgeschoben, gedreht und wieder aus dem Gefäß herausgezogen. Nach Verschluss der vorgelegten Ligatur um die Arteria Carotis interna wurden den Tieren 200×10^6 (in 250 μ l) DCF-markierte Plättchen infundiert. Der erzeugte Endothelschaden führt zu einem thrombotischen Verschluss des Gefäßes an der Läsionsstelle, der sich im Laufe der Zeit wiedereröffnet. Thrombusbildung und die Zeit bis zur Rekanalisation des Gefäßes mit Wiedereinsetzen des Blutflusses wurden als Endpunkte definiert.

3.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle statistischen Auswertungen wurden mit einer Prism 5 Software (GraphPad Software) durchgeführt und die Normalverteilung wurde über den D'Agostino-Pearson Omnibus Test für Fallzahlen ≥ 8 , beziehungsweise den Kolmogorov-Smirnov Test für Fallzahlen ≥ 5 geprüft. Die Daten wurden dann durch den ANOVA-Test, einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test oder einen Mann-Whitney Test analysiert. Die Patientenzahlen für den primären Studienendpunkt (Oberflächendeckung auf humanem Plaquematerial nach 3 Minuten Blutfluss) wurden so berechnet, dass eine statistische Gewissheit mit der Wahrscheinlichkeit eines Typ I Fehlers von $p = 0,05$ (α), die Wahrscheinlichkeit eines Typ II Fehlers von $p = 0,2$ (Power 0,8), ein minimal feststellbarer Unterschied von 30 % und eine erwartete Standardabweichung von 15 % erreicht wurden.

4 ERGEBNISSE

4.1 PATIENTENKOLLEKTIV

Insgesamt wurden 73 Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern oder –flattern und einer bestehenden antikoagulatorischen Therapie mit Dabigatran in einer zweimal täglichen Dosis von 150 mg (n = 31) oder einer INR-adaptierten Vitamin-K-Antagonistentherapie (n = 42) in diese Studie eingeschlossen. Beide Patientengruppen zeigten ähnliche Charakteristiken mit einem mittleren CHA₂DS₂-VASc Score von $3,1 \pm 1,4$ in der VKA-Gruppe und $2,5 \pm 1,4$ in der Dabigatrangruppe ($p = 0,10$). Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Untersuchung war mit $66,2 \pm 10,1$ Jahren in der Dabigatrangruppe signifikant jünger als in der VKA-Gruppe mit $71,2 \pm 9,2$ Jahren. Das Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 34 Frauen und 39 Männern. Die weiteren Kollektiveigenschaften beider Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede und sind in Abbildung 1A zusammengefasst.

Zur Bestimmung des Dabigatranplasmaspiegels wurde die verdünnte Thrombinzeit mit dem Hemoclot® Thrombin Inhibitor Gerinnungstest gemessen. Der mittlere Dabigatranspiegel war $0,148 \pm 0,109$ µg/ml (Abbildung 1B) und damit den Plasmaspiegeln in der RE-LY Studie ähnlich (118).

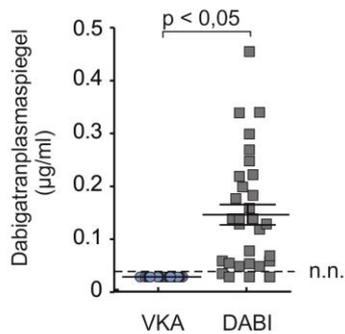
Die Bestimmung der Gerinnungsparameter zeigte die zu erwartenden Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 1C-E). Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) war $42,1 \pm 7,6$ Sekunden in der VKA-Gruppe und $51,8 \pm 15,5$ Sekunden in der Dabigatrangruppe. Die Thrombinzeit lag bei $19,2 \pm 3,3$ Sekunden in der VKA-Gruppe und bei >120 Sekunden in der Dabigatrangruppe. VKA-behandelte Patienten zeigten durchschnittlich einen INR-Wert von $2,4 \pm 0,5$.

Abbildung 1:

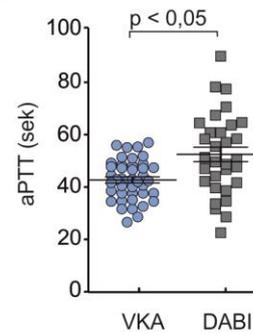
A

Charakteristik	VKA (n = 42)	Dabigatran (n = 31)	P-Wert
Alter - Jahre	71,2 ± 9,2	66,2 ± 10,1	0,03
Männliches Geschlecht - Anzahl/Gesamtzahl (%)	21/42 (50)	18/31 (58)	
Hämoglobin - g/dl	14,0 ± 1,4	14,5 ± 1,2	0,23
Leukozyten - 10 ⁹ /l	7,2 ± 3,2	6,8 ± 1,6	0,88
Thrombozyten - 10 ⁹ /l	217,5 ± 41,7	219,3 ± 41,9	0,75
CHA2DS2-VASc - Wert	3,05 ± 1,4	2,5 ± 1,4	0,10
Vorhofflimmern - Anzahl/Gesamtzahl (%)			
paroxysmal	24/42 (57)	16/31 (51)	
persistierend/permanent	16/42 (38)	12/31 (39)	
Vorhofflattern	2/42 (5)	3/31 (10)	

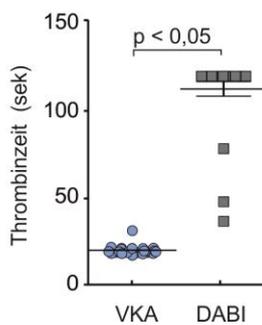
B



C



D



E

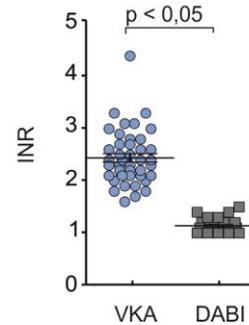


Abbildung 1: (A) Charakteristika der Dabigatran- und VKA-behandelten Patienten. (B) Zur Bestimmung des Dabigatranplasmaspiegels wurde die verdünnte Thrombinzeit mit dem Hemoclot® Test gemessen. Die Bestimmung der aPTT (C), Thrombinzeit* (D) und INR-Werte (E) wurde mittels Routine-Testverfahren durchgeführt. Jedes Symbol repräsentiert ein Individuum (n. n. = nicht nachweisbar; n = 31 Dabigatran, n = 42 VKA; * bei 4 Dabigatran- und 6 VKA-Patienten konnte keine Thrombinzeit bestimmt werden. Das Signifikanzniveau ist angegeben).

4.2 THROMBOZYTENAKTIVITÄT UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN

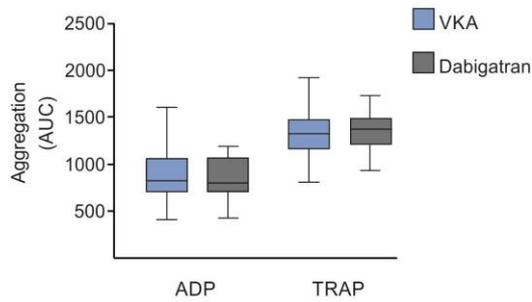
Zunächst untersuchten wir mittels Impedanzaggregometrie, ob die Antikoagulation mit Dabigatran die Plättchenaggregation und Thrombusformation im Vollblut beeinflusst. In beiden Gruppen (VKA n = 15, Dabigatran n = 15) zeigte sich eine ähnliche Aggregationsantwort nach Stimulation mit ADP (VKA $865,5 \pm 68$ AUC und Dabigatran $858,1 \pm 41$ AUC; p = 0,32) oder TRAP (VKA 1248 ± 61 AUC und Dabigatran 1341 ± 53 AUC; p = 0,26; Abbildung 2A).

Um mögliche Unterschiede in der Plättchenaktivität einzelner Zellen zu untersuchen, führten wir unter Ruhebedingungen und nach Stimulation mit verschiedenen Thrombozytenagonisten FACS Messungen durch. Zur Beurteilung des Aktivierungszustandes der Thrombozyten wurden die P-Selectin Expression und die Aktivierung des Integrins α IIb β IIIa mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der hierfür verwendete anti-CD62P Antikörper bindet an P-Selectin, das bei der Aktivierung der Plättchen aus den α -Granula freigesetzt und auf der äußeren Plasmamembran exponiert wird. Desweiteren benutzten wir einen PAC-1 Antikörper, der spezifisch an aktiviertes, hochaffines Integrin α IIb β IIIa bindet, das nach einem Konformationswechsel in einem entfalteten Zustand vorliegt. Die Thrombozyten wurden mit den Plättchenagonisten Thrombin, ADP und CRP stimuliert, die die Thrombozytenaktivierung jeweils durch unterschiedliche Rezeptoren und Signalwege herbeiführen. In beiden Patientengruppen fanden wir sowohl unter statischen Bedingungen als auch nach Stimulation eine ähnlich hohe P-Selectin Expression und Integrinaktivierung (Abbildung 2B und C).

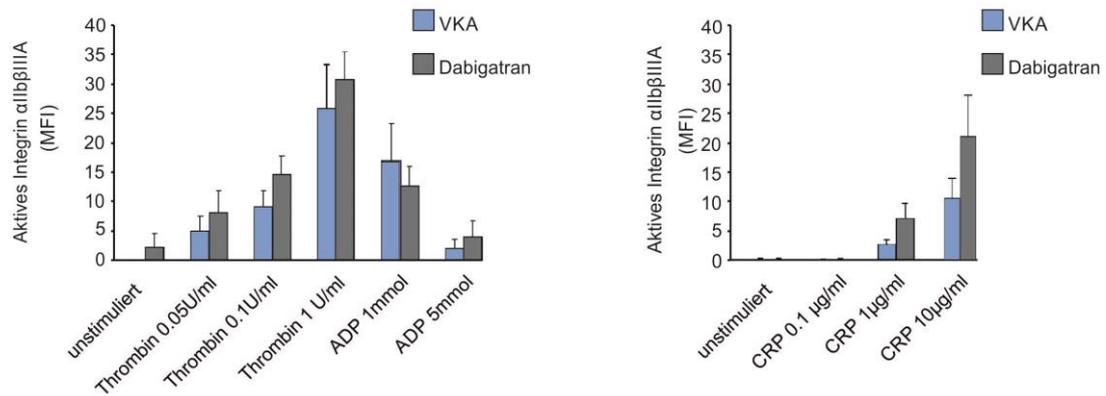
Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Dabigatran *in vitro* keinen großen Einfluss auf die Plättchenaktivität oder –aggregation unter statischen Bedingungen ausübt.

Abbildung 2:

A



B



C

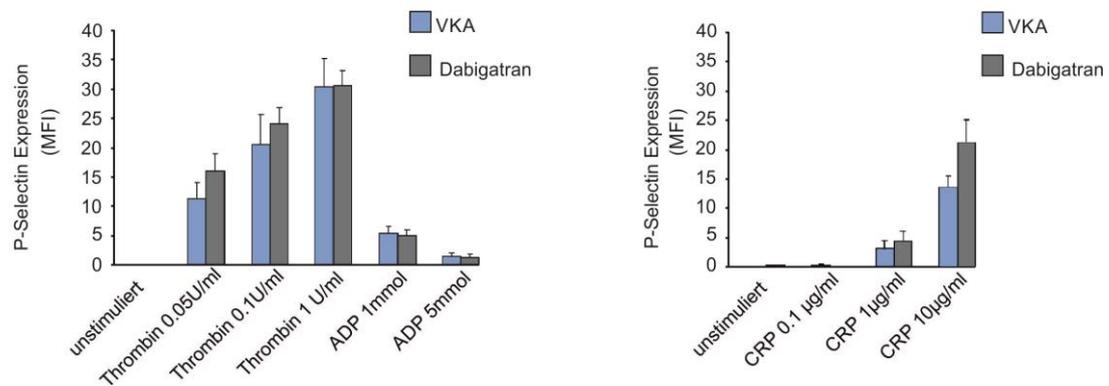


Abbildung 2: (A) Thrombozytenaggregation in Vollblut wurde nach Stimulation mit ADP und TRAP mittels Impedanzaggregometrie gemessen und als Area under the curve (AUC) angegeben (n = 15 Dabigatran, n = 15 VKA; Box-Whiskers-Plot \pm min./max. Werte).

Plättchenaktivierung und -reaktivität in verdünntem Vollblut (1:100) Dabigatran- oder VKA-behandelter Patienten wurden durchflusszytometrisch analysiert. Aktivierung des Integrins α IIb β 3 (B) und die Expression von P-Selectin auf der Plasmamembran (C) wurde unter statischen Bedingungen und nach Stimulation mit den angegebenen Plättchenagonisten gemessen (n = 14 Dabigatran; n = 14 VKA für Stimulation mit Thrombin und ADP; n = 5 Dabigatran, n = 4 VKA für Stimulation mit CRP; Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler).

4.3 PLÄTTCHENADHÄSION UND THROMBUSFORMATION UNTER FLUSSBEDINGUNGEN

Um die Plättchenfunktion unter den pathophysiologischen Bedingungen der arteriellen Thrombose zu untersuchen, führten wir Flusskammerversuche durch. Hauptauslöser für die Entstehung einer akuten arteriellen Thrombose ist die Freilegung von extrazellulären Matrixproteinen durch die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques, was zur Plättchenaktivierung an der Läsionsstelle führt. Um den Einfluss von Dabigatran auf die Thrombozytenfunktion während dieser frühen Phase der arteriellen Thrombose zu analysieren, führten wir Flusskammerversuche auf Kollagen durch.

Hierfür wurde Citrat-antikoaguliertes Vollblut durch eine mit 250 µg/ml Kollagen-beschichtete Flusskammer mit einer arteriellen Wandscherrate von 1000 /s geleitet. Anschließend wurde die von Thrombozyten bedeckte Oberfläche bestimmt und als arbiträre Einheit (a.u.) angegeben. Für eine differenzierte Analyse der Thrombusformation auf Kollagen wurden die gebildeten Thrombozytenaggregate in drei Größenkategorien eingeteilt. Diese Kategorien repräsentieren die frühen, intermediären und späten Stadien der Thrombusformation in unserem *in vitro* Modell.

Am Eine-Minute-Zeitpunkt zeigte sich in Blut von Dabigatran-behandelten Patienten eine signifikant erhöhte Oberflächendeckung im Vergleich zu Blut von VKA-Patienten ($p < 0,05$; Abbildung 3A und B). Zudem fanden sich deutlich mehr Plättchenaggregate mit einer Größe über 25 a.u. ($p < 0,05$) und über 200 a.u. ($p < 0,01$) als in VKA-Blut (Abbildung 3A und C). Nach drei Minuten war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten (Abbildung 3A, D und E).

Abbildung 3:

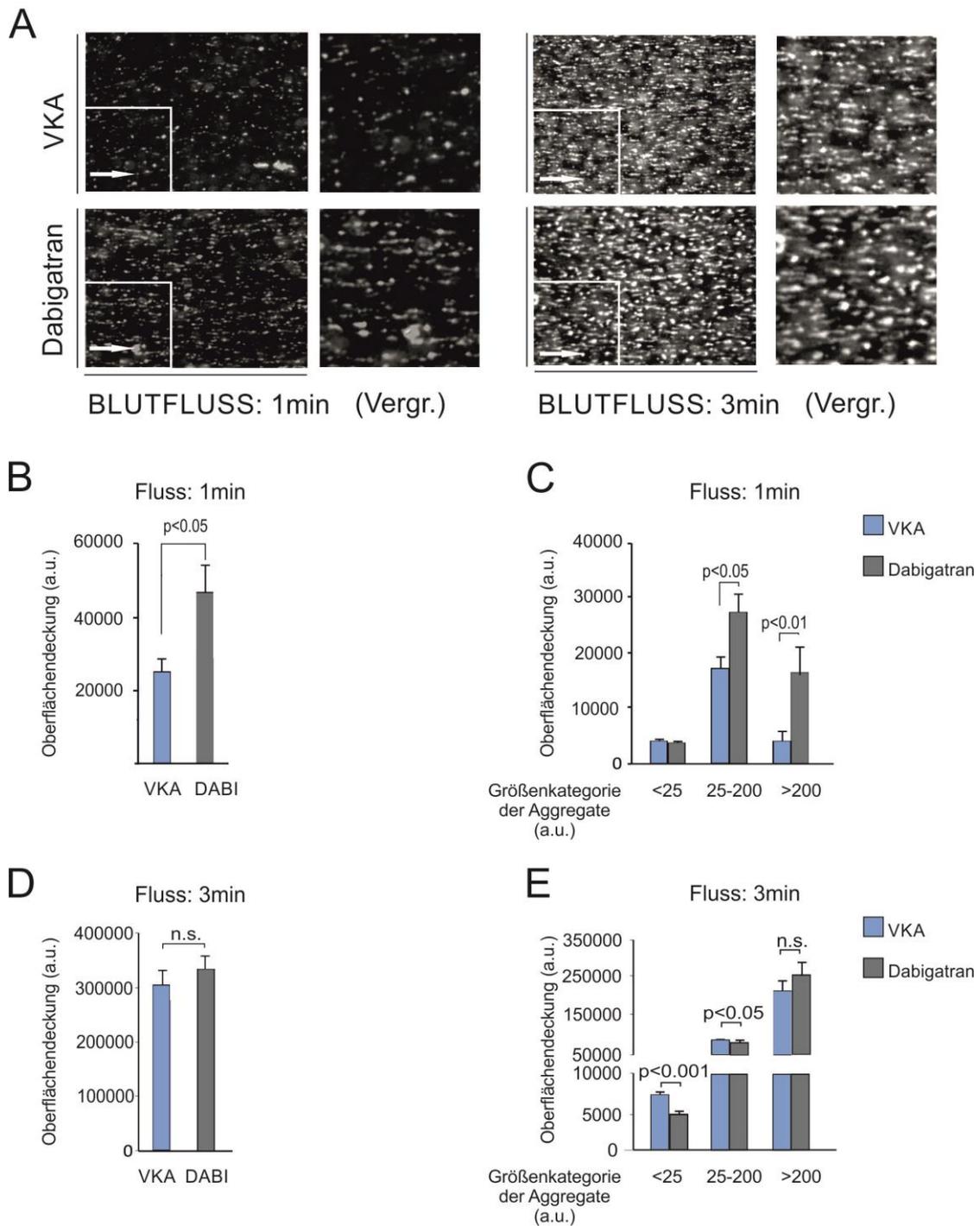


Abbildung 3: Blut von Dabigatran- oder VKA-behandelten Patienten wurde mit einer arteriellen Wandscherrate von 1000 /s durch eine Kollagen-beschichtete Flusskammer perfundiert. (A) Repräsentative Bilder nach 1 und 3 Minuten Blutfluss werden gezeigt. Der abgebildete Pfeil (140 μ m) zeigt die Flussrichtung an. (B) Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation wurden als Gesamtoberflächendeckung nach 1 min (B) und nach 3 min Blutfluss(D) analysiert. Die nach 1 min (C) und nach 3 min (E) gebildeten Thrombozytenaggregate wurden anhand ihrer Fläche in drei Größenkategorien eingeteilt. (n = 13 Dabigatran, n = 14 VKA; Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Das Signifikanzniveau ist angegeben).

Da unsere *in vitro* Versuche eine vermehrte Plättchenadhäsion und Thrombusformation unter Dabigatran zeigten, fragten wir uns, ob diese Ergebnisse auch auf die Entstehung einer arteriellen Thrombose *in vivo* übertragen werden können. Wir untersuchten deshalb die Thrombusformation und -stabilität in zwei verschiedenen murinen arteriellen Thrombosemodellen.

Den Wildtyp-Mäusen wurde hierfür 30 Minuten vor Versuchsbeginn eine Einmaldosis Dabigatran etexilate (37,5 mg/kg KG) über eine Magensonde verabreicht. Die Dabigatrandosierung wurde dabei Bezug nehmend auf eine Arbeit von Lauer et al. so gewählt, dass eine aPTT Verlängerung erreicht wurde, wie sie in Dabigatran-behandelten Patienten beobachtet wird (115). VKA-behandelten Tieren wurde eine gewichtsadaptierte Dosis Marcumar von 2 mg/kg KG am ersten und 1,5 mg/kg KG am zweiten Tag analog zur Dabigatrangabe über eine Magensonde appliziert. Kontrolltiere wurden mit einer alleinigen Gabe der Lösungssubstanz DMSO (1 % in steriler, physiologischer Kochsalzlösung) vorbehandelt.

Um die gerinnungshemmende Wirkung von Dabigatran zu messen, bestimmten wir 30 Minuten nach der Wirkstoffgabe die aPTT. Wie bereits in früheren Studien (115) gezeigt werden konnte, war die aPTT in der Dabigatrangruppe mit $61,3 \pm 18,9$ Sekunden im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $25,1 \pm 5,5$ Sekunden deutlich verlängert (Abbildung 4A). Eine Behandlung mit VKA führte dagegen zu einem zu erwartenden Anstieg der INR-Werte (Abbildung 4B).

Abbildung 4:



Abbildung 4: (A) Die aPTT der Wildtyp-Mäuse wurde 30 min nach Einmalgabe von Dabigatran (37,5 mg/kg KG) beziehungsweise der Lösungssubstanz DMSO (1 %) bestimmt (n = 9 Dabigatran, n = 10 DMSO; Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler). (B) Die INR-Werte wurde nach Einmalgabe von Dabigatran (37,5 mg/kg KG) beziehungsweise einer zweitägigen Behandlung mit VKA gemessen (n = 3 Dabigatran, n = 3 VKA; Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler).

Um den Einfluss von Dabigatran auf die initialen Phasen der arteriellen Thrombose zu untersuchen, analysierten wir die Thrombozytenrekrutierung und -adhäsion in einem Carotis-Ligatur-Modell. Nach fünfminütiger Ligatur der Arteria Carotis wurden die Adhäsion und Aggregation der DCF-markierten Thrombozyten im Bereich der Endothelläsion über einen Zeitraum von 60 Minuten intravitalmikroskopisch beobachtet und quantifiziert. Die Zahl der adhärenen Plättchen an der Läsionsstelle wurde als Prozentsatz der adhärenen Plättchen der mit Dabigatran-behandelten Tiere zum Fünf-Minuten-Zeitpunkt angegeben. Im Vergleich zu DMSO-Kontrolltieren zeigten Dabigatran-behandelte Mäuse zwar eine ähnliche Plättchenadhäsion (Abbildung 5A und B), allerdings war die Aggregatbildung nach 15 Minuten signifikant ($21,3 \pm 5,6$ % versus $13,0 \pm 9,4$ % in Dabigatran- versus Kontrolltieren; $p < 0,05$) und zu allen späteren Zeitpunkten leicht erhöht (Abbildung 5A und C).

Abbildung 5:

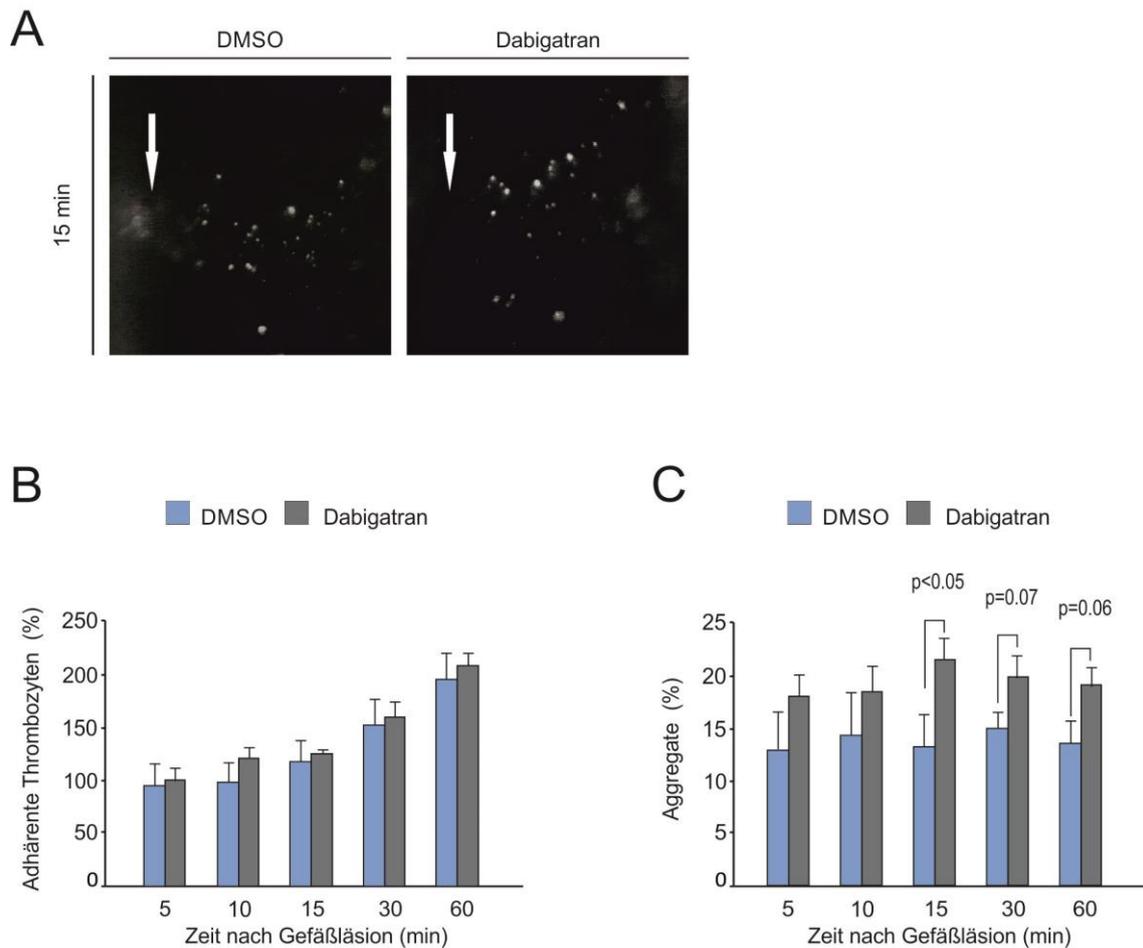


Abbildung 5: 30 min nach Applikation von Dabigatran (37,5 mg/kg) oder der Lösungssubstanz DMSO (1 %) wurde die Arteria Carotis communis der Wildtyp-Mäuse für einen Zeitraum von 5 min ligiert. (A) Repräsentative Bilder 15 min nach Ligatur der Arteria Carotis communis werden gezeigt, wobei der Pfeil die Richtung des Blutflusses angibt. Thrombozytenadhäsion (B) und –aggregation (C) an der Läsionsstelle wurden intravitalmikroskopisch beobachtet und zu den angegebenen Zeitpunkten dargestellt (n = 9 Dabigatran, n = 9 DMSO; Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler in Prozent der gemessenen Werte von Dabigatran-behandelten Tieren zum Fünf-Minuten-Zeitpunkt. Das Signifikanzniveau ist angegeben).

Um den Einfluss von Dabigatran auf die späteren Phasen der arteriellen Thrombose zu untersuchen, führten wir eine Endothelzelldenudation mittels Drahtmodell in der Arteria Carotis communis durch. Dieses Modell, bei dem ein flexibler Draht in das Gefäß eingeführt und mehrmals rotiert wird, führt zu einem umfassenden Endothelschaden mit Beteiligung tieferliegender Gewebsschichten wie Tunica intima und Tunica media. Dabei kommt es in

Kontrolltieren zu einem sofortigen thrombotischen Verschluss des Gefäßes, der sich im Laufe der Zeit wiedereröffnet.

Die Zeit bis zur Rekanalisation des Gefäßes mit Wiedereinsetzen des Blutflusses wurde zu den angegebenen Zeitpunkten kontrolliert. Während sich bei allen DMSO-Kontrolltieren (n = 6) der Blutfluss nach spätestens 15 Minuten wieder einstellte, zeigte nur eine von neun Dabigatran-behandelten Mäusen eine Wiedereröffnung des Gefäßes innerhalb von 30 Minuten nach Endothelläsion. Wie schon in Mäusen, die mit Heparin behandelt wurden (119), konnte auch in VKA-antikoagulierten Tieren (n = 3) kein vollständiger thrombotischer Gefäßverschluss beobachtet werden (Abbildung 6).

Abbildung 6:

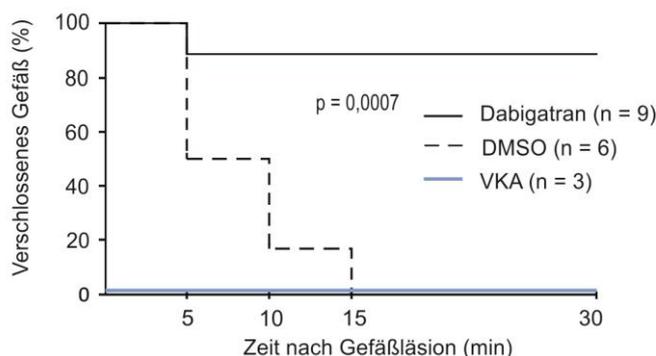


Abbildung 6: 30 min nach Dabigatran (37,5 mg/kg KG) oder DMSO (1 %) Applikation beziehungsweise nach zweitägiger Behandlung mit VKA wurde in der Arteria Carotis communis der Wildtyp-Mäuse eine Endotheldenudation mittels Drahtmodell durchgeführt. Das Wiedereinsetzen des Blutflusses in dem initial verschlossenen Gefäß wurde intravitalmikroskopisch beobachtet und ist in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (n = 9 Dabigatran, n = 3 VKA, n = 6 DMSO. Das Signifikanzniveau zwischen Dabigatran- und DMSO-behandelten Tieren ist angegeben).

Zusammenfassend konnten wir *in vitro* und in zwei verschiedenen arteriellen Thrombosemodellen *in vivo* zeigen, dass eine Therapie mit Dabigatran zu einer vermehrten Thrombusformation und einer erhöhten Thrombusstabilität führt. Im direkten Vergleich scheint Dabigatran einen geringeren antikoagulatorischen Effekt auszuüben als Vitamin-K-Antagonisten.

4.4 THROMBUSFORMATION AUF HUMANEM PLAQUEMATERIAL

Um die klinische Relevanz unserer bisherigen Ergebnisse zu untersuchen und den *in vivo* ablaufenden Pathomechanismen der arteriellen Thrombose in Patienten möglichst nahe zu kommen, analysierten wir die Plättchenadhäsion und Thrombusformation auf humanem Plaquematerial unter arteriellen Flussbedingungen.

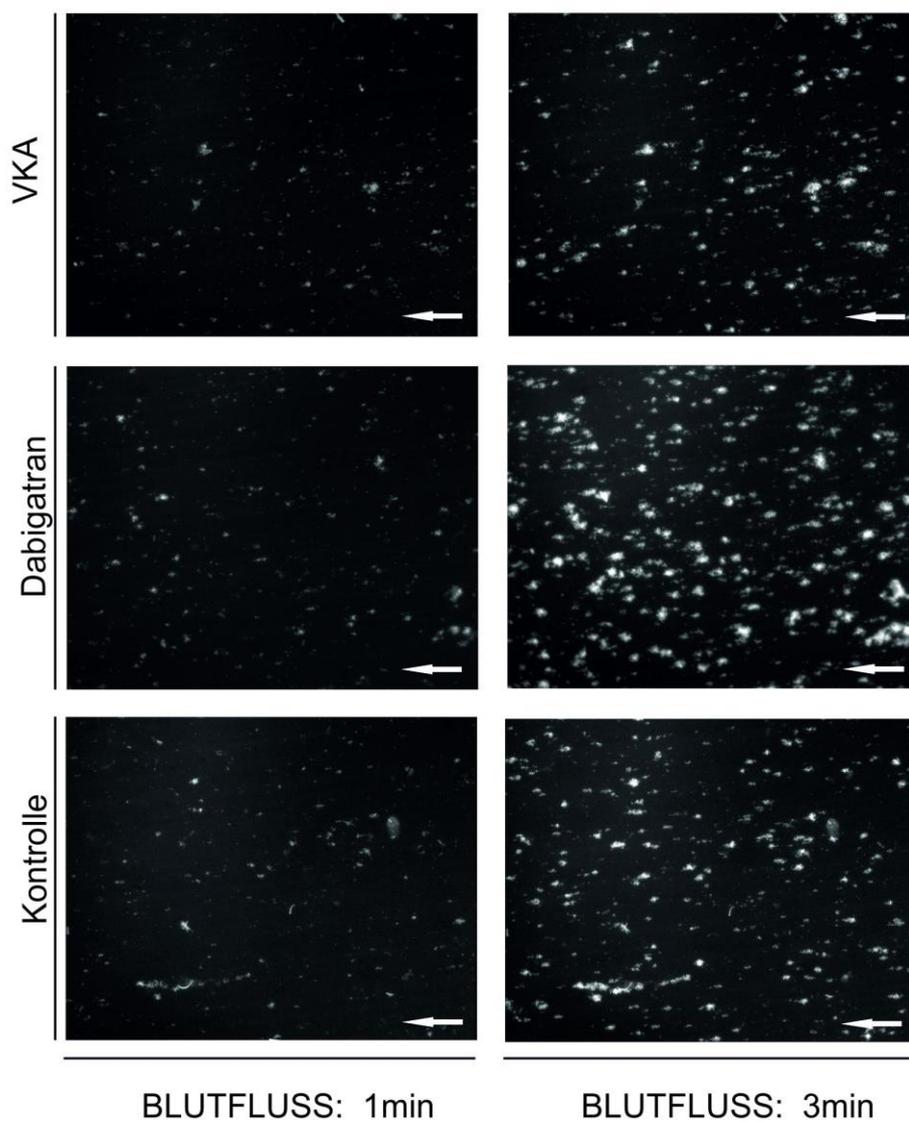
Wir verwendeten hierfür atherosklerotische Plaques, die Patienten mit hochgradiger Carotisstenose durch Endarteriektomie im Ganzen entnommen wurden. Ein Pool von fünf Patienten wurde homogenisiert und auf Glascoverslips aufgetragen. Das verwendete Plaquematerial besteht aus einer Vielzahl verschiedener Matrixproteine, die im Menschen durch Plaqueruptur freigelegt werden und in einem zweistufigen Mechanismus zur arteriellen Thrombose führen (110). In diesem Modell initiiert die Freisetzung von hoch thrombogenen subendothelialen Matrixproteinen wie vWF, Tissue Factor und Kollagen die Plättchenrekrutierung und –adhäsion. Darauf folgend kommt es über im Plaquematerial gebundenen Tissue Factor zur Bildung von Thrombin und Fibrin (110, 113, 120).

Nach Perfusion von Rhodamin-gefärbtem Vollblut unter arteriellen Wandscherraten von 1000 /s durch die Plaque-beschichteten Flusskammern, fand sich nach einer Minute Fluss eine ähnliche Oberflächendeckung im Blut von Dabigatran- oder VKA-behandelten Patienten und gesunden, nicht-behandelten Kontrollen (Abbildung 7A und B). Jedoch konnten wir nach drei Minuten Fluss im Blut von Dabigatran-behandelten Patienten im Vergleich zu Blut von VKA-Patienten oder Kontrollen eine signifikant verstärkte Oberflächendeckung beobachten (Abbildung 7A und C). Zur Kompensation von Unterschieden in der Plättchenadhäsion und Thrombusformation, die am ehesten auf Unterschieden im Plauecoating beruhen (112), erfolgte eine separate Darstellung. Wie Abbildung 7D zeigt, war die Oberflächendeckung bei Dabigatran-behandeltem Blut auf jedem Plauecoating deutlich höher als die Adhäsion von VKA-Patienten und gesunden Kontrollen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass Dabigatran die Plättchenadhäsion und Thrombusformation auf humanem Plaquematerial weniger effektiv hemmt als VKA. Im Vergleich zu Blut von gesunden, nicht behandelten Kontrollen fand sich sogar eine Zunahme der Plättchenadhäsion und Thrombusbildung, was wir als prothrombotische Wirkung interpretieren.

Abbildung 7:

A



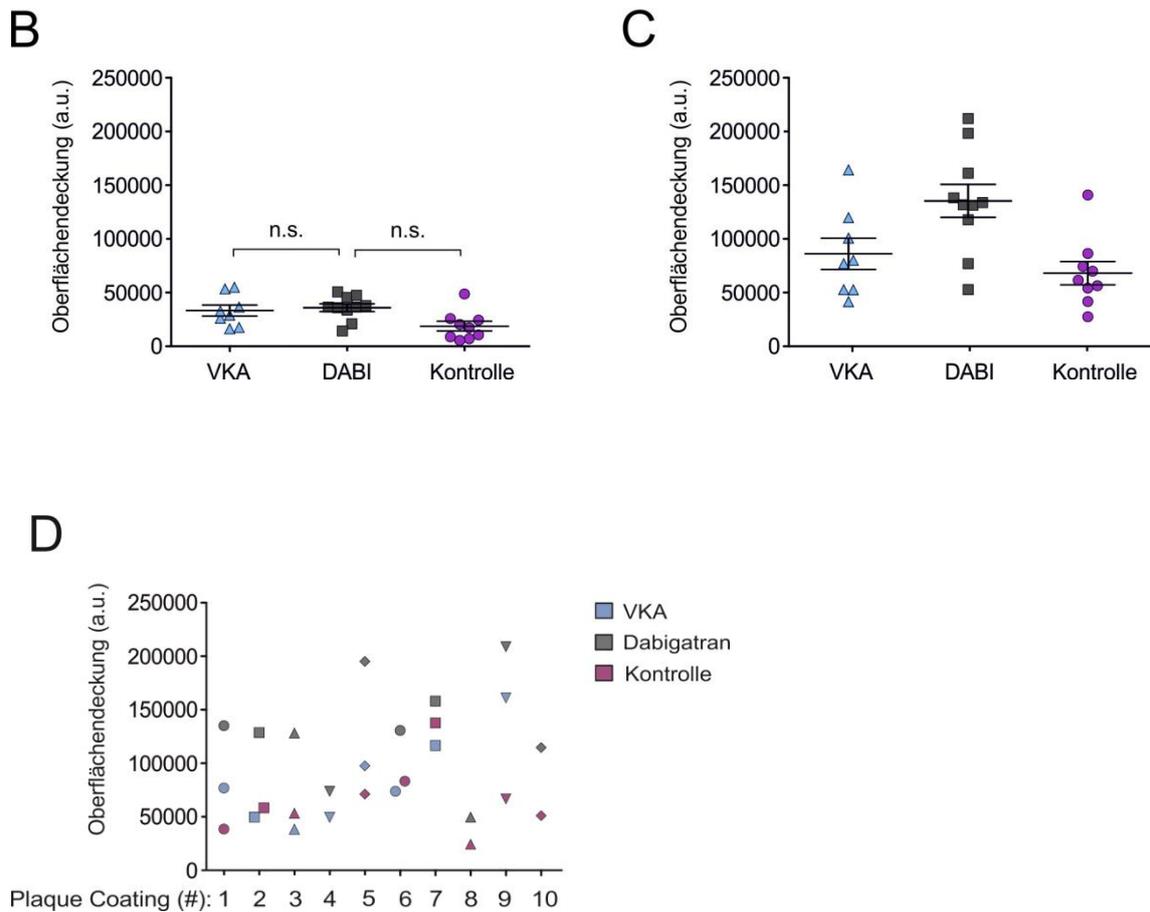


Abbildung 7: Blut von Dabigatran- oder VKA-behandelten Patienten und gesunden, nicht-behandelten Kontrollen wurde mit einer arteriellen Wandscherrate von 1000 /s für 1 min oder 3 min durch eine Flusskammer perfundiert, die mit humanem Plaquematerial beschichtet wurde. (A) Repräsentative Bilder werden gezeigt. Der abgebildete Pfeil (120 μ m) zeigt die Flussrichtung an. Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation nach 1 min (B) beziehungsweise 3 min (C) Blutfluss wurden als Gesamtoberflächendeckung in arbiträren Einheiten (a .u.) analysiert, wobei jedes Symbol ein Individuum darstellt (n = 10 Dabigatran, n = 8 VKA, n = 9 Kontrolle; Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Das Signifikanzniveau ist angegeben). (D) Die Thrombusbildung nach 3 min Blutfluss wurde nach Plaquecoating aufgetragen, um Unterschiede in der Plaquezusammensetzung zu kompensieren.

4.5 GERINNUNG UNTER DABIGATRAN

Um einen möglichen Mechanismus für die beobachteten prothrombotischen Effekte zu untersuchen, erfolgte die Analyse des Gerinnungssystems. In früheren Studien konnte eine vermehrte Thrombinentstehung unter Dabigatran gezeigt werden (99). Um die Relevanz dieser Beobachtung in unserem Setup zu prüfen, wurde die Thrombinbildung im Blut von VKA- und Dabigatran-behandelten Patienten unter statischen Bedingungen (n = 10 Dabigatran, n = 15 VKA) verglichen.

Bei der proteolytischen Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin entstehen die Prothrombinfragmente 1 und 2 (F1 + 2). Durch einen Enzymimmunoassay wurden diese Fragmente quantifiziert und zur indirekten Thrombinbestimmung herangezogen. Im Vergleich zu VKA-Patienten, in deren Plasmen durchschnittlich $52,33 \pm 4,23$ pmol/l F1 + 2 nachgewiesen wurde, fanden wir im Blut von Dabigatran-Patienten mit $132,10 \pm 14,04$ pmol/l deutlich höhere F1 + 2 Werte ($p < 0,0001$; Abbildung 8A).

Zudem erfolgte die Quantifizierung der Thrombin/Antithrombin III – Komplexe (TAT) im Plasma. Antithrombin III ist ein wichtiger physiologischer Gerinnungshemmer, der Thrombin durch Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes inaktiviert. Da im Plasma der Großteil des gebildeten Thrombins an Antithrombin III gebunden ist, ermöglicht die Quantifizierung der TAT-Komplexe einen Rückschluss auf die Menge des ursprünglich gebildeten Thrombins. Im Vergleich zu VKA-Patienten konnten im Blut von Dabigatran-behandelten Patienten ebenfalls deutlich, wenn auch nicht signifikant erhöhte TAT-Werte gemessen werden (Abbildung 8B).

Im nächsten Schritt wurden die Thrombinproteinlevel im Plasma mittels Immunoblotting bestimmt. Während die Thrombinproteinlevel im Blut von Dabigatran-behandelten Patienten und gesunden Kontrollen unter statischen Bedingungen ähnlich hoch waren (Abbildung 8C), fanden wir im Blut von VKA-Patienten eine bis zu 80-prozentige Verminderung der Thrombinproteinlevel (Abbildung 8D). Diese Beobachtung kann durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen der beiden Antikoagulantien erklärt werden. Während VKAs die Synthese der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren hemmen und so

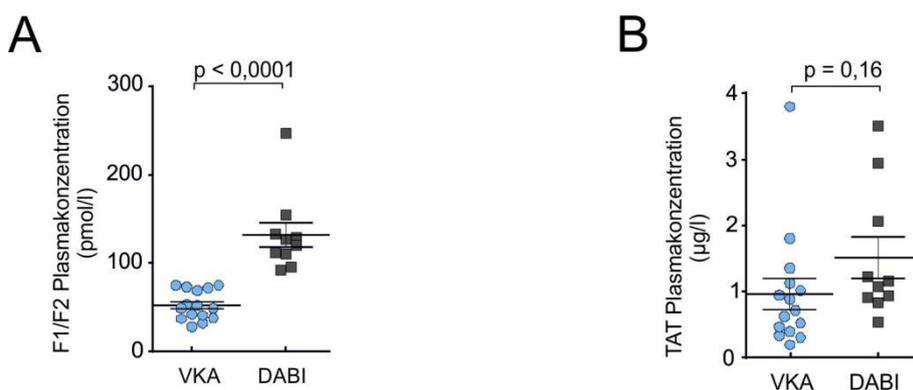
die Entstehung von Thrombin vermindern (55), inhibiert Dabigatran Thrombin direkt, indem es an das katalytische Zentrum des Moleküls bindet (81).

Anschließend untersuchten wir nach dem Sandwich-ELISA-Verfahren, ob die vermehrte Verfügbarkeit von Thrombin unter Dabigatran im Vergleich zu VKA mit einer erhöhten enzymatischen Aktivität von Thrombin verbunden ist. In einem Oligobind® Thrombin activity assay, in dem die Fluoreszenzveränderung eines fluorogenen Thrombinsubstrats mit der Thrombinaktivität korreliert, konnten allerdings keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 8E).

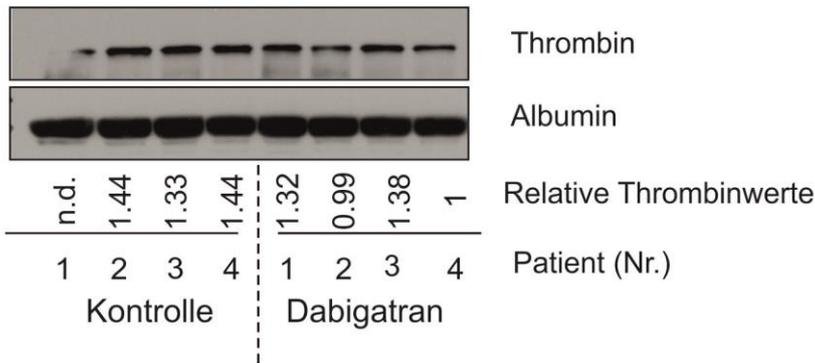
Da eine erhöhte koagulatorische Aktivität mit einer verstärkten fibrinolytischen Aktivität einhergeht, bestimmten wir zudem die D-Dimerlevel im Plasma. In beiden Patientengruppen konnten gleichermaßen niedrige Werte festgestellt werden (Abbildung 8F).

Diese Versuche zeigen, dass eine dauerhafte Antikoagulation mit Dabigatran im Vergleich zu VKA mit einer vermehrten Verfügbarkeit von Thrombin einhergeht. Jedoch zeigt sich keine erhöhte Thrombinaktivität oder verstärkte Gerinnungsantwort.

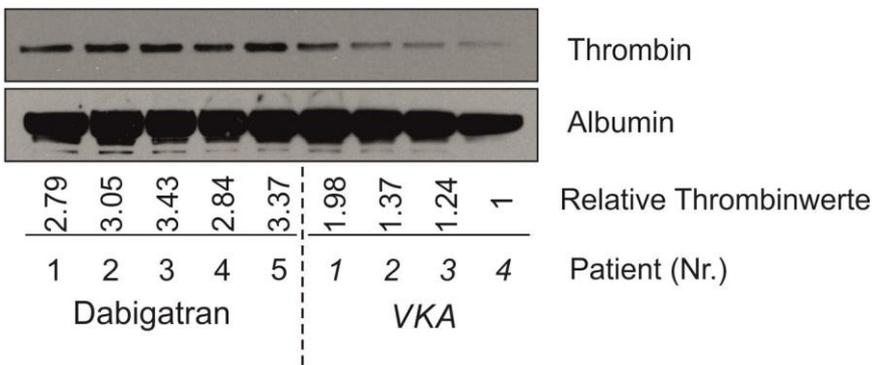
Abbildung 8:



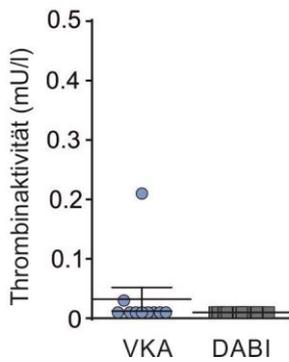
C



D



E



F

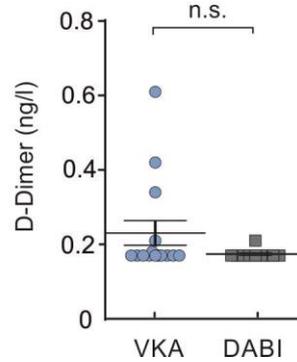


Abbildung 8: (A) Prothrombinfragmente 1 und 2 (F1 + 2) und (B) Thrombin-Antithrombin III Komplexe (TAT) wurden mit Hilfe eines Enzymimmunoassays quantifiziert. Jedes Symbol repräsentiert ein Individuum (n = 10 Dabigatran, n = 15 VKA. Das Signifikanzniveau ist angegeben). Thrombinplasmalevel wurden mittels Immunoblotting analysiert und die relativen Thrombinwerte werden gezeigt. (C) Daten von Dabigatran-behandelten Patienten werden im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollen (n = 3 Dabigatran, n = 3 Kontrolle) und (D) zu VKA-behandelten Patienten gezeigt (n = 10 Dabigatran, n = 14 VKA). (E) Die Thrombinaktivität wurde mittels ELISA analysiert und die D-Dimer Werte wurden bestimmt (F), wobei jedes Symbol ein Individuum repräsentiert (n = 10 Dabigatran, n = 15 VKA).

4.6 ROLLE DER GPI β A-THROMBIN INTERAKTION UNTER DABIGATRAN AUF DIE THROMBOZYTENADHÄSION UND THROMBUSBILDUNG

Da unsere Versuche zeigten, dass die Thrombinbildung effektiver durch Vitamin-K-Antagonisten als durch Dabigatran gehemmt wird, wurde als nächstes untersucht, ob die erhöhte Thrombinverfügbarkeit zu einer Veränderung in der Thrombin-Plättchen Interaktion führt.

Thrombozyten exprimieren verschiedene Thrombinrezeptoren auf ihrer Oberfläche. Primär sind hier die beiden G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptoren PAR-1 und PAR-4 zu nennen (121). Die Serinprotease Thrombin bindet an die PAR-Rezeptoren und spaltet die N-terminale Exodomäne des Rezeptors. Hierdurch entsteht ein neuer N-Terminus, der als Rezeptor-eigener Ligand zur intramolekularen Aktivierung des PAR-Rezeptors führt und so eine vollständige Plättchenaktivierung auslöst (122). Da eine PAR-vermittelte Plättchenaktivierung enzymatisch aktives Thrombin benötigt und Dabigatran Thrombin durch Bindung an das katalytische Zentrum hemmt (81), ist eine vermehrte PAR-vermittelte Thrombin-Plättchen Interaktion als mögliche Ursache für die beobachtete prothrombotische Wirkung von Dabigatran unwahrscheinlich.

Ein weiterer essentieller Thrombinrezeptor auf der Plättchenoberfläche ist das Glykoprotein GPI β α , das zusammen mit GPI β β , GPV und GPIX den von-Willebrand-Faktor Rezeptor bildet, der die initiale Plättchenrekrutierung und -adhäsion einleitet (73). Thrombin bindet dabei unabhängig von seiner katalytischen Aktivität an die N-terminale extrazelluläre Domäne des GPI β α und führt über intrazelluläre Rho-assoziierte, GTPase abhängige Signalwege zur Thrombozytenaktivierung (123, 124). In der Tat führte eine Blockade der GPI β -vWF Interaktion durch den anti-GPI β 6B4 Antikörper (5 μ g/ml) zu einer drastischen Reduktion der Plättchenadhäsion und Thrombusformation auf humanem Plaquematerial im Blut von gesunden, nicht behandelten Kontrollen (Abbildung 9).

Abbildung 9:

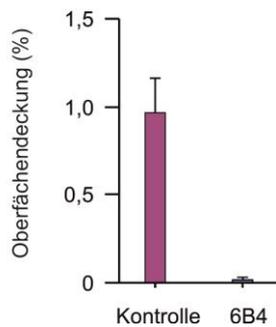


Abbildung 9: Blut von gesunden, nicht behandelten Kontrollen wurde nach Zugabe von Anti-GPIb 6B4 (5 µg/ml) Antikörper mit einer arteriellen Wandscherrate von 1000 /s für 3 min durch eine mit Plaquematerial beschichtete Flusskammer perfundiert. Die mit Thrombusmaterial bedeckte Oberfläche wurde als prozentualer Anteil der Gesamtfläche angegeben (n = 3 Kontrolle, n = 5 6B4 Antikörper. Der Graph zeigt den Mittelwert ± Standardfehler).

In zwei verschiedenen Ansätzen *in vivo* wurde eine mögliche GPIb α -Abhängigkeit der prothrombotischen Wirkung von Dabigatran untersucht. Zunächst wurden IL4R/GPIb α tg chimäre Mäuse durch adoptiven Knochenmarkstransfer generiert. Die Thrombozyten der IL4R/GPIb α tg chimären Mäusen exprimieren statt der extrazellulären Domäne des Glykoproteins GPIb α die extrazelluläre Domäne des humanen IL-4 Rezeptors. Wie bereits beschrieben (114), zeigen die Tiere normale Thrombozytenzahlen und –volumina. Unabhängig davon, ob diese Tiere mit Dabigatran oder DMSO behandelt wurden, konnte nach Endotheldenudation mittels Drahtmodell kein thrombotischer Gefäßverschluss beobachtet werden (Abbildung 10).

In einem zweiten *in vivo* Ansatz wurde C57BL/6 Wildtyp-Mäusen 30 Minuten nach Dabigatran beziehungsweise DMSO Applikation 2,5 mg/kg KG Xia.B2 Anti-GPIb α Fab Fragmente (116) zur Inhibierung der vWF-GPIb α Interaktion intravenös verabreicht. Nach Endotheldenudation mittels Drahtmodell konnte auch hier kein Gefäßverschluss festgestellt werden (Abbildung 10). Nach Gabe eines Fab Isotyp-Fragments zeigte sich ein regulärer Gefäßverschluss nach Induktion der Endothelläsion.

Diese Daten zeigen, dass Dabigatran seine prothrombotische Wirkung nur in Gegenwart eines funktionsfähigen Glykoproteins GPIIb α auf der Thrombozytenoberfläche ausüben kann.

Abbildung 10:

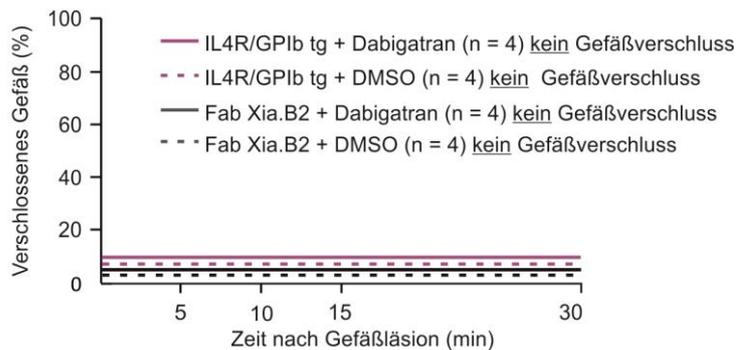


Abbildung 10: 30 min nach Dabigatran (37,5 mg/kg KG) oder DMSO (1 %) Applikation wurde in der Arteria Carotis communis der IL4R/GPIIb tg chimären Mäuse eine Endothelzelldenudation mittels Drahtmodell durchgeführt. Keine okklusive Thrombusbildung konnte beobachtet werden (n = 4 Dabigatran, n = 4 DMSO). Wildtyp-Mäusen wurde 30 min nach Dabigatran beziehungsweise DMSO Applikation 2,5 mg/kg KG Xia.B2 Anti-GPIIb α Fab Fragmente zur Inhibierung der vWF-GPIIb α Interaktion intravenös verabreicht. Auch hier konnte nach Endothelzelldenudation mittels Drahtmodell kein Gefäßverschluss beobachtet werden (n = 4 Dabigatran, n = 4 DMSO).

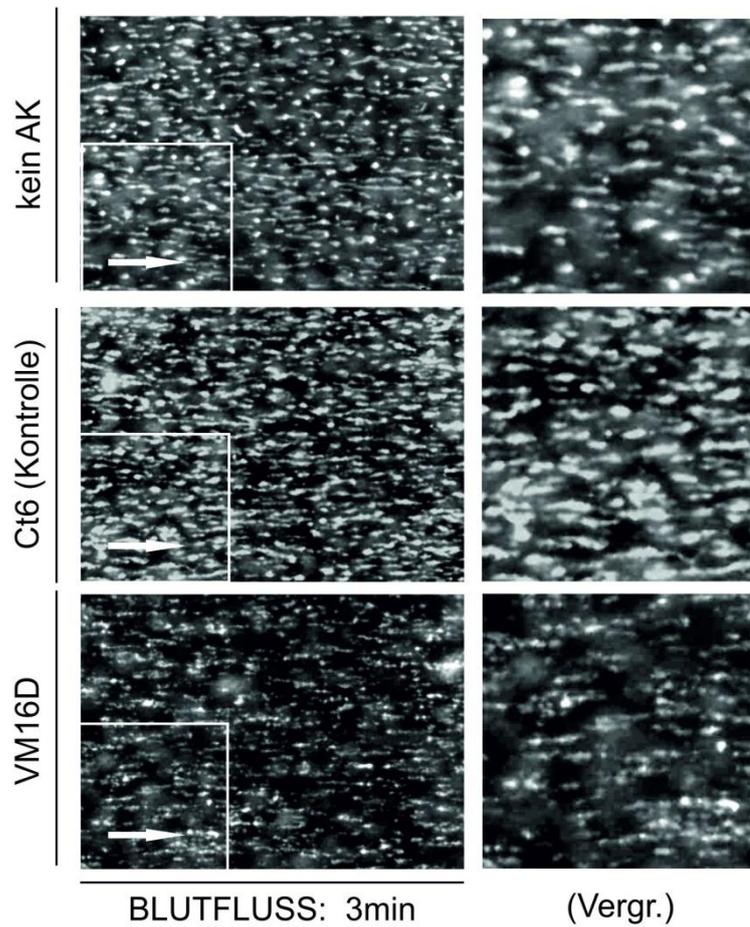
Wie Dubois et al. zeigen konnten, löst die Thrombin-GPIIb α Interaktion auch in Plättchen, deren PAR-1 und PAR-4 Rezeptoren inhibiert wurden, eine Plättchenaktivierung aus. Interessanterweise stimuliert eine Bindung von Thrombin an das Glykoprotein GPIIb α dabei auch unabhängig von der Bindung von vWF die Plättchenaggregation. Durch eine Aktivierung der Rho-Kinase p160ROCK sowie einer MEK-1 Phosphorylierung kommt es zu einem Formwandel („shape change“) der Thrombozyten. (124).

Wir untersuchten deshalb, ob die Interaktion von GPIIb α und Thrombin direkt an der prothrombotischen Wirkung von Dabigatran beteiligt ist und führten nach Zugabe von 20 μ g/ml Anti-GPIIb α VM16D Antikörper mit dem Blut von Dabigatran- oder VKA-behandelten Patienten erneut Flusskammerversuche

durch. Dieser Antikörper blockiert bei niedrigen Thrombinkonzentrationen mit einer Aktivität von unter 0,05 U/ml spezifisch die GPIIb/IIIa-Thrombin Interaktion, ohne dabei die GPIIb/IIIa-vWF Bindung zu stören (125). In Gegenwart von VM16D, jedoch nicht von CT6 Isotyp Kontroll-Antikörpers konnte eine deutliche Reduktion der Plättchenadhäsion und Thrombusformation auf Kollagen beobachtet werden (Abbildung 11A-C).

Abbildung 11:

A



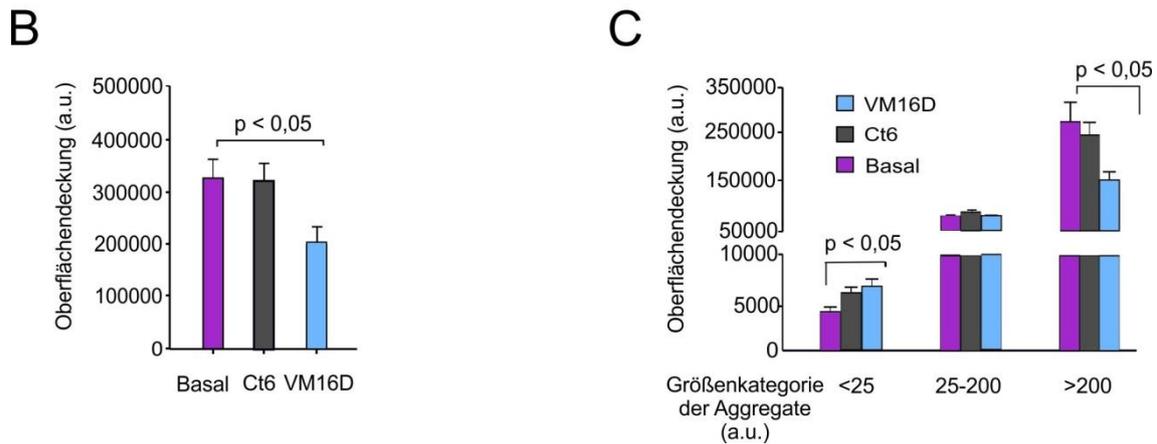


Abbildung 11: Blut von Dabigatran-behandelten Patienten wurde nach Zugabe von 20 µg/ml VM16D Anti-GPIIb/IIIa Antikörper oder 20 µg/ml Ct6 Kontroll-Antikörper mit einer arteriellen Wandscherrate von 1000 /s für 3 min durch eine Kollagen-beschichtete Flusskammer perfundiert. (A) Repräsentative Bilder werden gezeigt, wobei der abgebildete Pfeil (140 µm) die Richtung des Flusses angibt. Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation wurden als Gesamtoberflächendeckung (B) und als Oberflächendeckung bezogen auf die verschiedenen Größenkategorien der Aggregate (C) in arbiträren Einheiten (a.u.) analysiert (n = 8 VM16D, n = 6 Ct6, n = 10 basal; Die Graphen zeigen den Mittelwert ± Standardfehler. Das Signifikanzniveau ist angegeben).

Auf humanem Plaquematerial fand sich in Gegenwart des VM16D Antikörpers interessanterweise nur in Blut von Dabigatran-behandelten Patienten, nicht jedoch von VKA-Patienten, eine signifikante Verminderung der Plättchenadhäsion und Thrombusformation (Abbildung 12A und B). Unterschiede in der GPIIb/IIIa-Oberflächenexpression zwischen den beiden Gruppen konnten hierbei mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen ausgeschlossen werden (Abbildung 12C). Diese Versuche zeigen, dass die erhöhte Thrombinverfügbarkeit im Blut von Dabigatran-behandelten Patienten über eine Interaktion von GPIIb/IIIa und Thrombin zu dem beobachteten Anstieg an Plättchenadhäsion und Thrombusformation beitragen.

Abbildung 12:

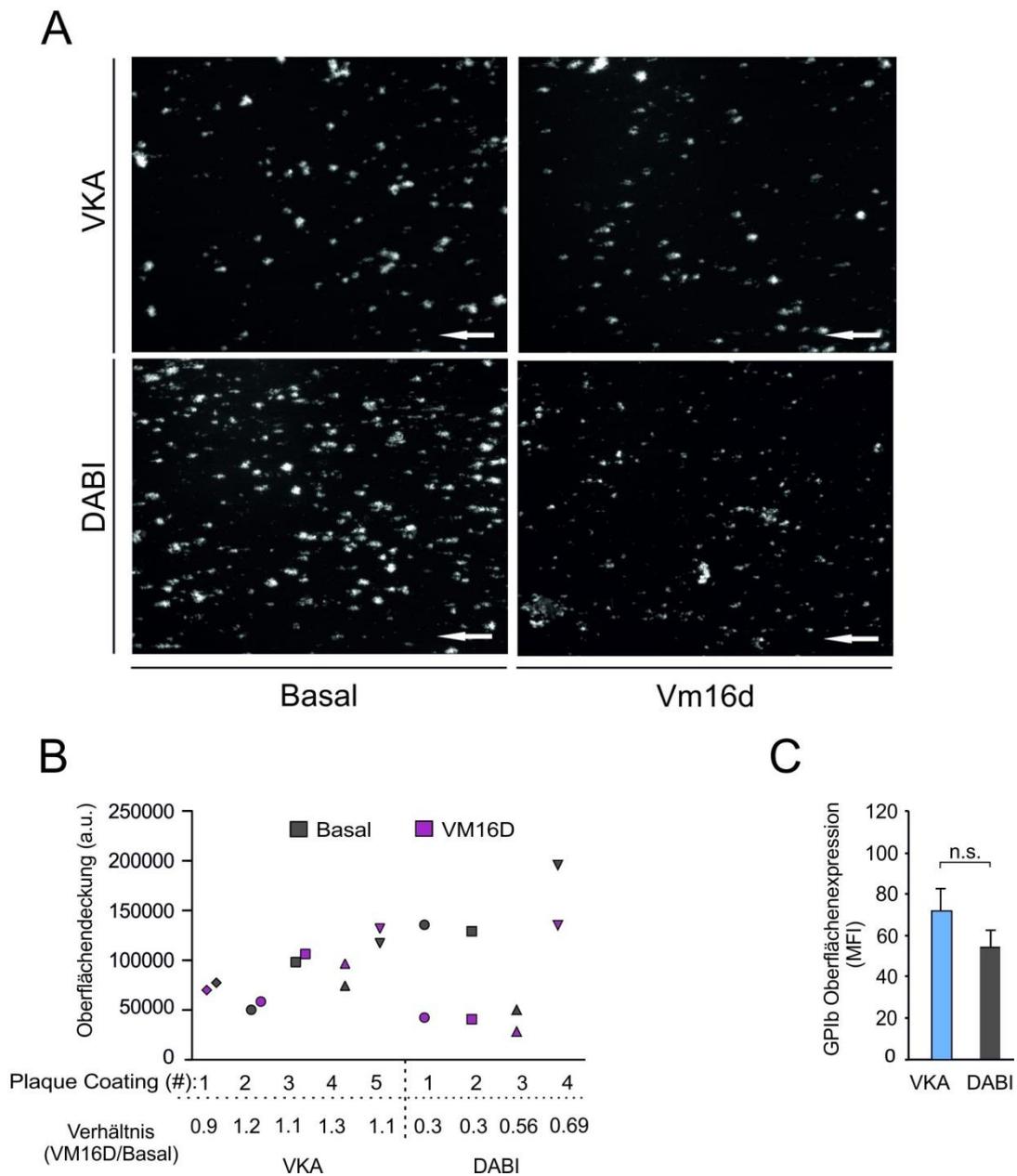


Abbildung 12: Blut von Dabigatran- oder VKA-behandelten Patienten wurde nach Zugabe von 20 $\mu\text{g/ml}$ VM16D Anti-GPIIb/IIIa Antikörper mit einer arteriellen Wandscherrate von 1000 /s für 3 min durch eine Flusskammer perfundiert, die mit humanem Plaquematerial beschichtet wurde. (A) Repräsentative Bilder nach 3 min Blutfluss werden gezeigt, wobei der abgebildete Pfeil (120 μm) die Richtung des Flusses angibt. (B) Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation wurden als Gesamtoberflächendeckung in arbiträren Einheiten (a.u.) analysiert und werden von den individuellen Patienten gezeigt. Das Verhältnis Oberflächendeckung nach VM16D-Zugabe/Oberflächendeckung ohne Antikörper Zugabe wird angegeben (n = 4 Dabigatran, n = 5 VKA). (C) Die GPIIb/IIIa-Oberflächenexpression wurde in verdünntem Vollblut von Dabigatran- und VKA-behandelten Patienten durchflusszytometrisch bestimmt (n = 13 Dabigatran, n = 14 VKA). Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Das Signifikanzniveau ist angegeben).

Im Einklang dazu hat Hirudin, ein direkter bivalenter Thrombininhibitor, der die katalytische Aktivität des Enzyms hemmt, keinen Einfluss auf die prothrombotische Wirkung von Dabigatran. Nach Zugabe von 26 µg/ml Hirudin in Dabigatranblut fanden sich keine Unterschiede in der Thrombusbildung (Abbildung 13A). Ähnliche Ergebnisse fanden sich für Kontrollblut in Gegenwart von Hirudin oder PAR-1 Antagonisten (SCH79797; 2,5 µM; Abbildung 13B; Die hier vorgestellten Daten wurden von Janina Jamasbi, Labor Professor Siess in München, generiert und dürfen hier freundlicherweise vorgestellt werden.)

Abbildung 13:

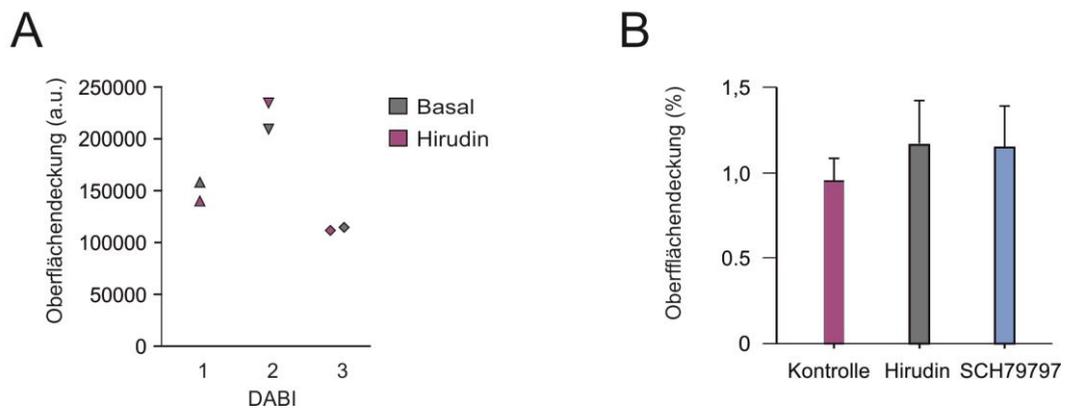


Abbildung 13: (A) Blut von Dabigatran-behandelten Patienten wurde nach Zugabe von 26 µg/ml Hirudin mit einer arteriellen Wandscherrate von 1000 /s für 3 min durch eine Flusskammer perfundiert, die mit humanem Plaquematerial beschichtet wurde. Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation wurden als Gesamtoberflächendeckung in arbiträren Einheiten (a.u.) analysiert und werden von den individuellen Patienten gezeigt (n = 3). (B) Blut von gesunden, nicht behandelten Kontrollen wurde nach Zugabe von 26 µg/ml Hirudin oder 2,5 µM PAR-1 Antagonist SCH79797 mit einer arteriellen Wandscherrate von 1000 /s für 3 min durch eine Flusskammer perfundiert, die mit humanem Plaquematerial beschichtet wurde. Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung wurde als prozentualer Anteil der Gesamtoberfläche angegeben. (Die hier vorgestellten Daten wurden von Janina Jamasbi, Labor Professor Siess in München, generiert und dürfen hier freundlicherweise vorgestellt werden.)

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse, dass eine vermehrte GPIIb/IIIa-Thrombin Interaktion, nicht jedoch katalytisch aktives Thrombin zu dem unter Dabigatran beobachteten Anstieg an Fluss-induzierter Plättchenadhäsion und Thrombusformation beiträgt.

5 DISKUSSION

5.1 PLÄTTCHENAKTIVITÄT UNTER DABIGATRAN

In mehreren randomisierten klinischen Studien zeigte sich ein signifikanter Anstieg an Herzinfarkten bei Patienten unter Dabigatrantherapie (66, 87-93). Bis jetzt ist nicht klar, ob diese Beobachtung dem Zufall geschuldet ist oder, ob Dabigatran tatsächlich eine prothrombotische Wirkung auf Thrombozyten ausübt. In unserer Studie wurden insgesamt 73 Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern/-flattern, die infolgedessen unter oraler Antikoagulation mit Dabigatran (2 x 150 mg) oder INR-adaptierter VKA Therapie sind, eingeschlossen. Mittels Impedanzaggregometrie und durchflusszytometrischen Versuchen wurde die Plättchenfunktion in Ruhe- und unter Flussbedingungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Dabigatran keinen Effekt auf die Thrombozytenaktivität und -aggregation unter statischen Bedingungen hat. Unter Flussbedingungen konnten wir *in vitro* sowohl auf Kollagen als auch auf humanem Plaquematerial eine vermehrte Plättchenadhäsion und Thrombusformation in Blut von Dabigatran-behandelten Patienten im Vergleich zu VKA Patienten oder gesunden Kontrollen feststellen. Auch in Mäusen, die mit Dabigatran behandelt wurden, zeigte sich in zwei verschiedenen Modellen der arteriellen Thrombose eine vermehrte Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung. Wir konnten zeigen, dass die verstärkte Fluss-induzierte Thrombusformation unter Dabigatran durch eine erhöhte Verfügbarkeit von Thrombin verursacht wird, die mit einer vermehrten Interaktion von Thrombin mit dem GPIIb α -Rezeptor der Blutplättchen einhergeht.

5.2 VERSTÄRKTE THROMBUSFORMATION UNTER DABIGATRAN

5.2.1 EINFLUSS VON DABIGATRAN UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN

Als Auslöser des akuten Koronarsyndroms spielen Thrombozyten bei der Entstehung einer arteriellen Thrombose eine entscheidende Rolle. Zunächst wurde der Einfluss von Dabigatran auf die Plättchenfunktion unter statischen

Bedingungen untersucht. Nach Stimulation mit verschiedenen Thrombozytenagonisten, die die Thrombozytenaktivierung jeweils durch unterschiedliche Rezeptoren und Signalwege herbeiführen, stellten wir keine Unterschiede in der Thrombozytenaggregation oder –aktivierung in Blut von Dabigatran oder VKA Patienten fest. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten aus anderen Studien überein, in denen turbidimetrisch eine normale Thrombozytenaggregation (126, 127) und Thrombozyten-Leukozyten Aggregatbildung nach Stimulation mit ADP gefunden wurde (128).

5.2.2 EINFLUSS VON DABIGATRAN UNTER FLUSSBEDINGUNGEN

Als nächstes haben wir die Plättchenfunktion unter pathophysiologisch relevanteren Flussbedingungen, wie sie in den frühen Phasen der arteriellen Thrombose vorherrschen, analysiert.

Der initiale Auslöser für die Entstehung einer akuten arteriellen Thrombose ist der Verlust der Endothelintegrität durch die Erosion oder Ruptur eines atherosklerotischen Plaques. Die damit verbundene Exposition von hoch thrombogenen, extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen führt binnen Sekunden zur Thrombozytenrekrutierung. Die primäre Plättchenadhäsion erfolgt hierbei über eine Interaktion der GPIb(α) Komponente des Glykoproteinkomplexes GPIb-GPV-GPIX auf den Thrombozyten mit Kollagen-gebundenem vWF. Diese transiente Verbindung ermöglicht anderen Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche wie dem Glykoprotein GPVI oder den Integrinen α IIb β 3 und α 2 β 1 stabile Verbindungen mit den subendothelialen Matrixproteinen einzugehen (104, 120). Parallel dazu führt im Blut zirkulierender sowie im Plaque gebundener Tissue Factor zur Aktivierung der Gerinnung mit Bildung von Thrombin und Fibrin (129, 130).

Flusskammerversuche ermöglichen die Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen (110). Als Substrat für die Flusskammern wurde 250 μ g/ml fibrilläres Kollagen sowie humanes Plaquematerial verwendet, das Patienten mit hochgradiger Carotisstenose durch Endarteriektomie entnommen und homogenisiert wurde. Unter Flussbedingungen konnten wir eine beschleunigte

und signifikant vermehrte Plättchenadhäsion und Thrombusformation in Blut von Dabigatran-behandelten Patienten im Vergleich zu VKA Patienten oder gesunden Kontrollen feststellen. Der prothrombotische Effekt von Dabigatran auf die Thrombusformation auf Kollagen-beschichteten Flusskammern war eher moderat und verstärkt nach einer Minute Blutfluss zu beobachten. Auf humanem Plaquematerial zeigte sich dagegen ein stärkerer, aber zeitlich verzögerter Anstieg der Plättchenadhäsion und Thrombusformation in Dabigatran-behandeltem Patientenblut. Dieser Unterschied in der Kinetik und Ausprägung der prothrombotischen Wirkung von Dabigatran ist am ehesten durch die verschiedenen Mechanismen der Thrombozytenadhäsion, die in beiden Modellen vorherrschen, zu erklären. Die Plättchenadhäsion und Thrombusformation auf fibrillärem Kollagen wird vor allem über die Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin $\alpha 2\beta 1$ induziert. Das verwendete Plaquesomogenisat besteht dagegen sowohl aus dem lipidreichen Kern als auch der fibrösen Kapsel des atherosklerotischen Plaques. Es enthält somit eine Vielzahl thrombogener Substanzen und Matrixproteine (z.B. Kollagen, vWF, etc.), die bei der Entstehung der arteriellen Thrombose *in vivo* eine Rolle spielen (110). Wie Abbildung 9 zeigt, spielt GPIIb/IIIa für die Thrombusformation via vWF auf Plaquematerial eine bedeutende Rolle.

Ähnliche Ergebnisse fanden wir in zwei verschiedenen murinen Modellen der arteriellen Thrombose. Zunächst untersuchten wir die Thrombozytenadhäsion und -aggregation in einem Carotis-Ligatur-Modell. In diesem Modell führt eine fünfminütige Ligatur der Arteria Carotis zu einem Verlust der Endothelzellschicht und einer Freilegung der extrazellulären Matrixproteine, was eine sofortige Plättchenadhäsion und -aggregation auslöst. Dabigatran-behandelte Mäuse zeigten hier verglichen mit Kontrolltieren eine signifikant vermehrte Plättchenaggregation, jedoch keine Unterschiede in der Zahl der adhärenen Thromben. Zusätzlich wurde eine Endotheldenudation der Arteria Carotis mit Hilfe eines Angioplastiedrahtes durchgeführt. In diesem Modell wird durch Einführen eines flexiblen Drahtes in das Gefäßlumen ein umfassender Endothelschaden mit Beteiligung tieferliegender Gefäßschichten erzeugt. Dies löst einen sofortigen thrombotischen Verschluss des Gefäßes aus, der sich im Lauf der Zeit wiedereröffnet. Dabigatran-behandelte Tiere zeigten im Vergleich

zu Kontrolltieren eine deutlich erhöhte Thrombusstabilität. Unsere Daten widersprechen dabei den Ergebnissen von Ammollo et al. (131), die unter Dabigatran eine verminderte Thrombusstabilität und eine reduzierte Aktivität des Thrombin-aktivierbaren Inhibitor der Fibrinolyse (TAFI) beobachteten und damit verbunden eine erhöhte Empfindlichkeit der Thrombi gegenüber Fibrinolyse. Diese Daten wurden allerdings unter *in vitro* Bedingungen in plättchenarmen Plasma gewonnen und ihre Relevanz für die *in vivo* Situation ist daher nicht bekannt.

In unserer Studie zeigen wir einen prothrombotischen Effekt von Dabigatran, der möglicherweise den klinisch beobachteten Anstieg an Myokardinfarkten bei Patienten mit Vorhofflimmern und antikoagulatorischer Therapie mit Dabigatran erklärt. Unter arteriellen Flussbedingungen auf humanem atherosklerotischem Plaquematerial zeigt Dabigatran-behandeltes Patientenblut sowohl im Vergleich zu VKA-Blut als auch zu Blut von gesunden, nicht behandelten Kontrollen eine verstärkte Plättchenadhäsion und Thrombusformation. Damit übereinstimmend fanden wir in einem murinen Carotis-Denudationsmodell in Mäusen, die mit Dabigatran behandelt wurden, eine signifikant verstärkte Thrombusbildung und –stabilität verglichen zu Kontrolltieren. Zusammengefasst sprechen diese Daten für eine verstärkte thrombotische Wirkung von Dabigatran im Vergleich zu VKA und zu Kontrollen. Es kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine verminderte antithrombotische, antikoagulatorische Wirksamkeit von Dabigatran im Vergleich zu VKA zu dem beobachteten Anstieg an akuten Koronarsyndromen beiträgt. Für eine stärkere antikoagulatorische Wirksamkeit von VKA spricht die Tatsache, dass eine Antikoagulation mit Warfarin bei Patienten mit mechanischer Herzklappe besser vor thromboembolischen Komplikationen schützt als eine Therapie mit Dabigatran (132). Zudem wurden unter VKA-Therapie mehr schwere Blutungskomplikationen beobachtet als unter Dabigatran (92).

5.3 ROLLE DER GPIIb/IIIa-THROMBIN INTERAKTION

5.3.1 THROMBINBILDUNG UNTER DABIGATRAN

Analog zur RE-LY Studie verglichen wir die Wirkung von Dabigatran mit der von Vitamin-K-Antagonisten, die beide unterschiedliche pharmakodynamische Effekte auf das Gerinnungssystem ausüben. Als wir den Einfluss der Medikamente auf die Thrombinproteinlevel im Plasma untersuchten, fanden wir in Dabigatranblut deutlich höhere Werte als in Blut von VKA Patienten, nicht allerdings im Vergleich zu gesunden, nicht-behandelten Kontrollen. VKA hemmen die Vitamin-K-abhängige Synthese der Gerinnungsfaktoren VII, IX, X und Thrombin, indem sie die Vitamin-K-Epoxid-Reduktase inhibieren. Hierdurch verzögern sie den Beginn der Thrombinbildung (55-57, 133). Dabigatran hemmt Thrombin spezifisch, indem es direkt an das katalytische Zentrum des Moleküls bindet. Die Thrombinneubildung wird nur indirekt über die Inhibierung des positiven Feedbackmechanismus über die Faktoren V, VIII und XI vermindert. In zwei *in vitro* Studien konnte sogar gezeigt werden, dass direkte Thrombininhibitoren wie Dabigatran die Thrombinbildung im Vergleich zu VKA steigern (99, 134). Verschiedene Mechanismen wie das Fehlen der Thrombin-vermittelten Protein-C Aktivierung und dem damit einhergehenden negativen Feedback-Mechanismus könnten hier eine Rolle spielen (134).

5.3.2 THROMBIN-INDUZIERTE PLÄTTCHENAKTIVIERUNG

Wir zeigen hier, dass der unter Dabigatran beobachtete Anstieg an Plättchenadhäsion und Thrombusformation nicht durch eine verstärkte katalytische Thrombinaktivierung, sondern durch eine vermehrte Thrombin-Plättchen Interaktion vermittelt wird.

Thrombin fungiert über verschiedenste Mechanismen als wichtiger Thrombozytenaktivator. Katalytisch aktives Thrombin bindet an die G-Proteingekoppelten PAR-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche und spaltet die N-terminale Exodomäne des Rezeptors. Hierdurch entsteht ein neuer N-Terminus, der über intramolekulare Aktivierung zu einer vollständigen Plättchenaktivierung und der Ausbildung eines prothrombotischen Milieus führt.

Unsere Flusskammerversuche, die wir mit Dabigatranblut nach Zugabe von Hirudin, einem zusätzlichen direkten Thrombininhibitor durchführten, zeigten allerdings keine Unterschiede zu Kontrollblut, das mit Hirudin oder einem PAR-1 Antagonisten vorbehandelt wurde. Neu gebildetes, katalytisch aktives Thrombin und PAR-vermittelte Signalwirkung scheinen also zumindest während dem Ablauf unserer Experimente nur von geringerer Bedeutung zu sein.

5.3.3 GPIIb/IIIa-THROMBIN INTERAKTION

Wir konnten dagegen zeigen, dass Dabigatran *in vivo* und *in vitro* zu einem Anstieg an Plättchenadhäsion und Thrombusformation führt, die über eine vermehrte GPIIb/IIIa-Thrombin Interaktion vermittelt wird und unabhängig von katalytisch aktivem Thrombin ist.

Da die Expression des GPIIb/IIIa Rezeptors auf der Plättchenoberfläche in beiden Gruppen gleich war, wird dies vermutlich durch die erhöhte Thrombinverfügbarkeit im Blut von Dabigatranpatienten und dem damit einhergehenden Anstieg an Thrombin, das an die Blutplättchen gebunden ist, verursacht. Die Ergebnisse einiger Strukturanalysen weisen darauf hin, dass die GPIIb/IIIa-Thrombin Interaktion über Exosite I und II erfolgt, die neben der katalytischen Domäne des Thrombinmoleküls liegen. Dabei kann ein Thrombinmolekül zwei GPIIb/IIIa-Moleküle binden und so einerseits clustering von benachbarten GPIIb/IIIa-Molekülen auf einem Thrombozyten und andererseits Plättchenaggregation über GPIIb/IIIa-Moleküle zweier verschiedener Thrombozyten ermöglichen (123, 124, 135). In einer kürzlich publizierten Kristallographiestudie konnte allerdings lediglich eine Interaktion zwischen Exosite II und GPIIb/IIIa nachgewiesen werden. Die tatsächliche physiologische Relevanz bleibt also ungewiss (136).

Um die Bedeutung der GPIIb/IIIa-Thrombin Interaktion unter Dabigatran genauer zu untersuchen, inhibierten wir in zwei verschiedenen Ansätzen *in vivo* die Wirkung von GPIIb während der Entstehung der arteriellen Thrombose. Zunächst wurde die Thrombusformation und –stabilität in IL4R/GPIIb chimären Mäusen untersucht, deren Thrombozyten statt der extrazellulären

Domäne des Glykoproteins GPIIb/IIIa die extrazelluläre Domäne des humanen IL-4 Rezeptors exprimieren. Tiere, die diese Mutation tragen, zeigen einen Blutungsphänotyp wie GPIIb/IIIa null Mäuse aber entwickeln kein klassisches Bernard-Soulier Syndrom mit einer stark verringerten Thrombozytenzahl und erhöhtem Thrombozytenvolumen. In einem zweiten Ansatz wurde Wildtyp-Mäusen Anti-GPIIb/IIIa Fab Fragmente zur Inhibierung der vWF-GPIIb/IIIa Interaktion intravenös verabreicht. Nach Endothelabradation mittels Drahtmodell konnten wir weder in den IL4R/GPIIb/IIIa tg chimären Mäusen noch in den Anti-GPIIb/IIIa behandelten Tieren einen okklusiven Gefäßverschluss beobachten. Dies spricht dafür, dass die prothrombotische Wirkung unter Dabigatran von einer intakten extrazellulären Domäne des GPIIb/IIIa-Rezeptors abhängig ist. Allerdings zeigte eine frühere Studie, dass ein Fehlen der extrazellulären Domäne beziehungsweise des N-terminalen 45 kDa Fragments des GPIIb/IIIa-Rezeptors die Thrombusbildung in den Mesenterialgefäßen in einem murinen Eisen(III)Chlorid Modell vollständig verhindert (137). Man kann daher nicht ausschließen, dass durch Verwendung von IL4R/GPIIb/IIIa tg chimären Mäusen oder Anti-GPIIb/IIIa Fab Fragmente die GPIIb/IIIa-Abhängigkeit des Dabigatran-vermittelten prothrombotischen Effekts überschätzt wird.

5.4 LIMITATIONEN DER STUDIE

Es stellt eine große Herausforderung dar, die komplexen, ineinander greifenden Mechanismen, die während der Entwicklung der arteriellen Thrombose *in vivo* ablaufen, experimentell nachzustellen. Deswegen ist es schwierig unsere Daten auf das Szenario eines akuten Myokardinfarkts zu übertragen. Typisch für die Entwicklung der Atherosklerose sind sich wiederholende Zyklen klinisch stummer Plaquerupturen mit Exposition von subendothelialen Matrixproteinen, die zu einer lokalisierten Gerinnungsaktivierung führen (138). Es ist wahrscheinlich, dass die hier aufgeführten Mechanismen die thrombotische Reaktion verstärken und somit zu vermehrten klinisch relevanten Ischämien führen.

Für unsere Flusskammerversuche auf Kollagen verwendeten wir 250 µg/ml aufgereinigtes, fibrilläres Kollagen Typ I, was einer sehr hohen Kollagenkonzentration entspricht. Die Plättchenadhäsion und Thrombusformation auf fibrillärem Kollagen erfolgt in erster Linie über das Integrin $\alpha 2\beta 1$, dem während der Atherothrombose *in vitro* (112, 139) und der Entstehung der arteriellen Thrombose *in vivo* (140, 141) nur eine untergeordnete Rolle zukommt. Humane atherosklerotische Plaques enthalten im Gegensatz dazu in erster Linie Tissue Factor, Kollagen Typ I und Typ III (112). Um die pathophysiologische Relevanz unserer Versuche zu erhöhen, perfundierten wir deshalb zusätzlich Blut über humanes Plaquematerial, das durch Endarteriektomie aus Carotiden von Patienten gewonnen wurde. Das Homogenisat enthält sowohl den lipidreichen Kern als auch die fibröse Kapsel des atherosklerotischen Plaques und damit alle potenziell thrombogenen Substanzen, die *in vivo* eine Rolle spielen. Im Gegensatz zur Plättchenrekrutierung auf Kollagen erfolgt die initiale Plättchenadhäsion auf humanem Plaquematerial primär über das Glykoprotein GPIIb/IIIa, was zudem die vermehrte Thrombin-Plättchen Interaktion unter Dabigatran vermittelt. Flussversuche auf humanem Plaquematerial bieten daher ein sehr gute Möglichkeit, die komplexen Mechanismen während der arteriellen Thrombose unter Dabigatran zu untersuchen (110).

Um zu überprüfen, ob unsere *in vitro* gewonnenen Daten auch *in vivo* von Relevanz sind, untersuchten wir die Thrombusformation und -stabilität in zwei verschiedenen murinen Modellen der arteriellen Thrombose.

Bei dem zunächst verwendeten Carotis-Ligatur-Modell führt eine kräftige, fünfminütige Ligatur der Arteria Carotis zu einem Verlust der Endothelzellschicht. Die dadurch verursachte Exposition von subendothelialen Matrixproteinen triggert eine sofortige Plättchenadhäsion an der Läsionsstelle, die intravitalmikroskopisch beobachtet werden kann. Ein vollständiger thrombotischer Gefäßverschluss tritt hier in der Regel nicht ein. Zusätzlich wurde eine Gefäßdenudation der Arteria Carotis mit Hilfe eines Angioplastiedrahtes durchgeführt. Das Einführen und Drehen des Drahtes führt ähnlich der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques zu einer großflächigen

Endothelläsion mit Beteiligung der Intima und Media, die gefolgt ist von einer Plättchenadhäsion, -aggregation und einem thrombotischen Gefäßverschluss. Beiden Methoden ist dabei gemein, dass sie auf einer mechanischen Zerstörung der Endothelintegrität beruhen.

In anderen Modellen der arteriellen Thrombose wird die Gefäßverletzung durch elektrische, photochemische oder chemische Prozesse herbeigeführt. In dem von Carmeliet et al. (142) beschriebenen Elektromikrokoagulationsmodell führt das perivaskuläre Anlegen eines elektrischen Stromflusses zur Verletzung der Gefäßwand und löst auf diese Weise die Bildung eines wandständigen Plättchen- und Fibrin-reichen Thrombus aus. Der so erzeugte Schaden betrifft neben der Endothelzellschicht die glatten Muskelzellen der Media und führt zu einer ausgeprägten Nekrose der gesamten Gefäßwand. Ähnlich wie beim Eisen(III)Chlorid-Modell nach Farrehi et al. (143) oder Modellen, in denen die Gefäßverletzung durch einen Laser induziert wird (144), werden die im Menschen ablaufenden Pathomechanismen nur bedingt widergespiegelt.

Das hier verwendete Carotis-Ligatur-Modell und die Endotheldenudation mittels Angioplastiedraht stellen daher die geeignetsten Methoden dar, die Entstehung der arteriellen Thrombose zu analysieren (102, 117).

5.5 KLINISCHE RELEVANZ

In der 2009 veröffentlichten RE-LY Studie zeigte sich ein leicht erhöhtes Risiko für die Entstehung eines akuten Koronarsyndroms unter Dabigatran im Vergleich zu VKA. Eine genauere Analyse der Myokardinfarkte zeigte, dass die Zahl schwerer und tödlicher Herzinfarkte unter Dabigatran im Vergleich zu VKA nicht erhöht ist (97). Unsere Ergebnisse belegen, dass unter Dabigatran die prothrombotische Antwort auf die Exposition von atherosklerotischem Plaquematerial unter Flussbedingungen verstärkt ist, was eine Erklärung für den klinisch beobachteten Anstieg an akuten Koronarsyndromen sein kann.

Von ganz besonderem Interesse ist diese Beobachtung bei Patienten, bei denen unter Dabigatrantherapie eine perkutane Koronarintervention (PCI) durchgeführt wird. In einer kleinen randomisierten klinischen Studie erhielten Patienten mit stabiler Angina Pectoris vor einer perkutanen Koronarintervention entweder Dabigatran oder während des Eingriffs unfractioniertes Heparin. Obwohl die Studie aufgrund der geringen Patientenzahl nicht aussagekräftig genug ist, um daraus Rückschlüsse auf klinisch relevante Endpunkte zu ziehen, zeigten sich in der Dabigatrangruppe während des Eingriffs dennoch mehr Fälle von abruptem Gesäßverschluss als in der Heparin-Gruppe (100). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie von Oldgren et al. Hier erhielten Patienten durchschnittlich 7,5 Tage nach einem akuten Myokardinfarkt Dabigatran in verschiedenen Dosierungen oder Placebo als Zusatzmedikation zu einer konventionellen dualen Thrombozytenaggregationshemmung. Interessanterweise zeigten Dabigatran-behandelte Patienten in allen Dosierungen innerhalb der ersten sechs Monate ein höheres Risiko, einen erneuten Myokardinfarkt zu erleiden als die Vergleichsgruppe mit Placebo (90).

Die Daten unserer experimentellen Studie weisen darauf hin, dass bei Patienten mit koronarer Gefäßerkrankung das Risiko, unter Dabigatran ein arterielles thrombotisches Ereignis zu entwickeln, erhöht ist. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollte die Entscheidung bezüglich der antikoagulatorischen Therapie immer das individuelle Risiko für die Entwicklung eines Myokardinfarkts berücksichtigen.

5.6 AUSBLICK

Um die prothrombotische Wirkung von Dabigatran und die damit einhergehende Gefahr einer arteriellen Thrombose zu analysieren, werden zusätzliche klinische Studien mit einer ausreichend hohen Teststärke benötigt. Ziel sollte dabei sein, die Notwendigkeit einer personalisierten Antikoagulation

insbesondere bei Patienten mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko zu analysieren.

Nach aktueller Studienlage werden direkte Faktor-Xa-Inhibitoren wie Rivaroxaban oder Apixaban nicht mit einer erhöhten Rate an Myokardinfarkten in Verbindung gebracht (145, 146). In einer Metaanalyse von Chatterjee et al., die Daten von über 50 000 Patienten aus neun verschiedenen Studien einbezog, zeigte sich, dass Rivaroxaban sogar mit einem signifikant verringerten Risiko für die Entwicklung eines Myokardinfarkts einhergeht als die untersuchten Kontrollen (147). In der ATLAS ACS 2-TIMI 51 Studie konnte eine zusätzliche Antikoagulation mit Rivaroxaban (2 x 2,5 mg täglich) die Rate an kardiovaskulären Ereignissen und In-Stent-Thrombosen in Patienten mit kürzlich stattgehabtem Myokardinfarkt und bestehender Thrombozytenaggregationshemmung im Vergleich zu Placebo reduzieren (148). Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse ist es unklar, ob der unter Dabigatran beobachtete Anstieg an Plättchenadhäsion und Thrombusbildung auf direkte Thrombininhibitoren beschränkt ist, oder ob direkte orale Antikoagulantien im Allgemeinen einen prothrombotischen Effekte auf die Thrombozyten ausüben. In Zukunft ist daher geplant, analog zu der hier beschriebenen Studie die Wirkung von Rivaroxaban auf die Plättchenaktivität und –aggregation zu untersuchen. Dabei soll die Thrombozytenfunktion von Patienten mit non-valvulärem Vorhofflimmern und einer oralen Antikoagulation mit Rivaroxaban oder Vitamin-K-Antagonisten sowie gesunden Kontrollen unter Ruhe- und unter Flussbedingungen verglichen werden.

In einem weiteren Projekt möchten wir den Langzeiteffekt der neuen oralen Antikoagulantien auf die Thrombozytenfunktion, insbesondere die Proteinsynthese analysieren. Wie kürzlich von Michaelis et al. (149) mittels Massenspektrometrie gezeigt werden konnte, inhibiert Dabigatran nicht selektiv Thrombin, sondern zusätzlich NQO2, ein Flavoprotein, das die Reduktion verschiedener Chinone katalysiert und so eine wichtige Rolle im Zellmetabolismus spielt. Inwieweit eine antikoagulatorische Therapie mit Dabigatran die Proteinsynthese und die posttranslationale Modifikation der

Proteine beeinflusst ist bis dato unklar und soll Gegenstand eines neuen Projektes sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation--executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation). *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(4):854-906.
2. Gallagher MM, Camm J. Classification of atrial fibrillation. *The American journal of cardiology*. 1998;82(8A):18N-28N.
3. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2010;31(19):2369-429.
4. Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *The New England journal of medicine*. 1998;339(10):659-66.
5. Tsai CF, Tai CT, Hsieh MH, Lin WS, Yu WC, Ueng KC, et al. Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the superior vena cava: electrophysiological characteristics and results of radiofrequency ablation. *Circulation*. 2000;102(1):67-74.
6. Hwang C, Wu TJ, Doshi RN, Peter CT, Chen PS. Vein of marshall cannulation for the analysis of electrical activity in patients with focal atrial fibrillation. *Circulation*. 2000;101(13):1503-5.
7. Moe GK, Abildskov JA. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *American heart journal*. 1959;58(1):59-70.
8. Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. Population prevalence, incidence, and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study. *Heart (British Cardiac Society)*. 2001;86(5):516-21.
9. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001;285(18):2370-5.
10. Naccarelli GV, Varker H, Lin J, Schulman KL. Increasing prevalence of atrial fibrillation and flutter in the United States. *The American journal of cardiology*. 2009;104(11):1534-9.

11. Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS, et al. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004;110(9):1042-6.
12. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 2014;129(8):837-47.
13. Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Bailey KR, Abhayaratna WP, et al. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation*. 2006;114(2):119-25.
14. Friberg J, Buch P, Scharling H, Gadsbphioll N, Jensen GB. Rising rates of hospital admissions for atrial fibrillation. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2003;14(6):666-72.
15. Le Heuzey JY, Pazioud O, Piot O, Said MA, Copie X, Lavergne T, et al. Cost of care distribution in atrial fibrillation patients: the COCAF study. *American heart journal*. 2004;147(1):121-6.
16. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998;98(10):946-52.
17. Kirchhof P, Auricchio A, Bax J, Crijns H, Camm J, Diener HC, et al. Outcome parameters for trials in atrial fibrillation: recommendations from a consensus conference organized by the German Atrial Fibrillation Competence NETwork and the European Heart Rhythm Association. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. 2007;9(11):1006-23.
18. Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *The American journal of medicine*. 2002;113(5):359-64.
19. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1991;22(8):983-8.
20. Grau AJ, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, et al. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2001;32(11):2559-66.
21. Lin HJ, Wolf PA, Kelly-Hayes M, Beiser AS, Kase CS, Benjamin EJ, et al. Stroke severity in atrial fibrillation. The Framingham Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1996;27(10):1760-4.

22. Marini C, De Santis F, Sacco S, Russo T, Olivieri L, Totaro R, et al. Contribution of atrial fibrillation to incidence and outcome of ischemic stroke: results from a population-based study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005;36(6):1115-9.
23. Fatkin D, Kelly RP, Feneley MP. Relations between left atrial appendage blood flow velocity, spontaneous echocardiographic contrast and thromboembolic risk in vivo. *Journal of the American College of Cardiology*. 1994;23(4):961-9.
24. Rastegar R, Harnick DJ, Weidemann P, Fuster V, Coller B, Badimon JJ, et al. Spontaneous echo contrast videodensity is flow-related and is dependent on the relative concentrations of fibrinogen and red blood cells. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(4):603-10.
25. Transesophageal echocardiographic correlates of thromboembolism in high-risk patients with nonvalvular atrial fibrillation. The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators Committee on Echocardiography. *Annals of internal medicine*. 1998;128(8):639-47.
26. Sanfilippo AJ, Abascal VM, Sheehan M, Oertel LB, Harrigan P, Hughes RA, et al. Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study. *Circulation*. 1990;82(3):792-7.
27. Di Tullio MR, Sacco RL, Sciacca RR, Homma S. Left atrial size and the risk of ischemic stroke in an ethnically mixed population. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1999;30(10):2019-24.
28. Masawa N, Yoshida Y, Yamada T, Joshita T, Ooneda G. Diagnosis of cardiac thrombosis in patients with atrial fibrillation in the absence of macroscopically visible thrombi. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1993;422(1):67-71.
29. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation*. 1997;96(4):1180-4.
30. Tziakas DN, Chalikias GK, Papanas N, Stakos DA, Chatzikiyiakou SV, Maltezos E. Circulating levels of collagen type I degradation marker depend on the type of atrial fibrillation. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. 2007;9(8):589-96.
31. Marin F, Roldan V, Climent V, Garcia A, Marco P, Lip GY. Is thrombogenesis in atrial fibrillation related to matrix metalloproteinase-1 and its inhibitor, TIMP-1? *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003;34(5):1181-6.
32. Roldan V, Marin F, Blann AD, Garcia A, Marco P, Sogorb F, et al. Interleukin-6, endothelial activation and thrombogenesis in chronic atrial fibrillation. *European heart journal*. 2003;24(14):1373-80.

33. Asakura H, Hifumi S, Jokaji H, Saito M, Kumabashiri I, Uotani C, et al. Prothrombin fragment F1 + 2 and thrombin-antithrombin III complex are useful markers of the hypercoagulable state in atrial fibrillation. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 1992;3(4):469-73.
34. Kumagai K, Fukunami M, Ohmori M, Kitabatake A, Kamada T, Hoki N. Increased intracardiovascular clotting in patients with chronic atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 1990;16(2):377-80.
35. Lip GY, Lowe GD, Rumley A, Dunn FG. Increased markers of thrombogenesis in chronic atrial fibrillation: effects of warfarin treatment. *British heart journal*. 1995;73(6):527-33.
36. Mahe I, Drouet L, Chassany O, Mazoyer E, Simoneau G, Knellwolf AL, et al. D-dimer: a characteristic of the coagulation state of each patient with chronic atrial fibrillation. *Thrombosis research*. 2002;107(1-2):1-6.
37. Marin F, Roldan V, Lip GY. Fibrinolytic function and atrial fibrillation. *Thrombosis research*. 2003;109(5-6):233-40.
38. Choudhury A, Chung I, Blann AD, Lip GY. Platelet surface CD62P and CD63, mean platelet volume, and soluble/platelet P-selectin as indexes of platelet function in atrial fibrillation: a comparison of "healthy control subjects" and "disease control subjects" in sinus rhythm. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(19):1957-64.
39. Choudhury A, Chung I, Blann AD, Lip GY. Elevated platelet microparticle levels in nonvalvular atrial fibrillation: relationship to p-selectin and antithrombotic therapy. *Chest*. 2007;131(3):809-15.
40. Akar JG, Jeske W, Wilber DJ. Acute onset human atrial fibrillation is associated with local cardiac platelet activation and endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(18):1790-3.
41. Lim HS, Willoughby SR, Schultz C, Chakrabarty A, Alasady M, Lau DH, et al. Successful catheter ablation decreases platelet activation and improves endothelial function in patients with atrial fibrillation. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2014;11(11):1912-8.
42. Hart RG, Pearce LA, Rothbart RM, McAnulty JH, Asinger RW, Halperin JL. Stroke with intermittent atrial fibrillation: incidence and predictors during aspirin therapy. *Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators*. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35(1):183-7.
43. Hohnloser SH, Pajitnev D, Pogue J, Healey JS, Pfeffer MA, Yusuf S, et al. Incidence of stroke in paroxysmal versus sustained atrial fibrillation in patients taking oral anticoagulation or combined antiplatelet therapy: an ACTIVE W Substudy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(22):2156-61.

44. Nieuwlaat R, Dinh T, Olsson SB, Camm AJ, Capucci A, Tieleman RG, et al. Should we abandon the common practice of withholding oral anticoagulation in paroxysmal atrial fibrillation? *European heart journal*. 2008;29(7):915-22.
45. Flaker G, Ezekowitz M, Yusuf S, Wallentin L, Noack H, Brueckmann M, et al. Efficacy and safety of dabigatran compared to warfarin in patients with paroxysmal, persistent, and permanent atrial fibrillation: results from the RE-LY (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy) study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59(9):854-5.
46. Lip GY, Frison L, Grind M. Stroke event rates in anticoagulated patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Journal of internal medicine*. 2008;264(1):50-61.
47. Al-Khatib SM, Thomas L, Wallentin L, Lopes RD, Gersh B, Garcia D, et al. Outcomes of apixaban vs. warfarin by type and duration of atrial fibrillation: results from the ARISTOTLE trial. *European heart journal*. 2013;34(31):2464-71.
48. Vanassche T, Lauw MN, Eikelboom JW, Healey JS, Hart RG, Alings M, et al. Risk of ischaemic stroke according to pattern of atrial fibrillation: analysis of 6563 aspirin-treated patients in ACTIVE-A and AVERROES. *European heart journal*. 2015;36(5):281-7a.
49. Hughes M, Lip GY. Stroke and thromboembolism in atrial fibrillation: a systematic review of stroke risk factors, risk stratification schema and cost effectiveness data. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;99(2):295-304.
50. Lip GY, Nieuwlaat R, Pisters R, Lane DA, Crijns HJ. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest*. 2010;137(2):263-72.
51. Lip GY, Frison L, Halperin JL, Lane DA. Identifying patients at high risk for stroke despite anticoagulation: a comparison of contemporary stroke risk stratification schemes in an anticoagulated atrial fibrillation cohort. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2010;41(12):2731-8.
52. Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, 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. *European heart journal*. 2012;33(21):2719-47.
53. Wyse DG, Waldo AL, DiMarco JP, Domanski MJ, Rosenberg Y, Schron EB, et al. A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2002;347(23):1825-33.
54. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Annals of internal medicine*. 2007;146(12):857-67.

55. Whitlon DS, Sadowski JA, Suttie JW. Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochemistry*. 1978;17(8):1371-7.
56. Stafford DW. The vitamin K cycle. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3(8):1873-8.
57. Ansell J, Hirsh J, Poller L, Bussey H, Jacobson A, Hylek E. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3 Suppl):204S-33S.
58. Holbrook AM, Pereira JA, Labiris R, McDonald H, Douketis JD, Crowther M, et al. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Archives of internal medicine*. 2005;165(10):1095-106.
59. Lindh JD, Holm L, Andersson ML, Rane A. Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirements--a systematic review and meta-analysis. *European journal of clinical pharmacology*. 2009;65(4):365-75.
60. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*. 2005;105(2):645-9.
61. Efirid LM, Mishkin DS, Berlowitz DR, Ash AS, Hylek EM, Ozonoff A, et al. Stratifying the risks of oral anticoagulation in patients with liver disease. *Circulation Cardiovascular quality and outcomes*. 2014;7(3):461-7.
62. Fachinformation Marcumar®. MEDA Pharma GmbH & Co.KG.; 2010.
63. van Walraven C, Jennings A, Oake N, Fergusson D, Forster AJ. Effect of study setting on anticoagulation control: a systematic review and metaregression. *Chest*. 2006;129(5):1155-66.
64. Oake N, Fergusson DA, Forster AJ, van Walraven C. Frequency of adverse events in patients with poor anticoagulation: a meta-analysis. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2007;176(11):1589-94.
65. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2011;365(10):883-91.
66. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2009;361(12):1139-51.
67. Giugliano RP, Ruff CT, Braunwald E, Murphy SA, Wiviott SD, Halperin JL, et al. Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2013;369(22):2093-104.

68. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2011;365(11):981-92.
69. Heidbuchel H, Verhamme P, Alings M, Antz M, Hacke W, Oldgren J, et al. EHRA practical guide on the use of new oral anticoagulants in patients with non-valvular atrial fibrillation: executive summary. *European heart journal*. 2013;34(27):2094-106.
70. Mantha S, Cabral K, Ansell J. New avenues for anticoagulation in atrial fibrillation. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2013;93(1):68-77.
71. Huntington JA, Baglin TP. Targeting thrombin--rational drug design from natural mechanisms. *Trends in pharmacological sciences*. 2003;24(11):589-95.
72. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258-64.
73. Ruggeri ZM, Zarpellon A, Roberts JR, Mc Clintock RA, Jing H, Mendolicchio GL. Unravelling the mechanism and significance of thrombin binding to platelet glycoprotein Ib. *Thrombosis and haemostasis*. 2010;104(5):894-902.
74. Tulinsky A. Molecular Interactions of Thrombin. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1996;22(2):117-24.
75. Weitz JI, Leslie B, Hudoba M. Thrombin binds to soluble fibrin degradation products where it is protected from inhibition by heparin-antithrombin but susceptible to inactivation by antithrombin-independent inhibitors. *Circulation*. 1998;97(6):544-52.
76. Di Nisio M, Middeldorp S, Buller HR. Direct thrombin inhibitors. *The New England journal of medicine*. 2005;353(10):1028-40.
77. Lee WM, Larrey D, Olsson R, Lewis JH, Keisu M, Auclert L, et al. Hepatic findings in long-term clinical trials of ximelagatran. *Drug safety*. 2005;28(4):351-70.
78. Fachinformation Pradaxa® 110 mg Hartkapseln. Boehringer Ingelheim; 2013.
79. Fachinformation Pradaxa® 150 mg Hartkapseln. Boehringer Ingelheim; 2011.
80. van Ryn J, Huel N, Waldmann L, Wienen W. Dabigatran Inhibits Both Clot-Bound and Fluid Phase Thrombin In Vitro: Effects Compared to Heparin and Hirudin. *Blood*. 2007;110(11):3998-.
81. Huel NH, Nar H, Priepke H, Ries U, Stassen JM, Wienen W. Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 2002;45(9):1757-66.

82. Eriksson BI, Smith H, Yasothan U, Kirkpatrick P. Dabigatran etexilate. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(7):557-8.
83. Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, Stangier J, Roth W. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008;36(2):386-99.
84. Stangier J, Rathgen K, Stahle H, Gansser D, Roth W. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *British journal of clinical pharmacology*. 2007;64(3):292-303.
85. Stangier J, Rathgen K, Stahle H, Mazur D. Influence of renal impairment on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral dabigatran etexilate: an open-label, parallel-group, single-centre study. *Clinical pharmacokinetics*. 2010;49(4):259-68.
86. Stangier J, Stahle H, Rathgen K, Roth W, Shakeri-Nejad K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dabigatran etexilate, an oral direct thrombin inhibitor, are not affected by moderate hepatic impairment. *Journal of clinical pharmacology*. 2008;48(12):1411-9.
87. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Reilly PA, Wallentin L. Newly identified events in the RE-LY trial. *The New England journal of medicine*. 2010;363(19):1875-6.
88. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, Kurth AA, van Dijk CN, Frostick SP, et al. Oral dabigatran etexilate vs. subcutaneous enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total knee replacement: the RE-MODEL randomized trial. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5(11):2178-85.
89. Schulman S, Kearon C, Kakkar AK, Mismetti P, Schellong S, Eriksson H, et al. Dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism. *The New England journal of medicine*. 2009;361(24):2342-52.
90. Oldgren J, Budaj A, Granger CB, Khder Y, Roberts J, Siegbahn A, et al. Dabigatran vs. placebo in patients with acute coronary syndromes on dual antiplatelet therapy: a randomized, double-blind, phase II trial. *European heart journal*. 2011;32(22):2781-9.
91. Uchino K, Hernandez AV. Dabigatran association with higher risk of acute coronary events: meta-analysis of noninferiority randomized controlled trials. *Archives of internal medicine*. 2012;172(5):397-402.

92. Douxfils J, Buckinx F, Mullier F, Minet V, Rabenda V, Reginster JY, et al. Dabigatran etexilate and risk of myocardial infarction, other cardiovascular events, major bleeding, and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3(3):e000515.
93. Mak KH. Coronary and mortality risk of novel oral antithrombotic agents: a meta-analysis of large randomised trials. *BMJ open*. 2012;2(5).
94. Tornyos A, Kehl D, D'Ascenzo F, Komocsi A. Risk of Myocardial Infarction in Patients with Long-Term Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant Treatment. *Progress in cardiovascular diseases*. 2016;58(5):483-94.
95. Loke YK, Pradhan S, Yeong JK, Kwok CS. Comparative coronary risks of apixaban, rivaroxaban and dabigatran: a meta-analysis and adjusted indirect comparison. *British journal of clinical pharmacology*. 2014;78(4):707-17.
96. 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. *The American journal of cardiology*. 2013;112(12):1973-9.
97. Hohnloser SH, Oldgren J, Yang S, Wallentin L, Ezekowitz M, Reilly P, et al. Myocardial ischemic events in patients with atrial fibrillation treated with dabigatran or warfarin in the RE-LY (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy) trial. *Circulation*. 2012;125(5):669-76.
98. Eikelboom JW, Weitz JI. Anticoagulation therapy. Dabigatran and risk of myocardial infarction. *Nature reviews Cardiology*. 2012;9(5):260-2.
99. Dale B, Eikelboom JW, Weitz JI, Young E, Paikin JS, Coppens M, et al. Dabigatran attenuates thrombin generation to a lesser extent than warfarin: could this explain their differential effects on intracranial hemorrhage and myocardial infarction? *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2013;35(2):295-301.
100. Vranckx P, Verheugt FW, de Maat MP, Ulmans VA, Regar E, Smits P, et al. A randomised study of dabigatran in elective percutaneous coronary intervention in stable coronary artery disease patients. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2013;8(9):1052-60.
101. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(7):887-96.
102. Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(1):41-9.

103. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(12):2341-9.
104. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9 Suppl 1:92-104.
105. Borisoff JI, Spronk HMH, ten Cate H. The Hemostatic System as a Modulator of Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(18):1746-60.
106. Hankey GJ, Eikelboom JW. Dabigatran etexilate: a new oral thrombin inhibitor. *Circulation*. 2011;123(13):1436-50.
107. Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN. Antithrombin: in control of coagulation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(3):386-9.
108. Wilson DS, Szostak JW. In vitro selection of functional nucleic acids. *Annual review of biochemistry*. 1999;68:611-47.
109. Muller J, Becher T, Braunstein J, Berdel P, Gravius S, Rohrbach F, et al. Profiling of active thrombin in human blood by supramolecular complexes. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 2011;50(27):6075-8.
110. Reininger AJ, Bernlochner I, Penz SM, Ravanat C, Smethurst P, Farndale RW, et al. A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(11):1147-58.
111. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood*. 1996;88(5):1525-41.
112. Penz S, Reininger AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(8):898-909.
113. Penz SM, Reininger AJ, Toth O, Deckmyn H, Brandl R, Siess W. Glycoprotein Ibalpha inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;97(3):435-43.
114. Kanaji T, Russell S, Ware J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 2002;100(6):2102-7.
115. Lauer A, Cianchetti FA, Van Cott EM, Schlunk F, Schulz E, Pfeilschifter W, et al. Anticoagulation with the oral direct thrombin inhibitor dabigatran does not enlarge hematoma volume in experimental intracerebral hemorrhage. *Circulation*. 2011;124(15):1654-62.

116. Le Behot A, Gauberti M, Martinez De Lizarrondo S, Montagne A, Lemarchand E, Repesse Y, et al. GpIbalpha-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice. *Blood*. 2014;123(21):3354-63.
117. Lindner V, Fingerle J, Reidy MA. Mouse model of arterial injury. *Circulation research*. 1993;73(5):792-6.
118. Reilly PA, Lehr T, Haertter S, Connolly SJ, Yusuf S, Eikelboom JW, et al. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: the RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy). *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(4):321-8.
119. Wang X, Cheng Q, Xu L, Feuerstein GZ, Hsu MY, Smith PL, et al. Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3(4):695-702.
120. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(1):34-45.
121. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 1998;394(6694):690-4.
122. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3(8):1800-14.
123. Dumas JJ, Kumar R, Seehra J, Somers WS, Mosyak L. Crystal structure of the GpIbalpha-thrombin complex essential for platelet aggregation. *Science (New York, NY)*. 2003;301(5630):222-6.
124. Dubois C, Steiner B, Kieffer N, Reigner SC. Thrombin binding to GPIbalpha induces platelet aggregation and fibrin clot retraction supported by resting alphaIIb beta3 interaction with polymerized fibrin. *Thrombosis and haemostasis*. 2003;89(5):853-65.
125. Mazurov AV, Vinogradov DV, Vlasik TN, Repin VS, Booth WJ, Berndt MC. Characterization of an antiglycoprotein Ib monoclonal antibody that specifically inhibits platelet-thrombin interaction. *Thrombosis research*. 1991;62(6):673-84.
126. Wiene W, Stassen JM, Priepke H, Ries UJ, Huel N. In-vitro profile and ex-vivo anticoagulant activity of the direct thrombin inhibitor dabigatran and its orally active prodrug, dabigatran etexilate. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;98(1):155-62.

127. Eller T, Busse J, Dittrich M, Flieder T, Alban S, Knabbe C, et al. Dabigatran, rivaroxaban, apixaban, argatroban and fondaparinux and their effects on coagulation POC and platelet function tests. *Clinical chemistry and laboratory medicine* : CCLM / FESCC. 2014:1-10.
128. Christersson C, Johnell M, Siegbahn A. The influence of direct thrombin inhibitors on the formation of platelet-leukocyte aggregates and tissue factor expression. *Thrombosis research*. 2010;126(4):e327-33.
129. Balasubramanian V, Grabowski E, Bini A, Nemerson Y. Platelets, circulating tissue factor, and fibrin colocalize in ex vivo thrombi: real-time fluorescence images of thrombus formation and propagation under defined flow conditions. *Blood*. 2002;100(8):2787-92.
130. Diquelou A, Lemozy S, Dupouy D, Boneu B, Sakariassen K, Cadroy Y. Effect of blood flow on thrombin generation is dependent on the nature of the thrombogenic surface. *Blood*. 1994;84(7):2206-13.
131. Ammollo CT, Semeraro F, Incampo F, Semeraro N, Colucci M. Dabigatran enhances clot susceptibility to fibrinolysis by mechanisms dependent on and independent of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH. 2010;8(4):790-8.
132. Eikelboom JW, Connolly SJ, Brueckmann M, Granger CB, Kappetein AP, Mack MJ, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with mechanical heart valves. *The New England journal of medicine*. 2013;369(13):1206-14.
133. Johnson SA, Caldwell MJ, Priest EM. Effect of oral anticoagulant (marcumar) on prothrombin and related components in blood coagulation. *Circulation research*. 1957;5(3):252-6.
134. Furugohri T, Sugiyama N, Morishima Y, Shibano T. Antithrombin-independent thrombin inhibitors, but not direct factor Xa inhibitors, enhance thrombin generation in plasma through inhibition of thrombin-thrombomodulin-protein C system. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;106(6):1076-83.
135. Celikel R, McClintock RA, Roberts JR, Mendolicchio GL, Ware J, Varughese KI, et al. Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha. *Science (New York, NY)*. 2003;301(5630):218-21.
136. Lechtenberg BC, Freund SM, Huntington JA. GpIbalpha interacts exclusively with exosite II of thrombin. *Journal of molecular biology*. 2014;426(4):881-93.
137. Bergmeier W, Piffath CL, Goerge T, Cifuni SM, Ruggeri ZM, Ware J, et al. The role of platelet adhesion receptor GPIbalpha far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(45):16900-5.

138. Mann J, Davies MJ. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. *Heart (British Cardiac Society)*. 1999;82(3):265-8.
139. Schulz C, Penz S, Hoffmann C, Langer H, Gillitzer A, Schneider S, et al. Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic research in cardiology*. 2008;103(4):356-67.
140. Petzold T, Ruppert R, Pandey D, Barocke V, Meyer H, Lorenz M, et al. beta1 integrin-mediated signals are required for platelet granule secretion and hemostasis in mouse. *Blood*. 2013;122(15):2723-31.
141. Gruner S, Prostredna M, Schulte V, Krieg T, Eckes B, Brakebusch C, et al. Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. *Blood*. 2003;102(12):4021-7.
142. Carmeliet P, Moons L, Stassen JM, De Mol M, Bouche A, van den Oord JJ, et al. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *The American journal of pathology*. 1997;150(2):761-76.
143. Farrehi PM, Ozaki CK, Carmeliet P, Fay WP. Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Circulation*. 1998;97(10):1002-8.
144. Rosen ED, Raymond S, Zollman A, Noria F, Sandoval-Cooper M, Shulman A, et al. Laser-induced noninvasive vascular injury models in mice generate platelet- and coagulation-dependent thrombi. *The American journal of pathology*. 2001;158(5):1613-22.
145. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2011;365(10):883-91.
146. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2011;365(11):981-92.
147. Chatterjee S, Sharma A, Uchino K, Biondi-Zoccai G, Lichstein E, Mukherjee D. Rivaroxaban and risk of myocardial infarction: insights from a meta-analysis and trial sequential analysis of randomized clinical trials. *Coronary artery disease*. 2013;24(8):628-35.
148. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Murphy SA, Plotnikov A, Gotcheva N, et al. Comparison of the efficacy and safety of two rivaroxaban doses in acute coronary syndrome (from ATLAS ACS 2-TIMI 51). *The American journal of cardiology*. 2013;112(4):472-8.

149. Michaelis S, Marais A, Schrey AK, Graebner OY, Schaudt C, Sefkow M, et al. Dabigatran and dabigatran ethyl ester: potent inhibitors of ribosylidihydronicotinamide dehydrogenase (NQO2). *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(8):3934-44.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Bei Patienten mit Vorhofflimmern und einer oralen Antikoagulation mit Dabigatran wurde im Vergleich zu Vitamin-K-Antagonisten (VKA) ein Anstieg an Myokardinfarkten beobachtet. Bis jetzt ist nicht klar, ob dies dem Zufall geschuldet ist, oder ob Dabigatran eine prothrombotische Wirkung auf die Thrombozyten ausübt. Ziel dieser Studie war, den Einfluss von Dabigatran auf die Plättchenfunktion, deren Adhäsion und Aktivierung zu untersuchen.

Hierfür wurde die Thrombozytenfunktion von Patienten mit Vorhofflimmern und Antikoagulation mit Dabigatran oder VKA unter statischen Bedingungen und unter Fluss analysiert. Desweiteren wurde in zwei Modellen der arteriellen Thrombose die Plättchenaggregation und Thrombusstabilität in Dabigatran- oder VKA-behandelten Mäusen und Kontrolltieren untersucht. Um den *in vivo* ablaufenden Pathomechanismen der arteriellen Thrombose möglichst nahe zu kommen, wurde zusätzlich die Plättchenadhäsion und Thrombusformation auf humanem Plaquematerial analysiert.

Unter statischen Bedingungen fanden wir in beiden Gruppen eine ähnliche Thrombozytenaggregation und -reaktivität. Unter arteriellen Flussbedingungen zeigte sich allerdings sowohl auf Kollagen als auch auf humanem Plaquematerial eine signifikant erhöhte Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation in der Dabigatrangruppe. In Mäusen, denen Dabigatran gegeben wurde, fanden wir in zwei verschiedenen Modellen der arteriellen Thrombose eine erhöhte Plättchenaggregation und Thrombusstabilität. Die beobachtete verstärkte Thrombusformation war sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Inhibierung der GPIIb/IIIa-Thrombin Interaktion reversibel.

Im Vergleich zu VKA verstärkt Dabigatran also die Plättchenadhäsion und Thrombusformation in Mäusen und auf humanem Plaquematerial, was zu der klinisch beobachteten erhöhten Rate an Herzinfarkten beitragen könnte. Der zugrunde liegende Mechanismus beinhaltet eine erhöhte Verfügbarkeit von Thrombin, die einhergeht mit einer veränderten Interaktion von Thrombin mit dem GPIIb/IIIa-Rezeptor der Blutplättchen.

8 SUMMARY

In patients with atrial fibrillation, oral anticoagulation with dabigatran in contrast to vitamin K antagonists (VKAs) associates with a numerical increase in acute coronary syndromes. Whether this observation is due to a play of chance or linked to so far undefined prothrombotic actions of dabigatran remains unclear. We therefore addressed whether platelet functionality is altered in dabigatran-treated human blood and mice.

Platelet function from patients receiving either dabigatran or VKA was analyzed under static and flow conditions. To evaluate the effect of dabigatran *in vivo* we analyzed thrombus formation and stability in dabigatran-, VKA- or vehicle-treated mice in two models of arterial thrombosis. To address the relevance to human pathology we further examined platelet adhesion and thrombus formation to human atherosclerotic plaque homogenate under arterial shear.

Under static conditions whole blood aggregation and platelet reactivity were similar in both groups. However, under flow conditions platelet adhesion and thrombus formation on collagen and human plaque were significantly increased with dabigatran compared to VKA. In the arterial thrombosis models thrombus formation and stability were enhanced under dabigatran. Ablation of GPIIb/IIIa in mice and inhibition of GPIIb/IIIa-thrombin interactions using a GPIIb/IIIa blocking antibody abolished the prothrombotic effect of dabigatran on thrombus formation in mice and on human atherosclerotic plaque.

In summary, dabigatran accelerates and enhances platelet adhesion and thrombus formation in mice and on human atherosclerotic plaque compared to VKA. The underlying mechanism involves the platelet receptor GPIIb/IIIa and can be reversed by inhibition of GPIIb/IIIa function. This might contribute to the increase in acute coronary syndromes, observed clinically in patients treated with dabigatran.

9 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich in erster Linie bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung sowie die kompetente wissenschaftliche Projektbetreuung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Tobias Petzold für die ausnahmslos hervorragende Betreuung, seinen steten Anregungen und Hilfestellungen bei allen auftretenden Fragen sowie seine fachliche und menschliche Unterstützung.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner gesamten Arbeitsgruppe für die freundschaftliche, kollegiale Arbeitsatmosphäre, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Bei Dr. med. vet. Ildiko Konrad, Dr. med. vet. Annekathrin Eckart und Dr. med. vet. Irene Schubert möchte ich mich für die Durchführung der hier vorgestellten Tierversuche bedanken.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. med. Wolfgang Siess, Janina Jamasbi und der ganzen Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der humanen Plaquehomogenisate und der Durchführung der Flusskammerversuche in Gegenwart von Hirudin und des PAR-1 Antagonisten.

Eidesstattliche Versicherung

Thienel, Manuela Bernadette

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Prothrombotische Wirkung von Dabigatran während der arteriellen Thrombose

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 29.07.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand