

Aus dem Zentrum für Kardiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung der Thrombozytenfunktion bei Patienten mit peripherer arterieller
Verschlusskrankheit – Inhibitorische Mechanismen unter Acetylsalicylsäure,
Clopidogrel und Rivaroxaban in vaskulärer Dosierung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Korbinian Franz Rothenaicher
aus Altötting

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 07. Dezember 2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	11
1. Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	12
2. Literaturdiskussion	14
2.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit	14
2.1.1 Definition, Epidemiologie und Diagnostik.....	14
2.1.2 Grundzüge der Therapie.....	16
2.2 Thrombozyten – Physiologie, Biochemie und klinische Relevanz	18
2.2.1 Thrombozyten im Zentrum der Hämostase.....	19
2.2.2 Rolle der Thrombozyten bei Arteriosklerose und thromboembolischen Krankheiten	25
2.2.3 Antithrombozytäre Substanzen.....	27
2.2.4 Effekte von Rivaroxaban auf die Thrombozytenfunktion	31
2.3 PAVK und antithrombotische Therapie	32
2.3.1 Indikation bei PAVK zur antithrombotischen Therapie	32
2.3.2 Thrombozytenaggregationshemmer bei PAVK – Aktuelle Studienlage	34
2.3.3 Duale Thrombozytenaggregationshemmung nach peripherer transluminaler Angioplastie.....	38
3. Material und Methoden	42
3.1 Geräte und Materialien.....	42
3.1.1 Geräte und Zubehör	42
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	43
3.1.3 Reagenzien	43
3.1.4 Antikörper	44
3.1.5 Software	44
3.2 Studienbeschreibung und Methodik.....	45
3.2.1 Studiendesign.....	45
3.2.2 Studienpopulation.....	45

3.2.3 Studienablauf	48
3.2.4 Probengewinnung und Datenmanagement.....	49
3.2.5 Auswertung und statistische Analyse	50
3.2.6 Gewinnung von plättchenreichem und plättchenfreiem Plasma.....	51
3.2.7 <i>Calibrated Automated Thrombography</i> (CAT).....	51
3.2.7.1 Technisches Prinzip.....	51
3.2.7.2 Versuchsdurchführung.....	52
3.2.7.3 Auswertung der Thrombingenerierung	53
3.2.8 Durchflusszytometrie	54
3.2.8.1 Technisches Prinzip.....	54
3.2.8.2 Quantifizierung der Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche.....	56
3.2.8.3 Thrombozytenfunktionsmessung.....	57
3.2.8.4 Monitoring von ADP-spezifischen P2Y ₁₂ Antagonisten mittels <i>Vasodilator Stimulated Phosphoprotein</i> (VASP)	60
4. Ergebnisse.....	64
4.1 Deskriptive Statistik.....	64
4.1.1 Patientenkollektiv und Probencharakteristika.....	64
4.1.2 Messung der Thrombingenerierung im PFP und PRP	66
4.1.3 Messung der Thrombozytenfunktion mittels Durchflusszytometrie.....	69
4.1.4 Messung des Thrombozyten-Reaktivitätsindex mittels VASP Phosphorylierung...73	
4.2 Konfirmatorische Datenanalyse	75
4.3 Explorative Datenanalyse	75
4.3.1 Untersuchungen der thrombozytären und plasmatischen Thrombingenerierung <i>in vitro</i>	75
4.3.1.1 <i>Lagtime</i> im PFP nach Zugabe von TF	76
4.3.1.2 <i>Lagtime</i> im PRP nach Zugabe von TF	77
4.3.1.3 <i>Lagtime</i> im PRP nach Zugabe von Thrombin.....	78
4.3.1.4 ETP im PFP nach Zugabe von TF.....	79
4.3.1.5 ETP im PRP nach Zugabe von TF	80
4.3.1.6 ETP im PRP nach Zugabe von Thrombin.....	81
4.3.1.7 <i>Peak</i> im PFP nach Zugabe von TF	82
4.3.1.8 <i>Peak</i> im PRP nach Zugabe von TF	83
4.3.1.9 <i>Peak</i> im PRP nach Zugabe von Thrombin	84

4.3.2 Untersuchung der Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche mittels Durchflusszytometrie.....	85
4.3.3 Untersuchung der Thrombozytenfunktion mittels Durchflusszytometrie.....	86
4.3.3.1 Analyse der CD62P Oberflächen-Expression basal und nach Aktivierung mit Thrombozyten-Agonisten.....	87
4.3.3.2 Analyse der thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptor-Aktivierung basal und nach Aktivierung mit Thrombozyten-Agonisten.....	93
4.3.3.3 Analyse der thrombozytären Mepacrine Aufnahme und Freisetzung aus den δ -Granula.....	99
4.3.4 Untersuchung des Thrombozyten-Reaktivitätsindex mittels VASP Phosphorylierung	102
5. Diskussion	103
5.1 <i>In vitro</i> Thrombingenerierungspotential bei Patienten mit PAVK bzw. KHK unter verschiedener antithrombotischer Therapie	103
5.1.1 Einfluss von Rivaroxaban auf die <i>in vitro</i> Thrombingenerierung.....	105
5.1.2 Effekte von ASS und Clopidogrel als Monotherapie oder duale Thrombozytenaggregationshemmung auf die <i>in vitro</i> Thrombingenerierung.....	107
5.1.3 Assoziation zwischen Thrombingenerierung und thrombotischen Ereignissen ...	110
5.2 Vergleich der Thrombozytenfunktion von Patienten mit PAVK bzw. KHK unter verschiedener antithrombotischer Therapie	112
5.2.1 Einfluss von Rivaroxaban auf die Thrombozytenfunktion.....	113
5.2.2 Effekte von ASS und Clopidogrel als Monotherapie oder duale Thrombozytenaggregationshemmung auf die Thrombozytenfunktion.....	116
5.3 Ansprechen auf Clopidogreltherapie bei PAVK Patienten	119
5.3.1 Nachweis und Prävalenz inadäquater Clopidogrel <i>Response</i> bei PAVK Patienten	120
5.3.2 Therapeutische Möglichkeiten bei Clopidogrel <i>Low-</i> bzw. <i>Non-Responder</i>	123
5.4 Limitationen der Studie	125
6. Zusammenfassung	126
7. Literaturverzeichnis	129
8. Anhang.....	138
8.1 Messergebnisse der Thrombingenerierung im CAT	138
8.2 Ergebnisse der Analyse der Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche.....	139

8.3 Ergebnisse der TZ-Funktionsanalyse.....	141
8.3.1 CD62P.....	141
8.3.2 GPIIb/IIIa.....	143
8.3.3 Mepacrine	144
8.4 Ergebnisse des VASP Assays	145
Danksagung	146
Lebenslauf.....	147

Abkürzungsverzeichnis

ABI	Ankle-Brachial-Index
ABS	Antigen binding sites
ACE	Angiotensin Converting Enzym
ADP	Adenosindiphosphat
ARB	Angiotensinrezeptorblocker
ASS	Acetylsalicylsäure
AU	Arbitrary units
BMI	Body Mass Index
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Calibrated Automated Thrombography
CAVK	Cerebrale arterielle Verschlusskrankheit
CD	Cluster of Differentiation
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	Konfidenzintervall
COX	Cyclooxygenase
CTA	Computertomographische Angiographie
ESC	European Society of Cardiology
ETP	Endogenes Thrombin Potential
FA	Formaldehyd
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GP	Glykoprotein
GPRP	Gly-Pro-Arg-Pro
GTP	Guanosintriphosphat
HR	Hazard ratio
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5- Trisphosphat
ISTH	International Society on Thrombosis and Hemostasis
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
MACE	Major adverse cardiovascular event
MALE	Major adverse limb event
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MRA	Magnetresonanzangiographie
NO	Stickstoffmonoxid
PAD	Peripheral Arterial Disease

PAR	Protease-activated receptor
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PF	Plättchenfaktor
PFP	Plättchenfreies Plasma
PGE1	Prostglandin E1
PGI ₂	Prostazyklin
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRI	Platelet reactivity index
PRP	Plättchenreiches Plasma
PTA	Perkutane tranluminale Angioplastie
RANTES	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted chemokine
TBI	Toe Brachial Index
TG	Thrombingenerierung
TF	Tissue factor
TIMI	Thrombolysis in Myocardial Infarction
TRAP-6	Thrombin Receptor Activator Peptide-6
TXA ₂	Thromboxan A2
VASP	Vasodilator Stimulated Phosphoprotein
vWF	Von Willebrand Faktor

Einheiten

g	Gramm	l	Liter
mg	Milligramm	dl	Deziliter
µg	Mikrogramm	ml	Milliliter
ng	Nanogramm	µl	Mikroliter
cm	Zentimeter	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mm	Millimeter	°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer		
nm	Nanometer		
d	Tag		
min	Minuten		
sek	Sekunden		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: G Protein gekoppelte Signaltransduktion bei Thrombozyten.....	22
Abbildung 2: Zellabhängige Thrombingenerierung.	24
Abbildung 3: Thrombozyten in der Frühphase der Atherogenese.....	26
Abbildung 4: Wirkmechanismus antithrombotischer Substanzen.....	30
Abbildung 5: Einfluss von Rivaroxaban auf Thrombozyten und Gerinnungssystem.....	32
Abbildung 6: Punkteverteilung und Definitionen beim HAS-BLED Score.	47
Abbildung 7: Übersicht über die Zeitpunkte der Blutanalysen in der Studiengruppe.	49
Abbildung 8: Thrombogramm.	54
Abbildung 9: Regulation der VASP Phosphorylierung in Thrombozyten.	61
Abbildung 10: Lagtime im PFP nach Zugabe von TF.....	76
Abbildung 11: Lagtime im PRP nach Zugabe von TF.	77
Abbildung 12: Lagtime im PRP nach Zugabe von Thrombin.....	78
Abbildung 13: ETP im PFP nach Zugabe von TF.	79
Abbildung 14: ETP im PRP nach Zugabe von TF.	80
Abbildung 15: ETP im PRP nach Zugabe von Thrombin.	81
Abbildung 16: Peak im PFP nach Zugabe von TF.	82
Abbildung 17: Peak im PRP nach Zugabe von TF.....	83
Abbildung 18: Peak im PRP nach Zugabe von Thrombin.	84
Abbildung 19: Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche.	85
Abbildung 20: Basale thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P.	87
Abbildung 21: CD62P Oberflächen-Expression nach Zugabe von 12,5 µM TRAP-6.....	88
Abbildung 22: CD62P Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin.....	89
Abbildung 23: CD62P Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 ng/ml Convulxin.....	90
Abbildung 24: CD62P Oberflächen-Expression nach Zugabe von 1 µM Arachidonsäure.	91
Abbildung 25: CD62P Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,75 µM ADP.....	92
Abbildung 26: Basale Bindung von PAC-1 an GPIIb/IIIa Rezeptor.	93
Abbildung 27: PAC-1 Bindung an GPIIb/IIIa Rezeptor nach Zugabe von 12,5 µM TRAP-6. .	94
Abbildung 28: PAC-1 Bindung an GPIIb/IIIa Rezeptor nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin.	95
Abbildung 29: PAC-1 Bindung an GPIIb/IIIa Rezeptor nach Zugabe von 5 ng/ml Convulxin.	96
Abbildung 30: PAC-1 Bindung an GPIIb/IIIa Rezeptor nach Zugabe von 1 µM Arachidonsäure.	97
Abbildung 31: PAC-1 Bindung an GPIIb/IIIa Rezeptor nach Zugabe von 0,75 µM ADP.....	98
Abbildung 32: Basale Mepacrine Aufnahme in die δ-Granula.	99
Abbildung 33: Mepacrine Freisetzung aus den δ-Granula nach Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin.	100

Abbildung 34: Mepacrine Freisetzung aus den δ -Granula nach Zugabe von 20 ng/ml Convulxin.	101
Abbildung 35: Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI) bei Patienten mit KHK bzw. PAVK unter verschiedener medikamentöser Therapie.....	102
Abbildung 36: Thrombogramm PFP nach Zugabe von TF.....	138
Abbildung 37: Thrombogramm PRP nach Zugabe von TF.	138
Abbildung 38: Thrombogramm PRP nach Zugabe von Thrombin.....	139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Studie verwendete Geräte und Hersteller.	42
Tabelle 2: In dieser Studie verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.	43
Tabelle 3: In dieser Studie verwendete Reagenzien und deren Hersteller.	43
Tabelle 4: In dieser Studie verwendete Antikörper und deren Bezugsquelle.	44
Tabelle 5: In dieser Studie verwendete Software-Programme.	44
Tabelle 6: Versuchsreihen kalibrierte automatisierte Thrombographie.	53
Tabelle 7: Verwendete Antikörper zur Quantifizierung der Hauptrezeptoren.	56
Tabelle 8: Thrombozytäre Aktivierungsmarker mit den dazugehörigen Targets.	59
Tabelle 9: Kitkomponenten des PLT VASP/P2Y ₁₂ Kits.	62
Tabelle 10: Charakteristika des Studienkollektivs.	65
Tabelle 11: Messergebnisse der Thrombingenerierung im CAT.	67
Tabelle 12: Expression von CD62P basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten.	70
Tabelle 13: Thrombozytäre GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten.	71
Tabelle 14: Thrombozytäre Mepacrine Aufnahme und Freisetzung basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten.	73
Tabelle 15: Messergebnisse der VASP Phosphorylierung.	74
Tabelle 16: Hauptrezeptorpräsentation auf der Thrombozytenoberfläche.	139
Tabelle 17: Vergleich der Hauptrezeptorpräsentation auf der Thrombozytenoberfläche.	140
Tabelle 18: Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten in aufsteigender Konzentration.	141
Tabelle 19: Thrombozytäre GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten in aufsteigender Konzentration.	143
Tabelle 20: Thrombozytäre Mepacrine Aufnahme und Freisetzung basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten in aufsteigender Konzentration.	144
Tabelle 21: Einzelmessergebnisse der VASP Phosphorylierung.	145

1. Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK) ist eine systemische Gefäßerkrankung auf Grundlage von Atherosklerose mit häufiger Manifestation in der unteren Extremität [1]. Betroffene Patienten haben ein hohes kardiovaskuläres Risiko geprägt von kardialen und zerebralen Ereignissen mit eingeschränkter Lebensqualität und erhöhtem Risiko für Amputationen [2]. Dabei kann diese Erkrankung als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität betrachtet werden mit zunehmendem Risiko bei fortgeschrittener Erkrankung [3].

Nach Zahlen der Weltgesundheitsorganisation stellen atherothrombotische Erkrankungen weltweit die Hauptursache der Morbidität und Mortalität dar [4]. Schätzungsweise leiden allein in Europa etwa 40 Millionen Menschen an einer PAVK und die Prävalenz nimmt parallel mit dem Alter zu [3]. Im Zuge der demographischen Entwicklung einer alternden Bevölkerung sowie der damit verbundenen gleichzeitigen Zunahme atherogener Risikofaktoren wie Hypertonie und Diabetes mellitus ist in Zukunft mit einer weiter steigenden Erkrankungszahl zu rechnen [2, 5].

Dieses kardiovaskuläre Risiko bei PAVK kann deutlich durch eine antithrombotische Therapie reduziert werden. Der klinische Stellenwert von Thrombozytenaggregationshemmern bei symptomatischer PAVK zur Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse ist daher unbestritten [6, 7]. Die *European Society of Cardiology* (ESC) unterstreicht in den aktuellen Leitlinien von 2017 diese enorme Bedeutung in der Sekundärprävention der peripheren Atherosklerose und widmet diesbezüglich der antithrombotischen Therapie ein ganzes Kapitel. Des Weiteren empfehlen diese aktuellen Leitlinien der ESC mit höchsten Empfehlungs- und Evidenzgrad eine singuläre Thrombozytenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure (ASS) oder Clopidogrel zur Sekundärprophylaxe bei PAVK [8].

Thrombozyten sind Schlüsselzellen der primären und sekundären Hämostase, da auf deren Oberfläche explosionsartig Thrombin, ein zentrales Enzym der Hämostase, gebildet wird und Thrombozyten aktiviert [9]. Darüber hinaus sind Thrombozyten maßgeblich an thromboembolischen Komplikationen sowie an der initialen Phase der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt. Entzündung und Hämostase sind dabei zwei

sich gegenseitig beeinflussende und verflochtene Prozesse, sodass eine Thrombozytenaggregationshemmung endotheliale Entzündungsprozesse beeinflusst und vice versa [10]. Studien verdeutlichen in diesem Zusammenhang, dass besonders bei PAVK Patienten eine erhöhte Thrombozytenaktivierung sowie erhöhte Entzündungsparameter vorherrschen [11, 12]. Diese Effekte einer erhöhten Thrombozytenaktivität konnten in Studien bei PAVK Patienten trotz ASS Einnahme weiterhin nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass sich Patienten mit PAVK hinsichtlich der Wirkung von Gerinnungsmedikamenten deutlich von Patienten anderer Manifestationen der Atherosklerose unterscheiden [13].

In der im Jahre 2017 publizierte COMPASS Studie konnte gezeigt werden, dass eine niedrig dosierte Antikoagulation mit Rivaroxaban zusätzlich zu einer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS signifikant die Prognose von Hochrisiko Patienten mit PAVK bei vertretbarem Sicherheitsprofil verbessert [14]. Es ist derzeit jedoch unklar, worauf diese klinischen Effekte einer intensivierten Gerinnungstherapie zurückzuführen sind.

Ziel meiner Dissertation ist es, die *in vitro* Thrombinbildungskapazität sowie die Thrombozytenfunktion bei Patienten mit PAVK und koronarer Herzkrankheit (KHK) unter verschiedenen, im klinischen Alltag bei PAVK zur Sekundärprävention und nach Intervention eingesetzten Therapieregimen, zu untersuchen, um mögliche Rückschlüsse auf die veränderte Wirksamkeit antithrombotischer Therapien bei PAVK zu ziehen.

Dafür sollte die plasmatische und thrombozytäre Thrombinbildungskapazität mittels kalibrierter automatisierter Thrombographie (CAT) bei PAVK und KHK Patienten nach diversen antithrombozytären Therapiekonzepten im plättchenfreien und plättchenreichen Plasma getriggert durch Thrombin und *tissue factor* (TF) vergleichend analysiert werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Glykoprotein (GP)IIb/IIIa Aktivierung, P-Selektin Oberflächenexpression sowie die Mepacrine Aufnahme und Freisetzung *ex vivo* und nach Zugabe von Agonisten zwischen Patienten mit KHK und PAVK mit unterschiedlicher medikamentöser Therapie charakterisiert werden. Da Clopidogrel einen hohen Stellenwert in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse bei PAVK Patienten hat, sollte zudem das Ansprechen auf die Clopidogreltherapie mittels *Vasodilator Stimulated Phosphoprotein* (VASP) Phosphorylierung evaluiert werden.

2. Literaturdiskussion

2.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit

2.1.1 Definition, Epidemiologie und Diagnostik

Bei der PAVK handelt es sich um eine chronisch-progrediente Erkrankung meist auf Grundlage einer weit fortgeschrittenen Atherosklerose [15, 16]. Vaskulitiden, traumatische Gefäßverletzungen und embolische Verschlüsse sind seltener die Ursache der PAVK [17]. Zwar ist die PAVK überwiegend in den unteren Extremitäten klinisch manifest, jedoch verdeutlichen die 2017 veröffentlichten Leitlinien der ESC zur Diagnose und Therapie der *Peripheral Arterial Disease* (PAD), dass die Atherosklerose eine systemische Erkrankung des gesamten Gefäßbaumes ist. Darin werden atherosklerotische Erkrankungen in verschiedene Gefäßgebiete aufgegliedert [8]. Schlaganfall, Herzinfarkt und PAVK stellen somit lediglich unterschiedliche Manifestationsformen ein und derselben Erkrankung dar, wobei zahlreiche Studien zeigen, dass gerade die PAVK als weit fortgeschrittener Atherosklerose betrachtet werden sollte [18, 19].

Weltweit leiden schätzungsweise über 200 Millionen Menschen an PAVK [20, 21]. Ein positiv linearer Zusammenhang zeigt die Prävalenz in Bezug auf das Alter der Patienten. Unabhängig vom Geschlecht steigt diese bei über 70-Jährigen auf etwa 15-20% an [1, 22]. Des Weiteren liegt eine hohe Koinzidenz der Atherosklerose in mehreren Gefäßprovinzen vor und die Atheroskleroselast korreliert dabei direkt mit der kardiovaskulären Prognose. So liegt die Prävalenz bei Patienten mit PAVK für eine KHK bei bis zu 70% und ist Ausdruck der ursächlichen generalisierten Atherosklerose [1, 23].

Klinisch symptomatisch wird zwischen einem Stadium mit ischämiebedingten Muskelschmerzen bei Belastung, als *Claudicatio intermittens* bezeichnet, und der kritischen Extremitätenischämie unterschieden [24]. Zur Einteilung dieser Symptomatik bedient man sich in Deutschland meist der Klassifikation nach Fontaine, die vier Stadien der klinischen Präsentation unterscheidet [25].

Die Diagnostik der PAVK erfolgt stufenweise und beginnt mit einer gezielten Anamnese mit klinischer Untersuchung, welche Inspektion, Palpation der Pulse im Seitenvergleich und Auskultation auf Strömungsgeräusche der Aorta, Beckenarterien und Oberschenkelarterien beinhaltet [26].

Zur Basisdiagnostik zählt die Ermittlung des Knöchel-Arm-Index (*ankle-brachial-index* = ABI), einer einfachen und kostengünstigen Methode PAVK Patienten zu identifizieren. Die Messung des ABI erfolgt mittels geeigneter Blutdruckmanschette an der *Arteria dorsalis pedis* und *Arteria tibialis posterior* am liegenden Patienten nach einer Ruhephase von mindestens zehn Minuten. Dabei wird der niedrigere systolische Knöcheldruck ins Verhältnis zum systolischen Blutdruck der oberen Extremität gesetzt [23]. Für die Definition der PAVK wird der niedrigste berechnete ABI verwendet. ABI Werte unter 0,9 sind kennzeichnend für eine PAVK, wobei bei einem ABI unter 0,5 eine schwere Ischämie des Beins vorliegt [25]. Falsch hohe ABI Werte werden bei Patienten mit Mediakalkinose kennzeichnend durch nicht kompressible Gefäße ermittelt. Alternativ kann daher die Messung des Blutdrucks an der Großzeh erfolgen und der *Toe Brachial Index* (TBI) bestimmt werden [22, 24]. Pathologisch ist dieser TBI bei einem Wert $\leq 0,7$. Der TBI berechnet sich analog zum ABI als Verhältnis von Großzehblutdruck zu Blutdruck am Arm [25].

Bei erhärtetem PAVK Verdacht aus klinischer Untersuchung und Basisdiagnostik wird eine weiterführende angiologische Diagnostik durchgeführt, um den Kompensationsgrad der PAVK zu bestimmen und eine fundierte Therapieplanung zu erstellen.

Diese beinhaltet bildgebende Verfahren, wie etwa Duplexsonographie, computertomographische- und Magnetresonanztomographie (CTA, MRA) sowie funktionelle angiologische Diagnostik, beispielsweise *Continuous wave* Dopplersonographie, Oszillographie und Laufbandergometrie [26].

Eine zentrale Rolle in der Diagnostik der PAVK nimmt dabei die farbkodierte Duplexsonographie ein, die gleichzeitig eine morphologische und funktionelle Untersuchung ermöglicht jedoch ein gutes Duplexsonographiegerät sowie erfahrene Untersucher voraussetzt [25]. Um eine in Ruhe gut kompensierte PAVK zu demaskieren, bedient man sich Belastungsuntersuchungen. Häufig wird dazu eine standardisierte Laufbandergometrie durchgeführt bis der Patient Schmerzen in den Beinen angibt. Vor und nach der Laufbanduntersuchung wird der ABI bestimmt. Reduziert sich der ABI Wert nach Laufbanduntersuchung um 20%, so beweist dies eine PAVK [25]. Funktionelle Untersuchungen liefern wichtige Informationen zum Kompensationsgrad der PAVK und sind für die Indikationsstellung weiterer therapeutischer Schritte von enormer Bedeutung.

Goldstandard der Gefäßdarstellung ist aktuell die invasive intraarterielle Angiographie in digitaler Subtraktionstechnik, welche meist in Bereitschaft für Balloninterventionen durchgeführt wird. Weitere radiologische Gefäßdarstellungen sind CTA und MRA, deren Anwendung bei unzureichenden Befunden zur Therapieplanung dienen [24].

Differenzialdiagnostisch müssen Claudicatio intermittens Symptome von nicht vaskulären Ursachen, unter anderem bedingt durch Spinalkanalstenosen, Gelenkarthrosen oder Veränderungen der Wirbelsäule, abgegrenzt werden [24]. Häufig ermöglicht erst die Kombination mehrerer Untersuchungsmodalitäten die eindeutige Diagnose einer PAVK.

2.1.2 Grundzüge der Therapie

Ziel der PAVK Therapie ist eine Reduzierung kardiovaskulärer und extremitätenbedingter Ereignisse und damit eine Verbesserung der kardiovaskulären Prognose und Lebensqualität [26]. Unabhängig des klinischen Stadiums erfolgt eine konservative Basisbehandlung, die regelmäßige körperliche Aktivität, Nikotinkarenz, Gewichtsreduktion sowie Behandlung einer etwaigen Hypercholesterinämie, Hypertonie und Diabeteseinstellung umfasst. Bei symptomatischen PAVK Patienten wird eine antithrombotische Therapie empfohlen; im Stadium kritischer Extremitätenischämie ist eine rasche Revaskularisierungstherapie zur Vermeidung von Amputationen indiziert [1].

Fundamental bei der nicht medikamentös konservativen Therapie einer PAVK ist eine standardisierte Bewegungstherapie, die insbesondere bei Claudicatio intermittens Patienten in supervidierter Form stattfinden sollte [26]. Studien zeigten nicht nur eine Steigerung der Gehstrecke, sondern auch eine Zunahme von mit Angiogenese assoziierten Zelltypen sowie eine Reduktion von Inflammationsmarkern [1]. Die Leitlinien der ESC sprechen physischer Aktivität, gesunder Ernährung und Nikotinkarenz den höchsten Empfehlungsgrad zur Therapie einer Atherosklerose aus [8].

Um die Gehstrecke bei Claudicatio intermittens medikamentös zu verlängern, ist derzeit lediglich Cilostazol und Naftidrofuryl in Verwendung und wird bei einer Gehstrecke unter 200 Metern bei stark eingeschränkter Lebensqualität eingesetzt [27, 28].

In der medikamentösen PAVK Sekundärprävention ist die Therapie von Fettstoffwechselstörungen von zentraler Bedeutung [26]. Die Prognose einer PAVK kann maßgeblich insbesondere durch Senkung des *low density lipoprotein* (LDL) Cholesterins verbessert werden. Mehrere randomisierte kontrollierte Studien der letzten drei Jahrzehnte zeigten bei PAVK Patienten unter Statintherapie einen signifikanten Rückgang von Myokardinfarkten, Schlaganfall und kardiovaskulärem Tod sowie Revaskularisierungsmaßnahmen [29, 30]. Eine Statintherapie bewirkt zudem eine Steigerung der schmerzfreien Strecke bei Patienten mit Claudicatio intermittens [31]. Aktuelle Leitlinien der ESC empfehlen daher eine Statintherapie zur Sekundärprävention bei PAVK Patienten, die bis zur maximal tolerierbaren Statindosis zu steigern ist, um den Ziel LDL Wert zu erreichen [8]. Dieser wurde bei sogenannten Hochrisikopatienten, zu denen PAVK Patienten gezählt werden, 2019 von der ESC und Europäischen Atherosklerosegesellschaft veröffentlichten Leitlinie zum Umgang mit Dyslipidämie auf unter 55 mg/dl gesetzt und verdeutlicht die enorme Bedeutung der Therapie von Fettstoffwechselstörungen bei Patienten mit peripherer Atherosklerose [32].

Eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse bei PAVK Patienten lässt sich durch Behandlung einer Hypertonie erreichen. Empfohlen wird diesbezüglich ein Zielblutdruck von unter 140/90 mmHg beziehungsweise bei Diabetes Patienten ein diastolischer Blutdruck ≤ 85 mmHg, wobei systolische Werte weniger als 110-120 mmHg vermieden werden sollten [8]. Neben Lebensstiländerungen und täglichem Kochsalzkonsum unter 5-6 g finden vor allem Angiotensin Converting Enzym (ACE) Hemmer und Angiotensin Rezeptorblocker (ARB) Verwendung, da diese in Studien zu weniger kardiovaskulären Ereignissen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und kardiovaskulärem Tod führten [8, 33]. Diabetes mellitus trägt wesentlich zur Entwicklung und Progression einer PAVK bei [1]. Um Amputationen und vaskuläre Eingriffe bei PAVK Patienten zu vermeiden, ist eine enge Zusammenarbeit zwischen Gefäßmedizinern und Diabetologen essenziell [8, 26].

Bei starker Limitation im Alltag, erfolgloser Verlängerung der Gehstrecke durch supervidiertes Gehtraining und ausgereizter medikamentöser Therapie sind bei PAVK Patienten im Stadium der Claudicatio intermittens Revaskularisierungsmaßnahmen indiziert [34]. Dabei wird zwischen einer endovaskulären Therapie, bei der über einen Ballonkatheter der Verschluss

rekanalisiert oder die Stenose erweitert wird und einer operativen Therapie, die durch Thrombendarteriektomie oder Bypassoperation erfolgen kann, unterschieden [26]. Ob eine endovaskuläre oder eine operative Therapie zum Einsatz kommt, ist unter anderem davon abhängig, welche Gefäßregion betroffen ist und in welchem Zustand der Patient ist. Prinzipiell empfehlen aktuelle Leitlinien der ESC von 2017 bei kurzen Läsionen, das heißt aorto-iliakal unter 5 Zentimeter und femoro-popliteal unter 25 Zentimeter eine endovaskuläre Therapie [8]. Patienten mit chronisch Gliedmaßen bedrohender Ischämie bedürfen einer individuellen Risikostratifizierung sowie eines multidisziplinären Therapieansatzes bestehend aus Wundtherapie, Schmerzkontrolle und rascher Revaskularisation [34]. Im Stadium einer akuten Extremitätenischämie, häufig durch embolische Verschlüsse oder akute Thrombosen verursacht, sollte eine dringliche Revaskularisation durchgeführt werden, um Amputationen zu vermeiden [8].

Aktuell untersuchen mehrere Studien die antiinflammatorische Therapie bei Atherosklerose. Es wird sich in Zukunft zeigen, inwiefern dieser therapeutische Ansatz in die Behandlung Einzug finden wird. Positive Einflüsse auf kardiovaskuläre Ereignisse konnten bereits in der CANTOS Studie gezeigt werden, bei welcher ein monoklonaler Antikörper gegen Interleukin (IL) 1 β eingesetzt wurde [35]. Studien aus den USA zeigten zudem, dass die Bedeutung der PAVK von Patienten und Ärzten unterschätzt wird und PAVK Patienten hinsichtlich Risikofaktoren und Begleiterkrankungen deutlich unterbehandelt sind [20, 22]. Neue Therapieregime, Forschungsvorhaben und Aufklärungsarbeit sind für eine adäquate PAVK und Atherosklerose Therapie in Zukunft unerlässlich.

2.2 Thrombozyten – Physiologie, Biochemie und klinische Relevanz

Thrombozyten sind etwa im Durchmesser 2 bis 3 μm große anukleäre Blutplättchen, welche als Sequestrierung von in Knochenmark gereiften Megakaryozyten entstehen [36]. Physiologisch sind diese in einer Konzentration von 100–450 $\times 10^9$ pro Liter im peripheren Blut vorhanden und haben eine durchschnittliche Lebenszeit von 5 bis 10 Tagen, bevor sie über das retikuloendotheliale System der Leber und Milz abgebaut werden [37, 38].

Im ruhenden Zustand haben Thrombozyten eine typisch diskoide Form. Charakteristisch für Thrombozyten sind spezifische Rezeptoren auf deren Membran, welche elementar für die Signaltransduktion sind. Ferner besitzen Thrombozyten im

Zytoplasma Speichergranula mit Inhaltsstoffen, die nach Thrombozytenaktivierung sezerniert werden und eine wichtige Rolle als Mediatoren der Hämostase sowie im Rahmen von Entzündungs- und Immunmodulation einnehmen [39].

Entgegen früherer Überzeugungen, dass Thrombozyten einzig als Hämostasezellen dienen, sind Thrombozyten an vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Insbesondere in der Frühphase der Arteriosklerose, bei Entzündung und Abwehr, Tumorwachstum und Tumormetastasierung, beim Schutz des Endothels und Angiogenese sowie bei arteriellen thrombotischen Gefäßverschlüssen sind sie von zentraler Bedeutung [9]. Nachfolgend wird die klinische Funktion und Beteiligung der Thrombozyten bei Hämostase und Arteriosklerose dargestellt.

2.2.1 Thrombozyten im Zentrum der Hämostase

Bei der Hämostase handelt es sich um ein komplexes System, welches einerseits bei einer Verletzung der Integrität von Blutgefäßen zu einem Wundschluss am Ort der Schädigung führt sowie andererseits die Fließeigenschaft des Blutes gewährleistet [40]. Man unterscheidet dabei im Ablauf die primäre Hämostase, welche vorwiegend durch Zusammenlagerung von Thrombozyten zu einem instabilen Thrombus und ersten Wundschluss führt, von der sekundären Hämostase, auch plasmatische Gerinnung genannt, durch Gerinnungsfaktoren. Klassische Sichtweisen unterscheiden bei der sekundären Hämostase zwischen einem intrinsischen und extrinsischen Aktivierungsweg, die beide kaskadenartig weitere Enzyme aktivieren und als gemeinsame Endstrecke zu einem stabilen Thrombus durch Fibrin führen. Nach definitivem Wundschluss und funktionslos gewordenem Blutgerinnsel sowie als Schutz vor überschießender Koagulation limitiert das Fibrinolyse-System vor überschießender Koagulation durch Abbau von Fibrin Polymeren [41].

Moderne Sichtweisen der Hämostase verlassen jedoch dieses klassische Modell der sekundären Hämostase mit intrinsischer und extrinsischer Aktivierungskaskade zunehmend zu Gunsten des zellbasierten Modells. Dougald Monroe beschrieb dieses zellbasierte Modell erstmalig, welches über Aktivierungsschleifen und Feedback-Reaktionen auf der Thrombozytenoberfläche zu explosionsartiger Thrombinvermehrung führt und Thrombozyten als Zentralzellen der Hämostase betrachtet [42].

Nachfolgend wird die primäre Hämostase durch Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und –aggregatbildung sowie das zellbasierte Modell der Thrombingenerierung auf der Thrombozytenoberfläche erläutert.

Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregatbildung

Durch Verletzung des Gefäßendothels oder atherosklerotischer Plaqueruptur treten subendotheliale Strukturen in Erscheinung, welche konstitutiv TF an der Oberfläche tragen und unterschiedlichste Mechanismen der Blutgerinnung aktivieren. Dabei interagieren Thrombozyten als erste Zellen am verletzten Endothel. Bei hohem Scherstress, welcher bei arterieller Blutströmung und hochgradigen Stenosen vorherrscht, werden Thrombozyten dabei durch die Interaktion des GPIIb mit dem von Willebrand Faktor (vWF) und Thrombospondin-1 eingefangen und abgebremst. Eine Aktivierung des GPIIb/IIIa - Komplexes erfolgt jedoch erst bei mehrfachem Kontakt und Quervernetzen des multimeren vWF mit GPIIb auf den Thrombozyten [39, 43]. Demgegenüber bindet GPIIb - Hauptrezeptor für Kollagen auf der Thrombozytenoberfläche - bei geringem Scherstress freiliegende Kollagenfibrillen an der verletzten Gefäßwand und leitet das Kollagenaktivierungssignal über *Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* weiter [9].

Dieser Adhäsionsprozess beziehungsweise Kontakt zwischen verletztem Gefäß und Thrombozyten führt über Signalkaskaden zu einer aktivierenden Konformationsänderung der Integrine in der Thrombozytenmembran und Thrombozyten werden aktiviert. Das aktivierte Integrin $\alpha 2\beta 1$ (GPIIb/IIIa) bewirkt eine stärkere Bindung an Kollagen, wohingegen das Integrin $\alpha 1\text{b}\beta 3$ (GPIIb/IIIa) in aktivierter Form an lösliches Fibrinogen und vWF binden kann. Dadurch haften Thrombozyten fest an der subendothelialen Matrix, können sich ausbreiten und so effektiv den ersten Wundverschluss bewirken [39].

Um weitere Thrombozyten zu rekrutieren und die initiale Stimulierung autokrin zu amplifizieren, setzen die aktivierten Thrombozyten eine Vielzahl von Granulainhaltsstoffen aus α -Granula, dichten Granula und Lysosomen via Exozytose frei. Wichtige Guanosintriphosphat (GTP) – bindende prothrombotische Inhaltsstoffe sind unter anderem Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan A₂ (TXA₂) (vgl. Abbildung 1). Des Weiteren bewirkt Serotonin eine Verstärkung der

Thrombozytenaktivierung über den Gq gekoppelten Serotoninrezeptor. Neben GTP bindenden G Proteinen erfolgt als zweiter wichtiger Signaltransduktionsweg die Signalübertragung über Quervernetzung der Rezeptoren durch Tyrosinkinasen. Als Agonisten dafür fungieren Immunglobuline, Kollagen und vWF [39].

Die Vernetzung der Thrombozyten untereinander wird als Thrombozytenaggregation bezeichnet und geschieht über Ausbildung von Fibrinogenbrücken am GPIIb/IIIa. Ein inaktiver Thrombozyt trägt in etwa 50.000 GPIIb/IIIa Komplexe auf seiner Oberfläche. Jedoch ist er im inaktiven Zustand nicht in der Lage, lösliche Liganden zu binden und dadurch unkontrolliert und ohne Reiz sich zu aktivieren [44]. Interaktionen zwischen GPIIb/IIIa und seinen Liganden bedingen Formwechsel, Pseudopodienbildung und Ausbreitung der Thrombozyten und resultieren in einer Vernetzung der Thrombozyten [10].

Um eine unkontrollierte Thrombozytenaktivierung zu vermeiden, werden Thrombozyten über inhibitorische und modulierende Mechanismen reguliert. Zum einen sondert intaktes Gefäßendothel thrombozyteninhibitorische Stoffe wie Prostazyklin (PGI_2) oder Stickstoffmonoxid (NO) ab; zum anderen werden Thrombozyten über autogene negative Feedback Reaktionen, insbesondere nach Stimulierung mit Thrombin oder Kollagen, gehemmt [39].

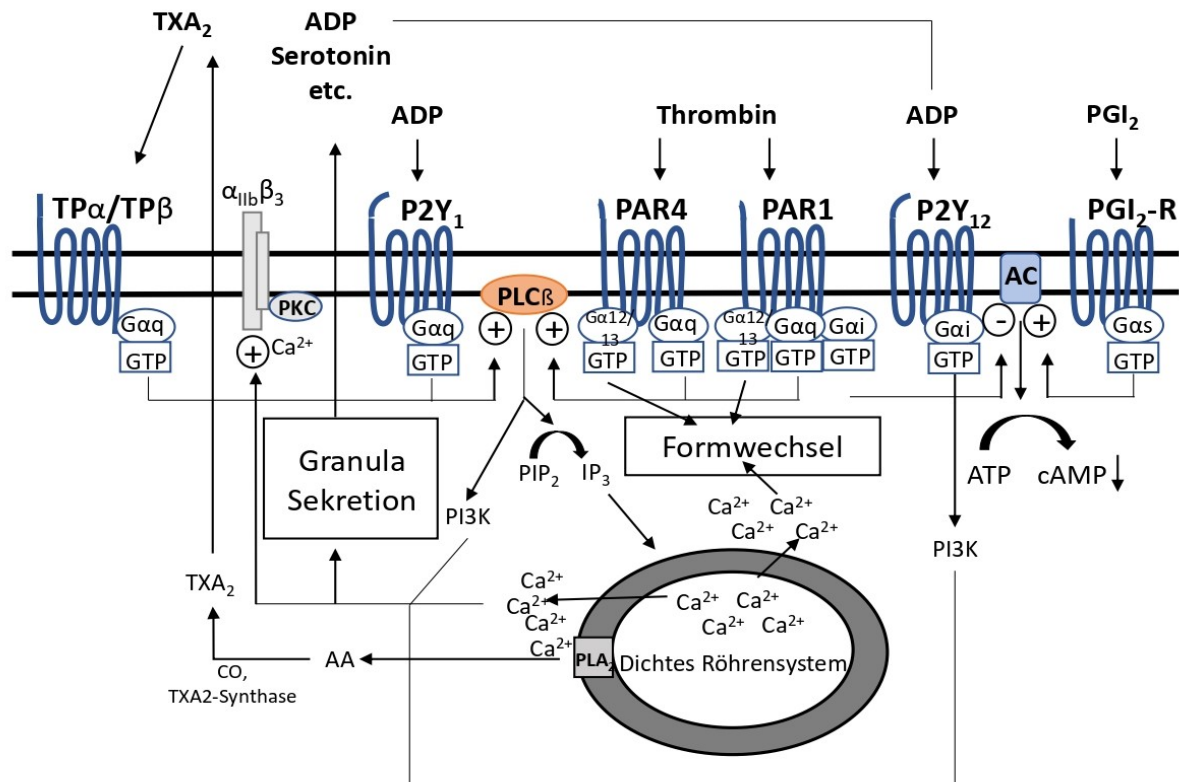


Abbildung 1: G Protein gekoppelte Signaltransduktion bei Thrombozyten.

Nach Thrombozytenaktivierung mit Agonisten wie ADP, TXA₂, Serotonin und Thrombin kommt es zu G-Protein vermittelten Signaltransduktionsprozessen, welche durch Gq, G₁₃ und Gi G-Proteine mediiert werden. Gq gekoppelte Rezeptoren, unter anderem PAR1, PAR4, TXA₂-Rezeptor, führen über Stimulation der PLC zu einer vermehrten Bildung von IP₃. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung des zytosolischen Kalziums, welches zu einer Aktivierung der PKC führt. Das Protein G₁₃ ist elementar am thrombozytären *Shape Change* über RhoA Aktivierung beteiligt, wohingegen das Gi Protein durch Inhibierung der AC mit resultierender cAMP Abnahme sowie Aktivierung der PI3K führt.

Abkürzungen in Abbildung 1: AA: Arachidonsäure, AC: Adenylatzyklase, ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriophosphat, Ca²⁺: Kalzium-Ion, cAMP: Zyklisches Adenosinmonophosphat, CO: Cyclooxygenase, GTP: Guanosintriophosphat, IP₃: Inositol-1,4,5- Trisphosphat, PGI₂: Prostazyklin, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, PIP₂: Phosphatidylinositolbiphosphat, PKC: Proteinkinase C, PLA: Phospholipase A, PLC: Phospholipase C, TXA₂: Thromboxan A2. (Modifiziert aus: [44])

Explosionsartige Thrombinvermehrung auf der Thrombozytenoberfläche

Bei strukturellen oder entzündlichen Gefäßveränderungen kommt Blut mit TF in Kontakt und kleine Mengen Thrombin werden über den Faktor VIIa–TF Komplex generiert. Diese geringen Mengen Thrombin auf der Oberfläche TF-präsentierender Zellen (Fibroblasten, aktivierte Monozyten und Endothelzellen) sind nicht in der Lage Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln, reichen jedoch aus, Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren zu aktivieren und die weitere Thrombingenerierung voranzutreiben [45]. Aktivierte Thrombozyten, vor allem thrombinvermittelt durch Interaktion mit *Protease-activated receptor* (PAR)-1 und PAR-4, sind in der Lage, Gerinnungsfaktoren durch spezifische, hochaffine Rezeptoren und Ca^{2+} -Ionen an der Thrombozytenoberfläche zu binden und vor Inaktivierung zu schützen [10]. Faktor XIa bindet über dessen Rezeptor GPIb an der Thrombozytenoberfläche, aktiviert Faktor IX und ermöglicht eine erhöhte Ansammlung des Xase- und Prothrombinase-Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche [46, 47]. Thrombin bewirkt zudem eine Abnahme der Affinität von Faktor VIII zum vWF, sodass ein Anbinden von Faktor VIII an die Thrombozytenmembran und Faktor IXa möglich ist.

Auf diese Weise ist es möglich, dass explosionsartig durch optimale Arbeitsweise des Xase- und Prothrombinase–Enzymkomplexes auf der Thrombozytenoberfläche über Faktor Xa Thrombinmoleküle vermehrt werden. Diese effiziente Thrombinbildung führt dazu, dass Fibrinogen gespalten werden kann und ein stabiles Fibrinnetz gebildet wird [44].

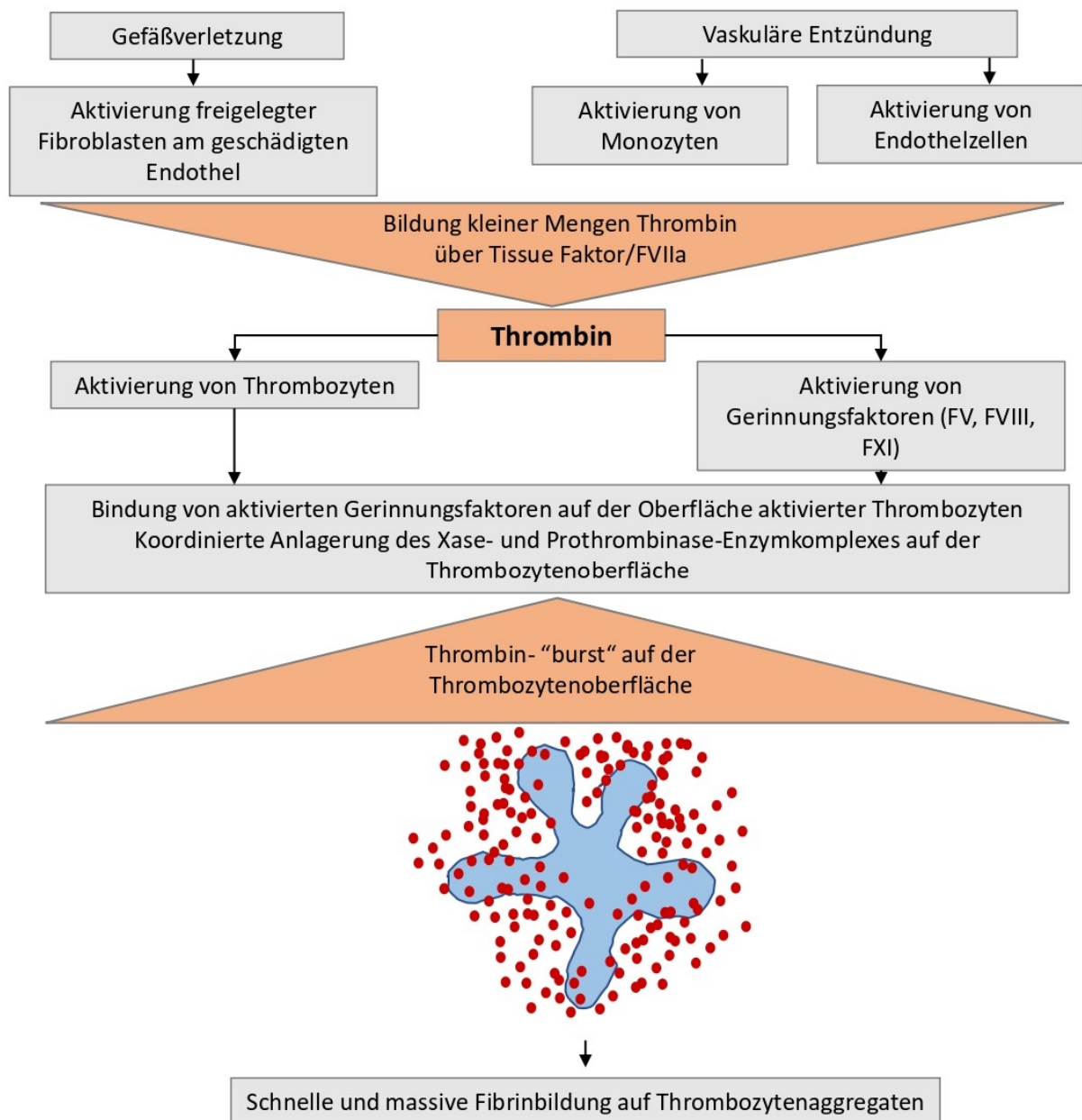


Abbildung 2: Zellabhängige Thrombingenerierung.

Auf der Oberfläche TF-tragender Zellen werden bei Gefäßverletzung oder vaskulärer Entzündung geringe Mengen Thrombin gebildet. Diese kleinen Mengen Thrombin reichen zwar nicht zur Bildung eines Thrombus aus, jedoch aktivieren diese Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren. Auf der Thrombozytenoberfläche aktivierter Thrombozyten wird dadurch vermehrt Thrombin gebildet und über Feedback-Mechanismen explosionsartig generiert. Dies führt zu einer Verfestigung der Thrombozytenaggregate, da Thrombin die Spaltung von Fibrinogen in lösliches Fibrin katalysiert. (Modifiziert aus: [10])

2.2.2 Rolle der Thrombozyten bei Arteriosklerose und thromboembolischen Krankheiten

Neben der zentralen Rolle der Thrombozyten in der Hämostase sind diese zudem maßgeblich an der Entstehung und Progression der Arteriosklerose sowie an akuten atherothrombotischen Ereignissen beteiligt. Grundlage für die Pathogenese der Arteriosklerose ist die chronische Gefäßentzündung sowie Dysfunktion des Endothels an bestimmten vulnerablen Orten der Arterien [48]. Diese Permeabilitätserhöhung am entzündlich veränderten Gefäßendothel bewirkt, dass Thrombozyten über das von Endothelzellen exprimierte P-Selektin via GPIb/V/IX oder *P-selectin glycoprotein ligand* am Endothel reversibel anhaften. Für eine feste Adhäsion der Thrombozyten am Endothel bedarf es weiterer Bindung über Integrine, welche die wichtigsten Oberflächenrezeptoren für eine stabile Adhäsion darstellen [4, 49]. Aktivierte am Endothel adhärierende Thrombozyten sezernieren proinflammatorische Mediatoren, wie beispielsweise Plättchenfaktor (PF)4, *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted chemokine* (RANTES) und IL 1 β , und rekrutieren dabei vorwiegend Monozyten und neutrophile Granulozyten aus der Blutzirkulation ins entzündete Endothel [4]. Dabei trägt PF4 direkt zur Genese der Arteriosklerose bei, indem es den LDL Stoffwechsel inhibiert und die Aufnahme von oxidiertem LDL durch Monozyten deutlich steigert [17]. Zudem bewirkt die Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren aus Thrombozyten wiederum eine Generierung und Sekretion von Zytokinen in verschiedenen Zellen der Gefäßwand, die über Rückkopplungskreise Thrombozyten zur Sekretion verstärkt anregen. Ein weiterer wichtiger Mediator und *Chemoattractant* für Monozyten und Neutrophile ist *Cluster of Differentiation* (CD) 40, welcher in großen Mengen in Thrombozyten gespeichert wird, und nach Freisetzung am Endothel eine gesteigerte endotheliale Aktivierung auslöst [49]. Vor allem unter hohem Scherstress ist es Leukozyten dadurch möglich, zusammen mit Thrombozyten und Thrombozytenmikropartikel, welche hauptsächlich von aktivierten Thrombozyten abgeschnürt werden, in vulnerable Gefäße und Plaques zu migrieren. Dies bewirkt, dass Monozyten zu Makrophagen differenzieren und die Schaumzellbildung und damit den Atherogeneseprozess vorantreiben. Zudem führt die Sezernierung von Proteasen durch Thrombozyten zu einer Plaqueinstabilisierung, welche in einer Plaqueruptur und thrombotischem Gefäßverschluss resultieren kann [9].

Inwiefern TF zur Pathogenese der Arteriosklerose beiträgt, ist derzeit unklar. Studien zeigten zwar einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten TF Expression und der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. In *Knock-out* Mäusen mit verminderten TF Level wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Menge und Zellzusammensetzung atherosklerotischer Läsionen gefunden [50].

Dieses oben angeführte neuere Verständnis der Thrombozyten im Zentrum der primären und sekundären Blutgerinnung unterstreicht, dass Thrombozyten nicht nur als Quelle negativ geladener Phospholipide und als Vermittler der primären Hämostase fungieren. Vielmehr sind Thrombozyten in besonderer Weise in der Lage, Gerinnungsprozesse zu steuern, zu verstärken und zu kontrollieren. Zudem zeigt sich, dass Thrombozyten nicht nur den finalen Thrombus bei Rupturen arteriosklerotischer Plaques bilden, sondern bereits entscheidend in der Frühphase der Pathogenese der Arteriosklerose beteiligt sind und Brückenglied zwischen Leukozyten und Endothelzellen bilden.

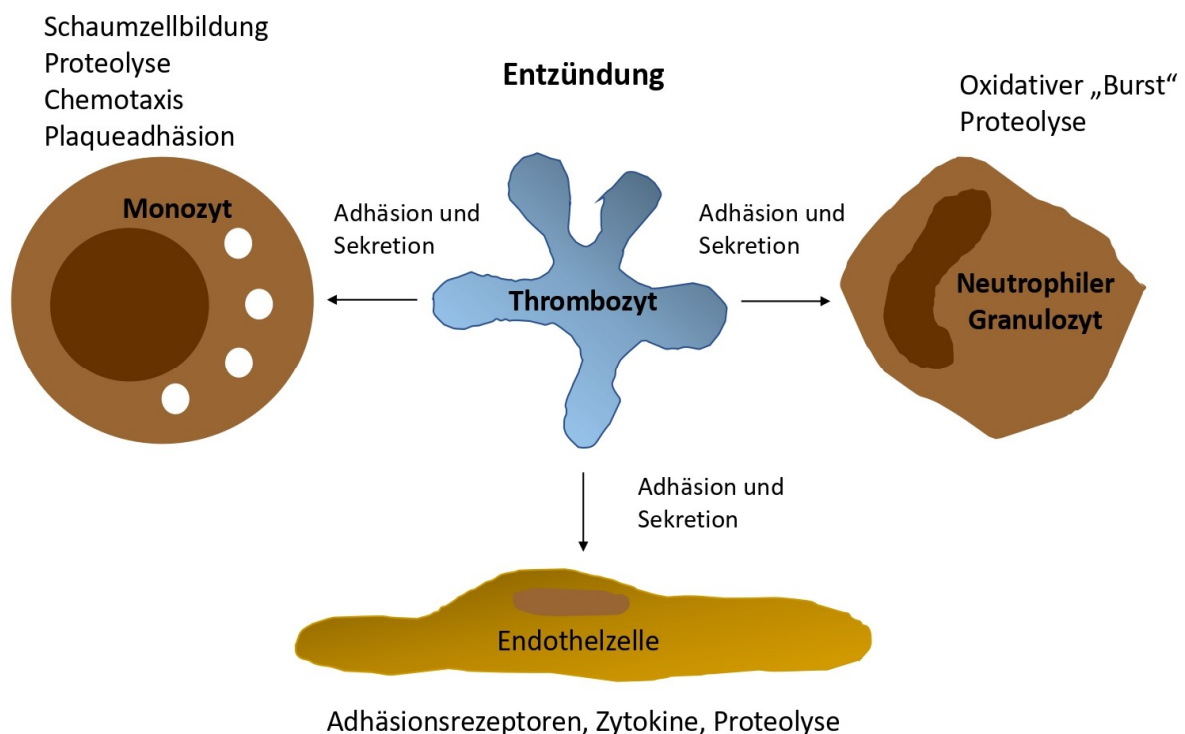


Abbildung 3: Thrombozyten in der Frühphase der Atherogenese.

Thrombozyten sind bereits in der Frühphase der Arteriosklerose beteiligt, indem sie an aktivierte vaskuläre Endothelzellen binden und durch Sekretion chemotaktischer Substanzen Monozyten und neutrophile Granulozyten anlocken und deren Aktivierung verstärken. (Modifiziert aus: [9])

2.2.3 Antithrombozytäre Substanzen

Da der Prozess der Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation über mehrere Schritte abläuft und diverse pharmakologisch relevante Rezeptoren und aktivierende Faktoren von Thrombozyten beeinflusst werden können, werden nachfolgend primär die klinisch am häufigsten eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmer und deren Signalwege, nämlich Cyclooxygenase (COX)-1-Hemmer, P2Y₁₂ Antagonisten und GPIIb/IIIa Antagonisten, erläutert und deren Signalwege dargestellt. Abbildung 4 fasst die Wirkmechanismen antithrombozytärer Substanzen zusammen.

COX-1 Hemmer

Ein aktivierender Signalweg der Thrombozyten erfolgt über die Synthese und Freisetzung von TXA₂, welches Ca²⁺-abhängig aus Arachidonsäure über die Phospholipase A₂ metabolisiert wird. Das freigesetzte TXA₂ wiederum bindet am Thrombozyten über den Gq gekoppelten Thromboxanrezeptor und bewirkt dadurch eine verstärkte Thrombozytenaktivierung durch Konformationsänderung und vermehrter Granulasekretion [44, 51].

Der etablierte Thrombozytenaggregationshemmer ASS inhibiert irreversibel die COX-1 und hemmt dadurch die TXA₂ Synthese in Thrombozyten [52, 53]. Dies geschieht über Acetylierung eines Serinrestes in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms, was dazu führt, dass Arachidonsäure das aktive Zentrum nicht mehr erreichen kann und weniger TXA₂ gebildet wird [54]. Dies resultiert in einer abgeschwächten Thrombozytenaktivierung und -aggregation beziehungsweise einer beeinträchtigten primären Hämostase. In niedriger Dosierung inhibiert ASS dabei selektiv die COX-1, wohingegen in höherer Dosierung ASS die COX-1 und COX-2 hemmt und zu analgetischen und anti-inflammatorischen Effekten führt [55]. Aufgrund der nur eingeschränkten Möglichkeit der Proteinbiosynthese der Thrombozyten, bedingt durch fehlenden Zellkern, ist eine effektive Thrombozytenaggregationshemmung bei täglich einmaliger Einnahme von 75-100 mg ASS, unabhängig der kurzen Halbwertszeit von 15-20 Minuten, möglich [54, 55].

P2Y₁₂ Antagonisten

Ein weiterer wichtiger Verstärkeragonist der Thrombozytenaktivierung ist ADP, welches bei Aktivierung aus den dichten Granula der Thrombozyten ausgeschüttet wird [43]. Das freigesetzte ADP interagiert mit zwei verschiedenen Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Zum einen führt diese Bindung am Gq gekoppelten P2Y₁ Rezeptor zu einer Ca²⁺-Mobilisierung im Thrombozyten und zu einer Konformationsänderung, welche in einer reversiblen Thrombozytenaggregation resultiert. Zum anderen bedingt diese ADP Bindung am P2Y₁₂ Rezeptor eine manifeste Aktivierung durch Wegfall der Hemmreaktion [56]. Der P2Y₁₂ Rezeptor ist dabei Gi Protein gekoppelt und führt bei ADP Bindung zu einer Abnahme von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und dadurch zu einer verstärkten Aktivierung [57, 58].

Thienopyridine, wie beispielsweise Clopidogrel oder Prasugrel, führen zu einer irreversiblen Hemmung des P2Y₁₂ Rezeptors durch Ausbildung spezifischer Disulfidbindungen mit Cysteinresten des Rezeptors. Da es sich bei Clopidogrel und Prasugrel um *Prodrugs* handelt, müssen diese erst in aktive Metabolite umgewandelt werden [54]. Diese Metabolisierung erfolgt bei Prasugrel effektiver als bei Clopidogrel, da Prasugrel weniger auf Cytochrom P450 Enzyme angewiesen ist und die Umwandlung vermehrt über Esterasen geschieht. Folglich ist nach Einnahme einer Aufsättigungsdosis schneller eine suffiziente Thrombozytenhemmung unter Prasugrel gegenüber Clopidogrel zu beobachten [58]. Ein neuerer oral applizierbarer P2Y₁₂ Antagonist ist Ticagrelor. Dabei handelt es sich um einen direkten und reversiblen P2Y₁₂ Antagonisten, welcher in der aktiven Form aufgenommen wird und keiner aktivierenden Metabolisierung bedarf. Der einzige intravenös verabreichbare P2Y₁₂ Antagonist ist Cangrelor, der reversibel und direkt am P2Y₁₂ Rezeptor bindet und die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung kompetitiv hemmt [54].

GPIIb/IIIa Antagonisten

Die Vernetzung von Thrombozyten untereinander und somit der finale Schritt der Thrombozytenaggregation erfolgt nach Aktivierung und Konformationsänderung im GPIIb/IIIa Rezeptor [10]. Aktivierte GPIIb/IIIa Rezeptoren sind in der Lage, lösliches Fibrinogen, beziehungsweise bei hohem Scherstress vWF, zu binden und Thrombozyten miteinander zu vernetzen [53].

Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban, die derzeit ausschließlich intravenös eingesetzten GPIIb/IIIa Antagonisten, verhindern eine Interaktion zwischen GPIIb/IIIa Rezeptoren und Fibrinogen [43]. Abciximab, das Fab Fragment eines chimären GPIIb/IIIa Antikörpers, hat eine große Affinität zum GPIIb/IIIa Rezeptor und bindet diesen irreversibel [54]. Dadurch sind aktivierte GPIIb/IIIa Rezeptoren nicht in der Lage, lösliches Fibrinogen zu binden und Thrombozyten zu vernetzen. Sowohl Tirofiban, ein nicht peptidisches Tyrosin Derivat, als auch Eptifibatid, ein zyklisches Heptapeptid, sind GPIIb/IIIa Antagonisten, welche ebenfalls eine hohe Spezifität für den GPIIb/IIIa Rezeptor aufweisen, diesen jedoch reversibel binden [43].

Die oben angeführten klassischen antithrombozytären Substanzen stellen derzeit die klinisch am meisten verwendeten und erforschten Substanzen dar. Aktuell wird an weiteren Thrombozytenaggregationshemmern geforscht, welche zu einer suffizienteren Prävention und Therapie Thrombozyten bedingter Thrombosen führen, ohne das Blutungsrisiko zu erhöhen. Neuere Forschungsansätze, die teilweise schon in klinischen Studien erforscht werden, sind unter anderem PAR-1 Antagonisten, GPVI Antagonisten, Serotonin Rezeptor Antagonisten und Thromboxan Rezeptor Antagonisten und werden in den nächsten Jahren deren klinische Verwendung zeigen.

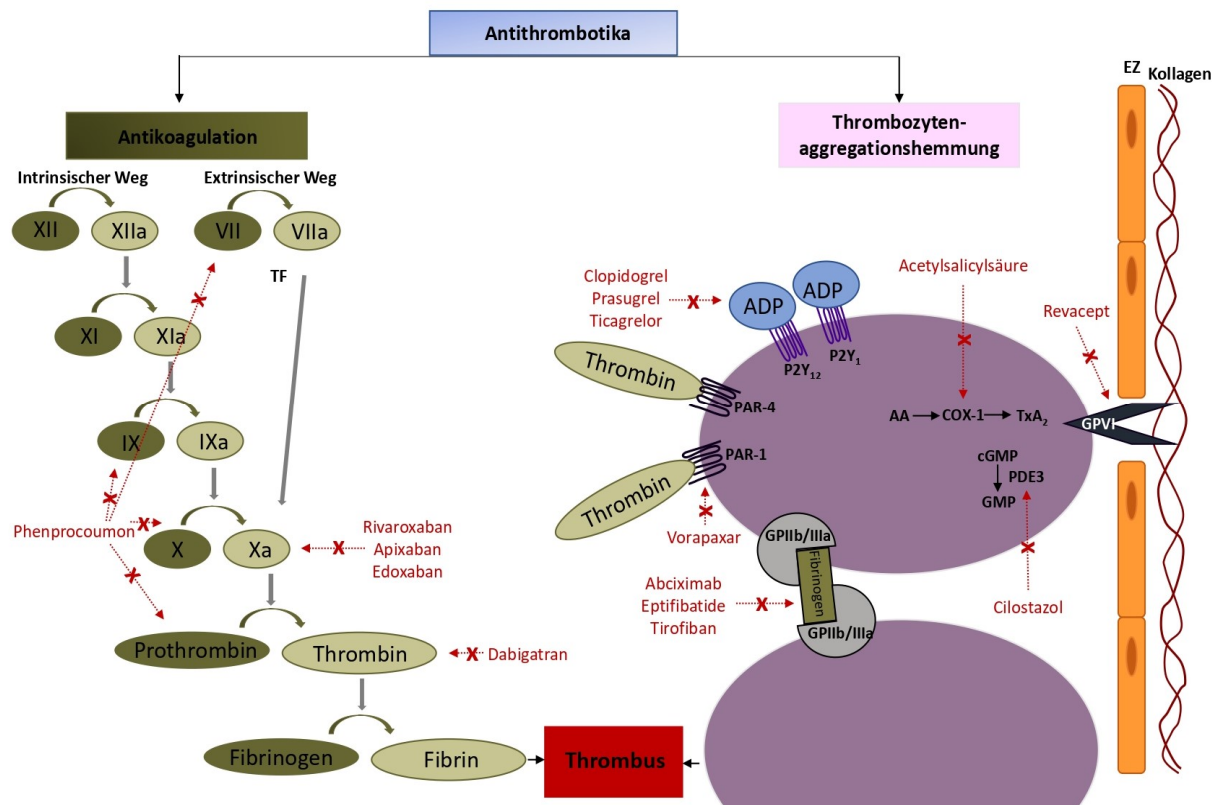


Abbildung 4: Wirkmechanismus antithrombotischer Substanzen.

Die Thrombusentstehung ist ein mehrstufiger Prozess, welcher durch das Zusammenwirken der zellulären und plasmatischen Hämostase abläuft. Im linken Bildabschnitt ist aus Gründen der besseren Verständlichkeit das Kaskadenmodell der sekundären – plasmatischen Hämostase dargestellt. Phenprocoumon bewirkt eine Reduktion der Synthese Vitamin K abhängiger Gerinnungsfaktoren. Demgegenüber greifen neuere Antikoagulanzen selektiv über Hemmung von Faktor Xa (Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban) oder über Thrombin Antagonismus (Dabigatran) in die Gerinnung ein. Der rechte Bildabschnitt zeigt Thrombozyten mit möglichen pharmakologischen Angriffspunkten. Revacept verhindert die Thrombozytenadhäsion an verletztes Endothel. Acetylsalicylsäure, P2Y₁₂ Antagonisten wie Clopidogrel oder Prasugrel, sowie der PAR-1 Antagonist Vorapaxar führen zu einer verminderten Thrombozytenaktivierung. Die Vernetzung der Thrombozyten miteinander wird durch Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban (GPIIb/IIIa Antagonisten) gehemmt.

Abkürzungen in Abbildung 4: AA: Arachidonsäure, ADP: Adenosindiphosphat, cGMP: Zyklisches Guanosinmonophosphat, COX-1: Cyclooxygenase-1, EZ: Endothelzelle, GMP: Guanosinmonophosphat, GP: Glykoprotein, PAR: *Protease-activated Receptor*, PDE3: Phosphodiesterase-3, TXA₂: Thromboxan A₂. (Modifiziert aus: [54])

2.2.4 Effekte von Rivaroxaban auf die Thrombozytenfunktion

Rivaroxaban ist ein kleines Molekül, welches Faktor Xa in löslicher Form und im Prothrombinasekomplex auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten kompetitiv bindet und dadurch inaktiviert [52]. Nach oraler Einnahme wird Rivaroxaban schnell als aktive Form resorbiert und die maximale Konzentration im Plasma wird in etwa 2,5 bis 4 Stunden erreicht. Abgebaut wird Rivaroxaban zu einem Drittel unverändert durch Urinausscheidung und zwei Drittel werden in der Leber über CYP3A4 in die inaktive Form metabolisiert. Um die maximale Absorption zu erreichen, sollte Rivaroxaban mit dem Essen eingenommen werden [54].

Der genaue Einfluss von Rivaroxaban auf die Thrombozytenfunktion ist derzeit ungewiss. Es zeigte sich jedoch, dass es unter einer Therapie mit Rivaroxaban dosisabhängig zu einer verminderten Thrombingenerierung sowie zu einer veränderten Kinetik der Thrombingenerierung kommt [52, 59-61]. Thrombin ist neben maßgeblicher Beteiligung an der plasmatischen Gerinnung zudem ein potenter Thrombozytenaktivator über PAR-1 und PAR-4 [20]. Durch Thrombinreduktion bedingt durch Faktor Xa Hemmung kommt es dadurch indirekt zu einer Thrombozytenaggregationshemmung [52]. Analog zum ADP Rezeptor sind PAR-1 und PAR-4 G Protein gekoppelt und interagieren dabei über gemeinsame intrazelluläre Kaskaden mit dem ADP Rezeptor [60]. Studien zeigen, dass der Effekt von Faktor Xa Hemmern wie Rivaroxaban oder Apixaban auf die Thrombin induzierte Thrombozytenaggregation abhängig von der Therapiedauer ist und eine langfristige Therapie über 7 Tage möglicherweise zu einer veränderten Expression von PAR-1 und PAR-4 führt [62].

Thrombin und Faktor Xa haben zudem Einfluss auf pathophysiologische Prozesse wie Inflammation, Plaquebildung und Angiogenese. Rivaroxaban reduziert in diesem Kontext möglicherweise pro-inflammatorische Zytokine und verhindert Plaquebildung und Plaquestabilisierung. Diese pleiotropen Effekte werden möglicherweise mit unterschiedlichem Einfluss von direkten oralen Antikoagulantien wie Dabigatran, ein Thrombin Inhibitor, oder Rivaroxaban verändert und sind diesbezüglich hinsichtlich Atherothromboseprävention untereinander nicht vergleichbar [20].

Die Kombination von Rivaroxaban mit einfacher oder dualer Thrombozytenhemmung führt *in vitro* und *in vivo* zu einer synergistisch gesteigerten antithrombozytären Wirkung und zeigt zudem in klinischen Studien signifikante Vorteile für PAVK Patienten mit vertretbarem Sicherheitsprofil [18, 52].

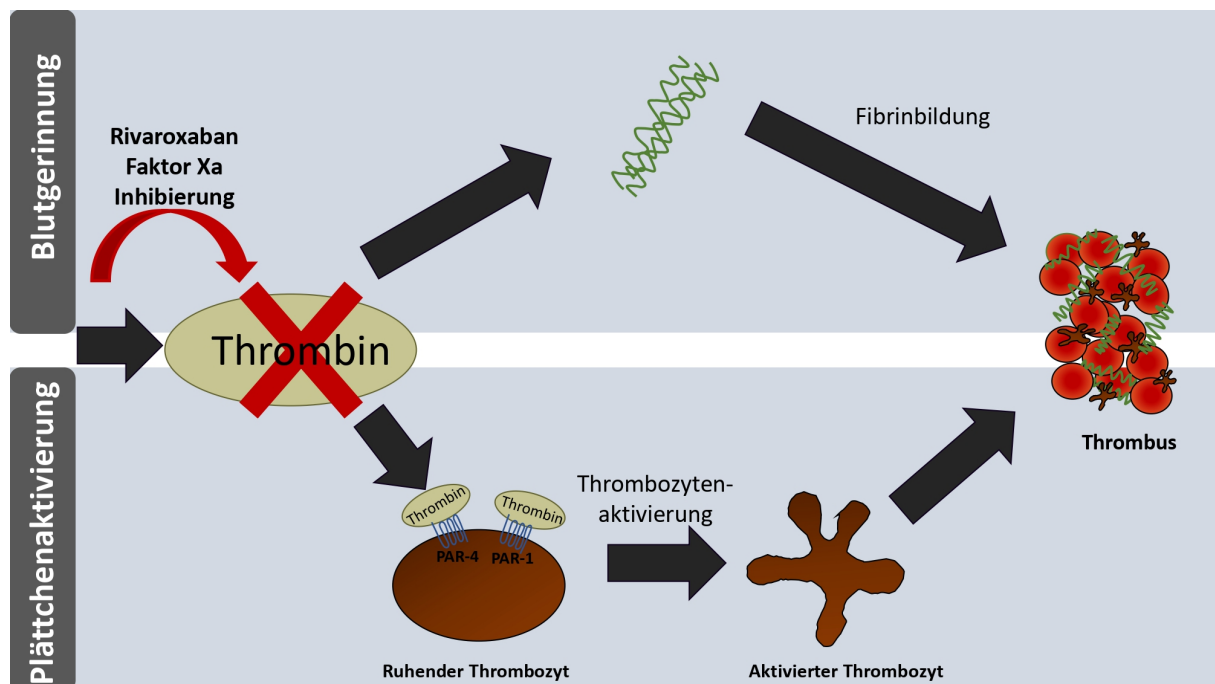


Abbildung 5: Einfluss von Rivaroxaban auf Thrombozyten und Gerinnungssystem.

Thrombin ist das zentrale Enzym der Hämostase und katalysiert die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, welches Thrombozytenaggregate zu einem stabilen Thrombus formt. Zudem ist Thrombin einer der potentesten Thrombozytenaktivatoren via PAR-1 und PAR-4 mit daraus resultierender Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenaggregation. Rivaroxaban inaktiviert Faktor Xa und führt dadurch zu einer verminderten Thrombinbildung und Thrombin-vermittelten Thrombozyten-Aktivierung.

Abkürzungen in Abbildung 5: PAR: *Protease-activated Receptor*. (Modifiziert aus: [20])

2.3 PAVK und antithrombotische Therapie

2.3.1 Indikation bei PAVK zur antithrombotischen Therapie

Die Indikation und Wahl der antithrombotischen Therapie unterscheidet sich nach Manifestationsform der Atherosklerose sowie Intention der antithrombotischen Therapie. Das Blutungsrisiko ist gegenüber dem thrombotischen Risiko vor Therapiebeginn abzuwägen [34, 59].

Bei symptomatischer PAVK der unteren Extremität ist eine Monotherapie mit einem Thrombozytenaggregationshemmer indiziert und Clopidogrel ist dabei ASS zu bevorzugen [8, 63]. Eine Kombinationstherapie aus ASS in Kombination mit zweimal täglich 2,5 mg Rivaroxaban sollte bei symptomatischen PAVK Patienten ohne erhöhten Blutungsrisiken erwogen werden [64]. Bei asymptomatischer PAVK der unteren Extremität wird keine Thrombozytenaggregationshemmung empfohlen, da

es in Studien zu keiner Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse kam [65, 66]. Ungeachtet des Stenttyps sollte als Konsensus bei schwacher Evidenz nach einer perkutanen Intervention eine duale Thrombozytenaggregationshemmung für mindestens 1 Monat erfolgen, die im Anschluss eine langfristige singuläre Thrombozytenaggregationshemmung vorsieht. Eine singuläre Thrombozytenaggregationshemmung wird zudem mit höchstem Empfehlungs- und Evidenzgrad nach einer infrainguinalen Bypassoperation empfohlen. Ferner spricht sich die aktuelle Leitlinie der ESC bei kniegelenksüberschreitendem Bypass für eine duale Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel aus, wohingegen nach infrainguinalem autologen Venenbypass die Gabe eines Vitamin K-Antagonisten erwogen werden sollte [8].

Bei Patienten mit Indikation für eine orale Antikoagulationstherapie und gleichzeitiger PAVK wird eine Fortführung der Antikoagulation unter Verzicht auf Thrombozytenaggregationshemmung als Sekundärprävention und nach operativen Gefäßeingriffen empfohlen [8, 67]. Nach perkutanen Interventionen erfolgt risikostratifiziert bei niedrigem Blutungsrisiko eine Fortführung der oralen Antikoagulation und eine zusätzliche Gabe von ASS oder Clopidogrel für mindestens einen Monat. Im Gegensatz dazu wird bei hohem Blutungsrisiko die alleinige orale Antikoagulation nach perkutaner Intervention empfohlen [34].

2.3.2 Thrombozytenaggregationshemmer bei PAVK – Aktuelle Studienlage

CAPRIE-Studie (ASS vs. Clopidogrel)

Bei der im Jahre 1996 publizierten CAPRIE Studie handelt es sich um eine randomisierte klinische Studie, die einen möglichen Nutzen von Clopidogrel verglichen mit ASS im Hinblick auf Risikoreduktion von ischämischen Schlaganfall, Myokardinfarkt und vaskulärem Tod untersucht. Diesbezüglich wurden 19.185 Patienten mit manifester Atherosklerose, das heißt mit früherem ischämischen Schlaganfall (≥ 1 Woche und ≤ 6 Monate), Myokardinfarkt (≤ 35 Tage) oder symptomatischer peripherer arterieller Verschlusskrankheit über 3 Jahre rekrutiert. Nach randomisierter Zuteilung erhielten die Probanden entweder täglich 75 mg Clopidogrel mit einem ASS Placebo oder 325 mg ASS mit einem Clopidogrel Placebo ohne Kenntnis, welche Medikation enthalten war. Mit einem durchschnittlichen Verlauf von 1,91 Jahren resultierten dadurch errechnete 36.731 Jahre, die die Patienten dem Risiko ausgesetzt waren. In der Schlaganfall Untergruppe lag die durchschnittliche Ereignisrate jährlich unter Clopidogrel bei 7,15% verglichen mit 7,71% bei ASS mit einer relativen Risikoreduktion von 7,3% zu Gunsten von Clopidogrel ($p=0,26$). Bei Patienten mit Myokardinfarkt hingegen zeigte sich ein Anstieg des relativen Risikos von 3,7% unter Clopidogreltherapie ($p=0,66$). Die Ereignisrate bei PAVK Patienten hingegen lag jährlich bei 3,71% unter Clopidogrel und 4,86% unter ASS Einnahme und führte zu einer relativen Risikoreduktion von 23,8 % unter Clopidogrel ($p=0,0028$).

Mit Blick auf beobachtete Nebenwirkungen zeigte sich eine höhere Rate an Hautausschlägen ($p=0,017$) und Diarrhoe ($p=0,080$) unter Clopidogrel, während häufiger gastrointestinale Beschwerden ($p=0,096$), gastrointestinale Blutungen ($p=0,05$) sowie intrazerebrale Blutungen ($p=0,23$) unter ASS zu verzeichnen waren. Zusammenfassend zeigte die gesamte Studienkohorte eine relative Risikoreduktion von 8,7% ($p=0,043$) in der *Intention to treat* Analyse [68].

Ogleich Schlaganfall, Myokardinfarkt und PAVK nur unterschiedliche Manifestationsformen der Atherosklerose sind, zeigten sich in dieser Studie deutliche Vorteile von Clopidogrel gegenüber ASS bei PAVK Patienten. Die Heterogenität wurde signifikant in Bezug auf die unterschiedlichen Subgruppen getestet und unterstreicht dabei den Stellenwert von Clopidogrel bei PAVK Patienten. Folglich ist

Clopidogrel als einziger Thrombozytenaggregationshemmer formal zur Sekundärprävention der PAVK zugelassen und diesbezüglich wurde in der Leitlinie der ESC von 2017 eine Empfehlung gegenüber ASS ausgesprochen [18, 57].

EUCLID-Studie (Clopidogrel vs. Ticagrelor)

Aufbauend auf den Ergebnissen der CAPRIE Studie überprüfte die EUCLID Studie mögliche Vorteile von Ticagrelor gegenüber Clopidogrel bei Patienten mit stabiler Claudicatio intermittens. In diesem Zusammenhang wurden von Dezember 2012 bis März 2014 13.885 PAVK Patienten in 811 Zentren in 28 Ländern eingeschlossen, davon 6.010 Patienten mit einem ABI $<0,80$ sowie 7.875 Patienten mit Revaskularisation der unteren Extremität, die mindestens 30 Tage vor Studieneinschluss stattfand. Nach gleichmäßiger Randomisierung wurde den Patienten doppelverblindet entweder zweimal täglich 90 mg Ticagrelor oder einmal täglich 75 mg Clopidogrel verabreicht und im Mittel 30 Monate beobachtet. Als primärer Endpunkt der Studie wurde die Kombination Schlaganfall, kardiovaskulärer Tod oder Myokardinfarkt vorab definiert. Hospitalisierung aufgrund akuter Beinischämie, Notwendigkeit peripherer oder koronarer Revaskularisation galten diesbezüglich als sekundäre Endpunkte [69].

Mit Blick auf den primären Endpunkt der EUCLID Studie konnte kein Unterschied zwischen einer Behandlung mit Ticagrelor und Clopidogrel festgestellt werden. Unter Ticagrelor wurde eine verminderte Rate ischämischer Schlaganfälle festgestellt (1,9% vs. 2,4%, HR 0,78, $p=0,03$). Auch hinsichtlich des sekundären Endpunkts zeigte sich keine stärkere Wirkung von Ticagrelor als der bisherige Therapiestandard Clopidogrel, wobei die Rate an Studienabbrüchen aufgrund von Dyspnoe (4,8% vs. 0,8%, $p<0,001$) oder Blutungen (2,6% vs. 1,4%, $p<0,001$) unter Ticagrelor erhöht war. Eine gesonderte Auswertung der 7.875 Patienten mit zuvor durchgeführter peripherer Revaskularisation ergab, dass diese Patientengruppe signifikant häufiger den kombinierten Endpunkt (11,4% vs. 9,9%; $p=0,02$) sowie häufiger Myokardinfarkte, akute Beinischämien und schwerwiegende Blutungen aufwies. Dies unterstreicht das hohe Risikopotenzial fortgeschrittener PAVK. Im Hochrisikokollektiv zeigte sich jedoch kein Vorteil einer Ticagrelor Therapie gegenüber Clopidogrel bezüglich des primären Endpunkts der Studie [69].

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass eine Monotherapie mit Ticagrelor bei Patienten mit PAVK einer Clopidogrel Monotherapie nicht überlegen ist. Erwähnt werden sollte im Zusammenhang der EUCLID Studie jedoch, dass Patienten mit homozygoter Mutation im Cytochrom P450 Allel, sogenannte *poor metabolizer* für Clopidogrel, ausgeschlossen wurden [70]. Das Enzym Cytochrom P450 ist maßgeblich an der Umwandlung des Clopidogrel *Prodrugs* in die aktiven Metabolite beteiligt und damit für eine suffiziente Wirkung entscheidend [54, 58].

COMPASS-Studie (ASS vs. ASS + Rivaroxaban vs. Rivaroxaban)

Ziel der COMPASS Studie war es herauszufinden, ob eine niedrigdosierte zweimalige Rivaroxaban Gabe in Kombination mit oder ohne ASS einer Monotherapie mit ASS bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und/oder PAVK überlegen ist. Dafür wurden von März 2013 bis Mai 2016 27.395 Patienten mit stabiler atherosklerotischer Gefäßerkrankung, darunter 7.470 Patienten mit peripherer Manifestation der Atherosklerose (symptomatische PAVK, Karotisstenose bzw. KHK und niedrigem ABI) in die Studie eingeschlossen. Nach randomisierter Zuteilung erhielten Patienten oral verabreicht entweder zweimal täglich 2,5 mg Rivaroxaban plus 100 mg ASS einmal pro Tag, zweimal täglich 5 mg Rivaroxaban mit einem ASS Placebo einmal pro Tag oder 100 mg ASS einmal täglich mit zweimaligem Rivaroxaban Placebo pro Tag. Als primärer kombinierter Endpunkt der COMPASS Studie wurde kardiovaskulärer Tod, Schlaganfall oder Myokardinfarkt (*major adverse cardiovascular event* = MACE) definiert. In der Subgruppe mit peripherer Manifestation der Atherosklerose wurde die ischämiebedingte Major-Amputation oder eine akute schwere Ischämie, die zu einer Intervention führt, als Endpunkt festgelegt (*major adverse limb event* = MALE) [14, 21].

Die Studie wurde vorzeitig mit einer mittleren Behandlungsdauer von 23 Monaten abgebrochen, da sich eine signifikante Überlegenheit der Kombinationstherapie von 2,5 mg Rivaroxaban plus ASS gegenüber einer 100 mg ASS Monotherapie zeigte. MACE ereigneten sich bei 126 (5%) von 2.492 Patienten mit PAVK mit einer Rivaroxaban plus ASS Therapie, wohingegen es unter einer ASS Monotherapie bei 172 (7%) von 2504 Patienten zu MACE kam. Niedrigdosiertes Rivaroxaban in Kombination mit ASS war einer ASS Monotherapie signifikant überlegen (HR 0,72, 95% CI 0,57 – 0,90, p=0,0047). Vergleicht man MACE unter Rivaroxaban

Monotherapie mit ASS Monotherapie, konnte jedoch keine signifikante Überlegenheit einer Rivaroxaban Monotherapie festgestellt werden (149 (6%) von 2.474 vs. 174 (7%) von 2.504: HR 0,68, 95% CI 0,69 – 1,08, p=0,25).

Mit Blick auf MALE in der PAVK Subgruppe zeigte sich zudem eine 46% Reduktion von MALE bei Kombination von Rivaroxaban mit ASS gegenüber einer ASS Monotherapie (HR 0,54, 95% CI 0,35 – 0,82, p=0,0037) und eine 33% Reduktion von MALE unter Rivaroxaban Monotherapie verglichen mit ASS Monotherapie (HR 0,67, 95% CI 0,45 – 1,00, p=0,047) [14].

Vermehrte schwere Blutungen traten bei Patienten unter Kombinationstherapie von Rivaroxaban mit ASS im Vergleich zu Patienten unter Monotherapie mit ASS (HR 1,61, 95 % CI 1,12-2,31, p=0,0043) sowie unter Rivaroxaban Monotherapie Gruppe verglichen mit ASS Monotherapie auf (HR 1,68, 95% CI 1,12-2,31, p=0,0089). Bei den Blutungskomplikationen handelte es sich dabei mehrheitlich um gastrointestinale Blutungen. Tödliche Blutungen, intrakranielle Blutungen oder symptomatische Blutungen in kritische Organe traten jedoch nicht signifikant häufiger auf [14].

In der aktuellen Leitlinie der ESC von 2017 ist die COMPASS Studie noch nicht berücksichtigt, wohingegen in der PAVK Leitlinie der *European Society of Vascular Medicine* von 2019 der Einsatz von niedrigdosiertem Rivaroxaban zusätzlich zur ASS Therapie erwogen werden sollte [34, 64]. Die Ergebnisse der COMPASS Studie zeigen die nicht mehr zu vernachlässigenden Vorteile einer zusätzlichen Gerinnungshemmung mit niedrigdosiertem Rivaroxaban über die bloße Thrombozytenaggregationshemmung hinaus. Rivaroxaban 2,5 mg wurde im August 2018 bei KHK und symptomatischen PAVK Patienten zur Prophylaxe atherothrombotischer Ereignisse zugelassen. Vor allem Patienten mit hohem thromboembolischem Risiko bei gleichzeitig niedrigem Blutungsrisiko profitieren von diesem Therapieregime [14, 18].

2.3.3 Duale Thrombozytenaggregationshemmung nach peripherer transluminaler Angioplastie

Die Datenlage zur dualen Thrombozytenaggregationshemmung nach peripherer transluminaler Angioplastie ist sehr dünn und oft nur eine Extrapolation von KHK Studien [20]. Aktuelle Leitlinien empfehlen in diesem Zusammenhang nach Stenting eine duale Thrombozytenaggregationshemmung für mindestens 1 Monat bei schwacher Evidenz mit anschließend einfacher Thrombozytenaggregationshemmung [34].

MIRROR-Studie (ASS vs. ASS + Clopidogrel)

Die MIRROR Studie ist eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, Placebo kontrollierte Studie, die an 80 PAVK Patienten mit geplanter endovaskulärer Intervention durchgeführt wurde. 40 Patienten erhielten vor perkutaner transluminaler Angioplastie (PTA) mit oder ohne Stentimplantation der femoro-poplitealen Gefäßgegend einmalig 500 mg ASS und 300 mg Clopidogrel 6-12 Stunden vor Intervention mit anschließend täglicher Dosis 100 mg ASS in Kombination mit 75 mg Clopidogrel für 6 Monate. Der zweiten Gruppe, auch 40 Patienten umfassend, wurde in analoger Weise die ASS Therapie verabreicht, jedoch wurde anstelle von Clopidogrel ein Placebo prä- und postinterventionell gegeben. Als primärer Endpunkt wurde die Konzentration von β -Thromboglobulin und löslichem CD40L direkt vor der Intervention gemessen sowie die Clopidogrel Resistenz bestimmt. Sekundärer Endpunkt waren dabei klinische Befunde, welche präinterventionell und 6 Monate nach PTA erhoben wurden. Dazu zählte unter anderem die Eingruppierung der PAVK in Stadien nach Rutherford, ABI Bestimmung sowie Erhebung von kardiovaskulären Ereignissen und Revaskularisationsmaßnahmen am therapierten Gefäßabschnitt [71].

Bei Patienten mit zusätzlicher Clopidogrel Aufsättigungsdosis vor Intervention zeigte sich eine signifikante Reduktion von β -Thromboglobulin (Median=224,5 IE/ml vs. 365,5 IE/ml, $p=0,035$) sowie löslichem CD40L (Median=127 pg/ml vs. 206,5 pg/ml, $p=0,046$) gegenüber der Placebogruppe. In der Clopidogrelgruppe zeigten 30% nach Gabe der Aufsättigungsdosis mit Clopidogrel eine Clopidogrelresistenz. Mit Blick auf

den sekundären Endpunkt zeigten Patienten mit Clopidogreltherapie 6 Monate nach PTA signifikant weniger Revaskularisationsmaßnahmen des intervenierten Gefäßes gegenüber der Placebogruppe, wobei bei beiden betroffenen Patienten zum Zeitpunkt der Intervention eine Clopidogrelresistenz nachgewiesen wurde (2 vs. 8, $p=0,040$). Die duale Thrombozytenaggregationshemmung konnte jedoch keine signifikante Verbesserung des ABI sowie der Rutherford Klassifikation nach 6 Monaten nachweisen. Mit Blick auf Blutungskomplikationen konnte zudem kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen herausgefunden werden [71].

Nach 6 Monaten wurde Clopidogrel in der einen Gruppe sowie das Placebo in der anderen abgesetzt und beide Therapiearme erhielten weiterhin 100 mg ASS als Monotherapie. Eine weitere Studie untersuchte im Anschluss, ob diese verminderte Revaskularisationsrate unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung auch nach Clopidogrelende in dieser Studiengruppe weiterhin bestehen bleibt. Diesbezüglich wurden 36 Clopidogrel Patienten und 37 Placebo Patienten 12 Monaten nach PTA erneut evaluiert. Es zeigte sich, dass nach 12 Monaten, das heißt 6 Monate ohne duale Thrombozytenaggregationshemmung mit Clopidogrel und ASS, kein signifikanter Unterschied in Bezug auf erneute Interventionen des betroffenen Gefäßes zwischen der Clopidogrel und Placebo Gruppe festzustellen war (9 (25%) Patienten mit Clopidogrel vs. 12 (32,4%) Patienten mit Placebo) [72].

Aus dieser Studie lässt sich ableiten, dass Patienten mit gleichzeitig hohem kardiovaskulärem Risiko und geringem Blutungsrisiko möglicherweise von einer längeren dualen Thrombozytenaggregationshemmung nach PTA profitieren würden. Bedacht werden sollte jedoch, dass diese Studie an einer sehr geringen Patientenzahl durchgeführt wurde und daher die Aussagekraft in weiteren Studien überprüft werden sollte.

VOYAGER-Studie (ASS vs. ASS + Rivaroxaban)

Aufbauend auf den Ergebnissen der COMPASS Studie, welche einen signifikanten Vorteil einer niedrigdosierten Rivaroxabantherapie in Kombination mit ASS mit Blick auf Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit stabiler PAVK zeigte, wurde die VOYAGER Studie entwickelt [14]. Die VOYAGER Studie evaluierte bei

Hochrisiko PAVK Patienten nach endovaskulärer oder chirurgischer Revaskularisationstherapie der unteren Extremitäten die Effektivität und Sicherheit einer Kombinationstherapie eines Thrombozytenaggregationshemmers (ASS) mit niedrig dosiertem Faktor Xa Inhibitor (Rivaroxaban) [20]. Zwischen August 2015 und Januar 2018 wurden 6.564 Patienten randomisiert entweder der Placebo oder der Rivaroxaban Gruppe zugeteilt und davon erhielten 6.504 Patienten mindestens eine Dosis der Studienmedikation. Die mediane *Follow up* Dauer betrug 28 Monate [73]. Im Rahmen dieser doppelverblindeten Phase III Studie erhielten die teilnehmenden Patienten entweder täglich 2,5 mg Rivaroxaban morgens und abends oder in analoger Weise ein Placebo zusätzlich zu einer täglichen 100 mg ASS Therapie in beiden Studienarmen. Die Randomisierung erfolgte dabei nach Art der Prozedur, eingeteilt in die Gruppe der chirurgischen Therapie, die Gruppe der endovaskulären Therapie mit Clopidogrel sowie die Gruppe der endovaskulären Therapie ohne Clopidogrel. Clopidogrel war dabei erst ein Ausschlusskriterium ab einer geplanten dualen Thrombozytenaggregationshemmung von über 6 Monaten und Patienten wurden dazu angehalten, keine weiteren Thrombozytenaggregationshemmer sowie Antikoagulantien einzunehmen. Primärer Endpunkt der Studie war eine Kombination aus kardiovaskulären Ereignissen (Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall und kardiovaskulärer Tod) und Extremitäten Ereignissen (akute Extremitätenischämie und Amputationen aufgrund vaskulärer Ursache). Ferner wurde die Rate an Blutungskomplikationen nach der TIMI und ISTH Klassifikation sowie hämodynamische Veränderungen der Extremitäten erhoben [74].

In der Rivaroxaban Gruppe trat bei 508 Personen der primäre Endpunkt ein verglichen mit 584 Ereignissen in der Placebo Gruppe. Extrapoliert man diese Zahlen mittels Kaplan-Meier-Schätzer für Inzidenzen des primären Endpunkts innerhalb 3 Jahren, so zeigt dies, dass unter Rivaroxabantherapie signifikant weniger Ereignisse auftreten als in der Placebo Gruppe (17,3% vs. 19,9%, HR 0,85, 95 % CI 0,76 bis 0,96; $p=0,009$). Betrachtet man jedoch die Anzahl der Major Blutungen nach TIMI und ISTH unter Rivaroxabantherapie verglichen mit der Placebo Gruppe, konnte nach beiden Definitionen eine erhöhte Anzahl festgestellt werden, wobei nach ISTH die Anzahl der Major Blutungen unter Rivaroxabantherapie signifikant war. Nach ISTH kam es bei der Rivaroxaban Gruppe zu 140 Major Blutungen verglichen mit 100 Patienten in der Placebo Gruppe (5,94% vs. 4,06%; HR 1,42; 95% CI 1,1 bis 1,84; $p=0,007$). In der Rivaroxabangruppe zeigten nach TIMI 62 Personen verglichen

mit 44 Personen in der Placebo Gruppe Major Blutungen (2,65% vs. 1,87%; HR 1,43; 95% CI 0,97 – 2,10; p=0,07) [73].

Analog zu den Ergebnissen der COMPASS Studie unterstreichen die Erkenntnisse der VOYAGER Studie die Bedeutung von niedrig dosiertem Rivaroxaban morgens und abends zusätzlich zu einer singulären Thrombozytenaggregationshemmung bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit als Langzeit Prävention sowie als Initialtherapie nach Revaskularisationstherapie [14, 73]. Unabhängig der Definition von Major Blutungen zeigte sich, dass eine Rivaroxabantherapie mit erhöhter Blutungsneigung einhergeht. Deshalb sollte individuell das Blutungsrisiko gegenüber Prävention kardiovaskulärer sowie extremitätenbedingter Ischämien einer Rivaroxabantherapie abgewogen und im Einzelfall entschieden werden.

3. Material und Methoden

Nachfolgend werden die Geräte und Materialien aufgelistet, welche im Rahmen der Studie verwendet wurden. Der Ablauf der Studie, das Patientenkollektiv sowie die laborchemische Methodik der Studie werden im Folgenden beschrieben und erläutert.

3.1 Geräte und Materialien

3.1.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 1: In dieser Studie verwendete Geräte und Hersteller.

Gerätebezeichnung	Typ	Hersteller
Automatisches Hämatologie Analysegerät	Sysmex KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH (Hamburg)
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Kolbenhub-Einkanalpipetten	Eppendorf Research Plus®, variabel 0,1-2,5 µl Research Plus®, variabel 0,5-5 µl Research Plus®, variabel 2-20 µl Research Plus®, variabel 10-100 µl Research Plus®, variabel 20-200 µl Research Plus®, variabel 100-1000 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Wesseling)
Magnetrührer	NeoMag D-6010	NeoLab® (Heidelberg)
pH/ORP-Meter	HI 2211	Hanna Instruments GmbH (Kehl am Rhein)
Präzisionswaage	CPA 1003P	Sartorius AG (Göttingen)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5418R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Wesseling)
Thrombinoskop	Fluoroskan Ascent®	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH (USA)
Vortexer	Lab Dancer S40	VWR International GmbH (Darmstadt)
Wasserbad (mit Einsätzen)	ED-AP (042) (5A max. 60° Celsius)	Julabo GmbH (Seelbach)
Zentrifuge	Allegra X-30R (Rotoren: F2402, SX 4400)	Breckmann Coulter GmbH (Krefeld)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: In dieser Studie verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

Bezeichnung	Typ	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäße	Safe Seal Gefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
50 ml Polypropylen Röhren mit konischem Boden	Cellstar Tubes® 50 ml, PS	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
5 ml Polystyrene Röhren		
Blutentnahmeröhren	S-Monovette® (10 ml) mit Citrat 3,2% (1:10) S-Monovette® (2,7 ml) mit K3 EDTA	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Kanüle mit Schlauch zur Blutentnahme	Safety-Multifly® 21G 200mm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Latexhandschuhe	Sempercure® Premium	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG (Neuwied)
Mikrotiterplatten (Calibrated Automated Thrombography)	PS-Microplate, 96-wells, U-förmiger Boden	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Ep T.I.P.S. 50-100 µl	Fisher Scientific GmbH (Nidderau)
Pipettenspitzen	TipOne 200 µl Yellow Tip	StarLab (Hamburg)
Pipettenspitzen	TipOne 10 µl XL graduated tip	StarLab (Hamburg)
Transferpipetten	Einmal-Pasteurpipetten mit integriertem Saugball 3,5 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Zytometer Röhren	12x75 mm, Polystyrol (PS)	Ratiolab GmbH (Dreieich)

3.1.3 Reagenzien

Tabelle 3: In dieser Studie verwendete Reagenzien und deren Hersteller.

Bezeichnung	Lösung	Bezugsquelle
α-Thrombin (bovin)	100 U/ml in 0,9% NaCl	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Adenosin 5'- diphosphat Natriumsalz (ADP)	5 mM ADP in 0,9 %NaCl	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Arachidonsäure	53 mM	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Convulxin	100 µg/ml	Enzo Life Sciences
Dade®Innovin®	15 nM	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (Marburg)
FLUCA Kit		Stago Deutschland GmbH IMMUNOTECH SAS
PBS (phosphate buffered solution, phosphatgepufferte Salzlösung)	10x PBS-Fertigprodukt 1:100 in ddH ₂ O; pH 7,4	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Plättchen-armes-Plasma-Reagenz (Platelet-poor-plasma-reagent, PPP-Reagenz)		Stago Deutschland GmbH (Düsseldorf)
PLT VASP/P2Y12 Kit	<i>vgl. Tabelle 9</i>	Biocytex (Frankreich)
TRAP-6	40 mM	Bachem (Schweiz)
Thrombin Kalibrator		Stago Deutschland GmbH (Düsseldorf)

Tyrodepuffer	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO ₃ , 0,42 mM NaH ₂ PO ₄ , 5,5 mM Glucose, 5 mM Hepes; pH 7,4
---------------------	---

3.1.4 Antikörper

Tabelle 4: In dieser Studie verwendete Antikörper und deren Bezugsquelle.

Zielantigen	Endkonzentration	Bezugsquelle
CD36 (Klon 185-1G2)-FITC	5 µg/ml	Santa Cruz (USA)
CD36 (Klon FA6.152)-FITC	5 µg/ml	Beckman Coulter (USA)
CD42b (Klon SZ2)-FITC	5 µg/ml	Beckman Coulter (USA)
CD41/CD61 (Klon P2)-FITC	5 µg/ml	Beckman Coulter (USA)
CD42a (Klon Beb-1)-FITC	5 µg/ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD29 (Klon K20)-FITC	5 µg/ml	Beckman Coulter (USA)
GPVI (Klon HY101)- eFluor660	5 µg/ml	eBiosciences (USA)
CD62P-FITC	5 µg/ml	BD Pharmingen (USA)
Aktiviertes GPIIb/IIIa (Pac- 1)-FITC	5 µg/ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
IgG1-FITC	5 µg/ml	BD Pharmingen (USA)
CD61 (Klon RUU-PL 7F12)- FITC	5 µg/ml	BD Pharmingen (USA)

3.1.5 Software

Tabelle 5: In dieser Studie verwendete Software-Programme.

Software	Hersteller
BD FACSDIVA Software © Becton, Version 6.1.3	BD Bioscience (USA)
EndNote™X7	Clarivate Analysis (USA)
GraphPad Prism 9.0.0	GraphPad Software (USA)
Microsoft 365 für Windows: Word, Excel, PowerPoint	Microsoft Corporation (USA)
SPSS Statistics 23 V5 R	IBM (Deutschland)
Sysmex-Software; Version 1kXNH 00-10	Sysmex Europe (Hamburg)
Thrombinoscope™ Software Version 3.0.0.29	Thrombinoscope BV (Maastricht, Niederlande)

3.2 Studienbeschreibung und Methodik

3.2.1 Studiendesign

Bei der TRPX17 Studie handelt es sich um eine monozentrische prospektive Pilotstudie, welche die *in vitro* Thrombinbildungskapazität sowie die Thrombozytenfunktion bei Patienten mit PAVK und KHK unter verschiedenen gerinnungshemmenden bzw. thrombozytenaggregationshemmenden Therapien untersucht.

3.2.2 Studienpopulation

Fallzahl und Genehmigung

Bei der Berechnung der Fallzahlgröße wurde als Parameter der im CAT gemessene Thrombin *Peak* im plättchenreichen Plasma mit TF als Trigger festgelegt. In der Studiengruppe PAVK unter ASS Therapie wurde ein Thrombin *Peak* Mittelwert von 90 nM mit einer Abnahme von mindestens 30% nach zusätzlicher Rivaroxabangabe, entspricht der Standardabweichung zwischen den Gruppen, angenommen. Die Power-Kalkulation erfolgte mittels T-Test (zweiseitig, unverbunden) und einem 5% Test-Signifikanzniveau. Um eine Power von 80% für einen Unterschied mit statistischer Signifikanz des *Peak* zwischen der ASS Monotherapie und ASS in Kombination mit Rivaroxaban innerhalb der Studiengruppe zu erlangen, wurde eine Fallzahl von 10 ermittelt.

Da es sich um eine Pilotstudie handelt, die möglicherweise Ergebnisse liefern soll für weiterführende Studien an größeren Patientengruppen, wurden insgesamt 10 Patienten in die Studiengruppe sowie zwei Kontrollgruppen mit jeweils 10 Patienten eingeschlossen. Insgesamt waren somit 30 Patienten für die Studienteilnahme vorgesehen. Vor Studienbeginn wurde ein Antrag bei der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz vorgelegt und durch diese genehmigt (18.03.2019, Antragsnummer: 2019-14055_1). Bei Studienplanung und Ablauf wurden die üblichen Maßgaben der *Good Clinical Practice* sowie die Deklaration von Helsinki berücksichtigt und gewahrt [75].

Patientenrekrutierung und Ein-/ Ausschlusskriterien

Aus dem Zentrum für Kardiologie/Kardiologie I der Universitätsmedizin Mainz wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, die aufgrund medizinischer Indikation einer Thrombozytenaggregationshemmung bedürfen. Die zusätzliche Belastung durch die Studienteilnahme stellte lediglich die Blutabnahme zur Thrombozytenfunktionstestung dar. Alle Patienten wurden vorab über mögliche Komplikationen einer venösen Blutabnahme durch einen approbierten Arzt umfassend informiert und erst nach deren schriftlicher Zustimmung in die Studie eingeschlossen.

Die Studiengruppe (n=10) umfasst Patienten mit bekannter PAVK im Stadium IIb mit Indikation für eine PTA. Zur Gewährleistung der Homogenität in der Gruppe wurden ausschließlich Patienten unter Monotherapie mit 100 mg ASS pro Tag eingeschlossen. Nach Intervention erhielten die Patienten eine duale Thrombozytenaggregationshemmung für 3 Monate. Im Anschluss an die duale Thrombozytenaggregationshemmung war bei diesen Patienten eine langfristige Therapie mit 100 mg ASS plus zweimal täglich 2,5 mg Rivaroxaban geplant. Im Rahmen der 3 Therapiephasen, nachfolgend als PAVK ASS, PAVK ASS + Clopidogrel und PAVK ASS + Rivaroxaban bezeichnet, wurde jeweils eine Blutabnahme durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass ausschließlich Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko und geringem Blutungsrisiko an der Studie teilnehmen. Zur Abschätzung des Blutungsrisikos gegenüber dem präventiven Effekt einer Antikoagulation mit Rivaroxaban wurde der HAS-BLED Score verwendet. Die Maximalpunktzahl beim HAS-BLED Score beträgt 9 Punkte. Jedoch ist bei drei oder mehr Punkten von einem erhöhten Blutungsrisiko durch die Antikoagulation auszugehen. Um ein erhöhtes Blutungsrisiko bei den teilnehmenden Patienten der Studiengruppe auszuschließen, wurden ausschließlich Patienten in die Studiengruppe eingeschlossen, welche maximal 1 Punkt im HAS-BLED Score erzielten [76]. Lediglich ein Studienpatient wurde mit einer höheren Punktzahl in die Studie eingeschlossen, da dieser Patient bereits in der Vergangenheit an der VOYAGER-Studie mit analoger Studienmedikation teilgenommen hat und dadurch ein möglicherweise erhöhtes Blutungsrisiko vertretbar war.

Score	Parameter	Punkt(e)
H	Hypertonie	1 Punkt
A	Eingeschränkte Nieren- und Leberfunktion	1 - 2 Punkt(e)
S	Schlaganfall	1 Punkt
B	Blutung	1 Punkt
L	Schwankende INR - Werte	1 Punkt
E	Alter > 65 Jahre	1 Punkt
D	Medikamenteneinnahme oder Alkoholkonsum	1 - 2 Punkt(e)

Abbildung 6: Punkteverteilung und Definitionen beim HAS-BLED Score.

Mithilfe des HAS-BLED Score kann das Blutungsrisiko unter Antikoagulationstherapie bei Vorhofflimmern abgeschätzt werden. Ab einem Wert von 3 Punkten oder mehr ist von einem hohen Blutungsrisiko auszugehen.

Abkürzungen in Abbildung 6: INR: *International Normalized Ratio*. (Modifiziert aus: [77])

Bei der Kontrollgruppe KHK ASS (n=10), nachfolgend als KHK ASS bezeichnet, wurden Patienten mit stabiler KHK eingeschlossen, die täglich 100 mg ASS einnahmen. Diagnostiziert wurde die KHK dabei durch eine perkutane transluminale koronare Angiographie. Ferner wurde darauf geachtet, dass diese Patienten keine Manifestation der Atherosklerose an weiteren Gefäßprovinzen, wie beispielsweise PAVK an den Extremitäten oder Carotisstenosen, aufweisen. Die Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel (n=10), nachfolgend als PAVK Clopidogrel bezeichnet, setzt sich aus Patienten mit stabiler PAVK zusammen, welche täglich als Sekundärprävention 75 mg Clopidogrel einnehmen. Bei beiden Kontrollgruppen war eine einmalige Blutabnahme vorgesehen.

In Studien konnte gezeigt werden, dass Statine neben lipidsenkender Wirkung auch antiinflammatorische sowie antithrombotische Effekte aufweisen und Einfluss auf die Thrombozytenfunktion nehmen [78, 79]. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen und innerhalb den unterschiedlichen Studien- bzw. Kontrollgruppen zu gewährleisten, wurden sowohl in der Studiengruppe als auch in beiden Kontrollgruppen ausschließlich Patienten mit Statintherapie eingeschlossen.

Als Ausschlusskriterien wurde PAVK im Stadium der kritischen Extremitätenischämie, Schwangerschaft, fehlende Einwilligung, Patienten unter 18 Jahren, rheumatische Erkrankungen, aktive Tumorerkrankungen, maligne Erkrankung mit Limitation der Lebenserwartung auf unter 12 Monate, erhöhtes Blutungsrisiko, Vorgeschichte für gastrointestinale Blutungen sowie Indikation für eine Antikoagulation festgelegt.

3.2.3 Studienablauf

Die *in vitro* Thrombingenerierung sowie die Thrombozytenfunktion *ex vivo* und *in vitro* wurde unter den 3 Therapieregimen der Studiengruppe an 10 Patienten mit PAVK getestet.

Die erste Blutabnahme fand dabei am Tag der PTA vor Beginn der Intervention unter 100 mg ASS statt. Nach Intervention erhielten die teilnehmenden Patienten eine duale Thrombozytenaggregationshemmung mit 300 mg Clopidogrel als Aufsättigungsdosis einmalig gefolgt von täglich 75 mg Clopidogrel für 3 Monate. Unter diesem Therapieregime war die zweite Blutabnahme etwa 1 Monat nach PTA geplant. Nach Beendigung der dualen Thrombozytenaggregationshemmung mit 100 mg ASS und 75 mg Clopidogrel erhielten die teilnehmenden Patienten für 14 Tage eine singuläre Thrombozytenaggregationshemmung mit 100 mg ASS, da ASS und Clopidogrel die Thrombozyten irreversibel hemmen und dadurch bei sofortiger Rivaroxabangabe eine erhöhte Blutungsgefahr bestehen könnte. Nach dieser Zeit wurde 2,5 mg Rivaroxaban morgens und abends zusätzlich zu 100 mg ASS verabreicht. Nach etwa 10 Tagen war unter diesem Therapieregime die 3. Blutabnahme geplant.

Zusätzlich zur Blutabnahme zu den beschriebenen Zeitpunkten wurden klinische Verlaufsuntersuchungen (angiologische Untersuchung, Blutungskomplikationen, Medikamentenunverträglichkeiten, Erfassung klinischer Beschwerden, kardiovaskuläre Ereignisse) durchgeführt sowie allgemeine Angaben zu den Patienten (Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, *Body Mass Index* = BMI), kardiovaskuläre Risikofaktoren (aktuell oder ehemaliges Rauchen, Rauchmenge und Rauchdauer, familiäre Disposition für kardiovaskuläre Erkrankungen) und der aktuelle Gesundheitsstatus inklusive Medikation dokumentiert und erfasst. Diese Daten stellen jedoch nicht den primären Fokus dieser Studie dar. Diesbezüglich wurden keine signifikanten Ergebnisse erwartet.

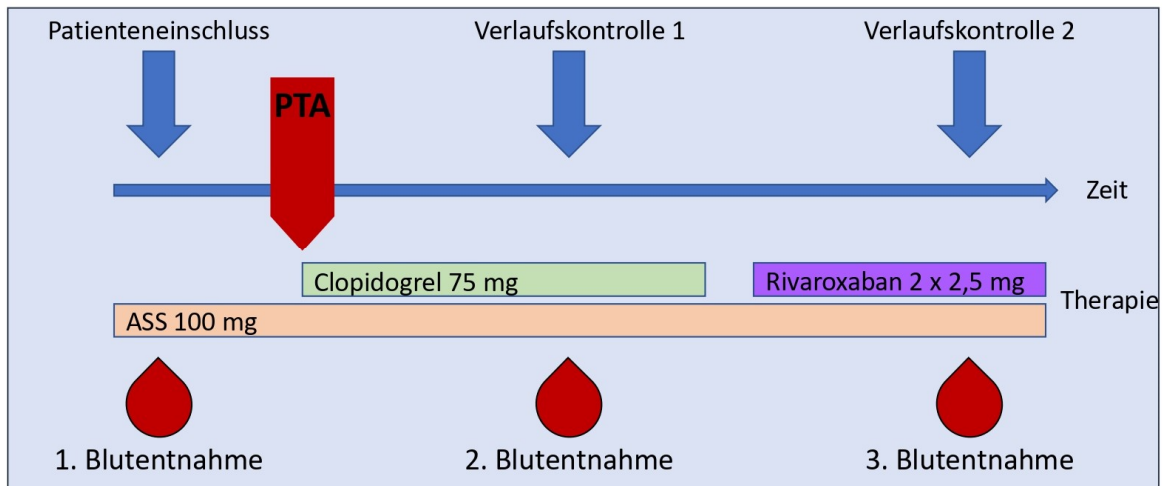


Abbildung 7: Übersicht über die Zeitpunkte der Blutanalysen in der Studiengruppe.

Die erste Blutentnahme wurde vor PTA unter ASS Monotherapie durchgeführt. Nach PTA erhielten die Studienpatienten zusätzlich zur ASS Therapie täglich 75 mg Clopidogrel für insgesamt 3 Monate. Unter diesem Therapieregime fand die zweite Blutentnahme statt. Abschließend wurde Blut unter ASS in Kombination mit Rivaroxaban in vaskulärer Dosierung entnommen und analysiert.

Abkürzungen in Abbildung 7: ASS: Acetylsalicylsäure, PTA: Perkutane transluminale Angioplastie.

3.2.4 Probengewinnung und Datenmanagement

Die Blutabnahme fand unmittelbar vor Durchführung der Laborversuche statt bzw. maximal mit einer Verzögerung zwischen Abnahme und Beginn der Versuche von 45 Minuten. Zur Blutentnahme wurde eine Vene der Ellenbeuge (*Vena mediana cubiti*, *Vena basilica*, *Vena cephalica antebrachii*) nach kurzer Stauung punktiert und die S-Monovetten mit mäßigem Sog via 21 Gauge Sicherheitskanüle nach Herstellervorgaben befüllt. Um eine Präaktivierung der Thrombozyten zu verhindern, erfolgte, nach vorsichtigem Schwenken der Blutröhrchen, der Transport der Proben erschütterungsfrei bei Raumtemperatur ins Labor. Bei jedem Probanden wurden pro Blutabnahme jeweils 20 ml Citratblut (je 10 ml Monovetten mit 0,107 mol/l Präparierungskonzentration Tri-Natriumcitrat-Lösung) und 2,7 ml EDTA Blut abgenommen und im Centrum für Thrombose und Hämostase an der Universitätsmedizin Mainz analysiert.

Alle erhobenen Daten wurden computergestützt erfasst und in pseudonymisierter Form gespeichert. Ferner wurden die Patienten gezielt über die Verwendung patientenbezogener Daten sowie über die Risiken einer Blutabnahme aufgeklärt. Mit ihrer schriftlichen Einwilligung zur Studienteilnahme stimmten sie der Verwendung

der anonymisierten Daten zu. Die ärztliche Schweigepflicht wurde gewahrt sowie die Vorschriften des Datenschutzes eingehalten. Sollten die Patienten einen Studienausschluss wünschen, konnten sie die Studie jederzeit und ohne Angabe von Gründen beenden.

3.2.5 Auswertung und statistische Analyse

Alle im Rahmen der Studie erhobenen Daten wurden zunächst in Form von *Microsoft Excel* Tabellen dokumentiert und anschließend mittels *IBM SPSS Statistics 23* analysiert und ausgewertet.

Als erster Schritt der statistischen Analyse wurden die Laborergebnisse sowie Patientencharakteristika auf Normalverteilung durch den *Kolmogorov-Smirnov* und *Shapiro-Wilk Test* getestet. Da die erhobenen Daten keine Normalverteilung aufzeigten, wurden ausschließlich nichtparametrische Tests angewandt. Bei zwei unverbundenen Stichproben wurde der *U-Test von Mann und Whitney* durchgeführt. Demgegenüber kam bei zwei verbundenen Stichproben der *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test* zur Anwendung. Als signifikant beziehungsweise statistisch auffällig wurden Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ definiert. Als p-Werte wurden dabei beim *Mann-Whitney-U-Test* die exakten Signifikanzen und beim *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test* die zweiseitig getesteten exakten Signifikanzen verwendet.

Zur graphischen Darstellung der Messergebnisse sowie der statistischen Zusammenhänge wurden Box-Whisker-Plots in *GraphPad Prism 9.0.0* erstellt. Die Whisker erstrecken sich dabei zwischen dem 5%- und dem 95%-Quartil, wohingegen innerhalb der Box 50% der Daten liegen und den Median anzeigt.

Die TRPX17 Studie wurde statistisch beraten und supervidiert durch Frau Dr. I. Schmidtman vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universitätsmedizin Mainz.

3.2.6 Gewinnung von plättchenreichem und plättchenfreiem Plasma

Zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma (*platelet-rich plasma* = PRP) wurde venöses Citratblut für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der entstandene gelblich-weiße Überstand (PRP) mittels Pipette in ein neues Polystyrene Röhrchen separiert und die Thrombozytenkonzentration des PRP im *Sysmex* gemessen.

Für die Gewinnung von plättchenarmem Plasma (*platelet-poor plasma* = PPP) wurden im Anschluss die Citrat Monovetten erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 2.000 x g zentrifugiert. Analog zur Herstellung von PRP wurde der zentrifugierte gelblich-klare Überstand (PPP) ebenfalls in neue Gefäße transferiert. Diese wurden wiederum für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 30.000 x g zentrifugiert, sodass plättchenfreies Plasma (*platelet-free plasma* = PFP) entsteht.

3.2.7 *Calibrated Automated Thrombography* (CAT)

3.2.7.1 Technisches Prinzip

Die CAT ist eine Labormethode zur kontinuierlichen Messung der Thrombingenerierung (TG) *in vitro* und ermöglicht dabei eine kinetische Erfassung der Thrombinbildung über die Zeit [80]. Verwendung findet diese Methode dabei im Management von Thrombosen, Hämophilie sowie allgemein zur Beurteilung physiologischer sowie pathologischer Funktionen des Gerinnungssystems [81, 82]. Grundlegend bei dieser Methode ist die Verwendung spezifischer Substrate, die durch Thrombin gespalten werden. Diese Spaltprodukte führen dadurch zu einem messbaren fluoreszierenden Signal bzw. chromogenen Umschlag und geben Rückschluss auf die Thrombinmenge.

Als Substrat wurde anfangs chromogenes Thrombin verwendet. Damit konnte jedoch nur der Beginn der Thrombingenerierung aufgezeichnet werden. Ferner war es nicht möglich PRP zu verwenden, da die Bildung von Fibrinnetzen und Präsenz von Zellen wie Thrombozyten zu einer gestörten Lichtabsorption führte. Daher werden aktuell fluorogene Substrate mit niedriger Affinität zu Thrombin als Goldstandard verwendet [81]. Langsam reagierende fluoreszierende Substrate erlauben eine kontinuierliche Messung der Thrombingenerierung im PRP sowie PPP und ermöglichen so den

Einfluss von Thrombozyten auf die Thrombingenerierung zu messen. Als fluoreszierendes Substrat wurde in dieser Studie Z-Gly-Gly-Arg-AMC verwendet, welches durch Spaltung durch Thrombin 7-amino-4-methylcoumarin freisetzt. Dies kann durch ein 390-nm Extinktions- und 460-nm Emissionsfilter Set aufgezeichnet werden und mit einer speziellen Software direkt in Thrombingenerierungskurven konvertiert werden, da die Umsetzung des Substrates proportional zur entstandenen Thrombinmenge ist [80].

Um innere Filtereffekte zu korrigieren, bedarf es einer adäquaten Kalibrierung mit einer bekannten Menge Thrombin gebunden an alpha2-Makroglobulin. Dies führt dazu, dass Thrombin nicht durch Plasma Protease-Inhibitoren inhibiert wird. Folglich bedarf jeder CAT Test zweier Fluoreszenz-Messungen der gleichen Plasmaprobe [80, 83].

In unserer Studie wurde im PRP die TF und Thrombin getriggerte Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung sowie die TF getriggerte Thrombingenerierung im PFP getestet [84].

3.2.7.2 Versuchsdurchführung

Initial vor Versuchsbeginn wurde PRP nach der in Kapitel 3.2.6 beschriebenen Methodik hergestellt. Im Anschluss wurde die Thrombozytenkonzentration im *Sysmex* gemessen und mittels PFP auf 150.000 / μl verdünnt. Für weitere Untersuchungen im Plasma wurde das übrige PFP bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Tabelle 6 zeigt die durchgeführten Versuchsreihen mit den unterschiedlichen Plasma-Reagenz Kombinationen und unterschiedlichen Endkonzentrationen der Reagenzien. Für die Durchführung des Versuchs wurden zu Beginn 80 μl des jeweiligen Plasmas (PFP oder PRP) in die definierten *Wells* einer 96-Well-Mikrotiterplatte luftfrei pipettiert und anschließend 20 μl Reagenz hinzugegeben. Im PFP wurde als Triggersubstanz PFP-Reagenz mit Phospholipiden eingesetzt mit einer Endkonzentration von 5 pM TF. Die Phospholipide ermöglichen dabei die Thrombingenerierung trotz fehlender Thrombozytenoberfläche im PFP. Im PRP wurden Versuchsreihen unter Verwendung von Innovin mit einer Endkonzentration bei Messung von 2,5 pM sowie Thrombin mit einer Endkonzentration im Assay von 0,1 U/ml durchgeführt. Als Referenz bei jeder Versuchsreihe diente ein Thrombin Kalibrator bestehend aus 80 μl PFP und 20 μl Kalibrator.

Tabelle 6: Versuchsreihen kalibrierte automatisierte Thrombographie.

Darstellung der drei Versuchsreihen mit verwendetem Plasma, Reagenz und Endkonzentration des Reagenz im Plasma bei der Messung.

Abkürzungen in Tabelle 6: PFP=plättchenfreies Plasma, PRP=plättchenreiches Plasma, TF=*tissue factor* (Gewebsfaktor).

Versuchsreihe	1	2	3
Plasma	PFP	PRP	PRP
Reagenz	PFP-Reagenz	Innovin	bovines α -Thrombin
Endkonzentration des Reagenz im Plasma bei der Messung	5 pM TF 4 μ M Phospholipide	2,5 pM TF	0,1 U/ml Thrombin

Im Anschluss wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte und das FluCa-Substrat, bestehend aus fluorogenem Z-Gly-Gly-Arg-AMC Substrat und Fluo-Puffer mit 17 mM CaCl₂, konstant bei 37 °C temperiert. Das im Fluo-Puffer enthaltene CaCl₂ ist dabei elementar für den Start der Thrombingenerierung.

Im Thrombinoscope-Gerät wurde dann automatisiert FluCa-Substrat zu den einzelnen Versuchsreihen distribuiert und die Thrombingenerierung alle 20 Sekunden über 60 Minuten aufgezeichnet [84].

3.2.7.3 Auswertung der Thrombingenerierung

Aus den erhobenen Daten wurde computergestützt eine Thrombingenerierungskurve erstellt, aus welcher bestimmte Parameter abgeleitet werden können.

Das Endogene Thrombin Potential (ETP) beschreibt die Fläche unter der Kurve und repräsentiert die während des Messvorgangs insgesamt gebildete Thrombinmenge. Angegeben wird diese in nM x min. Die *Lagtime*, gemessen in Minuten, ist definiert als Zeit vom Start der Reaktion bis zum Beginn der Thrombingenerierung [81]. Die maximal gemessene Thrombinkonzentration wird durch den *Peak* in nM angegeben und die dafür benötigte Zeit als *time to peak* gemessen in Minuten definiert [80].

Ein hypokoagulatorischer Status zeigt sich grundsätzlich in einer verlängerten *Lagtime* sowie erniedrigtem Thrombin *Peak* und ETP. Im Gegensatz dazu präsentiert sich ein hyperkoagulatorischer Zustand durch eine verkürzte *Lagtime* sowie hohen *Peak* und ETP [85].

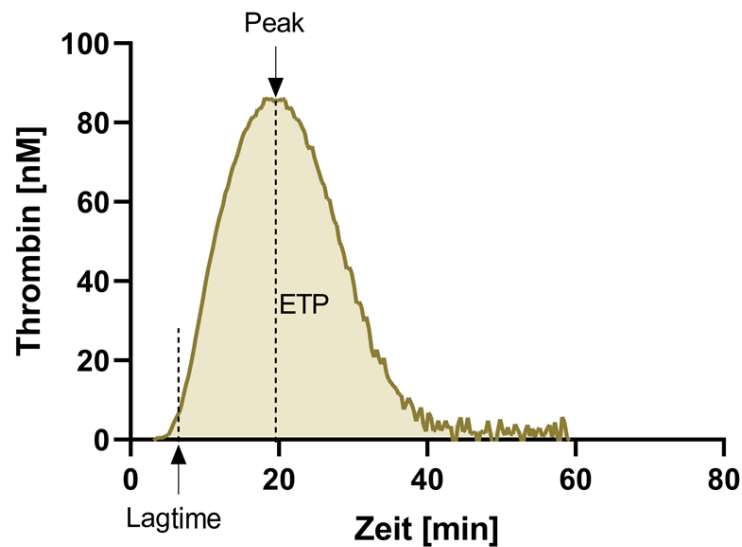


Abbildung 8: Thrombogramm.

Das Thrombogramm bildet die gebildete Menge Thrombin in nM in Abhängigkeit der Zeit in Minuten ab. Die *Lagtime* beschreibt dabei die Zeit vom Start der Reaktion bis zum Beginn der Thrombinbildung. Die insgesamt gemessene Thrombinkonzentration während der Messung wird als ETP bezeichnet und die maximale Thrombinkonzentration durch den *Peak* ausgedrückt.

Abkürzungen in Abbildung 8: ETP: Endogenes Thrombin Potential. (Modifiziert aus: [81])

3.2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie zählt zu den elementarsten laborchemischen Verfahren der Thrombozytenfunktionsanalyse in der experimentellen Forschung und klinischen Diagnostik [86]. Im Rahmen dieser Studie findet diese Methode Anwendung in der Quantifizierung der Thrombozyten Hauptrezeptoren und im Monitoring von ADP spezifischen P2Y₁₂ Antagonisten. Ferner wurden die durch Agonisten induzierte sowie basal *ex vivo* gemessene GPIIb/IIIa Aktivierung, P-Selektin Oberflächenexpression und Mepacrine Aufnahme und Freisetzung analysiert.

3.2.8.1 Technisches Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein laborchemisches Verfahren, welches eine physikalische sowie chemische Analyse von Partikeln, in dieser Studie von Thrombozyten, ermöglicht. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen von

einer Kapillare angesaugt, mittels hydrodynamischer Fokussierung zentriert und perlenschnurartig an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Die hydrodynamische Fokussierung in Kombination mit Verengung des Flüssigkeitsstroms in Richtung Messkammer bewirkt, dass die Zellen singulär die Detektoren passieren und dadurch gezielt Eigenschaften von Zellen auf Einzelzellebene dokumentiert werden können.

Die von Zellen gebeugten Lichtstrahlen werden über zwei Streulichtdetektoren, nämlich dem Vorwärtsstreulicht, *Forward scatter*, und Seitwärtsstreulicht, *Side scatter*, wahrgenommen. Das Vorwärtsstreulicht liegt in der Ebene des Laserstrahls und gibt Auskunft über die Zellgröße. Demgegenüber hängt das Signal des Seitwärtsstreulichtes von der Granularität beziehungsweise inneren Komplexität der Zelle ab und misst das im 90 Grad Winkel gestreute Licht vom Vorwärtsstreulicht. Das detektierte Licht kann in ein elektronisches Signal konvertiert und computergestützt ausgewertet werden [87].

Ein Synonym der Durchflusszytometrie ist die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (*fluorescence activated cell sorting* = FACS). Dabei werden die zu untersuchenden Zellen zunächst durch spezifisch fluoreszierende Antikörper markiert. Diese Antikörper können gegen spezifische Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine gerichtet sein. Anschließend werden diese analog zur Durchflusszytometrie an einem Laserstrahl bestimmter Wellenlänge einzeln und geordnet vorbeigeleitet. Durch den monochromatischen Laserstrahl werden die Elektronen des Fluorochroms der markierten Zelle kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau angehoben. Unter Emission von Photonen spezifischer, größerer Wellenlänge fallen die Elektronen innerhalb weniger Nanosekunden wieder auf das ursprüngliche Energieniveau zurück. Diese emittierte Photonenkonzentration wird durch Detektoren wahrgenommen und verhält sich proportional zur gebundenen Menge an fluoreszierenden Antikörpern [87]. Da sich die Emissionsspektren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden ist es möglich, dass gleichzeitig mehrere Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden.

3.2.8.2 Quantifizierung der Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche

Vor Messung der Thrombozytenfunktion und Monitoring von P2Y₁₂ Antagonisten und FXa Inhibitoren wurden die Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche von allen teilnehmenden Probanden der Studie quantifiziert, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Durchflusszytometrie zu gewährleisten.

Dafür wurde in 9 Polystyrene-Röhrchen je 50 µl venöses Vollblut mit Natriumzitat (0,106 mol/l) Zusatz distribuiert und anschließend in jedes Röhrchen 50 µl PBS (pH 7,4) hinzugegeben. Nach Zugabe von jeweils 5 µl (finale Konzentration 5 µg/ml) der in Tabelle 7 aufgelisteten Antikörper (1 Antikörper pro Röhrchen) wurden diese nach vorsichtigem Schwenken in der Hand auf einem Schüttler für 20 Minuten bei 90 rpm inkubiert.

Tabelle 7: Verwendete Antikörper zur Quantifizierung der Hauptrezeptoren.

Darstellung der Antikörper mit Klon und Konjugation, welche zur Quantifizierung der Hauptrezeptoren im Durchflusszytometer verwendet wurden.

Abkürzungen in Tabelle 7: CD: *Cluster of differentiation*, GP: Glykoprotein, FITC: Fluoresceinisothiocyanat.

Antikörper gegen	Klon	Konjugation
CD41	P2	FITC
CD42b	SZ2	FITC
CD42a	Beb-1	FITC
CD29	K20	FITC
CD41	SZ22	FITC
CD61	RUU-PL 7F12	FITC
GPVI	HY101	eFluor660
CD36	FA6.152	FITC
CD36	185-1G2	FITC

Nach Inkubation der Antikörper wurde zu jedem Röhrchen 2 ml PBS (pH 7,4) hinzugefügt und daraus 500 µl in neue Polystyrene Röhrchen transferiert. Im letzten Schritt wurde nochmals 2 ml PBS zu jeder Probe hinzugegeben, bevor die Proben im Durchflusszytometer ausgewertet und die Antigenbindungsstellen berechnet wurden.

3.2.8.3 Thrombozytenfunktionsmessung

Thrombozyten Agonisten und Thrombozytenaktivierung

Ziel der Thrombozytenfunktionsmessung ist es, die Aktivierung *ex vivo/in vivo* sowie die Reaktivität der Thrombozyten *in vitro* bei Patienten mit PAVK und KHK unter verschiedener antithrombotischer Therapie zu untersuchen. Im PRP werden dazu die Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten aktiviert und im Anschluss die Reaktion mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie aufgezeichnet.

Als erster Schritt wurden die im nachfolgenden beschriebenen Agonisten (vgl. Tabelle 8) in aufsteigender Konzentration in die Polystyrene-Röhrchen pipettiert und anschließend durch Zugabe von jeweils 100 µl verdünntem PRP (Verdünnung 1:7 mit PBS pH 7,4) aktiviert. Es wurde darauf geachtet, dass bei Thrombinanwendung gleichzeitig das Tetrapeptid Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) zugegeben wurde, um eine Fibrinpolymerisation zu vermeiden [88]. Das Mepacrine wurde vor der Thrombozyten-Stimulation mit einer Endkonzentration von 5 µM für 10 min bei Raumtemperatur mit dem verdünnten PRP vorinkubiert.

Folgende Agonisten wurden zur Thrombozytenaktivierung verwendet:

- Thrombin Receptor Activator Peptide-6 (TRAP-6) ist ein PAR-1 Agonist, welcher den Thrombinrezeptor unabhängig von der Rezepterspaltung aktiviert [89].
- Thrombin ist einer der potentesten Thrombozytenaktivatoren über PAR-1, PAR-4 und dem Korezeptor GPIIb α . Zudem bewirkt Thrombin die Konversion von Fibrinogen in Fibrin, welches zu einem stabilen Thrombus führt [89, 90].
- Convulxin ist ein spezifischer Agonist des Kollagenrezeptors GPVI [89].
- Arachidonsäure wird von der COX-1 über Phospholipase A2 in TXA₂ umgewandelt. TXA₂ bindet über den Gq gekoppelten Thromboxanrezeptor und bewirkt eine Aktivierung der Thrombozyten [52, 53].
- ADP führt zur Thrombozytenaktivierung über die G Protein gekoppelten Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ [89].

Thrombozytenfixierung und Thrombozytenwaschen

Die Reaktion wurde nach 6-minütiger Aktivierungszeit durch die Zugabe von je 100 µl 1% Formaldehyd (FA) Lösung (Endkonzentration 0,5% FA) gestoppt und mittels Inkubation über 30 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Proben mit einem Milliliter PBS gewaschen und die Zellen bei 800 x g bei Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Pasteurpipette abpipettiert.

Da PAC-1 Antikörper nicht an bereits fixierte Thrombozyten binden, wurden nach einer Aktivierungszeit von 6 Minuten die für PAC-1 Markierung vorgesehenen Polystyrene Röhrchen mit PAC-1 Antikörper benetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten erfolgte im Anschluss die Fixierung mit FA bei Raumtemperatur.

Antikörper-Markierung und Messung am Durchflusszytometer

Nach abgeschlossener Thrombozytenfixierung wurden die Proben mit Aktivierungsmarker benetzt. Verwendet wurden dafür fluorchrom-markierte Antikörper, da diese spezifisch Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten binden und durchflusszytometrisch ausgewertet werden können. Die in dieser Studie verwendeten thrombozytären Aktivierungsmarker mit den dazugehörigen Targets werden in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Thrombozytäre Aktivierungsmarker mit den dazugehörigen Targets.

Darstellung der Antikörper-Marker sowie die zur Thrombozytenaktivierung verwendeten Agonisten.

Abkürzungen in Tabelle 8: ADP: Adenosindiphosphat, CD: *Cluster of differentiation*, GP: Glykoprotein, TRAP-6: *Thrombin Receptor Activator Peptide-6*, TZ: Thrombozyten

Antikörper-Marker	Antigen/Target/Epitop	Anmerkung	Aktivierung über TZ-Agonisten
CD62P	P-Selektin	Marker für α -Granula Freisetzung; P-Selektin wird nach TZ Aktivierung auf die Thrombozytenoberfläche transloziert	TRAP-6, Thrombin, Convulxin, Arachidonsäure, ADP
PAC-1	Aktiviertes GPIIb/IIIa	Fibrinogenbindungsstelle wird nur nach Konformationsänderung des GPIIb/IIIa gebunden	TRAP-6, Thrombin, Convulxin, Arachidonsäure, ADP
Mepacrine		Freisetzungsmarker für dichte Granula; Aufnahme in dichte Granula; diese werden bei Agonisten Aktivierung ausgeschüttet; Vorverdünnung des Mepacrines mit 1:100 PBS (Stammlösung 10 mM), dann Einsatz 1:20 mit 5 μ M Endkonzentration	Thrombin, Convulxin

Die Antikörperinkubation der Proben erfolgte über 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 120 rpm. Als letzter Schritt wurden zu jeder Probe 500 μ l PBS hinzugefügt und vor Messung im Durchflusszytometer durch kurzes Vortexen in Suspension gebracht.

Im Durchflusszytometer wurden abschließend die einzelnen Proben mit einer Eventzahl von 10.000 Zellen pro Probenröhrchen erfasst und mittels *BD FACSDIVA Software* analysiert.

3.2.8.4 Monitoring von ADP-spezifischen P2Y₁₂ Antagonisten mittels *Vasodilator Stimulated Phosphoprotein (VASP)*

In dieser Studie wurde zum Monitoring von ADP spezifischen Antagonisten die PLT VASP/P2Y₁₂ Kits von *BioCytex* verwendet. Die Versuche fanden im venösen Vollblut mit Natriumzitrat 0,106 mol/l als Antikoagulanz statt.

Allgemeines Versuchsprinzip

Thrombozyten werden unter anderem durch ADP aktiviert (vgl. Kapitel 2.2.1 und 2.2.3). ADP interagiert dabei am Thrombozyten über den Ionenkanalrezeptor P2X₁ und über die G Protein gekoppelten Rezeptoren P2Y₁ sowie P2Y₁₂. Der Gi Protein gekoppelte P2Y₁₂ Rezeptor wird durch ADP aktiviert und vermittelt dadurch eine Hemmung der Adenylatzyklase, welche eine Abnahme des zyklischen Adenosinmonophosphats bedingt und aktivitätssteigernd wirkt. Im Gegensatz dazu aktiviert Prostaglandin E1 (PGE1) diesen Signalweg und bewirkt dabei einen Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphats über den Prostaglandinrezeptor an der Oberfläche der Thrombozyten [58]. Zyklisches Adenosinmonophosphat sowie zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) entfalten ihre antiaggregatorischen Wirkungen über die Proteinkinasen A und G, welche cAMP beziehungsweise cGMP abhängig ihre Substrate phosphorylieren bzw. aktivieren.

VASP ist ein intrazelluläres Thrombozytenprotein und Substrat der Proteinkinasen A und G, welche mit unterschiedlicher Affinität dieses Protein phosphorylieren. Mittels spezifischer fluoreszierender Antikörper kann die VASP Phosphorylierungsstelle Serin239 markiert und untersucht werden [91]. Die VASP Phosphorylierung wird dabei durch Gabe von PGE1 ausgelöst, wohingegen bei intaktem P2Y₁₂ Rezeptor und gleichzeitiger ADP Zugabe dieses Signal unterbunden wird. Ist jedoch der P2Y₁₂ Rezeptor irreversibel durch Thienopyridineinnahme, wie beispielsweise Clopidogrel, gehemmt, bleibt trotz ADP Gabe die VASP Phosphorylierung durch PGE1 aktiv und das Fluoreszenzsignal erhalten. Phosphoryliertes VASP korreliert dabei mit der Hemmung des P2Y₁₂ Rezeptors. Durch Testung beider Zustände, nämlich einerseits die Inkubation der Blutprobe mit PGE1 alleine und andererseits in Kombination mit ADP, kann der Thrombozyten-Reaktivitätsindex (*platelet reactivity index* = PRI)

berechnet und die Wirkung von Thienopyridinen nachgewiesen werden [92]. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige ASS Einnahme zu keiner signifikanten Interferenz führt [93]. Ein niedriger PRI weist auf eine suffiziente P2Y₁₂ Rezeptor Blockade beispielsweise durch Clopidogrel hin, wohingegen ein hoher PRI eine Clopidogrel Resistenz oder insuffiziente P2Y₁₂ Blockade aufzeigt.

In der von uns durchgeführten Studie wurde anlehnend an internationale Studien ein Clopidogrel *Non-Responder* bei einem PRI >50% definiert [94].

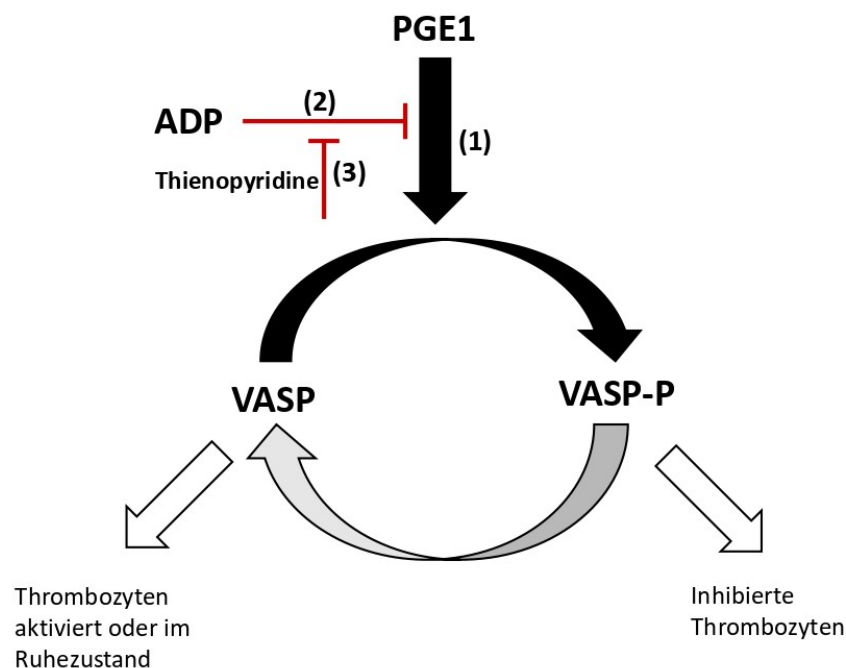


Abbildung 9: Regulation der VASP Phosphorylierung in Thrombozyten.

PGE1 wirkt am Thrombozyten über den Prostaglandinrezeptor und führt zu einer vermehrten Phosphorylierung des im Thrombozyten befindlichen VASP (1). Demgegenüber hemmt ADP, welches unter anderem auf die P2Y₁₂ Rezeptoren der Thrombozyten wirkt, diesen Weg (2). Thienopyridine hemmen irreversibel diesen P2Y₁₂ Rezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten und verhindern dadurch die Wirkung von ADP auf den Thrombozyten (3). Mithilfe spezifischer Antikörper kann phosphoryliertes VASP markiert und dadurch die inhibitorische Kapazität des ADP bestimmt werden. Phosphoryliertes VASP korreliert dabei mit der Inhibition des P2Y₁₂ Rezeptors.

Abkürzungen in Abbildung 9: ADP: Adenosindiphosphat, PGE1: Prostaglandin E1, VASP: *Vasodilator Stimulated Phosphoprotein*. (Modifiziert aus: [95])

Versuchsdurchführung

Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Kitkomponenten sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Zu Beginn des Versuchs wurden drei Kunststoffröhrchen auf einem Gestell angeordnet und mit T1, T2 und T3 beschriftet. Das Röhrchen T3 diente dabei als Negativkontrolle. 10 µl Reagenz 2a wurde in das Röhrchen T1, je 10 µl Reagenz 2b wurden in die Röhrchen T2 und T3 sowie 10 µl Gesamtblut in alle 3 Röhrchen transferiert, mit niedriger Geschwindigkeit homogenisiert und bei 10 Minuten Raumtemperatur inkubiert. Zur Fixierung wurde jeweils 10 µl Reagenz 3 in die Röhrchen T1, T2 und T3 pipettiert. Nach kurzem Vortexen bei niedriger Geschwindigkeit wurden die Proben daraufhin 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss fand die Permeabilisierung der Zellen und Antikörpermarkierung statt. Dafür wurden 10 µl Reagenz 4a in die Röhrchen T1 und T2 sowie 10 µl Reagenz 4b in das Röhrchen T3 hinzugefügt und analog zur Fixierung bei niedriger Geschwindigkeit im Vortexer homogenisiert. Nach 5 Minuten Inkubationszeit erfolgte dann die Fluoreszenzmarkierung und Gegenfärbung der Thrombozyten. Dabei wurde 10 µl Reagenz 5 in die Röhrchen T1, T2 und T3 transferiert, ebenfalls mit einem Vortex bei niedriger Geschwindigkeit vermengt und 5 Minuten inkubiert. Zum Abschluss wurde 2 ml Reagenz 1 in jedes der 3 Röhrchen hinzugefügt, mit hoher Geschwindigkeit im Vortex homogenisiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

Tabelle 9: Kitkomponenten des PLT VASP/P2Y₁₂ Kits.

Auflistung der im VASP/P2Y₁₂ Kit enthaltenen Reagenzien.

Abkürzungen in Tabelle 9: ADP: Adenosindiphosphat, CD: *Cluster of differentiation*, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, IgG: Immunglobulin G, P: Phosphat, PE: Phycoerythrin, PGE1: Prostaglandin E1, VASP: *Vasodilator Stimulated Phosphoprotein*

Reagenz 1	1 x 60 ml Verdünnungsmittel
Reagenz 2a	1 x Fläschchen PGE1
Reagenz 2b	1 x Fläschchen PGE1 + ADP
Reagenz 3	1 x Fläschchen (300 µl) Fixiermittel
Reagenz 4a	1 x Fläschchen (200 µl) monoklonale anti-VASP-P S239 Maus-Antikörper + Permeabilisierungsmittel
Reagenz 4b	1 x Fläschchen (100 µl) isotypische Negativkontrolle (monoklonaler Maus-Antikörper) + Permeabilisierungsmittel
Reagenz 5	1 x Fläschchen (300 µl) Farbreagenz, PE-konjugiertes Thrombozyten-spezifischer Antikörper (anti-CD61-PE) + FITC-konjugierter Anti-IgG-Maus-Antikörper + Permeabilisierungsmittel

Für die Messung im Durchflusszytometer wurden die einzelnen Proben vor der Messung mittels Vortex nochmals durchgemischt. Die gemessene Thrombozytenzahl wurde auf 10.000 pro Probe festgelegt und die mittlere (*mean*) Fluoreszenzintensität (MFI) für die 3 Röhrchen bestimmt.

Analyse der Ergebnisse und Testauswertung

Nach durchflusszytometrischer Bestimmung der MFI wurde der korrigierte MFI (MFI_c) bestimmt, indem der MFI Wert der Negativkontrolle (Röhrchen 3) von den MFI Werten mit monoklonalen anti-VASP-P Maus-Antikörpern abgezogen wurde:

$$\begin{aligned} \text{MFI}_{c(\text{PGE1})} &= \text{MFI}_{c(\text{T1})} = \text{MFI}(\text{T1}) - \text{MFI}(\text{T3}) \\ \text{MFI}_{c(\text{PGE1} + \text{ADP})} &= \text{MFI}_{c(\text{T2})} = \text{MFI}(\text{T2}) - \text{MFI}(\text{T3}) \end{aligned}$$

Der PRI wird in Prozent angegeben und berechnet sich unter Verwendung der korrigierten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI_c) durch folgende Formel:

$$\text{PRI}_{\text{VASP}} [\%] = [(\text{MFI}_{c(\text{PGE1})} - \text{MFI}_{c(\text{PGE1} + \text{ADP})}) / \text{MFI}_{c(\text{PGE1})}] \times 100$$

4. Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

4.1.1 Patientenkollektiv und Probencharakteristika

Im Rahmen dieser Studie wurden 50 Blutproben der 30 Probanden untersucht. Die Studiengruppe umfasste dabei 10 Patienten, welche unter 3 verschiedenen Medikationsregimen analysiert wurden, sowie zwei Kontrollgruppen mit jeweils 10 teilnehmenden Probanden (Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel und Kontrollgruppe KHK ASS).

Zum Zeitpunkt der Untersuchung lag das mediane Alter in der Studiengruppe bei 58,5 Jahren mit einem Interquartilsabstand von 56,3 bis 61,5 Jahren. Die erste Blutabnahme wurde unmittelbar vor PTA unter ASS Einnahme, welches die Studienpatienten kontinuierlich über Monate sowie morgens am Tag der Blutentnahme einnahmen, durchgeführt. Die zweite Blutentnahme erfolgte nach PTA unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel. Die mediane Einnahmedauer betrug dabei 34,5 Tage mit einem Interquartilsabstand von 32,4 bis 37,6 Tagen. Die letzte Blutabnahme wurde unter ASS und Rivaroxaban in vaskulärer Dosierung durchgeführt. Diese Medikation nahmen die Patienten im Median 11,5 Tage mit einem Interquartilsabstand von 8 bis 19,5 Tagen ein.

In der Kontrollgruppe KHK ASS wurde ein medianes Alter von 66 Jahren mit einem Interquartilsabstand von 57 bis 74,3 Jahren errechnet. In der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel lag das mediane Alter bei 71 Jahren mit einem Interquartilsabstand von 64,3 bis 79,3 Jahren.

Eine Zusammenfassung weiterer Charakteristika des Studienkollektivs ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Charakteristika des Studienkollektivs.

Darstellung der demographischen Variablen, PAVK Risikofaktoren, klinischen Charakteristika sowie Begleitmedikation für die Studiengruppe und den beiden Kontrollgruppen. Metrische Variablen werden mit Median sowie 1. und 3. Quartil angegeben. Binäre Variablen werden in absoluten und relativen Häufigkeiten (%) beschrieben.

Abkürzungen in Tabelle 10: ARB = Angiotensinrezeptorblocker; BMI = Body Mass Index; n = Anzahl; CAVK = Cerebrale arterielle Verschlusskrankheit.

	Studiengruppe (n=10)	Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel (n=10)	Kontrollgruppe KHK ASS (n=10)
Demographische Variablen			
Alter, Jahre	58,5 (56,3 - 61,5)	71 (64,3 - 79,3)	66 (57 - 74,3)
Geschlecht			
männlich	9 (90%)	4 (40%)	9 (90%)
weiblich	1 (10%)	6 (60%)	1 (10%)
BMI, kg/m ²	24,7 (22,6 - 27,8)	25,4 (22,3 - 31,3)	29,9 (26,1 - 33,4)
PAVK Risikofaktoren			
Rauchen			
Aktuell	5 (50%)	3 (30%)	3 (30%)
Ehemalig	5 (50%)	5 (50%)	5 (50%)
Nie	0 (0%)	2 (20%)	2 (20%)
Rauchmenge, <i>Pack years</i>	30 (23,8 - 42,5)	30 (11,3 - 40)	21,5 (6 - 48,8)
Hypertonie	6 (60%)	8 (80%)	8 (80%)
Dyslipidämie			
Cholesterin (ges.), mg/dl	171,5 (151,8 - 195,3)	206,5 (168 - 260,5)	165,5 (142 - 219,8)
LDL Cholesterin, mg/dl	83,5 (67,8 - 118,3)	117,5 (87,8 - 165)	76,5 (59,5 - 114,8)
Diabetes mellitus	1 (10%)	4 (40%)	4 (40%)
Glucose, mg/dl	101,5 (94,5 - 108,5)	124 (106 - 188,8)	102,5 (93,8 - 120,5)
Klinische Charakteristika			
Z.n. Schlaganfall	0 (0%)	2 (20%)	1 (10%)
KHK	2 (20%)	2 (20%)	10 (100%)
PAVK	10 (100%)	10 (100%)	0 (0%)
CAVK	0 (0%)	2 (20%)	0 (0%)
Begleitmedikation			
Statin	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
ACE / ARB	6 (60%)	7 (70%)	8 (80%)
β-Blocker	2 (20%)	5 (50%)	8 (80%)
Calciumantagonist	2 (20%)	5 (50%)	4 (40%)
Diuretikum	2 (20%)	5 (50%)	6 (60%)
Antidiabetische Medikation	1 (10%)	3 (30%)	4 (40%)
Protonenpumpeninhibitor	4 (40%)	3 (30%)	4 (40%)

4.1.2 Messung der Thrombingenerierung im PFP und PRP

Tabelle 11 fasst die Messergebnisse der Thrombingenerierung im CAT zusammen. Die Thrombogramme, gemessen im PFP mit TF als Triggersubstanz sowie im PRP getriggert mit TF und Thrombin, sind im Anhang Kapitel 8.1 als Abbildungen 36, 37 und 38 dargestellt.

Die *Lagtime* ist definiert als Zeit vom Start der Reaktion bis zum Beginn der Thrombinbildung.

Im PFP nach Zugabe von TF war die *Lagtime* innerhalb der Studiengruppe unter gleichzeitiger ASS- und Rivaroxabaneinnahme mit 5,89 Minuten (min) im Median deutlich verlängert gegenüber der Monotherapie mit ASS (3,84 min) sowie der dualen Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel (3,94 min). Auch im Vergleich mit den Kontrollgruppen PAVK Clopidogrel (4,06 min) und KHK ASS (3,95 min) zeigte sich die Zeit bis zum Beginn der Thrombingenerierung in der Studiengruppe unter ASS und Rivaroxaban verlängert (5,89 min). Dieser Trend zeigte sich auch im PRP getriggert mit TF sowie Thrombin; bei Zugabe von Thrombin jedoch nur marginal. Innerhalb der Studiengruppe war die *Lagtime* unter ASS Monotherapie stets am kürzesten. Vergleicht man die *Lagtime* von Patienten mit PAVK und KHK mit einer ASS Monotherapie war diese nach Zugabe von TF im PFP und PRP in der Studiengruppe PAVK verkürzt gegenüber der Kontrollgruppe KHK. Am deutlichsten zeigte sich dies im PRP nach Zugabe von TF (PAVK ASS 8,50 min vs. KHK ASS 10,79 min).

Das Endogene Thrombin Potential beschreibt die Fläche unter der Kurve im Thrombogramm und repräsentiert dabei die insgesamt gebildete Thrombinmenge während des Messvorgangs.

Bei der Analyse der Ergebnisse zeigte sich, dass in allen drei Versuchen die Probanden der Studiengruppe unter ASS und Rivaroxaban im Median die geringste Gesamtmenge an Thrombin bildeten (PFP + TF 1428,35 nM x min, PRP + TF 1502,58 nM x min, PRP + Thrombin 1243,04 nM x min). Am deutlichsten war dieser Unterschied im PFP getriggert mit TF zu sehen. Dabei lag der Median bei der Kontrollgruppe KHK ASS mit 1884,96 nM x min am höchsten. Ein inhomogenes Bild zeigte sich bei den Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel. Während in der Kontrollgruppe KHK im PFP + TF (1884,96 nM x min) und PRP + TF (1644,85

nM x min) gegenüber der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel (PFP + TF 1810,30 nM x min, PRP + TF 1547,16 nM x min) eine vermehrt gebildete Thrombinmenge gemessen wurde, so zeigten die Messergebnisse im PRP + Thrombin geringer gebildete Thrombinmengen in der Kontrollgruppe KHK ASS (1391,92 nM x min) verglichen mit der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel (1441,02 nM x min).

Der *Peak* ist die maximal gemessene Thrombinkonzentration.

Innerhalb der Studiengruppe PAVK lag der höchste *Peak* bei allen drei Messungen im Median bei der Monotherapie mit ASS (PFP + TF 292,71 nM, PRP + TF 93,44 nM, PRP + Thrombin 60,54 nM) gefolgt von der dualen Thrombozytenaggregationshemmung unter ASS und Clopidogrel (PFP + TF 288,19 nM, PRP + TF 88,24 nM, PRP + Thrombin 32,48 nM). Die geringste Thrombinkonzentration innerhalb der Studiengruppe und im Vergleich mit den Kontrollgruppen wurde unter gleichzeitiger Therapie mit ASS und Rivaroxaban gemessen (PFP + TF 79,10 nM, PRP + TF 48,05 nM, PRP + Thrombin 32,48 nM). Verglichen mit der Studiengruppe PAVK ASS bedeutet dies eine Reduktion des Peaks im PFP + TF um etwa 73%, im PRP mit TF als Triggersubstanz um etwa 49%, sowie um etwa 46% im PRP nach Zugabe von Thrombin bei zusätzlicher Rivaroxabaneinnahme zu ASS in der Studiengruppe.

Tabelle 11: Messergebnisse der Thrombingenerierung im CAT.

Angegeben ist der Median sowie das 1. und 3. Quartil für die im CAT gemessenen Parameter *Lagtime* [min], *ETP* [nM x min] und *Peak* [nM]. Die Versuche wurden im PFP + TF, PRP + TF sowie PRP + Thrombin durchgeführt.

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** beschreibt die beiden Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel.

A

Parameter	PAVK ASS	PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS + Rivaroxaban
<i>Lagtime</i> [min]			
PFP + TF	3,84 (3,33; 4,14)	3,94 (3,41; 4,25)	5,89 (5,39; 7,17)
PRP + TF	8,50 (7,53; 9,47)	9,23 (8,06; 10,01)	12,78 (11,67; 13,91)
PRP + Thrombin	10,56 (9,75; 13,11)	11,45 (10,33; 13,53)	13,17 (10,53; 17,58)

ETP [nM x min]			
PFP + TF	1827,08 (1749,34; 2020,61)	1808,02 (1683,89; 2139,47)	1428,35 (1119,91; 1572,10)
PRP + TF	1645,74 (1477,20; 1765,88)	1661,43 (1419,27; 1813,91)	1502,58 (1210,27; 1797,88)
PRP + Thrombin	1410,10 (1089,74; 1565,52)	1359,76 (1196,39; 1589,18)	1243,04 (543,20; 1450,46)
Peak [nM]			
PFP + TF	292,71 (240,06; 320,49)	288,19 (260,04; 323,94)	79,10 (60,21; 113,77)
PRP + TF	93,44 (79,48; 118,40)	88,24 (69,58; 99,97)	48,05 (38,68; 64,26)
PRP + Thrombin	60,54 (50,77; 80,30)	55,15 (44,46; 67,37)	32,48 (16,69; 45,98)

B

Parameter	KHK ASS	PAVK Clopidogrel
Lagtime [min]		
PFP + TF	3,95 (3,67; 4,42)	4,06 (3,67; 4,46)
PRP + TF	10,79 (9,81; 12,07)	8,40 (7,50; 10,47)
PRP + Thrombin	10,17 (9,39; 11,33)	9,40 (8,42; 11,44)
ETP [nM x min]		
PFP + TF	1884,96 (1633,09; 2105,13)	1810,30 (1669,93; 1881,02)
PRP + TF	1644,85 (1406,50; 1893,62)	1547,16 (1502,48; 1741,89)
PRP + Thrombin	1391,92 (1054,66; 1552,54)	1441,02 (1279,07; 1536,99)
Peak [nM]		
PFP + TF	331,53 (266,80; 356,28)	294,08 (224,49; 318,36)
PRP + TF	84,29 (74,04; 94,57)	81,35 (73,16; 85,03)
PRP + Thrombin	54,79 (47,25; 68,42)	57,12 (40,65; 65,1)

4.1.3 Messung der Thrombozytenfunktion mittels Durchflusszytometrie

In Tabelle 12 sind die Messergebnisse der im Durchflusszytometer gemessenen Expression von CD62P basal und nach Zugabe von Thrombozytenagonisten zusammengefasst. Die Messergebnisse der thrombozytären GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung sind in Tabelle 13 dargestellt. Tabelle 14 zeigt das thrombozytäre Mepacrine Aufnahme/Freisetzungs-Assay basal und nach Aktivierung über Thrombozyten-Agonisten. Für die Auswertung wurde für jeden der verwendeten Thrombozytenagonisten jeweils eine Agonistenkonzentration festgelegt. Zur Vollständigkeit sind im Anhang unter Kapitel 8.3 die Ergebnisse aller Agonistenkonzentrationen aufgelistet.

Um die Freisetzung der α -Granula näher zu charakterisieren, wurde die Expression von CD62P auf der Thrombozytenoberfläche als Aktivierungsmarker bestimmt.

Im nichtaktivierten – basalem Zustand der Thrombozyten zeigten Studienpatienten unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel mit 8,50 lin Arbitrary Units (AU) im Median das niedrigste Expressionsniveau von CD62P innerhalb der Studiengruppe sowie im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen (KHK ASS 11,00 lin AU und PAVK Clopidogrel 10,50 lin AU).

Zur Thrombozytenaktivierung wurden als Agonisten TRAP-6, Thrombin, Convulxin, Arachidonsäure und Adenosindiphosphat in aufsteigender Konzentration verwendet. Dabei zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg thrombozytärer Aktivierung und Oberflächenexpression von CD62P.

Wie auch bei den Thrombozyten im nichtaktivierten Zustand war auch innerhalb der Studiengruppe bei gleichzeitiger ASS- und Clopidogreltherapie die geringste Expression von CD62P bei allen Thrombozytenagonisten zu verzeichnen. Am deutlichsten war dieser Unterschied unter Verwendung von ADP als Aktivierungsagonist. Dabei führte eine zusätzliche Clopidogreleinnahme zu einer Verminderung der Fluoreszenzintensität von 29,50 lin AU im Median unter ASS Monotherapie auf im Median 13,00 lin AU. Die zusätzliche Rivaroxabantherapie zur ASS Monotherapie zeigte in der Durchflusszytometrie ein ähnliches Expressionsniveau mit 28,00 lin AU im Median wie unter singulärer ASS Therapie (29,50 lin AU im Median).

Bei den Kontrollgruppen war die α -granuläre Freisetzung unabhängig von der Wahl des Agonisten in der KHK ASS Gruppe durchweg erhöht gegenüber den PAVK Kontrollpatienten mit Clopidogreltherapie.

Tabelle 12: Expression von CD62P basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten.

Angegeben ist der Median sowie das 1. und 3. Quartil für die mittels Durchflusszytometrie gemessene Fluoreszenzintensität der CD62P-Antikörperbindung.

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** beschreibt die beiden Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel.

A

CD62P	PAVK ASS	PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS + Rivaroxaban
<i>Basal</i>			
	11,50 (10,25; 13,25)	8,50 (7,00; 10,25)	11,00 (8,00; 14,00)
<i>TRAP-6 [μM]</i>			
12,5	116,50 (97,00; 139,00)	88,50 (73,75; 108,00)	91,50 (83,75; 117,80)
<i>Thrombin [U/ml]</i>			
0,1	124,00 (94,75; 134,30)	71,50 (50,25; 103,30)	109,50 (89,75; 128,30)
<i>Convulxin [ng/ml]</i>			
5	101,00 (83,00; 141,80)	69,00 (38,75; 79,25)	95,50 (79,75; 109,80)
<i>Arachidonsäure [μM]</i>			
1	72,00 (49,00; 77,75)	65,00 (47,00; 75,50)	72,00 (49,50; 90,50)
<i>Adenosindiphosphat [μM]</i>			
0,75	29,50 (26,75; 33,75)	13,00 (9,75; 17,00)	28,00 (19,50; 31,00)

B

CD62P	KHK ASS	PAVK Clopidogrel
<i>Basal</i>		
	11,00 (7,75; 12,75)	10,50 (8,75; 13,25)
<i>TRAP-6 [μM]</i>		
12,5	95,00 (75,75; 110,30)	71,00 (45,50; 81,25)
<i>Thrombin [U/ml]</i>		
0,1	86,50 (76,50; 102,30)	73,50 (60,00; 95,50)
<i>Convulxin [ng/ml]</i>		
5	71,00 (51,25; 84,50)	63,00 (43,50; 72,00)
<i>Arachidonsäure [μM]</i>		
1	73,50 (59,75; 99,50)	67,00 (41,00; 81,25)
<i>Adenosindiphosphat [μM]</i>		
0,75	25,00 (16,00; 29,25)	16,00 (15,00; 19,25)

Zur Einschätzung des Aktivierungszustandes des GPIIb/IIIa Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche wurde die PAC-1 Bindung auf der Thrombozytenoberfläche bestimmt. Die Bindung des PAC-1 Antikörpers gilt dabei als direkter Marker für die Aktivität des GPIIb/IIIa Rezeptors.

Ohne Zugabe von Thrombozyten-Agonisten war die mediane Fluoreszenzintensität am höchsten in der Studiengruppe ASS + Rivaroxaban (12,00 lin AU), gefolgt von der Kontrollgruppe KHK mit singulärer ASS Therapie (11,00 lin AU). Am geringsten war die PAC-1 Bindung im basalen Zustand der Thrombozyten in der Studiengruppe unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel (7,50 lin AU im Median).

Für die thrombozytäre Aktivierung wurden als Agonisten TRAP-6, Thrombin, Convulxin, Arachidonsäure und ADP verwendet. Durch Zugabe der Thrombozyten-Agonisten in steigender Konzentration konnte eine erhebliche Steigerung der PAC-1 Bindung verglichen mit der basalen Aktivität beobachtet werden.

Unter allen Therapieregimen wiesen Studienpatienten mit dualer Thrombozytenaggregationshemmung die niedrigste PAC-1 Bindung unabhängig vom Thrombozyten-Agonisten auf. Beim Vergleich der Kontrollgruppen war die PAC-1 Bindung an aktiviertes GPIIb/IIIa in der KHK ASS Gruppe stark erhöht bei allen Thrombozyten-Agonisten mit Ausnahme von Arachidonsäure. Nach thrombozytärer Aktivierung mittels Arachidonsäure war die PAC-1 Bindung in den Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel mit 47,50 lin AU im Median in beiden Gruppen gleich.

Tabelle 13: Thrombozytäre GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten.

Angegeben ist der Median sowie das 1. und 3. Quartil für die mittels Durchflusszytometrie gemessene Fluoreszenzintensität der PAC-1 Antikörperbindung.

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** beschreibt die beiden Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel.

A

aktiviertes GPIIb/IIIa	PAVK ASS	PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS + Rivaroxaban
<i>Basal</i>	9,00 (6,00; 12,75)	7,50 (5,75; 9,00)	12,00 (10,50; 14,25)
<i>TRAP-6 [µM]</i>			
12,5	134,00 (95,75; 150,50)	67,00 (35,25; 113,80)	133,00 (101,50; 146,30)
<i>Thrombin [U/ml]</i>			
0,1	145,00 (115,00; 172,00)	80,00 (37,25; 118,50)	150,50 (119,50; 178,30)

<i>Convulxin [ng/ml]</i>			
5	130,50 (87,50; 176,80)	67,50 (50,25; 136,00)	126,50 (112,00; 172,80)
<i>Arachidonsäure [µM]</i>			
1	74,50 (32,25; 102,80)	41,00 (32,75; 67,00)	45,00 (27,50; 61,25)
<i>Adenosindiphosphat [µM]</i>			
0,75	107,00 (97,00; 145,80)	52,50 (34,00; 69,25)	112,00 (71,50; 123,50)

B

aktiviertes GPIIb/IIIa	KHK ASS	PAVK Clopidogrel
<i>Basal</i>		
	11,00 (9,75; 13,00)	8,50 (5,75; 10,50)
<i>TRAP-6 [µM]</i>		
12,5	144,50 (93,25; 166,30)	67,50 (32,25; 96,75)
<i>Thrombin [U/ml]</i>		
0,1	133,50 (116,80; 196,00)	76,50 (49,25; 92,00)
<i>Convulxin [ng/ml]</i>		
5	129,50 (92,50; 173,00)	46,50 (37,75; 114,80)
<i>Arachidonsäure [µM]</i>		
1	47,50 (34,75; 62,00)	47,50 (20,00; 62,25)
<i>Adenosindiphosphat [µM]</i>		
0,75	106,00 (82,00; 125,00)	43,50 (26,50; 59,25)

Das Mepacrine Aufnahme/Freisetzungs-Assay dient der genaueren δ -Granula Analyse. Im basalen Zustand kann die Menge an aufgenommenem Mepacrine in die Thrombozyten gemessen werden.

Am meisten Mepacrine wurde von Thrombozyten der Studiengruppe unter ASS + Clopidogrel im Median mit 57,50 lin AU aufgenommen. Bei Thrombozyten der Kontrollgruppe PAVK mit Clopidogrel Monotherapie wurde mit einem Median von 45,50 lin AU am wenigsten Mepacrine in die dichten Granula aufgenommen.

Durch Zugabe von Thrombozyten-Agonisten werden Thrombozyten aktiviert und setzen dichte Granula mit Mepacrine frei. Als Agonisten wurden Thrombin und Convulxin verwendet. Die steigende Konzentration der Agonisten führt zu einer physiologischen Abnahme der Mepacrine Fluoreszenz.

Das höchste Fluoreszenzniveau nach Aktivierung mit Thrombin wurde in der Studiengruppe PAVK ASS + Clopidogrel mit 32,00 lin AU im Median aufgezeichnet gefolgt von 28,00 lin AU im Median in der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel. Demgegenüber war die höchste Mepacrine Freisetzung nach Zugabe von Convulxin mit 25,50 lin AU im Median in der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel.

Tabelle 14: Thrombozytäre Mepacrine Aufnahme und Freisetzung basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten.

Angegeben ist der Median sowie das 1. und 3. Quartil für die mittels Durchflusszytometrie gemessene Fluoreszenzintensität der Mepacrineaufnahme.

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** beschreibt die beiden Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel.

A

Mepacrine	PAVK ASS	PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS + Rivaroxaban
<i>Basal</i>	50,00 (47,00; 62,25)	57,50 (47,00; 61,75)	49,00 (45,25; 56,00)
<i>Thrombin [U/ml]</i>			
0,2	19,50 (17,50; 27,00)	32,00 (24,75; 37,50)	23,00 (17,50; 24,00)
<i>Convulxin [ng/ml]</i>			
20	14,50 (12,25; 23,50)	22,50 (19,75; 31,00)	15,50 (13,75; 19,00)

B

Mepacrine	KHK ASS	PAVK Clopidogrel
<i>Basal</i>	46,50 (38,00; 56,25)	45,50 (38,25; 62,00)
<i>Thrombin [U/ml]</i>		
0,2	23,00 (19,00; 28,50)	28,00 (22,00; 33,75)
<i>Convulxin [ng/ml]</i>		
20	18,50 (15,00; 22,25)	25,50 (18,25; 28,75)

4.1.4 Messung des Thrombozyten-Reaktivitätsindex mittels VASP Phosphorylierung

Tabelle 15 zeigt den medianen PRI in der Studiengruppe sowie in den beiden Kontrollgruppen unter verschiedener medikamentöser Therapie. Die detaillierten Einzelmessergebnisse des VASP Assays sind in Tabelle 21 im Anhang Kapitel 8.4 dargestellt.

Der höchste Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI) wurde in der Kontrollgruppe KHK unter ASS Monotherapie im Median mit 88,76% gemessen. Mit einem PRI im Median von 84,61% in der PAVK ASS + Rivaroxaban Gruppe und 84,45% in der PAVK ASS Gruppe waren diese annähernd gleich, jedoch marginal vermindert gegenüber der KHK ASS Gruppe. Demgegenüber zeigte sich bei der Analyse der Ergebnisse bei Patienten mit Clopidogreinnahme ein deutlich verminderter Thrombozyten-Reaktivitätsindex. Am niedrigsten war dieser in der Kontrollgruppe PAVK unter Clopidogreinnahme im Median bei 33,80%. Unter gleichzeitiger ASS- und Clopidogreltherapie in der Studiengruppe lag dieser bei 41,07%.

In dieser Studie wurde ein Clopidogrel Non-Responder bei einem PRI >50% festgelegt. Bei Betrachtung der Einzelmessungen unter Clopidogreltherapie zeigten jeweils 4 Probanden in der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel sowie 4 Probanden in der Studiengruppe PAVK ASS + Clopidogrel einen PRI über 50% und wiesen dadurch eine inadäquate Clopidogrel *Response* auf.

Tabelle 15: Messergebnisse der VASP Phosphorylierung.

Angegeben ist der Median sowie das 1. und 3. Quartil des Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI).

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** beschreibt die beiden Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel.

A

Parameter	PAVK ASS	PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS + Rivaroxaban
PRI [%]	84,45 (78,66; 86,29)	41,07 (20,65; 54,25)	84,61 (83,29; 90,76)

B

Parameter	KHK ASS	PAVK Clopidogrel
PRI [%]	88,76 (84,40; 90,51)	33,80 (9,68; 60,57)

4.2 Konfirmatorische Datenanalyse

Zur konfirmatorischen Datenanalyse wurde die im PRP gemessene TG zwischen Studienpatienten mit ASS Monotherapie und Studienpatienten unter gleichzeitiger ASS- und Rivaroxabaneinnahme verglichen. Es wurde ein mindestens um 30% erniedrigter Thrombin *Peak* bei Studienpatienten mit ASS und Rivaroxaban gegenüber Studienpatienten mit ASS Monotherapie erwartet.

Die gleichzeitige ASS- und Rivaroxabaneinnahme im Vergleich zur ASS Monotherapie in der Studiengruppe führte zu einer Reduktion des Thrombin *Peak* um etwa 49% im TF getriggerten plättchenreichen Plasma. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant ($p=0,004$). Im PRP mit Thrombin als Triggersubstanz wurde ein um etwa 46% verminderter *Peak* in der Studiengruppe unter ASS- und Rivaroxabantherapie verglichen mit Studienpatienten unter singulärer ASS Therapie gemessen. Dieser Unterschied zeigte sich ebenfalls als statistisch signifikant ($p=0,002$).

4.3 Explorative Datenanalyse

4.3.1 Untersuchungen der thrombozytären und plasmatischen Thrombingenerierung *in vitro*

Da die *in vitro* TG bei Patienten mit PAVK unter verschiedenen antithrombotischen Therapieregimen unzureichend erforscht ist, wurde im Rahmen dieser Studie die *in vitro* Thrombinbildungskapazität vergleichend mit KHK Patienten analysiert. Um den Einfluss von Thrombozyten auf die *in vitro* Thrombinbildung und die Wechselwirkung von Thrombozyten mit Gerinnungsfaktoren zu detektieren, wurden die Versuche im PFP sowie im PRP durchgeführt.

Die Erklärung der einzelnen gemessenen Parameter *Lagtime*, ETP und *Peak* sowie die Durchführung der CAT sind im Kapitel 3.2.7 näher beschrieben.

4.3.1.1 Lagtime im PFP nach Zugabe von TF

Die Analyse der *Lagtime*, gemessen im plättchenfreien Plasma mit TF als Triggersubstanz, zeigte eine statistisch auffällig verlängerte *Lagtime* innerhalb der Studiengruppe PAVK (Abb. 10: A) unter gleichzeitiger ASS- und Rivaroxabantherapie im Vergleich zur Monotherapie mit ASS ($p=0,002$; Abb. 10: A) sowie unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS und Clopidogrel ($p=0,002$; Abb. 10: A). Kein hinreichender Unterschied ergab sich bei der Gruppe PAVK ASS Therapie verglichen mit beiden Kontrollgruppen KHK ASS ($p=0,280$; Abb. 10: B) und PAVK Clopidogrel ($p=0,123$; Abb. 10: C).

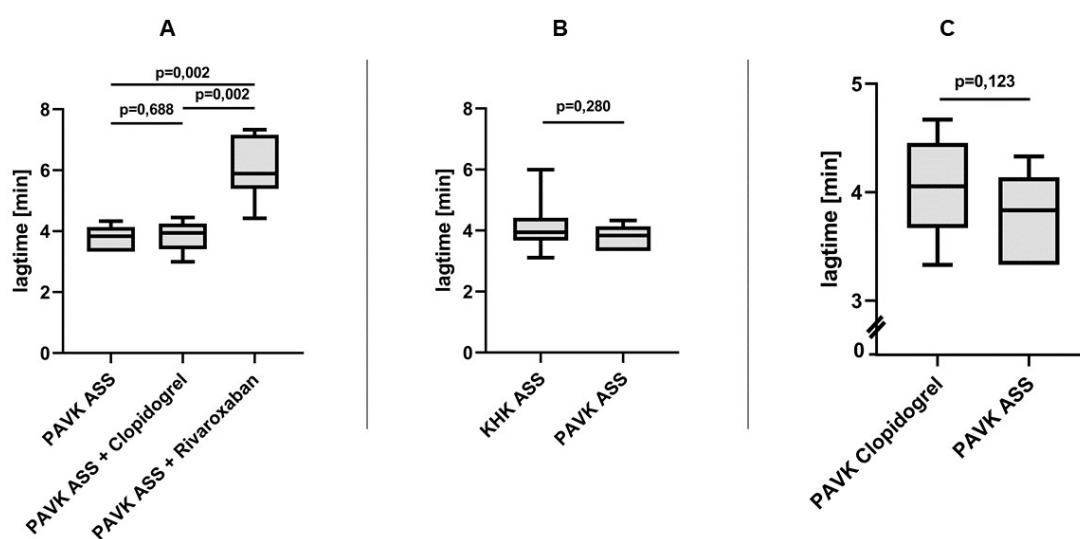


Abbildung 10: Lagtime im PFP nach Zugabe von TF.

Darstellung der *Lagtime* in Minuten. Versuchsdurchführung im CAT mit plättchenfreiem Plasma getriggert mit TF (enthalten im PPP Reagenz). Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die *Lagtime* innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die *Lagtime* zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.1.2 Lagtime im PRP nach Zugabe von TF

Bei der Messung im PRP getriggert mit TF zeigten die Ergebnisse in der Studiengruppe (Abb. 11: A) eine verlängerte *Lagtime* unter ASS- und Rivaroxabantherapie im Vergleich zum Therapieregime ASS + Clopidogrel ($p=0,002$; Abb. 11: A) und singulärer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS ($p=0,004$; Abb. 11: A). Zudem ließ sich ein statistisch auffälliger Unterschied durch eine verlängerte *Lagtime* in der Kontrollgruppe KHK ASS im Vergleich zur Studiengruppe PAVK ASS ($p=0,003$, Abb. 11: B) erkennen. Nicht auffällig verschieden war PAVK Clopidogrel verglichen mit PAVK ASS ($p=0,739$; Abb. 11: C).

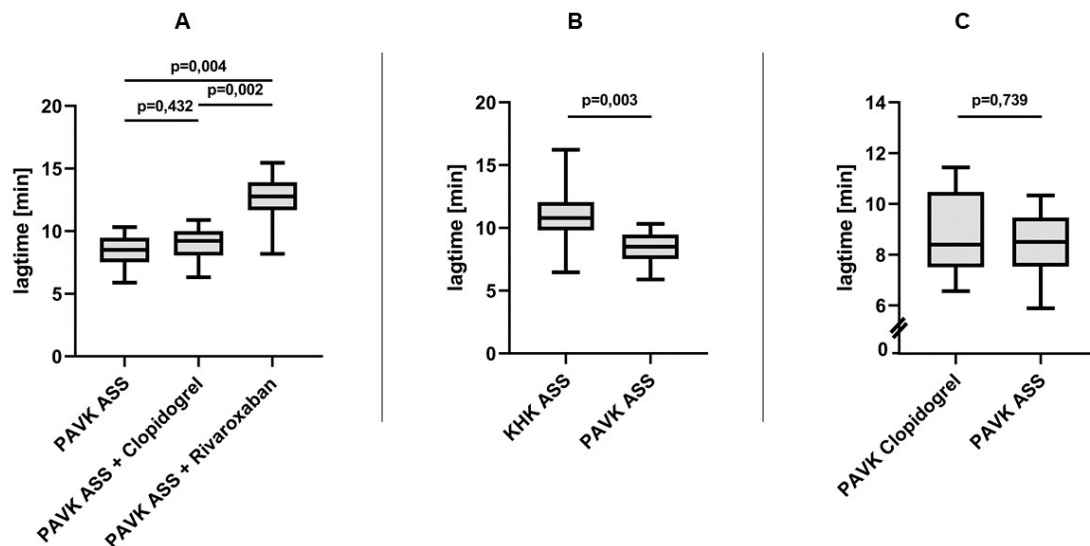


Abbildung 11: Lagtime im PRP nach Zugabe von TF.

Darstellung der *Lagtime* in Minuten. Versuchsdurchführung im CAT mit plättchenreichem Plasma getriggert mit TF (Innovin). Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die *Lagtime* innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die *Lagtime* zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.1.3 Lagtime im PRP nach Zugabe von Thrombin

Nach Zugabe von Thrombin im PRP ließen sich keine statistisch relevanten Unterschiede innerhalb der Studiengruppe (Abb. 12: A) sowie im Vergleich mit den Kontrollgruppen (Abb. 12: B und C) erkennen ($p > 0,05$). Tendenziell, aber nicht statistisch relevant, war die *Lagtime* in der Studiengruppe unter ASS und Rivaroxaban verlängert gegenüber der ASS ($p = 0,232$; Abb. 12: A) und ASS + Clopidogrel Therapie ($p = 0,275$; Abb. 12: A). Statistisch unauffällig verlängert war die *Lagtime* in der Studiengruppe PAVK ASS im Vergleich zur Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel ($p = 0,063$; Abb. 12: C).

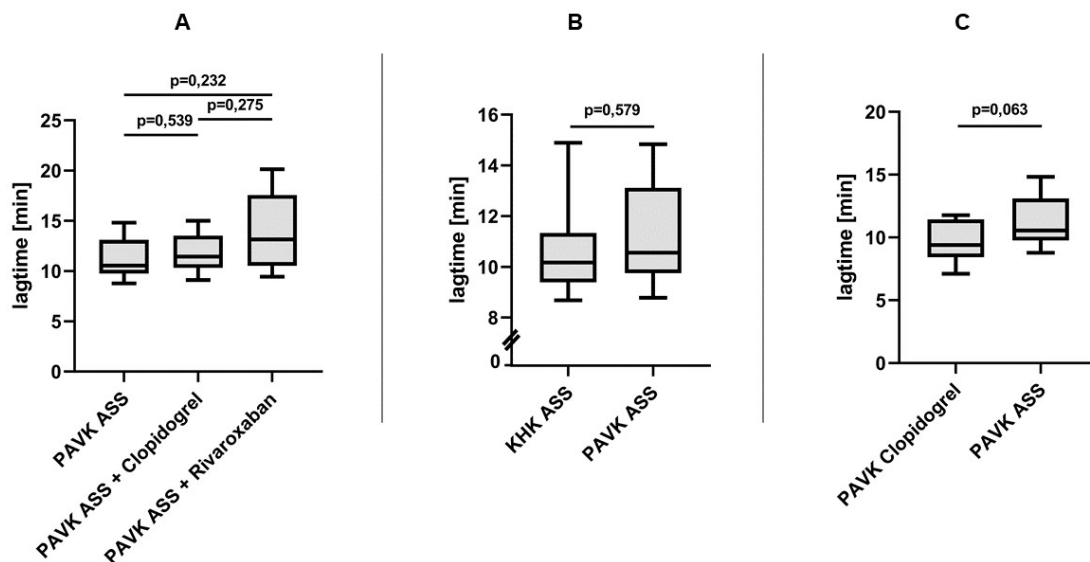


Abbildung 12: Lagtime im PRP nach Zugabe von Thrombin.

Darstellung der *Lagtime* in Minuten. Versuchsdurchführung im CAT mit plättchenreichem Plasma getriggert mit Thrombin. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die *Lagtime* innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die *Lagtime* zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.1.4 ETP im PFP nach Zugabe von TF

Die Ergebnisse zeigten im PFP mit TF als Triggersubstanz statistisch nennenswerte Unterschiede zwischen den Therapieregimen ASS und ASS in Kombination mit Rivaroxaban innerhalb der Studiengruppe ($p=0,037$; Abb. 13: A). Diese Tendenz des verminderten ETP innerhalb der Studiengruppe unter ASS und Rivaroxaban zeigte sich zudem im Vergleich mit dem Therapieregime ASS + Clopidogrel, jedoch ohne statistische Auffälligkeit. Der Vergleich von Studienpatienten unter ASS Therapie mit der Kontrollgruppe KHK ASS ($p=0,796$, Abb. 13: B) und der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel ($p=0,684$; Abb. 13: C) ergab keine statistische Relevanz.

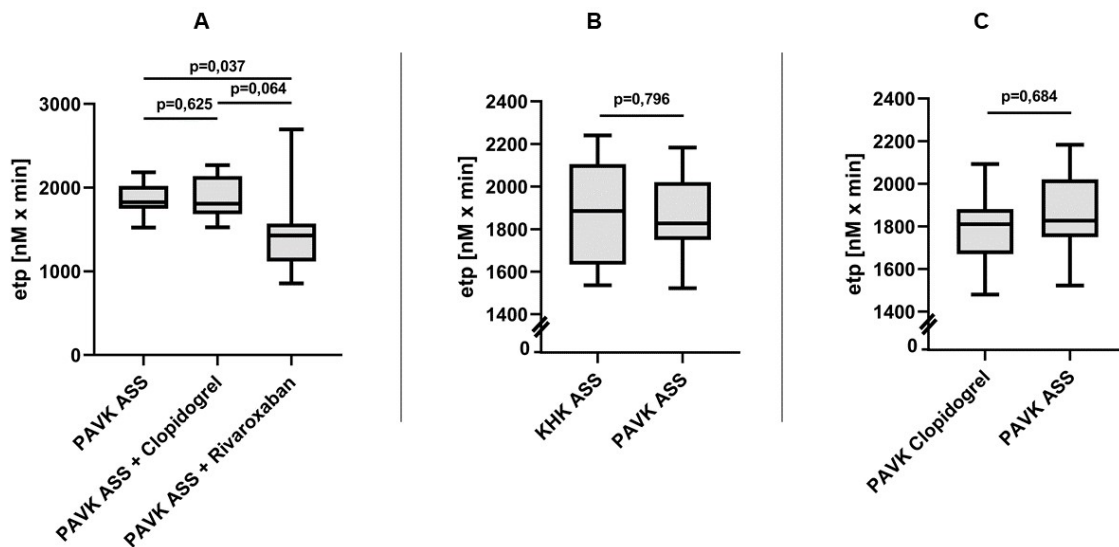


Abbildung 13: ETP im PFP nach Zugabe von TF.

Darstellung des ETP in nM x min. Versuchsdurchführung im CAT mit plättchenfreiem Plasma getriggert mit TF (enthalten im PPP Reagenz). Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt das ETP innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht das ETP zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.1.5 ETP im PRP nach Zugabe von TF

Die Ergebnisse im PRP mit TF als Triggersubstanz ließen innerhalb der Studiengruppe (Abb. 14: A) als auch vergleichend mit den Kontrollgruppen (Abb. 14: B und C) keine statistische Auffälligkeit erkennen ($p > 0,05$). Innerhalb der Studiengruppe wurde unter ASS und Rivaroxaban im Median am wenigsten Thrombin gebildet, jedoch nicht statistisch nennenswert.

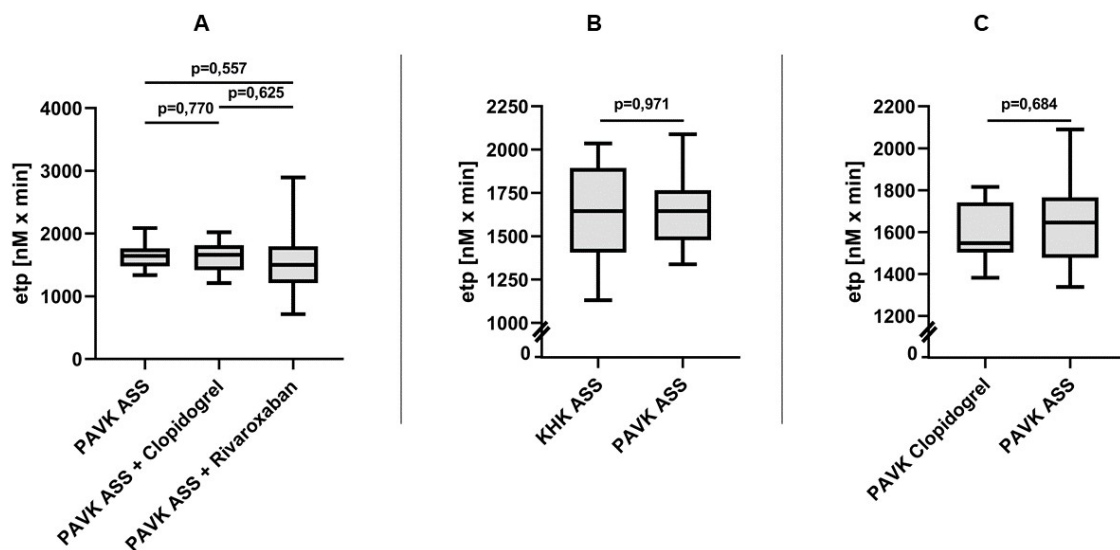


Abbildung 14: ETP im PRP nach Zugabe von TF.

Darstellung des ETP in nM x min. Versuchsdurchführung im CAT mit plättchenreichem Plasma getriggert mit TF (Innovin). Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt das ETP innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht das ETP zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.1.6 ETP im PRP nach Zugabe von Thrombin

Die Messung des ETP im PRP nach Zugabe von Thrombin ergab innerhalb der Studiengruppe (Abb. 15: A) sowie im Vergleich PAVK ASS mit den Kontrollgruppen KHK ASS (Abb. 15: B) und PAVK Clopidogrel (Abb. 15: C) keinen statistisch auffälligen Unterschied. Die medikamentöse Kombinationstherapie mit ASS und Rivaroxaban führte innerhalb der Studiengruppe zum niedrigsten ETP, in der Tendenz jedoch ohne statistische Auffälligkeit.

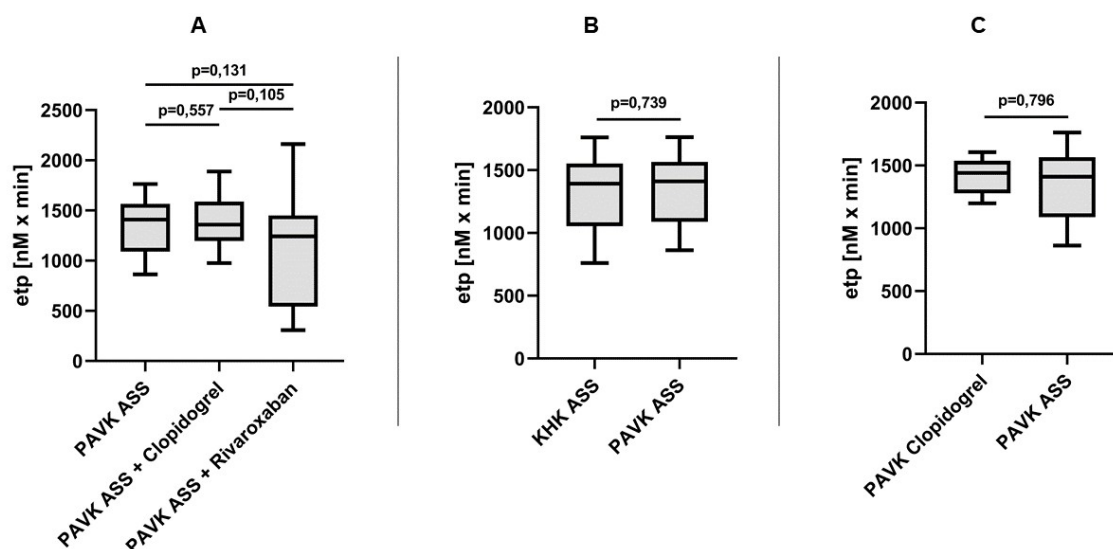


Abbildung 15: ETP im PRP nach Zugabe von Thrombin.

Darstellung des ETP in nM x min. Versuchsdurchführung im CAT mit plättchenreichem Plasma getriggert mit Thrombin. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt das ETP innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht das ETP zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.1.7 *Peak* im PFP nach Zugabe von TF

Die Analyse des Thrombin *Peak* im PFP getriggert mit TF zeigte innerhalb der Studiengruppe eine statistisch relevante Erniedrigung bei gleichzeitiger ASS- und Rivaroxabantherapie im Vergleich zur Monotherapie mit ASS ($p=0,002$; Abb. 16: A) sowie der Kombinationstherapie unter ASS + Clopidogrel ($p=0,002$; Abb. 16: A). Patienten der Studiengruppe unter ASS Monotherapie verglichen mit der Kontrollgruppe PAVK unter ASS Monotherapie zeigten die Tendenz zu einem verminderten *Peak*, jedoch ohne statistische Auffälligkeit ($p=0,315$; Abb. 16: B). Kein statistisch hinreichender Unterschied ergab sich aus dem Vergleich zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel ($p=0,796$; Abb. 16: C).

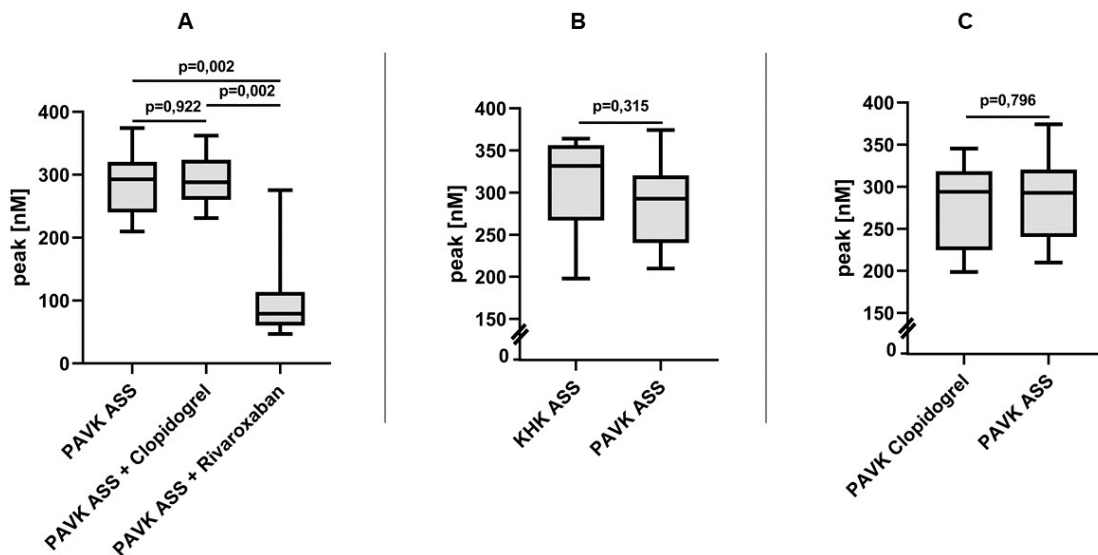


Abbildung 16: Peak im PFP nach Zugabe von TF.

Darstellung der maximalen Thrombinkonzentration (*Peak*) in nM. Versuchsdurchführung im CAT mit plättchenfreiem Plasma getriggert mit TF (enthalten im PPP Reagenz). Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt den *Peak* innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht den *Peak* zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.1.8 *Peak* im PRP nach Zugabe von TF

Die Ergebnisse zeigten im PRP mit TF als Triggersubstanz einen signifikant verminderten *Peak* unter gleichzeitiger ASS- und Rivaroxabantherapie verglichen mit ASS als Monotherapie innerhalb der Studiengruppe ($p=0,004$; Abb. 17: A). Ebenso statistisch auffällig innerhalb der Studiengruppe erwies sich die Kombinationstherapie mit ASS und Clopidogrel im Vergleich zur ASS Monotherapie ($p=0,027$; Abb. 17: A). Verglichen mit der PAVK ASS + Clopidogrel Gruppe zeigten die Ergebnisse unter ASS + Rivaroxaban einen statistisch nicht nennenswerten verminderten *Peak* ($p=0,064$; Abb. 17: A). Die Studiengruppe PAVK ASS im Vergleich zu den Kontrollgruppen KHK ASS ($p=0,247$; Abb. 17: B) und PAVK Clopidogrel ($p=0,105$; Abb. 17: C) wies tendenziell einen höheren *Peak* auf, jedoch ohne statistische Relevanz.

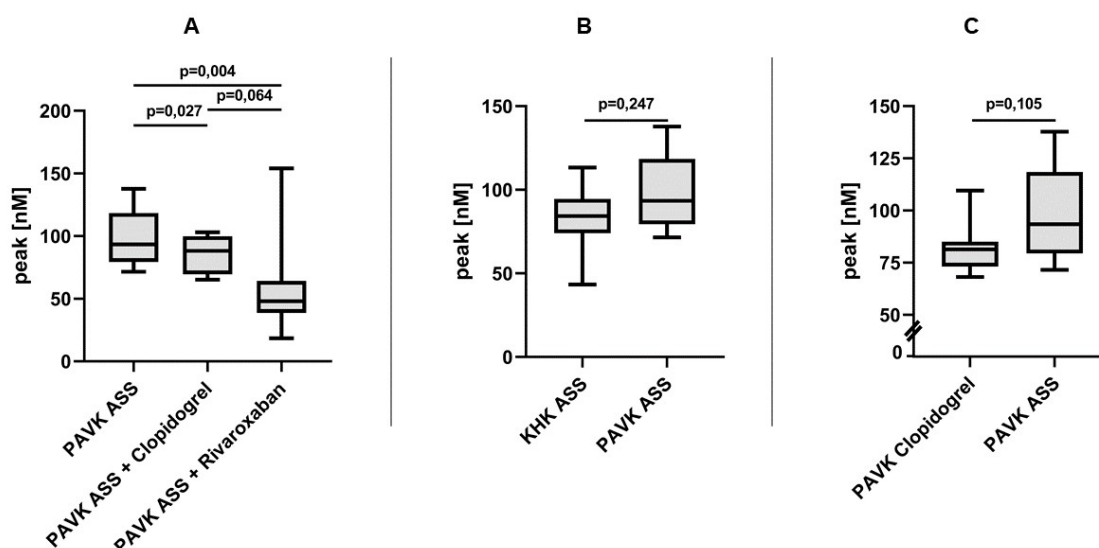


Abbildung 17: Peak im PRP nach Zugabe von TF.

Darstellung der maximalen Thrombinkonzentration (*Peak*) in nM. Versuchsdurchführung im CAT mit plättchenreichem Plasma getriggert mit TF (Innovin). Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt den *Peak* innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht den *Peak* zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.1.9 Peak im PRP nach Zugabe von Thrombin

Die Analyse des *Peak* im PRP nach Zugabe von Thrombin ergab statistisch relevante Auffälligkeiten innerhalb der Studiengruppe (Abb. 18: A). Im Vergleich zur Monotherapie mit ASS wurde der *Peak* einerseits durch die zusätzliche Clopidogrelgabe relevant vermindert ($p=0,037$; Abb. 18: A). Zum anderen war dieser statistisch signifikant vermindert nach zusätzlicher Rivaroxabangabe im Vergleich zur ASS Monotherapie ($p=0,002$; Abb. 18: A) und verglichen mit der dualen Thrombozytenaggregationshemmung unter ASS und Clopidogrel ($p=0,006$; Abb. 18: A). Der Unterschied zwischen den Kontrollgruppen KHK ASS ($p=0,393$; Abb. 18: B) und PAVK Clopidogrel ($p=0,436$; Abb. 18: C) erwies sich als nicht auffällig.

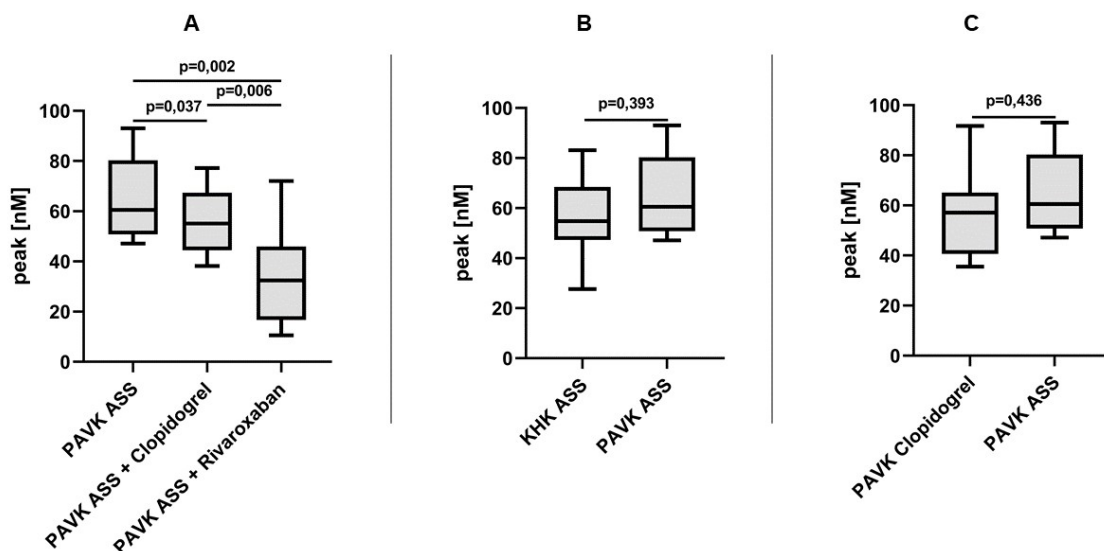


Abbildung 18: Peak im PRP nach Zugabe von Thrombin.

Darstellung der maximalen Thrombinkonzentration (*Peak*) in nM. Versuchsdurchführung im CAT mit plättchenreichem Plasma getriggert mit Thrombin. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt den *Peak* innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht den *Peak* zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.2 Untersuchung der Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche mittels Durchflusszytometrie

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Durchflusszytometrie zu gewährleisten, wurde vor Messung der Thrombozytenfunktion und Monitoring von P2Y₁₂ Antagonisten und FXa Inhibitoren die Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche von allen teilnehmenden Probanden quantifiziert und untereinander verglichen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche teilnehmender Probanden sind in Abbildung 19 und im Anhang Kapitel 8.2 dargestellt. Tabelle 16 stellt den Median mit 1. und 3. Quartil der *Antigen binding sites* (ABS) auf der Thrombozytenoberfläche exprimierter Rezeptoren dar. Die einzelnen p-Werte für den Vergleich der Hauptrezeptorpräsentation auf der Thrombozytenoberfläche innerhalb der Studiengruppe bzw. mit den Kontrollgruppen sind in Tabelle 17 dargelegt.

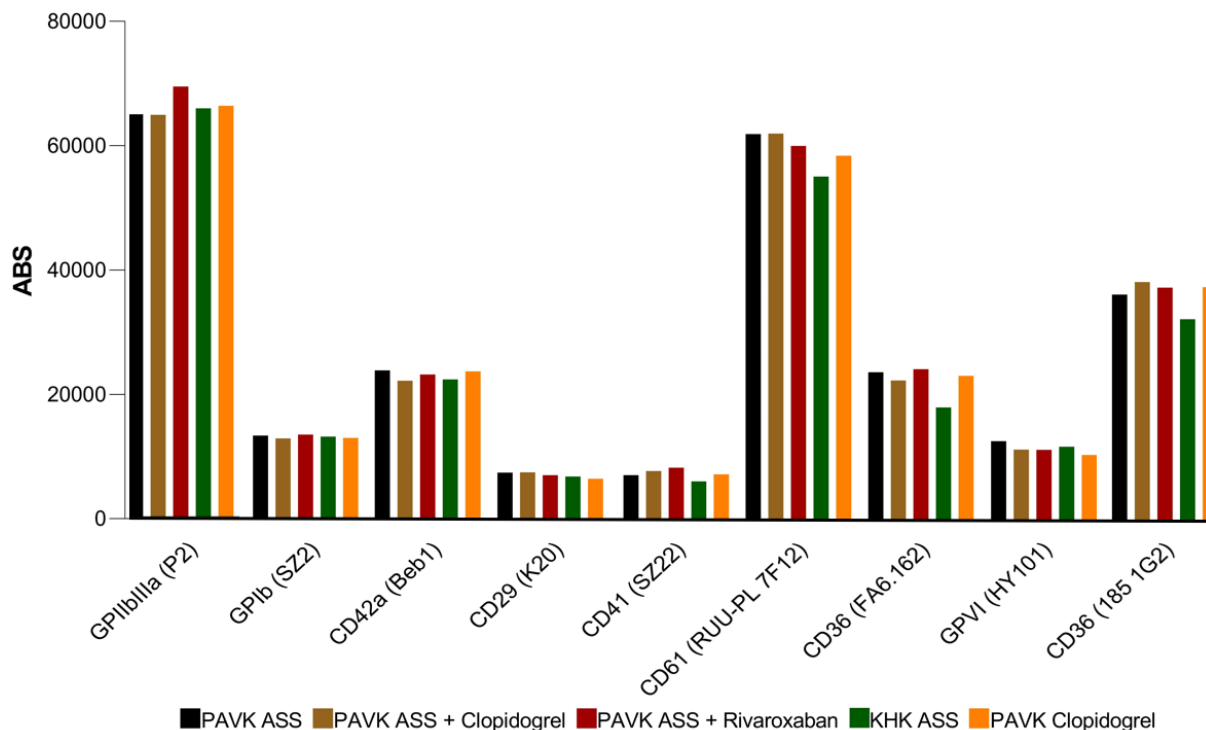


Abbildung 19: Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche.

Abbildung 19 zeigt den Median der ABS auf der Thrombozytenoberfläche exprimierter Rezeptoren.

Abkürzungen in Abbildung 19: ABS: *Antigen Binding Sites*.

Die Ergebnisse der im Durchflusszytometer gemessenen ABS zeigten im Hinblick auf GPIIb/IIIa (P2) statistisch nennenswerte Unterschiede. So konnte eine auffällig verminderte Anzahl an GPIIb/IIIa (P2) ABS in der Kontrollgruppe KHK mit singularer ASS Therapie verglichen mit der Studiengruppe unter gleichzeitiger ASS- und Rivaroxabaneinnahme festgestellt werden ($p=0,045$; vgl. Anhang Tabelle 17).

Bei Analyse des Rezeptors CD29 (K20) zeigten sich statistisch relevante Auffälligkeiten innerhalb der Studiengruppe. Verglichen mit der gleichzeitigen ASS- und Rivaroxabaneinnahme wiesen Thrombozyten unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel im Median eine deutlich vermehrte Anzahl an ABS auf ($p=0,041$; vgl. Anhang Tabelle 17). Auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe KHK mit singularer ASS Einnahme zeigten Thrombozyten der Studiengruppe unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS + Clopidogrel eine erhöhte Anzahl an ABS mit statistischer Relevanz ($p=0,034$; vgl. Anhang Tabelle 17).

Die Auswertung von CD36 (185 1G2) auf der Thrombozytenoberfläche ergab statistisch auffällig verminderte ABS in der Studiengruppe unter ASS- und Rivaroxabantherapie im Vergleich zu Studienpatienten mit ASS- und Clopidogreleinnahme ($p=0,039$; vgl. Anhang Tabelle 17).

Kein hinreichender Unterschied bei der Untersuchung der Thrombozyten Hauptrezeptoren innerhalb der Studiengruppe sowie im Vergleich mit den Kontrollgruppen zeigten sich bei GPIb (SZ2), CD42a (Beb1), CD41 (SZ22), CD61 (RUU-PL 7F12), CD36 (FA6.162) und GPVI (HY101) (vgl. Anhang Tabelle 16 und 17).

4.3.3 Untersuchung der Thrombozytenfunktion mittels Durchflusszytometrie

Um den Einfluss von ASS, Clopidogrel und Rivaroxaban bei PAVK Patienten und KHK Patienten auf die Thrombozytenfunktion näher zu charakterisieren, wurden als thrombozytäre Aktivierungsmarker die CD62P Expression sowie die PAC-1 Bindung auf der Thrombozytenoberfläche gemessen. Überdies wurde zur genaueren δ -Granula Analyse das Mepacrine Aufnahme/Freisetzungs-Assay durchgeführt.

Die Methodik der Durchflusszytometrie sowie die Erklärung der verwendeten Agonisten zur Thrombozytenaktivierung und thrombozytären Aktivierungsmarker sind im Kapitel 3.2.8 näher beschrieben.

4.3.3.1 Analyse der CD62P Oberflächen-Expression basal und nach Aktivierung mit Thrombozyten-Agonisten

Basal

Innerhalb der Studiengruppe (Abb. 20: A) wiesen die Thrombozyten im basalen Zustand unter gleichzeitiger ASS- und Clopidogreltherapie die geringste CD62P Expression auf und zeigten im direkten Vergleich mit den anderen Therapieregimen, ASS Monotherapie ($p=0,016$; Abb. 20: A) und ASS + Rivaroxaban ($p=0,012$; Abb. 20: A), statistische Auffälligkeit. Thrombozyten der Studiengruppe unter singulärer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS exprimierten tendenziell mehr CD62P im Vergleich zur Kontrollgruppe KHK ASS ($p=0,481$; Abb. 20: B) und Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel ($p=0,436$; Abb. 20: C), allerdings ohne statistische Relevanz.

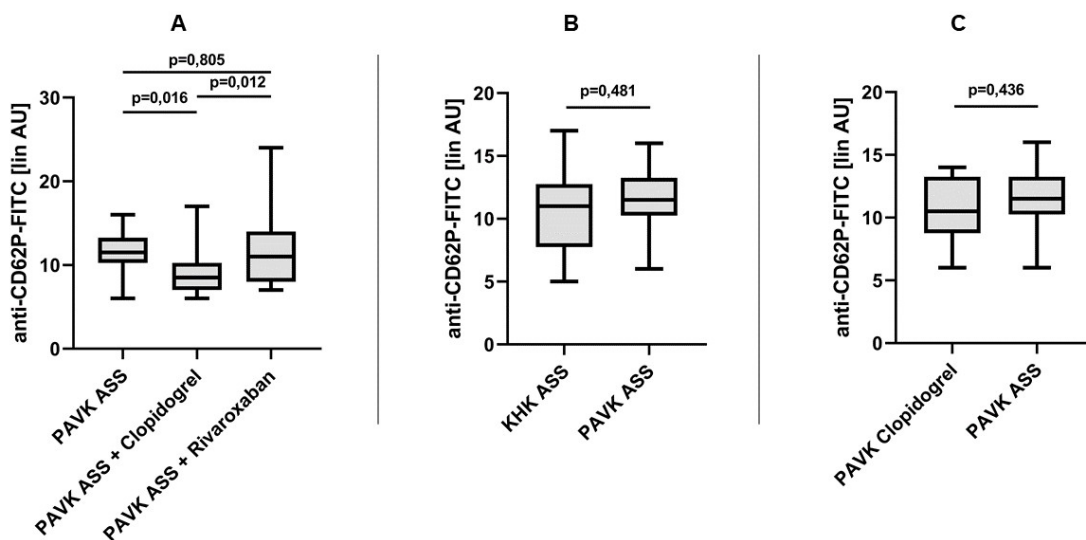


Abbildung 20: Basale thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P.

Darstellung der basalen Oberflächen-Expression von CD62P in linearen relativen Einheiten der mittleren Fluoreszenzintensität des gebundenen anti-CD62P-FITC-Antikörpers. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die basale Oberflächen-Expression von CD62P innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die basale Oberflächen-Expression von CD62P zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

TRAP-6 12,5 μ M

TRAP-6-stimulierte Thrombozyten zeigten in der Studiengruppe unter ASS Therapie das höchste Expressionsniveau. Bei Studienpatienten mit singulärer ASS Therapie war dieser Unterschied im Vergleich zur dualen Thrombozytenaggregationshemmung ($p=0,027$; Abb. 21: A) sowie verglichen mit ASS + Rivaroxaban ($p=0,018$; Abb. 21: A) statistisch auffällig. Auch im Vergleich mit den beiden Kontrollgruppen wurde eine vermehrte Expression in der Studiengruppe PAVK mit ASS Therapie gemessen, jedoch war dieser Unterschied nur verglichen mit der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel statistisch relevant ($p=0,002$; Abb. 21: C).

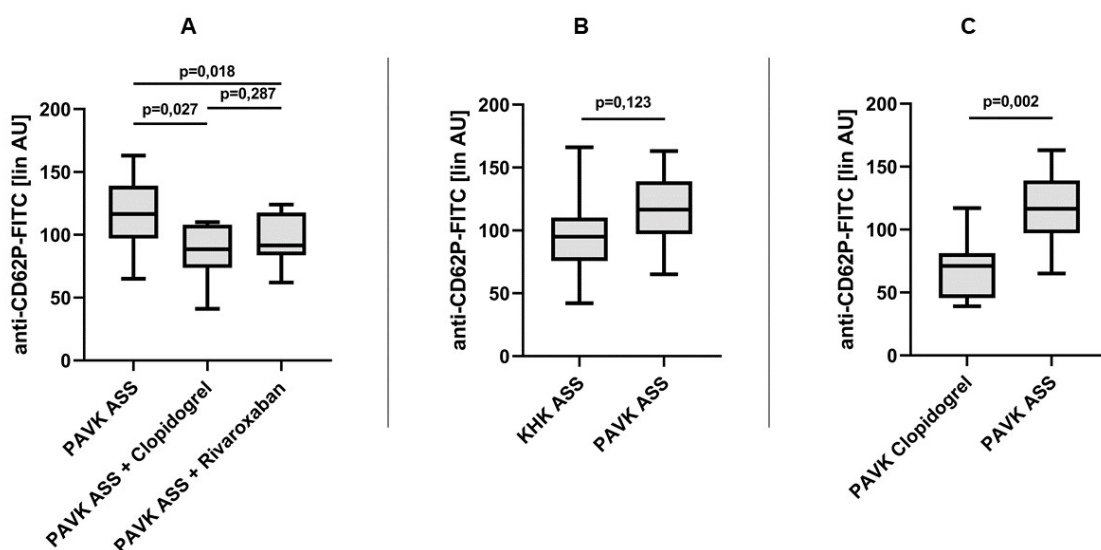


Abbildung 21: CD62P Oberflächen-Expression nach Zugabe von 12,5 μ M TRAP-6.

Darstellung der thrombozytären Oberflächen-Expression von CD62P in linearen relativen Einheiten der mittleren Fluoreszenzintensität des gebundenen anti-CD62P-FITC-Antikörpers nach Thrombozytenaktivierung mit TRAP-6. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die CD62P Oberflächen-Expression innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die CD62P Oberflächen-Expression zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

Thrombin 0,1 U/ml

Nach Aktivierungsreiz der Thrombozyten mit Thrombin wurde innerhalb der Studiengruppe unter gleichzeitiger ASS- und Clopidogreltherapie das geringste Expressionsniveau von CD62P gemessen. Der Unterschied verglichen mit den Therapieformen PAVK ASS ($p=0,002$; Abb. 22: A) und PAVK ASS + Rivaroxaban ($p=0,004$; Abb. 22: A) innerhalb der Studiengruppe war statistisch auffällig. Wie in den Abbildungen B und C dargestellt, wurde statistisch relevant mehr CD62P in der Studiengruppe PAVK ASS auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert als in der Kontrollgruppe KHK ASS ($p=0,019$; Abb. 22: B) und der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel ($p=0,001$; Abb. 22: C).

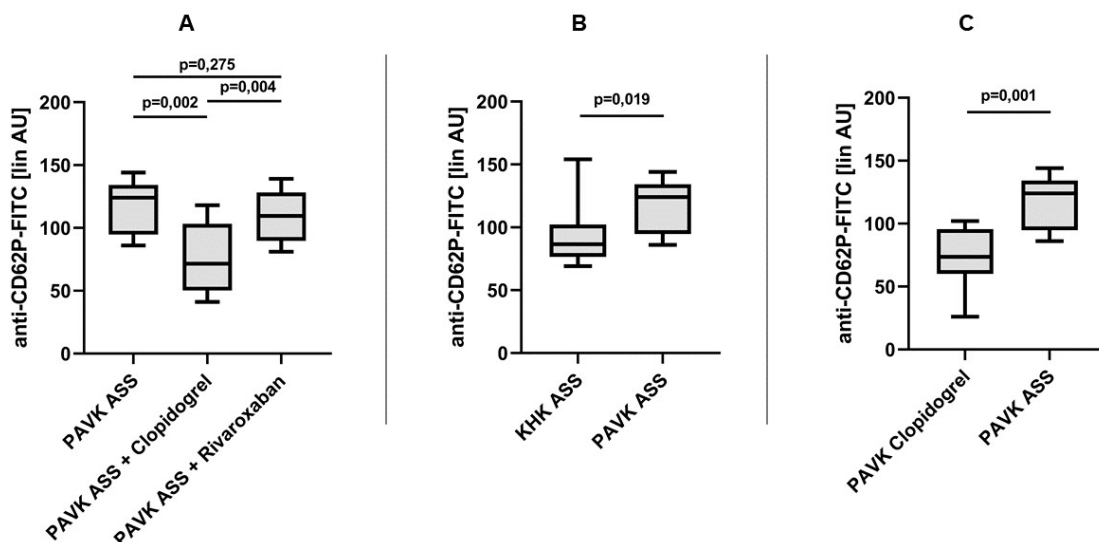


Abbildung 22: CD62P Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin.

Darstellung der thrombozytären Oberflächen-Expression von CD62P in linearen relativen Einheiten der mittleren Fluoreszenzintensität des gebundenen anti-CD62P-FITC-Antikörpers nach Thrombozytenaktivierung mit Thrombin. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die CD62P Oberflächen-Expression innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die CD62P Oberflächen-Expression zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

Convulxin 5 ng/ml

Auch Convulxin-stimulierte Thrombozyten der Studiengruppe unter ASS- und Clopidogreltherapie wiesen eine statistisch relevant verminderte Oberflächen-Expression von CD62P gegenüber der Monotherapie mit ASS ($p=0,010$; Abb. 23: A) und ASS in Kombination mit niedrig dosiertem Rivaroxaban ($p=0,004$; Abb. 23: A) auf. Vergleicht man die Fluoreszenzintensität der Studiengruppe unter singulärer ASS Therapie mit den Kontrollgruppen, so konnte ein statistisch auffällig erhöhter prozentualer Anteil in der PAVK ASS Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe Clopidogrel ($p=0,009$; Abb. 23: C) beobachtet werden. Zudem zeigte sich eine tendenziell erhöhte, aber nicht statistisch relevante, Expression von CD62P bei Studienpatienten mit ASS Einnahme verglichen mit der ASS Einnahme in der Kontrollgruppe KHK ($p=0,052$; Abb. 23: B).

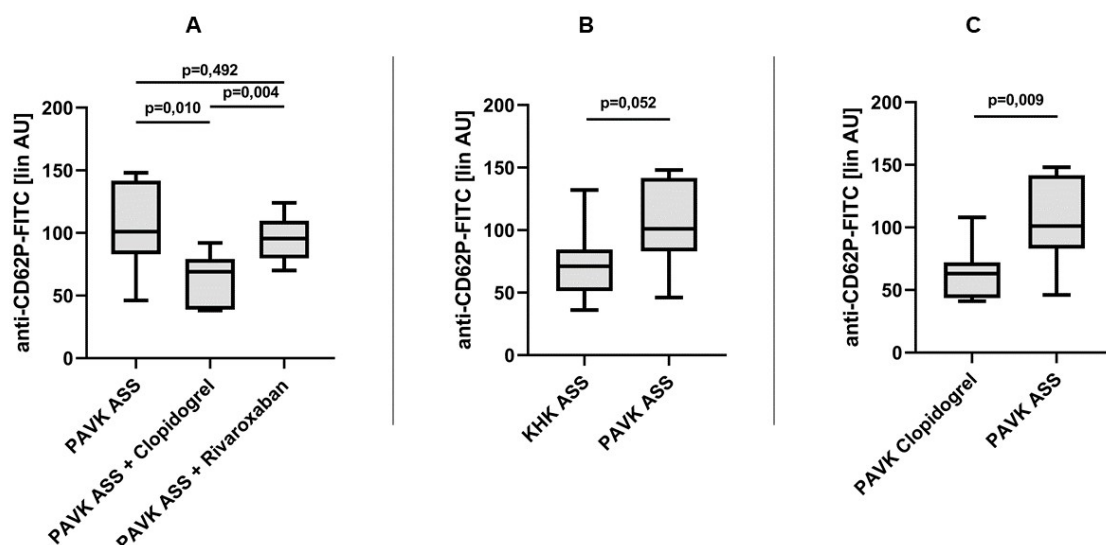


Abbildung 23: CD62P Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 ng/ml Convulxin.

Darstellung der thrombozytären Oberflächen-Expression von CD62P in linearen relativen Einheiten der mittleren Fluoreszenzintensität des gebundenen anti-CD62P-FITC-Antikörpers nach Thrombozytenaktivierung mit Convulxin. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die CD62P Oberflächen-Expression innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die CD62P Oberflächen-Expression zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

Arachidonsäure 1 μ M

Erfolgte eine thrombozytäre Aktivierung mit Arachidonsäure, so zeigten sich weder innerhalb der Studiengruppe (Abb. 24: A) noch im Vergleich mit den beiden Kontrollgruppen (Abb. 24: B und Abb. 24: C) statistisch relevante Auffälligkeiten ($p > 0,05$; Abb. 24: A, B und C).

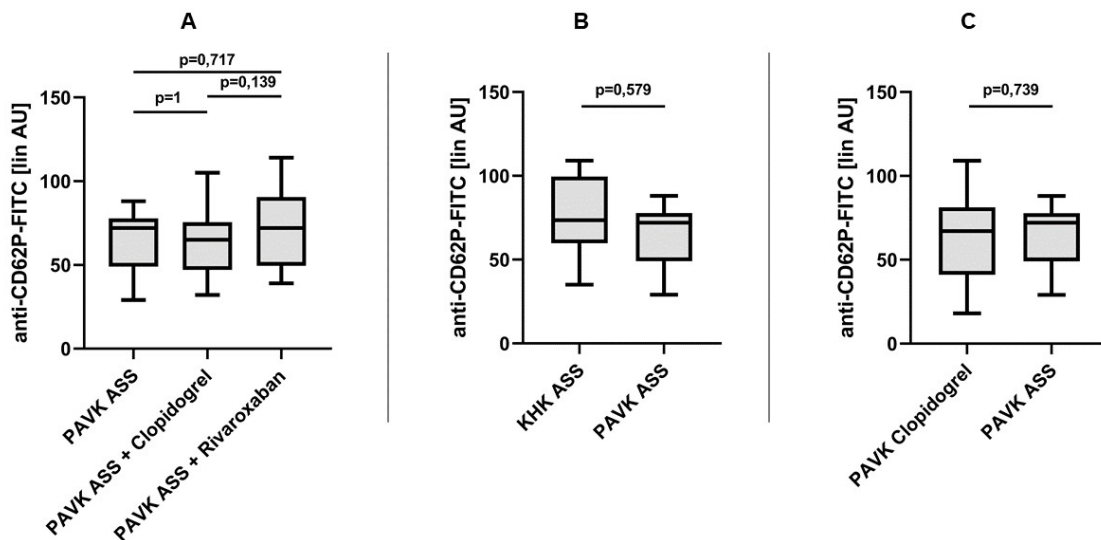


Abbildung 24: CD62P Oberflächen-Expression nach Zugabe von 1 μ M Arachidonsäure.

Darstellung der thrombozytären Oberflächen-Expression von CD62P in linearen relativen Einheiten der mittleren Fluoreszenzintensität des gebundenen anti-CD62P-FITC-Antikörpers nach Thrombozytenaktivierung mit Arachidonsäure. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die CD62P Oberflächen-Expression innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die CD62P Oberflächen-Expression zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

ADP 0,75 μ M

Nach Zugabe von ADP als Aktivierungsreiz wiesen Thrombozyten der Studiengruppe mit ASS + Clopidogrel die niedrigste Expressionsrate von CD62P auf der Thrombozytenoberfläche auf. Sowohl im Vergleich mit der Studiengruppe unter ASS ($p=0,012$; Abb. 25: A) sowie ASS in Kombination mit Rivaroxaban ($p=0,004$; Abb. 25: A) war dieser Unterschied mit statistischer Auffälligkeit. Die Expressionsrate der Studiengruppe war mit ASS verglichen mit der Kontrollgruppe KHK ASS ($p=0,043$; Abb. 25: B) und der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel ($p=0,001$; Abb. 25: C) statistisch auffällig höher.

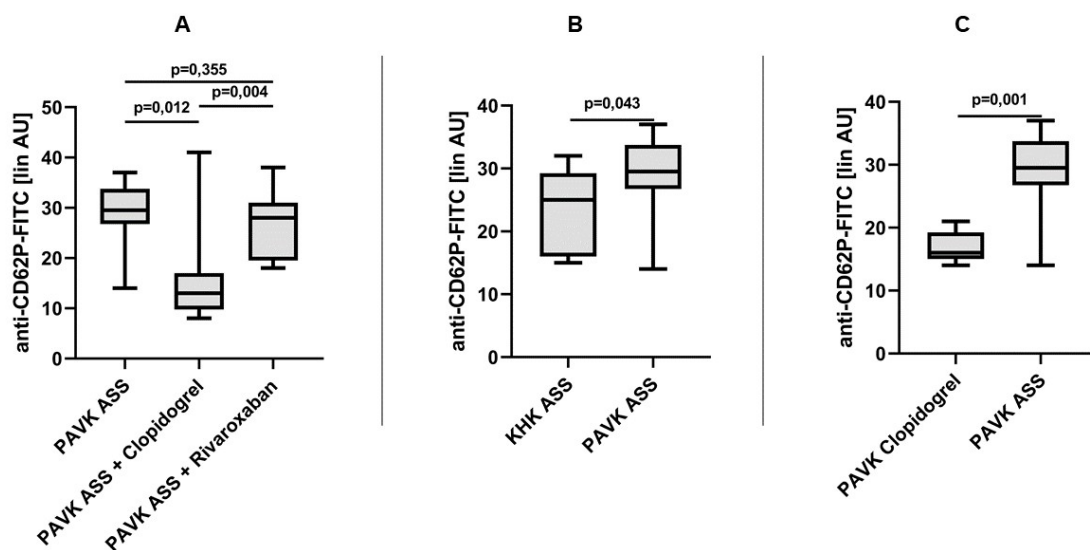


Abbildung 25: CD62P Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,75 μ M ADP.

Darstellung der thrombozytären Oberflächen-Expression von CD62P in linearen relativen Einheiten der mittleren Fluoreszenzintensität des gebundenen anti-CD62P-FITC-Antikörpers nach Thrombozytenaktivierung mit ADP. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die CD62P Oberflächen-Expression innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die CD62P Oberflächen-Expression zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.3.2 Analyse der thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptor-Aktivierung basal und nach Aktivierung mit Thrombozyten-Agonisten

Basal

Im basalen Zustand wiesen Thrombozyten innerhalb der Studiengruppe unter Clopidogrel- und ASS Therapie die niedrigste PAC-1 Expression auf. Dieser Unterschied zeigte sich statistisch auffällig im Vergleich zu den Studienpatienten mit zusätzlicher Rivaroxabantherapie, welche ein deutlich höheres basales PAC-1 Expressionsniveau hatten ($p=0,020$; Abb. 26: A). Nicht auffällig verschieden war jedoch die PAC-1 Bindung an den GPIIb/IIIa Rezeptor der Studiengruppe ASS verglichen mit zusätzlicher Clopidogrel- ($p=0,344$; Abb. 26: A) oder Rivaroxabantherapie ($p=0,445$; Abb. 26: A) sowie im Vergleich mit den beiden Studiengruppen KHK ASS ($p=0,315$; Abb. 26: B) und der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel ($p=0,579$; Abb. 26: C).

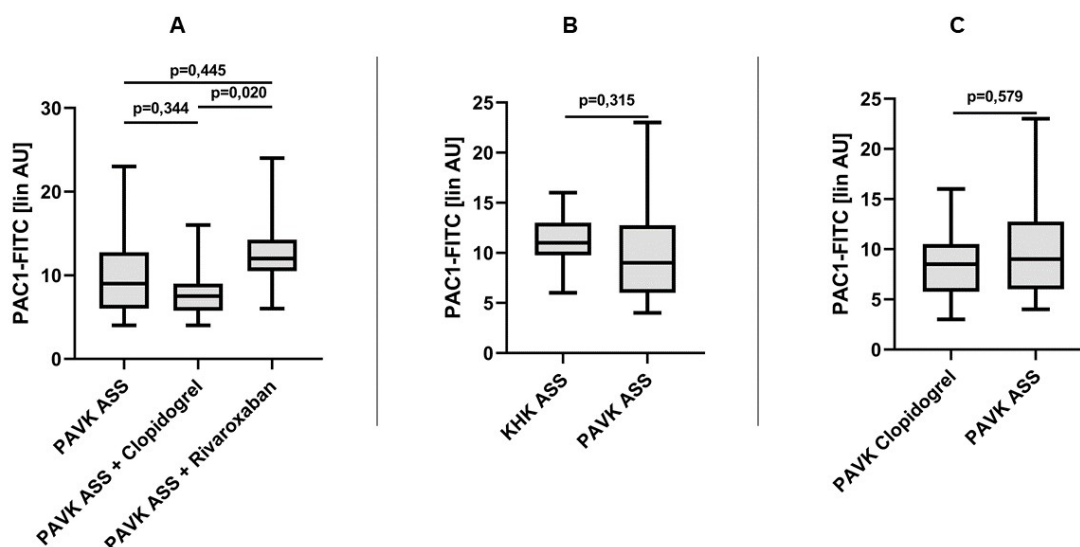


Abbildung 26: Basale Bindung von PAC-1 an GPIIb/IIIa Rezeptor.

Darstellung der basalen Bindung von PAC-1 in lin AU an den GPIIb/IIIa Rezeptor der Thrombozytenoberfläche. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die basale Bindung von PAC-1 innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die basale Bindung von PAC-1 zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

TRAP-6 12,5 μ M

Nach Aktivierung mit TRAP-6 banden Thrombozyten der Studiengruppe unter ASS- und Clopidogreleinnahme mit einer statistischen Auffälligkeit weniger PAC-1 an die Thrombozytenoberfläche assoziiert mit weniger aktivierten GPIIb/IIIa Rezeptoren als Patienten unter ASS Monotherapie ($p=0,010$; Abb. 27: A) sowie bei gleichzeitiger ASS- und Rivaroxabaneinnahme ($p=0,004$; Abb. 27: A). Statistisch nennenswert erwies sich zudem der Vergleich zwischen Studienpatienten unter ASS Monotherapie und der Kontrollgruppe Clopidogrel. Dabei zeigten Thrombozyten der Kontrollgruppe Clopidogrel eine deutlich verminderte PAC-1 Bindung gegenüber der Studiengruppe mit ASS Therapie ($p=0,003$; Abb. 27: C).

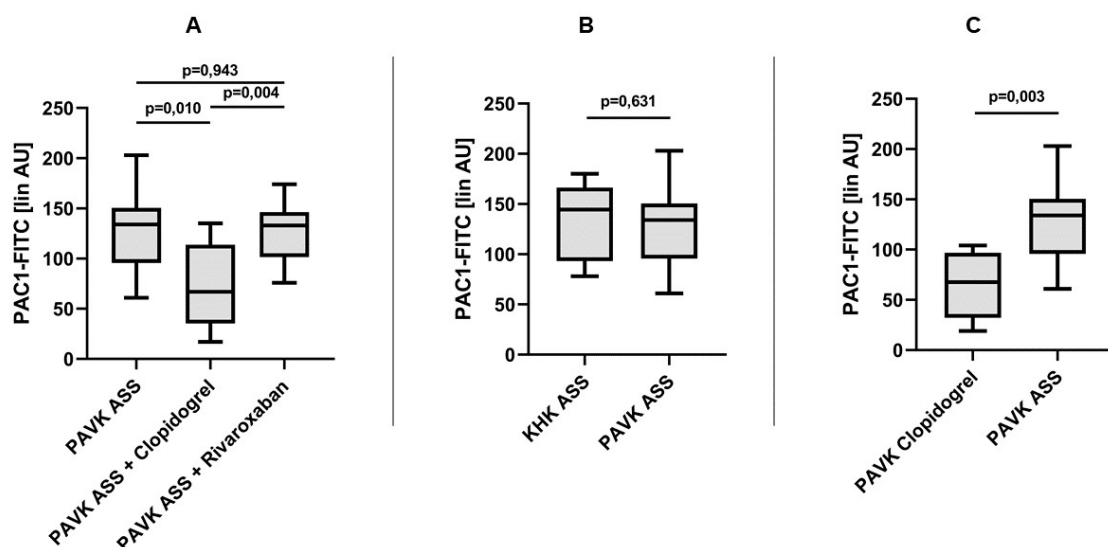


Abbildung 27: PAC-1 Bindung an GPIIb/IIIa Rezeptor nach Zugabe von 12,5 μ M TRAP-6.

Darstellung der Bindung von PAC-1 in lin AU an den GPIIb/IIIa Rezeptor der Thrombozytenoberfläche nach Thrombozytenaktivierung mit TRAP-6. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die PAC-1 Bindung innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die PAC-1 Bindung zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

Thrombin 0,1 U/ml

Mit Thrombin als Aktivierungsreiz der Thrombozyten zeigte sich eine statistisch relevant verminderte Bindung von PAC-1 der Studiengruppe ASS + Clopidogrel verglichen mit dem Therapieregime unter ASS Monotherapie ($p=0,014$; Abb. 28: A) sowie ASS + Rivaroxaban ($p=0,025$; Abb. 28: A). Während Thrombozyten von Studienpatienten mit ASS Einnahme im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen eine höhere PAC-1 Bindungskapazität aufwiesen, war diese jedoch nur im Vergleich mit der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel statistisch auffällig erhöht ($p=0,001$; Abb. 28: C).

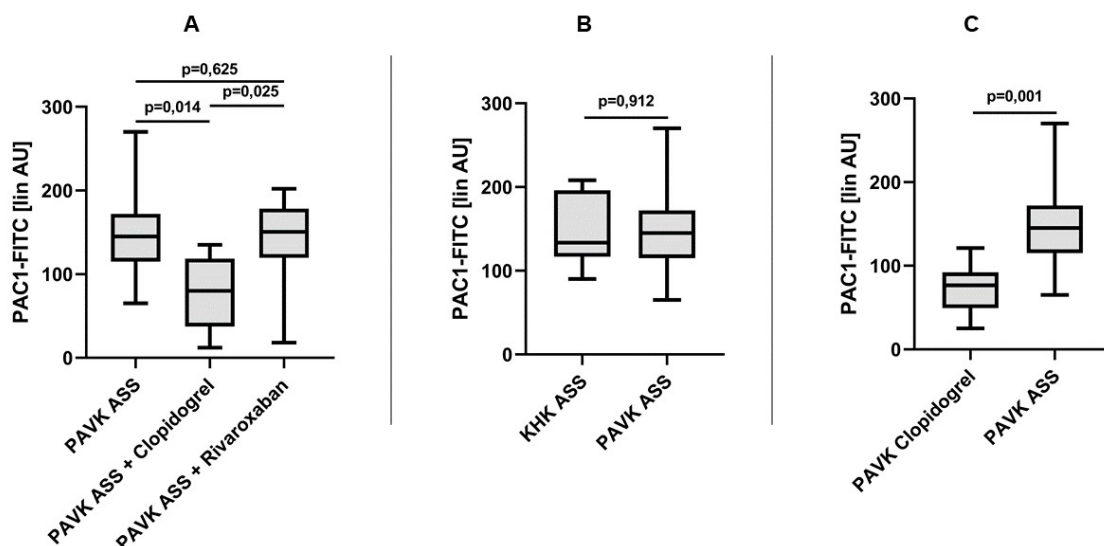


Abbildung 28: PAC-1 Bindung an GPIIb/IIIa Rezeptor nach Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin.

Darstellung der Bindung von PAC-1 in lin AU an den GPIIb/IIIa Rezeptor der Thrombozytenoberfläche nach Thrombozytenaktivierung mit Thrombin. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die PAC-1 Bindung innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die PAC-1 Bindung zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

Convulxin 5 ng/ml

Convulxin-stimulierte Thrombozyten banden innerhalb der Studiengruppe unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel am wenigsten PAC-1 an der Thrombozytenoberfläche (Abb. 29: A). Statistisch relevant war der Unterschied innerhalb des Studienkollektivs jedoch nur im Vergleich mit dem Therapieregime ASS + Rivaroxaban ($p=0,004$; Abb. 29: A). Vergleicht man innerhalb der Studiengruppe die medikamentösen Therapieformen ASS + Clopidogrel mit der singulären ASS Therapie, so wiesen Thrombozyten unter ASS Monotherapie eine Tendenz zur vermehrten Bindung von PAC-1 auf ($p=0,123$; Abb. 29: A). Mit statistischer Auffälligkeit banden jedoch Thrombozyten der Studiengruppe ASS mehr PAC-1 als die Kontrollgruppe PAVK unter singulären Clopidogreltherapie ($p=0,011$; Abb. 29: C).

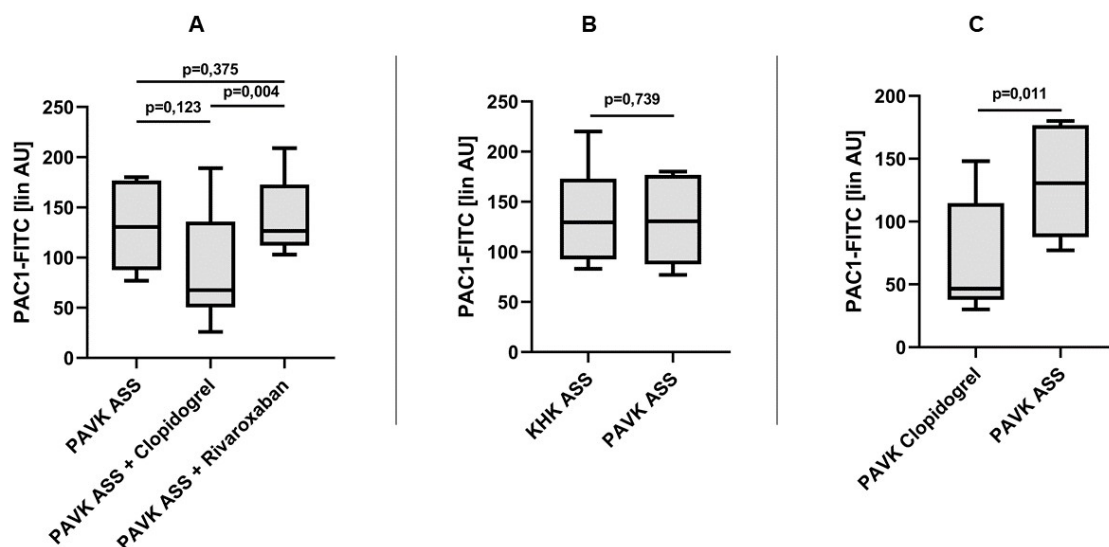


Abbildung 29: PAC-1 Bindung an GPIIb/IIIa Rezeptor nach Zugabe von 5 ng/ml Convulxin.

Darstellung der Bindung von PAC-1 in lin AU an den GPIIb/IIIa Rezeptor der Thrombozytenoberfläche nach Thrombozytenaktivierung mit Convulxin. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die PAC-1 Bindung innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die PAC-1 Bindung zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

Arachidonsäure 1 μ M

Die Verwendung von Arachidonsäure als Triggersubstanz zeigte keine statistische Auffälligkeit innerhalb der Studiengruppe und im Vergleich mit den Kontrollgruppen ($p > 0,05$; Abb. 30: A, B und C). Lediglich der Vergleich zwischen der Studiengruppe mit ASS Einnahme und der Kontrollgruppe mit Clopidogreltherapie zeigte eine tendenziell vermehrte PAC-1 Bindung im Studienarm ($p = 0,075$; Abb. 30: C).

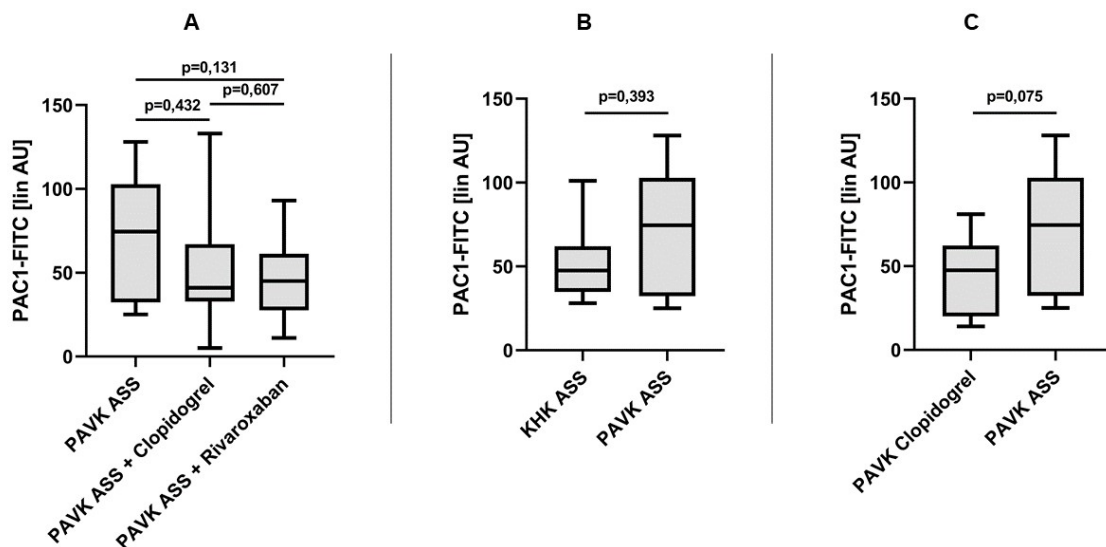


Abbildung 30: PAC-1 Bindung an GPIIb/IIIa Rezeptor nach Zugabe von 1 μ M Arachidonsäure.

Darstellung der Bindung von PAC-1 in lin AU an den GPIIb/IIIa Rezeptor der Thrombozytenoberfläche nach Thrombozytenaktivierung mit Arachidonsäure. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die PAC-1 Bindung innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die PAC-1 Bindung zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

ADP 0,75 μ M

Erfolgte eine thrombozytäre Aktivierung mit ADP, so zeigten Thrombozyten innerhalb des Studienkollektivs die geringste PAC-1 Bindung bei gleichzeitiger ASS- und Clopidogreleinnahme. Im Vergleich mit der Monotherapie ASS ($p=0,004$; Abb. 31: A) und der Kombinationstherapie ASS + Rivaroxaban ($p=0,002$; Abb. 31: A) erwies sich der Unterschied als statistisch relevant. Auch die Thrombozyten der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel zeigten eine deutlich verminderte Bindung von PAC-1 als das Studienkollektiv unter ASS Therapie. Der Unterschied war dabei statistisch auffällig ($p<0,001$; Abb. 31: C).

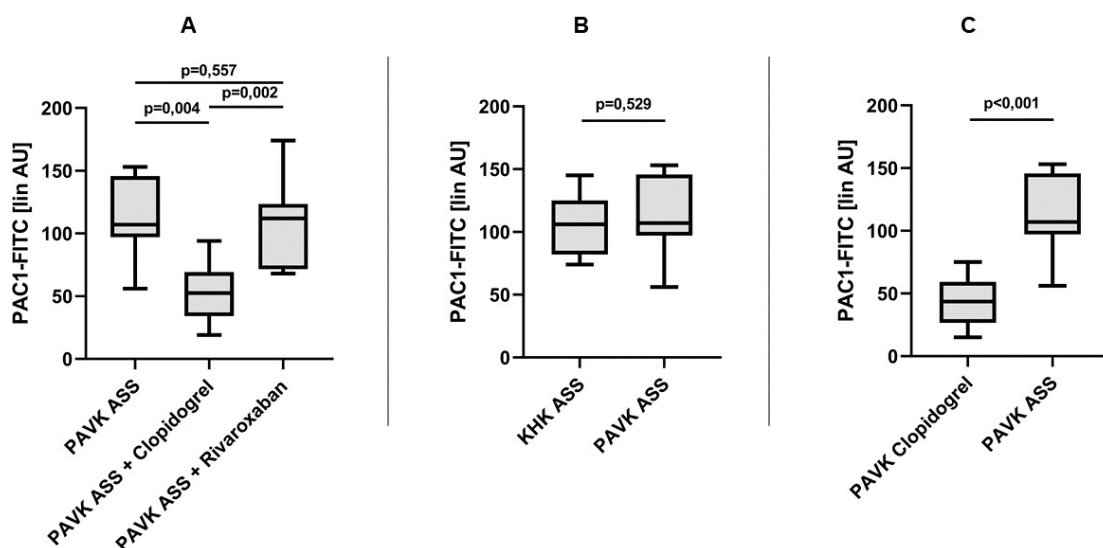


Abbildung 31: PAC-1 Bindung an GPIIb/IIIa Rezeptor nach Zugabe von 0,75 μ M ADP.

Darstellung der Bindung von PAC-1 in lin AU an den GPIIb/IIIa Rezeptor der Thrombozytenoberfläche nach Thrombozytenaktivierung mit ADP. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die PAC-1 Bindung innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die PAC-1 Bindung zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.3.3 Analyse der thrombozytären Mepacrine Aufnahme und Freisetzung aus den δ -Granula

Basal

Im nichtaktivierten Zustand zeigte sich die höchste Mepacrine Aufnahme innerhalb der Studiengruppe unter ASS- und Clopidogreltherapie. Im Vergleich zur Kombinationstherapie ASS + Rivaroxaban war die Aufnahme statistisch auffällig erhöht ($p=0,043$; Abb. 32: A). Verglichen mit den beiden Kontrollgruppen wurde eine in der Tendenz erhöhte Mepacrine Aufnahme im Studienkollektiv unter ASS Monotherapie ermittelt. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch relevant ($p=0,190$; Abb. 32: B und $p=0,315$; Abb. 32: C).

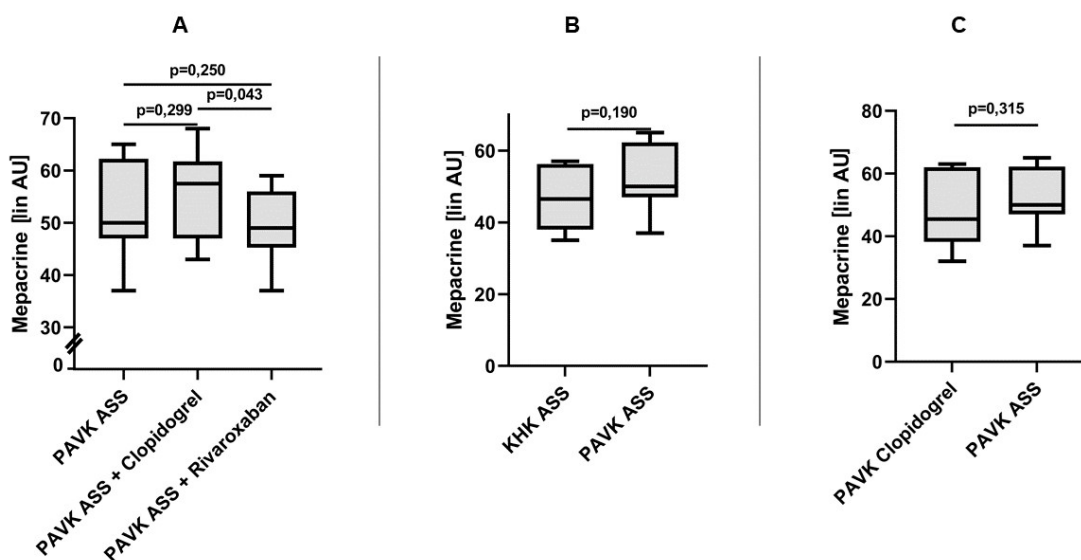


Abbildung 32: Basale Mepacrine Aufnahme in die δ -Granula.

Darstellung der basalen Aufnahme von Mepacrine in lin AU in die δ -Granula der Thrombozyten. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die basale Mepacrine Aufnahme innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die basale Mepacrine Aufnahme zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

Thrombin 0,2 U/ml

Thrombozyten des Studienkollektivs mit ASS- und Clopidogreleinnahme wiesen das höchste Mepacrine-Fluoreszenzniveau nach Stimulation mit Thrombin auf. Statistisch auffällig war dabei der Vergleich innerhalb der Studiengruppe mit der einfachen Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS ($p=0,008$; Abb. 33: A) sowie der Kombinationstherapie ASS und Rivaroxaban ($p=0,002$; Abb. 33: A). Kein hinreichender Unterschied zeigten die Ergebnisse von Studienpatienten mit ASS verglichen mit den Kontrollgruppen KHK ASS ($p=0,393$; Abb. 33: B) und PAVK Clopidogrel ($p=0,105$; Abb. 33: C).

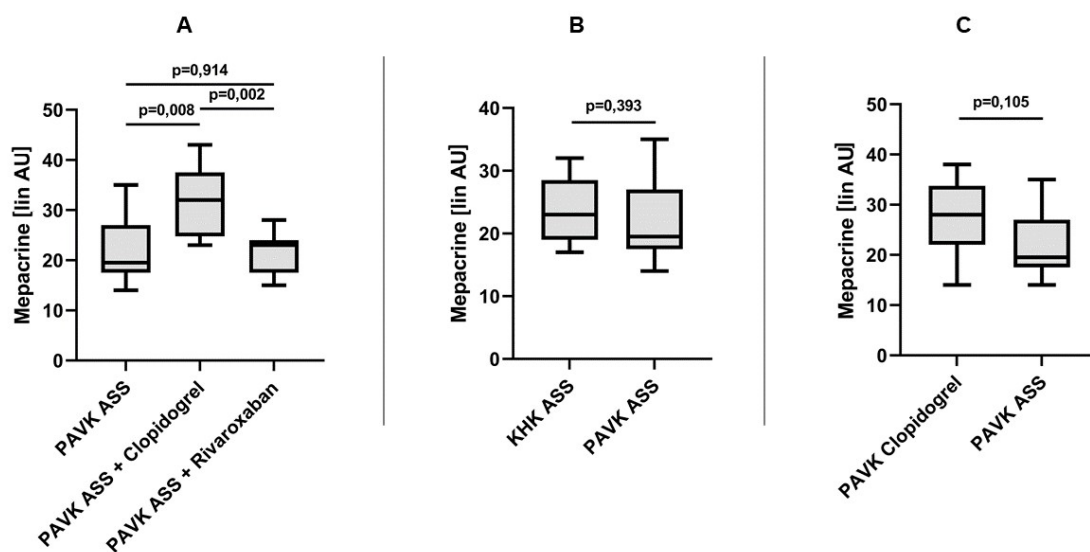


Abbildung 33: Mepacrine Freisetzung aus den δ -Granula nach Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin.

Darstellung der Mepacrine Freisetzung in lin AU aus den δ -Granula der Thrombozyten nach Thrombozytenaktivierung mit Thrombin. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die Mepacrine Freisetzung innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die Mepacrine Freisetzung zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

Convulxin 20 ng/ml

Auch nach Zugabe von Convulxin ließ sich die höchste Mepacrine Fluoreszenz im Studienkollektiv ASS + Clopidogrel erkennen. Der Unterschied zum Therapieregime ASS Monotherapie ($p=0,047$; Abb. 34: A) und ASS in Kombination mit Rivaroxaban ($p=0,002$; Abb. 34: A) erwies sich als statistisch auffällig. Zudem ergaben sich statistisch relevante Auffälligkeiten bei der Freisetzung von Mepacrine aus den dichten Granula beim Vergleich des Studienkollektivs unter ASS mit der Kontrollgruppe PAVK mit Clopidogreleinnahme. Aktivierte Thrombozyten der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel setzten deutlich mehr Mepacrine frei als Studienpatienten unter ASS Therapie ($p=0,023$; Abb. 34: C). Das Fluoreszenzniveau zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS zeigte keine statistische Auffälligkeit ($p=0,315$; Abb. 34: B).

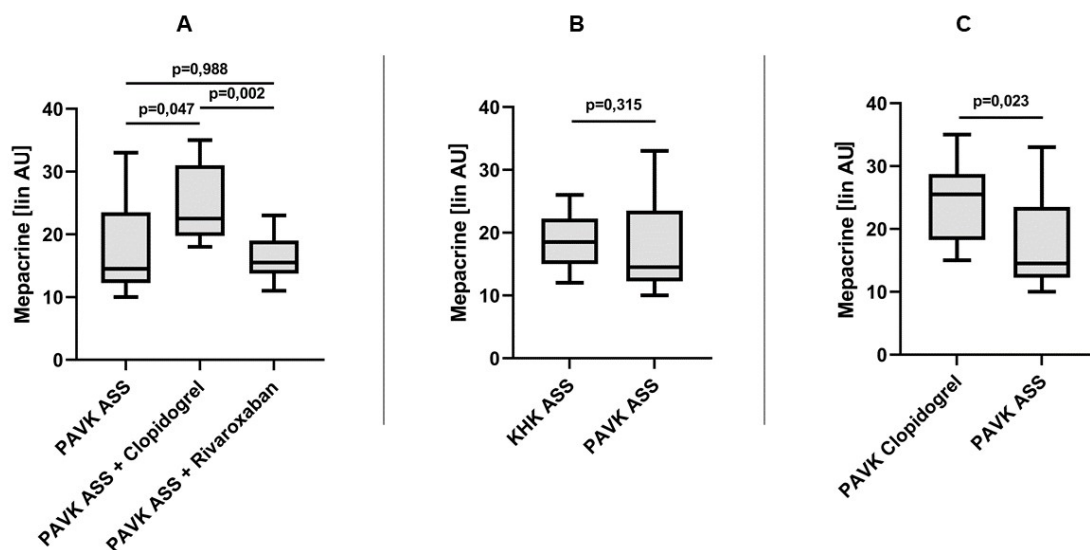


Abbildung 34: Mepacrine Freisetzung aus den δ -Granula nach Zugabe von 20 ng/ml Convulxin.

Darstellung der Mepacrine Freisetzung in lin AU aus den δ -Granula der Thrombozyten nach Thrombozytenaktivierung mit Convulxin. Messung mittels fluoreszierender Durchflusszytometrie unter Verwendung von PRP. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die Mepacrine Freisetzung innerhalb der Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** vergleicht die Mepacrine Freisetzung zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe KHK ASS. **C** bildet den Vergleich der Kontrollgruppe Clopidogrel mit der Studiengruppe ASS ab.

4.3.4 Untersuchung des Thrombozyten-Reaktivitätsindex mittels VASP Phosphorylierung

Zur Evaluation der Clopidogrelwirkung bei PAVK Patienten wurde der PRI mittels VASP/P2Y₁₂ Kit gemessen.

Die Auswertung des Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI) ergab eine statistisch auffällige Verminderung innerhalb der Studiengruppe unter gleichzeitiger ASS- und Clopidogreltherapie (Abb. 35: A). Dies zeigte sich im Vergleich mit der ASS Monotherapie ($p=0,004$; Abb. 35: A) sowie im Vergleich mit der Kombinationstherapie aus ASS und Rivaroxaban ($p=0,004$; Abb. 35: A). Auch der PRI der Kontrollgruppe PAVK mit singulärer Clopidogreleinnahme ließ einen statistisch relevant verminderten PRI gegenüber der Studiengruppe PAVK ASS erkennen ($p<0,001$; Abb. 35: B).

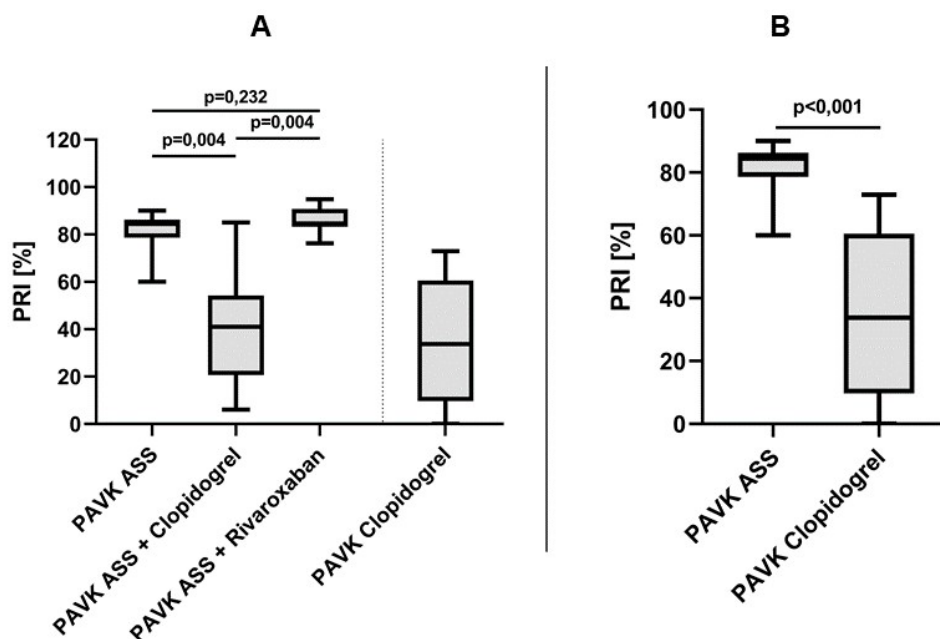


Abbildung 35: Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI) bei Patienten mit KHK bzw. PAVK unter verschiedener medikamentöser Therapie.

Darstellung des PRI in %. Durchführung des VASP Assays mit Zitrat versetztem Gesamtblut sowie Kitkomponenten im Durchflusszytometer. Ein niedriger PRI weist auf eine suffiziente P2Y₁₂ Rezeptorblockade hin. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. Rechts abgetrennt werden die Ergebnisse der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel aufgezeigt. **B** vergleicht den PRI zwischen der Studiengruppe PAVK ASS und der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel.

5. Diskussion

Die antithrombotische Therapie nimmt eine zentrale Rolle in der Therapie der PAVK nach peripherer Intervention sowie zur Sekundärprävention kardiovaskulärer und extremitätenbedingter Ereignisse ein [7]. Diesbezüglich wurden im Rahmen dieser Studie die aktuell klinisch am häufigsten bei PAVK eingesetzten Therapieregime untersucht.

In der Studiengruppe PAVK mit 10 teilnehmenden Probanden fand die erste Blutentnahme am Tag der geplanten PTA vor Intervention unter ASS Monotherapie statt. Nach im Median 34,5 Tagen mit einem Interquartilsabstand von 32,4 bis 37,6 Tagen unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel wurde die zweite Blutentnahme durchgeführt. Die letzte Blutentnahme erfolgte unter ASS in Kombination mit Rivaroxaban in vaskulärer Dosierung mit einer medianen Einnahmedauer von 11,5 Tagen und einem Interquartilsabstand von 8 bis 19,5 Tagen. Bei zwei teilnehmenden Probanden musste die letzte Blutentnahme verschoben werden, da diese versehentlich Rivaroxaban nur einmal täglich statt morgens und abends einnahmen. Ein Studienpatient hatte zwischen der zweiten und dritten Blutentnahme eine koronare Bypassoperation, weswegen die dritte Blutentnahme verlegt wurde. Weder bei der zweiten noch bei der dritten Blutentnahme äußerte ein teilnehmender Proband Blutungskomplikationen. Mit Ausnahme der Bypassoperation waren keine weiteren kardialen oder extremitätenbedingten Ereignisse während der Studie zu verzeichnen. Die Blutentnahmen in den mit jeweils 10 Probanden teilnehmenden Kontrollgruppen KHK und ASS Therapie und PAVK mit Clopidogreleinnahme fand einmalig statt.

5.1 *In vitro* Thrombingenerierungspotential bei Patienten mit PAVK bzw. KHK unter verschiedener antithrombotischer Therapie

Das aktuell gültige Konzept der Hämostase ist das zellbasierte Modell der Blutgerinnung mit drei sich überschneidenden Phasen, welches die Thrombingenerierung auf der Thrombozytenoberfläche beschreibt [96]. Thrombin ist das zentrale Enzym der Hämostase mit pro- sowie antikoagulatorischen Eigenschaften. Bei der Bildung eines Blutgerinnsels bewirkt Thrombin die Konversion von Fibrinogen zu Fibrinmonomere, die sich zu einem Fibrinnetz zusammenlagern

und so zu einem stabilen Thrombus führen. Überdies ist Thrombin einer der potentesten Thrombozytenaktivatoren über PAR-1 und PAR-4. Neben der zentralen Rolle in der Hämostase moduliert Thrombin Prozesse, die mit der Initiierung und Progression von Atherosklerose, wie beispielsweise die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Rekrutierung von Monozyten in atherosklerotische Läsionen, assoziiert sind [90].

Da die *in vitro* TG-Kapazität bei Patienten mit PAVK unter verschiedenen antithrombotischen Therapieregimen unzureichend erforscht ist, wurde im Rahmen dieser Studie mit Hilfe der kalibrierten automatisierten Thrombographie nach Hemker et al. die *in vitro* Thrombinbildungskapazität, das heißt die kinetische Erfassung der Thrombinbildung über die Zeit, gemessen [80, 83]. Diese Methodik ermöglicht die nahezu gesamte Beurteilung des Ablaufs der Hämostase und gibt Auskunft über die Kapazität des Blutes *in vitro* Thrombin zu generieren. Im Gegensatz dazu bilden traditionelle Gerinnungstests wie beispielsweise die Prothrombinzeit nur den Beginn der Blutgerinnung ab [81, 85]. Von besonderem Interesse war dabei der Einfluss von Rivaroxaban in vaskulärer Dosierung zusätzlich zur ASS Therapie auf die *in vitro* TG-Kapazität. Dieser wurde bislang noch nicht bei PAVK Patienten untersucht, obgleich klinische Studien, insbesondere COMPASS und VOYAGER, signifikante Vorteile der zusätzlich niedrig dosierten Rivaroxabantherapie bei vertretbarem Sicherheitsprofil zeigten [14, 73]. Um den Einfluss von Thrombozyten auf die *in vitro* Thrombinbildung und die Wechselwirkung von Thrombozyten mit Gerinnungsfaktoren zu detektieren, wurden die Versuche im PFP sowie im PRP durchgeführt und als Parameter die *Lagtime* [min], das ETP [nm x min] und der *Peak* [nm] erfasst. Da im plättchenarmen Plasma immer noch ein nicht zu vernachlässigender Thrombozytenanteil vorhanden ist, wurde in dieser Studie darauf verzichtet. Als Triggersubstanz kam im PFP TF mit Zugabe von Phospholipiden zum Einsatz, da im PFP durch das Fehlen von Thrombozyten die TG auf Phospholipiden stattfindet. Die TG im PRP wurde durch TF und Thrombin getriggert.

5.1.1 Einfluss von Rivaroxaban auf die *in vitro* Thrombingenerierung

Rivaroxaban ist ein direktes orales Antikoagulans, welches freien sowie im Prothrombinasekomplex auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten gebundenen Faktor Xa selektiv hemmt und dadurch die TG inhibiert [97, 98].

Gerotziafas et al. untersuchten den Einfluss von Rivaroxaban auf die *in vitro* TG im PRP nach TF Aktivierung sowie die indirekte TG durch Messung der Prothrombinfragmente 1 und 2 im Vollblut. Dabei wurde Blut von 16 gesunden Probanden mit Rivaroxaban in unterschiedlicher Konzentration versetzt. Mit steigender Rivaroxabankonzentration und Zugabe von TF kam es konzentrationsabhängig zu einer verlängerten *Lagtime* im PRP und Vollblut. Ferner reduzierte Rivaroxaban den *Peak* als auch das ETP im PRP, wobei eine 3,5-fach höhere Konzentration an Rivaroxaban benötigt wurde um das ETP um 50% zu reduzieren als die *Lagtime* zu verdoppeln. Als mögliche Erklärung nannten die Autoren, dass Rivaroxaban mit größerem Ausmaß die Initiierungs- und Vervielfältigungsphase der TG beeinflusst und weniger die Inaktivierung des entstandenen Thrombins [61]. Daraus lässt sich ableiten, dass in der *ex vivo* TG vorwiegend die Parameter *Lagtime* und *Peak* beeinflusst werden und das ETP weniger von Rivaroxaban verändert wird.

Borst et al. untersuchten den Einfluss von Rivaroxaban in vaskulärer Dosierung zusätzlich zur dualen Thrombozytenaggregationshemmung auf die *in vitro* TG, Thrombusbildung und Thrombozytenaggregation bei Patienten mit Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt. Die erste Blutentnahme erfolgte dabei vor Katheterintervention unter ASS Monotherapie. Nach koronarer Intervention erhielten die Probanden entweder Clopidogrel oder Ticagrelor zusätzlich zur ASS Therapie. Unter diesem Therapieregime wurde am Tag nach Intervention die zweite Blutentnahme durchgeführt. Das Blut wurde mit und ohne Zugabe von 40 ng/ml Rivaroxaban, welches einer in etwa 2,5 mg oraler Rivaroxabaneinnahme entspricht, ausgewertet. Für die dritte Blutentnahme wurde in der Ticagrelor Gruppe die Therapie fortgesetzt, wohingegen Probanden der Clopidogrelgruppe zusätzlich 2,5 mg Rivaroxaban morgens und abends erhielten. Unter diesen antithrombotischen Therapien wurde die letzte Blutentnahme drei Tage nach koronarer Intervention durchgeführt. Mit Blick auf die *in vitro* TG konnte im PPP und PRP sowohl in der Ticagrelorgruppe mit *in vitro* Rivaroxabangabe sowie in der Clopidogrelgruppe mit *in*

vivo und *in vitro* Rivaroxabangabe eine verminderte TG gegenüber der ASS Monotherapie gezeigt werden. Die *Lagtime* und *time to peak* war signifikant verlängert, wohingegen der *Peak* und *velocity index*, das heißt die höchste Rate der Thrombinbildung pro Minute, signifikant vermindert gegenüber der ASS Monotherapie war. Die insgesamt gebildete Thrombinmenge, ausgedrückt durch das ETP, wurde jedoch in der Studie von Borst et al. nicht untersucht [99].

In der vorliegenden von uns durchgeführten Studie konnte im PFP mit TF als Triggersubstanz gezeigt werden, dass bei PAVK Patienten eine zweimal tägliche orale 2,5 mg Rivaroxabantherapie zusätzlich zur ASS Therapie gegenüber einer Monotherapie mit ASS zu einem statistisch auffällig verminderten *Peak* sowie zu einer verlängerter *Lagtime* führt.

Im PRP zeigte sich ebenfalls bei zusätzlicher Rivaroxabaneinnahme gegenüber der singulären ASS Therapie ein signifikant verminderter *Peak* um etwa 49% bei TF als Triggersubstanz sowie im Thrombin getriggertem PRP um etwa 46%. Die *Lagtime* war bei gleichzeitiger ASS- und Rivaroxabaneinnahme im TF getriggerten PRP statistisch auffällig verlängert und im PRP mit Thrombin als Triggersubstanz in der Tendenz verlängert; jedoch ohne statistische Relevanz.

Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die in der Literatur bereits beschriebenen Effekte von Rivaroxaban auf die *ex vivo* TG mit Verlängerung der *Lagtime* und Reduzierung des *Peak*. Zum anderen konnten erstmalig im Rahmen dieser Dissertation diese Effekte im PFP und PRP mit TF und Thrombin als Triggersubstanz bei Patienten mit PAVK und Rivaroxabaneinnahme in vaskulärer Dosierung zusätzlich zur ASS Therapie laborexperimentell nachgewiesen werden.

Auch Graff et al. kamen zu ähnlichen Erkenntnissen in einer Placebo-kontrollierten, randomisierten Studie mit 12 gesunden männlichen Probanden mit einmaliger Rivaroxabaneinnahme von 5 mg bzw. 30 mg. Analog zu den Ergebnissen unserer Studie, bei welcher im PRP mit TF als Triggersubstanz der *Peak* um etwa 49% bei zusätzlicher Rivaroxabantherapie gegenüber der singulären ASS Therapie reduziert wurde, führte die einmalige Rivaroxabaneinnahme von 5 mg nach 2 Stunden zu einer Reduktion des *Peak* um etwa 40%. Keine statistische Auffälligkeit konnte jedoch beim ETP im PRP mit Kollagen als Triggersubstanz zwischen den Probanden mit 5 mg Rivaroxabaneinnahme und der Placebogruppe festgestellt werden, obwohl

unter gleichen Bedingungen der *Peak* unter Rivaroxabaneinnahme signifikant erniedrigt war [100].

Diese Effekte sind ebenfalls in unseren Ergebnissen zu sehen. Im PFP getriggert mit TF führte die zusätzliche Rivaroxabangabe gegenüber der Monotherapie mit ASS zu einem verminderten ETP mit statistischer Auffälligkeit, sodass der Einfluss von Rivaroxaban in vaskulärer Dosierung zusätzlich zur ASS Therapie auf alle drei Parameter der CAT (*Lagtime*, *Peak*, ETP) mit statistischer Auffälligkeit gegenüber der ASS Monotherapie bestätigt wird. Da im PFP durch das Fehlen von Thrombozyten die TG auf Phospholipiden und nicht auf der Thrombozytenoberfläche stattfindet, lässt sich ein möglicher Einfluss von Rivaroxaban auf die Inhibierung der TG auf Phospholipiden ableiten.

Demgegenüber wurden im PRP mit TF oder Thrombin als Triggersubstanz bei Rivaroxabantherapie in vaskulärer Dosierung keine statistisch relevanten Veränderungen im ETP gemessen.

Dies untermauert die Hypothese, dass Rivaroxaban vorwiegend die Initiierungs- und Vervielfältigungsphase der TG beeinflusst und weniger die Inaktivierung des entstandenen Thrombins. Insbesondere bei niedrig dosiertem Rivaroxaban sind deshalb der *Peak* und die *Lagtime* als Parameter der CAT besser geeignet den Effekt von Rivaroxaban im PRP nachzuweisen als das ETP.

5.1.2 Effekte von ASS und Clopidogrel als Monotherapie oder duale Thrombozytenaggregationshemmung auf die *in vitro* Thrombingenerierung

Bratseth et al. untersuchten den Einfluss einer Langzeittherapie mit ASS oder Clopidogrel auf die plasmatische TG an KHK Patienten. Zur Evaluierung der *in vivo* TG wurden die Prothrombinfragmente 1 und 2 sowie die D-Dimer Konzentration bestimmt. Demgegenüber wurde zur Beurteilung der *in vitro* Thrombingenerierungskapazität die CAT im PPP mit TF sowie Phospholipiden durchgeführt. Als Parameter der CAT wurde die *Lagtime*, *Peak*, ETP sowie die *time to peak* bestimmt. Nach einer einjährigen singulären Thrombozytenaggregationshemmung mit Clopidogrel oder ASS konnte in beiden Gruppen eine signifikante Verminderung der TG-Kapazität *in vitro* (ETP) und in der ASS Gruppe zudem *in vivo* TG (ETP, Prothrombinfragmente 1 und 2) festgestellt

werden. Als möglichen Erklärungsansatz für den Effekt von ASS auf die TG nannten die Autoren die antiinflammatorische Wirkung von ASS sowie eine Veränderung der Gerinnungsfaktoren und TF Expression nach Langzeittherapie in experimentellen Studien. Den Einfluss von Clopidogrel auf die TG begründeten die Autoren ebenfalls mit einer Abnahme von TF aufgrund von verminderter TF Freisetzung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten durch Blockierung des ADP Signalwegs. Bei Betrachtung der Subgruppenanalyse der Studie zeigte sich ein erhöhtes ETP bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern sowie eine erhöhte *ex vivo* TG bei Patienten mit Einnahme von ARB und ACE-Hemmern [101].

Bei Patienten mit nicht ST-Hebungs-Myokardinfarkt und Diabetes untersuchten Boussofara et al. den Einfluss einer erhöhten ASS Tagesdosis auf das ETP im PPP. Dazu erhielten die teilnehmenden Probanden nach Koronarangiographie als Aufsättigungsdosis 300 mg Clopidogrel und 250 mg ASS gefolgt von 75 mg Clopidogrel in Kombination mit 100 mg ASS, 160 mg ASS oder zweimal täglich 100 mg ASS pro Tag für 6 Monate. Da Statine die TG beeinflussen, erhielten alle Patienten während der Studie eine Rosuvastatintherapie [102]. Im Median nach 4 Tagen nach der Aufsättigungsdosis und nach 6 Monaten wurde die TG im PPP mit TF als Triggersubstanz analysiert. Bei der zweimal täglichen 100 mg ASS Gruppe konnte gegenüber dem Ausgangswert eine signifikante Verminderung des ETP beobachtet werden, wohingegen bei der 160 mg ASS Gruppe ein niedrigeres ETP ohne statistische Auffälligkeit beobachtet wurde. Ein nicht signifikanter Anstieg des ETP nach 6 Monaten wurde in der 100 mg ASS Gruppe im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet. Die signifikante ETP Verminderung nach zweimal täglicher 100 mg ASS Einnahme begründeten die Autoren mit einem möglicherweise bei Diabetes Patienten vorliegenden erhöhtem Thrombozytenumsatz. Als möglichen Erklärungsansatz für die Verminderung der TG führten die Autoren neben der Wirkung als irreversibler COX-1 Hemmer mit Hemmung der TXA₂-Synthese mehrere hypothetische antikoagulatorische Wirkmechanismen von ASS auf, insbesondere die Acetylierung von Prothrombin *in vivo* [102].

Analog zu Boussofara et al. wählten wir als Einschlusskriterium für Studienteilnahme lediglich Patienten unter Statintherapie, da mehrere Studien die Beeinflussung von Statinen auf die TG zeigten [103-105]. Einflussparameter auf die TG wie beispielsweise Rauchen oder die Einnahme von ACE-Hemmern und ARB waren jedoch nicht Schwerpunkt unserer Untersuchungen und es bedarf weiterer Studien,

die mögliche Einflussfaktoren auf die TG-Kapazität *in vitro* bei PAVK Patienten untersuchen.

In unserer Studie konnten wir im PFP mit TF als Triggersubstanz keine Unterschiede mit statistischer Auffälligkeit bei der Thrombingenerierungskapazität *in vitro* zwischen Patienten mit PAVK und ASS Therapie, PAVK und Clopidogreltherapie sowie KHK und singulärer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS feststellen.

Zudem konnten wir im TF oder Thrombin getriggertem PRP keine statistisch auffälligen Unterschiede bei der Thrombingenerierungskapazität *in vitro* zwischen Patienten mit PAVK und ASS Therapie, PAVK und Clopidogreltherapie sowie KHK und singulärer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS feststellen. Lediglich die *Lagtime*, gemessen im PRP mit TF als Triggersubstanz, war bei KHK mit ASS Therapie gegenüber PAVK Patienten mit ASS Therapie statistisch auffällig verlängert.

Ob die verkürzte *Lagtime* bei Patienten mit PAVK gegenüber KHK auf Grundlage einer weiter fortgeschrittenen Atherosklerose mit erhöhter prokoagulatorischer Tendenz oder zufällig entstanden ist, kann im Rahmen dieser Studie nicht beantwortet werden. Mit Ausnahme der Studiengruppe PAVK erfolgte jedoch die Blutabnahme der Kontrollgruppen PAVK Clopidogrel und KHK ASS nur einmalig. Die Langzeittherapie von ASS oder Clopidogrel auf die TG wurde – anders als in der Studie von Bratseth et al. - nach 6 Monaten nicht nochmals evaluiert. Zusätzlich zur TG-Kapazität *in vitro* mittels CAT wurde in unserer Studie eine durchflusszytometrische Thrombozytenfunktionsanalyse durchgeführt. Diese wird im Kapitel 5.2 näher dargestellt, in dem auch die Unterschiede der singulären Thrombozytenaggregationshemmung bei PAVK und KHK aufgezeigt werden.

An 54 Patienten mit KHK und elektiver Koronarintervention mit Stenting wurde die TG im PPP und PRP unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung evaluiert. Dafür erhielten die Probanden nach Intervention für 6 Monate 75 mg oder 100 mg ASS in Kombination mit 75 mg Clopidogrel täglich. Als Kontrollgruppe dienten 40 dem Alter und Geschlecht der Studiengruppe entsprechende Probanden ohne klinischen Hinweis auf KHK sowie ohne Einnahme von antithrombotischer Medikation. Berezovskaya et al. stellten fest, dass die duale Thrombozytenaggregationshemmung gegenüber der Kontrollgruppe zu einem signifikant vermindertem ETP und *Peak* sowie zu einer signifikant verlängerten *time*

to peak im PRP führt. Die *Lagtime* im PRP sowie die TG im PPP zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe [106].

In unseren Ergebnissen zeigten sich im TF getriggerten PFP - wie erwartet bei fehlenden Thrombozyten im PFP Reagenz - keine statistisch relevanten Unterschiede bei der dualen Thrombozytenaggregationshemmung im Vergleich zur singulären Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS bei PAVK Patienten.

Im PRP mit TF sowie Thrombin als Triggersubstanz führte die zusätzliche Gabe von täglich 75 mg Clopidogrel zusätzlich zur 100 mg ASS Therapie bei PAVK Patienten nach PTA und Stenting zu einem statistisch nennenswert verminderten *Peak* als die Monotherapie mit ASS vor PTA. Berezovskaya et al. begründeten dies damit, dass durch die verminderte Thrombozytenaktivierung bei dualer Thrombozytenaggregationshemmung weniger negativ geladene Phospholipide auf der Thrombozytenoberfläche und möglicherweise eine reduzierte Geschwindigkeit der Translokation von Phospholipiden an die Thrombozytenoberfläche für die TG auf der Thrombozytenoberfläche vorherrschen [106]. Obgleich die CAT keine spezifischen Mechanismen der Thrombozytenaggregationshemmung beurteilt, lässt sich ableiten, dass die duale Thrombozytenaggregationshemmung zu einer verminderten Thrombozytenaktivität führt mit resultierendem vermindertem Thrombin *Peak* im PRP. Im Unterschied zu der zitierten Studie von Berezovskaya et al. sollte jedoch hinzugefügt werden, dass die duale Thrombozytenaggregationshemmung in unserer Studie mit PAVK Patienten vor PTA unter ASS Monotherapie verglichen wurde und nicht mit gesunden Probanden ohne antithrombotische Therapie.

5.1.3 Assoziation zwischen Thrombingenerierung und thrombotischen Ereignissen

Bei der Frage nach dem Zusammenhang zwischen TG und thrombotischen Ereignissen muss einerseits zwischen TG *in vivo* und *in vitro* unterschieden werden und andererseits venöse Thrombosen von atherothrombotischen Ereignissen differenziert werden. Die *in vivo* TG beschreibt dabei die im Körper ablaufende TG und wird unter anderem durch Messung der Prothrombinfragmente 1 und 2 sowie der Thrombin-Antithrombin Komplexe bestimmt. Demgegenüber gibt die *in vitro* TG Auskunft über die Kapazität des Plasmas mit und ohne Thrombozyten nach Zugabe von Triggersubstanzen Thrombin zu generieren [107].

In unserer Studie wurde ausschließlich die *in vitro* TG-Kapazität als primärer Endpunkt bestimmt. Klinische Ereignisse wurden dokumentiert, waren aber nicht Schwerpunkt der Auswertung, sodass im Rahmen dieser Studie keine Aussagen über die Assoziation zwischen *in vitro* TG und atherothrombotischen Ereignissen getroffen werden kann. Um signifikante Erkenntnisse bei klinischen Endpunkten wie beispielsweise Blutungen oder kardiovaskuläre Ereignisse zu erlangen, bedarf es Studien mit einer größeren Patientenzahl als der von uns durchgeführten Studie mit 30 teilnehmenden Patienten. In zahlreichen pro- sowie retrospektiven Studien konnte der Zusammenhang zwischen TG und dem Auftreten von venösen Thrombosen aufgezeigt werden [81].

So zeigte beispielsweise eine Studie an Patienten mit zugrundeliegender Tumorerkrankung, dass ein erhöhter *Peak* mit einer signifikant erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Thrombose einhergeht [108]. Mit Blick auf atherothrombotische Ereignisse auf Grundlage von Atherosklerose ist die Datenlage jedoch uneindeutig und es bedarf einer differenzierteren Betrachtung [107]. An 108 Patienten mit symptomatischer PAVK und PTA mit Stenting untersuchten Gremmel et al. den Zusammenhang zwischen *in vitro* TG im PPP mit TF als Trigger und kardiovaskulären Ereignissen. Am Tag nach Katheterintervention wurde den teilnehmenden Probanden Blut unter ASS- und Clopidogreleinnahme abgenommen und klinische Ereignisse nach 1 und 2 Jahren dokumentiert. Dabei fanden sie einen inversen Zusammenhang zwischen dem Thrombin *Peak* und dem kombinierten Endpunkt bestehend aus Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall, transitorischer ischämischer Attacke und kardiovaskulärem Tod. Diesen inversen Zusammenhang begründeten die Autoren damit, dass möglicherweise eine vermehrte *in vivo* ablaufende TG zu Erschöpfung und verminderten Thrombingenerierungspotential *in vitro* führt [109]. Demgegenüber konnten Loeffen et al. einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem im PPP gemessenen *Peak* sowie der Faktor XIa Konzentration und dem erneuten Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom feststellen. Im akuten Stadium zeigten Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ST-Hebungsinfarkt, Nicht-ST-Hebungsinfarkt, instabile Angina pectoris) gegenüber dem Kontrollkollektiv ohne akutem Koronarsyndrom eine prothrombotische Tendenz mit erhöhter TG-Kapazität *in vitro* im PPP mit TF als Trigger, das heißt signifikant kürzere *time to peak* sowie höherer *velocity index* und *Peak*, und erhöhter Plasmakonzentration von Faktor XIa sowie D-Dimeren. Nach 1 und 6 Monaten wurde nach der ersten Blutentnahme, welche vor

Katheterintervention und Heparinabgabe durchgeführt wurde, erneut Blut abgenommen und kardiovaskuläre Ereignisse notiert. Im *Follow up* wurde eine verminderte TG, insbesondere *Peak* und ETP, gegenüber dem Ersteinschluss gemessen. Die Faktor XIa Konzentration in den Folgeuntersuchungen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den Messungen im akuten Ereignis [110].

Zum jetzigen Zeitpunkt ist es schwierig zu beurteilen, was die genaue Aussagekraft vermehrter bzw. verminderter TG ist. Für ein tieferes Verständnis der Mechanismen der TG bei der Hämostase, Inflammation und im Zusammenhang mit atherothrombotischen Ereignissen bedarf es noch weiterer prospektiver multizentrischer Studien an großen Populationen. Die CAT ermöglicht die Evaluierung der antithrombotischen Therapie, insbesondere die Kombinationstherapie von Thrombozytenaggregationshemmern mit Antikoagulantien bei Patienten mit Arteriosklerose unter prothrombotischen Verhältnissen, da im PRP das Zusammenspiel zwischen Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten analysiert werden kann. Dieses Verfahren bietet in Zukunft die Möglichkeit einer personalisierten antithrombotischen Therapie bei Patienten mit Indikation zur Antikoagulation und / oder Thrombozytenaggregationshemmung [111]. Um die Vergleichbarkeit der Studien jedoch zu gewährleisten, benötigt es international einheitlicher präanalytischer und analytischer Standards der Messung der TG.

5.2 Vergleich der Thrombozytenfunktion von Patienten mit PAVK bzw. KHK unter verschiedener antithrombotischer Therapie

Zusätzlich zur Messung der Thrombingenerierung im CAT erfolgte eine durchflusszytometrische Funktionsanalyse der Thrombozyten. Ziel war es, die Thrombozytenfunktion von PAVK Patienten und KHK Patienten unter den klinisch relevantesten antithrombotischen Therapieregimen zu untersuchen. Die Durchflusszytometrie ermöglicht dabei die Analyse der primären Hämostase auf zellulärer Ebene durch Einsatz fluoreszierender Antikörper bzw. fluoreszierender Marker. Da im Rahmen der primären Hämostase verschiedene Signalwege zur Thrombozytenaktivierung mit resultierender Thrombozytenaggregation führen, wurde in unserer Studie die Thrombozytenfunktion anhand verschiedener Thrombozytenaktivierungsmarker basal *ex vivo* sowie die Thrombozyten-Reaktivität

in vitro nach Zugabe verschiedener Agonisten untersucht [43]. Der *ex vivo* Aktivierungszustand bildet den Aktivierungszustand der Thrombozyten im Patienten ab, wohingegen die *in vitro* Thrombozyten-Reaktivität das laborexperimentell gemessene Aktivierungspotential der Thrombozyten beschreibt. Als Marker für die α -Granula Freisetzung wurde die Oberflächenexpression von CD62P gemessen; im Mepacrine-Assay wurde die Funktion der δ -Granula beurteilt. Überdies wurde die Aktivität des GPIIb/IIIa Rezeptors, welcher über Ausbildung von Fibrinogenbrücken Thrombozyten untereinander vernetzt, anhand der PAC-1 Antikörperbindung beurteilt [89]. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgte für die Detektion der Oberflächenexpression von CD62P und PAC-1 über TRAP-6, Thrombin, Convulxin, Arachidonsäure und ADP. Für den Mepacrine-Assay wurden die Thrombozyten mit Thrombin und Convulxin aktiviert (vgl. Kapitel 3.2.8).

5.2.1 Einfluss von Rivaroxaban auf die Thrombozytenfunktion

Thrombin ist neben seiner maßgeblichen Beteiligung an der plasmatischen Gerinnung zudem ein potenter Thrombozytenaktivator über PAR-1 und PAR-4 [20]. Rivaroxaban inhibiert Faktor Xa und führt zu einer verminderten Thrombinbildung, welche indirekt zu einer verminderten Thrombozytenaktivierung führt [52]. Ob Rivaroxaban jedoch weitere Effekte auf die Thrombozytenfunktion hat, ist nicht abschließend geklärt.

In unserer Studie wurde deshalb die Thrombozytenfunktion einer zusätzlichen Rivaroxabantherapie in vaskulärer Dosierung zur ASS Therapie gegenüber der Monotherapie mit ASS bei PAVK Patienten untersucht. Der *ex vivo* Aktivierungsstatus (CD62P, PAC-1, Mepacrine Aufnahme) der Thrombozyten unter Rivaroxaban in Kombination mit ASS zeigte keine Unterschiede mit statistischer Auffälligkeit gegenüber der ASS Monotherapie. Dies bedeutet, dass die in der Blutzirkulation der Patienten vorhandenen Thrombozyten durch eine zusätzliche Rivaroxabaneinnahme keine veränderte Voraktivität der Thrombozyten gegenüber der singulären ASS Therapie zeigten. Mit Blick auf das *in vitro* Aktivierungspotential konnte eine statistisch auffällig verminderte Expression von CD62P und PAC-1 nach Thrombozytenaktivierung mit TRAP-6 (CD62P 12,5 μ M; PAC-1 6,5 μ M) unter ASS- und Rivaroxabaneinnahme im Vergleich zur singulären ASS Einnahme festgestellt werden.

TRAP-6 ist ein spezifischer Agonist, der Thrombozyten über den G Protein gekoppelten PAR-1 Thrombinrezeptor aktiviert [89]. Nehaj et al. konnten analog zu den Ergebnissen unserer Studie eine verminderte TRAP-induzierte Thrombozytenaktivierung unter Faktor Xa Inhibitoren feststellen. 41 Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern unter Apixaban- oder Rivaroxabantherapie zeigten 2 Stunden nach Medikamenteneinnahme in der Lichttransmissionsaggregometrie eine signifikant verminderte Thrombozytenaggregation [112]. Die Gruppe um Petzold et al. kamen bei Patienten mit Vorhofflimmern zu ähnlichen Ergebnissen. Sie konnten aufzeigen, dass Faktor Xa direkt über PAR-1 die Thrombozytenaktivierung unabhängig von Thrombin triggert. Faktor Xa spaltet dabei ähnlich zu Thrombin den PAR-1 Rezeptor, woraufhin ein Phosphatidylinositol-3-Kinase- und Phospholipase C-abhängiger Signalweg zur Thrombozytenaggregation führt. Rivaroxaban inhibiert dadurch direkt die Thrombozytenaktivierung über PAR-1 durch Faktor Xa Inhibierung. Um zu unterscheiden, ob der Rivaroxaban Effekt thrombozyten- oder plasmaabhängig ist, führten Petzold et al. die Versuche mit Rivaroxaban inkubierten Thrombozyten in Rivaroxaban naivem Plasma durch. Es zeigte sich eine Thrombozytenreaktion, die mit Kontrollpatienten ohne Rivaroxabaneinnahme vergleichbar ist. Auf Grundlage dessen postulierten die Autoren, dass Rivaroxaban plasmaabhängig über Inhibierung von Faktor Xa zu einer verminderten Thrombozytenaktivierung führt und Rivaroxaban nicht direkt an Thrombozyten bindet. Ferner fanden sie heraus, dass der Effekt von Rivaroxaban dosisabhängig ist, jedoch bei einmaliger Rivaroxabaneinnahme in niedriger Dosierung abgeschwächt (verminderte P-Selektin Expression) noch vorhanden ist. Andere Faktor Xa Inhibitoren (Apixaban und Otamixaban) zeigten in der Studie ähnliche Effekte auf die Thrombozytenfunktion wie Rivaroxaban. Diesbezüglich ist davon auszugehen, dass der Einfluss auf die Thrombozytenfunktion eher ein Gruppeneffekt von Faktor Xa Inhibitoren als ein Substanzeffekt von Rivaroxaban ist [113].

An einer kleinen Studie mit 8 teilnehmenden Probanden unter Rivaroxabantherapie wurde eine erhöhte TXA₂ Konzentration im Plasma gegenüber gesunden Probanden und Patienten unter Warfarintherapie, ein Vitamin K Antagonist, festgestellt [114]. TXA₂ wird aus Arachidonsäure über die Phospholipase A₂ und COX-1 metabolisiert und bewirkt eine verstärkte Thrombozytenaktivierung. Obgleich die Studie lediglich an 8 Patienten durchgeführt wurde, könnte Rivaroxaban möglicherweise die Thrombozytenaktivierung *in vivo* durch vermehrte TXA₂ Bildung und Freisetzung

erhöhen. ASS inhibiert irreversibel die COX-1 und dadurch die TXA₂ Synthese in Thrombozyten [52, 53]. Dies könnte ein möglicher Erklärungsansatz sein für die Überlegenheit einer zusätzlichen ASS Gabe zu einer niedrig dosierten Rivaroxabantherapie in der Prophylaxe atherothrombotischer Ereignisse [14].

Unsere Ergebnisse zeigten, wie erwartet bei COX-1 Hemmung durch ASS Einnahme, keine Unterschiede in der Expression der Thrombozytenaktivierungsparameter (CD62P und PAC-1) durch Arachidonsäure bei zusätzlicher Gabe von Rivaroxaban zur ASS Therapie gegenüber der Monotherapie mit ASS. Zukünftige Studien an großen Populationen müssen den Zusammenhang zwischen Rivaroxabaneinnahme und möglicherweise erhöhter TXA₂ Synthese klären.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Einnahmedauer von Faktor Xa Inhibitoren möglicherweise die Thrombozytenfunktion beeinflussen kann. Sokol et al. konnten an 34 Patienten mit Vorhofflimmern unter Antikoagulation mit Rivaroxaban oder Apixaban eine signifikant verminderte Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation 2 Stunden nach Medikamenteneinnahme feststellen. Interessanterweise konnte der Effekt jedoch erst ab einer Einnahmedauer der Faktor Xa Inhibitoren von über 7 Tagen beobachtet werden. Als Ursache nannten die Autoren eine möglicherweise veränderte Expression von PAR-1 und PAR-4 Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche [62]. Eine erhöhte Dichte an PAR-1 auf der Thrombozytenoberfläche konnte unter Dabigatrantherapie, ein direkter Thrombinhemmer, festgestellt werden [115].

Die mediane Einnahmedauer von 2,5 mg Rivaroxaban morgens und abends zusätzlich zu 100 mg ASS lag in dieser Studie bei 11,5 Tagen, sodass eine suffiziente Rivaroxabanwirkung für die durchgeführten Versuche vorausgesetzt werden kann. Vor Versuchsbeginn wurden unter jedem Therapieregime die Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche quantifiziert. Rivaroxaban in Kombination mit ASS zeigte gegenüber der Monotherapie mit ASS keine statistisch relevanten Unterschiede bei der Expression der Thrombozyten Hauptrezeptoren GPIIb/IIIa (P2), GPIb (SZ2), CD42a (Beb1), CD29 (K20), CD41 (SZ22), CD61 (RUU-PL 7F12), CD36 (FA6.162), GPVI (HY101) und CD36 (185 1G2) (vgl. Kapitel 4.3.2).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Arbeit der von Petzold et al. beschriebene Effekt einer verminderten Thrombozytenreaktivität nach TRAP-6

Stimulierung bei PAVK Patienten unter niedrig dosierter 2,5 mg Rivaroxabantherapie verifiziert werden konnte. Angemerkt werden sollte jedoch, dass in unserer Studie lediglich bei einer Thrombozytenaktivierung mit TRAP-6 in zwei Konzentrationen (CD62P 12,5 μ M und PAC-1 6,5 μ M) statistisch relevant verminderte Thrombozytenaktivierungsmarker zeigten. Bei einer Thrombozytenaktivierung mit Thrombin, Convulxin, Arachidonsäure und ADP wurden keine statistisch auffälligen Veränderungen einer zusätzlichen Rivaroxabangabe zur ASS Therapie beobachtet. Ferner sind die Ergebnisse von Patienten mit Vorhofflimmern nur bedingt auf PAVK Patienten übertragbar, da in Studien gezeigt werden konnte, dass sich die Thrombozytenfunktion von Patienten mit Vorhofflimmern deutlich von anderen Patientengruppen unterscheidet [116]. Die Datenlage von Rivaroxaban in Bezug auf die Thrombozytenfunktion ist zudem uneindeutig, da in einigen Studien kein signifikanter Effekt von Rivaroxaban auf die Thrombozytenfunktion mit und ohne zusätzlicher Thrombozytenggregationshemmung nachweisbar war [117, 118]. Es bedarf weiterführender Studien an großen Probandenzahlen, die den Effekt von Rivaroxaban in Patienten mit Vorhofflimmern bei PAVK Patienten evaluieren.

5.2.2 Effekte von ASS und Clopidogrel als Monotherapie oder duale Thrombozytenaggregationshemmung auf die Thrombozytenfunktion

PAVK Patienten haben ein deutlich erhöhtes kardiovaskuläres Risiko im Vergleich zu Patienten mit koronarer Herzerkrankung, obgleich die Ursache beider Erkrankungen die Atherosklerose ist [18, 19]. Zahlreiche Studien zeigen, dass möglicherweise PAVK Patienten inadäquat auf Thrombozytenaggregationshemmer ansprechen und eine erhöhte Thrombozytenreaktivität in Patienten mit PAVK vorherrscht [16, 119, 120].

Diesbezüglich untersuchten wir die Thrombozytenfunktion von PAVK und KHK Patienten unter einmal täglicher 100 mg ASS Einnahme. Es wurde darauf geachtet, dass Patienten mit KHK keine weitere Manifestation von Atherosklerose an anderen Gefäßprovinzen aufwiesen. Ohne Zugabe von Thrombozytenagonisten wurden keine statistisch auffälligen Unterschiede im basalen *ex vivo* Zustand der Thrombozyten festgestellt. Nach Zugabe der Agonisten zeigte sich, weitestgehend unabhängig vom Thrombozyten-Agonist, eine erhöhte Expression von CD62P und PAC-1 sowie eine

vermehrte Mepacrine Freisetzung. Statistisch auffällig erhöht war die Expression von CD62P bei Thrombozytenaktivierung mit Thrombin sowie mit ADP bei PAVK Patienten gegenüber der KHK Gruppe. Dies spricht dafür, dass Thrombozyten von PAVK Patienten gegenüber KHK Patienten eine erhöhte Thrombozytenreagibilität aufweisen. Um die COX-1 Inhibition, welche durch ASS Einnahme gehemmt wird, zu evaluieren, wählten wir Arachidonsäure als Agonisten. Wir konnten keine statistisch auffälligen Unterschiede in der Expression von CD62P und PAC-1 nach Zugabe von Arachidonsäure beobachten, jedoch eine in der Tendenz erhöhte PAC-1 Expression bei PAVK Patienten. Da die Blutentnahmen nur einmalig unter ASS Therapie stattfanden und keine Blutentnahmen vor Beginn der Therapie durchgeführt wurden, kann in unserer Studie keine generelle Aussage über das Ansprechen der ASS Therapie bei PAVK getroffen werden.

Gremmel et al. kamen in einer Studie an 270 Patienten mit PAVK oder KHK zu ähnlichen Ergebnissen. Nach peripherer oder koronarer Intervention unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel untersuchten sie die ADP, Arachidonsäure und TRAP-6-induzierte Expression von CD62P und PAC-1 in der Durchflusszytometrie. PAVK Patienten zeigten gegenüber KHK Patienten sowohl basal *ex vivo* als auch nach Zugabe von TRAP-6 als Thrombozytenaktivator eine signifikant erhöhte Expression von CD62P und PAC-1. Auch bei Thrombozytenaktivierung mit ADP und Arachidonsäure wiesen Thrombozyten von PAVK Patienten eine signifikant erhöhte Expression der Aktivitätsparameter CD62P und PAC-1 auf. ADP als Agonist gibt Aufschluss über die Clopidogrelwirkung, wohingegen der Einsatz von Arachidonsäure Rückschlüsse auf die ASS Wirkung zulässt. Die erhöhte Thrombozytenreaktivität sowie das verminderte Ansprechen der Thrombozytenaggregationshemmung bei PAVK Patienten im Vergleich zu KHK Patienten begründeten die Autoren mit einer möglicherweise bei PAVK weiter fortgeschrittenen Atherosklerose [120].

Zahlreiche Studien beschreiben den Zusammenhang zwischen inadäquatem Ansprechen auf Thrombozytenaggregationshemmung und dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen, sodass die Kombination aus insuffizienter Thrombozytenaggregationshemmung und erhöhter Thrombozytenreagibilität, wie sie auch in unserer Studie unter ASS Therapie in der Tendenz gezeigt werden konnte,

mit ein Grund für die schlechtere Prognose von PAVK Patienten gegenüber KHK Patienten sein könnte [121].

In der PAVK Studiengruppe unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung zeigte sich eine erniedrigte Voraktivität basal *ex vivo* (erniedrigte Expression von CD62P und PAC-1, erhöhte Expression von Mepacrine) verglichen mit der singulären ASS Therapie in der Tendenz oder zusätzlicher Rivaroxabangabe mit statistischer Auffälligkeit. Nach erfolgter Thrombozytenaktivierung konnte zudem eine erniedrigte Expression von CD62P und PAC-1 sowie verminderte Mepacrine Freisetzung bei allen Thrombozyten-Agonisten unter ASS- und Clopidogreltherapie aufgezeigt werden. Statistisch auffällig war der Unterschied gegenüber der Monotherapie mit ASS bei der CD62P Expression und PAC-1 Expression nach TRAP-6-, Thrombin- und ADP-induzierten Aktivierung. Eine verminderte Mepacrine Freisetzung wurde nach Aktivierung mit Thrombin und Convulxin unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit statistischer Auffälligkeit gegenüber der ASS Monotherapie festgestellt. Daraus lässt sich ableiten, dass die thrombozytenhemmenden Eigenschaften von ASS durch zusätzliche Clopidogrelgabe gesteigert werden kann und deutlich höher ist als der Rivaroxabaneinfluss auf die Thrombozytenfunktion. Die synergistischen Effekte von ASS und Clopidogrel können durch die Hemmung unterschiedlicher Signalwege der Thrombozytenaktivierung erklärt werden.

Die Gruppe um Moshfegh et al. untersuchten an 30 Patienten nach Myokardinfarkt die Thrombozytenfunktion unter ASS- und Clopidogreleinnahme als Monotherapie oder dualer Thrombozytenaggregationshemmung. Konform mit den Ergebnissen unserer Studie konnten sie eine signifikant verminderte Expression von CD62P, PAC-1 und CD63, einem Marker für die Freisetzung von δ -Granula und Lysosomen, nach Thrombozytenaktivierung mit ADP und Thrombin messen. Kollagen-getriggerte Thrombozyten unter ASS- und Clopidogreltherapie zeigten eine verminderte Expression von CD62P, PAC-1 und CD63; jedoch ohne statistische Signifikanz. Auch die Monotherapie mit Clopidogrel zeigte nach ADP-, Thrombin-, und Kollagen-induzierter Thrombozytenaktivierung im Vergleich zur Monotherapie mit ASS ein vermindertes Expressionsniveau von CD62P, PAC-1 und CD63 [122].

In unserer Studie konnte ebenfalls bei Patienten mit PAVK und Monotherapie mit Clopidogrel im Vergleich zu PAVK Patienten mit ASS Einnahme eine erniedrigte hypoaktive thrombozytäre Tendenz nachgewiesen werden. Bei Verwendung von Arachidonsäure als aktivierenden Agonisten, welcher als Marker für eine suffiziente ASS Wirkung verwendet wird, zeigte sich zudem eine in der Tendenz verminderte Expression von Aktivierungsmarker (CD62P und PAC-1) unter Clopidogreltherapie verglichen mit singulärer ASS Einnahme. Es ist bekannt, dass P2Y₁₂ Inhibitoren wie Clopidogrel in mehrere Signalwege der Thrombozytenaktivierung, unter anderem die TXA₂-abhängige Thrombozytenaktivierung, involviert sind [36, 123]. Auffällig war jedoch, dass die Clopidogreltherapie im Vergleich zur ASS Therapie dennoch zu einem niedrigeren Expressionsniveau von Aktivierungsmarkern führte. Grund dafür könnte ein möglicherweise insuffizientes Ansprechen auf ASS bei PAVK Patienten sein.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass unter Monotherapie mit ASS bei PAVK Patienten eine erhöhte Thrombozytenreaktivität gegenüber Patienten mit KHK vorherrscht. Eine Clopidogreltherapie als Monotherapie oder duale Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS führte zu einer deutlich erniedrigten Thrombozytenreaktivität gegenüber der Monotherapie mit ASS bei PAVK Patienten. Unsere Ergebnisse müssen jedoch in einer größer angelegten Studie validiert werden.

5.3 Ansprechen auf Clopidogreltherapie bei PAVK Patienten

Clopidogrel ist ein Thrombozytenaggregationshemmer aus der Gruppe der Thienopyridine, welcher seine Wirkung über irreversible Hemmung des membranständigen P2Y₁₂ Rezeptors am Thrombozyten ausübt und dadurch die ADP-abhängige Thrombozytenaktivierung hemmt [54]. In der 1996 publizierten CAPRIE Studie war Clopidogrel gegenüber ASS signifikant überlegen im Hinblick auf den gemeinsamen Endpunkt Myokardinfarkt, kardiovaskulärer Tod oder ischämischer Schlaganfall. Insbesondere in der PAVK Subgruppe konnte eine relative Risikoreduktion um 23,8% zugunsten von Clopidogrel aufgezeigt werden, was die Bedeutung von Clopidogrel bei PAVK verdeutlicht [68]. Bei symptomatischer PAVK empfiehlt die aktuelle ESC Leitlinie von 2017 mit höchstem Empfehlungs- und Evidenzgrad eine singuläre Thrombozytenaggregationshemmung, wobei Clopidogrel

gegenüber ASS zu favorisieren ist (Empfehlungsklasse IIb, Evidenzgrad B). Nach perkutaner transluminaler Angiographie mit infrainguinaler Stentimplantation wird eine duale Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS plus Clopidogrel für mindestens 1 Monat empfohlen (Empfehlungsklasse IIa, Evidenzgrad C) [8]. Clopidogrel nimmt diesbezüglich eine zentrale Rolle in der antithrombotischen Therapie bei PAVK zur Prävention von thrombotischen Ereignissen ein. Zahlreiche Studien belegten die Effizienz von Clopidogrel zur Reduktion von Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall und vaskulärem Tod [68, 124].

Ungeachtet des klinischen Nutzens einer Thrombozytenaggregationshemmung mit Clopidogrel, zeigten jedoch eine Vielzahl von Patienten unter Clopidogreltherapie eine insuffiziente Thrombozytenaggregationshemmung. Die Gründe für das inadäquate Ansprechen, so genannte Clopidogrel *Low-* bzw. *Non-Responder*, auf die Therapie mit Clopidogrel sind multifaktoriell [125]. Dazu zählen unter anderem die fehlende *Compliance* der Patienten, Interaktionen mit anderen Medikamenten, wie beispielsweise Protonenpumpeninhibitoren, und gastrointestinale Malabsorption. Bei Clopidogrel handelt es sich um eine inaktive Vorstufe, welche erst in seine aktiven Metabolite umgewandelt werden muss. Dabei ist das *CYP2C19* Enzym entscheidend bei der Biotransformation beteiligt. Polymorphismen im *CYP2C19* Enzym führen folglich zu einer verminderten Biotransformation von Clopidogrel in die aktiven Metabolite mit resultierender höheren Thrombozytenaktivität trotz Clopidogreleinnahme [126]. Für den Nachweis der Clopidogrelwirksamkeit stehen verschiedene Messmethoden zur Verfügung. Am häufigsten werden dabei die Lichttransmissionsaggregometrie, der P-VASP-Assay, FACS mit ADP als Agonisten, VaryfyNow und Impedanz-Aggregometrie verwendet.

5.3.1 Nachweis und Prävalenz inadäquater Clopidogrel *Response* bei PAVK Patienten

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zur Evaluation der Clopidogrelwirkung bei PAVK Patienten die PAC-1- und CD62P-Expression nach Thrombozytenaktivierung mit ADP in aufsteigender Konzentration im FACS sowie der PRI mittels VASP/P2Y₁₂ Kit gemessen. Ein Clopidogrel *Non-Responder* wurde anlehnend an internationale Studien bei einem PRI >50% im VASP-Assay definiert [127].

Sowohl bei der PAC-1- als auch bei der CD62P-Expression wurde nach Thrombozytenaktivierung mit ADP, unabhängig der Konzentration, ein statistisch relevant vermindertes Expressionsniveau nach dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS plus Clopidogrel verglichen mit der Monotherapie ASS vor PTA gemessen. Die zusätzliche Clopidogreleinnahme führte in der Studiengruppe verglichen mit der Monotherapie ASS vor PTA bei der PAC-1 Expression zu einer etwa 56% niedrigeren medianen Fluoreszenzintensität und bei CD62P zu einer etwa 51% erniedrigten medianen Fluoreszenzintensität. Da die Blutentnahmen in den Kontrollgruppen nur einmalig stattfanden und die Probanden der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel bereits längerfristig Clopidogrel einnahmen, konnte diesbezüglich kein Ausgangswert ohne Clopidogreleinnahme in dieser Gruppe gemessen werden.

Im P-VASP-Assay wurde ebenfalls ein erniedrigter PRI innerhalb der Studiengruppe unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel gegenüber der ASS Monotherapie sowie der Kombinationstherapie mit ASS und Rivaroxaban mit statistischer Auffälligkeit gemessen. In der Kontrollgruppe PAVK mit Clopidogreltherapie war der PRI statistisch auffällig vermindert gegenüber PAVK Patienten der Studiengruppe unter ASS Einnahme. Betrachtet man jedoch die Einzelmessungen bei Probanden unter Clopidogreltherapie, so waren 40% der Kontrollgruppe PAVK Clopidogrel sowie 40% der Studiengruppe PAVK mit dualer Thrombozytenaggregationshemmung Clopidogrel *Non-Responder*.

Die in unserer Studie an einer kleinen Patientenzahl unter Clopidogreltherapie ermittelte Häufigkeit von jeweils 40% Clopidogrel *Non-Responder* spiegelt in etwa die in der Literatur beschriebene Prävalenz wider. So konnte in einer Metaanalyse mit insgesamt 34.776 Patienten eine inadäquate *Response* auf Clopidogrel bei 40,4% aller Patienten unter Clopidogreleinnahme festgestellt werden. Dafür wurden 59 Studien, davon 3 Studien an PAVK Patienten, mit 15 verschiedenen Tests zur Identifikation von Clopidogrel *Low-* bzw. *Non- Responder* ausgewertet. Ferner zeigte sich, dass ein insuffizientes Ansprechen auf Clopidogrel mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko (RR 2,8; 95% CI 2,4 – 3,27) einhergeht. Von den insgesamt 15 verschiedenen Tests der ausgewerteten Studien konnte bei 11 Tests, unter anderem auch der in unserer Studie verwendete P-VASP-Assay, ein signifikanter Zusammenhang mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko dargelegt werden [128]. An 60 Patienten mit St-Hebungsinfarkt konnte ebenfalls ein signifikanter

Zusammenhang zwischen Clopidogrel *Non-Responder* und erneutem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse dargelegt werden. Die Patienten wurden anhand der Reduktion der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation von Tag 6 im Vergleich zum Ausgangswert am Tag der koronaren Intervention in vier Quartile eingeteilt, wobei Patienten im 1. Quartil resistent gegenüber Clopidogrel waren und Patienten im 4. Quartil die niedrigste Thrombozytenaggregation aufwiesen. Nach 6 Monate *Follow up* zeigten 40% der Patienten im 1. Quartil ein erneutes kardiovaskuläres Ereignis, wohingegen lediglich ein Patient im 2. Quartil und kein Patient im 3. und 4. Quartil kardiovaskuläre Ereignisse erlitt. Bei zwei Patienten kam es innerhalb des Zeitraums zu schweren Blutungen. Beide Patienten waren im 4. Quartil mit der niedrigsten ADP induzierten Thrombozytenaggregation [129].

Die Studienlage für PAVK Patienten und Prävalenz von inadäquatem Ansprechen auf Clopidogrel ist deutlich schwächer im Vergleich zu Studien an KHK Patienten. Wenige Publikationen in diesem Zusammenhang zeigten jedoch eine höhere Inzidenz von *Low- bzw. Non-Clopidogrel Responder* bei PAVK Patienten gegenüber Patienten mit KHK [121, 130]. Leunissen et al. untersuchten an 30 PAVK Patienten nach PTA unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS plus Clopidogrel den Anteil an Clopidogrel *Non-Responder* durch unterschiedliche Labormethoden. Dabei fanden sie heraus, dass der Anteil an Clopidogrel *Non-Responder* stark abhängig von der Labormethode und den zugrundeliegenden Grenzwerten für *Non-Responder* ist. Die Prävalenz variierte dabei von 24% im P-VASP-Assay bis zu 83,3% im VarifyNow mit Cut-off Werten für Clopidogrel *Non-Responder* von <40% Thrombozytenhemmung und zeigte insgesamt nur eine geringe Korrelation zwischen den Tests. Wurde der Test innerhalb von 24 Stunden nach PTA mit 300 mg Clopidogrel als Aufsättigungsdosis durchgeführt, so zeigte sich ein erhöhter Anteil von Clopidogrel *Non-Responder* gegenüber der Testung nach 24 Stunden. Die Autoren erklärten dieses Phänomen durch eine möglicherweise noch unzureichend erzielte Thrombozytenaggregationshemmung, obgleich die empfohlene Dauer zwischen Aufsättigungsdosis und Messung lediglich über 8 Stunden liegen sollte [126].

In unserer Studie erhielten die Patienten der Studiengruppe bei PTA eine Aufsättigungsdosis von 300 mg Clopidogrel gefolgt von 75 mg Clopidogrel als Erhaltungsdosis zusätzlich zur Dauertherapie mit 100 mg ASS. Nach einer medianen

Behandlungsdauer von 34,5 Tagen wurde das Ansprechen der Clopidogreltherapie in der Studiengruppe getestet. In der Kontrollgruppe PAVK mit 75 mg Clopidogrel erfolgte die einmalige Blutentnahme nach andauernder Clopidogreleinnahme. Diesbezüglich lässt sich der von Leunissen et al. postulierte Einfluss einer möglicherweise inadäquaten Thrombozytenaggregationshemmung aufgrund unzureichender Therapiedauer nicht verifizieren. Verzerrungen aufgrund zu kurzer Einnahmedauer können jedoch ausgeschlossen werden. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Clopidogrel Wirkung mit statistischer Auffälligkeit sowohl in der Thrombozytenfunktionsanalyse als auch im P-VASP-Assay verglichen mit Therapieregimen ohne Clopidogrel zu sehen ist. Bei Einzelbetrachtung jedoch wiesen 40% der Patienten unter Clopidogreltherapie im P-VASP-Assay eine unzureichendes Clopidogrel Ansprechen auf mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse.

5.3.2 Therapeutische Möglichkeiten bei Clopidogrel *Low-* bzw. *Non-Responder*

Um eine suffiziente Thrombozytenaggregationshemmung bei mangelhafter Clopidogrel *Response* zu gewährleisten, stehen verschiedene therapeutische Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen kann als Behandlungsstrategie entweder auf Alternativsubstanzen wie beispielsweise Prasugrel oder Ticagrelor umgestellt werden; zum anderen kann durch eine Anpassung der Clopidogreldosis ein *Responder* Status erreicht werden.

Bonello et al. untersuchten die Auswirkungen einer Anpassung der Aufsättigungsdosis von Clopidogrel anhand des PRI auf kardiovaskuläre Ereignisse nach perkutaner koronarer Intervention bei gleichbleibender 75 mg Clopidogrel Erhaltungsdosis. Sie konnten zeigen, dass eine mehrfache Gabe von 600 mg Clopidogrel als Aufsättigungsdosis bei Clopidogrel *Non-Responder* zu einer 86% suffizienten Clopidogrelwirkung (PRI unter 50%) führt. Überdies zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe mit einmaliger Aufsättigungsdosis von 600 mg Clopidogrel eine signifikant verminderte Rate an kardiovaskulären Ereignissen 1 Monat nach perkutaner Intervention. Es wurde kein Unterschied bei Blutungskomplikationen zwischen der Studiengruppe und Kontrollgruppe beobachtet [131]. Demgegenüber untersuchten Mega et al. den Einfluss einer erhöhten Erhaltungsdosis von Clopidogrel bei Patienten mit Polymorphismus im *CYP2C19*

Gen. Bei täglicher Einnahme der Standarddosis von 75 mg Clopidogrel wiesen Probanden mit heterozygoter *Loss-of-Function-Mutation* im *CYP2C19* Gen (*CYP2C19*2*) verglichen mit Probanden ohne Träger dieser Mutation eine signifikant erhöhte Thrombozytenreaktivität im P-VASP-Assay und VerifyNow auf. Mit steigender Dosis kam es zu einer verminderten Thrombozytenreaktivität bei Probanden mit heterozygoter *CYP2C19*2* Mutation. Bei einer täglichen 225 mg Clopidogreleinnahme in der *CYP2C19*2* Gruppe entsprach die Thrombozytenreaktivität der von Probanden ohne Mutation im *CYP2C19* Gen bei 75 mg Clopidogreleinnahme. Bei homozygoten *CYP2C19*2* Trägern konnte jedoch keine suffiziente Thrombozytenaggregationshemmung durch Steigerung der Erhaltungsdosis erzielt werden [132]. Dridi et al. verglichen bei Patienten mit inadäquater Clopidogrel *Response* die Thrombozytenreaktivität unter doppelter Clopidogreldosis mit Standarddosis Prasugrel nach perkutaner koronarer Intervention. 1 Monat nach Therapie zeigten 73,1% der Probanden eine mit Clopidogrel *Responder* vergleichbare Thrombozytenreaktivität. Der Therapiewechsel auf Prasugrel führte jedoch zu einer stärkeren Thrombozyteninhibierung im Vergleich zur doppelten Clopidogreleinnahme [133]. Neuere P2Y₁₂ Inhibitoren (Prasugrel, Ticagrelor, Cangrelor, Elinogrel) zeigten in einer Metaanalyse mit 71.097 Patienten eine deutliche Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse gegenüber Clopidogrel. Die Anzahl an schweren Blutungen war jedoch unter den neueren P2Y₁₂ Inhibitoren nicht signifikant gegenüber der Clopidogreleinnahme erhöht [134].

In unserer Studie wurden Patienten nicht auf Veränderungen im *CYP2C19* Gen untersucht. Ferner wurde die Therapie bei ermittelten Clopidogrel *Non-Responder* im P-VASP-Assay nicht angepasst. Die Verwendung von neueren P2Y₁₂ Inhibitoren als Alternative zu Clopidogrel zeigte klinische Vorteile gegenüber Clopidogrel auf Kosten erhöhter Blutungskomplikationen. Es ist derzeit unklar, ob eine angepasste antithrombotische Therapie bei inadäquater Clopidogrel *Response* zu einem verbesserten klinischen Ergebnis führt. Die Studienlage dazu ist ambivalent. Einerseits zeigten groß angelegte klinische Studien keinen Unterschied einer angepassten antithrombotischen Therapie zur konventionellen Therapie mit Blick auf kardiovaskuläre Ereignisse und Blutungskomplikationen [135-137]. Andererseits konnten mehrere Studien den Vorteil einer angepassten Thrombozytenaggregationshemmung bei inadäquater Clopidogreltherapie aufzeigen [131, 138]. Da die Studien mit KHK Patienten durchgeführt wurden und es bis dato

keine Studien einer angepassten antithrombotischen Therapie mit PAVK Patienten gibt, bedarf es in Zukunft groß angelegter randomisierter Studien an Patienten mit PAVK, die einen möglichen Nutzen der angepassten antithrombotischen Therapie bei inadäquater Clopidogrel Response untersuchen.

5.4 Limitationen der Studie

Das Probandenkollektiv unserer Studie umfasste 30 teilnehmende Patienten und war verglichen mit anderen Studien zu diesem Thema eher klein. Trotz der umfangreichen Ergebnisse der Laborexperimente ist die Übertragbarkeit auf die Gesamtpopulation der PAVK Patienten aufgrund der geringen Studiengröße und fehlenden Randomisierung der Patienten nur eingeschränkt möglich. Ferner wurden zwar klinische Endpunkte dokumentiert. Es bedarf jedoch größerer Studien, um signifikante Ergebnisse zu erzielen und Korrelationen mit laborexperimentellen Erkenntnissen herauszufinden. Die Hämostase ist ein dynamisches, komplexes in sich greifendes Geschehen und daher eine Herausforderung experimentell zu untersuchen. Es besteht immer die Gefahr einer artifiziellen Thrombozytenaktivierung bei der Blutabnahme und Probenpräparation und Störvariablen können nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Alle Blutentnahmen fanden einmalig statt, sodass zum Zeitpunkt der Blutentnahme von inter-individuell variierenden Verhältnissen ausgegangen werden muss. Eine weitere Limitation unserer Arbeit ist, dass keine Kontrollgruppen ohne Manifestation von Atherosklerose bzw. ohne antithrombotische Therapie untersucht wurden. Auch konnten wir in die Studiengruppe PAVK keine Patienten ohne ASS Einnahme vor Katheterintervention einschließen, um so einen Basalwert vor Beginn der antithrombotischen Therapie zu eruieren. Überdies wurde nicht die anti-Faktor Xa Aktivität sowie der Plasmaspiegel von Rivaroxaban in der Studiengruppe unter Rivaroxabantherapie gemessen. Eine Korrelation von Wirkspiegel mit den Ergebnissen der Thrombingerierung und Thrombozytenfunktion war somit nicht möglich.

6. Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde die *in vitro* Thrombinbildungskapazität sowie die Thrombozytenfunktion von 30 Patienten mit PAVK und KHK unter den verschiedenen, im klinischen Alltag bei PAVK zur Sekundärprävention und nach Intervention eingesetzten Therapieregimen, untersucht. Überdies wurde das Ansprechen der Clopidogreltherapie mittels P-VASP-Assay evaluiert.

Dazu wurde Blut von Patienten der Studiengruppe PAVK (n=10) vor PTA unter täglicher 100 mg ASS Monotherapie sowie nach Katheterintervention unter dualer Thrombozytenaggregationshemmung mit 75 mg Clopidogrel und 100 mg ASS analysiert. Die letzte Blutentnahme erfolgte unter 100 mg ASS in Kombination mit zweimal täglicher 2,5 mg Rivaroxabaneinnahme. Eine einmalige Blutabnahme fand in den Kontrollgruppen PAVK (n=10) mit 75 mg Clopidogreleinnahme und KHK (n=10), ohne weiterer Manifestation der Atherosklerose an anderen Gefäßprovinzen, unter 100 mg ASS Monotherapie statt.

Die TG wurde mittels CAT im plättchenfreien und plättchenreichem Plasma getriggert durch TF und Thrombin durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei PAVK Patienten eine zweimal tägliche orale 2,5 mg Rivaroxabantherapie zusätzlich zur ASS Therapie gegenüber einer Monotherapie mit ASS zu einem signifikant verminderten *Peak* im TF sowie im Thrombin getriggertem PRP führt. Im PFP mit TF als Triggersubstanz zeigte sich ebenfalls ein statistisch auffällig verminderter *Peak* bei zusätzlicher Rivaroxabaneinnahme gegenüber der singulären ASS Therapie. Die *Lagtime* war bei gleichzeitiger ASS- und Rivaroxabaneinnahme im TF getriggerten PFP und PRP statistisch auffällig sowie im PRP mit Thrombin als Triggersubstanz in der Tendenz verlängert; jedoch ohne statistische Relevanz. Im PFP getriggert mit TF führte die zusätzliche Rivaroxabangabe gegenüber der Monotherapie mit ASS zu einem verminderten ETP mit statistischer Auffälligkeit, wohingegen im PRP mit TF oder Thrombin als Triggersubstanz die Rivaroxabantherapie in vasukläarer Dosierung keine statistisch relevanten Veränderungen im ETP gemessen wurden. Daraus lässt sich ableiten, dass Rivaroxaban vorwiegend die Initiierungs- und Vervielfältigungsphase der TG beeinflusst und weniger die Inaktivierung des entstandenen Thrombins. Insbesondere bei niedrig dosiertem Rivaroxaban sind deshalb der *Peak* und die

Lagtime als Parameter der CAT besser geeignet den Effekt von Rivaroxaban im PRP nachzuweisen als das ETP.

Die zusätzliche Gabe von täglich 75 mg Clopidogrel zur 100 mg ASS Therapie führte bei PAVK Patienten nach PTA und Stenting zu einem statistisch nennenswert verminderten *Peak* im PRP mit TF sowie Thrombin als Triggersubstanz gegenüber der Monotherapie mit ASS vor PTA.

Die Thrombozytenfunktion wurde anhand verschiedener etablierter Thrombozytenaktivierungsmarker basal *ex vivo* sowie die Thrombozyten-Reaktivität *in vitro* nach Zugabe verschiedener Agonisten untersucht.

Unter ASS- und Rivaroxabaneinnahme konnte im Vergleich zur singulären ASS Einnahme eine statistisch auffällig verminderte thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P und PAC-1 Bindung nach Thrombozytenaktivierung mit TRAP-6 festgestellt werden. Bei PAVK Patienten unter 100 mg ASS Therapie wurde gegenüber KHK Patienten mit 100 mg ASS Einnahme eine erhöhte Expression von CD62P und PAC-1 sowie eine vermehrte Mepacrine Freisetzung weitestgehend unabhängig vom Thrombozyten-Agonisten gemessen. Statistisch auffällig erhöht war die Expression von CD62P bei Thrombozytenaktivierung mit Thrombin sowie mit ADP bei PAVK Patienten gegenüber der KHK Gruppe. Dies spricht dafür, dass Thrombozyten von PAVK Patienten gegenüber KHK Patienten eine erhöhte Thrombozytenreagibilität aufweisen.

Eine Clopidogreltherapie als Monotherapie oder duale Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS führte zu einer deutlich erniedrigten Thrombozytenreaktivität - weitestgehend unabhängig vom Thrombozyten-Agonisten - gegenüber der Monotherapie mit ASS bei PAVK Patienten.

Zur Evaluation der Clopidogrelwirkung bei PAVK Patienten wurde die thrombozytäre PAC-1- und CD62P Oberflächen-Expression nach Thrombozytenaktivierung mit ADP in aufsteigender Konzentration im FACS sowie der PRI mittels VASP/P2Y₁₂ Kit gemessen.

Die Clopidogrel Wirkung konnte mit statistischer Auffälligkeit sowohl in der Thrombozytenfunktionsanalyse als auch im P-VASP-Assay verglichen mit Therapieregimen ohne Clopidogrel nachgewiesen werden. Bei Einzelbetrachtung jedoch wiesen 40% der Patienten unter Clopidogreltherapie im VASP-Assay eine

unzureichendes Clopidogrel Ansprechen auf mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse.

Trotz der geringen Patientenzahl konnten im Rahmen dieser Studie wichtige Ergebnisse der Thrombozytenfunktion unter dualer antithrombotischer Therapie mit ASS und Rivaroxaban bei der PAVK erzielt werden. Es bedarf jedoch weiterer Studien mit größerem Patientenkollektiv, um in Zukunft eine suffizientere antithrombotische Therapie bei PAVK Patienten zu erzielen und die kardiovaskuläre Prognose dieser Erkrankung dadurch zu verbessern.

7. Literaturverzeichnis

1. Espinola-Klein C, Vosseler M, Abegunewardene N, Himmrich L, Schlosser A, Schuster CJ. [peripheral arterial occlusive disease as predictor of high atherosclerotic burden]. *Herz*. 2019;44(1):40-4.
2. Fowkes FG, Aboyans V, Fowkes FJ, McDermott MM, Sampson UK, Criqui MH. Peripheral artery disease: Epidemiology and global perspectives. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(3):156-70.
3. Olinic DM, Spinu M, Olinic M, Homorodean C, Tataru DA, Liew A, Scherthaner GH, Stanek A, Fowkes G, Catalano M. Epidemiology of peripheral artery disease in europe: Vas educational paper. *Int Angiol*. 2018;37(4):327-34.
4. Gawaz M. Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36(2):206-10.
5. Malyar N, Freisinger E, Reinecke H. [peripheral arterial disease - trends in morbidity and mortality]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2018;143(11):766-70.
6. Overbeck P. *MMW Fortschr Med*. 2017;159(16):10-1.
7. Hess CN, Bonaca MP. Contemporary review of antithrombotic therapy in peripheral artery disease. *Circ Cardiovasc Interv*. 2020;13(10):e009584. DOI: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.120.009584
8. Aboyans V, Ricco J-B, Bartelink M-LEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, Collet J-P, Czerny M, De Carlo M, Debus S, Espinola-Klein C, Kahan T, Kownator S, Mazzolai L, Naylor AR, Roffi M, Röther J, Sprynger M, Tendera M, Tepe G, Venermo M, Vlachopoulos C, Desormais I, Group ESD. 2017 esc guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the european society for vascular surgery (esvs): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries endorsed by: The european stroke organization (eso) the task force for the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases of the european society of cardiology (esc) and of the european society for vascular surgery (esvs). *Eur Heart J*. 2017;39(9):763-816.
9. Jurk K, Kehrel BE. [pathophysiology and biochemistry of platelets]. *Internist (Berl)*. 2010;51(9):1086, 8-92, 94.
10. Jurk K, Kehrel BE. [the role of platelets in haemostasis, thrombosis, immune defense and inflammation]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2008;133(21):1130-5.
11. Musicant SE, Taylor LM, Jr., Peters D, Schuff RA, Urankar R, Landry GJ, Moneta GL. Prospective evaluation of the relationship between c-reactive protein, d-dimer and progression of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2006;43(4):772-80.
12. Robless PA, Okonko D, Lintott P, Mansfield AO, Mikhailidis DP, Stansby GP. Increased platelet aggregation and activation in peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003;25(1):16-22.
13. Lessiani G, Vazzana N, Cuccurullo C, Di Michele D, Laurora G, Sgro G, Di Ruscio P, Simeone E, Di Iorio P, Lattanzio S, Liani R, Ferrante E, Davi G. Inflammation, oxidative stress and platelet activation in aspirin-treated critical limb ischaemia: Beneficial effects of iloprost. *Thromb Haemost*. 2011;105(2):321-8.
14. Anand SS, Bosch J, Eikelboom JW, Connolly SJ, Diaz R, Widimsky P, Aboyans V, Alings M, Kakkar AK, Keltai K, Maggioni AP, Lewis BS, Stork S, Zhu J, Lopez-Jaramillo P, O'Donnell M, Commerford PJ, Vinereanu D, Pogosova N, Ryden L, Fox KAA, Bhatt DL, Misselwitz F, Varigos JD, Vanassche T, Avezum AA, Chen E, Branch K, Leong DP, Bangdiwala SI, Hart RG, Yusuf S. Rivaroxaban with or without aspirin in patients with stable

- peripheral or carotid artery disease: An international, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2018;391(10117):219-29.
15. Espinola-Klein C. [anti-thrombotic treatment of patients with peripheral artery disease (pad)]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2018;143(15):1060-4.
 16. van Geffen JP, Kleinegris MC, Verdood R, Baaten CC, Cosemans JM, Clemetson KJ, Ten Cate H, Roest M, de Laat B, Heemskerk JW. Normal platelet activation profile in patients with peripheral arterial disease on aspirin. *Thromb Res*. 2015;135(3):513-20.
 17. Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, Kowalska MA, Bdeir K, Leitersdorf E, Hiss E, Ziporen L, Aviram M, Cines D, Poncz M, Higazi AA. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *J Biol Chem*. 2003;278(8):6187-93.
 18. Bauersachs R, Espinola-Klein C, Lawall H, Storck M, Zeller T, Debus S. [anti-thrombotic therapy of peripheral arterial disease - a review of current evidence, practice and outlook]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2019;144(10):683-9.
 19. Alberts MJ, Bhatt DL, Mas JL, Ohman EM, Hirsch AT, Rother J, Salette G, Goto S, Smith SC, Jr., Liao CS, Wilson PW, Steg PG. Three-year follow-up and event rates in the international reduction of atherothrombosis for continued health registry. *Eur Heart J*. 2009;30(19):2318-26.
 20. Bauersachs R, Zannad F. Rivaroxaban: A new treatment paradigm in the setting of vascular protection? *Thromb Haemost*. 2018;118(S 01):12-22.
 21. McClure GR, Kaplovitch E, Narula S, Bhagirath VC, Anand SS. Rivaroxaban and aspirin in peripheral vascular disease: A review of implementation strategies and management of common clinical scenarios. *Curr Cardiol Rep*. 2019;21(10):115. DOI: 10.1007/s11886-019-1198-5
 22. Lawall H, Diehm C, Hoffmann U, Reinecke H. [update pavk: Epidemiology, comorbidity and prognosis of peripheral arterial obstructive disease]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2015;140(24):1798-802.
 23. Espinola-Klein C. [principles of angiology in lower extremity arterial disease (lead)]. *Herz*. 2020;45(2):201-8.
 24. Espinola-Klein C, Savvidis S. [peripheral arterial disease: Epidemiology, symptoms and diagnosis]. *Internist (Berl)*. 2009;50(8):919-26.
 25. Espinola-Klein C, Weisser G. [vascular diagnostics in peripheral arteries]. *Internist (Berl)*. 2017;58(8):787-95.
 26. Espinola-Klein C. [peripheral arterial disease]. *Internist (Berl)*. 2011;52(5):549-60.
 27. De Backer TL, Vander Stichele R, Lehert P, Van Bortel L. Naftidrofuryl for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008(2):Cd001368. DOI: 10.1002/14651858.CD001368.pub3
 28. Bedenis R, Stewart M, Cleanthis M, Robless P, Mikhailidis DP, Stansby G. Cilostazol for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(10):Cd003748. DOI: 10.1002/14651858.CD003748.pub4
 29. Chionchio A, Galmer A, Hirsh B. Primary and novel lipid-lowering therapies to reduce risk in patients with peripheral arterial disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2019;21(12):94. DOI: 10.1007/s11936-019-0791-7
 30. Arya S, Khakharia A, Binney ZO, DeMartino RR, Brewster LP, Goodney PP, Wilson PWF. Association of statin dose with amputation and survival in patients with peripheral artery disease. *Circulation*. 2018;137(14):1435-46.
 31. Momsen AH, Jensen MB, Norager CB, Madsen MR, Vestersgaard-Andersen T, Lindholt JS. Drug therapy for improving walking distance in intermittent claudication: A systematic review and meta-analysis of robust randomised controlled studies. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009;38(4):463-74.

32. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen M-R, Tokgozoglu L, Wiklund O, Group ESD. 2019 esc/eas guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk: The task force for the management of dyslipidaemias of the european society of cardiology (esc) and european atherosclerosis society (eas). *Eur Heart J.* 2019;41(1):111-88.
33. Armstrong EJ, Chen DC, Singh GD, Amsterdam EA, Laird JR. Angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor blocker use is associated with reduced major adverse cardiovascular events among patients with critical limb ischemia. *Vasc Med.* 2015;20(3):237-44.
34. Espinola-Klein C. [esc guidelines 2017 on peripheral arterial diseases : Summary of the most important recommendations and innovations]. *Herz.* 2017;42(8):721-7.
35. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med.* 2017;377(12):1119-31.
36. Gremmel T, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Platelet physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):191-204.
37. Jastrow H, Weber AA. [physiology and pathophysiology. Fundamentals of platelet pharmacology]. *Pharm Unserer Zeit.* 2009;38(4):302-4.
38. Jurk K, Shiravand Y. Platelet phenotyping and function testing in thrombocytopenia. *J Clin Med.* 2021;10(5). DOI: 10.3390/jcm10051114
39. Jurk K, Kehrel BE. [platelets and the new comprehension of haemostasis]. *Hamostaseologie.* 2005;25(1):39-49.
40. Oldenburg J, Hertfelder HJ. [blood coagulation and hemorrhagic diathesis]. *Pharm Unserer Zeit.* 2006;35(1):20-8.
41. Tran R, Myers DR, Ciciliano J, Trybus Hardy EL, Sakurai Y, Ahn B, Qiu Y, Mannino RG, Fay ME, Lam WA. Biomechanics of haemostasis and thrombosis in health and disease: From the macro- to molecular scale. *J Cell Mol Med.* 2013;17(5):579-96.
42. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):41-8.
43. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2009;102(2):248-57.
44. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: Physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(4):381-92.
45. Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32 Suppl 1:32-8. DOI: 10.1055/s-2006-939552
46. Döhrmann M, Makhoul S, Gross K, Krause M, Pillitteri D, von Auer C, Walter U, Lutz J, Volf I, Kehrel BE, Jurk K. Cd36-fibrin interaction propagates fxi-dependent thrombin generation of human platelets. *FASEB J.* 2020;34(7):9337-57.
47. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(1):17-25.
48. Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost.* 2008;99(3):480-6.
49. Siegel-Axel D, Langer H, Lindemann S, Gawaz M. [role of platelets in atherosclerosis and inflammation]. *Med Klin (Munich).* 2006;101(6):467-75.

50. ten Cate H. Tissue factor-driven thrombin generation and inflammation in atherosclerosis. *Thromb Res.* 2012;129(Suppl 2):38-40. DOI: 10.1016/j.thromres.2012.02.028
51. Goli RR, Contractor MM, Nathan A, Tuteja S, Kobayashi T, Giri J. Antiplatelet therapy for secondary prevention of vascular disease complications. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(12):56. DOI: 10.1007/s11883-017-0698-2
52. Perzborn E, Heitmeier S, Laux V. Effects of rivaroxaban on platelet activation and platelet-coagulation pathway interaction: In vitro and in vivo studies. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015;20(6):554-62.
53. Michelson AD, Bhatt DL. How i use laboratory monitoring of antiplatelet therapy. *Blood.* 2017;130(6):713-21.
54. Tsoumani ME, Tselepis AD. Antiplatelet agents and anticoagulants: From pharmacology to clinical practice. *Curr Pharm Des.* 2017;23(9):1279-93.
55. Mega JL, Simon T. Pharmacology of antithrombotic drugs: An assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments. *Lancet.* 2015;386(9990):281-91.
56. Mansour A, Bachelot-Loza C, Nesseler N, Gaussem P, Gouin-Thibault I. P2y(12) inhibition beyond thrombosis: Effects on inflammation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4). DOI: 10.3390/ijms21041391
57. Tendera M, Wojakowski W. Role of antiplatelet drugs in the prevention of cardiovascular events. *Thromb Res.* 2003;110(5-6):355-9.
58. Michelson AD. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(2):154-69.
59. Makhoul S, Panova-Noeva M, Regnault V, Ruf W, Wenzel P, Lagrange J. Rivaroxaban effects illustrate the underestimated importance of activated platelets in thrombin generation assessed by calibrated automated thrombography. *J Clin Med.* 2019;8(11). DOI: 10.3390/jcm8111990
60. Flierl U, Fraccarollo D, Micka J, Bauersachs J, Schafer A. The direct factor xa inhibitor rivaroxaban reduces platelet activation in congestive heart failure. *Pharmacol Res.* 2013;74:49-55. DOI: 10.1016/j.phrs.2013.05.002
61. Gerotziakas GT, Elalamy I, Depasse F, Perzborn E, Samama MM. In vitro inhibition of thrombin generation, after tissue factor pathway activation, by the oral, direct factor xa inhibitor rivaroxaban. *J Thromb Haemost.* 2007;5(4):886-8.
62. Sokol J, Nehaj F, Ivankova J, Mokan M, Mokan M. First evidence: Rivaroxaban and apixaban reduce thrombin-dependent platelet aggregation. *J Thromb Thrombolysis.* 2018;46(3):393-8.
63. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ.* 2002;324(7329):71-86.
64. Frank U, Nikol S, Belch J, Boc V, Brodmann M, Carpentier PH, Chraim A, Canning C, Dimakakos E, Gottsäter A, Heiss C, Mazzolai L, Madaric J, Olinic DM, Pécsvárady Z, Poredoš P, Quéré I, Roztocil K, Stanek A, Vasic D, Visonà A, Wautrecht J-C, Bulvas M, Colgan M-P, Dorigo W, Houston G, Kahan T, Lawall H, Lindstedt I, Mahe G, Martini R, Pernod G, Przywara S, Righini M, Schlager O, Terlecki P. Esvm guideline on peripheral arterial disease. *Vasa.* 2019;48(Supplement 102):1-79.
65. Belch J, MacCuish A, Campbell I, Cobbe S, Taylor R, Prescott R, Lee R, Bancroft J, MacEwan S, Shepherd J, Macfarlane P, Morris A, Jung R, Kelly C, Connacher A, Peden N, Jamieson A, Matthews D, Leese G, McKnight J, O'Brien I, Semple C, Petrie J, Gordon D, Pringle S, MacWalter R. The prevention of progression of arterial disease and diabetes (popadad) trial: Factorial randomised placebo controlled trial of aspirin and antioxidants in patients with diabetes and asymptomatic peripheral arterial disease. *BMJ.* 2008;337:a1840. DOI: 10.1136/bmj.a1840

66. Fowkes FG, Price JF, Stewart MC, Butcher I, Leng GC, Pell AC, Sandercock PA, Fox KA, Lowe GD, Murray GD. Aspirin for prevention of cardiovascular events in a general population screened for a low ankle brachial index: A randomized controlled trial. *JAMA*. 2010;303(9):841-8.
67. Lamberts M, Lip GY, Ruwald MH, Hansen ML, Ozcan C, Kristensen SL, Kober L, Torp-Pedersen C, Gislason GH. Antithrombotic treatment in patients with heart failure and associated atrial fibrillation and vascular disease: A nationwide cohort study. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(24):2689-98.
68. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (caprie). Caprie steering committee. *Lancet*. 1996;348(9038):1329-39.
69. Hiatt WR, Fowkes FG, Heizer G, Berger JS, Baumgartner I, Held P, Katona BG, Mahaffey KW, Norgren L, Jones WS, Blomster J, Millegard M, Reist C, Patel MR. Ticagrelor versus clopidogrel in symptomatic peripheral artery disease. *N Engl J Med*. 2017;376(1):32-40.
70. Eggebrecht H. Euclid-studie. *Der Kardiologe*. 2017;11(1):17-8.
71. Tepe G, Bantleon R, Brechtel K, Schmehl J, Zeller T, Claussen CD, Strobl FF. Management of peripheral arterial interventions with mono or dual antiplatelet therapy--the mirror study: A randomised and double-blinded clinical trial. *Eur Radiol*. 2012;22(9):1998-2006.
72. Strobl FF, Brechtel K, Schmehl J, Zeller T, Reiser MF, Claussen CD, Tepe G. Twelve-month results of a randomized trial comparing mono with dual antiplatelet therapy in endovascularly treated patients with peripheral artery disease. *J Endovasc Ther*. 2013;20(5):699-706.
73. Bonaca MP, Bauersachs RM, Anand SS, Debus ES, Nehler MR, Patel MR, Fanelli F, Capell WH, Diao L, Jaeger N, Hess CN, Pap AF, Kittelson JM, Gudzi I, Matyas L, Krievins DK, Diaz R, Brodmann M, Muehlhofer E, Haskell LP, Berkowitz SD, Hiatt WR. Rivaroxaban in peripheral artery disease after revascularization. *N Engl J Med*. 2020;382:1994-2004. DOI: 10.1056/NEJMoa2000052
74. Capell WH, Bonaca MP, Nehler MR, Chen E, Kittelson JM, Anand SS, Berkowitz SD, Debus ES, Fanelli F, Haskell L, Patel MR, Bauersachs R, Hiatt WR. Rationale and design for the vascular outcomes study of asa along with rivaroxaban in endovascular or surgical limb revascularization for peripheral artery disease (voyager pad). *Am Heart J*. 2018;199:83-91.
75. Human experimentation: Code of ethics of the world medical association (declaration of helsinki). *Can Med Assoc J*. 1964;91(11):619.
76. Lane DA, Lip GY. Use of the cha(2)ds(2)-vasc and has-bleed scores to aid decision making for thromboprophylaxis in nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation*. 2012;126(7):860-5.
77. Trappe H-J. [Atrial Fibrillation: Established and Innovative Methods of Evaluation and Treatment]. *Dtsch Arztebl International*. 2012;109(1-2):1-7.
78. Barale C, Frascaroli C, Senkeev R, Cavalot F, Russo I. Simvastatin effects on inflammation and platelet activation markers in hypercholesterolemia. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6508709. DOI: 10.1155/2018/6508709
79. Macchia A, Laffaye N, Comignani PD, Cornejo Pucci E, Igarzabal C, Scazziotta AS, Herrera L, Mariani JA, Bragagnolo JC, Catalano H, Tognoni G, Nicolucci A. Statins but not aspirin reduce thrombotic risk assessed by thrombin generation in diabetic patients without cardiovascular events: The rational trial. *PLoS One*. 2012;7(3):e32894. DOI: 10.1371/journal.pone.0032894
80. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Beguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33(1):4-15.

81. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: What have we learned? *Blood Rev.* 2012;26(5):197-203.
82. Hemker HC. Thrombin generation: Biochemical possibilities and clinical reality. *Blood.* 2015;126(3):288-9.
83. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, Lecompte T, Beguin S. The calibrated automated thrombogram (cat): A universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32(5-6):249-53.
84. Jurk K, Lahav J, Van Aken H, Brodde MF, Nofer JR, Kehrel BE. Extracellular protein disulfide isomerase regulates feedback activation of platelet thrombin generation via modulation of coagulation factor binding. *J Thromb Haemost.* 2011;9(11):2278-90.
85. Duarte RCF, Ferreira CN, Rios DRA, Reis HJd, Carvalho MdG. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: Perspectives and limitations. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2017;39(3):259-65.
86. Jurk K. Analysis of platelet function and dysfunction. *Hamostaseologie.* 2015;35(1):60-72.
87. Aebischer D, Bartusik D, Tabarkiewicz J. Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine. *Biomed Pharmacother.* 2017;85:434-43.
88. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, 3rd, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods.* 2000;21(3):259-70.
89. Pasalic L. Assessment of platelet function in whole blood by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2017;1646:349-67.
90. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res.* 2009;82(3):392-403.
91. Geiger Jr, Teichmann L, Grossmann R, Aktas B, Steigerwald U, Walter U, Schinzel R. Monitoring of clopidogrel action: Comparison of methods. *Clin Chem.* 2005;51(6):957-65.
92. Aradi D, Magyarlaki T, Tóké-Füzesi M, Rideg O, Vorobcsuk A, Komócsi A. Comparison of conventional aggregometry with vasp for monitoring p2y12-specific platelet inhibition. *Platelets.* 2010;21(7):563-70.
93. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet vasp phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost.* 2005;3(1):85-92.
94. Mallouk N, Labruyère C, Reny J-L, Chapelle C, Piot M, Fontana P, Gris J-C, Delavenne X, Mismetti P, Laporte S. Prevalence of poor biological response to clopidogrel. *Thromb Haemost.* 2012;107(03):494-506.
95. Michelson AD, Linden MD, Barnard MR, Furman MI, Frelinger AL. Chapter 30 - flow cytometry. In: Michelson AD, editor. *Platelets (second edition)*. Burlington: Academic Press; 2007. p. 545-63.
96. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2009;19(1):3-10.
97. Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, Pohlmann J, Roehrig S, Schlemmer KH, Straub A. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent bay 59-7939--an oral, direct factor xa inhibitor. *J Thromb Haemost.* 2005;3(3):514-21.
98. Helbing T, Bode C, Moser M. [rivaroxaban in the prevention and treatment of thromboembolic disorders]. *Hamostaseologie.* 2012;32(3):195-202.
99. Borst O, Münzer P, Alnaggar N, Geue S, Tegtmeyer R, Rath D, Droppa M, Seizer P, Heitmeier S, Heemskerk JWM, Jennings LK, Storey RF, Angiolillo DJ, Rocca B, Spronk H, Ten Cate H, Gawaz M, Geisler T. Inhibitory mechanisms of very low-dose rivaroxaban in non-st-elevation myocardial infarction. *Blood Adv.* 2018;2(6):715-30.

100. Graff J, von Hentig N, Misselwitz F, Kubitzka D, Becka M, Breddin HK, Harder S. Effects of the oral, direct factor xa inhibitor rivaroxaban on platelet-induced thrombin generation and prothrombinase activity. *J Clin Pharmacol.* 2007;47(11):1398-407.
101. Bratseth V, Pettersen A, Opstad TB, Arnesen H, Seljeflot I. Markers of hypercoagulability in cad patients. Effects of single aspirin and clopidogrel treatment. *Thromb J.* 2012;10(1):12. DOI: 10.1186/1477-9560-10-12
102. Boussofara A, Laroussi L, Baccouche H, Bennour E, Kasbaoui S, Triki H, Zied EH, Kammoun I, Halima AB, Addad F, Marrakchi S, Romdhane NB, Kachboura S. Impact of aspirin regimen on thrombin generation in diabetic patients with acute coronary syndrome: Carthage-acs trial. *Eur J Clin Pharmacol.* 2021;77:517-26. DOI: 10.1007/s00228-020-02969-y
103. Mobarrez F, He S, Brøijersen A, Wiklund B, Antovic A, Antovic J, Egberg N, Jørneskog G, Wallén H. Atorvastatin reduces thrombin generation and expression of tissue factor, p-selectin and gpiia on platelet-derived microparticles in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Thromb Haemost.* 2011;106(2):344-52.
104. Undas A, Celinska-Löwenhoff M, Brummel-Ziedins KE, Brozek J, Szczeklik A, Mann KG. Simvastatin given for 3 days can inhibit thrombin generation and activation of factor v and enhance factor va inactivation in hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(7):1524-5.
105. Musiał J, Undas A, Undas R, Brozek J, Szczeklik A. Treatment with simvastatin and low-dose aspirin depresses thrombin generation in patients with coronary heart disease and borderline-high cholesterol levels. *Thromb Haemost.* 2001;85(2):221-5.
106. Berezovskaya G, Smirnova O, Malev E, Khromov-Borisov N, Klokova E, Karpenko M, Papayan L, Petrishchev N. Thrombin generation test for evaluation of antiplatelet treatment in patients with coronary artery disease after percutaneous coronary intervention. *Platelets.* 2018;29(2):185-91.
107. Ten Cate H, Hemker HC. Thrombin generation and atherothrombosis: What does the evidence indicate? *J Am Heart Assoc.* 2016;5(8). DOI: 10.1161/JAHA.116.003553
108. Ay C, Dunkler D, Simanek R, Thaler J, Koder S, Marosi C, Zielinski C, Pabinger I. Prediction of venous thromboembolism in patients with cancer by measuring thrombin generation: Results from the vienna cancer and thrombosis study. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):2099-103.
109. Gremmel T, Koppensteiner R, Ay C, Panzer S. Residual thrombin generation potential is inversely linked to the occurrence of atherothrombotic events in patients with peripheral arterial disease. *Eur J Clin Invest.* 2014;44(3):319-24.
110. Loeffen R, van Oerle R, Leers MP, Kragten JA, Crijns H, Spronk HM, Ten Cate H. Factor xia and thrombin generation are elevated in patients with acute coronary syndrome and predict recurrent cardiovascular events. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158355. DOI: 10.1371/journal.pone.0158355
111. Panova-Noeva M, van der Meijden PEJ, Ten Cate H. Clinical applications, pitfalls, and uncertainties of thrombin generation in the presence of platelets. *J Clin Med.* 2019;9(1). DOI: 10.3390/jcm9010092
112. Nehaj F, Sokol J, Ivankova J, Mokan M, Kovar F, Stasko J, Mokan M. First evidence: Trap-induced platelet aggregation is reduced in patients receiving xabans. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018;24(6):914-9.
113. Petzold T, Thienel M, Dannenberg L, Mourikis P, Helten C, Ayhan A, M'Pembele R, Achilles A, Trojovky K, Konsek D, Zhang Z, Regenauer R, Pircher J, Ehrlich A, Lüsebrink E, Nicolai L, Stocker TJ, Brandl R, Röschenthaler F, Strecker J, Saleh I, Spannagl M, Mayr CH, Schiller HB, Jung C, Gerdes N, Hoffmann T, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Schulz C, Kelm

- M, Polzin A. Rivaroxaban reduces arterial thrombosis by inhibition of fxa-driven platelet activation via protease activated receptor-1. *Circ Res.* 2020;126(4):486-500.
114. Murphy PT, Grace S, Glavey S, Quinn J. Rivaroxaban may increase platelet activation in vivo via thromboxane a₂. *Circ Res.* 2019;125(2):e9. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315453
115. Achilles A, Mohring A, Dannenberg L, Grandoch M, Hohlfeld T, Fischer JW, Levkau B, Kelm M, Zeus T, Polzin A. Dabigatran enhances platelet reactivity and platelet thrombin receptor expression in patients with atrial fibrillation. *J Thromb Haemost.* 2017;15(3):473-6.
116. Pourtau L, Sellal JM, Lacroix R, Poncelet P, Bernus O, Clofent-Sanchez G, Hocini M, Haïssaguerre M, Dignat-George F, Sacher F, Nurden P. Platelet function and microparticle levels in atrial fibrillation: Changes during the acute episode. *Int J Cardiol.* 2017;243:216-22.
117. Jourdi G, Bachelot-Loza C, Mazoyer E, Poirault-Chassac S, Duchemin J, Fontenay M, Gaussem P. Effect of rivaroxaban and dabigatran on platelet functions: In vitro study. *Thromb Res.* 2019;183:159-62.
118. Olivier CB, Weik P, Meyer M, Weber S, Diehl P, Bode C, Moser M, Zhou Q. Dabigatran and rivaroxaban do not affect aa- and adp-induced platelet aggregation in patients receiving concomitant platelet inhibitors. *J Thromb Thrombolysis.* 2016;42(2):161-6.
119. Gremmel T, Kopp CW, Seidinger D, Koppensteiner R, Steiner S, Panzer S. Impact of diabetes on platelet activation in different manifestations of atherosclerosis. *Swiss Med Wkly.* 2013;143:w13800. DOI: 10.4414/smw.2013.13800
120. Gremmel T, Xhelili E, Steiner S, Koppensteiner R, Kopp CW, Panzer S. Response to antiplatelet therapy and platelet reactivity to thrombin receptor activating peptide-6 in cardiovascular interventions: Differences between peripheral and coronary angioplasty. *Atherosclerosis.* 2014;232(1):119-24.
121. Spiliopoulos S, Pastromas G, Katsanos K, Kitrou P, Karnabatidis D, Siablis D. Platelet responsiveness to clopidogrel treatment after peripheral endovascular procedures: The preclop study: Clinical impact and optimal cutoff value of on-treatment high platelet reactivity. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(24):2428-34.
122. Moshfegh K, Redondo M, Julmy F, Wuillemin WA, Gebauer MU, Haerberli A, Meyer BJ. Antiplatelet effects of clopidogrel compared with aspirin after myocardial infarction: Enhanced inhibitory effects of combination therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(3):699-705.
123. Armstrong PC, Dhanji AR, Tucker AT, Mitchell JA, Warner TD. Reduction of platelet thromboxane a₂ production ex vivo and in vivo by clopidogrel therapy. *J Thromb Haemost.* 2010;8(3):613-5.
124. Cacoub PP, Bhatt DL, Steg PG, Topol EJ, Creager MA. Patients with peripheral arterial disease in the charisma trial. *Eur Heart J.* 2009;30(2):192-201.
125. Geisler T, Gawaz M. [resistance to antiplatelet substances--a real clinical problem]. *Herz.* 2008;33(4):260-8.
126. Leunissen TC, Peeters Weem SM, Urbanus RT, den Ruijter HM, Moll FL, Asselbergs FW, de Borst GJ. High on-treatment platelet reactivity in peripheral arterial disease: A pilot study to find the optimal test and cut off values. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016;52(2):198-204.
127. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, Bhatt DL, Cattaneo M, Collet JP, Cuisset T, Gachet C, Montalescot G, Jennings LK, Kereiakes D, Sibbing D, Trenk D, Van Werkum JW, Paganelli F, Price MJ, Waksman R, Gurbel PA. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(12):919-33.
128. Wisman PP, Roest M, Asselbergs FW, de Groot PG, Moll FL, van der Graaf Y, de Borst GJ. Platelet-reactivity tests identify patients at risk of secondary cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2014;12(5):736-47.

129. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Beinart R, Goldenberg I, Novikov I, Pres H, Savion N, Varon D, Hod H. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109(25):3171-5.
130. Pastromas G, Spiliopoulos S, Katsanos K, Diamantopoulos A, Kitrou P, Karnabatidis D, Siablis D. Clopidogrel responsiveness in patients undergoing peripheral angioplasty. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2013;36(6):1493-9.
131. Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, Boyer C, Panagides D, Wittenberg O, Simeoni MC, Barragan P, Dignat-George F, Paganelli F. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: A multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(14):1404-11.
132. Mega JL, Hochholzer W, Frelinger AL, 3rd, Kluk MJ, Angiolillo DJ, Kereiakes DJ, Isserman S, Rogers WJ, Ruff CT, Contant C, Pencina MJ, Scirica BM, Longtine JA, Michelson AD, Sabatine MS. Dosing clopidogrel based on cyp2c19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *JAMA*. 2011;306(20):2221-8.
133. Dridi NP, Johansson PI, Clemmensen P, Stissing T, Radu MD, Qayyum A, Pedersen F, Helqvist S, Saunamäki K, Kelbæk H, Jørgensen E, Engstrøm T, Holmvang L. Prasugrel or double-dose clopidogrel to overcome clopidogrel low-response--the tailor (thrombocytes and individualization of oral antiplatelet therapy in percutaneous coronary intervention) randomized trial. *Platelets*. 2014;25(7):506-12.
134. Gan XD, Wei BZ, Fang D, Fang Q, Li KY, Ding SL, Peng S, Wan J. Efficacy and safety analysis of new p2y12 inhibitors versus clopidogrel in patients with percutaneous coronary intervention: A meta-analysis. *Current medical research and opinion*. 2015;31(12):2313-23.
135. Cayla G, Cuisset T, Silvain J, Leclercq F, Manzo-Silberman S, Saint-Etienne C, Delarche N, Bellemain-Appaix A, Range G, El Mahmoud R, Carrié D, Belle L, Souteyrand G, Aubry P, Sabouret P, du Fretay XH, Beygui F, Bonnet JL, Lattuca B, Pouillot C, Varenne O, Boueri Z, Van Belle E, Henry P, Motreff P, Elhadad S, Salem JE, Abtan J, Rousseau H, Collet JP, Vicaut E, Montalescot G. Platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy in elderly patients stented for an acute coronary syndrome (antarctic): An open-label, blinded-endpoint, randomised controlled superiority trial. *Lancet*. 2016;388(10055):2015-22.
136. Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, Tanguay JF, Angiolillo DJ, Spriggs D, Puri S, Robbins M, Garratt KN, Bertrand OF, Stillabower ME, Aragon JR, Kandzari DE, Stinis CT, Lee MS, Manoukian SV, Cannon CP, Schork NJ, Topol EJ. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: The gravitas randomized trial. *JAMA*. 2011;305(11):1097-105.
137. Montalescot G, Rangé G, Silvain J, Bonnet JL, Boueri Z, Barthélémy O, Cayla G, Belle L, Van Belle E, Cuisset T, Elhadad S, Pouillot C, Henry P, Motreff P, Carrié D, Rousseau H, Aubry P, Monségu J, Sabouret P, O'Connor SA, Abtan J, Kerneis M, Saint-Etienne C, Beygui F, Vicaut E, Collet JP. High on-treatment platelet reactivity as a risk factor for secondary prevention after coronary stent revascularization: A landmark analysis of the arctic study. *Circulation*. 2014;129(21):2136-43.
138. Siller-Matula JM, Francesconi M, Dechant C, Jilma B, Maurer G, Delle-Karth G, Gouya G, Ruzicka K, Podczeck-Schweighofer A, Christ G. Personalized antiplatelet treatment after percutaneous coronary intervention: The madonna study. *Int J Cardiol*. 2013;167(5):2018-23.

8. Anhang

8.1 Messergebnisse der Thrombingenerierung im CAT

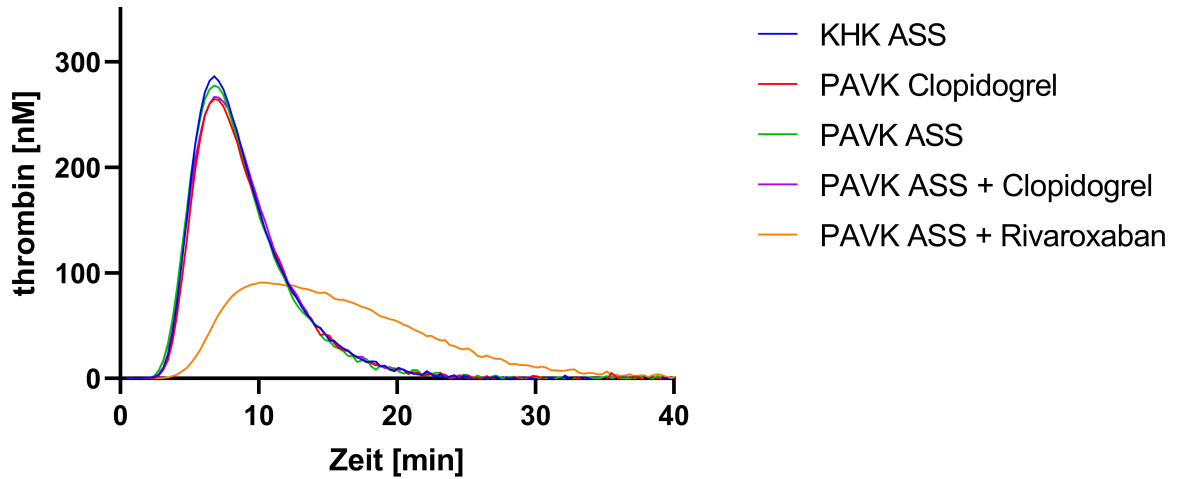


Abbildung 36: Thrombogramm PFP nach Zugabe von TF.

Abbildung 36 zeigt die gebildete Menge Thrombin [nM] in Abhängigkeit der Zeit [min] im plättchenfreien Plasma nach Zugabe von *tissue factor* (TF).

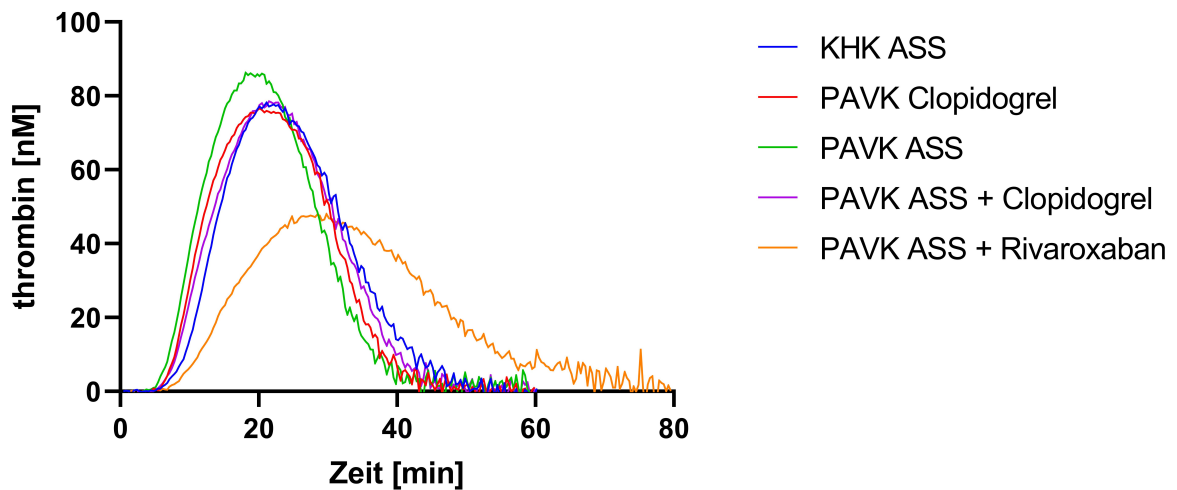


Abbildung 37: Thrombogramm PRP nach Zugabe von TF.

Abbildung 37 zeigt die gebildete Menge Thrombin [nM] in Abhängigkeit der Zeit [min] im plättchenreichen Plasma nach Zugabe von *tissue factor* (TF).

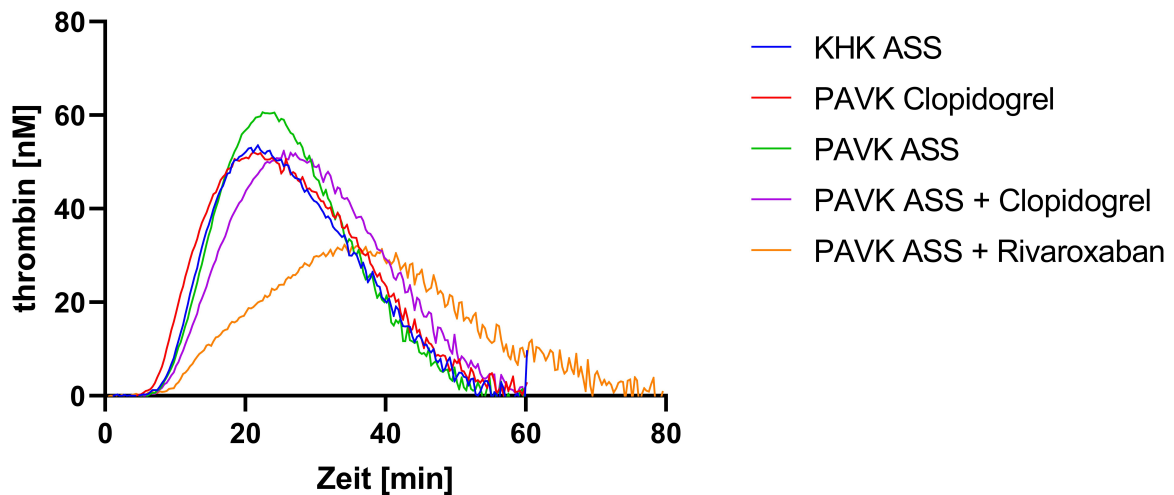


Abbildung 38: Thrombogramm PRP nach Zugabe von Thrombin.

Abbildung 38 zeigt die gebildete Menge Thrombin [nM] in Abhängigkeit der Zeit [min] im plättchenfreien Plasma nach Zugabe von Thrombin.

8.2 Ergebnisse der Analyse der Hauptrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche

Tabelle 16: Hauptrezeptorpräsentation auf der Thrombozytenoberfläche.

Angegeben ist der Median sowie das 1. und 3. Quartil für die im Durchflusszytometer gemessenen ABS auf der Thrombozytenoberfläche exprimierter Rezeptoren.

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** beschreibt die beiden Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel.

Abkürzungen in Tabelle 16: CD: *Cluster of differentiation*, GP: Glykoprotein.

A

Antikörper gegen	PAVK ASS	PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS + Rivaroxaban
GPIIb/IIIa (P2)	64876,57 (61136,26; 80416,67)	64787,51 (60446,08; 74783,94)	69329,32 (67748,59; 73826,60)
GPIb (SZ2)	13310,23 (11876,34; 13715,46)	12873,83 (11907,51; 15585,75)	13497,26 (12468,60; 15351,96)
CD42a (Beb1)	23852,75 (19230,12; 26133,24)	22188,60 (17319,44; 25732,61)	23174,76 (21202,44; 24407,46)
CD29 (K20)	7550,79 (6772,53; 8080,67)	7617,03 (7020,91; 8544,32)	7153,38 (6772,53; 7617,03)
CD41 (SZ22)	7197,08 (5620,86; 10171,08)	7851,36 (4639,44; 9635,76)	8386,68 (6334,62; 12788,20)
CD61 (RUU-PL 7F12)	62020,30 (50825,30; 69409,00)	62132,25 (38790,68; 71424,10)	60117,15 (48922,15; 75342,35)
CD36 (FA6.162)	23966,10 (17395,65; 35739,90)	22654,80 (18400,05; 30452,85)	24468,30 (15986,70; 36604,80)
GPVI (HY101)	12814,26 (11005,98; 13517,48)	11452,47 (10101,84; 12579,86)	11430,14 (10034,86; 12356,61)
CD36 (185 1G2)	36453,36 (29380,32; 53002,46)	38448,32 (29471,00; 56493,64)	37541,52 (24982,34; 52367,70)

B

Antikörper gegen	KHK ASS	PAVK Clopidogrel
GPIIb/IIIa (P2)	65811,65 (59711,38; 68349,71)	66212,39 (60824,57; 80127,24)
GPIb (SZ2)	13154,37 (11673,73; 15570,16)	12936,17 (12390,67; 14120,69)
CD42a (Beb1)	22373,51 (19661,57; 26040,79)	23667,84 (22219,42; 26009,97)
CD29 (K20)	6954,68 (6358,56; 7318,97)	6557,27 (5596,86; 8163,46)
CD41 (SZ22)	6185,92 (4579,96; 8208,24)	7316,04 (4371,78; 9576,28)
CD61 (RUU-PL 7F12)	55191,35 (52672,48; 59893,25)	58549,85 (50321,53; 74838,58)
CD36 (FA6.162)	18274,50 (16474,95; 24231,15)	23380,20 (19251,00; 25361,10)
GPVI (HY101)	11898,96 (10436,70; 13327,73)	10581,81 (9733,48; 13807,70)
CD36 (185 1G2)	32463,44 (29516,34; 37496,18)	37632,20 (32962,18; 41395,42)

Tabelle 17: Vergleich der Hauptrezeptorpräsentation auf der Thrombozytenoberfläche.

Angegeben ist der p Wert für den Vergleich der Hauptrezeptorpräsentation auf der Thrombozytenoberfläche teilnehmender Probanden. Innerhalb der Studiengruppe wurde zur statistischen Auswertung der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Beim Vergleich zwischen der Studien- und Kontrollgruppe bzw. innerhalb der beiden Kontrollgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A beschreibt den Vergleich innerhalb der Studiengruppe sowie zwischen den beiden Kontrollgruppen. **B** und **C** vergleicht die beiden Kontrollgruppen mit der Studiengruppe unter verschiedenen Therapieregimen.

Abkürzungen in Tabelle 17: CD: *Cluster of differentiation*, GP: Glykoprotein.

A

Antikörper gegen	PAVK ASS vs. PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS vs. PAVK ASS + Rivaroxaban	PAVK ASS + Clopidogrel vs. PAVK ASS + Rivaroxaban	KHK ASS vs. PAVK Clopidogrel
GPIIb/IIIa (P2)	0,625	0,492	0,232	0,481
GPIb (SZ2)	0,541	0,371	0,910	0,684
CD42a (Beb1)	0,232	0,557	0,375	0,393
CD29 (K20)	0,365	0,574	0,041	0,796
CD41 (SZ22)	0,520	0,426	0,416	0,393
CD61 (RUU-PL 7F12)	0,275	0,426	0,322	0,631
CD36 (FA6.162)	0,719	0,557	0,492	0,247
GPVI (HY101)	0,084	0,092	0,846	0,631
CD36 (185 1G2)	0,432	1,000	0,039	0,143

B

Antikörper gegen	KHK ASS vs. PAVK ASS	PAVK Clopidogrel vs. PAVK ASS	KHK ASS vs. PAVK ASS + Clopidogrel
GPIIb/IIIa (P2)	0,631	0,912	0,813
GPIb (SZ2)	0,796	0,912	0,870
CD42a (Beb1)	0,853	0,853	0,739
CD29 (K20)	0,105	0,353	0,034
CD41 (SZ22)	0,247	0,853	0,224
CD61 (RUU-PL 7F12)	0,481	0,853	0,739
CD36 (FA6.162)	0,218	0,853	0,190
GPVI (HY101)	0,436	0,315	0,543
CD36 (185 1G2)	0,393	0,971	0,239

C

Antikörper gegen	PAVK Clopidogrel vs. PAVK ASS + Clopidogrel	KHK ASS vs. PAVK ASS + Rivaroxaban	PAVK Clopidogrel vs. PAVK ASS + Rivaroxaban
GPIIb/IIIa (P2)	0,579	0,045	0,670
GPIb (SZ2)	0,971	0,838	0,469
CD42a (Beb1)	0,256	1,000	0,481
CD29 (K20)	0,183	0,362	0,481
CD41 (SZ22)	0,868	0,055	0,325
CD61 (RUU-PL 7F12)	0,853	0,726	0,912
CD36 (FA6.162)	1,000	0,247	0,811
GPVI (HY101)	0,985	0,436	0,837
CD36 (185 1G2)	0,912	0,393	0,912

8.3 Ergebnisse der TZ-Funktionsanalyse

8.3.1 CD62P

Tabelle 18: Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten in aufsteigender Konzentration.

Angegeben ist der Median sowie das 1. und 3. Quartil für die im Durchflusszytometer gemessene Fluoreszenzintensität der CD62P-Antikörperbindung.

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** beschreibt die beiden Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel.

A

CD62P	PAVK ASS	PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS + Rivaroxaban
<i>TRAP-6</i> [μ M]			
0	11,50 (10,25; 13,25)	8,50 (7,00; 10,25)	11,00 (8,00; 14,00)
6,5	77,00 (37,75; 85,75)	41,50 (39,50; 48,00)	66,00 (47,75; 75,25)
12,5	116,50 (97,00; 139,00)	88,50 (73,75; 108,00)	91,50 (83,75; 117,80)
25	129,50 (120,80; 161,80)	113,50 (95,50; 131,80)	133,50 (113,80; 143,80)

<i>Thrombin [U/ml]</i>			
0	11,50 (10,25; 13,25)	8,50 (7,00; 10,25)	11,00 (8,00; 14,00)
0,05	63,00 (42,00; 89,50)	36,00 (23,75; 48,00)	47,50 (28,75; 67,75)
0,1	124,00 (94,75; 134,3)	71,50 (50,25; 103,30)	109,50 (89,75; 128,30)
0,2	151,50 (125,50; 169,80)	107,00 (97,25; 135,80)	132,50 (126,50; 145,50)
<i>Convulxin [ng/ml]</i>			
0	11,50 (10,25; 13,25)	8,50 (7,00; 10,25)	11,00 (8,00; 14,00)
2,5	63,50 (29,50; 102,80)	37,50 (24,75; 57,75)	64,00 (45,00; 70,25)
5	101,00 (83,00; 141,80)	69,00 (38,75; 79,25)	95,50 (79,75; 109,80)
20	151,00 (135,80; 168,80)	130,00 (117,30; 144,50)	143,50 (130,80; 166,30)
<i>Arachidonsäure [µM]</i>			
0	11,50 (10,25; 13,25)	8,50 (7,00; 10,25)	11,00 (8,00; 14,00)
0,5	37,50 (29,00; 48,50)	28,00 (23,00; 42,00)	33,50 (23,50; 59,00)
1	72,00 (49,00; 77,75)	65,00 (47,00; 75,50)	72,00 (49,50; 90,50)
2	112,50 (70,25; 142,50)	104,50 (63,00; 119,30)	83,50 (60,75; 114,80)
<i>Adenosindiphosphat [µM]</i>			
0	11,50 (10,25; 13,25)	8,50 (7,00; 10,25)	11,00 (8,00; 14,00)
0,125	16,50 (14,00; 19,75)	9,50 (7,00; 12,50)	14,50 (11,00; 19,00)
0,25	20,50 (12,75; 25,00)	10,00 (8,00; 14,25)	17,50 (14,00; 23,25)
0,75	29,50 (26,75; 33,75)	13,00 (9,75; 17,00)	28,00 (19,50; 31,00)

B

CD62P	KHK ASS	PAVK Clopidogrel
<i>TRAP-6 [µM]</i>		
0	11,00 (7,75; 12,75)	10,50 (8,75; 13,25)
6,5	41,00 (32,75; 85,25)	33,50 (21,75; 41,25)
12,5	95,00 (75,75; 110,30)	71,00 (45,5; 81,25)
25	125,00 (108,50; 133,80)	105,00 (79,75; 130,00)
<i>Thrombin [U/ml]</i>		
0	11,00 (7,75; 12,75)	10,50 (8,75; 13,25)
0,05	35,00 (26,75; 48,50)	38,00 (28,25; 53,25)
0,1	86,50 (76,50; 102,30)	73,50 (60,00; 95,50)
0,2	118,50 (111,50; 134,00)	98,50 (90,75; 134,80)
<i>Convulxin [ng/ml]</i>		
0	11,00 (7,75; 12,75)	10,50 (8,75; 13,25)
2,5	49,00 (27,75; 54,50)	35,00 (28,00; 47,00)
5	71,00 (51,25; 84,50)	63,00 (43,50; 72,00)
20	131,00 (116,80; 159,00)	128,00 (104,00; 145,50)
<i>Arachidonsäure [µM]</i>		
0	11,00 (7,75; 12,75)	10,50 (8,75; 13,25)
0,5	28,50 (25,25; 44,25)	38,50 (25,75; 48,50)
1	73,50 (59,75; 99,50)	67,00 (41,00; 81,25)
2	103,5 (91,5; 113)	67 (51,75; 100,8)
<i>Adenosindiphosphat [µM]</i>		
0	11 (7,75; 12,75)	10,5 (8,75; 13,25)
0,125	13,5 (9,5; 16,25)	13 (11,75; 14,25)
0,25	17,5 (11,75; 19,5)	12,5 (12; 14)
0,75	25 (16; 29,25)	16 (15; 19,25)

8.3.2 GPIIb/IIIa

Tabelle 19: Thrombozytäre GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten in aufsteigender Konzentration.

Angegeben ist der Median sowie das 1. und 3. Quartil für die im Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzintensität der PAC-1 Antikörperbindung.

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** beschreibt die beiden Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel.

A

aktiviertes GPIIb/IIIa	PAVK ASS	PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS + Rivaroxaban
<i>TRAP-6 [µM]</i>			
0	9,00 (6,00; 12,75)	7,50 (5,75; 9,00)	12,00 (10,50; 14,25)
6,5	115,50 (92,75; 137,80)	40,00 (22,50; 70,25)	87,50 (58,25; 110,00)
12,5	134,00 (95,75; 150,50)	67,00 (35,25; 113,80)	133,00 (101,50; 146,30)
25	136,50 (87,00; 155,00)	79,50 (40,75; 100,30)	130,50 (119,00; 136,50)
<i>Thrombin [U/ml]</i>			
0	9,00 (6,00; 12,75)	7,50 (5,75; 9,00)	12,00 (10,50; 14,25)
0,05	91,00 (38,50; 136,80)	26,00 (10,75; 81,00)	122,00 (80,00; 159,80)
0,1	145,00 (115,00; 172,00)	80,00 (37,25; 118,50)	150,50 (119,50; 178,30)
0,2	179,00 (133,00; 202,00)	106,00 (59,50; 156,80)	195,50 (129,00; 203,50)
<i>Convulxin [ng/ml]</i>			
0	9,00 (6,00; 12,75)	7,50 (5,75; 9,00)	12,00 (10,50; 14,25)
2,5	75,50 (62,00; 151,80)	47,50 (22,50; 88,00)	109,50 (87,50; 138,80)
5	130,50 (87,50; 176,80)	67,50 (50,25; 136,00)	126,50 (112,00; 172,80)
20	178,50 (166,00; 199,00)	129,00 (110,80; 172,00)	165,50 (125,50; 214,80)
<i>Arachidonsäure [µM]</i>			
0	9,00 (6,00; 12,75)	7,50 (5,75; 9,00)	12,00 (10,50; 14,25)
0,5	61,50 (46,00; 78,75)	38,00 (26,50; 49,00)	60,00 (52,25; 65,00)
1	74,50 (32,25; 102,80)	41,00 (32,75; 67,00)	45,00 (27,50; 61,25)
2	15,00 (11,50; 23,00)	14,50 (6,50; 16,25)	11,00 (6,50; 26,00)
<i>Adenosindiphosphat [µM]</i>			
0	9,00 (6,00; 12,75)	7,50 (5,75; 9,00)	12,00 (10,50; 14,25)
0,125	78,00 (48,75; 90,25)	28,00 (13,75; 47,25)	53,50 (40,25; 75,50)
0,25	77,50 (60,50; 104,80)	33,00 (17,75; 51,00)	77,50 (63,50; 91,00)
0,75	107,00 (97,00; 145,80)	52,50 (34,00; 69,25)	112,00 (71,50; 123,50)

B

aktiviertes GPIIb/IIIa	KHK ASS	PAVK Clopidogrel
<i>TRAP-6 [µM]</i>		
0	11,00 (9,75; 13,00)	8,50 (5,75; 10,50)
6,5	102,00 (69,25; 124,80)	28,00 (18,50; 50,00)
12,5	144,50 (93,25; 166,30)	67,50 (32,25; 96,75)
25	136,50 (107,00; 181,30)	70,50 (40,75; 109,30)
<i>Thrombin [U/ml]</i>		
0	11,00 (9,75; 13,00)	8,50 (5,75; 10,50)
0,05	54,50 (18,00; 76,50)	26,50 (14,75; 46,75)
0,1	133,50 (116,80; 196,00)	76,50 (49,25; 92,00)
0,2	176,50 (143,30; 232,00)	118,50 (61,00; 157,50)

<i>Convulxin [ng/ml]</i>		
0	11,00 (9,75; 13,00)	8,50 (5,75; 10,50)
2,5	68,50 (45,00; 113,00)	27,50 (17,25; 42,00)
5	129,50 (92,50; 173,00)	46,50 (37,75; 114,80)
20	174,50 (155,30; 214,80)	134,00 (93,00; 169,80)
<i>Arachidonsäure [µM]</i>		
0	11,00 (9,75; 13,00)	8,50 (5,75; 10,50)
0,5	58,00 (54,00; 78,25)	45,50 (31,25; 66,75)
1	47,50 (34,75; 62,00)	47,50 (20,00; 62,25)
2	12,50 (8,50; 17,50)	23,00 (16,25; 32,50)
<i>Adenosindiphosphat [µM]</i>		
0	11,00 (9,75; 13,00)	8,50 (5,75; 10,50)
0,125	56,50 (19,00; 87,50)	17,50 (8,75; 29,00)
0,25	65,00 (40,75; 97,75)	27,00 (20,25; 40,25)
0,75	106,00 (82,00; 125,00)	43,50 (26,50; 59,25)

8.3.3 Mepacrine

Tabelle 20: Thrombozytäre Mepacrine Aufnahme und Freisetzung basal und nach Aktivierung mit Thrombozytenagonisten in aufsteigender Konzentration.

Angegeben ist der Median sowie das 1. und 3. Quartil für die im Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzintensität der Mepacrineaufnahme.

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** beschreibt die beiden Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel.

A

Mepacrine	PAVK ASS	PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS + Rivaroxaban
<i>Thrombin [U/ml]</i>			
0	50,00 (47,00; 62,25)	57,50 (47,00; 61,75)	49,00 (45,25; 56,00)
0,05	41,50 (35,00; 51,00)	51,50 (45,25; 53,25)	43,00 (36,50; 46,00)
0,1	29,00 (26,00; 39,25)	40,50 (34,25; 50,00)	32,00 (26,50; 37,00)
0,2	19,50 (17,50; 27,00)	32,00 (24,75; 37,50)	23,00 (17,50; 24,00)
<i>Convulxin [ng/ml]</i>			
0	50,00 (47,00; 62,25)	57,50 (47,00; 61,75)	49,00 (45,25; 56,00)
2,5	46,00 (32,75; 50,75)	51,00 (42,00; 57,25)	42,00 (37,75; 49,25)
5	38,50 (25,00; 42,25)	42,50 (38,75; 53,00)	35,50 (30,25; 41,25)
20	14,50 (12,25; 23,50)	22,50 (19,75; 31,00)	15,50 (13,75; 19,00)

B

Mepacrine	KHK ASS	PAVK Clopidogrel
<i>Thrombin [U/ml]</i>		
0	46,50 (38,00; 56,25)	45,50 (38,25; 62,00)
0,05	41,00 (34,50; 46,50)	44,00 (33,75; 53,50)
0,1	31,00 (25,50; 39,25)	37,50 (31,50; 47,25)
0,2	23,00 (19,00; 28,50)	28,00 (22,00; 33,75)

<i>Convulxin [ng/ml]</i>		
0	46,50 (38,00; 56,25)	45,50 (38,25; 62,00)
2,5	41,00 (37,00; 50,25)	42,50 (35,50; 51,50)
5	36,00 (33,50; 41,75)	38,00 (31,00; 46,75)
20	18,50 (15,00; 22,25)	25,50 (18,25; 28,75)

8.4 Ergebnisse des VASP Assays

Tabelle 21: Einzelmessergebnisse der VASP Phosphorylierung.

Darstellung des Thrombozyten-Reaktivitätsindex (PRI) der einzelnen Probanden.

A zeigt die Studiengruppe unter den Therapieregimen ASS, ASS + Clopidogrel und ASS + Rivaroxaban. **B** beschreibt die beiden Kontrollgruppen KHK ASS und PAVK Clopidogrel.

A

Proband	Parameter	PAVK ASS	PAVK ASS + Clopidogrel	PAVK ASS + Rivaroxaban
1	PRI [%]	79,66	23,40	94,87
2	PRI [%]	75,64	26,67	83,33
3	PRI [%]	81,40	51,22	90,57
4	PRI [%]	85,71	47,73	89,23
5	PRI [%]	83,91	63,33	91,36
6	PRI [%]	90,00	6,10	84,55
7	PRI [%]	85,00	85,00	83,15
8	PRI [%]	87,50	12,40	84,55
9	PRI [%]	85,89	34,42	76,23
10	PRI [%]	60,00	50,39	84,68

B

Proband	Parameter	KHK ASS	PAVK Clopidogrel
1	PRI [%]	91,45	60,00
2	PRI [%]	89,83	51,39
3	PRI [%]	89,12	9,33
4	PRI [%]	83,33	72,97
5	PRI [%]	84,76	34,27
6	PRI [%]	88,41	12,61
7	PRI [%]	90,20	9,79
8	PRI [%]	78,26	33,33
9	PRI [%]	97,30	0
10	PRI [%]	85,42	62,26

Danksagung

Lebenslauf