

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Steffen Massberg

Der Einfluss von Rivaroxaban auf die Entstehung von arteriellen Thrombosen

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

vorgelegt von
Ron Constantin Kurt Uwe Regenauer
aus
Solingen
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Tobias Petzold

Mitberichterstatter: PD Dr. Lisa Gross
Prof. Dr. Gerd Juchem

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2023

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	5
1 Einleitung	7
1.1 Vorhofflimmern	7
1.1.1 Einführung und Definition	7
1.1.2 Epidemiologie und klinische Bedeutung der Erkrankung	7
1.1.3 Diagnostik	8
1.1.4 Klassifikation	9
1.1.5 Stratifizierung des Schlaganfallrisikos mittels des CHA ₂ DS ₂ -VASc-Scores...	10
1.2 Therapie	11
1.2.1 Rhythmus- und Frequenzkontrolle	11
1.2.2 Antikoagulation	12
1.2.3 Vitamin-K-Antagonisten	12
1.2.4 Neue orale Antikoagulantien (NOAK)	14
1.3 Rivaroxaban	16
1.3.1 Indikationen und Dosierungen	16
1.3.2 Wirkmechanismus	18
1.3.3 Pharmakokinetik	18
1.3.4 Unerwünschte Wirkungen und Kontraindikationen	19
1.3.5 Der Einfluss Rivaroxabans auf das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse ...	19
1.4 Pathogenese der arteriellen Thrombose	21
2 Fragestellung der Arbeit	23
3 Material und Methoden	24
3.1 In Vitro Versuche	24
3.1.1 Patientenkollektiv	24
3.1.2 Probengewinnung	24
3.1.3 Multiplate®-Analyse	25
3.1.4 Lichttransmissionsaggregometrie	26
3.1.5 Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie	27
3.1.6 Flusskammerversuche	27
3.2 In Vivo Versuche	30

3.2.1	Mauslinien und Behandlungsschema	30
3.2.2	Eisen(III)Chlorid-Modell	30
3.2.3	Histologische Analyse der murinen Thromben	31
3.3	Statistische Auswertung	31
4	Ergebnisse	33
4.1	Patientenkollektiv	33
4.2	Thrombozytenaktivität unter statischen Bedingungen	34
4.3	Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation unter Flussbedingungen.	36
4.3.1	Flusskammerversuche auf Kollagen.....	36
4.3.2	Flusskammerversuche auf humanem Plaquematerial	39
4.4	Thrombusformation in vivo	40
4.5	FXa-vermittelte Aktivierung des PAR-1 Rezeptors	44
5	Diskussion	45
5.1	Thrombozytenaktivität unter Rivaroxaban-Therapie	45
5.2	Einfluss von Rivaroxaban unter statischen Bedingungen.....	45
5.3	Einfluss von Rivaroxaban unter Flussbedingungen (in vitro und in vivo).....	46
5.4	Antithrombotischer Effekt durch Inhibierung eines PAR-1-Signalwegs.....	47
5.5	Limitationen der Studie	48
6	Zusammenfassung.....	50
7	Literaturverzeichnis	52
8	Danksagung.....	57
9	Anhang	58
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	58
9.2	Tabellenverzeichnis	60
9.3	Lebenslauf.....	61
9.4	Publikationsliste	62
10	Eidesstattliche Versicherung.....	63

Verzeichnis der Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ANNEXA	Andexanet Alfa, a Novel Antidote to the Anticoagulation Effects of Factor-Xa Inhibitors
ARISTOTLE	Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation
ASS	Acetylsalicylsäure
ATLAS 2-TIMI 51	Anti-Xa Therapy to Lower Cardiovascular Events in Addition to Standard Therapy in Subjects with Acute Coronary Syndrome- Thrombolysis in Myocardial Infarction 51
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
CRP	Collagen-related Peptide
CYP2J2	Cytochrome P450 2J2
CYP3A4/5	Cytochrome P450 3A4/5
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOAK	direkte orale Antikoagulantien
EHRA	European Heart Rhythm Association
EKG	Elektrokardiogramm
EMA	European Medicine Agency
g	Gramm
GPIb(α)	Glycoprotein Ib α
GPVI	Glycoprotein VI
HSA	Humanes Serum Albumin
INR	International Normalized Ratio
KHK	koronare Herzerkrankung
LAE	Lungenarterienembolie
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter
NOAK	neue orale Antikoagulantien

pAVK	peripher arterielle Verschlusskrankheit
PPSB	Prothrombinkonzentrat
RE-LY	Randomized Evaluation of Long-term Anticoagulant Therapy Study
ROCKET-AF	Rivaroxaban Once Daily Oral Factor Xa Inhibition Compared with Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation
TVT	tiefe Venenthrombose
VKA	Vitamin-K-Antagonisten
vWF	von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

1.1 Vorhofflimmern

1.1.1 Einführung und Definition

Bei einem herzgesunden Menschen wird der Herzrhythmus vom Sinusknoten vorgegeben. Vom Sinusknoten aus wird die elektrische Erregung über das Reizleitungssystem der Vorhofmuskulatur auf den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) übertragen. Vom AV-Knoten aus wird der Impuls weiter zum His-Bündel geleitet, welches sich weiter distal in einen linken und rechten Tawaraschenkel aufteilt. Die Tawaraschenkel ziehen in Richtung Apex und zweigen sich dort weiter auf. Von den Endaufzweigungen, den Purkinjefasern, wird die Erregung schließlich auf die Kammermuskulatur übertragen.

Vorhofflimmern stellt eine supraventrikuläre Herzrhythmusstörung dar. Hierbei kommt es zu einer ungeordneten Erregung des Vorhofs, die nicht vom Sinusknoten ausgeht. Häufig sind mehrere Erregungsfoci im Vorhof verteilt. Hierbei befinden sich die genannten Foci am häufigsten im Mündungsbereich der Pulmonalvenen (1). Die ungeordneten Erregungsimpulse führen dabei zu einer sehr schnellen Vorhoffrequenz von bis zu 350-600/min. Dank der Filterfunktion des AV-Knotens werden nur ein Teil der elektrischen Impulse auf die Herzkammer übertragen, wodurch ein unregelmäßiger Herzschlag entsteht. Im Rahmen des Vorhofflimmerns kann es zu einer Tachyarrhythmia absoluta mit Kammerfrequenzen zwischen 100-150/min oder auch zu einer Bradyarrhythmia absoluta mit Frequenzen unter 60/min kommen.

1.1.2 Epidemiologie und klinische Bedeutung

Weltweit litten 2010 etwa 20.9 Millionen Männer und 12.6 Millionen Frauen an Vorhofflimmern. Sowohl Inzidenz als auch Prävalenz waren hierbei in Industrienationen höher als in Entwicklungsländern (2). In Europa allein waren es 2010 in der Altersgruppe über 55 Jahre etwa 8.8 Millionen Patienten. Die Prävalenz der Erkrankung steigt dabei in Abhängigkeit des Alters. So konnte man in Europa bei Patienten zwischen 55 und 59 Jahren eine Prävalenz von 1,3% bei Männern und 1,7% bei Frauen feststellen, bei Patienten über 85 Jahren stieg die Prävalenz bei Männern

auf 24.2% und bei Frauen auf 16.1%. Schätzungen zu Folge könnte die Zahl an europäischen Patienten über 55 Jahren bis 2060 sogar auf 17.9 Millionen steigen (3). Vorhofflimmern zählt zu den häufigsten Ursachen für Schlaganfälle, Herzinsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit (4). Schlaganfälle entstehen dabei durch Thromben, die vordergründig im linken Vorhof entstehen, über den linken Ventrikel in die arterielle Blutbahn und schließlich in die arterielle Versorgung des Hirns gelangen können. Bei der Entstehung der Thromben spielt die Reduktion der Flussgeschwindigkeit des Blutes im Bereich des linken Vorhofs eine entscheidende Rolle. Die Blutstase ist bedingt durch die hohe Vorhoffrequenz mit der damit verbundenen abnehmenden Kontraktilität des Vorhofs. Auch andere Aspekte der Virchowschen Trias können anteilig an der Thrombenentstehung beteiligt sein (5, 6). Das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden verfünffacht sich bei Patienten mit Vorhofflimmern. Bestehen zudem noch weitere kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B. koronare Herzerkrankungen, arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz) kann sich das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden zusätzlich verdoppeln oder sogar verdreifachen. Bei Patienten zwischen 80 und 89 Jahren ist Vorhofflimmern als alleinige kardiovaskuläre Erkrankung zu nennen, die das Auftreten eines Schlaganfall als Einzelfaktor erheblich steigern kann (7). Auch die Gesamtmortalität steigt bei Patienten mit Vorhofflimmern um das Doppelte bis Dreifache (8). Schlaganfälle und schwere Blutungen sind hierbei für 9.8% aller Todesfälle verantwortlich (9).

Gesundheitsökonomisch stellt Vorhofflimmern aufgrund der oben genannten Punkte für das öffentliche Gesundheitssystem eine große finanzielle Belastung dar.

1.1.3 Diagnostik

Um die Diagnose Vorhofflimmern zu sichern eignet sich ein 12-Kanal Elektrokardiogramm (EKG). Hier kann in der Regel keine P-Welle eindeutig abgegrenzt werden, die RR-Intervalle sind absolut unregelmäßig. Um ein nur intermittierend auftretendes Vorhofflimmern zu diagnostizieren kann ein (im besten Falle mehrtägiges) Langzeit-EKG zur Sicherung der Diagnose sinnvoll sein. Eine Vorhofflimmer-Episode ist definiert als Vorhofflimmern, das über einen Zeitraum von mindestens 30s besteht und über ein 12-Kanal-EKG oder intrakardiales Elektrogramm aufgezeichnet wird (10, 11).

Typischen Symptome bei Patienten sind Palpitationen, unregelmäßiger Puls, innere Unruhe und Schwindel bis hin zur Synkope. Auch Symptome und Zeichen einer Herzinsuffizienz können auftreten. Das häufige Fehlen von Symptomen (in ca. 1/3 der Fälle) kann die Diagnosestellung jedoch ungemein erschweren. Selbst bei sonst symptomatischen Patienten sind asymptomatische („stille“) Vorhofflimmer-Episoden häufig (12, 13).

Der Schweregrad der durch Vorhofflimmern verursachten Symptome wird mittels der European Heart Rhythm Association (EHRA)-Klassifikation ausgedrückt. Man unterscheidet hiermit Patienten, die keinerlei Symptome aufweisen bis hin zu Patienten, die massive Symptome aufweisen und dadurch die gewohnten alltäglichen Anstrengungen nicht mehr bewerkstelligen können (14).

Bezeichnung	Symptome	Definition
EHRA I	Keine	
EHRA II	Milde Symptome	Normaler Alltag nicht beeinträchtigt
EHRA III	Schwere Symptome	Normaler Alltag beeinträchtigt
EHRA IV	Massive Symptome	Normaler Alltag in gewohnter Form nicht umsetzbar

Tabelle 1: EHRA-Klassifikation (14)

1.1.4 Klassifikation

Unterschiedliche Vorhofflimmer-Subtypen werden nach Häufigkeit und Dauer des Auftretens, sowie nach Spontankonversion der Vorhofflimmer-Episoden gemeinhin in fünf unterschiedliche Gruppen unterteilt:

- *Erstmalig diagnostiziertes Vorhofflimmern:* Bei jedem Patienten, der sich erstmalig mit Vorhofflimmern vorstellt spricht man von einem erstmalig diagnostizierten Vorhofflimmern, unabhängig von Dauer der Rhythmusstörung und eventuell auftretenden Symptomen.

- *Paroxysmales Vorhofflimmern:* Von paroxysmalem Vorhofflimmern spricht man dann, wenn es zu einer Spontankonversion (meist innerhalb von 48 Stunden) in einen Sinusrhythmus innerhalb von sieben Tagen kommt. Auch wenn innerhalb von sieben Tagen nach Auftritt der Episode eine Elektrokardioversion durchgeführt wird kann definitionsgemäß von paroxysmalem Vorhofflimmern gesprochen werden.
- *Persistierendes Vorhofflimmern:* Wenn Vorhofflimmern länger als sieben Tage anhält, dann spontankonvertiert oder nur mittels Elektrokardioversion oder medikamentöser Rhythmisierung beendet werden kann, bezeichnet man dies als persistierendes Vorhofflimmern.
- *Lang-anhaltendes persistierendes Vorhofflimmern:* Wenn Vorhofflimmern länger als 12 Monate anhält, man aber weiterhin eine Rhythmisierung anstrebt, spricht man von lang-anhaltendem persistierendem Vorhofflimmern.
- *Permanentes Vorhofflimmern:* Wenn Vorhofflimmern seitens des Patienten und des behandelnden Arztes akzeptiert wird und keine Rhythmisierung mehr angestrebt wird bezeichnet man dies als permanentes Vorhofflimmern. Sollte diese Entscheidung im Verlauf revidiert und doch eine Rhythmisierung angestrebt werden müsste das Vorhofflimmern ab diesen Moment an folglich wieder als lang-anhaltend persistierend bezeichnet werden.

Zu erwähnen gilt, dass die Unterscheidung zwischen paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern ohne Zugang zu Langzeit-Monitorüberwachungen oft falsch ist. Sollte bei einem Patienten Vorhofflimmern sowohl paroxysmal, als auch persistierend auftreten sollte die prädominante Auftretungsform für die Klassifizierung herangezogen werden (15-17).

1.1.5 Stratifizierung des Schlaganfallrisikos mittels CHA₂DS₂-VASc-Scores

Der CHA₂DS₂-VASc-Score hilft bei der Abschätzung des individuellen Schlaganfall-Risikos bei Patienten, die an Vorhofflimmern leiden. Das Scoresystem setzt sich aus verschiedenen Risikofaktoren zusammen, die in die Errechnung des Gesamtscores eingehen.

Ein Alter über 75 Jahre, sowie ein vorangegangener Schlaganfall (hier zählt bereits eine transitorische ischämische Attacke als Schlaganfall) gehen aufgrund ihrer großen Bedeutung als Risikofaktor für einen Schlaganfall mit jeweils zwei Punkte in die Berechnung ein. Mit jeweils einem Punkt werden einberechnet: eine bestehende

Herzinsuffizienz, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, atherosklerotische Vorerkrankungen (Myokardinfarkt in der Vorgeschichte, eine schwer verkalkte Aorta, oder eine periphere arterielle Verschlusskrankheit), ein Lebensalter zwischen 65 und 74 Jahren, sowie das weibliche Geschlecht. Der errechnete CHA₂DS₂-VASc-Score hilft bei der Indikationsstellung zur therapeutischen Antikoagulation.

Risikofaktor	Punktezahl
C – Congestive Heart Failure	1
H – Hypertension	1
A₂ – Age ≥ 75 yrs	2
D – Diabetes mellitus	1
S₂ – Stroke or TIA	2
V – Vascular disease	1
A – Age 65-74 yrs	1
Sc – Sex category (female)	1

Tabelle 2: Berechnung des CHA₂DS₂-VASc-Scores (18)

Weist ein Patient keinerlei klinische Risikofaktoren auf einen Schlaganfall zu erleiden (CHA₂DS₂-VASc-Score 0), so kann von einer Antikoagulation abgesehen werden. Wenn ein Patient nur einen klinischen Risikofaktor aufweist (Zum Beispiel ein CHA₂DS₂-VASc-Score von 1 bei einem Mann oder 2 bei einer Frau), so sollte man unter Einbeziehung des Blutungsrisikos individuell abwägen ob der Patient von einer Antikoagulation profitiert. Bei einem CHA₂DS₂-VASc-Score von 2 bei Männern und 3 bei Frauen ist eine Antikoagulation in jedem Falle empfohlen (4).

1.2 Therapie

1.2.1 Rhythmus- und Frequenzkontrolle

Die Rhythmuskontrolle hat zum Ziel, das Vorhofflimmern in einen Sinusrhythmus zu konvertieren. Medikamentös stehen einem hierzu Klasse-Ic-Antiarrhythmika (Flecainid, Propafenon) und Klasse-III-Antiarrhythmika (Amiodaron, Dronedaron) zur Verfügung. An interventionellen Eingriffen ist vor allem die Katheterablation

hervorzuheben. Hierbei wird eine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt und nach Auffinden des Bildungsortes für das Vorhofflimmern eine Ablation durchgeführt. Vermutet man den Ursprungsort der Erregung im Mündungsbereich der Pulmonalvenen, so kann eine Pulmonalvenenisolation sinnvoll sein. Diese kann entweder mittels einer Hochfrequenz- oder einer Kryoablation durchgeführt werden. Bei der Frequenzkontrolle strebt man die Normalisierung der Herzfrequenz an. Zum Einsatz kommen hierbei vor allem Beta-Blocker oder auch Kalziumantagonisten vom Verapamil-Typ. Eskaliert werden kann die Therapie mit Herzglykosiden und Amiodaron (4).

Hauptziel der Rhythmus- und Frequenzkontrolle stellt die Symptomlinderung dar. Ein Unterschied hinsichtlich der Mortalität besteht zwischen den beiden Therapiekonzepten nicht (19).

1.2.2 Antikoagulation

Aufgrund des erhöhten Risikos für das Auftreten thromboembolischer Ereignisse ist bei Patienten mit einem relevanten CHA₂DS₂-VASc-Score eine orale Antikoagulation indiziert. Hauptziel der Antikoagulation ist daher die Vermeidung ebensolcher Ereignisse. Aufgrund der gerinnungshemmenden Wirkung geht mit der Einnahme einer oralen Antikoagulation ein erhöhtes Blutungsrisiko einher.

1.2.3 Vitamin-K-Antagonisten

Über Jahre hinweg waren Vitamin-K-Antagonisten (VKA) wie Phenprocoumon und Warfarin die einzigen oralen Blutgerinnungshemmer, die zur Prävention von Schlaganfällen und anderen thromboembolischen Ereignissen bei Vorhofflimmer-Patienten zum Einsatz kamen. Hierbei konnte in einer Meta-Analyse von Hart et al. gezeigt werden, dass Vorhofflimmer-Patienten unter Therapie mit einem VKA ein um 60% reduziertes Risiko zeigen einen Schlaganfall zu erleiden. Die Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern allein senkt das Schlaganfallrisiko bei Vorhofflimmer-Patienten um lediglich 20% (20).

Vitamin-K-Antagonisten wirken indem sie die Vitamin-K-abhängige γ -Carboxylierung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X als kompetitiver Antagonist hemmen. Damit wird sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Weg der Gerinnungskaskade

entscheidend inhibiert. Neben der Inhibition der γ -Carboxylierung der oben genannten Gerinnungsfaktoren wird zudem die ebenfalls Vitamin-K-abhängige Synthese der Proteine C und S in der Leber gehemmt. Selbige werden bei der Fibrinolyse benötigt.

Die blutverdünnende Wirkung von VKA wird heutzutage meist mittels laborchemischer Bestimmung des International Normalized Ratio (INR) kontrolliert und überwacht. Hierbei ist bei Vorhofflimmern in der Regel ein Ziel-INR-Wert von 2.5 (bzw. zwischen 2 und 3) empfehlenswert (21). Die Kontrolle des INR-Wertes und – sofern notwendig – die Anpassung der Dosis des VKA obliegt dem behandelnden Arzt. Allerdings ist nach entsprechender Schulung auch ein INR-Selbstmanagement seitens des Patienten möglich, was eine sichere Methode für passende Patienten in allen Altersgruppen darstellt (22). Insgesamt ist die Steuerbarkeit der blutverdünnenden Wirkung von Vitamin K Antagonisten jedoch schwierig. In einer 2015 publizierten Register-Studie betrug der Zeitanteil, in dem sich der INR im Zielbereich befand, nur $65\% \pm 20\%$. Zudem zeigte sich, dass gerade bei Patienten mit hohen Risikofaktoren für die Entstehung von Schlaganfällen und für das Auftreten von Blutungen der Zeitanteil, in dem sich der INR im Zielbereich befand, besonders niedrig war (23). Nachdem bei einem Zeitanteil von unter 65% eine Verdopplung der Auftretungswahrscheinlichkeit von Schlaganfällen, schweren Blutung, intrakraniellen Blutungen und Todesfällen beschrieben ist, ist gerade bei gefährdeten Patienten eine häufige und regelmäßige INR-Messung obligat (24).

Weiterhin können Vitamin-K-Antagonisten vielerlei Interaktionen mit anderen Medikamenten und auch Lebensmittel aufweisen, was die Einstellung und Überwachung der Zieldosis zusätzlich erschweren kann. So kann es zu Interaktionen mit Antibiotika, nicht-steroidalen Antirheumatika, oder auch Protonenpumpeninhibitoren kommen. Nicht zuletzt können auch Lebensmittel wie zum Beispiel grünes Gemüse, grüner Tee und Salate die Wirkung der VKA verändern (25).

Um die Wirkung von VKA zu unterbrechen ist, nachdem es sich um einen kompetitiven Antagonisten handelt, die orale oder intravenöse Substitution von Vitamin K möglich. Da die Neusynthese Vitamin-K-abhängiger Gerinnungsfaktoren jedoch Zeit benötigt ist der Effekt der Vitamin K-Gabe zeitverzögert zu beobachten. Auch ist von

entscheidender Bedeutung ob Vitamin K oral oder intravenös verabreicht wurde, da eine schnellere Wirkung bei der intravenösen Gabe festgestellt werden konnte. Oral gegebenes Vitamin K erreichte erst nach 24 Stunden eine zufriedenstellende Umkehr der blutverdünnenden Wirkung von VKA (26). Sofern eine lebensbedrohliche Blutung auftritt oder die Umkehr der blutverdünnenden Wirkung eines VKA aus anderen Gründen deutlich schneller erreicht werden muss besteht zudem die Möglichkeit Vitamin-K-abhängige Gerinnungsfaktoren in Form von humanen Plasmaprodukten oder auch Prothrombinkonzentrat (PPSB) zu verwenden (27).

1.2.4 Neue orale Antikoagulantien (NOAK)

In Anbetracht der oben genannten Besonderheiten und Probleme, die mit einer VKA-Therapie einhergehen, wurde in den letzten Jahrzehnten umfassend nach einer alternativen Möglichkeit zur sicheren Blutverdünnung bei Vorhofflimmer-Patienten geforscht.

Die sogenannten neuen oralen Antikoagulantien (NOAK) haben gemeinsam, dass es sich im Gegensatz zu VKA um direkte Inhibitoren eines Gerinnungsfaktors handelt. Aus diesem Grund werden die NOAK aktuell auch häufig als direkte orale Antikoagulantien (DOAK) bezeichnet. Zu den in Deutschland zugelassenen NOAK zählt der direkte Thrombin-Inhibitor Dabigatran (Pradaxa®, Boehringer Ingelheim), sowie die direkten Faktor-Xa-Inhibitoren Rivaroxaban (Xarelto®, Bayer AG), Apixaban (Eliquis®, Bristol-Myers Squibb) und Edoxaban (Lixiana®, Daichi Sankyo Deutschland GmbH).

1.2.4.1 Direkter Thrombininhibitor

Dabigatran etexilate stellt den einzigen in Deutschland zugelassenen direkten Thrombininhibitor dar, der oral eingenommen werden kann. Das Medikament wurde 2008 zur Thromboseprophylaxe nach elektivem chirurgischen Hüft- oder Kniegelenkersatz in Deutschland zugelassen. Die Zulassung wurde auf den Einsatz zur Prävention eines thromboembolischen Ereignissen bei nicht-valvulärem Vorhofflimmern im Jahre 2011 erweitert. In der RE-LY-Studie konnte gezeigt werden, dass bei Einnahme von Dabigatran in der Dosis von 110mg zweimal täglich eine ähnlich hohe Rate an thromboembolischen Ereignissen und weniger schwere Blutungen im Vergleich zu Warfarin auftreten. In der Dosis von 150mg zweimal täglich

konnte die Häufigkeit von thromboembolischen Ereignissen im Vergleich zu Warfarin sogar gesenkt werden. Hierbei war die Anzahl an schweren Blutungskomplikationen jedoch wieder der unter Warfarin-Therapie ähnlich (28).

1.2.4.2 Direkte Faktor-Xa-Inhibitoren

Seit 2014 ist der unter dem Handelsnamen Eliquis® bekannte Wirkstoff Apixaban EU-weit zur Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei nicht-valvulärem Vorhofflimmern zugelassen. Zur Zulassung des direkten Faktor-Xa-Inhibitors hatte hierbei die ARISTOTLE-Studie geführt, welche zeigen konnte, dass eine Apixaban-Therapie bei Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern Warfarin in der Vermeidung von Schlaganfällen und systemischen Embolien überlegen ist. Zudem war in der Apixaban-Gruppe eine niedrigere Mortalität zu beobachten (29).

Der unter dem Handelsnamen Lixiana® bekannte Wirkstoff Edoxaban stellt einen weiteren Faktor-Xa-Inhibitor dar und ist seit 2015 europaweit zur Prophylaxe von thromboembolischen Ereignissen bei nicht-valvulärem Vorhofflimmern zugelassen. Auch hier konnte in der Zulassungsstudie gezeigt werden, dass Edoxaban das Risiko einen Schlaganfall oder eine systemische Embolie zu erleiden ebenso effektiv hemmt wie Warfarin. Jedoch war in der Edoxaban-Gruppe die Anzahl an Patienten, die Blutungen boten oder an einem kardiovaskulären Ereignis starben signifikant reduziert (30).

Da Rivaroxaban in der hier vorliegenden Arbeit einen besonderen Stellenwert innehält, wird selbiger Wirkstoff gesondert aufgeführt und detailliert erklärt (s.u.).

1.2.4.3 Antidot

Nach Markteinführung der NOAK gab es zunächst kein verfügbares Antidot. Erst 2016 wurde in Deutschland das erste Antidot für ein NOAK zugelassen. Hierbei handelt es sich um den Wirkstoff Idarucizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper, welcher unter dem Handelsnamen Praxbind® verfügbar ist und von Boehringer Ingelheim vertrieben wird. In der Studie, die zur Zulassung führte, zeigte sich, dass die gerinnungshemmende Wirkung von Dabigatran nach Gabe von Idarucizumab innerhalb von Minuten aufgehoben werden kann (31). Indiziert ist die Idarucizumab-

Gabe bei nicht beherrschbaren oder lebensbedrohlichen Blutungen oder notwendigen Notfalloperationen.

Für die oben genannten Faktor-Xa-Inhibitoren wurde erst im Jahre 2019 das Antidot Andexanet alfa, ein biotechnologisch erzeugtes, strukturell mit Faktor Xa verwandtes Protein, welches unter dem Handelsnamen Ondexxya® von der Firma Portola Netherlands B.V. vertrieben wird, europaweit zugelassen. In den ANNEXA-Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Andexanet alfa die Anti-Faktor-Xa-Aktivität suffizient senkt. Bei über 80% der Patienten konnte nach zwölf Stunden eine gute oder sogar exzellente hämostatische Wirkung von Andexanet alfa festgestellt werden (32). Aktuell handelt es sich noch um eine bedingte Zulassung als Gegenmittel bei schweren Blutungen unter Rivaroxaban und Apixaban, da aus Sicht der europäischen Zulassungsbehörde (European Medicines Agency) die Datenlage zur Aufhebung der Wirkung von anderen Faktor-Xa-Inhibitoren, wie zum Beispiel Edoxaban, noch nicht ausreiche. Weiterhin müsse das möglicherweise erhöhte Risiko (zum Beispiel für Thrombosen) für Patienten nach Gabe von Andexanet alfa weiter untersucht werden (33).

1.3 Rivaroxaban

1.3.1 Indikationen und Dosierungen

Rivaroxaban wurde 2008 zur Thromboseprophylaxe nach Implantation einer Hüft- und Kniegelenksprothesen zugelassen, nachdem gezeigt werden konnte, dass mit Rivaroxaban verglichen mit Enoxaparin eine signifikant bessere Thromboseprophylaxe erreicht werden konnte (34). Hierbei wird empfohlen Rivaroxaban 6-10 Stunden postoperativ in der Dosis von 10mg einmal täglich zu beginnen. Nach Hüftoperationen sollte die Einnahmedauer der Thromboseprophylaxe fünf Wochen betragen, nach Knieoperationen zwei Wochen (35).

Im Jahre 2011 folgte die Erweiterung der Zulassung von Rivaroxaban für die Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei nicht-valvulärem Vorhofflimmern bei Patienten mit einem oder mehreren Risikofaktoren (s.o. unter CHA₂DS₂-VASc-Score). Die empfohlene Dosis beträgt hier 20mg einmal täglich. Bei einer Kreatinin-Clearance kleiner als 50, aber größer als 15ml/min wird eine Dosisreduktion auf 15mg einmal täglich empfohlen. Bei einer leichten Nierenfunktionseinschränkung (Kreatinin-Clearance >50ml/min) ist keine

Dosisanpassung erforderlich. Bei einer Nierenfunktionseinschränkung mit einer Kreatinin-Clearance unter 15ml/min ist eine Rivaroxaban-Therapie kontraindiziert (36). Ebenfalls im Jahr 2011 erfolgte die Zulassung für Rivaroxaban zur Behandlung der akuten tiefen Venenthrombose (TVT) und zur Prävention rezidivierend auftretender TVT und Lungenarterienembolien (LAE) durch die europäische Arzneimittelagentur. Bei einer akuten TVT ist innerhalb der ersten drei Wochen 15mg Rivaroxaban zweimal täglich einzunehmen. Anschließend ist die einmal tägliche Einnahme von 20mg ausreichend. Die Therapiedauer ist individuell unterschiedlich und abhängig von verschiedenen Risikofaktoren, sollte aber mindestens drei Monate betragen. Auch hier ist eine Dosisanpassung auf 15mg einmal pro Tag bei einer Kreatinin-Clearance von 15-50ml/min indiziert. Das Behandlungsregime in den ersten drei Wochen ändert sich dabei jedoch nicht (36).

Bei einer rezidivierenden TVT oder LAE sollte nach erneutem Ereignis zunächst mindestens sechs Monate 20mg einmal täglich eingenommen werden. Anschließend kann eine Dosisreduktion auf 10mg einmal täglich erwogen werden. Sollte das Risiko für eine rezidivierenden TVT oder LAE jedoch als hoch eingeschätzt werden (z.B. durch komplizierte Komorbiditäten) ist die Prophylaxe in der Dosis von 20mg einmal täglich fortzuführen. Abermalig wäre hier eine Dosisanpassung erforderlich, wenn der zu behandelnde Patient eine Nierenfunktionseinschränkung mit einer Kreatinin-Clearance von 15-50ml/min aufweist. Bei der Einnahme von 10mg einmal täglich ist keine Dosisanpassung erforderlich (36).

Im Jahre 2012 wurde die Zulassung von Rivaroxaban zudem für die Behandlung einer akuten LAE erweitert. Hierbei ist Rivaroxaban genauso einzunehmen wie bei einer akuten tiefen Venenthrombose (s.o.) (36). Die Zulassung erfolgte hierbei auf dem Boden der Einstein-PE-Studie, die zeigen konnte, dass die Therapie mit einer Einmalgabe Rivaroxaban der Standardtherapie (bestehend aus Heparin und Vitamin-K-Antagonisten) nicht unterlegen ist. Anzumerken ist dabei, dass die Anzahl an schweren Blutungen unter Rivaroxaban (1.1% der Patienten) im Vergleich zur Standardtherapie (2.2% der Patienten) signifikant niedriger war (37).

Zusätzlich zu den oben genannten Indikationen ist Rivaroxaban seit 2018 für die Prophylaxe atherothrombotischer Ereignisse nach einem akuten Koronarsyndrom mit erhöhten kardialen Biomarkern EU-weit zugelassen. Hierbei wird Rivaroxaban in einer

Dosis von 2.5mg zweimal täglich eingenommen. Kombiniert wird die Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) allein, oder mit ASS und einem weiteren Thrombozytenaggregationshemmer (z.B. Clopidogrel). Bei der Therapie sollte regelmäßig eine Nutzen-Risiko-Abwägung in Hinblick auf ischämische Ereignisse und Blutungsrisiko erfolgen. Weiterhin sollte eine Fortführung der Therapie über 24 Monate hinweg kritisch diskutiert werden, da es hierzu nur begrenzte Erfahrungen gibt (38). Auch bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung (KHK) oder einer peripher arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) und hohem Risiko für ischämische Ereignisse ist Rivaroxaban in der Dosierung 2,5mg zweimal täglich zur Prophylaxe atherothrombotischer Ereignisse in Kombination mit ASS seit 2018 zugelassen (38). Die Erweiterung der Zulassung basiert hier auf der COMPASS-Studie, in der 27395 Patienten mit stabiler atherosklerotischer Gefäßerkrankung randomisiert in die folgenden drei Studienarme aufteilt wurden: Eine Gruppe erhielt Rivaroxaban (2,5mg zweimal täglich) in Kombination mit ASS (100mg einmal täglich), eine andere Gruppe erhielt Rivaroxaban (5mg zweimal täglich) als Monotherapie und eine dritte alleinig ASS (100mg einmal täglich). Bei deutlicher Überlegenheit der Kombinationstherapie aus Rivaroxaban und ASS wurde die Studie frühzeitig nach einem durchschnittlichen follow-up von 23 Monaten beendet. Es hatte sich ein signifikanter Überlebensvorteil in dieser Gruppe gezeigt (39).

1.3.2 Wirkmechanismus

Rivaroxaban, ein Oxazolidinon-Derivat, ist ein direkter, reversibler und selektiver Inhibitor des Gerinnungsfaktors Xa. Hierbei bindet Rivaroxaban im Bereich der S1-Tasche des Faktors Xa und hemmt damit die Funktion desselben. Rivaroxaban kann dabei sowohl freien, als auch im Prothrombinasekomplex (bestehend aus Faktor Va, Xa, Calciumionen und gerinnungsaktive Phospholipide) gebundenen Faktor Xa hemmen. Die Plasmaproteinbindung (vor allem an Albumin) ist beim Menschen mit ca. 92-95% sehr hoch (40).

1.3.3 Pharmakokinetik

Rivaroxaban wird enteral resorbiert und weist mit 80-100% eine hohe Bioverfügbarkeit auf. Das Molekulargewicht beträgt 436g/mol. Die Ausscheidung erfolgt etwa zu zwei Drittel als inaktiver Metabolit. Hiervon wird die Hälfte renal und die andere Hälfte über

die Fäzes ausgeschieden. Das letzte Drittel wird als aktive Substanz über den Urin (damit also wieder renal) ausgeschieden. Die maximale Wirkung tritt bereits nach zwei bis vier Stunden auf, die Halbwertszeit beträgt zwischen sieben und elf Stunden (36, 40, 41). Nachdem Rivaroxaban oxidativ und hydrolytisch mittels einer Vielzahl von Enzymen (darunter auch CYP3A4/3A5 und CYP2J2) verstoffwechselt wird, sind Interaktionen mit anderen Medikamenten seltener zu erwarten (42). Starke CYP3A4-Inhibitoren können jedoch die Elimination von Rivaroxaban verlangsamen, CYP3A4-Induktoren können selbige entsprechend beschleunigen. Eine gemeinsame Gabe mit Rivaroxaban sollte bei den genannten Substanzen somit mit Vorsicht erfolgen (36).

1.3.4 Unerwünschte Wirkungen und Kontraindikationen

Zu den häufigsten unerwünschten Wirkungen zählen Blutungen (hierbei kam es am häufigsten zu Epistaxis und Blutungen im Gastrointestinaltrakt). Zu Hypotonien, Pruritus, Fieber, peripheren Ödemen, einer verminderten Leistungsfähigkeit und einem Anstieg der Transaminasen oder Nierenretentionsparametern kommt es ebenfalls häufig. Selten kommt es unter der Einnahme von Rivaroxaban zu einer Hepatitis, einer toxisch epidermalen Nekrolyse oder auch einer anaphylaktischen Reaktion bis hin zum anaphylaktischen Schock (36).

Zu den Kontraindikationen zählt neben der bereits oben genannten schweren Niereninsuffizienz (Kreatinin-Clearance $<15\text{ml/min}$) auch eine schwere Lebererkrankung, einschließlich Leberzirrhosen des Schweregrads Child Pugh B und C. Auch eine Überempfindlichkeit gegenüber dem Wirkstoff oder sonstiger in dem Medikament enthaltenen Bestandteile stellt eine Kontraindikation dar. Nachdem es sich bei Rivaroxaban um ein gerinnungshemmendes Medikament handelt, sollte es bei klinisch relevanten, akuten Blutungen nicht zum Einsatz kommen (43).

1.3.5 Der Einfluss Rivaroxabans auf das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse

In der im Jahr 2011 im New England Journal of Medicine publizierten ROCKET-AF-Studie (44) wurde die Effizienz und Sicherheit von Rivaroxaban im Vergleich zu Warfarin bei Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern untersucht. Bei der Doppelblindstudie wurden insgesamt 14.264 Patienten aus 45 verschiedenen Ländern

eingeschlossen. Die Patienten wurden auf zwei Therapiearme randomisiert verteilt. Die Patienten erhielten in einem Therapiearm 20mg Rivaroxaban (oder 15mg pro Tag bei Patienten mit einer Kreatinin-Clearance zwischen 30-49ml/min) pro Tag und in einem zweiten dosis-adaptiert Warfarin (Ziel-INR 2,0-3,0).

Die Studie konnte zeigen, dass Rivaroxaban einer Warfarin-Therapie in der Prophylaxe von Schlaganfällen oder systemischen Embolien nicht unterlegen ist. Unter der Rivaroxaban-Therapie traten entsprechende Ereignisse seltener als unter Warfarin-Therapie auf, ein signifikanter Unterschied zeigte sich aber nicht. Intrakranielle und tödliche Blutungen traten unter Rivaroxaban-Einnahme signifikant seltener auf als unter Warfarin-Therapie, gastrointestinale Blutungen jedoch häufiger. Aus den Daten der ROCKET-AF-Studie ließ sich zudem ableiten, dass Myokardinfarkte in der Rivaroxaban-Gruppe um 14% seltener auftraten (nicht signifikant) als in der Warfarin-Gruppe (45). In einer 2013 von Chatterjee et al. publizierten Metaanalyse (46), die neun, großangelegte Studien mit insgesamt 53.827 eingeschlossenen Patienten verglich, war die Rate an Myokardinfarkten unter Rivaroxaban-Einnahme verglichen mit verschiedenen Vergleichspräparaten sogar signifikant reduziert. Neben Daten aus der oben beschriebenen ROCKET-AF-Studie wurden in der Metaanalyse unter anderem auch Daten der ATLAS ACS 2-TIMI 51-Studie inkludiert. Hier erhielten Patienten nach einem akuten Koronarsyndrom zusätzlich zur Standard-Thrombozytenaggregationshemmung niedrigdosiertes Rivaroxaban (2,5mg zweimal täglich). Es zeigte sich auch hier eine signifikant reduzierte Rate an Myokardinfarkten in der Gruppe, in der zusätzlich Rivaroxaban eingenommen wurde (47). Die COMPASS-Studie (39) konnte zudem zeigen, dass es bei einer stabilen KHK zu einem besseren kardiovaskulären Outcome und Überleben kommt, wenn Patienten zusätzlich zur ASS-Therapie niedrigdosiertes Rivaroxaban (2,5mg zweimal täglich) eingenommen haben. Eine Überlegenheit gegenüber der Monotherapie mit ASS allein konnte bei höherer Rivaroxabandosis (5mg zweimal täglich) nicht gesehen werden. Hier waren Blutungskomplikation jedoch häufiger zu beobachten.

In Anbetracht der aktuellen Studienlage kann man also annehmen, dass die Einnahme von Rivaroxaban die Häufigkeit für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse positiv beeinflussen kann.

Der genaue Einfluss Rivaroxabans auf die Thrombozytenaggregation, -aktivierung und -adhäsion ist dabei jedoch noch nicht ausreichend verstanden.

1.4 Pathogenese der arteriellen Thrombose

Myokardinfarkte entstehen in den meisten Fällen dadurch, dass sich nach Erosion oder Ruptur eines atherosklerotischen Plaques im Bereich eines Koronargefäßes ein okkludierender Thrombus bildet (48). Das Risiko, dass ein Plaque rupturiert ist dabei abhängig von der Beschaffenheit, der Vulnerabilität und der Größe desselben (49). Bei der Ruptur eines Plaques nimmt die Endothelinintegrität Schaden und exponiert dadurch thrombogene, subendotheliale Matrixproteine wie Laminin, Kollagen und von-Willebrand-Faktor (vWF). Die Interaktion der freigelegten Matrixproteine mit Bestandteilen des Gerinnungssystems führt schließlich zur Thrombozytenrekrutierung, -adhäsion und -aktivierung. Die initiale Thrombozytenadhäsion entsteht dabei durch Bindung von GPIIb/IIIa an das freigelegten, kollagengebundenen, vWF (50). Durch die Bindung von GPIIb/IIIa mit vWF kann der Kollagen-Rezeptor GPVI mit seinem Liganden interagieren und dadurch die Thrombozytenaktivierung einleiten. Der Prozess wird unterstützt durch vor Ort produziertes Thrombin, sowie von prothrombogenen Granula wie Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan-A₂, welche von aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet werden. Eine starke Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten wird erst durch β 3-Integrine erreicht. Nach Stabilisierung und Organisation der Thrombozytenaggregate mittels Fibrinbildung entsteht schließlich ein stabiler Thrombus (50, 51). Abbildung 1 stellt schematisch sowohl die Thrombozytenadhäsion, als auch die nachgeschalteten, für die Entstehung eines stabilen Thrombus erforderlichen, Prozesse dar.

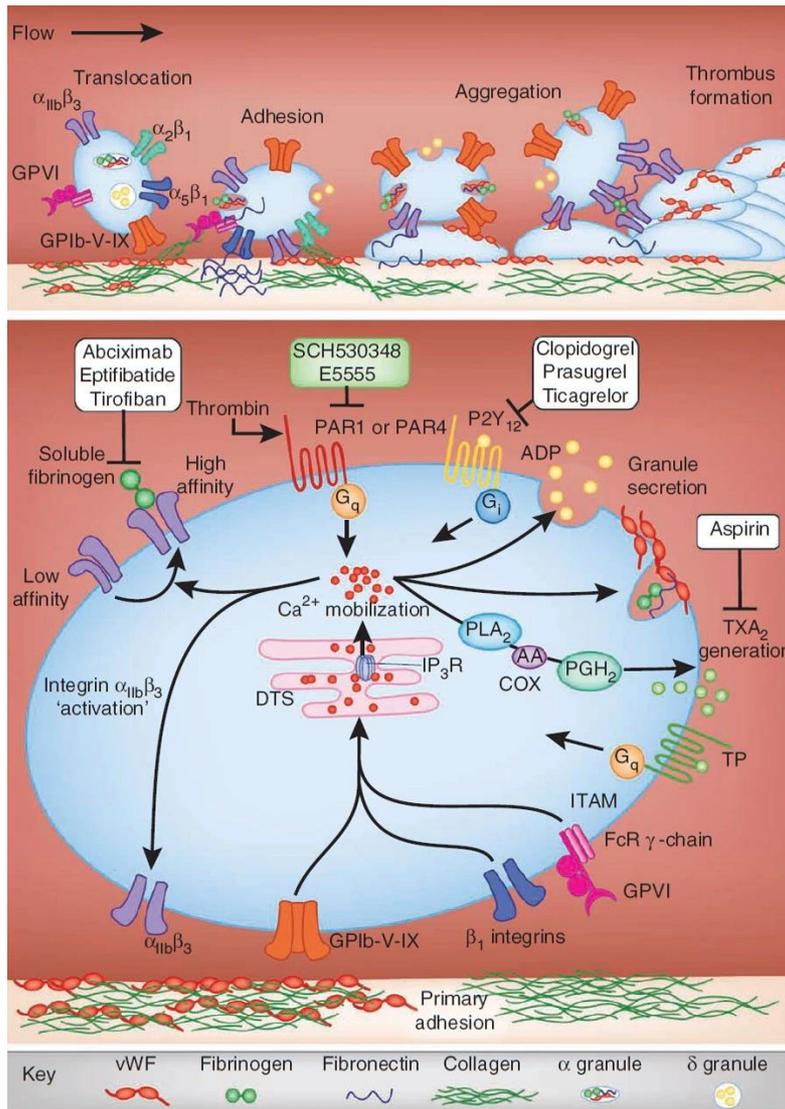


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Adhäsions- und Aktivierungsmechanismen der hämostatischen und prothrombotischen Wirkung der Thrombozyten. Gezeigt werden die wichtigsten Liganden und Rezeptoren, die die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten vermitteln. Im oberen Teil der Abbildung sieht man wie Thrombozyten mittels Interaktion des GPIb-V-IX-Komplexes mit kollagengebundenem vWF (im Subendothelium exponiert) im Bereich der Gefäßwandverletzung gebunden werden. Eine stabile Thrombozytenadhäsion wird durch die Bindung an fibrilläres Kollagen und durch Ligandierung mehrerer β_1 -Integrine erreicht. Nach stabiler Adhäsion durchlaufen Thrombozyten eine Reihe an biochemischen Veränderungen (unterer Teil der Abbildung), die zur Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und damit schließlich zur hochaffinen Interaktion mit Adhäsionsproteinen wie vWF, Fibrinogen und Fibronectin führen. Aktivierte Thrombozyten schütten (oder erzeugen lokal) lösliche Agonisten wie ADP, TXA₂ und Thrombin. Jeder Agonist kann dann spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an der Thrombozyten-Oberfläche aktivieren (dazu zählen ADP-P2Y₁, ADP-P2Y₁₂, TXA₂-TP und Thrombin-PAR1 oder Thrombin-PAR4), wodurch intrazelluläre Signalwege schließlich zu einer Kalziummobilisation führen. Gezeigt wird im unteren Anteil der Abbildung zudem Interaktionsstellen verschiedener Thrombozytenaggregationshemmer (52).

2 Fragestellung der Arbeit

Vorhofflimmern zählt zu den häufigsten Gründen für Schlaganfälle und andere kardiovaskuläre Ereignisse. Eine Vielzahl an Patienten benötigen daher weltweit eine orale Antikoagulation. Der Stellenwert der NOAK, zu denen auch Rivaroxaban zählt, nimmt dabei stetig zu.

Verschiedene Studien und Metaanalysen konnten zeigen, dass Rivaroxaban das Auftreten von Herzinfarkten reduziert. Die Pathophysiologie hinter diesem möglichen protektiven Effekt ist bisher nicht gut verstanden. Das Ziel meiner Arbeit ist die genauere Untersuchung des Einflusses von Rivaroxaban auf die Thrombozytenaggregation, -adhäsion und -aktivierung, sowie auf die Entstehung der arteriellen Thrombose.

Wir untersuchten hierzu die Thrombozytenfunktion von Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern unter Therapie mit Rivaroxaban im Vergleich mit gesunden Kontrollen ohne Einnahme einer oralen Antikoagulation. Die Thrombozytenaktivierung untersuchten wir unter Ruhebedingungen mittels Impedanzaggregometrie und Lichttransmissionsaggregometrie. Die Thrombusformation und Thrombozytenadhäsion untersuchten wir unter arteriellen Flussbedingungen auf kollagenbeschichteten Flusskammern. Um die in vivo ablaufenden Pathomechanismen der Thrombozytenadhäsion bestmöglich nachzuempfinden führten wir zudem Flusskammerversuche auf humanen Plaquematerial unter arteriellen Flussraten durch. Weiterhin untersuchten wir die Thrombenentstehung und -stabilität in vivo mittels eines Mausmodells. Ferner identifizierten wir die FXa-Spaltstellen auf PAR-1 mittels Massenspektrometrie.

3 Material und Methoden

3.1 In Vitro Versuche

3.1.1 Patientenkollektiv

In die Studie wurden insgesamt 53 Patienten eingeschlossen, die alle aufgrund von nicht-valvulärem Vorhofflimmern unter dauerhafter Rivaroxaban-Therapie standen. Als Kontrollgruppe rekrutierten wir außerdem 52 Freiwillige, die weder orale Antikoagulanzen noch Thrombozytenaggregationshemmer einnahmen. Aus organisatorischen Gründen konnten nicht alle Experimente mit allen Patienten durchgeführt werden.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit zusätzlicher Thrombozytenhemmung (zum Beispiel ASS oder ADP-Rezeptorblocker) oder Heparin-Therapie in den letzten 14 Tagen, pathologisch veränderte Blutwerte (Hämoglobin-Wert unter 10g/dl, Thrombozytenzahl unter 100×10^9 Zellen/l oder über 800×10^9 Zellen/l) oder einer ausgeprägten Leber- oder Niereninsuffizienz. Auch eine Tumorerkrankung verhinderte den Einschluss in die Studie.

Alle Studienteilnehmer haben mittels einer unterzeichneten Einverständniserklärung zugestimmt an der Studie teilzunehmen. Sie gaben mit der Unterschrift außerdem ihr Einverständnis zur Blutentnahme und zur Einsicht in ihre Krankenakte ab.

Zu jedem Patienten wurden Daten über Geschlecht, Alter, Diagnose (paroxysmales/ persistierendes/ permanentes Vorhofflimmern oder typisches/ atypisches Vorhofflattern) und Begleiterkrankungen erhoben. Bei jedem Patienten wurde nach Erheben der beschriebenen Daten der CHA₂DS₂-VASc-Score errechnet um das individuelle Risiko für die Entwicklung eines thromboembolischen Ereignisses abzuschätzen.

Die Genehmigung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität lag vor.

3.1.2 Probengewinnung

Jedem Patienten oder Freiwilligen wurden bis zu 40 ml Blut durch periphere Venenpunktion entnommen. Zur Verwendung kamen hierbei handelsübliche 21 G

Butterfly-Kanülen (BD Vacutainer® Safety-Lok, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und Blutentnahmeröhrchen (BD Vacutainer®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA, Volumen 2.7 ml, 0.1 M, 3.2% Trisodiumcitrat).

Neben mehreren Citrat-Röhrchen wurde außerdem ein Hirudin-Röhrchen (Antikoagulation mittels 0,045 mg Hirudin pro ml Blut, 2.7 ml, S-Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen. Lagen keine aktuellen laborchemischen Parameter vor, wurde die Blutentnahme durch ein Serum- (beschichtet mittels Silikat-Gerinnungsaktivator, 5.5 ml, S-Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) und EDTA-Röhrchen (Antikoagulation mittels Ethylendiaminzeetraazetat, 4.9 ml, S-Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) ergänzt.

Analysiert wurden die Blutproben im Routinelabor des Klinikums der Universität München.

3.1.3 Multiplate®-Analyse

Zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation wurde ein Multiplate®-Analyser (Roche) eingesetzt. Hierbei werden Blut und Reagenzien mit einer elektronischen Pipette in eine Einmalküvette pipettiert. Anschließend wird die Veränderung der Impedanz zwischen zwei in der Einmalküvette integrierten Sensordrähten registriert und kontinuierlich aufgezeichnet. Die Veränderung der Impedanz wird in einer willkürlich gewählten Einheit gemessen, den „aggregation units“ [AU]. Weiterhin kann bei der Analyse die Geschwindigkeit der Aggregation ([AU]/min) und die Fläche unter der Aggregationskurve ([AUC], [AU] x min) studiert werden.

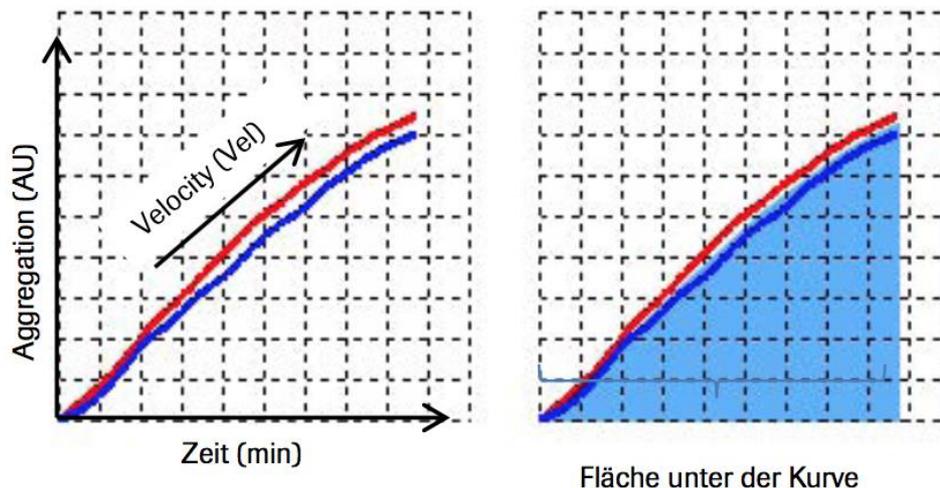


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Multiplate®-Analyse

Im Rahmen der Studie wurde mit Hirudin antikoaguliertes Vollblut verwendet. Als Reagenzien wurden mehrere Thrombozytenaktivatoren verwendet. Es kamen thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAPtest), Adenosinphosphat (ADPtest), Kollagen (COLtest) und humanes homogenisiertes Plaquematerial zum Einsatz (Petzold et al. DABI STUDIE Ref.). Verglichen wurde dann die [AUC] nach Stimulation der verschiedenen Reagenzien.

3.1.4 Lichttransmissionsaggregometrie

Die Thrombozytenaggregation wurde weiterhin mittels Lichttransmissionsaggregometrie (APACT 4004, Labitec) in Thrombozytenreichem Citratplasma untersucht. Wie bereits in einer anderen Studie beschrieben, wurden Blutproben mit 200 G für 10 min zentrifugiert um Thrombozytenreiches Plasma zu erhalten (53). Dem Thrombozytenreichen Plasma wurden dann folgende Stimuli zugefügt um eine Thrombozytenaggregation herbeizuführen: 10 μ M TRAP (Sigma), 2 μ g/ml Kollagen, 20 μ M ADP (Roche), oder 35 μ g/ml FXa (Thermo Fisher). Teilweise wurden die Proben mit dem PAR-1-Inhibitor Vorapaxar (VORA, Axon Medchem) fünf Minuten vor Stimulation inkubiert.

Die beobachtete Thrombozytenaggregation wurde anschließend in Prozent angegeben.

3.1.5 Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie

Um den direkten Einfluss von Faktor Xa auf PAR-1 zu untersuchen bestimmten wir mittels Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie die Faktor Xa Spaltstellen auf synthetisierten PAR-1-Peptiden. Die PAR-1 (Aminosäuresequenz: arrpeskatnatldprsfllrnpndkyepfwedeek) Peptide wurden im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried hergestellt. Um die Spaltstellen zu bestimmen wurden 2.5 µg Peptide zusammen mit 0.1 µg/ml Faktor Xa (Sigma) für 10 Minuten bei 37°C in einer Reaktionspufferlösung (Zusammensetzung: 20 mM Tris-Cl; 50 mM NaCl; 1 mM CaCl; pH 7.4) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Flüssigstickstoff überführt und bei -80°C gelagert.

Nach Auftrennung des Gemisches mittels Flüssigchromatographie erfolgte eine Analyse der Spaltprodukte per Massenspektrometer (Q-Exactive, Thermo Scientific). Die dabei entstandenen Rohdaten wurden anschließend mittels der MaxQuant software (Version 1.6.0.1) analysiert.

3.1.6 Flusskammerversuche

3.1.6.1 Flusskammerversuche auf Kollagen

Um die Pathomechanismen während der arteriellen Thromboseentstehung genauer analysieren zu können führten wir mit dem abgenommenen Patientenblut Flusskammerversuche durch.

Zunächst wurden hierfür Flusskammern (μ -Slide VI^{0.1}, Ibidi) mit fibrillärem Kollagen (250 µg/ml, Kollagenreagens Horm, Nycomed) beschichtet. Anschließend wurden die Kammern bei 37°C in 5% CO₂-haltiger Atmosphäre für eine Stunde inkubiert. Hiernach wurden die Kammern vorsichtig mit 200µl PBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline, without calcium chloride and magnesium chloride, Biochrom) gespült.

Mit Citrat antikoaguliertes Blut wurde aus dem Blutentnahmeröhrchen abpipettiert und in eine kommerziell verfügbare 5 ml Spritze (BD) überführt. Nun wurde das Blut mit Rhodamine 6G chloride (Life Technologies) versetzt (finale Konzentration: 0.01%) und für 15 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Kurz vor Versuchsbeginn wurde abschließend 6mM CaCl₂ zur Probe hinzugefügt um eine freie Kalzium-Konzentration

von circa 0.5mM zu erreichen und damit das durch Citrat gehemmte Gerinnungssystem zu reaktivieren.

Nach Vorbereitung der Blutproben und Flusskammern wurde die blutgefüllte Spritze an ein Spritzenpumpensystem (KDS 100 Syringe Pump, KD Scientific Inc.) angeschlossen und über einen Schlauch mit der Flusskammer verbunden. Nun wurde das Blut für entweder eine oder drei Minuten über die Flusskammer perfundiert (s. Abbildung 1 für eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs). Wir wählten eine Wandscherrate von 1000/s, was einer arteriellen Scherrate in vivo ungefähr entspricht (54).

Nachfolgend wurde die Kammer 3 Minuten lang mit PBS gespült. Auch hier wurde abermals die Infusionspumpe mit den oben genannten Einstellungen verwendet. Nach dem Spülvorgang wurde die Flusskammer unter ein Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert, Carl Zeiss Microscopy GmbH), welches mit einem Achroplan 10x0,25 Objektiv und einer HRc-Axiocam Kamera (Zeiss) ausgestattet war, gelegt. Pro Versuch wurden drei Bilder (proximaler, mittlerer und distaler Abschnitt der Flusskammer) in einer Auflösung von 1300x1300 Pixel aufgenommen und anschließend als JPEG gespeichert.

Zur Analyse wurden von den pro Flusskammer drei aufgenommenen Bildern ein repräsentatives Bild ausgewählt und anschließend mit Hilfe des Programms ImageJ (National Institutes of Health, Maryland) ausgewertet. Hierzu wandelten wir das jeweilige Bild zunächst in ein 8-bit-Graustufenbild um und passten zur Minimierung von etwaigen Unterschieden der Farbqualität Helligkeit und Kontrast an. Wir bestimmten schließlich die von Thromben bedeckte Fläche in Quadratmikrometer.

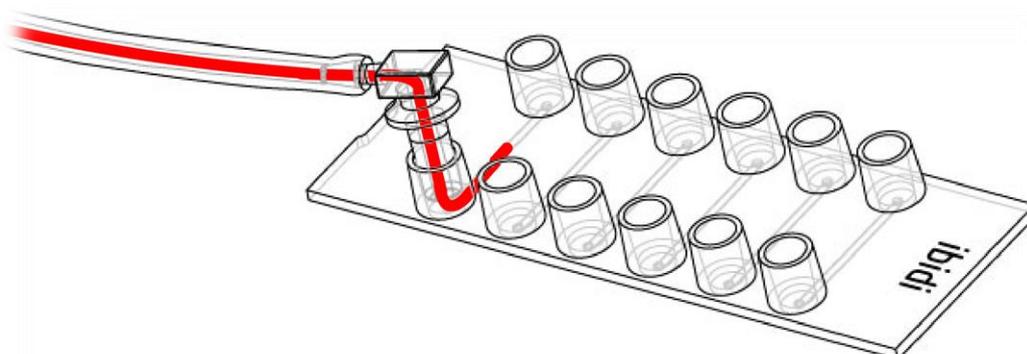


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Flusskammerversuchs.

Die beschriebenen Experimente wurden durchgeführt mit Blut von Patienten unter dauerhafter Rivaroxaban-Therapie, mit Blut von gesunden Kontrollen und mit Blut von Patienten kurz vor und vier Stunden nach Einnahme einer niedrigen (2.5 mg) Dosis Rivaroxaban.

3.1.6.2 Flusskammerversuche auf humanem Plaquematerial

Zur weiteren Untersuchung der klinischen Relevanz unserer Versuche führten wir zudem Flusskammerversuche auf humanem Plaquematerial durch. Hierbei wurde Patienten atherosklerotische Plaques entnommen, die aufgrund einer (hochgradigen) Stenose der A. carotis eine Endarteriektomie erhalten hatten. Die Patienten gaben hierfür ihr schriftliches Einverständnis ab und die Versuche wurden nach den ethischen Leitlinien der Declaration of Helsinki und nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Um das verwendete Plaquematerial zu erhalten wurden Plaquehomogenisate (100mg Feuchtgewicht pro Milliliter) von 5 Patienten gepoolt und als Aliquote bei -80°C aufbewahrt. Das Plaquehomogenisat wurde vor Versuchsdurchführung in einer Konzentration von 5mg/ml in PBS mit 0,1% Humanem Serum Albumin (HSA; Ibbidi) gelöst und auf Glascoverslips (Coverslips for sticky-Slides, Ibbidi) aufgetragen. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren wurden die Flusskanäle (sticky-Slide I 0.1 Luer, Ibbidi) mit HSA (in PBS gelöst, Endkonzentration 4%) geblockt. Nach Zusammenfügen des Flusskanals mit dem Plaquematerial-beschichteten Deckglas wurde die Flusskammer über eine Minute hinweg mit PBS und über eine weitere Minute mit HSA (in PBS gelöst, Endkonzentration 4%) gespült und anschließend über zehn Minuten hinweg inkubiert. (55, 56)

Mit dem oben beschriebenen Pumpensystem wurden die mit dem humanen Plaquematerial beschichteten Flusskammern mit einer Wandscherrate von 1000/s für drei Minuten mit den Blutproben perfundiert. Nach Beginn des Blutflusses wurde alle fünf Sekunden ein Bild einer repräsentativen Region, die nicht am äußeren Rand der Flusskammer lag, aufgenommen. Wie bereits bei den Flusskammerversuchen auf Kollagen wurde anschließend (nach Anpassung von Kontrast und Helligkeit) mit Hilfe

der ImageJ-Software die von Thromben bedeckte Oberfläche bestimmt. Die von Thromben bedeckte Oberfläche wurde dann in Quadratmikrometer angegeben. Die aufgenommenen Bilder wurden zudem in Videodateien im AVI-Format (Frame Rate von 12 Bildern/Sekunde) umgewandelt.

3.2 In Vivo Versuche

3.2.1 Mauslinien und Behandlungsschema

Für die in vivo Versuche wurden C57BL/6 Mäuse von The Jackson Laboratory verwendet. Um geschlechtsspezifische Einflüsse auszuschließen und um die Vergleichbarkeit zu vorangegangenen Studien zu erhöhen, wurden nur weibliche Tiere in einem Alter von 10-12 Wochen verwendet. Einem Teil der Tiere wurde mittels Magensonde eine gewichtsadaptierte Dosis Rivaroxaban (6 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 1% Dimethylsulfoxid (DSMO)) verabreicht. Einem weiteren Teil der Tiere wurde nur die in physiologischer Kochsalzlösung verdünnte Lösungssubstanz DSMO (1%) verabreicht. Sowohl Medikation, als auch Lösungssubstanz wurde den Tieren mittels Magensonde und jeweils eine Stunde vor Induktion einer arteriellen Thrombose verabreicht.

Die Blutentnahme erfolgte mittels intrakardialer Punktion unter Vollnarkose. Es erfolgte eine Antikoagulation des so entnommenen Blutes mittels Trisodiumcitrat (aus S-Monovette, Sarstedt; 170 µl 3,1% Trisodiumcitrat in 830 µl Blut).

Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung von der Regierung Oberbayern (München, Deutschland) durchgeführt.

Die Tieroperationen wurde durchgeführt von Dr. med. vet. Ildiko Konrad, Dr. med. vet. Annkathrin Eckart und Dr. med. vet. Irene Schubert.

3.2.2 Eisen(III)Chlorid-Modell

Um sicherzustellen, dass von einer adäquaten Rivaroxaban-Wirkung auszugehen ist wurde die Rivaroxaban-Konzentration im Plasma eine Stunde nach Prämedikation mittels eines Anti-Faktor-Xa-Assays (Chromogenix) bestimmt.

Die Verletzung der Arterie wurde herbeigeführt, indem zunächst die A. carotis communis beim in Narkose befindlichen Tier freipräpariert wurde. Anschließend wurde ein in Eisenchlorid getränktes Filterpapier (1 µl 10%iges Eisenchlorid auf 1 mm² Whatman Filterpapier) für 4 min im Bereich der Außenwand der A. carotis communis

appliziert. Anschließend wurde mit physiologischer Kochsalzlösung umfassend gespült. Die Arterie wurde während der Untersuchungen stets feucht gehalten.

Ähnlich wie bei Pircher et al. (57) beschrieben erfolgte die Darstellung der Thrombusformation im Bereich der Karotis mittels Injektion eines GPIIb-DyLight 488 markierten Antikörpers (Klon: X488, Emfret) über die Schwanzvene kurz vor der oben beschriebenen Eisenchlorid-Applikation. Über 60 min hinweg wurde anschließend mittels eines Fluoreszenzmikroskop (BX51W1, Olympus) mit angeschlossener Kamera (ORCA-ER CCD, Hamamatsu) die Thrombenbildung in der A. carotis communis beobachtet und aufgezeichnet. Die so erhobenen Videodaten wurden mittels des Bildanalyseprogrammes Cell[^]R von Olympus untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte verblindet.

3.2.3 Histologische Analyse der murinen Thromben

Zur weiteren Untersuchung der wie oben beschriebenen Thromben wurden 60 min nach Induktion mittels Eisenchlorid Thromben chirurgisch entnommen, einem Kryosat (Tissue-TEK, Sakura) zugeführt und anschließend bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden dann mit Hilfe des CryoStar NX70 (ThermoFischer Scientific) in 10 µm dünne Schichten geschnitten, in 4%igem Formaldehyd fixiert und mit 5%igem Ziegen Serum (Sigma) blockiert. Einzelne Sektionen wurden dann mit Antikörpern gegen CD 41 (MWRReg 30, eBioscience) und Fibrinogen (A0080, Dako) inkubiert. Weiterhin wurde DNA mittels 1 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) markiert. Mit einem Konfokalmikroskop (ZEISS LSM 800) wurden Bilder aufgenommen und anschließend mittels Image J-Software ausgewertet.

3.3 Statistische Auswertung

Die gesamten statistischen Auswertungen wurden mit einer Prism 5 Software (GraphPad Software) durchgeführt. Um die statistische Analyse der Daten durchzuführen wurden die Ergebnisse zunächst auf Normalverteilung geprüft (D'Agostino-Pearson Omnibus Test für Fallzahlen ≥ 8 , bzw. Kolmogorov-Smirnov Test für Fallzahlen ≥ 5). Die anschließende Auswertung erfolgte anhand des ANOVA-Tests, eines ungepaarten Zweistichproben-t-Tests, eines Mann-Whitney Tests oder eines

Shapiro-Wilks Tests. Angegeben wurden jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen wurde dann als signifikant angesehen, wenn $p < 0.05$ war.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

In diese Studie wurden 53 Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern eingeschlossen. Unter den Patienten waren 28 Frauen und 25 Männer, die allesamt im Schnitt 70.94 (± 11.69) Jahre alt waren. Darüber hinaus wurden 52 Freiwillige, bestehend aus 41 Frauen und 11 Männern, in die Studie eingeschlossen. Die eingeschlossenen Kontrollprobanden waren im Schnitt 61.77 (± 17.46) Jahre alt. Die weiteren Charakteristika der eingeschlossenen Patienten und Freiwilligen sind der untenstehenden Tabelle aufgeführt.

	Patienten (n=53)	Kontrollen (n=52)
Alter – Mittelwert \pm Standardabweichung	70.94 (± 11.69)	61.77 ± 17.46
Männliches Geschlecht – Anzahl in Prozent	25 (47.2%)	11 (21.2%)
CHA₂DS₂-VASc-Score – Mittelwert \pm Standardabweichung	3.25 (± 1.65)	1.95 (± 1.43)
Vorhofflimmern Anzahl in Prozent	53 (100%)	0 (0%)
Antikoagulation Anzahl in Prozent	53 (100%)	0 (0%)
Hämoglobin (g/dl) – Mittelwert \pm Standardabweichung	12.65 (± 2.49)	13.71 (± 1.53)
Leukozyten (x1000/μl) – Mittelwert \pm Standardabweichung	7.64 (± 2.39)	7.02 (± 2.05)
Thrombozyten (x1000/μl) – Mittelwert \pm Standardabweichung	217.85 (± 64.68)	234.78 (± 65.52)
Kreatinin (mg/dl) – Mittelwert \pm Standardabweichung	1.12 (± 0.29)	1.02 (± 0.76)

Tabelle 3: Patientenkollektiv - Charakteristika

4.2 Thrombozytenaktivität unter statischen Bedingungen

Ob und inwieweit Rivaroxaban die Thrombozytenaggregation und -aktivierung beeinflusst untersuchten wir unter statischen Bedingungen mittels Impedanzaggregometrie. Hierzu verglichen wir die Thrombozytenaggregation in Hirudin antikoaguliertem Vollblut von Patienten unter dauerhafter Rivaroxaban (RIVA)-Einnahme und von gesunden Kontrollen ohne Einnahme oraler Antikoagulanzen (Control, in den Abbildungen als Con abgekürzt). Die Thrombozytenaggregation wurde dann als Area under the curve (AUC) wiedergegeben.

Unter Stimulation Adenosin 5'-Diphosphat zeigte sich unter Rivaroxaban-Einnahme eine nicht-signifikant reduzierte Thrombozytenaggregation. Unter Stimulation mit Kollagen und Thrombinrezeptor Aktivator Proteine-6 (TRAP) zeigte sich im Blut der Patienten mit Rivaroxaban-Einnahme eine signifikant geringere Thrombozytenaggregation.

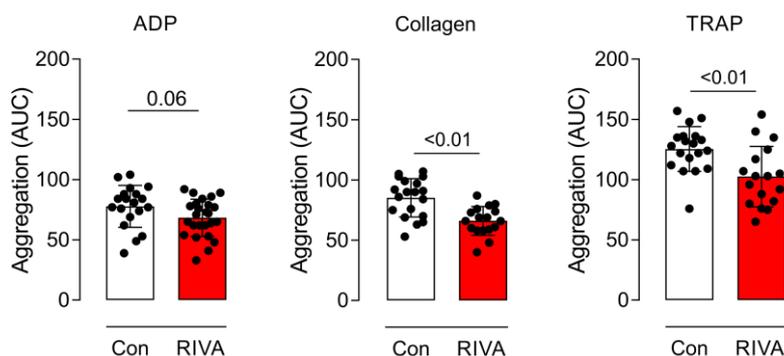


Abbildung 4: Impedanzaggregationsmessung mit Vollblut nach Stimulation mit 5 µmol/l ADP, 2 µg Kollagen, 12 µmol/l TRAP. Die Thrombozytenaggregation wurde als Area under the curve (AUC) angegeben (ADP-control n=19, RIVA n=25, P=0.0621, Shapiro-Wilk-Test zeigte eine Normalverteilung; Kollagen-control n=19, RIVA n=17, p=0.0003, Shapiro-Wilk-Test zeigte eine Normalverteilung; TRAP-control n=19, RIVA n=17, P=0.0004, Shapiro-Wilk-Test zeigte eine Normalverteilung).

Wir untersuchten anschließend ob die Thrombozytenaggregation abhängig von der Plasmakonzentration von Rivaroxaban ist. Hierzu erfassten wir die Thrombozytenaggregation (ausgedrückt in der Area under the curve (AUC)) nach Stimulation mit ADP in Bezug auf die für den jeweiligen Patienten bestimmte Plasmakonzentration von Rivaroxaban. Es zeigte sich, dass höhere Rivaroxaban-Plasmakonzentrationen mit einer verringerten Thrombozytenaggregation einhergehen (Abbildung 5).

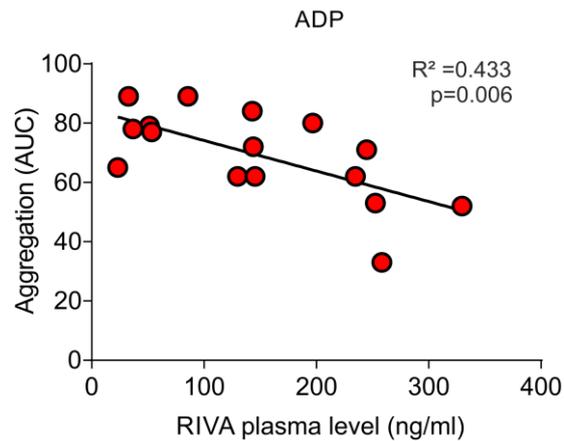


Abbildung 5: Thrombozytenaggregation (angegeben als Area under the curve (AUC)) in Abhängigkeit von der Rivaroxaban-Plasmakonzentration für individuelle Patienten wird gezeigt. Die Korrelation zwischen AUC und Plasmakonzentration wurde mittels linearer Regression berechnet. Die Trendlinie ist mit aufgeführt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist angegeben. $P=0.006$.

Mittels Lichttransmissionsaggregometrie untersuchten wir zudem die Faktor-Xa-induzierte Thrombozytenaggregation in An- oder Abwesenheit des Protease-aktivierten Rezeptor-1 (PAR-1)-Antagonisten Vorapaxar (VORA). Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, ist im Vergleich zu der Kontrollgruppe (in der Abbildung als vehicle, bzw. Veh. bezeichnet) die Thrombozytenaggregation unter Hinzugabe von Vorapaxar in verschiedener Konzentration deutlich reduziert.

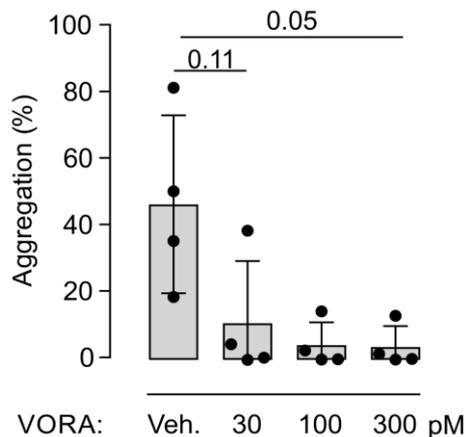


Abbildung 6: FXa-induzierte Thrombozytenaggregation wurde in der An- und Abwesenheit von Vorapaxar (VORA) mittels Lichttransmissionsaggregometrie gemessen (FXa ohne VORA (bezeichnet als Veh.) $n=4$ versus 30 pmol/l VORA versus 100 pmol/l VORA versus 300 pmol/l VORA, alle: Friedman-Test, $P=0.05$. Vehicle versus 30 pmol/l VORA: Wilcoxon-Test, $P=0.11$, n zu klein um Normalitätstests durchzuführen). Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

Die Thrombozytenaggregation wurde zudem nach Stimulation mit ADP, TRAP und Kollagen unter Anwesenheit von Vorapaxar untersucht. Hier zeigte sich, ähnlich wie

unter Anwesenheit von Rivaroxaban, eine geringe Aggregation der Thrombozyten (Abbildung 7).

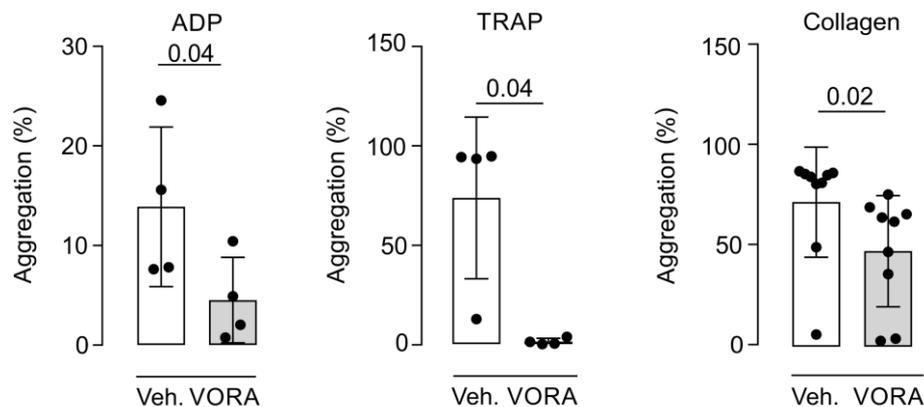


Abbildung 7: Die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit TRAP, ADP, oder Kollagen unter Ab- (hier als vehicle (Veh.) bezeichnet) und Anwesenheit von Vorapaxar (VORA) wurde untersucht (ADP: vehicle n=4 versus VORA n=4, gepaarter t-Test, P=0.04, Shapiro-Wilks-Test zeigte eine Normalverteilung; TRAP: vehicle n=4 versus VORA n=4, Wilcoxon-Test, P=0.04, Shapiro-Wilks-Test zeigte keine Normalverteilung; Kollagen: vehicle n=7 versus VORA n=7, Wilcoxon-Test, P=0.02, Shapiro-Wilks-Test zeigte keine Normalverteilung). Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.3 Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation unter Flussbedingungen

4.3.1 Flusskammerversuche auf Kollagen

Um die arterielle Thrombus- und Thromboseentstehung unter physiologischeren Bedingungen zu untersuchen führten wir Flusskammerversuche durch.

Eine arterielle Thrombose entsteht zumeist nach Ruptur eines atherosklerotischen Plaques mit anschließender Freilegung von extrazellulären Matrixproteinen (z.B. vWF, Laminin, sowie Kollagene). Durch die Freisetzung dieser Matrixproteine (und weiterer Thrombozytenagonisten wie ADP und Lipidmediatoren) kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten, die schließlich zur Bildung eines arteriellen Thrombus beitragen. Um den Einfluss von Rivaroxaban auf die Thrombozytenfunktion während der frühen Phase der Entstehung einer arteriellen Thrombose zu untersuchen führten wir Flusskammerversuche auf Kollagen durch.

Mit Citrat antikoaguliertes Vollblut wurde hierzu über eine mit Kollagen (250 $\mu\text{g/ml}$) beschichtete Flusskammer gegeben. Um möglichst physiologische Bedingungen zu erzeugen wählten wir eine Wandscherrate von 1000/s. Die Analyse der

Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation erfolgte anschließend nach 1 und 3 Minuten und wurde als bedeckte Fläche (Area covered) in Quadratmikrometer (μm^2) angegeben.

Nach 1 Minute (Abbildung 8) zeigt sich kein signifikanter Unterschied in Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung. Nach 3 Minuten (Abbildung 9) Flusszeit ist die Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung bei Patienten unter Rivaroxaban-Dauertherapie signifikant reduziert.

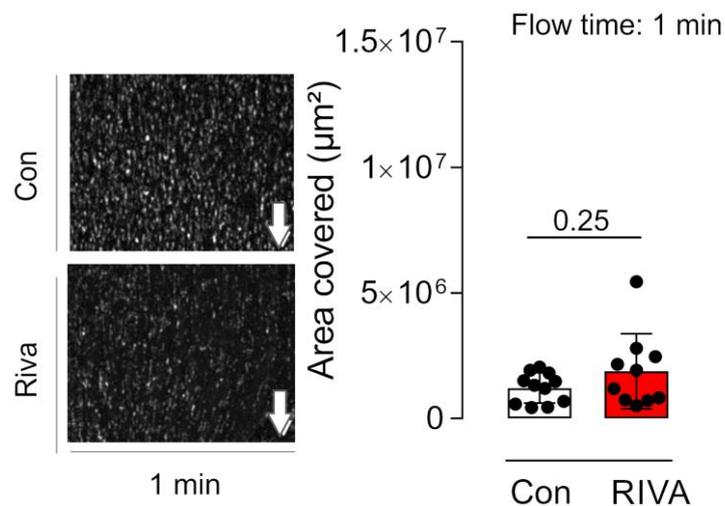


Abbildung 8: Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung im Blut mit Rivaroxaban behandelter Patienten (RIVA) oder gesunden Kontrollen (Con) nach 1 Minute Flusszeit. Repräsentative Bilder werden gezeigt. Die Pfeile geben die Flussrichtung an. Die Oberflächendeckung ist in μm^2 angegeben (Con n=11 vs. RIVA n=10, Mann-Whitney test, $P=0.25$, Shapiro-Wilks-Test zeigt keine Normalverteilung). Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

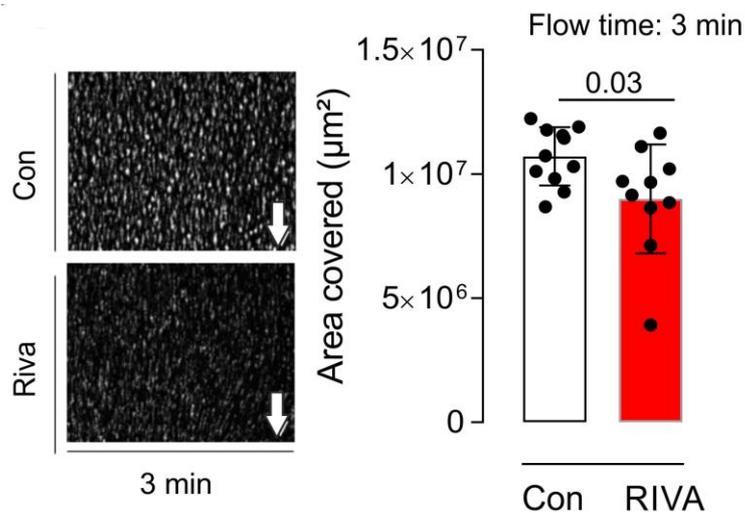


Abbildung 9: Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung im Blut mit Rivaroxaban behandelter Patienten oder gesunden Kontrollen nach 3 Minuten Flusszeit. Repräsentative Bilder werden gezeigt. Die Pfeile geben die Flussrichtung an. Die Oberflächendeckung ist in μm^2 angegeben (Con n=11 vs. RIVA n=10, Mann-Whitney test, $P=0.03$, Shapiro-Wilks-Test zeigt keine Normalverteilung). Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

In zuletzt publizierten klinischen Studien konnte bei Patienten nach einem akuten Koronarsyndrom oder mit stabiler koronarer Herzerkrankung ein vorteilhafter Effekt einer zusätzlich zur Thrombozytenaggregation eingenommenen niedrigdosierten Rivaroxaban-Therapie (2.5mg 2x pro Tag) nachgewiesen werden (47). Der oben genannter Versuchsaufbau wurde daher um weitere Untersuchungen unter Einnahme einer niedrigen Dosis Rivaroxaban wiederholt. Hierzu wurden gesunden Probanden sowohl kurz vor, als auch vier Stunden nach Einnahme von 2.5 mg Rivaroxaban Blut entnommen. Das Blut wurde anschließend wie oben beschrieben angefärbt und nachfolgend für 1 oder 3 Minuten über die kollagenbeschichtete Flusskammer gegeben. Wie Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen ist ein signifikanter Unterschied in der Oberflächendeckung nicht zu erkennen.

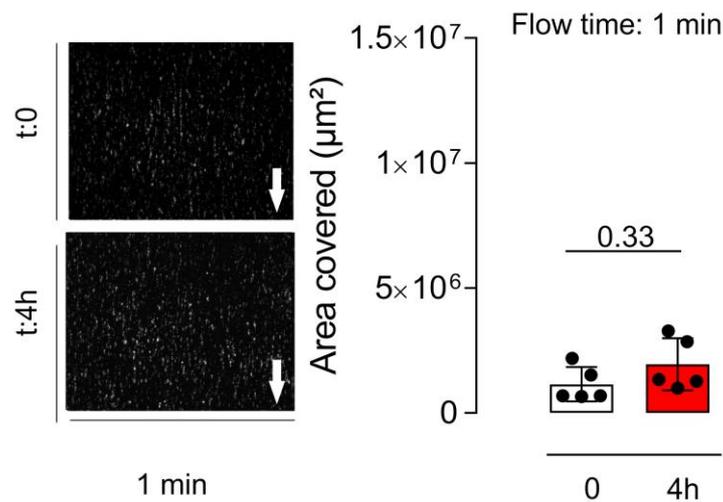


Abbildung 10: Analyse von Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung auf mit Kollagen beschichteten Flusskammern nach 1 min Flusszeit vor und vier Stunden nach Einnahme von 2.5 mg Rivaroxaban (vor Einnahme n=5 versus 4 Stunden nach Einnahme n=5, gepaarter t-Test, $P=0.33$, Shapiro-Wilks-Test zeigte eine Normalverteilung). Die Pfeile zeigen die Flussrichtung an und repräsentieren 120 μm . Repräsentative mittels Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Bilder werden gezeigt. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

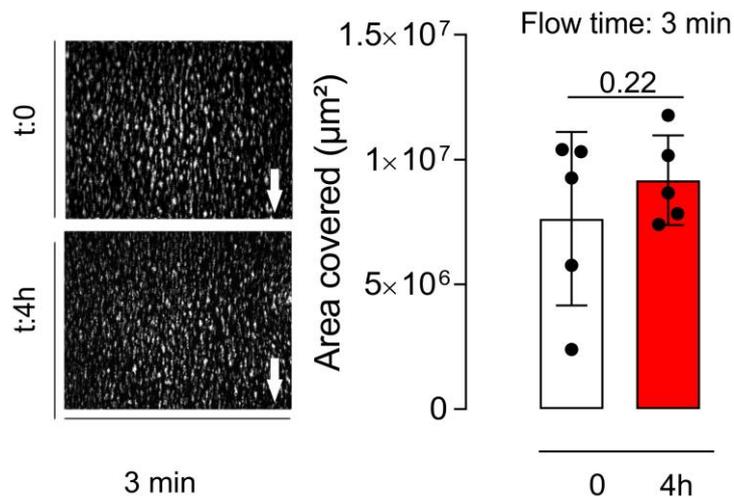


Abbildung 11: Analyse von Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung auf mit Kollagen beschichteten Flusskammern nach 3 min Flusszeit vor und vier Stunden nach Einnahme von 2.5 mg Rivaroxaban (vor Einnahme n=5 versus nach Einnahme n=5, gepaarter t-Test, P=0.22, Shapiro-Wilks-Test zeigte eine Normalverteilung). Die Pfeile zeigen die Flussrichtung an und repräsentieren 120 µm. Repräsentative mittels Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Bilder werden gezeigt. Die Graphen zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung.

4.3.2 Flusskammerversuche auf humanem Plaquematerial

Um den in vivo ablaufenden Prozessen möglichst nahe zu kommen ergänzten wir neben Flusskammerversuchen auf Kollagen zudem Versuche auf humanem Plaquematerial. Die Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung wurde nach 1 und 3 Minuten erfasst und als Area covered in Quadratmikrometer angegeben.

Sowohl nach 1 (Abbildung 12), als auch nach 3 Minuten (Abbildung 13) zeigte sich eine geringere Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung bei den Patienten unter Rivaroxaban-Therapie verglichen mit der Kontrollpopulation. Nach 3 Minuten war dieser Unterschied als signifikant zu werten.

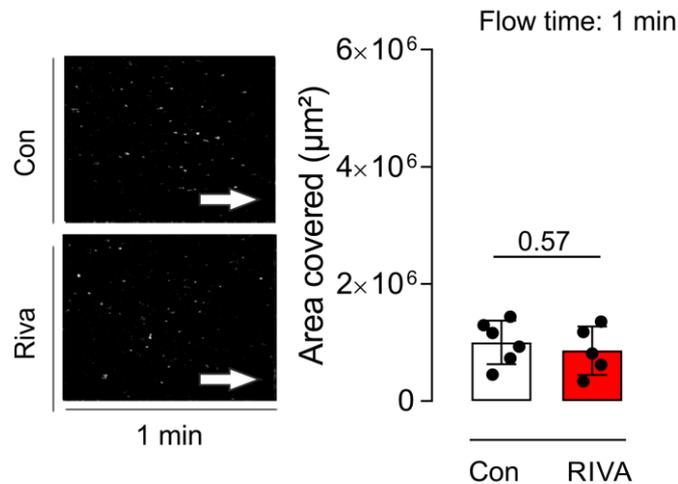


Abbildung 12: Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung im Blut mit Rivaroxaban behandelter Patienten oder gesunder Kontrollen nach 1 min Flusszeit. Es werden repräsentative Bilder gezeigt. Die Pfeile geben die Flussrichtung an. Die Oberflächendeckung ist in Quadratmikrometer angegeben (Control n=6, RIVA n=5, P=0.05689, Shapiro-Wilks-Test zeigt eine Normalverteilung). Die Graphen zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung.

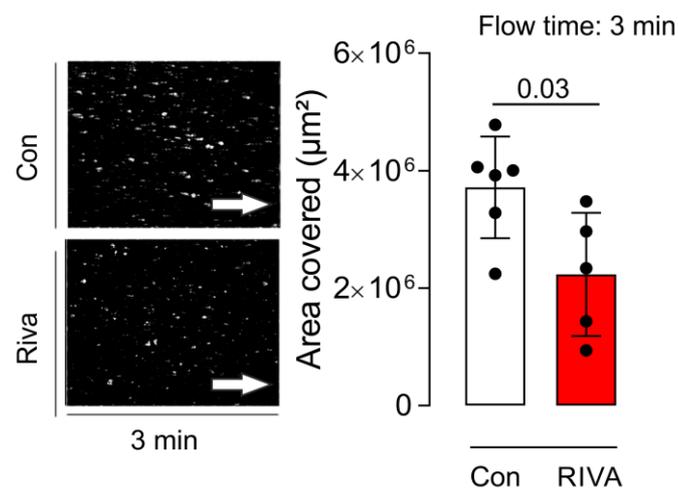


Abbildung 13: Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung im Blut mit Rivaroxaban behandelter Patienten oder gesunder Kontrollen nach 3 min Flusszeit. Es werden repräsentative Bilder gezeigt. Die Pfeile geben die Flussrichtung an. Die Oberflächendeckung ist in Quadratmikrometer angegeben (Control n=6, RIVA n=5, P=0.0300, Shapiro-Wilks-Test zeigt eine Normalverteilung). Die Graphen zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung.

4.4 Thrombusformation in vivo

Mittels eines Eisen(III)Chlorid-Modell visualisierten wir die Thrombusformation in vivo. Hierzu erhielten die Wildtyp-Mäuse zunächst 60 min vor Intervention eine Einzeldosis Rivaroxaban (6 mg/kg Körpergewicht, (Rivaroxaban-Gruppe)), bzw. eine Lösungssubstanz (Kontrollgruppe) über eine Magensonde. Die Rivaroxaban-

Plasmakonzentration wurde 60 min nach Verabreichung mittels Blutentnahme bestimmt. Die hier bestimmten Konzentrationen entsprachen den Werten, die auch bei humanen Patienten zu erwarten wären (58). Abbildung 14 zeigt den Unterschied der Plasmakonzentration zwischen Tieren, die Rivaroxaban erhalten haben und Tieren die ausschließlich die Lösungssubstanz DMSO (in der Abbildung als Vehicle (Veh.) bezeichnet) verabreicht bekommen haben.

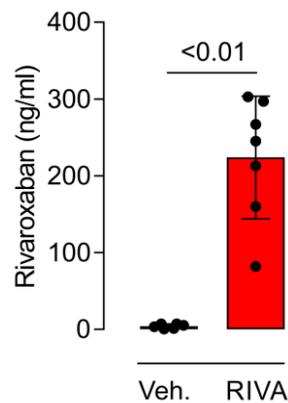


Abbildung 14: Wildtyp-Mäuse erhielten eine Einzeldosis Rivaroxaban (6 mg/kg Körpergewicht, in der Grafik bezeichnet als RIVA) oder ausschließlich eine Lösungssubstanz (in der Grafik bezeichnet als Veh.). Die Rivaroxaban-Plasmakonzentration wurde 60 min nach Verabreichung bestimmt (vehicle n=6 versus RIVA n=7, ungepaarter t-Test, $P<0.0001$, Shapiro-Wilks-Test zeigt zeigte eine Normalverteilung). Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

60 Minuten nach Verabreichung von Rivaroxaban oder der in physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Lösungssubstanz wurde ein in Eisenchlorid getränktes Filterpapier im Bereich der freipräparierten A. carotis communis appliziert. Der so entstandene Gefäßschaden führte anschließend zur Okklusion der A. carotis communis. Die Thrombusformation wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops über 60 Minuten hinweg beobachtet. Ein Unterschied in der Zeit bis zum Auftreten der ersten Okklusion zwischen Rivaroxaban- und Kontrollgruppe konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 15). Die entstanden Thromben in der Rivaroxaban-Gruppe wiesen jedoch eine höhere Rate an Embolisationen auf, der jeweilige Thrombus imponierte somit weniger stabil (Abbildungen 16,17).

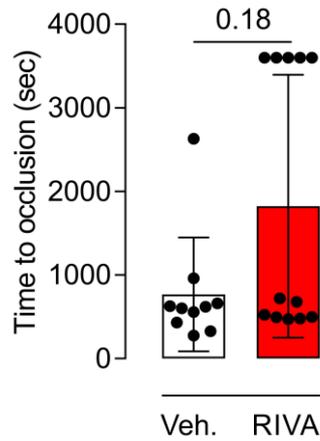


Abbildung 15: Die Zeit bis zur Okklusion des Gefäßes wurde in Sekunden gemessen (vehicle n=9 versus RIVA n=12, Mann-Whitney-Test, P=0.1258, Shapiro-Wilks-Test zeigte keine Normalverteilung). Die Graphen zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung.

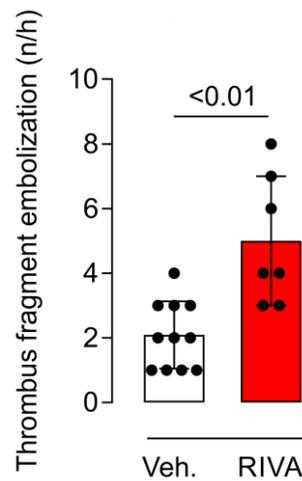


Abbildung 16: Der Anteil an Thrombus-Embolisierung in n/h wird gezeigt. Die Beobachtungszeit betrug 60 min. (vehicle n=11 versus RIVA n=7, P=0.0009, Shapiro-Wilks-Test zeigt zeigte eine Normalverteilung). Die Graphen zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung.

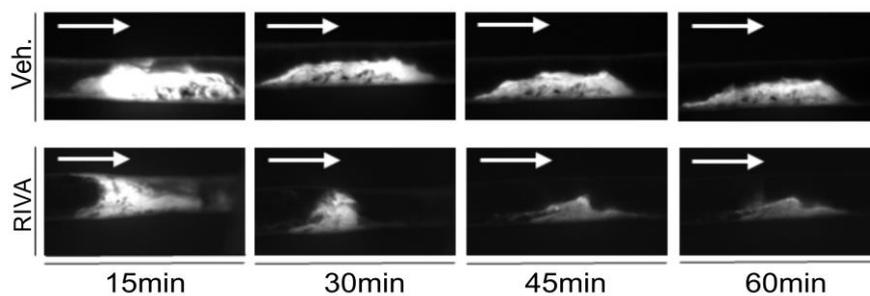


Abbildung 17: Repräsentative Bilder der Fluoreszenzmikroskopie von mit Rivaroxaban oder DMSO (hier angegeben als vehicle (Veh.)) behandelten Tieren 15, 30, 45 und 60 min. nach Verletzung der A. carotis communis werden gezeigt. Die Pfeile zeigen die Richtung des Blutflusses an und repräsentieren 500 µm.

Auch die histologische Aufarbeitung entnommener Thromben zeigte eine weniger kompakte Thrombusstruktur unter Rivaroxaban-Therapie (Abbildung 18) mit im

Vergleich zu den Kontrolltieren geringerm Thrombozyten- und Fibrinogen-Anteil (Abbildung 19).

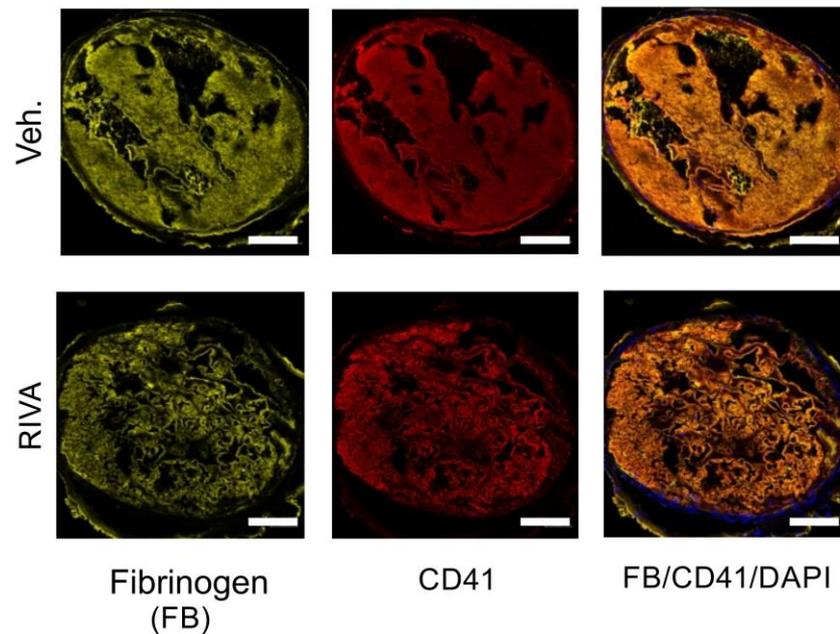


Abbildung 18: Thrombuskomposition explantierter Thromben von mit Rivaroxaban (RIVA) oder DMSO (hier als vehicle (Veh.) bezeichnet) behandelten Tieren. Die Thromben wurden nach Entnahme in 10 µm dünne Schichten geschnitten, in Formalaldehyd fixiert und mit Ziegenserum geblockt. Anschließend wurden Sektionen mit Antikörpern gegen Fibrinogen (grün) und CD41 (rot) inkubiert. DNA wurde mittels DAPI (blau) markiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines Konfokalmikroskops. Der weiße Balken im unteren rechten Bildrand repräsentiert 100 µm. Repräsentative Bilder werden gezeigt

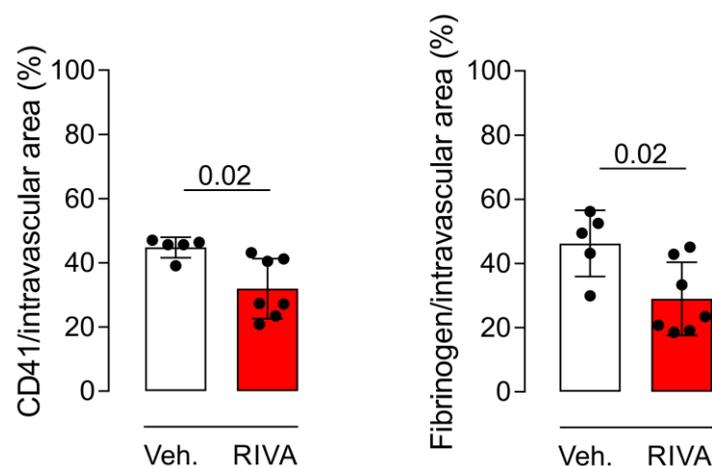


Abbildung 19: Intravaskuläre Oberflächendeckung von Thrombozyten (dargestellt mittels CD41, vehicle n=5 versus RIVA n=7, Mann-Whitney-Test, P=0.02) und Fibrinogen (vehicle n=5 versus RIVA n=7, ungepaarter t-Test, P=0.02, Shapiro-Wilks-Test zeigte eine Normalverteilung), angegeben in Prozent. Die Graphen zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung.

4.5 FXa-vermittelte Aktivierung des PAR-1 Rezeptors

Um die Cleavage site (Spaltstelle) von Faktor Xa auf PAR-1 zu identifizieren führten wir zudem Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie durch. Hierzu analysierten wir vom Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) hergestellte PAR-1-Peptide, die wir wie oben beschrieben vor- und aufbereiteten. Wir identifizierten Arg41-Ser42 als Cleavage site von Faktor Xa auf PAR-1.



Abbildung 20: Massenspektrometrische Analyse von PAR-1-Spaltprodukten nach Inkubation mit Faktor Xa. Gezeigt werden die repräsentativen Resultate zweier Experimente.

5 Diskussion

5.1 Thrombozytenaktivität unter Rivaroxaban-Therapie

Große Metaanalysen konnten zeigen, dass die Rate an Myokardinfarkten bei Patienten unter laufender Rivaroxaban-Therapie im Vergleich zu Patienten, die einen Vitamin-K-Antagonisten einnehmen reduziert ist (46). Ob und inwieweit Rivaroxaban dabei einen direkten, diese Beobachtung möglicherweise erklärenden, Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung, -adhäsion, -aggregation und auf die arterielle Thrombenbildung hat ist bisher nicht bekannt. Diese möglichen Mechanismen weiter zu untersuchen war Zielsetzung der Arbeit.

Wir konnten in dieser Studie insgesamt 53 Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern, die allesamt Rivaroxaban als Antikoagulation erhielten, einschließen. Zudem schlossen wir 52 gesunde Kontrollen in die Studie ein. Wir untersuchten die Thrombozytenaggregation zunächst unter statischen Bedingungen mittels Impedanz- und Lichttransmissionsaggregometrie. Hier zeigte sich eine geringere Thrombozytenaggregation bei der Rivaroxaban-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollpopulation. Der beobachtete Effekt war hierbei dosisabhängig. Die Thrombozytenaggregation war zudem in Anwesenheit des PAR1-Rezeptor-Antagonisten Vorapaxar in ähnlicher Weise reduziert.

Unter Flussbedingungen zeigte sich in der Rivaroxaban-Gruppe sowohl auf Kollagen, als auch auf humanem Plaquematerial eine geringe Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung. In einem Mausmodell konnte zudem eine geringe Thrombusstabilität unter Einfluss von Rivaroxaban beobachtet werden.

5.2 Einfluss von Rivaroxaban unter statischen Bedingungen

Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und der Stabilität arterieller Thromben (59). Um den möglichen Effekt von Rivaroxaban auf die Thrombozytenaktivierung und -aggregation genauer zu untersuchen wurden zunächst in vitro Versuche unter statischen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde eine Thrombozytenaktivierung durch Stimulation verschiedener Thrombozytenagonisten herbeigeführt und anschließend mittels Impedanz- oder Lichttransmissionsaggregometrie untersucht.

Der Effekt Rivaroxabans auf die Thrombozytenaggregation *in vitro* wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten konnten keinen messbaren Effekt Rivaroxabans auf die Thrombozytenaggregation oder -reaktivität *in vitro* nachweisen (60, 61). Im Jahre 2018 wurde von Nehaj et al. dagegen eine verringerte Thrombozytenaggregation nach TRAP-Stimulation bei mit Rivaroxaban behandelten Patienten beobachtet (62). Der Mechanismus, der diese Beobachtung erklären könnte wurde hierbei jedoch nicht beschrieben.

In unserer Studie zeigte sich im Blut von mit Rivaroxaban behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine durchweg geringere Thrombozytenaggregation. Unsere Ergebnisse decken sich somit mit der von Nehaj gemachten Beobachtung. Wir konnten außerdem zeigen, dass der beobachtete Effekt dosisabhängig war – je höher die Plasmakonzentration von Rivaroxaban, desto geringer war die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit ADP.

5.3 Einfluss von Rivaroxaban unter Flussbedingungen (in vitro und in vivo)

Um den Ablauf der Entstehung arterieller Thromben *in vivo* möglichst nahe zu kommen führten wir anschließend Flusskammerversuche durch. Sowohl auf 250 µg/ml Kollagen, als auch auf humanem Plaquematerial wurden die entsprechenden Versuche durchgeführt. Auf Kollagen zeigte sich unter Rivaroxaban-Einnahme nach einer Minute kein signifikanter Unterschied in Thrombusbildung und Thrombozytenadhäsion. Erst nach drei Minuten Flusszeit konnte unter Rivaroxaban-Einnahme eine signifikant geringere Thrombusformation und Thrombozytenadhäsion beobachtet werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich auf humanem Plaquematerial.

Ein signifikanter Effekt konnte bei gesunden Probanden nach Einnahme von 2.5 mg Rivaroxaban nicht beobachtet werden.

In einem murinen Modell konnten wir ähnliche Effekte beobachten. Zunächst untersuchten wir hier die Thrombusstabilität nach Induktion eines Gefäßverschlusses mittels Applikation von Eisenchlorid im Bereich der A. carotis communis von Wildtyp-Mäusen. Wir konnten zeigen, dass die so entstandenen Thromben unter Rivaroxaban-Einfluss instabiler waren und sich schneller auflösten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie von Wagner et al. (63), in der in einem vergleichbaren murinen Modell eine geringe Thrombuslast unter Rivaroxaban gesehen werden konnte.

Interessanterweise konnten in dem von uns verwendeten Mausmodell in der Vergangenheit vom Phänotyp her ähnliche Effekte unter dem Einfluss von Acetylsalicylsäure gesehen werden (64).

Die Interpretation der von uns erhobenen Ergebnisse ist schwierig. Die Mechanismen des antikoagulativen und thrombozytenhemmenden Effektes von Rivaroxaban laufen in vivo nach einer Gefäßverletzung praktisch zeitgleich ab und können somit nur schwer voneinander getrennt werden. Der thrombozytenhemmende Effekt Rivaroxabans wird allerdings zum einen in dem oben beschriebenen Flusskammerversuch auf pathophysiologisch relevantem humanen Plaquematerial deutlich. Zum anderen zeigte eine histologische Aufarbeitung der nach Gefäßverletzung entnommenen murinen Thromben eine deutlich geringere Flächendeckung mit Thrombozyten. Eine geringe Flächendeckung mit Thrombozyten konnte auch bei Thromben beobachtet werden, die aus Koronargefäßen von unter ASS-Therapie stehender Patienten entnommen wurden (65). Dies unterstützt die Annahme eines thrombozytenhemmenden Effekts Rivaroxabans in vivo.

5.4 Antithrombotischer Effekt durch Inhibierung eines PAR-1-Signalwegs

Wie bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, führt Faktor Xa mittels Interaktion mit Protease-aktivierte Rezeptoren (insbesondere PAR-1) zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle (66). Dies kann im Falle von Thrombozyten eine Aktivierung und Aggregation selbiger erwirken (67). Daraus lässt sich schließen, dass die Inhibition des PAR-1-Signalweges möglicherweise antithrombotisches Potential besitzt. In mehreren Studien konnte diese Annahme bestätigt werden. So konnte die Auftretungswahrscheinlichkeit kardiovaskulärer Ereignisse mittels Ergänzung der Standard-Medikation um einen PAR-1-Antagonisten (Vorapaxar) effektiv reduziert werden (68, 69). Beobachtet wurden hierbei jedoch zudem vermehrte, insbesondere intrakranielle, Blutungen (68-70), sodass aktuell keine Zulassung der Substanz von Seiten der European Medicines Agency (EMA) besteht. Dass die Inhibition des PAR-1-Signalweges mit Vorapaxar die Thrombozytenaggregation effektiv inhibieren kann, konnten wir in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zeigen. So war die Thrombozytenaggregation unter Vorapaxar-Therapie im Vergleich zur unbehandelten

Vergleichspopulation nach Stimulation mit ADP, Kollagen und TRAP signifikant reduziert.

Zusammen mit einer Arbeitsgruppe aus Düsseldorf konnten wir zudem zeigen, dass sich Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation unter Flussbedingungen unter Vorapaxar – ähnlich wie unter Rivaroxaban-Einfluss – ebenfalls reduziert zeigen (71). Dass der Faktor Xa einen direkten Einfluss auf PAR-1 hat konnten wir ebenfalls zeigen. So identifizierten wir mittels Massenspektrometrie die Spaltstellen von Faktor Xa in PAR-1-Peptiden (Arg41-Ser42) über die es zu einer Thrombozytenantwort, insbesondere einer -aggregation, kommt (67). Die nachgewiesenen Spaltstellen entsprechen dabei denen von Thrombin.

Der oben beschriebene Faktor Xa-abhängige Signalweg kann mittels Gabe des Faktor Xa-Antagonisten Rivaroxaban effektiv inhibiert werden. Somit besitzt Rivaroxaban neben dem bekannten antikoagulatorischen zudem einen thrombozytenaggregationshemmenden Effekt, der bis dato in der Form unbekannt war. Dies könnte die beobachtete Reduktion der ischämischen Ereignisse unter Rivaroxaban-Therapie, zumindest teilweise, erklären.

5.5 Limitationen der Studie

Die hier vorgestellte Studie hat gewisse Limitationen. Die komplexen, zeitgleich ablaufenden und ineinander verzahnten, Prozesse während der Entstehung arterieller Thromben experimentell nachzustellen stellt eine schwere Aufgabe dar. Für unsere Flusskammerversuche perfundierten wir das Blut von Patienten und Kontrollprobanden über mit Kollagen (aufgereinigtes, fibrilläres Kollagen Typ I) beschichtete Flusskammern. Die hierzu gewählte Konzentration lag mit 250 µg/ml recht hoch. Weiterhin erfolgt die Thrombenentstehung und Thrombozytenadhäsion auf fibrillärem Kollagen primär über das Integrin $\alpha 2\beta 1$, welchem in vivo bei der Entstehung arterieller Thromben eine nur untergeordnete Rolle zukommt (72, 73). Um den tatsächlichen Ablauf der arteriellen Thrombenentstehung in vivo besser nachstellen zu können ergänzten wir die Flusskammerversuche daher um Versuche auf humanem Plaquematerial. Humanes Plaquematerial enthält neben Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, von Willebrand factor (vWF) sowie in erster Linie Tissue factor (74). Die pathophysiologische Relevanz unseres Versuchsaufbaus konnten wir so deutlich erhöhen.

Eine weitere Limitation der Studie ist die geringe Anzahl an Patienten und freiwilligen Kontrollen. Auch waren die freiwilligen Kontrollen im Schnitt deutlich jünger als die in die Studie eingeschlossenen Patienten. Weiterhin konnten aus organisatorischen Gründen nicht alle Experimente und Versuche mit allen Patienten durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Zur Prävention von Schlaganfällen bei nicht-valvulärem Vorhofflimmern kommen verschiedene orale Antikoagulantien zum Einsatz. Man unterscheidet Vitamin K-Antagonisten von sogenannten NOAK. Aktuell werden hierbei zwei verschiedene Typen von NOAK verwendet: Direkte Faktor Xa- und direkte Faktor IIa (Thrombin)-Inhibitoren. Angesichts einer positiven Nutzen-Risiko-Bewertung (Reduktion der Auftretungswahrscheinlichkeit eines Schlaganfalls vs. Blutungsrisiko) im Vergleich zu Vitamin-K-Antagonisten sollten neue orale Antikoagulantien stets als Erstlinientherapie in Betracht gezogen werden (11, 28-30, 44). In einer großangelegten Metaanalyse konnte ein signifikant reduziertes Risiko für Myokardinfarkte unter Rivaroxaban verglichen mit unterschiedlichen Medikamenten beobachtet werden (46). Diese Erkenntnis ergab sich vor allem aus den Ergebnissen der ROCKET-AF und ATLAS 2-TIMI 51-Studien. In der ROCKET-AF-Studie wurde Rivaroxaban mit Warfarin hinsichtlich der Schlaganfall-Prävention verglichen. Man beobachtete hier neben einer Nicht-Unterlegenheit bezüglich der Schlaganfall-Prävention in der Rivaroxaban-Gruppe zudem eine 14%ige Risikoreduktion, ein ischämisches kardiales Ereignis zu erleiden (45). In der ATLAS 1-TIMI 51-Studie wurde zusätzlich zur Standard-Medikation eine niedrigdosierte (2.5 mg 2x pro Tag) Rivaroxaban-Therapie oder ein Placebo Patienten verabreicht. Die Patienten, die allesamt kürzlich ein akutes Koronarsyndrom erlitten haben zeigten in der Rivaroxaban-Gruppe ein reduziertes Risiko einen erneuten Myokardinfarkt zu erleiden (47). Weiterhin konnte in der COMPASS-Studie (Cardiovascular Outcomes for People Using Anticoagulation Strategies) eine höhere Überlebenschance bei Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung beobachtet werden, wenn diese neben einer ASS-Monotherapie zusätzlich Rivaroxaban erhielten. Damit liegt die Annahme nahe, dass Rivaroxaban die Auftretungswahrscheinlichkeit ischämischer Ereignisse bei Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose senken kann.

Der antikoagulative Effekt Rivaroxabans ist in der Inhibition der Faktor Xa-getriebenen Thrombin- und schließlich Fibrin-Bildung begründet. Angesichts der oben beschriebenen Studienlage vermuteten wir, dass Rivaroxaban zusätzlich zum antikoagulativen Effekt zudem einen thrombozytenaggregationshemmenden Effekt haben könnte, der bisher nicht bekannt war.

Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass Rivaroxaban die Thrombozytenaktivierung und -aggregation, sowie die Entstehung von arteriellen Thromben sowohl in vitro als auch in vivo reduzieren bzw. hemmen kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Faktor Xa über PAR-1 – unabhängig von Thrombin – eine direkte Thrombozytenaktivierung auslösen kann. Dieser Signalweg ist unter Rivaroxaban-Einfluss inhibiert. Wir konnten Rivaroxaban damit einen thrombozytenaggregationshemmenden Effekt nachweisen, der in Kombination mit der antikoagulativen Wirkung gegebenenfalls die Reduktion der ischämischen Ereignisse in den oben genannten Studien erklären könnte.

7 Literaturverzeichnis

1. 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. *N Engl J Med*. 1998;339(10):659-66.
2. 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.
3. Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, Lip GY, Franco OH, Hofman A, et al. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J*. 2013;34(35):2746-51.
4. Agewall S, Camm J. New ESC/ EACTS Guidelines for the management of atrial fibrillation. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2016.
5. Heppell RM, Berkin KE, McLenachan JM, Davies JA. Haemostatic and haemodynamic abnormalities associated with left atrial thrombosis in non-rheumatic atrial fibrillation. *Heart (British Cardiac Society)*. 1997;77(5):407-11.
6. Watson T, Shantsila E, Lip GY. Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet*. 2009;373(9658):155-66.
7. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke*. 1991;22(8):983-8.
8. 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.
9. Marijon E, Le Heuzey JY, Connolly S, Yang S, Pogue J, Brueckmann M, et al. Causes of death and influencing factors in patients with atrial fibrillation: a competing-risk analysis from the randomized evaluation of long-term anticoagulant therapy study. *Circulation*. 2013;128(20):2192-201.
10. Calkins H, Hindricks G, Cappato R, Kim YH, Saad EB, Aguinaga L, et al. 2017 HRS/EHRA/ECAS/APHS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation: Executive summary. *Heart Rhythm*. 2017;14(10):e445-e94.
11. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomstrom-Lundqvist C, et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association of Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*. 2020.
12. Grogan M, Smith HC, Gersh BJ, Wood DL. Left ventricular dysfunction due to atrial fibrillation in patients initially believed to have idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1992;69(19):1570-3.
13. Dilaveris PE, Kennedy HL. Silent atrial fibrillation: epidemiology, diagnosis, and clinical impact. *Clin Cardiol*. 2017;40(6):413-8.
14. Kirchhof P, Auricchio A, Bax J, Crijns H, Camm J, Diener HC, et al. Outcome parameters for trials in atrial fibrillation: executive summary. *Eur Heart J*. 2007;28(22):2803-17.
15. January CT, Wann LS, Alpert JS, Calkins H, Cigarroa JE, Cleveland JC, Jr., et al. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(21):e1-76.

16. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J*. 2016;37(38):2893-962.
17. Charitos EI, Purefellner H, Glotzer TV, Ziegler PD. Clinical classifications of atrial fibrillation poorly reflect its temporal persistence: insights from 1,195 patients continuously monitored with implantable devices. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(25 Pt A):2840-8.
18. 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.
19. 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. *N Engl J Med*. 2002;347(23):1825-33.
20. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*. 2007;146(12):857-67.
21. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008;133(6 Suppl):160S-98S.
22. Heneghan C, Ward A, Perera R, Self-Monitoring Trialist C, Bankhead C, Fuller A, et al. Self-monitoring of oral anticoagulation: systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet*. 2012;379(9813):322-34.
23. Pokorney SD, Simon DN, Thomas L, Fonarow GC, Kowey PR, Chang P, et al. Patients' time in therapeutic range on warfarin among US patients with atrial fibrillation: Results from ORBIT-AF registry. *Am Heart J*. 2015;170(1):141-8, 8 e1.
24. Krittayaphong R, Chantrarat T, Rojjarekumpai R, Jittham P, Sairat P, Lip GYH. Poor Time in Therapeutic Range Control is Associated with Adverse Clinical Outcomes in Patients with Non-Valvular Atrial Fibrillation: A Report from the Nationwide COOL-AF Registry. *J Clin Med*. 2020;9(6).
25. Holbrook AM, Pereira JA, Labiris R, McDonald H, Douketis JD, Crowther M, et al. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Arch Intern Med*. 2005;165(10):1095-106.
26. Watson HG, Baglin T, Laidlaw SL, Makris M, Preston FE. A comparison of the efficacy and rate of response to oral and intravenous Vitamin K in reversal of over-anticoagulation with warfarin. *Br J Haematol*. 2001;115(1):145-9.
27. Vigue B. Bench-to-bedside review: Optimising emergency reversal of vitamin K antagonists in severe haemorrhage - from theory to practice. *Crit Care*. 2009;13(2):209.
28. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2009;361(12):1139-51.
29. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2011;365(11):981-92.

30. Giugliano RP, Ruff CT, Braunwald E, Murphy SA, Wiviott SD, Halperin JL, et al. Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2013;369(22):2093-104.
31. Pollack CV, Jr., Reilly PA, Eikelboom J, Glund S, Verhamme P, Bernstein RA, et al. Idarucizumab for Dabigatran Reversal. *N Engl J Med.* 2015;373(6):511-20.
32. Connolly SJ, Crowther M, Eikelboom JW, Gibson CM, Curnutte JT, Lawrence JH, et al. Full Study Report of Andexanet Alfa for Bleeding Associated with Factor Xa Inhibitors. *N Engl J Med.* 2019;380(14):1326-35.
33. An overview of Ondexxya and why it is authorised in the EU, European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/ondexxya-epar-medicine-overview_en.pdf2019.
34. Eriksson BI, Borris LC, Friedman RJ, Haas S, Huisman MV, Kakkar AK, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty. *N Engl J Med.* 2008;358(26):2765-75.
35. Rivaroxaban for the prevention of venous thromboembolism after total hip or total knee replacement in adults, National Institute for Health and Care Excellence. 2009.
36. Fachinformation Xarelto® 20mg Filmtabletten, Bayer AG. 2019.
37. Investigators E-P, Buller HR, Prins MH, Lensin AW, Decousus H, Jacobson BF, et al. Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism. *N Engl J Med.* 2012;366(14):1287-97.
38. Fachinformation Xarelto® 2,5mg Filmtabletten, Bayer AG. 2019.
39. Eikelboom JW, Connolly SJ, Bosch J, Dagenais GR, Hart RG, Shestakovska O, et al. Rivaroxaban with or without Aspirin in Stable Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(14):1319-30.
40. Perzborn E, Roehrig S, Straub A, Kubitzka D, Mueck W, Laux V. Rivaroxaban: a new oral factor Xa inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(3):376-81.
41. Weinz C, Schwarz T, Kubitzka D, Mueck W, Lang D. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(5):1056-64.
42. Lang D, Freudenberger C, Weinz C. In vitro metabolism of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in liver microsomes and hepatocytes of rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(5):1046-55.
43. Xarelto® (Rivaroxaban), Information der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ). 2013.
44. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2011;365(10):883-91.
45. Mahaffey KW, Stevens SR, White HD, Nessel CC, Goodman SG, Piccini JP, et al. Ischaemic cardiac outcomes in patients with atrial fibrillation treated with vitamin K antagonism or factor Xa inhibition: results from the ROCKET AF trial. *Eur Heart J.* 2014;35(4):233-41.
46. 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. *Coron Artery Dis.* 2013;24(8):628-35.
47. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, et al. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2012;366(1):9-19.
48. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation

- Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2008;29(23):2909-45.
49. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(6):937-54.
 50. Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;364(18):1746-60.
 51. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:92-104.
 52. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011;17(11):1423-36.
 53. Kring C, Rasmussen LM, Lindholt JS, Diederichsen ACP, Vinholt PJ. Platelet aggregation is not altered among men with diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2020;57(4):389-99.
 54. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood*. 1996;88(5):1525-41.
 55. Reiningger 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. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(11):1147-58.
 56. Penz SM, Reiningger AJ, Toth O, Deckmyn H, Brandl R, Siess W. Glycoprotein Ibalph α inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*. 2007;97(3):435-43.
 57. Pircher J, Czermak T, Ehrlich A, Eberle C, Gaitzsch E, Margraf A, et al. Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation. *Nat Commun*. 2018;9(1):1523.
 58. Samama MM, Martinoli JL, LeFlem L, Guinet C, Plu-Bureau G, Depasse F, et al. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban--an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thromb Haemost*. 2010;103(4):815-25.
 59. Andre P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, et al. P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest*. 2003;112(3):398-406.
 60. Steppich B, Dobler F, Brendel LC, Hessling G, Braun SL, Steinsiek AL, et al. Effect of the FXa inhibitors Rivaroxaban and Apixaban on platelet activation in patients with atrial fibrillation. *J Thromb Thrombolysis*. 2017;43(4):490-7.
 61. Zemer-Wassercug N, Haim M, Leshem-Lev D, Orvin KL, Vaduganathan M, Gutstein A, et al. The effect of dabigatran and rivaroxaban on platelet reactivity and inflammatory markers. *J Thromb Thrombolysis*. 2015;40(3):340-6.
 62. Nehaj F, Sokol J, Ivankova J, Mokban M, Kovar F, Stasko J, et al. First Evidence: TRAP-Induced Platelet Aggregation Is Reduced in Patients Receiving Xabans. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018;24(6):914-9.
 63. Wagner NM, Dressel T, Schafer K, Konstantinides S. Effect of the factor Xa inhibitor rivaroxaban on arterial thrombosis in wild-type and apolipoprotein E-deficient mice. *Thromb Res*. 2012;130(5):793-8.
 64. Pircher J, Fochler F, Czermak T, Mannell H, Kraemer BF, Wornle M, et al. Hydrogen sulfide-releasing aspirin derivative ACS14 exerts strong antithrombotic effects in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(12):2884-91.

65. Fujikschot WW, Groothuizen WE, Appelman Y, Radonic T, van Royen N, van Leeuwen MA, et al. Inflammatory cell content of coronary thrombi is dependent on thrombus age in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J Cardiol.* 2017;69(1):394-400.
66. Artim-Esen B, Smoktunowicz N, McDonnell T, Ripoll VM, Pericleous C, Mackie I, et al. Factor Xa Mediates Calcium Flux in Endothelial Cells and is Potentiated by IgG From Patients With Lupus and/or Antiphospholipid Syndrome. *Sci Rep.* 2017;7(1):10788.
67. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 2004;84(2):579-621.
68. Magnani G, Bonaca MP, Braunwald E, Dalby AJ, Fox KA, Murphy SA, et al. Efficacy and safety of vorapaxar as approved for clinical use in the United States. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(3):e001505.
69. Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, Ameriso SF, Dalby AJ, Fish MP, et al. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1404-13.
70. Tricoci P, Huang Z, Held C, Moliterno DJ, Armstrong PW, Van de Werf F, et al. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2012;366(1):20-33.
71. Petzold T, Thienel M, Dannenberg L, Mourikis P, Helten C, Ayhan A, et al. Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa-Driven Platelet Activation via Protease Activated Receptor-1. *Circ Res.* 2020;126(4):486-500.
72. 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.
73. Gruner S, Prostedna 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.
74. Penz S, Reiningger AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J.* 2005;19(8):898-909.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich von ganzem Herzen bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Petzold für die Möglichkeit der Durchführung dieser interessanten Doktorarbeit bedanken. Weiterhin danke ich Herrn Petzold für die über Jahre hinweg durchweg freundliche, konstruktive und begeisterungsfähige Unterstützung.

Auch Frau Dr. med. Manuela Thienel möchte ich meinen Dank aussprechen. Der fachliche und zwischenmenschliche Austausch mit ihr war stets eine Bereicherung für Forschung und Gemüt.

Ebenso bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Zusammenarbeit.

Der Rudolf und Brigitte Zenner-Stiftung danke ich für die Vergabe eines einjährigen Forschungsstipendiums.

Ich bedanke mich weiterhin bei meinen Eltern und meiner Schwester, die mir allesamt mit ihrer unermüdlichen Unterstützung in allen Lebenslagen geholfen haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Ehefrau Dr. med. Stephanie Regenauer-Vandewiele für die andauernde Geduld und den immerwährenden Beistand bedanken.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adhäsions- und Aktivierungsmechanismen der hämostatischen und prothrombotischen Wirkung der Thrombozyten.....	22
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Multiplate®-Analyse	26
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Flusskammerversuchs.....	28
Abbildung 4: Impedanzaggregationsmessung mit Vollblut nach Stimulation mit ADP, Kollagen und TRAP	34
Abbildung 5: Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit der Rivaroxaban-Plasmakonzentration	35
Abbildung 6: FXa-induzierte Thrombozytenaggregation in An- und Abwesenheit von Vorapaxar (VORA)	35
Abbildung 7: Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit TRAP, ADP, oder Kollagen unter Ab- und Anwesenheit von Vorapaxar	36
Abbildung 8: Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung im Blut mit Rivaroxaban behandelter Patienten oder gesunden Kontrollen nach 1 Minute Flusszeit	37
Abbildung 9: Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung im Blut mit Rivaroxaban behandelter Patienten oder gesunden Kontrollen nach 3 Minuten Flusszeit	38
Abbildung 10: Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung auf mit Kollagen beschichteten Flusskammern nach 1 min Flusszeit vor und vier Stunden nach Einnahme von 2.5 mg Rivaroxaban.....	38
Abbildung 11: Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung auf mit Kollagen beschichteten Flusskammern nach 3 min Flusszeit vor und vier Stunden nach Einnahme von 2.5 mg Rivaroxaban.....	39
Abbildung 12: Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung im Blut mit Rivaroxaban behandelter Patienten oder gesunder Kontrollen nach 1 min Flusszeit.....	40
Abbildung 13: Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung im Blut mit Rivaroxaban behandelter Patienten oder gesunder Kontrollen nach 3 min Flusszeit.....	40
Abbildung 14: Rivaroxaban-Plasmakonzentration von Wildtyp-Mäuse nach Einzeldosis Rivaroxaban oder Lösungssubstanz	41
Abbildung 15: Die Zeit bis zur Okklusion des Gefäßes.....	42

Abbildung 16: Thrombus-Embolisation	42
Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopie von mit Rivaroxaban oder DSMO behandelten Tieren 15, 30, 45 und 60 min. nach Verletzung der A. carotis communis.....	42
Abbildung 18: Thrombuskomposition explantierter Thromben von mit Rivaroxaban oder DSMO behandelten Tieren.....	43
Abbildung 19: Intravaskuläre Oberflächendeckung von Thrombozyten.....	43
Abbildung 20: Massenspektrometrische Analyse von PAR-1-Spaltprodukten nach Inkubation mit Faktor Xa.....	44

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: EHRA-Klassifikation (12)	9
Tabelle 2: Berechnung des CHA ₂ DS ₂ -VASc-Scores (16).....	11
Tabelle 3: Patientenkollektiv - Charakteristika	33

9.3 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht eingefügt.

9.4 Publikationsliste

- Petzold, Tobias & Thienel, Manuela & Konrad, Ildiko & Schubert, Irene & Regenauer, Ron & Hoppe, Boj & Lorenz, Michael & Eckart, Annkathrin & Chandraratne, Sue & Lennerz, Carsten & Kolb, Christof & Braun, Daniel & Jamasbi, Janina & Brandl, Richard & Braun, Siegmund & Siess, Wolfgang & Schulz, Christian & Massberg, Steffen. (2016). Oral thrombin inhibitor aggravates platelet adhesion and aggregation during arterial thrombosis. *Science Translational Medicine*. 8. 367ra168-367ra168. 10.1126/scitranslmed.aad6712.
- Petzold, Tobias & Thienel, Manuela & Dannenberg, Lisa & Mourikis, Philipp & Helten, Carolin & Ayhan, Aysel & M'Pembele, René & Achilles, Alina & Trojovský, Kajetan & Konsek, Daniel & Zang, Zhe & Regenauer, Ron & Pircher, Joachim & Ehrlich, Andreas & Lüsebrink, Enzo & Nicolai, Leo & Stocker, Thomas & Brandl, Richard & Röschenthaler, Franz & Polzin, Amin. (2019). Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa Driven Platelet Activation Via Protease Activated Receptor-1. *Circulation Research*. 126. 10.1161/CIRCRESAHA.119.315099.
- Petzold, Tobias & Thienel, Manuela & Dannenberg, Lisa & Mourikis, Philipp & Helten, Carolin & Ayhan, Aysel & M'Pembele, René & Achilles, Alina & Trojovský, Kajetan & Zhang, Zhe & Regenauer, Ron & Pircher, Joachim & Ehrlich, Andreas & Lüsebrink, Enzo & Nicolai, Leo & Stocker, Thomas & Brandl, Richard & Röschenthaler, Franz & Strecker, Jan & Polzin, Amin. (2020). Response by Petzold et al to Letter Regarding Article, "Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa-Driven Platelet Activation via Protease Activated Receptor-1". *Circulation Research*. 126. 10.1161/CIRCRESAHA.120.316786.
- Füessl, Louise & Lau, Tobias & Rau, Simon & Regenauer, Ron & Paal, Michael & Hasmann, Sandra & Arend, Florian & Bruegel, Mathias & Teupser, Daniel & Fischereder, Michael & Schönermarck, Ulf. (2022). Humoral response after SARS-CoV-2 booster vaccination in hemodialysis patients with and without prior infection. *Clinical Kidney Journal*. 15. 10.1093/ckj/sfac148.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Der Einfluss von Rivaroxaban auf die Entstehung von arteriellen Thrombosen

selbstständig verfasst, mich außer 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, den 28.02.2023

Ron Regenauer