

DISSERTATION

**PAR1-vermittelte Interaktion von Gerinnungs- und Immunsystem in der Pathophysiologie
von Vorhofflimmern / PAR1-mediated interaction of the coagulation and immune system
in the pathophysiology of atrial fibrillation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Max Wegner

Erstbetreuer: PD Dr. med. Julian Friebe

Datum der Promotion: 20. Juni 2025

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden vorab in folgenden Artikeln veröffentlicht:

- Friebel J, Witkowski M, Wegner M, Blöbaum L, Lammel S, Schencke PA, Jakobs K, Puccini M, Reißner D, Steffens D, Moos V, Schutheiss HP, Landmesser U, Rauch U. Cytotoxic CD8+ T Cells Are Involved in the Thrombo-Inflammatory Response during First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *Cells*. 2022 (1).
- Blöbaum L, Witkowski M, Wegner M, Lammel S, Schencke PA, Jakobs K, Puccini M, Reißner D, Steffens D, Landmesser U, Rauch U, Friebel J. Intestinal Barrier Dysfunction and Microbial Translocation in Patients with First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *Biomedicines*. 2023 (2).
- Friebel J, Wegner M, Blöbaum L, Schencke P-A, Jakobs K, Puccini M, Ghanbari E, Lammel S, Thevathasan T, Moos V, Witkowski M, Landmesser U, Rauch-Kröhnert U. Characterization of Thrombo-inflammation in Patients with First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 (3).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	4
1. Abstract.....	6
1.1. In deutscher Sprache.....	6
1.2. In englischer Sprache.....	7
2. Einleitung.....	9
2.1. Definition und Diagnosekriterien von VHF.....	9
2.2. Epidemiologie von Vorhofflimmern.....	10
2.3. Klassifikation.....	11
2.4. Klinische Präsentation von Vorhofflimmern.....	13
2.5. Aktuelle Therapiekonzepte.....	13
2.6. Vorhofflimmern und Schlaganfall.....	15
2.6.1. CHA ₂ DS ₂ -VASc-Score.....	15
2.6.2. Orale Antikoagulanzen.....	17
2.7. Allgemeine Komplikationen von VHF.....	18
2.8. Pathophysiologie von Vorhofflimmern.....	19
2.8.1. Atriale Fibrose.....	19
2.8.2. Inflammation und VHF.....	21
2.8.3. Hyperkoagulabilität bei VHF.....	22
2.9. Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR).....	23
2.9.1. Struktur und Funktionsweise von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR).....	23
2.9.2. Biased Signalling von PARs.....	24
2.9.3. PAR bei VHF.....	25
2.9.4. PAR1 und PAR2 auf zirkulierenden Immunzellen.....	27

2.9.5.	PAR1/PAR2 und das Herz	28
2.9.6.	Einfluss von PAR1/2 auf atriale Inflammation und Remodelling	28
2.9.7.	PAR und Atherosklerose	29
2.9.8.	PARs und NOAKs	29
2.10.	Fragestellung.....	30
3.	Material und Methodik	33
3.1.	Patientenkohorten	33
3.3.	Blutentnahme.....	37
3.4.	PBMC-Isolierung aus humanem Vollblut	37
3.5.	Durchflusszytometrie.....	40
3.6.	Quantifizierung der PAR-Genexpression.....	44
3.7.	Bestimmung der Plasmakonzentration von Galectin-3 und sST-2 mittels ELISA	48
3.8.	Quantifizierung der Atherosklerose im Gefäßultraschall	50
3.9.	Statistische Auswertung	50
4.	Ergebnisse.....	51
4.1.	Erste Kohorte: Vergleich der PAR1 und PAR2- Expression	51
4.1.1.	Untersuchte PBMC-Populationen	51
4.1.2.	Vergleich der zellulären PAR1-Rezeptormenge	52
4.1.3.	Vergleich der extrazellulären PAR1/PAR2-Ratio.....	54
4.1.4.	Quantitative Genexpression von PAR1 bei erstdiagnostiziertem VHF	55
4.2.	Erste Kohorte: Vergleich der Entzündungs-, Fibrose- und Gerinnungsmarker	57
4.2.1.	Entzündungsparameter	57
4.2.2.	Fibrosemarker.....	59
4.2.3.	Gerinnungsmarker	61
4.3.	Zweite Kohorte: PAR-gerichtete vs. –ungerichtete gerinnungsaktive Medikation.....	63
4.3.1.	Vergleich der zellulären PAR1 und PAR2-Rezeptormenge	64

4.3.2.	Vergleich peripherer Fibroseparameter.....	67
4.4.2	Vergleich der quantitativen Atherosklerose.....	68
5.	Diskussion.....	69
5.1.	Zusammenfassung	69
5.2.	Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in experimentelle Studien.....	70
5.2.1.	Fibrose-, Entzündungs- und Gerinnungsmarker sind bei frühem VHF erhöht	70
5.2.2.	PAR1 ist bei VHF im Initialstadium hochreguliert.....	73
5.2.3.	Eine erhöhtes PAR1/PAR2-Ratio könnte zu mehr kardialer Fibrose führen.....	73
5.2.4.	PAR1-Signalling ist bei VHF mit proinflammatorischen Prozessen assoziiert	76
5.2.5.	NOAK könnten über die Hochregulation von PAR2 protektiv wirken	76
5.2.6.	VKA haben keinen Effekt auf das PAR1/2-Signalling.....	77
5.3.	Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in den Kontext klinischer Studien.....	79
5.3.1.	Reduzieren Faktor-Xa-Inhibitoren das Risiko für die Entstehung von VHF?	79
5.3.2.	Dabigatranetexilat: Mehr Atherosklerose-bedingte Komplikationen?	80
5.4.	Klinische Implikationen und Ausblick	81
5.6.	Limitationen.....	82
6.	Schlussfolgerung.....	83
7.	Literaturverzeichnis	85
8.	Eidesstaatliche Versicherung.....	97
9.	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen.....	98
10.	Lebenslauf.....	99
11.	Publikationsliste	100
12.	Danksagung	101
13.	Bescheinigung des akkreditierten Statistikers	102

Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicylsäure
CD	Cluster of Differentiation
cIMT	Karotis-Intima-Media-Dicke (<i>engl.:</i> carotid Intima-Media-Thickness)
CRP	C-reaktives Protein
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie (<i>engl.:</i> <i>European Society of Cardiology</i>)
FIIa	Aktivierter (Gerinnungs-)Faktor-II (Thrombin)
FXa	Aktivierter (Gerinnungs-)Faktor-X
Gal-3	Galectin-3
IL-6	Interleukin-6
KHK	Koronare Herzkrankheit
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
NOAK	Nicht-Vitamin-K-abhängiges-Antikoagulanz
OAK	Orales Antikoagulanz
PAR	Protease aktivierter Rezeptor
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (<i>engl.:</i> <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIVKA	proteins induced by vitamin K antagonism or absence

sST2	Lösliches ST2 (<i>engl.: soluble ST2</i>)
TIA	Transitorisch ischämische Attacke
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VHF	Vorhofflimmern
VKA	Vitamin-K-Antagonist
vWF-Ag	von-Willebrandt-Faktor-Antigen
vWF-RCo	von-Willebrand-Faktor-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation von Vorhofflimmern entsprechend der ESC-Leitlinien	11
Tabelle 2: CHA ₂ DS ₂ -VASc-Score aus den ESC-Leitlinien von 2022.....	16
Tabelle 3: Protease aktivierte Rezeptoren (PAR) und ihre wichtigsten Liganden	26
Tabelle 4: Erste Kohorte: Charakteristika Patient*innen mit erstdiagnostiziertem VHF und Kontrollgruppe	34
Tabelle 5: Zweite Kohorte: Patienten mit bekanntem VHF und verschiedener gerinnungsaktiver Medikation	36
Tabelle 6: Charakteristika der verwendeten FACS- Antikörper nach Herstellerangaben.....	42
Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese	46
Tabelle 8: Hinzugefügte Komponenten für die Taqman-PCR	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich Sinusrhythmus und Vorhofflimmern im EKG	10
Abbildung 2: Klassische Zeitachse von Vorhofflimmern (VHF)	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der PAR-Aktivierung am Beispiel von PAR1	24
Abbildung 4: PAR1/2 im Zentrum der drei pathophysiologischen Komponenten von VHF	31
Abbildung 5: Schema der PBMC-Isolierung durch Dichtegradient-Zentrifugation	38
Abbildung 6: Durchschnittliche prozentuale Anteile der unterschiedlichen Zellpopulationen innerhalb der PBMC-Zellfraktion	39
Abbildung 7: Vergleich der PAR1-Expression bei neuem VHF und der Kontrollgruppe.....	53
Abbildung 8: PAR1/PAR2-Ratio auf den untersuchten Zellreihen bei der Kontrollgruppe und bei Patienten mit Erstdiagnose Vorhofflimmern.....	54
Abbildung 9: Korrelation der extrazellulären PAR-1-Rezeptordichte mit der PAR1-Genexpression bei Lymphozyten, HLA-DR+- und CD3- Zellen aus dem Plasma von Patienten mit neu diagnostiziertem Vorhofflimmern.	56
Abbildung 10: Vergleich der serologischen Entzündungswerte Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) aus dem Plasma bei Patient*innen mit Erstdiagnose Vorhofflimmern und der Kontrollgruppe.	58
Abbildung 11: Vergleich des Fibrosemarkers Galectin-3 aus dem Plasma bei Patient*innen mit Erstdiagnose Vorhofflimmern und der Kontrollgruppe.	60
Abbildung 12: Vergleich des Fibrosemarkers lösliches ST2(soluble ST2, sST2) aus dem Plasma bei Patient*innen mit Erstdiagnose Vorhofflimmern und der Kontrollgruppe	60
Abbildung 13: Vergleich von Parametern der primären thrombozytenaggregations-vermittelten Gerinnung aus dem Plasma bei Patient*innen mit Erstdiagnose Vorhofflimmern und der Kontrollgruppe.....	62
Abbildung 14: Vergleich von Parametern der sekundären plasmatischen Gerinnung bei Patient*innen mit Erstdiagnose Vorhofflimmern und der Kontrollgruppe.	63

Abbildung 15: Vergleich der PAR1-Rezeptormenge zwischen den Therapiegruppen.....	64
Abbildung 16: Vergleich der PAR1-Rezeptormenge zwischen den Therapiegruppen.....	65
Abbildung 17: Vergleich der PAR1/PAR2-Ratio zwischen den Therapiegruppen	66
Abbildung 18: Vergleich der peripheren Fibrosemarker zwischen den Therapiegruppen	67
Abbildung 19: Vergleich der cIMT zwischen den Therapiegruppen.....	68
Abbildung 20: Pathophysiologisches Dreieck bei frühem VHF mit Darstellung der Ergebnisse	75
Abbildung 21: Mögliche Auswirkungen von Antikoagulanzen auf die zelluläre Signalübertragung	78
Abbildung 22: Möglicher therapeutischer Effekt von NOAK auf das pathophysiologische Dreieck bei VHF.....	84

1. Abstract

1.1. In deutscher Sprache

Einleitung: Vorhofflimmern (VHF) ist weltweit die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung. Die Prävalenz ist weiter steigend.

Die Pathophysiologie ist komplex und noch unzureichend verstanden, woraus eine fehlende Kausaltherapie resultiert. Atherosklerose, kardiale Fibrose, sowie Hyperinflammation und -koagulation stellen in der Pathogenese jedoch eine Schlüsselrolle dar.

Die Protease-aktivierte Rezeptoren PAR1 und PAR2 scheinen hier als wichtige Schnittstelle zu wirken, über die hochregulierte Gerinnungsproteine einen proinflammatorisch und -fibrinogen bedingten Umbau am Herzen, sowie Atherosklerose begünstigen, was zu einem Fortschreiten der Erkrankung und mehr kardiovaskulären Ereignissen führt.

Nicht-Vitamin-K-abhängigen Antikoagulanzen (NOAK) scheinen über ihre antikoagulatorische Wirkung hinaus, PAR-assoziiert, protektiv auf die Pathogenese von VHF und Atherosklerose zu wirken.

Veränderungen im PAR1- und PAR2-Signalling und dessen Effekte wurden bei VHF bisher jedoch unzureichend untersucht, wobei diese insbesondere im Initialstadium von pathophysiologischer Relevanz sein dürften.

Die vorliegende Arbeit untersucht die PAR1 und PAR2-Expression, sowie dessen Effekte bei Patient*innen mit neu diagnostiziertem VHF, sowie mögliche Effekte durch den Einsatz von NOAK.

Methoden: Bei 80 Patient*innen mit erstdiagnostiziertem VHF und 20 Kontrollen ohne VHF wurde durchflusszytometrisch die PAR1- und PAR2-Rezeptorverteilung auf Peripheren Mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), sowie mittels PCR die PAR1-Genexpression quantifiziert. Im venösen Plasma wurden Entzündungs-, Gerinnungs- und Fibroseparameter untersucht.

Bei 70 Patient*innen mit bekanntem VHF wurde der Einfluss einer gerinnungsaktiven Therapie auf die PAR1-/PAR2-Rezeptormenge und auf Fibroseparameter im Blutplasma analysiert. Zusätzlich wurde sonografisch die Intima-Media-Dicke der Karotiden als Indikator für Atherosklerose ermittelt.

Ergebnisse: Bei frühem VHF besteht auf PBMCs eine erhöhte PAR1-Rezeptormenge, sowie ein erhöhtes PAR1/PAR2-Mengenverhältnis. Die PAR1-Genexpression war bei hoher PAR1-Rezeptormenge herabreguliert. Die venösen Gerinnungs- (FVIII-Aktivität, Fibrinogen, D-Dimere,

von Willebrand-Faktor-Antigen und -Ristocetin-Cofaktor-Aktivität), Inflammations- (Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- α) und Fibroseparameter (Galectin-3, sST2) zeigten sich erhöht.

Unter NOAK zeigte sich bei bekanntem VHF hingegen im Vergleich eine erhöhte PAR2-Rezeptormenge. Bei VHF-Patient*innen mit dem NOAK Dabigatranetexilat war im Gefäßultraschall mehr Atherosklerose nachweisbar.

Schlussfolgerungen: Bei frühem VHF ist ein erhöhtes PAR1-Signalling mit erhöhten Gerinnungs-, Inflammations-, und Fibroseparametern assoziiert. Dabei könnte ein verändertes Mengenverhältnis mit einer verstärkten PAR1-Dominanz gegenüber PAR2 ein profibrotisches und -inflammatorisches Signalling verursachen. Eine unter NOAK beobachtete Hochregulation von PAR2 könnte hingegen protektiv wirken.

1.2. In englischer Sprache

Introduction: Atrial fibrillation (AF) is the most common persistent cardiac arrhythmia. The prevalence continues to increase.

The pathophysiology is complex and so far insufficiently understood, which results in a lack of causal therapy. However, atherosclerosis, cardiac fibrosis, as well as hyperinflammation and coagulation play a key role in the pathogenesis.

The protease-activated receptors PAR1 and PAR2 appear to act as an important interface through which upregulated coagulation proteins promote proinflammatory and fibrotic remodeling of the heart, as well as atherosclerosis, which leads to disease progression and more cardiovascular events.

In addition to their anticoagulant effect, non-vitamin K-dependent anticoagulants (NOACs) appear to have a protective effect on the pathogenesis of AF and atherosclerosis in a PAR-associated manner.

However, in AF changes in PAR1- and PAR2- signaling and their effects have so far been insufficiently investigated, although these are likely to be of pathophysiological relevance, particularly in the initial stage.

The present work examines PAR1- and PAR2- expression and its effects in patients with newly diagnosed AF, as well as possible effects from the use of NOACs.

Methods: In 80 patients with first diagnosed AF and 20 controls without AF, the PAR1 and PAR2 receptor distribution on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was quantified using flow

cytometry, and PAR1 gene expression was quantified using PCR. Inflammation, coagulation and fibrosis parameters were examined in venous plasma.

The influence of anticoagulant therapy on the PAR1/PAR2- receptor levels and venous fibrosis parameters was analyzed in 70 patients with known AF. In addition, the intima-media thickness of the carotid arteries was determined sonographically as an indicator of atherosclerosis.

Results: In early AF there is an increased amount of PAR1 on PBMCs, as well as an increased PAR1/PAR2-ratio. High levels of PAR1 seem to cause downregulation of PAR1 gene expression at mRNA-level. The venous coagulation parameters (FVIII activity, fibrinogen, D-dimers, von-Willebrand-factor-antigen and ristocetin-cofactor-activity), inflammation parameters (interleukin-6, tumor necrosis factor- α) and fibrosis parameters (galectin-3, sST2) were elevated.

Under therapy with NOACs patients with known AF showed an increased amount of PAR2.

Ultrasound assessment of extracranial carotids demonstrated more atherosclerosis in patients with the NOAC dabigatran etexilate.

Conclusions: In early AF, increased PAR1 signaling is associated with elevated parameters for coagulation, inflammation, and fibrosis. An increased PAR1 dominance over PAR2 could cause profibrotic and proinflammatory signaling. However, an upregulation of PAR2 observed under NOACs could have protective effects.

2. Einleitung

2.1. Definition und Diagnosekriterien von VHF

Gemäß der ESC-Leitlinien ist Vorhofflimmern (VHF) als supraventrikuläre Tachyarrhythmie mit ungeordneter atrialer elektrischer Aktivität und konsekutiv ineffizienter Vorhofkontraktion definiert (4).

Im gesunden Herzen wird durch die spontane Depolarisation von Schrittmacherzellen im Sinusknoten ein regelmäßiger von den Vorhöfen ausgehender elektrischer Stimulus generiert. Dieser breitet sich geordnet zunächst über das Vorhofmyokard aus und bewirkt über die elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten deren Kontraktion und damit die atriale Systole.

Auf Grund einer zwischengeschalteten bindegewebigen Ventilebene mit elektrisch isolierender Funktion zwischen Vorhöfen und Kammern, geschieht die Erregung des Kammermyokards anschließend etwas verzögert über den atrioventrikulären Knoten (AV-Knoten).

Bei VHF ist die geordnete und regelmäßige Erregungsausbreitung in den Vorhöfen gestört. Stattdessen zeigt sich dort eine unkoordinierte und hochfrequente elektrische Aktivität, was auf der einen Seite zu einer insuffizienten Vorhofkontraktion und auf der anderen Seite zu einer unregelmäßigen elektrischen Erregungsausbreitung auf die Herzkammern und so zu einem arrhythmischen Herzschlag führt (5).

Im Elektrokardiogramm (EKG) zeigt sich dies durch die Ableitung unregelmäßiger Kammerkomplexe (QRS-Komplexe) und fehlender regelmäßig vorgeschalteter Vorhofaktionen (P-Wellen) (s. **Abbildung 1**).

Zur Diagnosestellung von VHF müssen diese zwei genannten Kriterien im einfachen Oberflächen-EKG über mind. 30 Sekunden abgeleitet, oder in einem 12-Kanal-EKG über den gesamten Ableitungsausdruck bestehen. Die Diagnosekriterien dürfen nicht zur Anwendung kommen, sollte es Hinweise für einen Block der atrioventrikulären Erregungsüberleitung (AV-Block) geben (4).

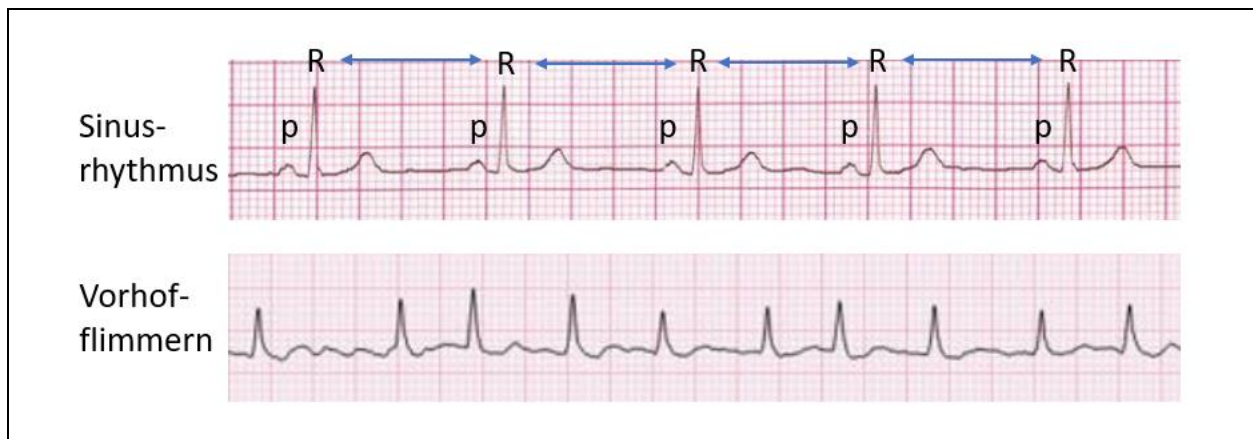


Abbildung 1: Vergleich Sinusrhythmus und Vorhofflimmern im EKG

VHF zeichnet sich durch unregelmäßige Kammerkomplexe (mit R beschriftet) und fehlende regelmäßig vorgeschalteter Vorhofaktionen (P-Wellen) aus.

(Abbildungen übernommen und modifiziert aus <https://commons.wikimedia.org> (6, 7))

2.2. Epidemiologie von Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist die häufigste klinisch signifikante Herzrhythmusstörung weltweit (8) und stellt im Rahmen der mit ihr assoziierten erhöhten Morbidität und Mortalität bereits heutzutage eine große Herausforderung und finanzielle Belastung für den Gesundheitssektor dar (9).

Einer Vielzahl von regionalen Studien zeigen eine steigende Prävalenz und Inzidenz von VHF in den letzten Jahrzehnten (10-12). Zum einen scheint dies auf die steigende Lebenserwartung insbesondere in westlichen Ländern zurückzuführen zu sein, da ein zunehmendes Alter einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von VHF darstellt. Zum anderen zeigen epidemiologische Untersuchungen auch nach Herausrechnung des Faktors Alters eine steigende Inzidenz für VHF, was insbesondere auf eine Zunahme der kardiovaskulären Risikofaktoren und Komorbiditäten im Rahmen eines veränderten Lebensstils zurückzuführen ist (13).

So zählen zu den wichtigsten Risikofaktoren von VHF das Vorliegen von arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Koronarer Herzerkrankung (KHK), chronische Niereninsuffizienz, Adipositas und das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) (4).

Allein in der Europäischen Union (EU) waren 2010 ca. 8,8 Millionen Menschen (1,8% der Gesamtbevölkerung) an VHF erkrankt. Insbesondere vor dem Hintergrund der steigenden

Lebenserwartung, ergeben Modellrechnungen eine Verdopplung der Fallzahlen bis 2060 auf über 17,9 Millionen Menschen mit VHF, entsprechend etwa 3,5% der EU-Gesamtbevölkerung (14).

Die Zahlen und die damit einhergehende Mehrbelastung des öffentlichen Gesundheitssektors in der Zukunft veranschaulichen die Wichtigkeit eines breiten pathophysiologischen Verständnisses der Erkrankung für die Entwicklung präventiver Strategien und den Ausbau von Therapieoptionen.

2.3. Klassifikation

Es existieren unterschiedliche Klassifikationssysteme von VHF. In der traditionellen und gängigsten Klassifikation werden fünf Formen an Hand von klinischer Präsentation, Episodendauer und möglicher spontaner Remission der Episoden unterschieden (s. **Tabelle-1**) (4).

Tabelle 1: Klassifikation von Vorhofflimmern entsprechend der ESC-Leitlinien
(übersetzt und modifiziert aus Hindricks et al. european heart journal 2020 (4))

VHF – Muster	Definition
Erstdiagnose	Vorher nicht diagnostiziertes VHF, unabhängig von Dauer, Vorhandensein oder Schweregrad der Symptome
Paroxysmal	VHF mit spontaner/therapeutisch induzierter Remission innerhalb von 7 Tagen nach Beginn
Persistierend	VHF, das kontinuierlich über mind. 7 Tage anhält, inkl. Episoden, welche durch Kardioversion (pharmakologisch oder elektrisch) nach ≥ 7 Tagen beendet werden
Lang-anhaltend persistierend	Kontinuierliches VHF > 12 Monate, wenn anschließend eine rhythmuserhaltende Strategie ergriffen wird
Permanent	VHF, das von Patient*in und Ärzt*in akzeptiert wird und kein weiterer Versuch unternommen wird, einen Sinusrhythmus zu erlangen oder erhalten

VHF wird im Allgemeinen als chronisch fortschreitende Erkrankung bewertet, welche in der Regel zunächst paroxysmal auftritt und im Verlauf meist mit zunehmender VHF-Last über eine persistierende in eine permanente Form übergeht (s. **Abbildung-2**) (15).

Aus einigen Daten lässt sich jedoch ableiten, dass in bis zu 40% bei Erstdiagnose bereits ein persistierendes VHF vorliegt (16), was durch einen asymptomatischen Verlauf und die dadurch verspätete Diagnosestellung oder ein bereits fortgeschrittenes strukturelles Substrat vor Beginn des VHF zu erklären sein könnte (17).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchung von pathophysiologischen Veränderungen, welche zum Auftreten der Erkrankung führen, ein besonderes Augenmerk auf die Untersuchung von Patient*innen mit Erstdiagnose VHF gelegt.

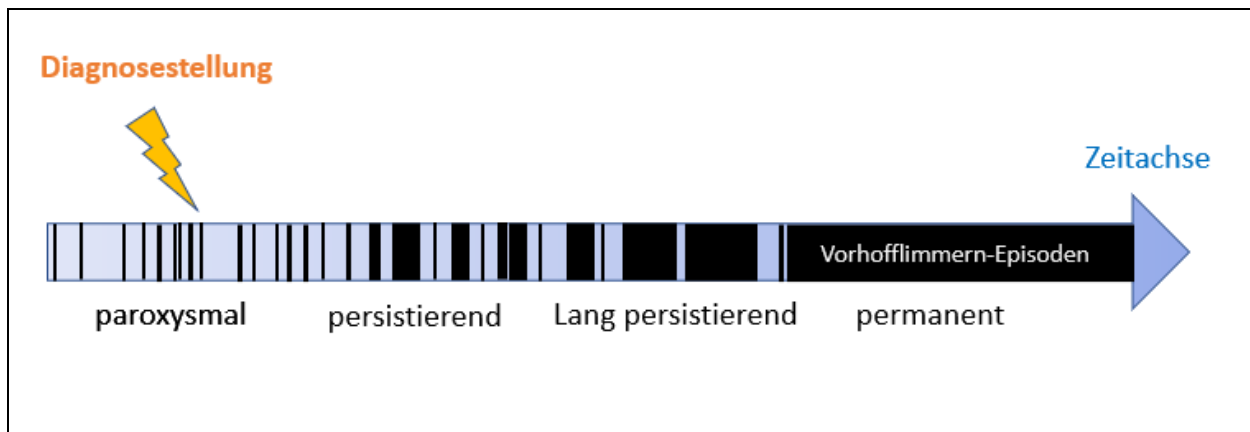


Abbildung 2: Klassische Zeitachse von Vorhofflimmern (VHF)

Schwarze Anteile des Zeitstrahls markieren VHF-Episoden. Diese treten typischerweise im frühen Stadium von VHF paroxysmal auf und halten nur kurz an. Im Verlauf kommt es zu längeren und persistierenden Episoden, welche durch den Einsatz von Medikamenten oder einer Elektrokardioversion jedoch terminiert werden können. Im Spätstadium kommt es häufig zu einem permanent vorliegendem VHF.

Eine terminologische Unterscheidung von Patient*innen mit VHF und zusätzlicher Mitralklappenstenose oder Mitralklappen-Prothese (= „valvuläres VHF“) und Patient*innen ohne eine solche (= „nicht-valvuläres VHF“) ist weit verbreitet, jedoch uneinheitlich und verwirrend (18) und sollte gemäß der aktuellen ESC-Leitlinie nicht mehr verwendet werden (4).

2.4. Klinische Präsentation von Vorhofflimmern

Die häufigsten im Rahmen von VHF auftretenden Beschwerden sind Palpitationen, Brustschmerzen, Dyspnoe, eine verringerte körperlichen Leistungsfähigkeit, Schwindel und seltener auch prä- und synkopale Ereignisse (19, 20).

Die Ausprägung der Symptome ist dabei individuell sehr unterschiedlich, verändert sich häufig im Verlauf der Erkrankung und wird maßgeblich durch die jeweilige Therapie beeinflusst (19, 20).

Zwischen 15 und 30% der Patient*innen mit Vorhofflimmern sind asymptomatisch(15, 19-21), was die Diagnosestellung erschwert und mit einer negativen Prognose assoziiert ist (4, 22).

Patient*innen mit permanentem VHF sind dabei häufiger asymptomatisch, als Patient*innen mit paroxysmalem VHF (20).

2.5. Aktuelle Therapiekonzepte

Mit dem Ziel einer besseren Symptomkontrolle können unterschiedliche Therapiekonzepte zur Anwendung kommen. Dabei kann grundlegend zwischen einer frequenzkontrollierenden und einer (sinus-)rhythmushaltenden Therapiestrategie unterschieden werden, wobei auch die Verfolgung beider Strategien in Kombination sinnvoll sein kann.

Frequenzkontrolle

Die bei VHF bestehende unkontrollierte und hochfrequente elektrische Erregung der Vorhöfe wird unregelmäßig über den AV-Knoten auf das Kammermyokard übertragen. Häufig kommt es dabei zu einer tachyarrhythmischen Überleitung mit Kammerfrequenzen von > 100 Schlägen/min, wobei auch eine normfrequente oder bradykarde Erregungsüberleitung von < 60 Schlägen/min möglich sind.

Tachyarrhythmien führen häufig zu Palpitationen, Brustschmerzen oder zu Symptomen einer akuten oder dekompensierten chronischen Herzinsuffizienz und verursachen dadurch eine signifikante Reduktion der Lebensqualität (23).

Darüber hinaus können anhaltende Tachykardien über die Entstehung einer Tachykardiomyopathie zu einer chronischen und irreversiblen Herzinsuffizienz führen.

Frequenzkontrolle stellt einen Therapieansatz dar, bei dem das VHF als Grundrhythmus akzeptiert wird. Statt einer Kardioversion in den Sinusrhythmus wird ein normfrequenter Kammererrhythmus

angestrebt, um auf diesem Weg eine bessere Symptomkontrolle zu erreichen und einer Tachykardiomyopathie vorzubeugen.

Die bei VHF vorliegende atriale Tachykardie und Dysfunktion werden bei einer frequenzerhaltenden Therapiestrategie bewusst toleriert.

Rhythmuskontrolle

Eine rhythmuskontrollierende Therapiestrategie verfolgt das Ziel, einen Sinusrhythmus wiederherzustellen und zu erhalten. Dafür kann die elektrische Kardioversion, medikamentöse Optionen und eine Katheterablation, sowie deren Kombination zur Anwendung kommen.

Für Jahrzehnte bestand großer Konsens über die Gleichwertigkeit von frequenzkontrollierender und rhythmuskontrollierender Therapiestrategie. Laut den ESC-Leitlinien 2022 besteht auch weiterhin keine ausreichende Evidenz für ein generell besseres Outcome von VHF-Patient*innen unter rhythmuserhaltender Therapiestrategie (4).

Es mehren sich jedoch Daten, die im Vergleich unter rhythmuserhaltender Therapie eine verzögerte VHF-Progression (24) und eine verbesserte Lebensqualität zeigen (23).

Vor diesem Hintergrund wird dieses Dogma zunehmend in Frage gestellt und insb. bei Patient*innen mit guten Aussichten auf eine erfolgreiche Rhythmuskontrolle sollte diese dringend erwogen werden.

Begünstigende Faktoren für eine erfolgreich sinusrhythmuserhaltene Therapie sind dabei unter anderem ein junges Alter, wenige kardiale und extrakardiale Komorbiditäten, ein frühes VHF-Stadium und eine normale Größe des linken Vorhofs (4).

Eine besondere Form der rhythmuskontrollierenden Therapie stellt die Katheterablation dar. Hier hat sich bei VHF die Pulmonalvenenisolation (PVI) durchgesetzt, bei der durch elektrische oder kryoablative Verödung im linken Vorhof linear angeordnete Läsionen entlang der Einmündung aller vier Pulmonalvenen platziert werden. Dessen narbiger Umbau soll zu einem kompletten elektrischen Leitungsblock zwischen Venen und Vorhofmyokard führen, mit dem Ziel, mögliche ektope Erregungszentren in den Pulmonalvenen vom Vorhofmyokard zu isolieren.

2.6. Vorhofflimmern und Schlaganfall

VHF ist mit einer deutlich erhöhten Rate an thromboembolischen Ereignissen assoziiert (25), so steigt die Wahrscheinlichkeit für solche bei VHF-Patient*innen mit Hochrisiko-Profil bis auf 15% pro Jahr (26). Eine besondere klinische Aufmerksamkeit gilt dabei dem ischämischen Schlaganfall, der mit einer deutlich herabgesetzten Lebensqualität assoziiert ist (23).

Große Kohortenstudien ergeben ein 2- bis 10-fach erhöhtes Risiko für einen ischämischen Schlaganfall bei Patient*innen mit VHF (27, 28).

Echokardiografische Studien heben hier das linke Vorhofohr als Hauptort der kardialen Thrombusentstehung hervor (29, 30).

Diese längliche, blind endende Aussackung des Vorhofs mit schmalen Einlass und stark trabekuliertem Endokard prädisponiert anatomisch bedingt eine verringerte Blutflussgeschwindigkeit und erfüllt damit nach der Virchow'schen Trias eine wichtige Ursache für die Thrombogenese (31).

Das Vorliegen von VHF begünstigt nun nicht nur auf Grund der resultierenden insuffizienten atrialen Systole eine weitere Herabsetzung der Blutflussgeschwindigkeit an dieser Stelle, sondern auch durch die häufig zusätzlich vorliegende Vergrößerung des linken Vorhofs (32, 33), was bei Patient*innen mit nicht-valvulärem VHF mit einem deutlich erhöhten Schlaganfall-Risiko assoziiert ist (34, 35).

Im Falle einer zusätzlichen Mitralklappenstenose („valvuläres Vorhofflimmern“) kommt es durch den herabgesetzten transmitralen Blutfluss und damit einhergehenden erhöhten linksatrialen Druck zu weiterer Vorhofdilatation, was die Thrombogenese im linken Vorhof weiter begünstigt (33).

2.6.1. CHA₂DS₂-VASc-Score

Vor dem Hintergrund des deutlich erhöhten thromboembolischen Risikos bei VHF ist bei der Mehrzahl der VHF-Patient*innen eine prophylaktische Medikation mit einem oralen Antikoagulant (OAK) indiziert.

Jedoch ist, insbesondere auf Grund des mit einem OAK einhergehenden erhöhten Blutungsrisikos und möglichen anderen Nebenwirkungen, vor Therapiebeginn eine ausführliche Nutzen-Risiko-Abwägung vorzunehmen. Hierfür sollten auch andere Schlaganfall-Risikofaktoren evaluiert werden und in die Indikationsstellung für eine OAK miteinfließen.

Nach den ESC-Leitlinien von 2022 dient der CHA₂DS₂-VASc-Score am besten zur Einschätzung des thromboembolischen Risikos von VHF-Patient*innen (4).

Bei der Anwendung des Scores werden für das Vorliegen ausgewählter Schlaganfall-Risikofaktoren Punkte vergeben.

Die einfließenden Risikofaktoren werden dabei unterschiedlich bewertet. So zählen ein Alter ≥ 75 Jahre und ein bereits aufgetretenes thromboembolisches Ereignis doppelt (s. **Tabelle-2**).

Tabelle 2: CHA₂DS₂-VASc-Score aus den ESC-Leitlinien von 2022
(übersetzt und modifiziert aus Hindricks et al. european heart journal 2020 (4))

	Risikofaktoren	Punkte
C	Chronische Herzinsuffizienz	1
H	Hypertonie	1
A ₂	Alter ≥ 75 Jahre	2
D	Diabetes mellitus	1
S ₂	Früherer Schlaganfall, TIA oder andere Thromboembolie	2
V	Vaskuläre Erkrankung (angiografisch signifikante KHK, vorheriger Myokardinfarkt, pAVK oder Aortenplaque)	1
A	Alter (65 – 74 Jahre)	1
Sc	Weibliches Geschlecht (engl. Sex category)	1
	Maximaler Score	9 Punkte

*Abkürzungen: TIA=Transitorische ischämische Attacke; KHK= Koronare Herzkrankheit; pAVK= periphere arterielle Verschlusskrankheit.

An der Summe der Punkte kann dann das individuelle Schlaganfall-Risiko pro Jahr abgeschätzt werden, was in der zu Grunde liegenden Studie von Lip et al. von 2010 mit steigender Punktezahl kontinuierlich zunahm (36).

Nach den aktuellen ESC-Leitlinien sollte der CHA₂DS₂-VASc-Score zur Entscheidungsfindung für oder gegen eine orale Antikoagulation neben anderen klinischen Faktoren und unter Berücksichtigung des individuellen Blutungsrisikos angewendet werden.

Empfohlen wird eine OAK bei Männern ab einem CHA₂DS₂-VASc-Score ≥ 2 , bei nur einem Punkt sollte diese erwogen werden. Für Frauen gelten die Empfehlungen ab einem Wert ≥ 3 , bzw. ab 2 Punkten (4).

Viele Patient*innen, bei denen entweder vor dem Hintergrund eines hohen Blutungsrisikos oder auf Grund eines niedrigen CHA₂DS₂-VASc-Scores auf eine OAK verzichtet wird, erhalten ersatzweise Acetylsalicylsäure (ASS), wobei dessen prophylaktischer Effekt hinsichtlich thromboembolischer Ereignisse zweifelhaft ist (37).

2.6.2. Orale Antikoagulationen

Der Einsatz von oralen Antikoagulantien (OAK) reduziert deutlich das Risiko von Schlaganfällen bei Patient*innen Vorhofflimmern.

Die Vitamin-K-Antagonisten (VKA) Warfarin und Phenprocoumon reduzieren in einer großen Kohortenstudie das Schlaganfall-Risiko um 64% und die Mortalität 26% (38) und werden weltweit seit den 1950ern bei VHF-Patient*innen eingesetzt.

Bei zusätzlicher vorliegender Mitralklappenstenose oder Zustand nach Klappenersatz (valvuläres VHF) bleiben VKA weiter die einzige Therapieoption (4).

Bei dieser Therapiestrategie wird die Vitamin-K abhängige Synthese der Gerinnungsfaktoren II (Prothrombin) VII, IX und X gehemmt, was zu einer dosisabhängigen Antikoagulation führt. Eine geringe therapeutische Breite bedingt dabei regelmäßige Kontrollen des Gerinnungsparameter International Normalized Ratio (INR) und entsprechende Dosisanpassungen (39).

Die Wirksamkeit hinsichtlich der Schlaganfall-Prävention und das Auftreten von Blutungskomplikationen korrelieren dabei signifikant mit der Zeit innerhalb des therapeutischen Intervalls (TTR= time in therapeutic range) (40).

Problematisch ist hierbei die Beeinflussung des Vitamin-K-Metabolismus durch zahlreiche externe Faktoren, wie z.B. bestimmte Komorbiditäten, Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten oder Ernährungsgewohnheiten, um nur einige wenige zu nennen (41).

Mit den NOAK (Nicht-Vitamin-K-abhängige Orale Antikoagulanzen) gibt es seit der ersten Zulassung in Deutschland 2011 nach mehr als 50 Jahren erstmals Alternativen zu den VKA für die orale Antikoagulation bei Patient*innen mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern.

Es handelt sich um den direkten Faktor-IIa-Inhibitor Dabigatranetexilat, sowie die drei direkten Faktor-Xa-Inhibitoren Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban.

In den Zulassungsstudien der vier Substanzen konnte eine Nicht-Unterlegenheit gegenüber der VKA-Leitsubstanz Warfarin gezeigt werden.

Bisher geht aus der ESC-Leitlinien von 2022 jedoch keine klare Empfehlung hinsichtlich einer OAK bei VHF mit VKA oder NOAK hervor. So zeigten sich die Wirksamkeit und Sicherheit von VKA in einigen Studien bei hoher TTR vergleichbar mit der von NOAK (42, 43).

Auf der anderen Seite wird das aus der aktuellen Studienlage hervorgehende deutlich erhöhte intrazerebrale Blutungsrisiko, insb. bei schlechter INR-Kontrolle und die verringerten Patienten-Compliance unter VKA hervorgehoben (4).

2.7. Allgemeine Komplikationen von VHF

Über die thromboembolischen Komplikationen hinaus geht Vorhofflimmern mit einer Vielzahl weiterer Komplikationen einher, was zu einer 1,5- bis 3,5-fachen Erhöhung der Gesamtmortalität führt. 20-30% der Menschen mit VHF haben begleitend eine Herzinsuffizienz, welche sich durch die ineffizientere Pumpfunktion im Rahmen der Herzrhythmusstörung häufig weiter verschlechtert, was einen der Hauptgründe für die deutlich erhöhte Hospitalisierungsrate von VHF-Patient*innen von 10-40% pro Jahr darstellt.

Insbesondere das mit VHF einhergehende erhöhte Risiko von cerebralen Mikroembolien führt zu einem deutlich erhöhten Risiko für kognitive Defizite bis hin zu einer vaskulären Demenz.

Bis zu 20% der VHF-Patient*innen entwickeln im Laufe der Erkrankung Symptome einer Depression. Insgesamt führt VHF bei > 60% den Erkrankten zu einer deutlichen Reduktion der Lebensqualität (4).

2.8. Pathophysiologie von Vorhofflimmern

Die Pathophysiologie von Vorhofflimmern ist hochkomplex und noch nicht vollständig verstanden.

Haisaguerre et al. berichteten zuerst von ektope Erregungszentren in den Pulmonalvenen als Ursache von Vorhofflimmern (44), was die Grundlage für die Pulmonalvenenisolation (PVI) als Behandlungsmöglichkeit darstellt. Der Fakt, dass ein erheblicher Anteil der Patient*innen unzureichend auf diese Therapie anspricht (45), suggeriert jedoch eine zusätzliche pathophysiologische Beteiligung des atrialen Gewebes.

Umfassende Daten zeigen, dass bei Menschen mit VHF in der Mehrheit der Fälle eine atriale Kardiomyopathie nachweisbar ist (46, 47), welche in der Pathophysiologie von VHF eine wichtige Rolle einzunehmen scheint und im zeitlichen Verlauf der Erkrankung in der Regel zunimmt (47, 48).

Eine atriale Myopathie meint dabei eine Vielzahl an Veränderungen des Vorhofs, welche zusammen das Auftreten von Vorhofflimmern und eine Hyperkoagulabilität begünstigen. Dazu zählen insbesondere eine vermehrte atriale Fibrose, eine Drucküberlastung, sowie ein Umbau von autonomen Fasern und des Reizleitungssystems im Vorhof. Darüber hinaus lassen sich insbesondere eine endotheliale Dysfunktion, sowie eine Hochregulation von proinflammatorischen und prothrombotischen Faktoren nachweisen (48).

Eine echokardiografische Beurteilung einer möglichen linksatrialen Dilatation als Zeichen atrialer Myopathie gehört regelhaft zur etablierten Diagnostik bei VHF-Patient*innen (4), dabei gilt das Ausmaß der Vergrößerung als signifikanter prognostischer Marker für das Wiederauftreten von VHF nach Erlangen des Sinusrhythmus (49).

2.8.1. Atriale Fibrose

Der atriale Umbau (Remodelling), welcher zu einer atrialen Myopathie mit systolischer Dysfunktion und veränderten elektrischen Leitungseigenschaften des atrialen Myokards führt, ist komplex.

Dabei besteht großer Konsens, dass der Entstehung einer myokardialen Fibrose des linken Atriums eine zentrale Bedeutung für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern zukommt (47, 48, 50, 51).

Fibrose ist am Herzen, wie auch an der Mehrheit der übrigen Organe des Körpers, eine typische Reaktion auf Verletzung, Fehlfunktion oder Entzündung. Hierbei führen wiederkehrende Gewebsverletzungen nach Durchlaufen einer regenerativen Antwort mit Ersatz des Ursprungsgewebes ohne bleibende Schäden zunehmend zum Einbau von fibrotischem Gewebe. Dies geschieht durch ein komplexes System aus zell- und zytokin-vermittelten proinflammatorischen Prozessen, welche im Herzen zu einer Proliferation von Fibro- und Myofibroblasten, sowie einer vermehrten Ablagerung kollagenhaltiger extrazellulärer Matrix führt. (48).

Myokardiale Fibrose führt durch eine regionale Herabsetzung der kardialen elektrischen Leitungsgeschwindigkeit (52, 53) zu zunehmend heterogenen elektrischen Leitungseigenschaften des linken Atriums (elektrisches Remodelling), was eine wichtige Ursache für die Entstehung von VHF ist (54, 55). So bilden die heterogenen Leitungseigenschaften die anatomische Grundlage für die Entstehung von multiplen kleinen, kreisenden und sich selbst unterhaltenden elektrischen Erregungen (engl. „*Re-entries*“) in den Vorhöfen als wichtige Ursache für die hochfrequente und irreguläre Vorhoffrequenz bei VHF.

Eine vermehrte atriale Fibrose ist nachgewiesen mit einer Progression von VHF assoziiert. So korrelierte der Fibrosegrad von humanen atrialen Gewebeproben in post-mortem Untersuchungen positiv mit der VHF-Last und bei Patient*innen mit paroxysmalen VHF waren deutlich weniger fibrotische Anteile als bei Patienten*innen mit persistierendem VHF nachweisbar (56).

Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung einer atrialen Fibrose sind dabei Alter (57), eine atriale Druck- und Volumen-Erhöhung und dadurch bedingte erhöhte atriale Wandspannung (58), oxidativer Stress (59, 60) und inflammatorische Prozesse (59, 61).

Serologische Biomarker für atriale Fibrose bei Vorhofflimmern

Die Identifikation von im Blut nachweisbarer Biomarker, welche unterschiedliche kardiale Erkrankungen anzeigen können ist von großem klinischem Interesse. Weit verbreitet ist z.B. die Messung der Enzyme Troponin-I und Troponin-T als Biomarker für kardiale Nekrose oder auch natriuretische Peptide, wie z.B. NT-proBNP als Marker für eine erhöhte kardiale Wandspannung(62).

Biomarker für kardiale Fibrose werden bisher weniger eingesetzt, sind jedoch Gegenstand aktueller Forschung. Hierbei haben sich die Proteine Galectin-3 (Gal-3) und sST-2 als gute im Blutplasma messbare Fibrosemarker herauskristallisiert (63).

Galectin-3 und sST2 bei frühem Vorhofflimmern

Studienergebnisse zeigen bei Vorhofflimmern erhöhte Werte für sowohl für Galectin-3 (64), wie auch für sST-2 (65). In welchem Ausmaß atriale Fibrose bei VHF im Initialstadium bereits vorliegt oder ob sich eine signifikante Erhöhung dieser Plasma-Fibrosemarker erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung messen lässt, wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

2.8.2. Inflammation und VHF

Auch inflammatorische Prozesse spielen für die Entstehung von Vorhofflimmern eine bedeutende Rolle (61, 66, 67).

Die ersten klinischen Hinweise auf eine mögliche inflammatorische Genese von VHF kommen von der Beobachtung, dass bei Patient*innen mit Perimyokarditis gehäuft atriale Arrhythmien auftreten (68).

Weitere Hinweise stammen von histologischen Untersuchungen von atrialen Gewebeproben, in denen bei Menschen mit VHF eine vermehrte Infiltration von Leukozyten und Makrophagen zusammen mit erhöhten Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen auffielen (69-71). Neben regionalen inflammatorischen Prozessen direkt am Herzen, scheinen jedoch auch systemische entzündliche Prozesse die Genese von VHF zu begünstigen.

So sind zahlreiche extrakardiale entzündliche Erkrankungen mit einer erhöhten Inzidenz von VHF assoziiert, darunter z.B. Rheumatoide Arthritis, Psoriasis vulgaris, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, systemischer Lupus erythematoses und Spondylosis ankylosans (M.Bechterew) (72-76). Bei vielen Patient*innen mit diesen Erkrankungen können darüber hinaus Zeichen einer atrialen Myopathie nachgewiesen werden (77, 78).

Ursächlich hierfür sind unter anderem lokal im Herzmuskelgewebe stattfindende entzündliche Prozesse, welche durch eine Schädigung von Kardiomyozyten und Aktivierung kardialer Fibroblasten atriale Myopathie und Fibrose begünstigen (66).

Darüber hinaus verursachen aktivierte kardiale Fibroblasten durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine eine Infiltration von weiteren Immunzellen, was den lokalen Entzündungsprozess weiter intensiviert und wodurch ein sich selbst unterhaltender, bösartiger Kreislauf mit Progression der Erkrankung entsteht (66, 79, 80).

2.8.3. Hyperkoagulabilität bei VHF

Die Pathogenese der Thrombusentstehung bei Vorhofflimmern ist im Gegensatz zu früheren Annahmen multifaktoriell und nicht ausschließlich auf die Blutstase im linken Vorhof zu beziehen (25). Tatsächlich suggerieren erhöhte Hämostasemarker im Plasma, wie Fibrinogen, D-Dimere, oder von-Willebrand-Faktor bei Menschen mit VHF einen auch extrakardial vorliegenden prothrombogenen Status (81) (82, 83).

Ob das VHF an sich oder aber die ihm zu Grunde liegenden Risikofaktoren zu der Hyperkoagulabilität führen, ist aktuell Bestandteil breiter Diskussion und Forschung. Dabei konnten in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass Hyperinflammation, atriale Myopathie und Fibrose auch in Abwesenheit von VHF unabhängige Risikofaktoren für das Auftreten von thromboembolischen Ereignissen darstellen (67, 84-86). So haben z.B. Menschen mit rheumatoider Arthritis oder systemischen Lupus erythematoses ein 60- bis 100-%ig erhöhtes Schlaganfall-Risiko verglichen mit der Allgemeinbevölkerung (87) und die Assoziation von erhöhten systemischen Entzündungsmarkern mit einer erhöhten Schlaganfall-Inzidenz bleibt auch nach Herausrechnung klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie VHF oder arterielle Hypertonie signifikant (88, 89).

Ein wichtiger Mechanismus für die Hyperkoagulabilität scheint dabei eine durch Inflammation und kardielle Fibrose bedingte endotheliale Dysfunktion zu sein (67, 84), wobei von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen ist und viele Bausteine noch nicht bekannt sein dürften.

2.9. Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR)

Die Gerinnungsfaktoren Thrombin (Faktor-IIa) und der aktivierte Faktor-X (FXa) haben sich durch die Entwicklung der NOAK als effektive Ziele für eine medikamentöse Antikoagulation herausgestellt.

Neben ihrer Hauptfunktion in der Hämostase, spielen beide Faktoren jedoch auch eine wichtige Rolle in vielen weiteren physiologischen und pathophysiologischen Prozessen.

Eine Interaktion zwischen Gerinnungskaskade und proinflammatorischen und -fibrotischen Signalwegen ist seit langem bekannt, wobei Thrombin und Faktor-Xa hier eine wichtige Schnittstelle darstellen (90, 91). Ihre gerinnungsunabhängigen Effekte vermitteln die beiden Serinproteasen dabei überwiegend über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) (90).

Die vermehrte Aktivierung von PAR scheint bei in der Pathophysiologie von VHF eine Schlüsselrolle einzunehmen (91, 92).

2.9.1. Struktur und Funktionsweise von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR)

Bei PARs handelt es sich um eine Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestehend aus 4 Subtypen: PAR1, PAR2, PAR3 und PAR4.

Alle PARs bestehen aus einem Rezeptorkörper mit sieben schleifenförmig aufgebauten transmembranösen Domänen, sowie einem intrazellulären C-Terminus und einem extrazellulären N-Terminus. Der extrazelluläre N-Terminus besteht aus einem 17 bis 26 Aminosäuren langen Peptid. Die Spaltung dieser Exodomäne an definierter Stelle durch Serin-Proteasen führt zu der Freilegung einer kurzen Aminosäuresequenz am N-Terminus, welche nun intramolekular als angebundener Ligand an den Rezeptorkörper binden kann und den PAR aktiviert.

Aktivierte PARs können dann intrazellulär an multiple G-Protein-Komplexe und β -Arrestin binden und entsprechende Signalkaskaden aktivieren (93) (s. **Abbildung-3**).

Zusätzlich zu PAR-aktivierenden Proteasen, existieren auch Proteasen, welche durch proteolytische Spaltung des extrazellulären N-Terminus an anderer Stelle einen PAR inaktivieren können (94).

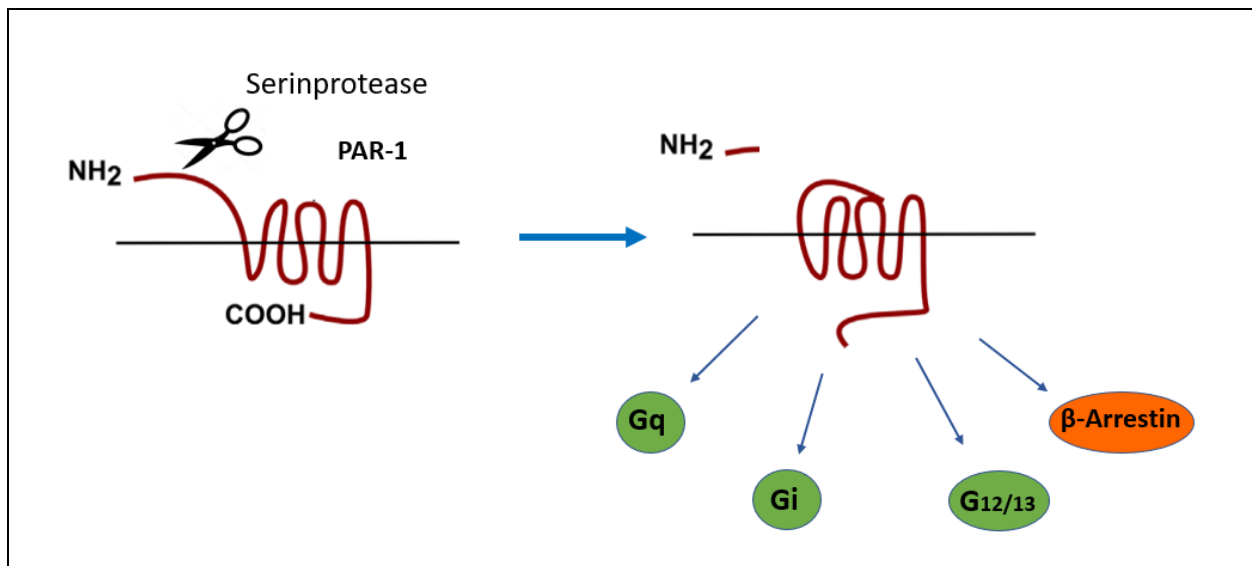


Abbildung 3: Schematische Darstellung der proteolytischen PAR-Aktivierung am Beispiel von PAR1

Durch die Proteolyse am N-Terminus der Exodomäne von PAR1 kommt es zur Freilegung des dort gebundenen Liganden. Dieser bindet an die transmembranösen Rezeptoranteil, was zur Aktivierung des Rezeptors führt und intrazellulär die Bindung an multiple G-Protein-Komplexe und β -Arrestin ermöglicht.

2.9.2. Biased Signalling von PARs

Die Aktivierung eines PAR-Subtyps auf einer Zelle hat nicht zwangsläufig das gleiche intrazelluläre Signalling zur Folge.

So können verschiedene Proteasen zu einer PAR-Aktivierung führen. Jedoch schneiden einige Proteasen den N-Terminus an einer alternativen Stelle, was zur Demaskierung einer anderen Ligandendomäne führt, dessen Bindung an den Rezeptorkörper ein anderes Down-Stream-Signalling bewirkt (94).

So kann beispielsweise, abhängig von der aktivierenden Protease, die Aktivierung des PAR1-Rezeptors eine pro- oder antiinflammatorischen Zellantwort verursachen (95).

Auch können intermolekulare Wechselwirkungen zwischen mehreren PARs Einfluss auf das vermittelte Signalling nehmen. So ließ sich z.B. auf Endothelzellen eine Transaktivierung von PAR2 durch PAR1 zeigen (96).

Darüber hinaus findet in einigen Fällen auch eine Transaktivierung von anderen Rezeptoren, wie dem eGF-Rezeptor (*engl. „epidermal growth factor-receptor“*) durch PAR1 oder PAR2 statt, was ebenfalls zu einem unterschiedlichen Down-Stream-Signalling führt (97, 98).

Die Möglichkeit der Homodimerisierung von zwei PAR-Rezeptoren oder einer Heterodimerisierung mit anderen PAR-Rezeptortypen und dadurch vermittelte Unterschiede des transmembranösen Signalling (99) veranschaulichen weiter dessen Komplexität.

2.9.3. PAR bei VHF

Bei VHF kommt es im Rahmen der bekannten Hyperkoagulabilität zu einer vermehrten lokalen und systemischen Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und damit auch von Thrombin und Faktor-X. Dadurch kommt es auch zu einer Zunahme ihrer gerinnungsunabhängigen, PAR-vermittelten Effekte (91, 92).

Insbesondere die exzessive Aktivierung von PAR1 und PAR2 scheint über die Vermittlung proinflammatorischer und -fibroproliferativer Signalwege im Herzen für die Pathophysiologie von VHF eine zentrale Rolle zu spielen (91, 92), weswegen sich in der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung dieser beiden Rezeptoren-Typen konzentriert wurde.

PAR1

PAR1 ist der am besten untersuchte Subtyp der PAR-Rezeptorgruppe. Thrombin ist durch seine hohe Affinität zum N-Terminus von PAR1 dessen effizientester Aktivator (100). Hierbei spaltet die Serin-Protease die Peptidverbindung Arg-41/Ser-42 in der Exodomäne von PAR1 und legt so den entsprechenden angehenden Liganden frei. Dieser bindet an den transmembranösen Teil von PAR1, was zur intrazellulären Kopplung von G-Proteinen ($G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_q$ oder $G\alpha_i$) oder β -Arrestin und zu entsprechendem Down-Stream-Signalling führt (101).

Auch Faktor-Xa bindet auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Thrombin mit hoher Affinität an PAR1. Die Spaltungssequenz und der freigelegte Ligand sind dabei identisch (102).

Ein wichtiger weiterer Aktivator von PAR-1 und ein gutes Beispiel für biased signalling ist das aktivierte Protein-C (APC), dessen Hauptfunktion über die proteolytische Spaltung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa eine Hemmung der Gerinnungskaskade ist.

APC kann die Exodomäne von PAR1 neben der klassischen Stelle Arg-41 auch an Stelle Arg-46 schneiden und so einen alternativen angehenden Liganden freilegen.

Während die durch Thrombin oder Faktor-Xa ausgelöste PAR1-Aktivierung eine proinflammatorische Zellantwort auf Endothel- und anderen Zellen auslöst, führt eine durch APC ausgelöste PAR1-Aktivierung zu einer Abschwächung proinflammatorischer Signalkaskaden und zu zellprotektiven Effekten (95). Weitere PAR-Liganden sind in **Tabelle 3** aufgeführt.

Tabelle 3: Protease aktivierte Rezeptoren (PAR) und ihre wichtigsten Liganden
(übersetzt und modifiziert aus Ossovskaya et al. *Physiol Rev* 2004 (103))

	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Aktivierende Proteasen	Thrombin Faktor-Xa APC Granzym-A Gingipains-R Trypsin MMP-1 MMP-13	Trypsin Tryptase FVIIa FXa MT-SP1 Proteinase-3 Acrosien Der P3 D9 Gingipains-R	Thrombin	Thrombin Trypsin Cathepsin G Gingipains-R
Deaktivierende Proteasen	Cathepsin G Plasmin Elastase Proteinase-3 Trypsin	Cathepsin G Elastase	Cathepsin-G	

*Abkürzungen: MMP=Matrix-Metalloprotease

PAR2

Als erstes wurde die Protease Trypsin als potenter PAR2-Aktivator identifiziert, wobei diese lediglich im Gastrointestinaltrakt vorkommt. Im Blut spielen vor allem die überwiegend von Mastzellen produzierte Tryptase und der Gerinnungsfaktor Faktor-Xa eine Rolle, wobei letztgenannter PAR2 sowohl in freier Form aktivieren kann, wie auch in besonders effizienter Weise im Verbund mit Faktor-VIIa und Faktor-III (100).

Thrombin kann PAR2 nicht direkt aktivieren. Interessanterweise konnte jedoch eine indirekte Aktivierung des Rezeptors durch Thrombin auf Endothelzellen nachgewiesen werden (104). Hierbei kommt es durch den Mechanismus der Transaktivierung bei Zellen, die sowohl PAR1 wie auch PAR2 exprimieren, nach Thrombin-vermittelter Freilegung des gebundenen Liganden von PAR1 auch zu einer Bindung dieses Liganden an den Rezeptorkörper von PAR2, was dessen (Trans-)Aktivierung zur Folge hat (100).

2.9.4. PAR1 und PAR2 auf zirkulierenden Immunzellen

PARs spielen auch für die Erkennung von Pathogenen und der dadurch vermittelten Immunreaktion eine Rolle, weswegen die Rezeptoren auf einer Vielzahl von Immunzellen zu finden sind.

PAR1 und PAR2 sind auf Monozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen, T-Helferzellen (CD4+) und eosinophilen Granulozyten nachweisbar. CD8+-T-Zellen exprimieren ausschließlich PAR1, während neutrophile Granulozyten, Mastzellen und dendritische Zellen ausschließlich PAR2 exprimieren. Auf B-Lymphozyten lassen sich keine PARs nachweisen (105-108).

Auf Grund ihrer systemischen Verfügbarkeit findet eine Thrombin und Faktor-Xa vermittelte PAR1- und PAR2-Aktivierung auch auf Immunzellen statt.

2.9.5. PAR1/PAR2 und das Herz

PAR1 und PAR2 sind auf zahlreichen Zellen des Herzens nachweisbar und scheinen hier eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von VHF und anderen kardialen Erkrankungen zu spielen (91, 92).

Beide Rezeptoren werden von kardialen Myozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert, PAR1 ist zusätzlich in hoher Konzentration auf kardialen Fibroblasten nachweisbar (109).

Die Expression von PAR1 und dessen Ligand Thrombin ist dabei auf Kardiomyozyten im linken Vorhof ausgeprägter als in den Ventrikeln (110) und eine tachykarde Rhythmusstimulation führte in vitro zu einer weiteren Hochregulierung der PAR1-Expression im Vorhofgewebe (111).

Die Exposition mit Thrombin verursachte in vitro PAR1-vermittelte proarrhythmogene Effekte auf humane atriale Kardiomyozyten (112).

2.9.6. Einfluss von PAR1/2 auf atriale Inflammation und Remodelling

Die Stimulierung von PAR1 und PAR2 am Vorhofgewebe scheint durch Aktivierung proinflammatorischer Signalwege und profibrotischer Effekte zu einem negativen atrialen Remodelling zu führen, was die Grundlage für die Entstehung von VHF bildet.

So konnte im Tierversuch ein proliferativer Effekt auf kardiale Fibroblasten und ein hypertropher Effekt auf Kardiomyozyten beobachtet werden (113, 114) und nach simultaner Stimulation mit Faktor-Xa und induzierter Tachyarrhythmie war in humanen atrialen Gewebeproben eine gesteigerte Expression von PAR1 und PAR2, sowie typischer proinflammatorischer Signalmoleküle nachweisbar (111).

Ein PAR2-Mangel führte im Mausmodell hingegen nach Myokardinfarkt zu einer reduzierten Aktivierung proinflammatorischer Signalwege und zu einer Verringerung des postischämischen Remodellings (109). Interessanterweise zeigen andere Untersuchungen eine ausgeprägte kardiale Fibrose bei PAR2-knockout-Mäusen (115), sodass die Bedeutung des PAR2-Signallings im Herzen aktuell noch nicht sicher einzuordnen scheint.

2.9.7. PAR und Atherosklerose

Atherosklerose bezeichnet einen chronischen krankhaften Umbau der arteriellen Gefäßwände. Im Wesentlichen kommt es hierbei durch pathologische Ablagerungen von Lipiden und entzündlichen Prozessen zu einem Elastizitätsverlust und einer Verdickung der Gefäßwände. Durch eine langsame konzentrische Zunahme der Gefäßwanddicke oder durch die Ruptur von instabilen atherosklerotischen Gefäßläsionen (Plaques) mit resultierender Thrombose des Gefäßes führt Atherosklerose im fortgeschrittenen Stadium zu einer Minderdurchblutung (Ischämie) von Organen. Am Herzen führt die Atherosklerose der Koronararterien im Verlauf zu einer ischämischen Kardiomyopathie (Koronare Herzerkrankung, KHK), welche einer der Hauptrisikofaktoren für Herzrhythmusstörungen, wie VHF darstellt (4).

Auch Entstehung und Progression von Atherosklerose nehmen PAR1 und PAR2 eine Schlüsselrolle ein. Thrombin und Faktor-Xa vermitteln hier nicht nur Thrombozytenaggregation und koagulative Effekte, sondern führen auch zu Endothelzellaktivierung, Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren, sowie zu Proliferation glatter Muskelzellen und Fibroblasten in den Gefäßwänden, wobei diese Prozesse zu einem wesentlichen Anteil PAR1 und PAR2- vermittelt scheinen (91, 92).

2.9.8. PARs und NOAKs

Insbesondere auf Grund der einfacheren Handhabung, sowie starken Hinweisen für eine erhöhte Patientensicherheit und mindestens gleichwertigen prophylaktischen Effekt für thromboembolische Ereignissen, werden die direkten Faktor-Xa-Hemmer Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban, sowie der direkte Thrombin-Hemmer Dabigatranetexilat mittlerweile in den USA deutlich häufiger für die OAK bei VHF-Patienten eingesetzt als die klassischen Vitamin-K-Antagonisten (VKA) (116).

Von besonderem Interesse sind dementsprechend eine Vielzahl von aktuellen Studienergebnissen, die zahlreiche weitere pleiotrope Effekte der NOAKs über die Antikoagulation hinaus vermuten lassen, wobei diese überwiegend durch eine Beeinflussung des PAR1- und PAR2-Signallings bedingt scheinen und primär aus präklinischen Modellen stammen. So scheint die Behandlung mit NOAKs bei Gefäßerkrankungen die weitere Progression von Atherosklerose zu verlangsamen und

zu einer Stabilisierung von artherosklerotischen Plaques zu führen. Darüber hinaus zeigen sich kardioprotektive Effekte durch antiinflammatorische und -fibrotische Mechanismen (91, 92). Die orale Antikoagulation mittels VKA scheint im Gegensatz zu den NOAKs über den gerinnungshemmenden Effekt hinaus keinen Effekt auf das PAR-Signalling zu haben (91).

2.10. Fragestellung

Die Pathophysiologie von VHF ist bis heute nicht zur Gänze verstanden. Lokale und systemische proinflammatorische Prozesse, atriale Fibrose und Hyperkoagulabilität nehmen eine Schlüsselrolle für die Entstehung und Progression der Erkrankung sowie dessen Komplikationen ein, wobei sich die einzelnen Komponenten dabei in einem bösartigen Kreislauf gegenseitig bedingen und verstärken.

Ein durch Thrombin und Faktor-Xa vermitteltes PAR1- und PAR2- Signalling führt in-vitro und im Tiermodell zu einer Verstärkung aller drei Komponenten und könnte dementsprechend zu einer Progression der Erkrankung führen.

Eine NOAK-vermittelte Hemmung dieses Signallings scheint hingegen protektiv zu wirken.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse ergibt sich die Annahme einer zentralen Bedeutung des PAR1- und PAR2-Signallings, sowie dessen Hemmung für die Pathophysiologie und mögliche Behandlungsoptionen der Erkrankung (**s. Abbildung-4**).

„Pathophysiologisches Dreieck“ bei VHF

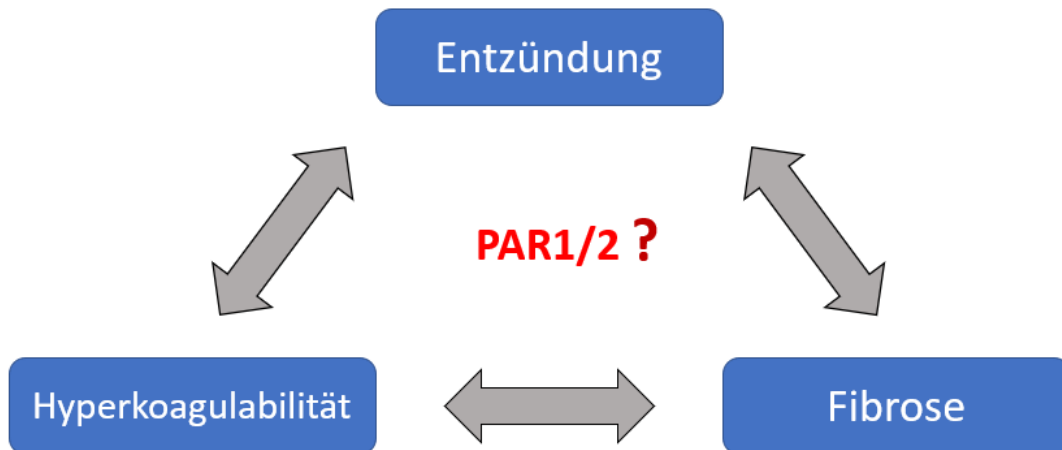


Abbildung 4: PAR1/2 im Zentrum der drei pathophysiologischen Komponenten von VHF

Das PAR1- und PAR2-Signalling am Herzen beeinflusst sowohl proinflammatorische, wie auch profibrotische Prozesse am Herzen und führt zu Hyperkoagulabilität. Diese drei Komponenten stellen auch wesentliche pathophysiologische Bausteine für die Entstehung von Vorhofflimmern dar. Die Hypothese der vorliegenden Dissertation besteht aus der Annahme einer Schlüsselrolle des kardialen PAR1- und PAR2-Signallings für die Entstehung von Vorhofflimmern.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der PAR1 und PAR2-Expression bei Patient*innen mit neu diagnostizierten VHF und dessen Korrelation mit peripheren Fibrose- und Gerinnungsmarkern, sowie die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung durch den Einsatz von NOAKs.

Wegen eingeschränkter Generierungsmöglichkeiten von humanen atrialen Gewebeproben in-vivo wurde, vor dem Hintergrund des systemisch vermittelten zellulären Thrombin- und FXa-Signallings und nachgewiesener ausreichender PAR- Expression, die Untersuchung der Rezeptoren auf Mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. „Peripheral blood mononuclear cells“, PBMC's) bei Patient*innen mit VHF gewählt.

Zur Untersuchung der angenommenen protektiven Effekte von NOAKs über das Herz hinaus auch auf vaskuläre Erkrankungen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch das Ausmaß an Atherosklerose bei Patient*innen mit VHF in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikoagulation untersucht.

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Fragestellungen formuliert:

1. Unterscheidet sich die Expression von PAR1 und PAR2 im Initialstadium von VHF im Vergleich zu Probanden mit ähnlichem kardiovaskulärem Risikoprofil, aber ohne VHF?
2. Zeigen sich im Initialstadium von VHF erhöhte Entzündungs-, Fibrose-, und Gerinnungsmarker im Blutplasma?
3. Hat die Einnahme von NOAKs bei VHF einen Einfluss auf die PAR1- und PAR2-Expression?
4. Hat eine NOAK-Therapie bei VHF einen Einfluss auf Fibrosemarker im Plasma?
5. Ist bei VHF-Patient*innen mit NOAK im Gefäßultraschall weniger Atherosklerose nachzuweisen?

3. Material und Methodik

3.1. Patientenkohorten

Das vorliegende Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Die Studie wurde im Einklang mit der Erklärung von Helsinki und nach der Satzung der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis durchgeführt.

Erste Kohorte: Patienten mit erstdiagnostiziertem VHF und Kontrollgruppe

Die Charakteristika der eingeschlossenen Patient*innen wurden bereits in den vorausgehenden Publikationen dargelegt (1-3).

In die erste Kohorte wurden 100 Patient*innen eingeschlossen. Einschlusskriterien für die VHF-Gruppe (n=80) waren die folgenden: Alter >18 Jahre, schriftliche Einwilligungserklärung für die Studienteilnahme, Aufnahme in die kardiologische Abteilung der Charité – Campus Benjamin Franklin auf Grund einer erstdokumentierten Diagnose eines Vorhofflimmerns.

Ausschlusskriterien für die VHF-Gruppe waren die folgenden: reversible Ursache für VHF (z.B. Hyperthyreose, akuter Myokardinfarkt, Myokarditis, Perikarditis, andere akute infektiöse oder inflammatorische Erkrankungen) oder vorherige Antikoagulation.

Die Kontrollgruppe (n=20) bestand aus Patient*innen mit vergleichbarem kardiovaskulären Risikoprofil (aber ohne VHF), welche ebenfalls in die kardiologische Abteilung der Charité – Campus Benjamin Franklin aufgenommen wurden. Die Aufnahmediagnosen setzten sich zusammen aus Herzinsuffizienz, hypertensiver Kardiomyopathie oder Verdacht auf Koronare Herzerkrankung (KHK) zur Durchführung einer elektiven Koronarangiografie.

Patient*innen der Kontrollgruppe, welche in der Nachverfolgung über ein Jahr VHF entwickelten, wurden ausgeschlossen. Eine detaillierte Beschreibung der Patientencharakteristika findet sich in **Tabelle-4**.

Eine ausgeglichene Geschlechterverteilung wurde für beide Gruppen berücksichtigt. Die peripher-venöse Blutentnahme, sowie Datenerhebung erfolgten innerhalb der ersten 24 Stunden nach Krankenhausaufnahme.

Tabelle 4: Erste Kohorte: Charakteristika Patient*innen mit erstdiagnostiziertem VHF und Kontrollgruppe
(ebenfalls dargestellt in (1-3))

	Kontrollgruppe (n=20)	VHF-Gruppe (n=80)	p-Wert
männl./weibl.	10/10 (50%/50%)	50/30 (62,5%/37,5%)	n.s.
CHA ₂ DS ₂ -VASC	3,45	3,98	n.s.
Bekannte Herzinsuffizienz	4/20 (20%)	21/80 (26%)	n.s.
Ejektionsfraktion	62%	59%	n.s.
NT-proBNP ng/L	170,3	215,3	n.s.
Art. Hypertonie	17/20 (85%)	70/80 (87,5%)	n.s.
Alter (in Jahren)			
<65	9/20 (45%)	22/80 (27,5%)	n.s.
65-75	6/20 (30%)	26/80 (32,5%)	n.s.
>75	5/20 (25%)	32/80 (40%)	n.s.
Diabetes mellitus	5/20 (25%)	24/80 (30%)	n.s.
Bekannte TIA/Schlaganfall	1/20 (5%)	8/80 (10%)	n.s.
Körpergewicht (kg)	82,95	85,93	n.s.
BMI (kg/m ²)	27,97	27,55	n.s.
Procalcitonin (µg/L)	0,07	0,07	n.s.
C-Reaktives Protein (mg/l)	3,33	3,25	n.s.

Werte sind im Mittel oder in Prozent angegeben. Abkürzungen: NT-proBNP=N-terminales Prohormon of brain natriuretic peptide; TIA=Transitorisch ischämische Attacke; BMI=Body Mass Index; n.s.=nicht signifikant.

Zweite Kohorte: Patient*innen mit bekanntem VHF und bestehender gerinnungshemmender Medikation

Der Effekt einer gerinnungsaktiven Medikation auf Patient*innen mit bekanntem Vorhofflimmern wurde in einer zweiten Kohorte aus 70 Patient*innen untersucht, welche durchgehend seit der Erstdiagnose Vorhofflimmern mit einer gerinnungshemmenden Medikation behandelt wurden. Zehn Patient*innen erhielten eine nicht-PAR-gerichtete Medikation mit Acetylsalicylsäure. Sechzig Patient*innen erhielten eine PAR-gerichtete Medikation mit dem FIIa-Hemmer Dabigatran (n=17) oder dem FXa-Hemmer Rivaroxaban oder Apixaban (n=43).

Hierfür wurden venöse Blutproben von Patient*innen mit bekanntem Vorhofflimmern gesammelt, die sich 2016 zu elektiven Routineuntersuchungen in der kardiologischen Abteilung der Charité – Campus Benjamin Franklin vorstellten. Als Messparameter für das allgemeine kardiovaskuläre Risiko der Patienten wurde bei dieser Patientenkohorte zusätzlich im B-Bild-Gefäßultraschall eine Karotis-Intima-media-Dicken-Messung (*engl. „carotid intima-media thickness“, cIMT*) durchgeführt. Dafür wurden im Bereich der Arteria carotis communis beidseits jeweils drei Messwerte erhoben und gemittelt.

Eine detaillierte Beschreibung der Patientencharakteristika findet sich in **Tabelle-5**.

Tabelle 5: Zweite Kohorte: Patienten mit bekanntem VHF und verschiedener gerinnungsaktiver Medikation
(ebenfalls dargestellt in (1-3))

	ASS (n=10)	IIa (n=17)	Xa (n=43)
männl./weibl.	7/3	9/8	17/26
CHA ₂ DS ₂ -VASC	3	3,9	4
Herzinsuffizienz	2/10 (20%)	13/17 (76%)	26/43 (60%)
Ejektionsfraktion	66	62	59
Art. Hypertonie	9/10 (90%)	13/17 (76%)	36/43 (83%)
Alter (in Jahren)			
<65	2/10 (20%)	2/17 (12%)	9/43 (20%)
65-75	5/10 (50%)	11/17 (64%)	19/43 (44%)
>75	3/10 (30%)	4/17 (24%)	15/43 (34%)
Diabetes mellitus	2/10 (20%)	3/17 (17%)	13/43 (30%)
TIA/Schlaganfall	0	2/17 (12%)	4/43 (9%)
Körpergewicht (kg)	81	82	84
BMI (kg/m ²)	26,28	28,1	28,8
CRP (mg/l)	9,5	4,3	15,2

Werte sind im Mittel oder in Prozent angegeben. Abkürzungen: CRP= C-Reaktives Protein; TIA=Transitorisch ischämische Attacke; BMI=Body-Mass-Index.

3.3. Blutentnahme

Nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligungserklärung erfolgte die Blutentnahme im Rahmen einer Routineblutentnahme für klinische Zwecke aus einer peripheren Armvene. Ein Teil des gewonnenen Materials wurde dafür benutzt, über das mit der Charité kooperierende Labor des Zentrums für Transfusions- und Zelltherapie Berlin (ZTB) mittels etablierter Nachweismethoden folgende Laborparameter zu messen: Differentialblutbild, CRP, Procalcitonin, LDL, HbA1c, Fibrinogen, D-Dimere, Von-Willebrand-Faktor-Antigen, Von-Willebrand-Faktor-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität, Faktor-VIII, NT-proBNP, Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α .

3.4. PBMC-Isolierung aus humanem Vollblut

PBMC-Isolierung - Methodik

Aus dem Blut einer 7,5ml Lithium-Heparin-Monovette wurden in einem nächsten Schritt Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC's) isoliert.

Unter PBMC's werden alle Blutzellen mit rundem Nukleus zusammengefasst. Im Einzelnen umfasst dies Dendritische Zellen, Lymphozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten.

Durch eine Dichtegradient-Zentrifugation mit einem Separationsmedium mit einer Dichte von 1.077 g/ml lassen sich die Zellen in einer Vollblutprobe abhängig von ihrer Dichte in zwei Gruppen teilen. Die PBMC's finden sich nach der Zentrifugation auf Grund ihrer geringeren Dichte in der oberen Zellfraktion, während die Erythrozyten und die polymorphkernigen Leukozyten (Neutrophile, Basophile und Eosinophile Granulozyten) hiervon entsprechend ihrer höheren Dichte durch die Ficoll-Lösung getrennt in der unteren Zellfraktion zu finden sind (s. **Abbildung-5**).

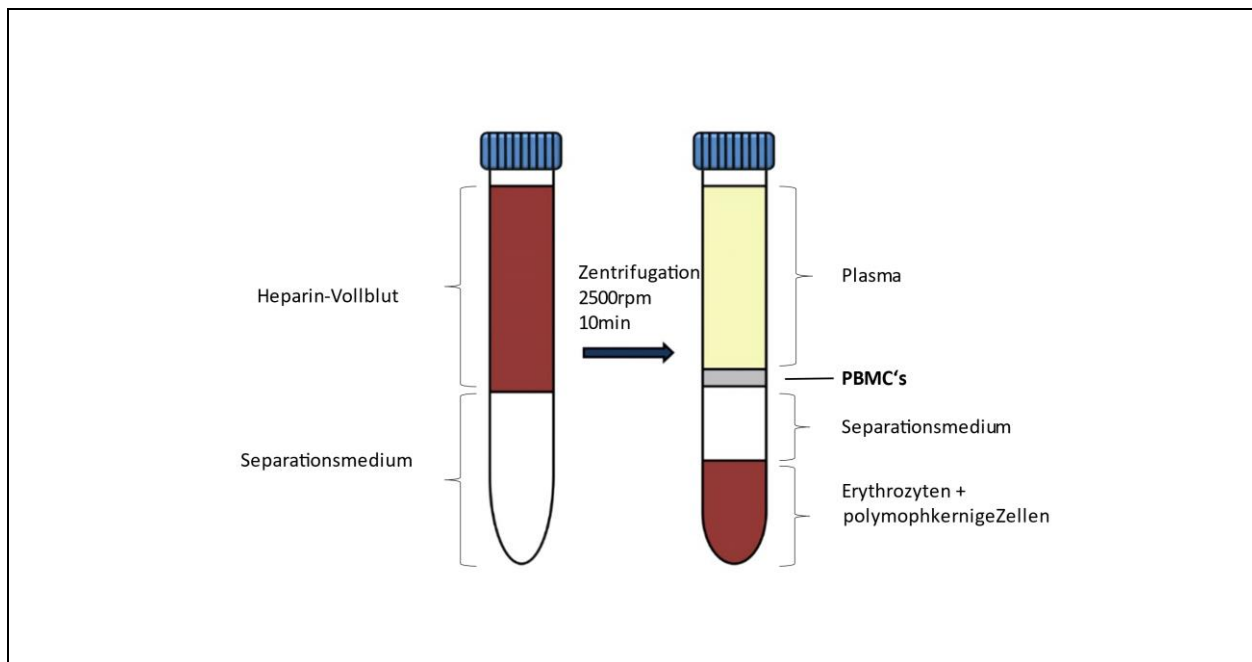


Abbildung 5: Schema der PBMC-Isolierung durch Dichtegradient-Zentrifugation mit einem 1.077g/ml-Separationsmedium

Durch die Zentrifugation kommt es zur Separation der Blutbestandteile. Dabei sammeln sich die Zellen mit größter Dichte (Erythrozyten, polymorphkernige Zellen) am Boden des Röhrchens, darüber befinden sich getrennt durch das Separationsmedium die mononukleären Zellen des Peripheren Blutes (*engl.* PBMC's) und in der oberen Fraktion das Blutplasma.

Der prozentuale Anteil der unterschiedlichen Immunzellpopulationen in der isolierten PBMC-Fraktion variiert individuell stark und hängt zusätzlich von dem aktuellen Immunstatus ab. Eine Übersicht über die durchschnittliche Zellverteilung innerhalb der PBMC-Fraktion zeigt **Abbildung-6**.

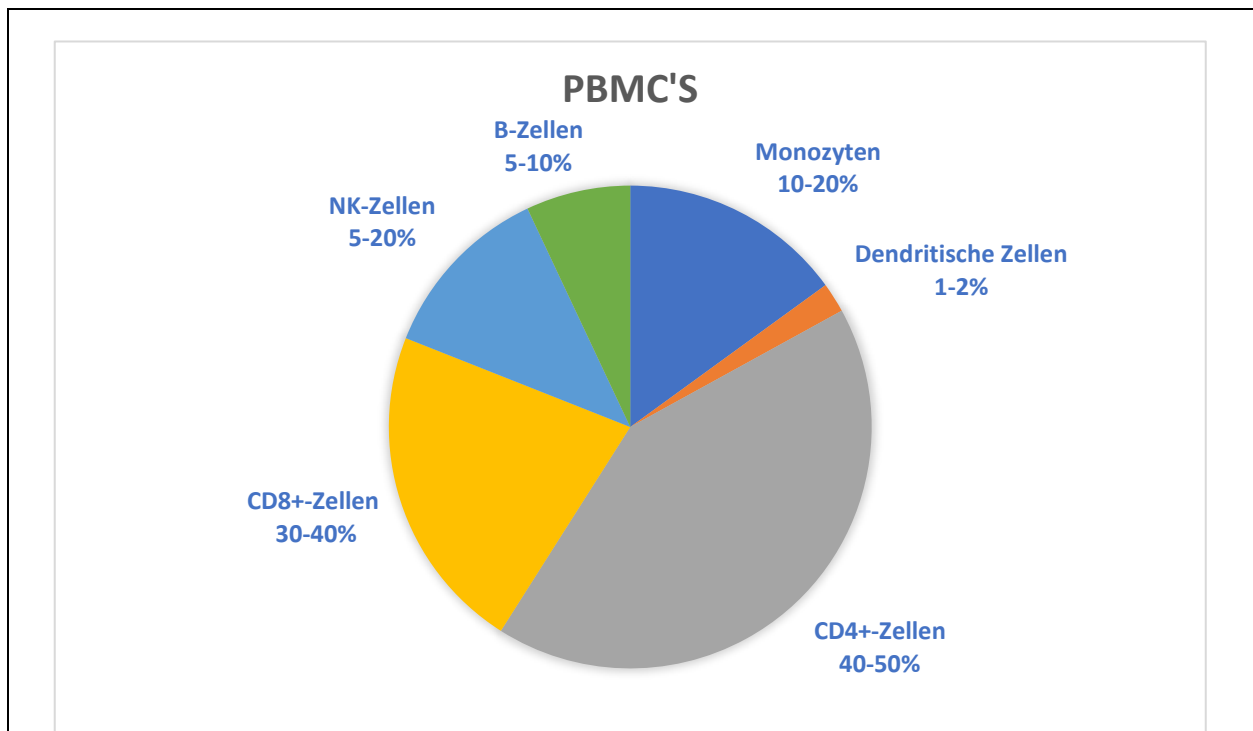


Abbildung 6: Durchschnittliche prozentuale Anteile der unterschiedlichen Zellpopulationen innerhalb der PBMC-Zellfraktion

Daten aus Verhoeckx K et al. Cham (CH): Springer. 2015 (117)

PBMC- Isolation - Probenverarbeitung

Das in der Heparin-Monovette gesammelte venöse Blut wurde für die PBMC-Isolation innerhalb von max. 4 Stunden weiterverarbeitet.

Dafür wurden für jede Blutprobe zunächst ein Leucosep™-Röhrchen mit 15ml Separationsmedium (Ficoll-Paque™ PLUS, 1.077mg/l) befüllt.

Nach vorsichtiger Hinzugabe des venösen Bluts wurden die Röhrchen bei 2500rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die Interphase mit den enthaltenen PBMC's zwischen Plasma und Separationsmedium wurde entnommen und anschließend zur Aufreinigung in einem Falcon-Röhrchen mit 45ml Pufferlösung aus phosphat-buffered saline (PBS) und Bovine-Serum-albumin (BSA) durchmischt und gekühlt bei 4°C für 7 Minuten bei 375g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das am Röhrchenboden befindliche PBMC- Pellet zur Elimination möglicher verbleibender Erythrozyten in 5ml Erylysepuffer (KHCO₃+NH₄CL + EDTA+H₂O)

resuspendiert und anschließend erneut mit 45ml PBS/BSA-Pufferlösung gewaschen und bei 4°C und 375g für 7 Minuten zentrifugiert.

Nach erneuter Resuspension in 45ml PBS/BSA-Pufferlösung wurden 10µl entnommen, die sich darin befindlichen Zellen mit 40µl Trypanblau gefärbt und unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Zählkammer ausgezählt.

Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 375g für 7 Minuten und Verwerfen des Überstandes wurde der Pellet vorbereitend für die Kryokonservierung mit einem Einfriermedium aus Fetalem-Kälberserum (FKS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert, wobei hier das Volumen abhängig von der vorher ermittelten Zellzahl so gewählt wurde, dass sich in einem Milliliter Einfriermedium ca. 1×10^7 Zellen befanden. Abschließend wurden die PBMC's in 1ml Kryotubes bei -80°C eingefroren.

3.5. Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie - Methodik

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der große Zellpopulationen innerhalb eines flüssigen Mediums ohne großen Zeitaufwand quantifiziert und differenziert werden können.

Hierfür lässt man die in einem flüssigen Medium befindlichen Zellen durch eine dünne Messkammer fließen. Hier werden sie von einem oder mehreren Lasern in definierten Wellenlängen angestrahlt. Beim Auftreffen auf die Zellen werden die Laserstrahlen abhängig von Zellgröße und -konsistenz unterschiedlich gebrochen und teils reflektiert. An Hand des dabei entstehenden charakteristischen Streuungsmusters (engl. „*Light-Scatter*“) können die unterschiedlichen Zelltypen differenziert werden (118, 119).

Die Lichtstrahlen, welche im Kleinwinkelbereich von 1°-20° zum Einfallswinkel des Laserstrahls gestreut werden (Vorwärtsstreulicht, engl. *Forward Scatter, FSC*), geben Auskunft über das Zellvolumen, während die Menge an stärker gebrochenen Lichtstrahlen > 20° (Seitwärtsstreulicht, „*Side Scatter*“, *SSC*) Aussagen zu der Komplexität des Zellinneren zulassen. Lichtstrahlen werden bei dem Übertritt von Medien mit unterschiedlicher optischer Dichte gebrochen oder reflektiert und zelluläre Bestandteile mit großer optischer Dichte, wie Granula oder ein Nukleus erhöhen das

Seitwärtsstreulicht(118, 119). Auf diese Weise lassen sich unterschiedliche Zellen einfach voneinander abgrenzen.

Aufgezeichnet werden die Messdaten durch eine entsprechende Software in einem Zytogramm oder Frequenzhistogramm.

Die vorherige Inkubation der Zellsuspension mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern ermöglicht eine zusätzliche Aussage über das Vorhandensein und die Quantität von Oberflächenmolekülen der unterschiedlichen Zellpopulationen.

Dabei werden in Abhängigkeit der zu untersuchenden Zielmoleküle (Antigene) entsprechende Antikörper mit unterschiedlichen gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) verwendet, wobei nach dessen laservermittelten Exzitation im Durchflusszytometer jedes Fluorochrom Lichtstrahlen in Form einer bestimmten Wellenlänge emittiert, was wiederum durch Photodetektoren detektiert wird.

So lässt sich messen, wie häufig die Zellen innerhalb einer bestimmten Zellpopulation mit entsprechenden Antikörpern markiert waren (engl.: *Frequency Of Parent*) und über die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (engl.: *Mean Fluorescence Intensity= MFI*) auch eine Aussage über die Quantität der Zielmoleküle auf der Zelloberfläche treffen.

Für diese Arbeit wurde ein FACSCalibur™-Durchflusszytometer mit der CellQuest Software (beide Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet.

Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) sind in **Tabelle-6** aufgeführt.

Tabelle 6: Charakteristika der verwendeten FACS- Antikörper nach Herstellerangaben von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

Ziel- antigen	Farbstoff	Maximale Exzitation (nm)	Maximale Emission (nm)
PAR-1	Alexa Fluor 488	488	515-545
PAR-2	Allophycocyanin (APC)	650	660
CD-3	Phycoerythrin (PE)	488	565-605
HLA- DR	Peridinin-chlorophyll Protein Complex (Per-CP)	482 + 564	675

Messung von internalisierten Rezeptoren

Im Rahmen des kontinuierlich stattfindenden Umbaus der Zellmembran kommt es zu einer regelmäßigen Internalisierung von PAR-Rezeptoren in die endosomalen Kompartimente (101, 103). Um auch die internalisierten Rezeptoren zu erfassen, erfolgte in einem zweiten Versuchsansatz vor der Anfärbung der Rezeptoren die Permeabilisierung der Zellmembranen mit Saponin. Zur Aufrechterhaltung der molekularen Stabilität der intrazellulären Rezeptoren erfolgte in dieser Versuchsreihe die zusätzliche Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA).

Durchflusszytometrie - Probenverarbeitung

Auftauen der PBMC's

Für das Auftauen der kryokonservierten PBMC's wurden zunächst für jede(n) Proband*in ein 50ml-Falcon-Röhrchen mit 20 ml eines Auftaumediums aus RPMI-604-Medium + FKS + PBS (alle ThermoFisherScientific™) im 37°C-Wasserbad vorbereitet.

Die in den Kryotubes befindlichen Proben wurden aus dem -80°C-Gefrierschrank entnommen und umgehend für 10-20 Sekunden im 37°C-Wasserbad unter optischer Kontrolle angetaut. Sobald

sich die Proben soweit verflüssigt hatten, dass sie sich aus dem Kryotube lösen ließen, wurden sie umgehend in das vorbereitete 50ml-Falcon-Röhrchen mit dem Auftaumedium überführt.

Anschließend wurden die Proben für 7 min mit 1400rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde der Zellpellet zum Waschen in 10ml Auftaumedium resuspendiert und der Zentrifugationsvorgang wiederholt.

Abschließend erfolgte die Resuspension der Zellen in einer PBS/BSA-Pufferlösung und mikroskopische Auszählung.

Für jede(n) Proband*in erfolgte die Verwendung von ca. 10^6 Zellen pro durchflusszytometrischer Versuchsreihe. Die restlichen Zellen wurden für die weiter unten beschriebene RNA-Isolation belassen.

Versuchsreihe-1: Durchflusszytometrie ohne vorherige Zellfixierung und Membranpermeabilisierung

Nach Zentrifugation der bei 10°C gekühlten Zellsuspension für 7 Minuten bei 1400rpm wurde zunächst vorsichtig der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde auf den Zellpellet die Antikörper-Färbemischung aus den monoklonalen Antikörpern (5µl Human PAR1 Alexa Fluor® 488[R&D-Systems], 5µl Human PAR2 APC-konjugierter Antikörper [R&D-Systems], 0,5µl Human CD3 Epsilon PE-konjugierter Antikörper[R&D-Systems], 1µl HLA-DR Per-CP konjugierter Antikörper [R&D-Systems], 1µl Beriglobin) und 20µl PBS hinzugegeben. Es erfolgte die Resuspension auf dem Vortex-Kreisschüttler und die Inkubation im Dunkeln für 15 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeder Probe weitere 300µl PBS hinzugegeben und durchflusszytometrisch gemessen.

Versuchsreihe-2: Durchflusszytometrie mit vorheriger Zellfixierung und Membranpermeabilisierung

Nach Zentrifugation der aufgetauten PBMC-Zellsuspension (2000rpm, 4°C, 5 min) und Verwerfen des Überstandes wurden zur Zellfixierung zunächst 100µl einer 4%igen PFA-Lösung auf den Zellpellet gegeben.

Nach Resuspension des Pellets auf dem Vortex-Kreisschüttler wurden die Proben für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden mit dem Ziel der Elimination des verbliebenden PFA 300µl PBS hinzugegeben, die Proben erneut zentrifugiert (2000rpm, 4°C, 5min) und der Überstand verworfen.

Die in Versuchsreihe-1 beschriebenen Antikörper-Färbemischung wurde pro zu färbender Probe um 5µl Saponin (1:10) ergänzt. Anschließend erfolgte die Färbung, Inkubation, sowie die Messung im Durchflusszytometer identisch zu Versuchsreihe-1.

3.6. Quantifizierung der PAR-Genexpression

Für das genauere Verständnis der Regulation von PAR-1 auf Ebene der Genexpression bei Patienten mit VHF erfolgte parallel zum Nachweis des Proteins via Durchflusszytometrie aus einem Teil der übrig gebliebenen aufgetauten Zellen die PAR1-mRNA-Isolation und anschließende Quantifizierung mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).

RNA-Isolation mit peqGold TriFast

Homogenisierung

Für die RNA-Isolation wurden nach dem oben beschriebenen standardisierten Auftauen und Auszählen jeweils eine Zellsuspension mit 1×10^6 PBMC's verwendet.

Hierfür wurde der abzentrifugierten Zellpellet nach Verwerfen des Überstands zunächst in jeweils 500µl peqGold Trifast-Lösung (TriFast™ - DNA/RNA-protein extraction reagent, VWR Life Science) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden jeweils 100µl Chloroform hinzugegeben und die Proben weitere 5min stehen gelassen.

Phasentrennung

Durch Zentrifugation der Proben für 15min bei 12.000 x g wurde die Suspension entsprechend der Dichte ihrer Bestandteile in drei Phasen aufgetrennt, wobei die RNA in der oberen, wässrigen Phase enthalten ist. In der zweiten organischen und Interphase befindet sich die DNA, die Proteine in der unteren organischen Phase.

RNA-Präzipitation

Die wässrige Phase wurde vorsichtig mittels Pipette abgenommen in ein frisches Röhrchen überführt. Zu jeder Probe wurden 250µl Isopropanol hinzugegeben und diese nach vorsichtigem Durchmischen für 15min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C, wodurch sich das gelartige RNA-Präzipitat am Röhrchenboden sammelt.

Waschen und Lösen der RNA

Der Isopropanol-Überstand wurde vorsichtig mittels Pipette abgenommen und das Pellet zweimal mit 0,5ml 75 % Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (10 Minuten, 12.000 x g, 4 °C) gewaschen.

Anschließend wurde das RNA-Pellet über 7min an der Luft getrocknet und dann mit deionisierten RNase-freiem Wasser durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Pipette gelöst.

Messung des RNA-Gehalts

Im Anschluss erfolgte die Messung des RNA-Gehalts in einem NanoDrop™-Spektrophotometer, wobei alle verwendeten Messwerte eine 260/280-Ratio von > 1,8 erreichten.

Umschreibung der RNA in cDNA

Vorbereitend für die Quantifizierung wurde zunächst die isolierte einzelsträngige und dadurch relativ instabile RNA mittels reverser Transkription in stabilere komplementäre (engl.: complementary) cDNA überführt.

Dafür wird das Enzym „Reverse Transkriptase“, eine retrovirale RNA-abhängige DNA-Polymerase, verwendet. Hierbei fungieren Random-Hexamer-Oligonukleotide als zufällige Primer, über welche die Reverse Transkriptase an die RNA bindet und aus Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTP) die komplementäre DNA synthetisiert.

Für die cDNA-Synthese im Rahmen dieser Arbeit wurden die Reagenzien des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems™ verwendet.

Arbeitsschritte für die Reverse Transkription

1. RNA-Denaturierung: 1 µg RNA wurde bis zu einem Volumen von 7,1 µl mit RNase-freiem Wasser vermischt und für 5 min bei 65°C inkubiert.
2. Primer-Bindung: Im Anschluss wurden 2,9 µL des Mastermixes aus Reverser Transkriptase, RT-Puffer, Random Primer und dNTP (genaue Zusammensetzung **s. Tabelle-7**) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 5 min auf Eis gekühlt.

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Thermocycler wie folgt inkubiert:

3. Primer-Extension: Auf Grund der Verwendung der relativ kurzen Random-Hexamere als Primer erfolgte zur Sicherstellung einer sicheren Bindung an die RNA zum Zeitpunkt des cDNA-Polymerisierungsbeginns die Inkubation für 10 min bei relativ niedriger Temperatur von 25°C.
4. DNA-Polymerisierung: Im Folgenden wurde die Temperatur entsprechend des Temperaturoptimums der Reversen Transkriptase auf 37°C erhöht und das Reaktionsgemisch für 120min inkubiert.
5. Enzymdeaktivierung: Inkubation bei 85°C für 5 min.
6. Lagerung der cDNA für mehrere Stunden bei 4 °C.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese

Substanz	Volumen je Reaktion
10x RT-Puffer	1µl
25x dNTP	0,4µl
10x Random Primer	1 µl
Reverse Transkriptase (50 U/µL)	0,5µl
Summe	2,9µl

Messung der Gen-Expression mittels Real-time quantitative PCR (TaqMan-PCR)

Die quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (engl.: *Real-time quantitative Polymerase chain reaction*) stellt eine Methode dar, bei der DNA vervielfältigt und gleichzeitig quantifiziert wird.

Die Quantifizierung erfolgt im Falle der TaqMan-Methode mittels Fluoreszenzgekoppelten Sonden, deren Abbau im Laufe der PCR-Zyklen quantifiziert werden kann.

Die Sonden sind spezifische Oligonukleotide, welche komplementär zur Ziel-DNA sind, deren Expression quantifiziert werden soll. An dem 5'-Ende der Sonde ist ein Reporter-Fluorochrom gekoppelt, dessen Fluoreszenzsignal durch die räumliche Nähe des am 3'-Ende der Sonde gekoppelten Quenchers gehemmt wird.

Reporter und Quencher sind so gewählt, dass das Emissionsspektrum des Reporters den Quencher anregt. Solange Reporter und Quencher an dem Oligonukleotid (Sonde) gekoppelt sind, emittiert der Reporter kein Licht, sondern überträgt seine Energie auf den Quencher. Sobald die Taq-Polymerase jedoch den komplementären Strang hybridisiert und die Sonde erreicht, wird der Reporter durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase freigesetzt und emittiert nun Licht. Mit jedem PCR-Zyklus werden mehr Farbstoffmoleküle freigesetzt und die gemessene Fluoreszenzintensität nimmt proportional zur Menge der synthetisierten Ziel-DNA-Kopien zu.

Derjenige PCR-Zyklus, ab welchem die DNA-Amplifikation eine exponentielle Phase erreicht und sich mit jedem weiteren Zyklus die DNA-Menge verdoppelt, ergibt den Ct-Wert (engl.: „*Cycle threshold*“, Schwellenwertzyklus). Er ist ein relatives Maß für die Konzentration des Zielgens in der Messprobe.

Für die korrekte quantitative Einordnung und zur Identifizierung von Fehlmessungen, wird der Ct-Wert des Zielgens mit dem Ct-Wert eines sogenannten „Housekeeping Gens“, also einem Gen, welches unabhängig von Regulationseinflüssen basal in allen Zelltypen exprimiert wird, hier GAPDH, normalisiert (120, 121).

Für die vorliegende Arbeit wurden im Anschluss an die cDNA-Synthese die Expression der Gene PAR1, PAR2 und GAPDH mittels TaqMan-PCR in einem ViiA 7 Real-time PCR-System quantifiziert. Das Temperaturprofil bestand dabei aus: 2 min Erwärmung auf 50 °C, anschließend zur Denaturierung der cDNA eine Steigerung auf 95 °C für 15 Sekunden. Danach erfolgte für die Hybridisierung von Primern und Sonden, sowie Elongation eine Absenkung der Temperatur auf 60°C für 1 min.

In 384-Wellplatten wurden Mastermix, RNase-freies Wasser, die jeweilige TaqMan-Sonde des zu messenden Zielgens (TaqMan Gene Expression Assay für PAR1, PAR2 und GAPDH von ThermoFisher Scientific™) und die synthetisierte cDNA der zu analysierenden Probe nach dem standardisierten Protokoll gemischt (s. **Tabelle-8**) und in technischer Doppelbestimmung quantifiziert.

Die Ct-Werte der Gene wurden ermittelt und anschließend wurden die $2^{-\Delta Ct}$ -Werte als relative mRNA-Expression mittels Normalisierung auf GAPDH berechnet.

Tabelle 8: Hinzugefügte Komponenten für die Taqman-PCR

Komponente	Volumen je Reaktion
Sonde: TaqMan Gene Expression Assay (20xforward, reserve)	0,5µl
Preamplifizierte cDNA	1µl
TaqMan Universal PCR-Mastermix	5µl
Nuklease freies Wasser	3,5µl
Endvolumen	10µl

3.7. Bestimmung der Plasmakonzentration von Galectin-3 und sST-2 mittels ELISA

Mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) können in einer Probe antikörperbasiert Antigene nachgewiesen und quantifiziert werden. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten ELISA-Kits „Human-ST2/IL-1 R4-Duonet-ELISA (R&D Systems, DY523B-05)“ und „Human Galectin-3 DuoSet ELISA (R&D Systems, DY1154)“ basieren auf dem Prinzip des Sandwich-ELISAs.

Hierbei werden pro Testdurchlauf jeweils zwei Antikörper verwendet, die für unterschiedliche Epitope auf dem jeweiligen Zielantigen spezifisch sind.

In einem ersten Schritt werden Fänger-Antikörper in Vertiefungen am Boden der Mikroplatte fixiert, welche nach Zugabe der Probe das Zielantigen binden und dieses so auf der Platte fixieren. Nach Herauswaschen von unspezifischem Material aus den Vertiefungen wird anschließend ein Enzym-konjugierter Detektionsantikörper hinzugegeben, welcher an einem anderen Epitop des Zielantigens bindet.

Nach einem weiteren Waschvorgang wird ein kolorimetrisches Substrat auf die Platte gegeben, welches durch das am Detektionsantikörper konjugierte Enzym zu einer Farblösung umgesetzt wird. Diese Farbreaktion wird nach einer festgelegten Inkubationszeit standardisiert durch eine Stopplösung unterbrochen.

Die anschließend durch die Farbreaktion entstandene und durch ein Photometer bei definierter Wellenlänge gemessene optische Dichte lässt dann Rückschlüsse auf die Existenz und Quantität des Zielantigens in der jeweiligen Probe zu. Dafür wird das gemessene Signal der Proben mit dem Signal der Verdünnungsreihe einer Standardlösung, welche eine bekannte Konzentration des zu bestimmenden Antigens enthält, verglichen.

Die für diese Arbeit verwendeten ELISA-Kits basieren auf der Bindung von Streptavidin-Peroxidase an die Biotin-Gruppe des biotinylierten Fangantikörpers und der enzymatischen Umsetzung des Farbsubstrats durch die Peroxidase.

Für die möglichst genaue Quantifizierung von Gal-3 und sST-2 aus dem Plasma der Probanden wurde vor Durchführung der Testreihen jeweils in einem Testlauf der optimale Verdünnungsfaktor der Proben ermittelt. Vor diesem Hintergrund verdünnten wir die Plasma-Proben für den Gal-3-Assay in einem Verhältnis von 1:15, für den ST-2-Assay von 1:20.

Bei der Durchführung der Tests wurde sich ohne Abweichungen an die Herstellervorgaben gehalten. Die in den ELISA-Kits enthaltenen Puffer und Lösungen wurden unmittelbar vor Durchführung der Test vorbereitet.

Nach Unterbrechung der enzymatischen Reaktion durch Zugabe der Stopplösung, erfolgte die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Wellenlängenkorrektur bei 540 nm (Photometer: Tecan™ Infinite F/M 200 Pro).

Durch den Vergleich der gemessenen photometrischen Dichte der Proben mit dem Signal der in den ELISA-Kits enthaltenden Standardlösungen, welche eine bekannte Konzentration von Gal-3, bzw. ST-2 enthält, konnten die Konzentrationen der jeweiligen Analyten in den Proben bestimmt werden.

Hierfür wurde softwaregestützt aus den Mittelwerten der pro Messplatte doppelt aufgetragenen Verdünnungsreihe der Standard-Lösung eine Standardkurve erstellt, in der die gemessene optische Dichte auf der y-Achse gegen die Antigenkonzentration auf der horizontalen X-Achse aufgetragen ist.

Mittels linearer Regression konnten die jeweiligen Gal-3-, bzw. ST-2-Konzentrationen in den Proben bestimmt werden.

Für die Bestimmung der tatsächlichen Konzentrationen erfolgte abschließend noch die Multiplikation der Messergebnisse mit dem jeweiligen für den ELISA verwendeten Verdünnungsfaktor (15, bzw. 20).

3.8. Quantifizierung der Atherosklerose im Gefäßultraschall

Vor dem Hintergrund der Fragestellung eines möglichen protektiven Effekts durch eine PAR-gerichtete Antikoagulation durch den Einsatz von NOAK bei Patient*innen mit Vorhofflimmern wurde bei den Patient*innen mit bekanntem Vorhofflimmern (zweite Kohorte) eine Duplexsonografie mit Darstellung der Arteria carotis communis beidseits durchgeführt.

Unter Einsatz eines linearen Ultraschallkopfs wurden bei jedem Patienten durch manuelle Setzung der Messgrenzen jeweils drei Messwerte pro Seite erhoben. Für den statistischen Vergleich wurden jeweils der gebildete Mittelwert und der maximale Messwert herangezogen.

3.9. Statistische Auswertung

Die deskriptive Darstellung der ordinal skalierten Daten erfolgte in Form von Boxplots mit Darstellung des Medians, sowie Markierung des Mittelwerts mit einem Kreuz.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant bewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden fettgedruckt dargestellt.

Folgende statistische Testverfahren wurden verwendet: Für den Vergleich unabhängiger Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Für die Berechnung monotoner Zusammenhänge wurde die Rangkorrelation nach Spearman berechnet und der Korrelationskoeffizient (r) angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel, Version Office Professional Plus 2016.

4. Ergebnisse

4.1. Erste Kohorte: Vergleich der PAR1 und PAR2- Expression

Bisherige Studiendaten suggerieren eine Schlüsselrolle von PAR1 und PAR2 für die Pathogenese von Vorhofflimmern. Die exzessive Aktivierung der beiden Rezeptoren trägt wahrscheinlich maßgeblich über proinflammatorische Prozesse zu einem negativem atrialen Umbau mit fortschreitender Fibrosierung als Grundlage von Vorhofflimmern bei, wobei zahlreiche Studiendaten auf einen proinflammatorischen Immunstatus über das Herz hinaus als wichtige Komponente für die Entstehung von Vorhofflimmern hinweisen. Ein Großteil der Peripheren Mononukleäre Blutzellen (PBMC's) tragen als Immunzellen PAR-Rezeptoren. Auf Grund der systemischen Verfügbarkeit der Gerinnungsfaktoren, ist davon auszugehen, dass eine exzessive PAR-Aktivierung durch Thrombin und Faktor-Xa auch außerhalb des Herzens messbar ist, sodass die Untersuchung der PAR1 und PAR2 Expression auf ausgewählten PBMC-Populationen durchgeführt wurde.

4.1.1. Untersuchte PBMC-Populationen

Für die Analyse der PAR-Expression wurden drei PBMC-Subgruppen betrachtet:

HLA-DR+ - Zellen

Das Oberflächenmolekül HLA-DR oder MHC-Klasse-II-Komplex (*engl. „Major histocompatibility complex-II“*) stellt eines der Schlüsselmoleküle von Antigen-präsentierenden Zellen dar. Die HLA-DR-exprimierenden PBMC's umfassen Monozyten, Dendritische Zellen, aktivierte T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, welche durch die MHC-II-gekoppelte Antigenpräsentation gegenüber CD4+-T-Helferzellen eine proinflammatorische Immunantwort auslösen können(122, 123).

Lymphozyten

Die Population der Lymphozyten lässt sich im Durchflusszytometer durch den ähnlichen Zellphänotyp mit entsprechend ähnlicher Vorwärts- und Seitwärtsstreuung gut von den anderen Zellreihen der PBMC's abgrenzen. Die Gruppe umfasst T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

CD3-negative Zellen

Bei dem Oberflächenmoleküle CD3 handelt es sich um einen T-Zellrezeptor, welcher durch seine ubiquitäre Expression in allen T-Zellen als standardisierter T-Zellmarker verwendet wird (124). Die Betrachtung der CD3-negativen Zellen umfasst dementsprechend das komplette Spektrum der PBMC's mit Ausschluss der T-Zellen.

4.1.2. Vergleich der zellulären PAR1-Rezeptormenge

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass bei Patient*innen mit erstdiagnostiziertem VHF im Vergleich mit der Kontrollkohorte in allen drei untersuchten Zellreihen sowohl prozentual mehr PAR1-tragende Zellen vorkommen, sowie dass auch die extrazelluläre PAR1-Rezeptormenge, gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), bei den untersuchten Immunzellen dieser Patienten erhöht sind (s. **Abbildung-7**).

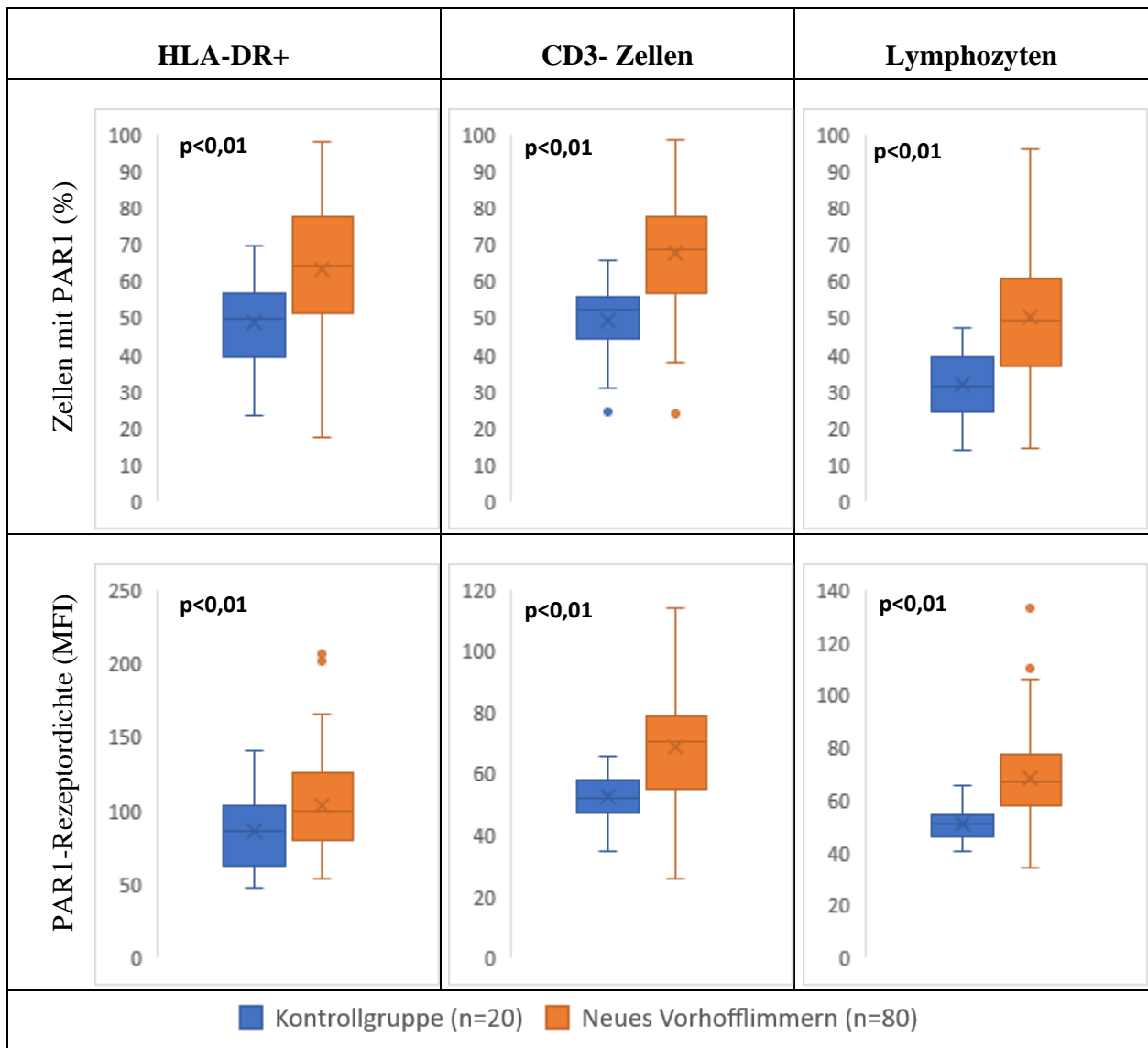


Abbildung 7: Vergleich der PAR1-Expression bei neuem VHF und der Kontrollgruppe

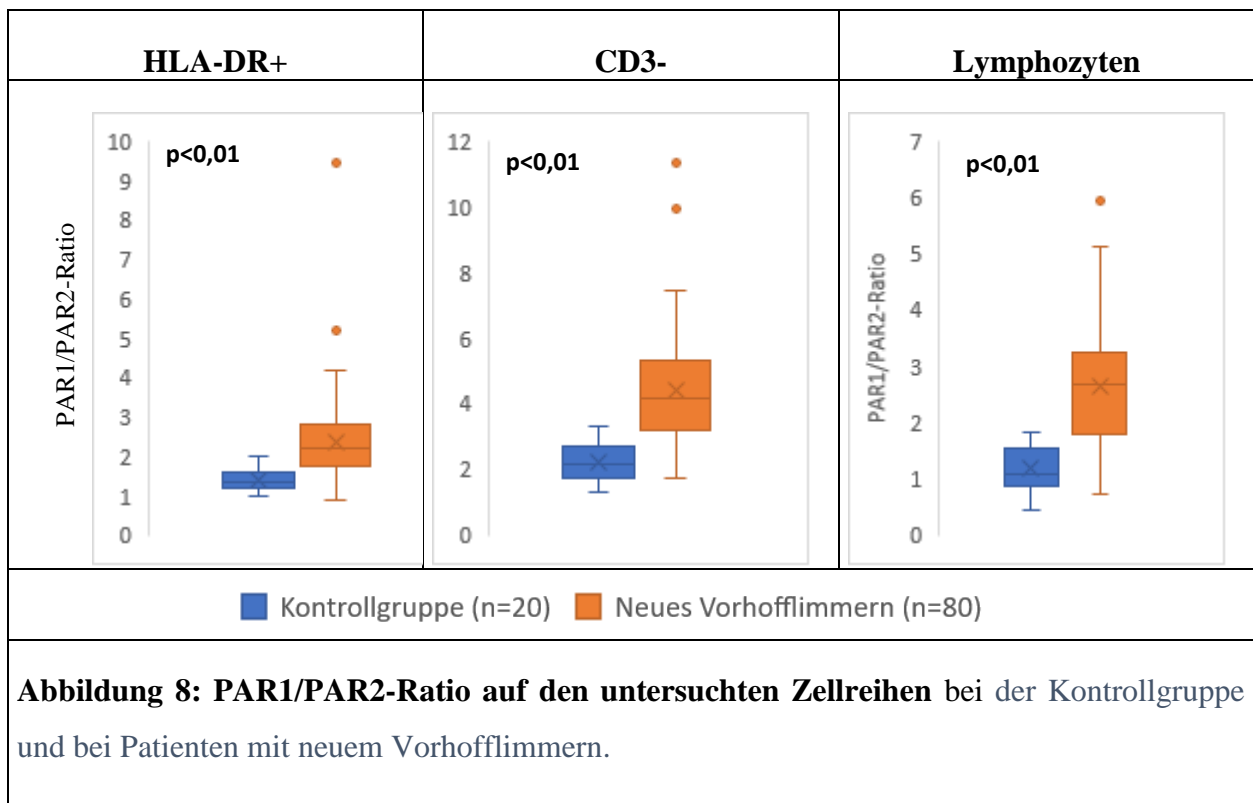
Aufgezeigt werden für die unterschiedlichen Zellreihen jeweils in der oberen Spalte der prozentuale Anteil der Zellen mit durchflusszytometrisch nachgewiesener PAR1-Expression intra- und extrazellulär, sowie in der unteren Spalte die extrazelluläre PAR1-Rezeptordichte, gemessen an der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI).

(Teilergebnisse der Abbildung ebenfalls dargestellt in Friebel J et al. Int. J. Mol. Sci. 2024 (3))

4.1.3. Vergleich der extrazellulären PAR1/PAR2-Ratio

Bei der Betrachtung des extrazellulären Verhältnisses von PAR1 zu PAR2 auf diesen Zellreihen, angegeben als die PAR1/PAR2-Ratio, ergab sich für beide Gruppen eine mengenmäßige Dominanz des PAR1-Rezeptortyps.

Bei Patient*innen mit erstdiagnostiziertem Vorhofflimmern zeigte sich diese PAR1-Dominanz jedoch im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe ausgeprägter. So war die PAR1/PAR2-Ratio für alle untersuchten Zellreihen im Vergleich mit der Kontrollgruppe erhöht (s. **Abbildung-8**).



4.1.4. Quantitative Genexpression von PAR1 bei erstdiagnostiziertem VHF

Für das bessere Verständnis genetischer Regulierungsmechanismen von PAR1 bei Patient*innen mit neuem Vorhofflimmern wurde für diese Gruppe untersucht, in wie weit die durchflusszytometrisch gemessene extrazelluläre PAR1-Rezeptormenge (quantifiziert durch PAR1-Mean fluorescence intensity, MFI) mit der PAR1-Genexpression (quantifiziert durch Taqman-PCR) korreliert.

Hier zeigte sich für die Lymphozyten und CD3-negativen Zellen eine deutlich negative Korrelation. Für HLA-DR+-Zellen zeigte sich ebenfalls ein Trend zur negativen Korrelation, wobei das Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht wurde (s. **Abbildung-9**).

An Hand dieser Ergebnisse lässt sich dementsprechend für Patient*innen mit erstdiagnostiziertem Vorhofflimmern auf Transkriptionsebene eine herunterregulierte PAR1-Expression bei hoher extrazellulärer PAR1-Menge annehmen.

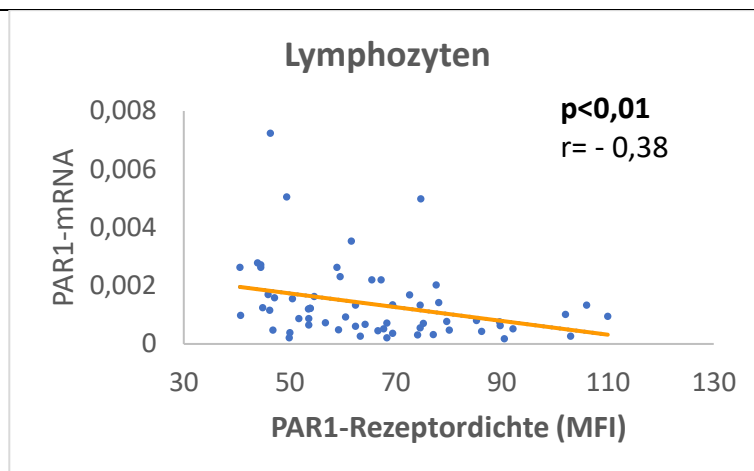
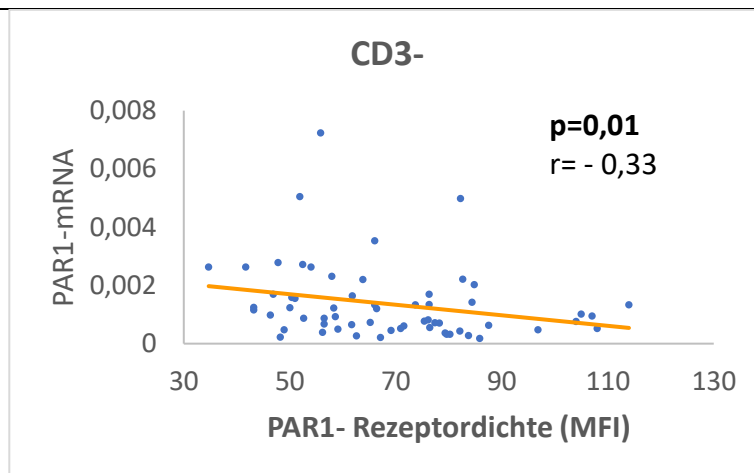
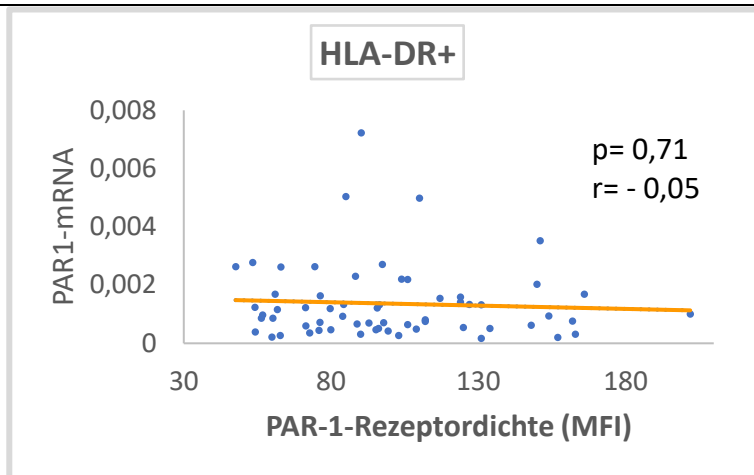


Abbildung 9: Korrelation der extrazellulären PAR-1-Rezeptordichte an Hand der Mean fluorescence Intensity (MFI) mit der durch TaqMan-PCR quantifizierten PAR1-Genexpression bei Lymphozyten, HLA-DR+- und CD3- Zellen aus dem Plasma von Patienten mit neu diagnostiziertem Vorhofflimmern (n=80).

4.2. Erste Kohorte: Vergleich der Entzündungs-, Fibrose- und Gerinnungsmarker

Die unter 4.1. aufgezeigten Ergebnisse lassen auf eine erhöhte PAR1-Signalling bei Patient*innen mit Vorhofflimmern schließen, was eine der Hauptthesen dieser Arbeit bestätigt.

Ob sich eine vermehrte PAR1- Aktivierung mit einem proinflammatorischen Immunstatus, sowie mehr Fibrose- und Gerinnungsaktivität in Zusammenhang bringen lässt, soll in dem folgenden Abschnitt aufgezeigt werden.

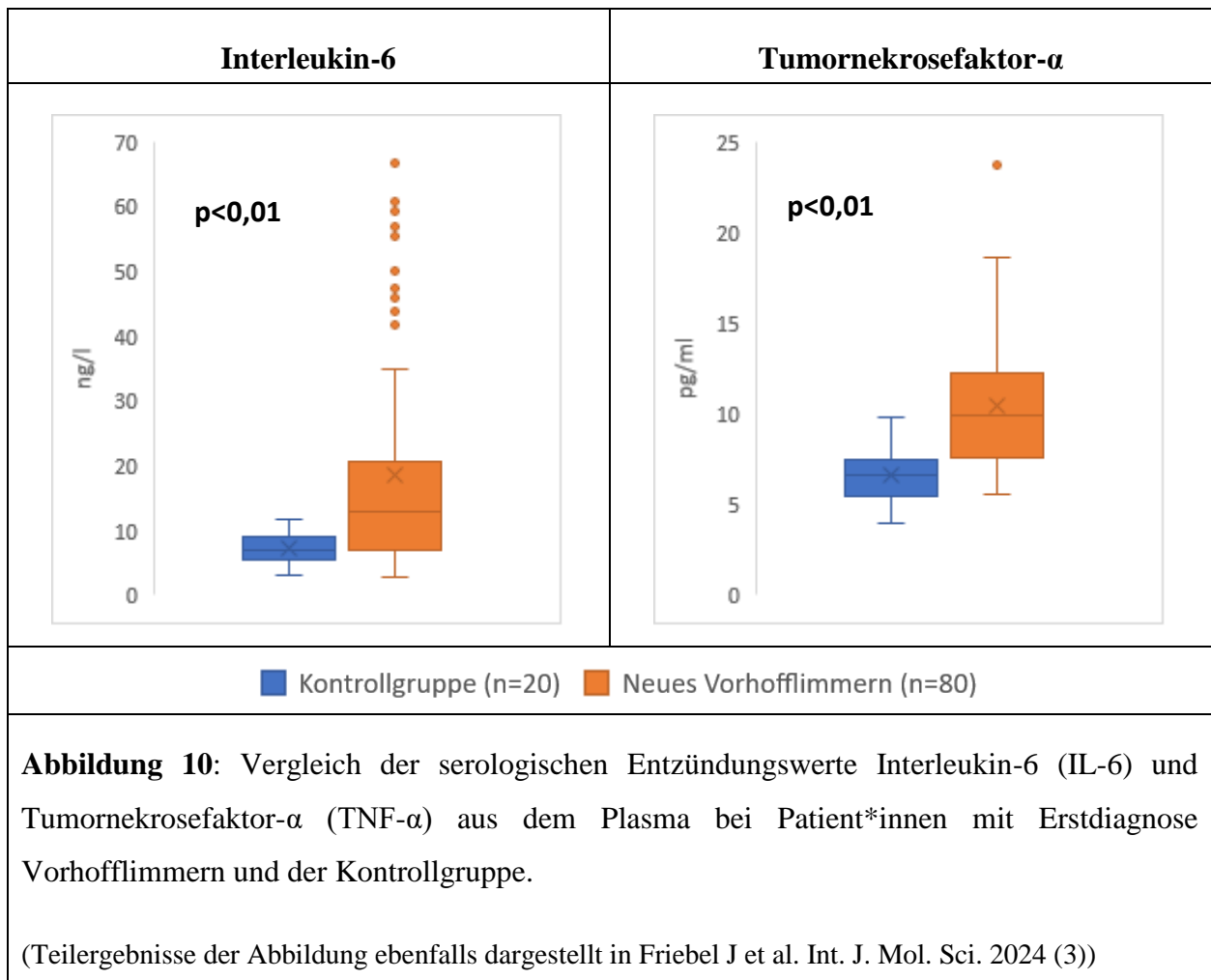
4.2.1. Entzündungsparameter

Ein exzessives PAR1-Signalling ist bei einer Reihe von Erkrankungen mit proinflammatorischen Prozessen vergesellschaftet. Die oben genannten Ergebnisse lassen auch bei Patient*innen mit einer frühen Form von Vorhofflimmern auf ein erhöhtes PAR1-Signalling schließen.

Um einen Zusammenhang mit vermehrter Entzündungsaktivität bei dieser Patientengruppe zu untersuchen, wurden in dessen Plasma die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) quantifiziert und mit der Kontrollgruppe verglichen.

IL-6 und TNF- α und wirken bei einer Vielzahl lokaler und systemischer entzündlicher Prozesse insbesondere als proinflammatorische Immunregulatoren und gelten daher als sensible periphere Entzündungsmarker.

Abbildung-10 veranschaulicht die deutlich erhöhten Messwerte der beiden Entzündungsmediatoren bei Patient*innen mit neuem Vorhofflimmern im Vergleich mit der Kontrollgruppe.



4.2.2. Fibrosemarker

Ein erhöhtes PAR1-Signalling scheint bei Patient*innen mit frühem Vorhofflimmern eine wichtige Ursache für eine erhöhte Entzündungsaktivität im Herzgewebe sein, welche wiederum die Grundlage für den mit VHF assoziierten negativen atrialen Umbau darstellen könnte.

Eine zunehmende atriale Fibrose, insb. des linken Vorhofs hat hierbei eine zentrale Bedeutung für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern. So resultieren aus ihr atriale Dysfunktion und zunehmend heterogene myokardiale Leitungseigenschaften der Vorhöfe, welche unter anderem elektrische Re-entries als elektrophysiologisches Korrelat für anhaltende Tachyarrhythmien der Vorhöfe bedingen können.

Wie bereits für den proinflammatorischen Immunstatus beschrieben, scheint auch ein systemischer profibrotischer Status bei der Entstehung von Vorhofflimmern vorzuliegen, wobei dieser eng mit den systemischen Entzündungsprozessen verknüpft ist und zum Teil aus ihnen resultiert.

Um diesen suggerierten profibrotischen Status von Patient*innen mit Vorhofflimmern zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit aus deren Plasma die peripheren Fibrosemarker sST2 und Galectin-3 mittels Sandwich-ELISA-Methode quantifiziert und ein Vergleich der Patienten mit Erstdiagnose Vorhofflimmern und der Kontrollkohorte vorgenommen. Beide Faktoren spielen pathophysiologisch eine Rolle für die Aktivierung proinflammatorischer und -fibrotischer Signalwege und erhöhte Plasmawerte sind mit kardialer Fibrose assoziiert.

Abbildung-11 und **Abbildung-12** zeigen den Vergleich der Messwerte für beide Gruppen. Hieraus wird ersichtlich, dass sich in der Gruppe mit Erstdiagnose Vorhofflimmern sowohl die Galectin-3-, wie auch die sST2-Werte deutlich erhöht zeigten.

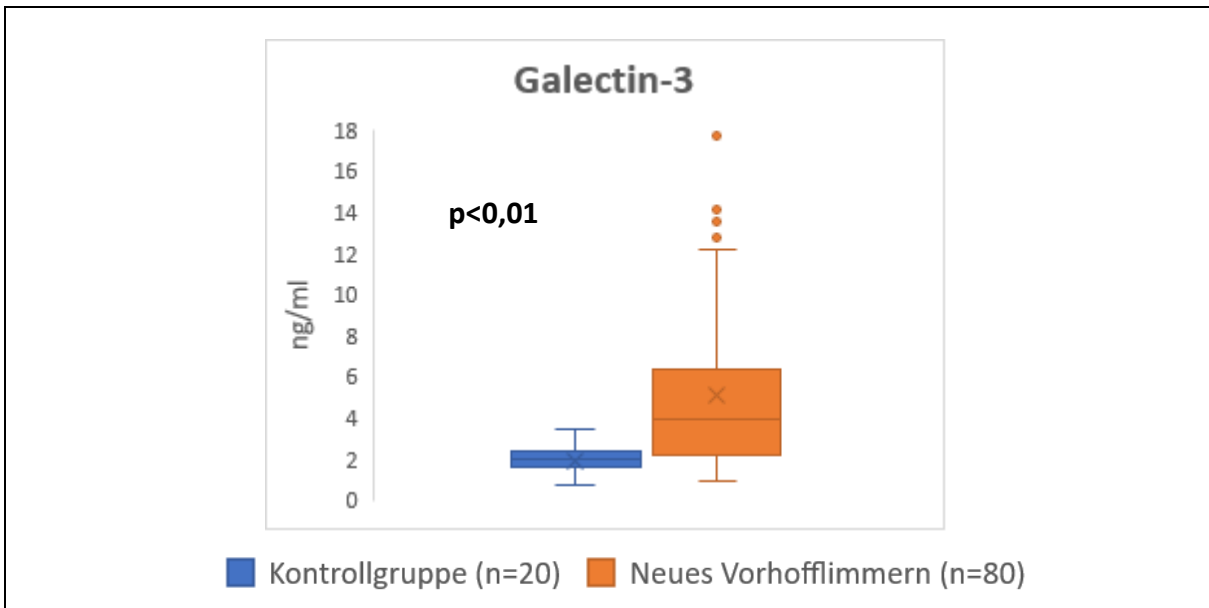


Abbildung 11: Vergleich des Fibrosemarkers Galectin-3 aus dem Plasma bei Patient*innen mit Erstdiagnose Vorhofflimmern und der Kontrollgruppe.

(Ergebnisse ebenfalls veröffentlicht in Friebel et al. Cells. 2022 (1))

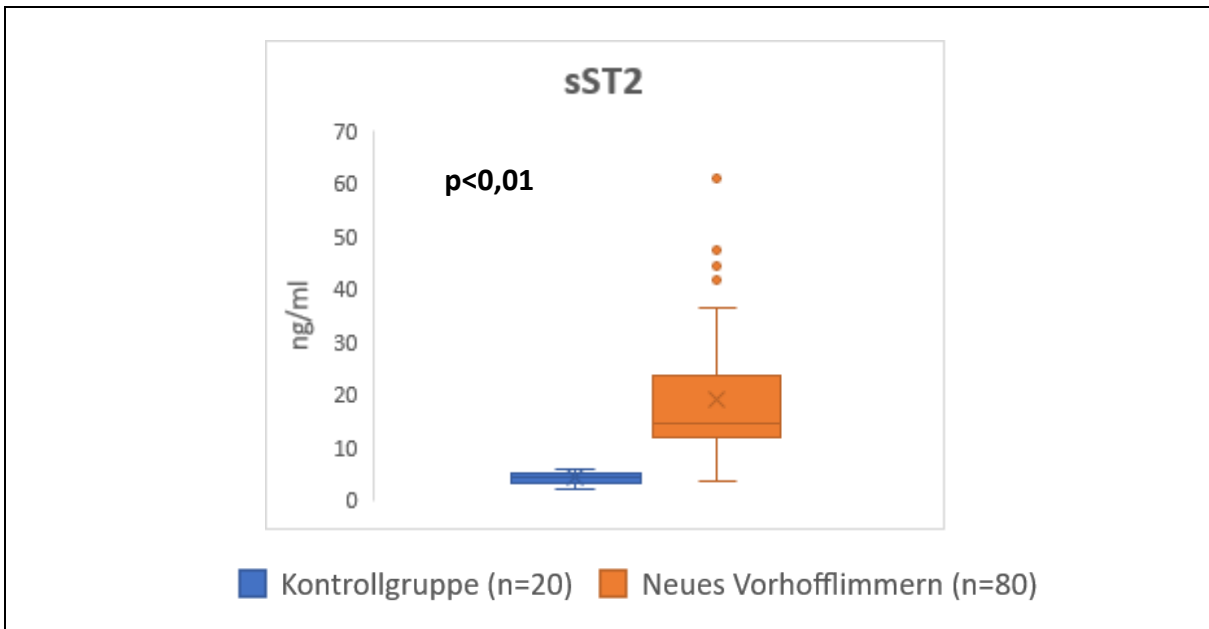


Abbildung 12: Vergleich des Fibrosemarkers lösliches ST2(soluble ST2, sST2) aus dem Plasma bei Patient*innen mit Erstdiagnose Vorhofflimmern und der Kontrollgruppe

(Ergebnisse ebenfalls veröffentlicht in Friebel et al. Cells. 2022 (1))

4.2.3. Gerinnungsmarker

Vorhofflimmern geht mit einem deutlich erhöhten Risiko für kardioembolische Ereignisse einher. Wie in der Einleitung beschrieben, scheint dies jedoch nicht ausschließlich durch vermehrte Blutstase des dysfunktionalen linken Vorhofes, sondern vielmehr multifaktoriell bedingt zu sein. Auch hier dürfte der strukturelle Umbau der Vorhöfe, welcher unter anderem mit einer endothelialen Dysfunktion einhergeht, wesentlich an einer erhöhten Gerinnungsaktivität bei Patient*innen mit Vorhofflimmern beteiligt sein.

Die Gerinnungsfaktoren Thrombin und Faktor-Xa sind die beiden Hauptaktivatoren von PAR1. PAR2 hingegen kann von Faktor-Xa direkt und von Thrombin nur indirekt aktiviert werden.

Eine vermehrte Gerinnungsaktivität bei Vorhofflimmern sollte dementsprechend hypothetisch mit einer erhöhten Aktivierung von PAR1 und PAR2 einhergehen, was wiederum über den vermehrten atrialen Umbau in einem bösartigen Kreislauf die Gerinnungsaktivität dieser Patient*innen verstärken könnte.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden unterschiedliche Gerinnungsmarker aus dem Plasma von Patient*innen mit neuem Vorhofflimmern und der Kontrollgruppe verglichen.

Dabei wurden sowohl Parameter der primären über Thrombozytenaggregation vermittelten, wie auch der sekundären plasmatischen Gerinnung untersucht.

Von-Willebrandt-Faktor zirkuliert an Faktor-VIII gebunden im Blut und initiiert an verletztem Endothel die Thrombozytenaggregation. Um die Aktivität der primären Thrombozytenvermittelten Gerinnung zu untersuchen, wurde dementsprechend in den Vergleichsgruppen das von-Willebrandt-Antigen (vWF-Ag) und Faktor-VIII quantifiziert. Zusätzlich wurde die von-Willebrandt-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (vWF-RCo) als funktioneller Messwert der vWF-vermittelten Thrombozytenaggregation gemessen.

Für die Quantifizierung der sekundären plasmatischen Gerinnungskaskade wurde der Gerinnungsfaktor Fibrinogen und das bei dem Fibrinabbau entstehende Peptid D-Dimere bestimmt.

Sowohl die Messparameter der primären Hämostase (s. **Abbildung-13**), wie auch der sekundären Hämostase (s. **Abbildung-14**) zeigten sich in der Gruppe der Patient*innen mit neuem Vorhofflimmern erhöht und zeigen eine erhöhte Gerinnungsaktivität bei dieser Patientengruppe an.

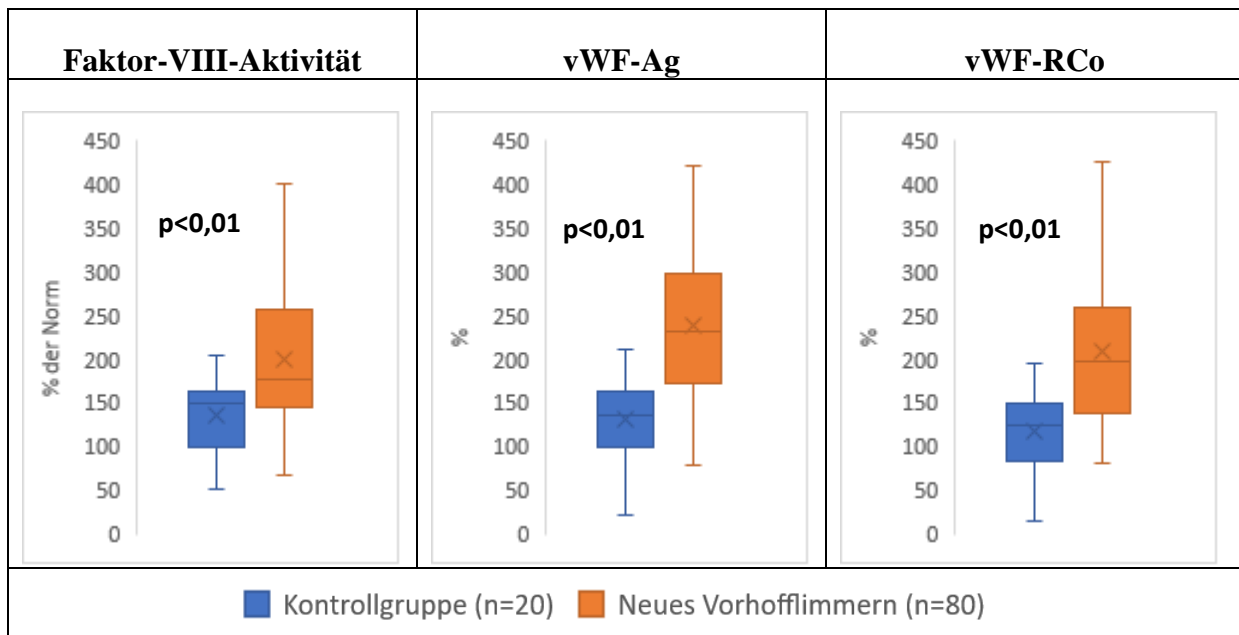
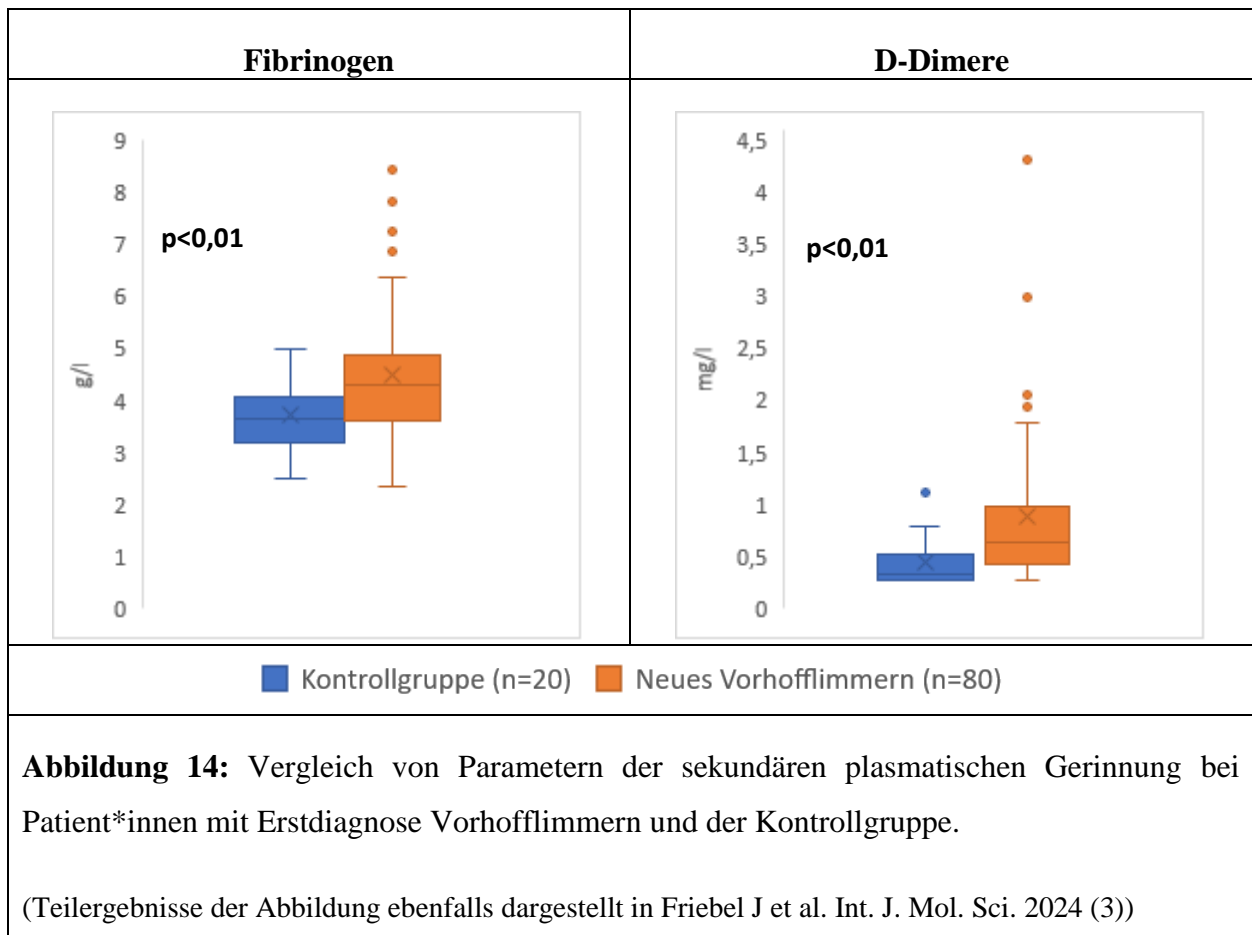


Abbildung 13: Vergleich von Parametern der primären thrombozytenaggregationsvermittelten Gerinnung aus dem Plasma bei Patient*innen mit Erstdiagnose Vorhofflimmern und der Kontrollgruppe.

*vWF-Ag = von-Willebrand-Faktor-Antigen, *vWF-RCo= von-Willebrand-Faktor-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität.

(Teilergebnisse der Abbildung ebenfalls dargestellt in Friebel J et al. Int. J. Mol. Sci. 2024 (3))



4.3. Zweite Kohorte: PAR-gerichtete vs. –ungerichtete gerinnungsaktive Medikation

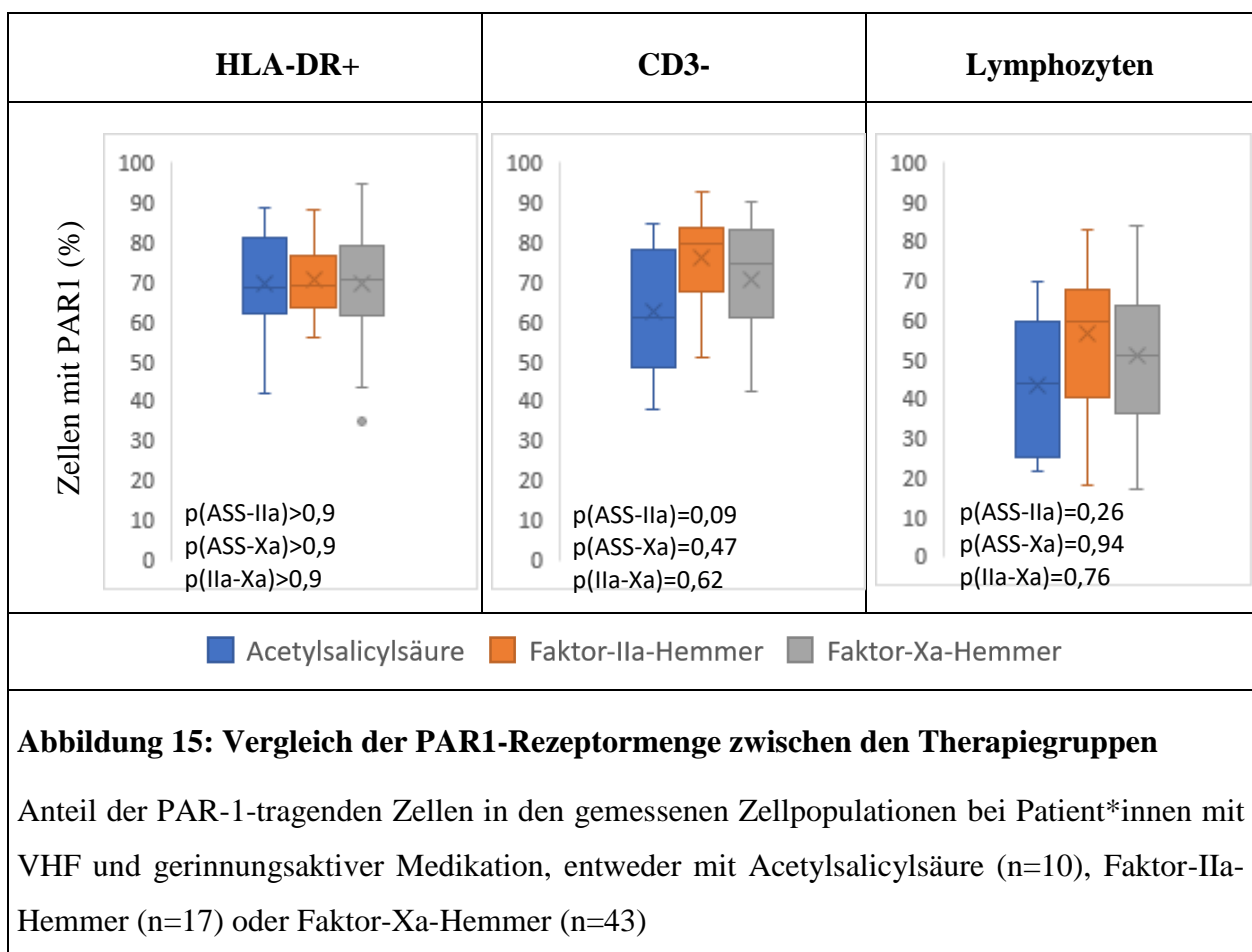
Der folgende Abschnitt zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen an der zweiten Patientenkohorte auf, also von Patient*innen mit bekanntem Vorhofflimmern und unterschiedlicher gerinnungsaktiver Therapie, entweder mit einer PAR-ungerichteten Medikation mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure (ASS, n=10) oder einer PAR-gerichteten Medikation mit einem Faktor-IIa-Hemmer (Dabigatranetexilat, n=17), bzw. einem Faktor-Xa-Hemmer (Rivaroxaban/Apixaban, n=43).

An dieser Kohorte wurde die Hypothese untersucht, nach welcher die direkte Hemmung von Thrombin (Faktor-IIa) oder Faktor-Xa als wichtige PAR-Aktivatoren einen Effekt auf das PAR1- und PAR2-Signalling und dessen negative Effekte auf Vorhofflimmern und mit Artherosklerose assoziierte Erkrankungen haben könnte.

4.3.1. Vergleich der zellulären PAR1 und PAR2-Rezeptormenge

Verglichen wurde die durchflusszytometrisch gemessene PAR1- und PAR2-Gesamtexpression (intra- und extrazellulär) auf HLA-DR-positiven, CD3-negativen-Zellen und Lymphozyten bei Patienten mit bekanntem Vorhofflimmern und unterschiedlicher gerinnungsaktiver Therapie.

Abbildung-15 zeigt die PAR1-Expression auf den unterschiedlichen Zellreihen. Hier zeigte sich im Vergleich der Therapiegruppen untereinander kein Unterschied.



In **Abbildung-16** wird die PAR2-Gesamtepression der untersuchten Zellreihen demonstriert. Hier zeigten interessanterweise die Patientengruppen, welche einen direkten Faktor-IIa- oder Faktor-Xa-Inhibitor einnahmen im Vergleich mit der ASS-Gruppe auf den HLA-DR+-Zellen eine erhöhte PAR2-Menge.

Der Trend für eine höhere PAR2-Expression bei Patient*innen mit VHF und Medikation mit einer PAR-gerichteten Medikation im Vergleich zu Acetylsalicylsäure zeigte sich auch für die anderen Zelleihen, wobei hier das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde.

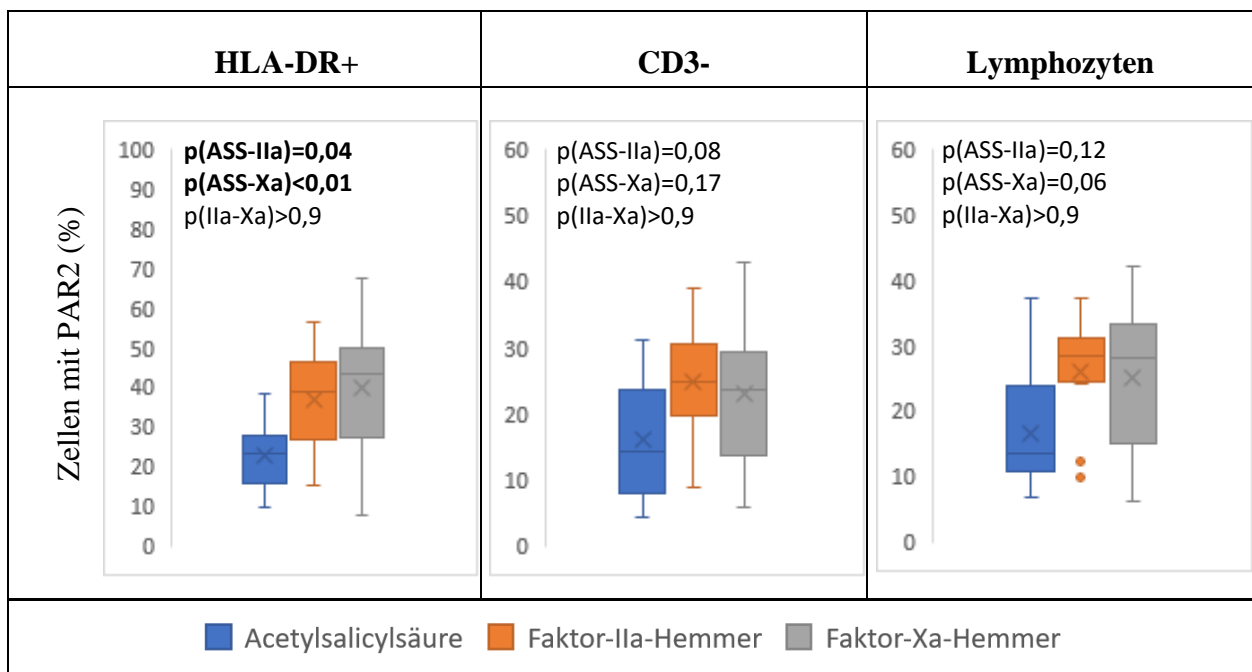


Abbildung 16: Vergleich der PAR2-Rezeptormenge zwischen den Therapiegruppen

Anteil der PAR2-tragenden Zellen in den gemessenen Zellpopulationen bei Patient*innen mit VHF und gerinnungsaktiver Medikation, entweder mit Acetylsalicylsäure (n=10), Faktor-IIa-Hemmer (n=17) oder Faktor-Xa-Hemmer (n=43). Werte mit Erreichen des Signifikanzniveaus sind fett-gedruckt hervorgehoben.

Zur Verdeutlichung der PAR1- und PAR2- Expression wurde für die unterschiedlichen Therapiegruppen aus den durchflusszytometrischen Messwerten der Zellreihen die PAR1/PAR2-Ratio gebildet und in **Abbildung-17** dargestellt.

Hier zeigte sich auf allen Zellreihen der ASS-Gruppe ein Trend zur höheren PAR1-/PAR2-Ratio, wobei jedoch nur auf der HLA-DR+-Zellreihe im Vergleich mit der FXa-Gruppe das Signifikanzniveau erreicht wurde. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für niedrigere PAR1-Rezeptordominanz unter der Medikation unter einem FIIa- oder FXa-Hemmer.

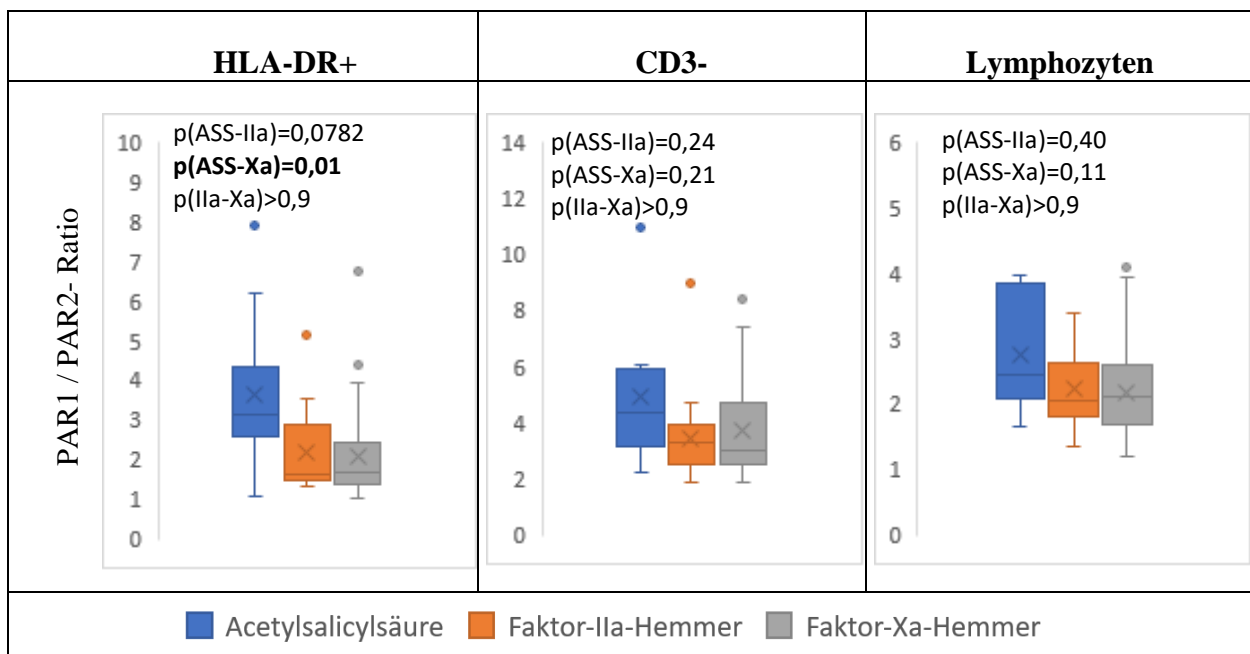


Abbildung 17: Vergleich der PAR1/PAR2-Ratio zwischen den Therapiegruppen

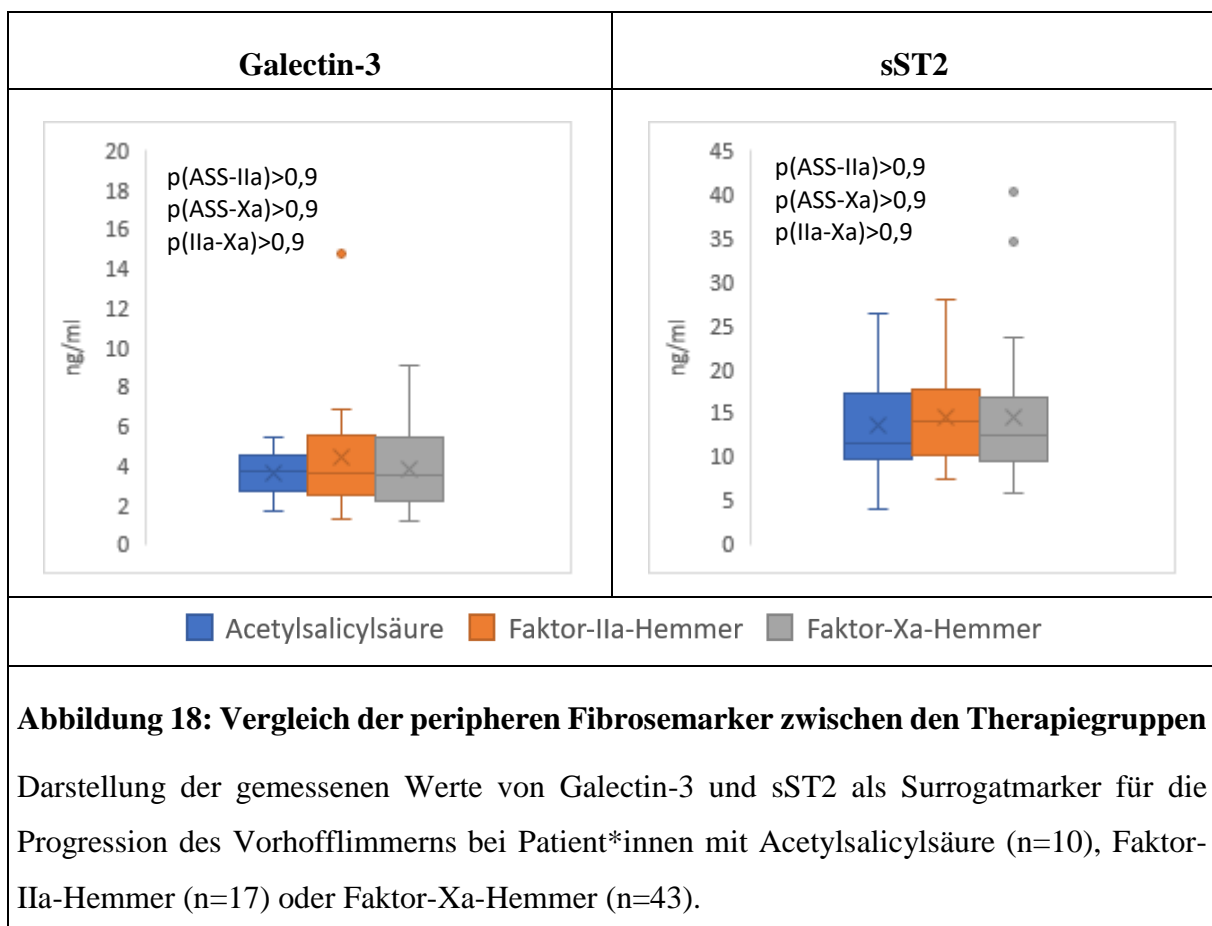
Darstellung des PAR1/PAR2-Mengenverhältnisses auf den gemessenen Zellpopulationen bei Patient*innen mit VHF und gerinnungsaktiver Therapie mit Acetylsalicylsäure (n=10), Faktor-IIa-Hemmer (n=17) oder Faktor-Xa-Hemmer (n=43). Werte mit Erreichen des Signifikanzniveaus sind fett-gedruckt hervorgehoben

4.3.2. Vergleich peripherer Fibroseparameter

Vorhofflimmern ist in der Regel eine fortschreitende Erkrankung mit zunehmender VHF-Last, wobei spätere Stadien mit einer höheren atrialen Fibrose assoziiert sind (56).

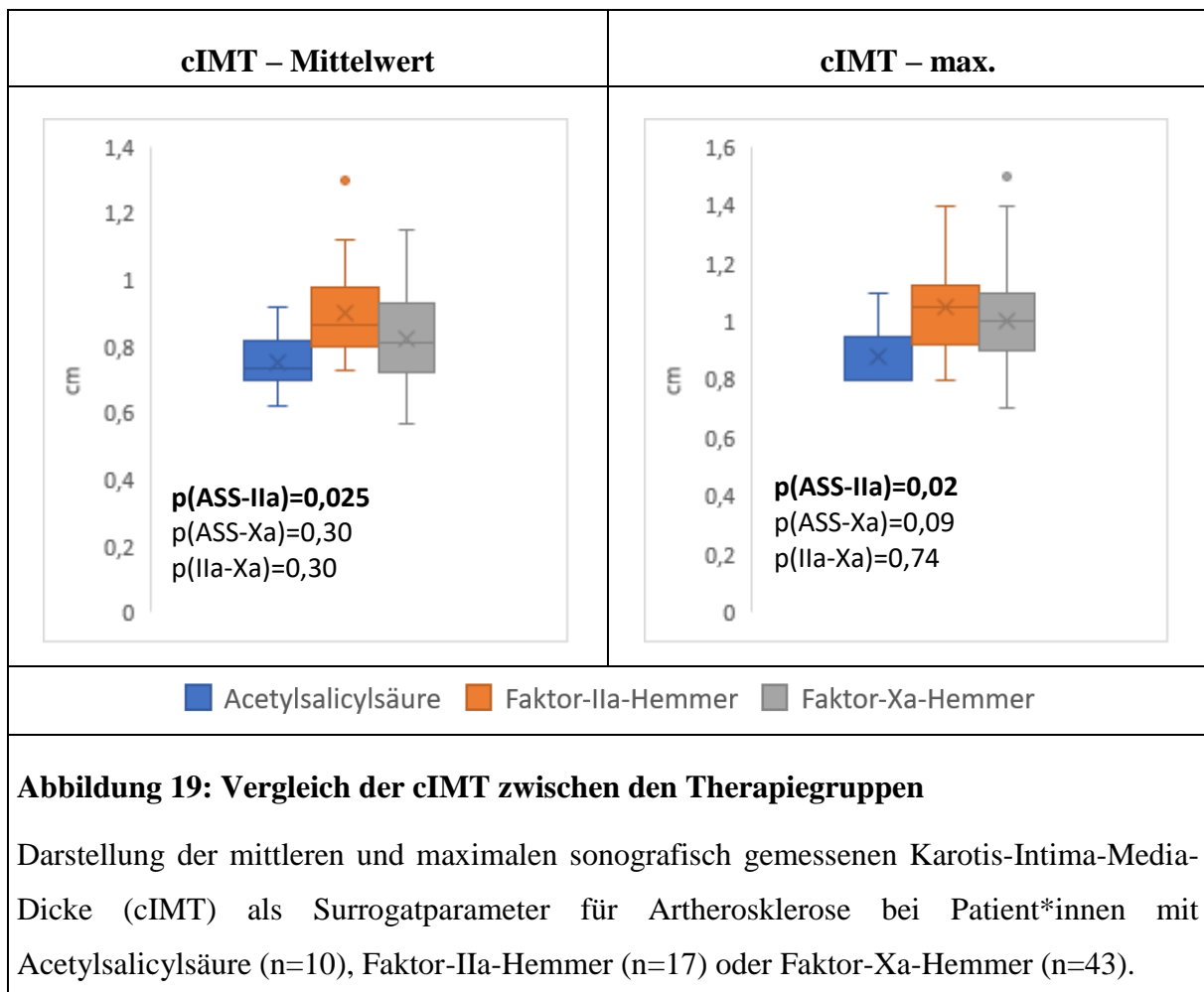
Vor diesem Hintergrund erscheint die Untersuchung der peripheren Fibroseparameter sST2 und Galectin-3 als Surrogatmarker für die Messung von struktureller Krankheitsprogression am Herzen naheliegend.

Hier zeigte sich für die Therapiegruppen jedoch kein relevanter Unterschied (s. **Abbildung-18**).



4.4.2 Vergleich der quantitativen Atherosklerose

Als Surrogatmarker für Artherosklerose wurden für die Therapiegruppen duplexsonografisch jeweils drei Messwerte die mittlere und maximale Karotis-Intima-Media-Dicke (cIMT) gemessen. Für die maximale und mittlere cIMT zeigten sich in der Therapiegruppe mit FIIa-Inhibitor im Vergleich mit der ASS-100mg-Gruppe signifikant größere Messwerte (s. **Abbildung-19**).



5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung

Die Ergebnisse einer Vielzahl von experimentellen Studien suggerieren eine entscheidende Bedeutung des PAR1- und PAR2- Signallings für die Pathogenese von Vorhofflimmern (91, 92). Hierbei scheint eine vermehrte PAR-Aktivierung am Herzen über proinflammatorische und profibrotische Effekte ein negatives atriales Remodelling zu begünstigen (111, 113), welches die Grundlage für VHF darstellt. PAR1-Signalling ist darüber hinaus mit proarrhythmischen Effekten am Myokard assoziiert (112).

In der vorliegenden Dissertation wurde eine PAR1- und PAR2- vermittelten Zunahme von Fibrose, Inflammation und Hyperkoagulabilität bei Patienten mit Vorhofflimmern, sowie möglichen inhibitorischen Effekte durch den Einsatz von Faktor-Xa- oder -IIa-Hemmern (NOAKs) am Menschen untersucht.

Dabei konnte an einer ersten Patientenkohorte gezeigt werden, dass auf den untersuchten Immunzellpopulationen im Blut bei Patient*innen mit neudiagnostiziertem VHF mehr PAR1 exprimiert wird als bei Patient*innen mit ähnlichem kardiovaskulärem Risikoprofil, aber ohne Vorhofflimmern.

Auch zeigte sich für die Patientengruppe mit neuem VHF im Vergleich eine höhere mengenmäßige PAR1-Rezeptordominanz gegenüber PAR2 und intrazellulär eine herabregulierte PAR1-Transkription.

Alle untersuchten peripheren Fibrose- (sST2, Gal-3), Entzündungs- (TNF- α , IL-6) und Gerinnungsparameter (FVIII-Aktivität, D-Dimere, Fibrinogen, vWF-Ag, vWF-RCo) zeigten sich darüber hinaus in der Gruppe mit neuem VHF im Vergleich mit der Kontrollgruppe erhöht.

In einer zweiten Patientenkohorte mit bekanntem VHF (n=70) wurde die PAR1- und PAR2- Expression, die peripher venösen Fibroseparameter (sST2, Gal-3) und die duplexsonografisch bestimmte Karotis-Intima-Media-Dicke (cIMT) der Patient*innen in Abhängigkeit von ihrer gerinnungsaktiven Therapie verglichen.

Hier ergab sich für die Therapiegruppen mit NOAK-Einnahme, insb. auf antigenpräsentierenden Zellen (HLADR+), eine höhere PAR2-Expression. In der Gruppe mit Faktor-IIa-Inhibitor-Therapie zeigte sich im Vergleich mit den anderen Therapiegruppen eine größere cIMT.

Hinsichtlich der peripheren Fibrosemarker ergaben sich für die verschiedenen Therapiegruppen keine signifikanten Unterschiede.

5.2. Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in experimentelle Studien

5.2.1. Fibrose-, Entzündungs- und Gerinnungsmarker sind bei frühem VHF erhöht

Eine mögliche Erhöhung von peripheren Entzündungs-, Fibrose- und Gerinnungsmarkern bei Patient*innen mit Vorhofflimmern ist bereits in zahlreichen Studien untersucht worden. Hierbei blieb jedoch fraglich, ob eine Erhöhung mit dem Auftreten der Erkrankung oder erst im Verlauf als Folge von Vorhofflimmern auftritt. Vor dem Hintergrund dieser Fragestellung wurde sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung dieser Parameter bei Erstdiagnose von VHF fokussiert.

Periphere Fibroseparameter: Galectin-3 und sST-2

Galectin-3 (Gal-3) ist ein beta-Galactosid bindendes Protein und wird in zahlreichen Gewebetypen exprimiert. Es ist an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, welche in der Entstehung von Fibrose eine entscheidende Rolle spielen, darunter Apoptose, Inflammation und Angiogenese.

Gal-3 ist im murinen Herzen insbesondere in kardialen Makrophagen sowie in atrialen, nicht jedoch in ventrikulären, Kardiomyozyten nachweisbar (125).

In atrialen Myofibroblasten führt es an deren Zellmembran u.a. zu einer Stabilisierung von bestimmten Zytokin-Rezeptoren und führt über diesen Mechanismus zu einer Verstärkung derer profibrotischer und -inflammatorischer Effekte auf das atriale Gewebe (63).

In einer großen Kohortenstudien waren erhöhte Gal-3-Werten im Plasma mit der Entwicklung und der Progression von VHF assoziiert (64) und erhöhte Gal-3-Werten korrelierten bei Patient*innen mit paroxysmalen VHF in der Magnetresonanztomografie (MRT) mit dem Ausmaß der linksatrialen Fibrose (126).

Gal-3 wird deswegen als Biomarker für die frühe Phase des atrialen Remodelings und Fibrose bei VHF postuliert (63).

ST-2 ist ein Teil des Interleukin-1-Rezeptors. Es gibt zwei Isoformen: einen Transmembranrezeptor (ST-2L) und einen löslichen (*engl. „soluble“*) ST-2-Rezeptor (sST2).

Die Bindung von Interleukin-33 (IL-33) durch den transmembranösen ST-2L-Rezeptor führt zur Aktivierung zahlreicher kardioprotektiver Signalkaskaden und damit zu einer Verringerung von kardialer Fibrose und Hypertrophie (63).

Die Bindung des gelösten sST-2 an freies IL-33 im Plasma verhindert somit die Entstehung des transmembranösen ST-2L/IL-33-Komplexes und verringert so die durch ihn ausgelösten kardioprotektiven Effekte (127).

Bei Patient*innen mit persistierendem und permanentem VHF konnten im Vergleich mit Patient*innen im Sinusrhythmus deutlich erhöhte sST-2-Plasmawerte nachgewiesen werden (65). Darüber hinaus ist ein erhöhter sST-2-Wert im Plasma nach Pulmonalvenenisolation oder elektrischer Kardioversion mit einem erhöhten Risiko für ein Wiederauftreten von VHF assoziiert, was durch die Autor*innen durch eine exzessivere atriale Fibrose bei diesen Patient*innen erklärt wird (128, 129).

Die beiden Fibrosemarker sST-2 und Galectin-3 zeigten sich in unseren Versuchsergebnissen in der Gruppe mit erstdiagnostiziertem VHF im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit ähnlichem kardiovaskulären Risikoprofil, aber ohne VHF, deutlich erhöht, sodass von einem profibrotischem Status der Patienten bereits vor, bzw. unmittelbar bei Auftreten der Erkrankung auszugehen ist.

Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α

Die Assoziation von VHF mit erhöhten systemischen Entzündungsmarkern konnte bereits in vorherigen Studien nachgewiesen werden und unterstreicht einmal mehr den systemisch vorliegenden proinflammatorischen Status von Patient*innen mit VHF.

So zeigte sich in mehreren Kohortenstudien signifikant erhöhte Werte des C-reaktiven Proteins (CRP), wobei das Ausmaß der CRP-Erhöhung positiv mit der VHF-Last korrelierte (130, 131).

Auch wurde die Assoziation von VHF mit erhöhten Werten der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) mehrfach gezeigt (132-134).

Unsere Untersuchungsergebnisse bestätigen nun auch die Erhöhung dieser beiden Zytokine bereits bei Erstdiagnose und damit eine bereits bestehende systemische Entzündungsreaktion bei Erstauftreten der Erkrankung.

Gerinnungsfaktoren

Eine Erhöhung aller untersuchten Gerinnungsparameter bereits im Initialstadium von VHF ist insbesondere deshalb hervorzuheben, da diese Ergebnisse im Gegensatz zu der „Hämostase-Theorie“ im linken Vorhof als hauptsächliche Erklärung für die vermehrte kardiale Thrombusbildung bei Patient*innen mit VHF stehen. Nach dieser Theorie kommt es vordergründig durch die dysfunktionale Kontraktion des linken Vorhofs bei Auftreten von Vorhofflimmern und der damit einhergehenden Blutstase zur Thrombogenese. Dieser Theorie folgend dürfte eine relevante Hyperkoagulabilität damit erst bei zunehmender VHF-Last und damit einhergehend längerer Hämostase-Zeit im Vorhof zu vermehrter Thrombusbildung führen. Eine Erhöhung der Gerinnungsparameter bereits kurz nach Erstdiagnose bestätigt nun jedoch eine bereits bei Erkrankungsbeginn bestehenden Hyperkoagulabilität, welche durch Hämostase nicht zu erklären sein dürfte, da im Initialstadium die VHF-Last typischerweise noch relativ niedrig ist. Interessanterweise zeigten sich in unseren Untersuchungen dabei sowohl die mit der primären thrombozytenvermittelten Gerinnungsreaktion assoziierten Parameter (von-Willebrand-Faktor-Antigen und von-Willebrand-Faktor-Ristocetin-Cofaktor), sowie die mit der sekundären plasmatischen Gerinnungsreaktion assoziierten Parameter (Fibrinogen, Faktor-VIII-Aktivität, D-Dimere) erhöht.

Hierbei zeigen erhöhte von-Willebrand-Faktor-Antigen (vWF-Ag) und dessen Aktivitätsmesswert von-Willebrand-Faktor-Ristocetin-Cofaktor ein erhöhtes Potenzial für die Initiierung der Thrombozytenaggregation am Endothel des Gefäßsystems auf. Fibrinogen und Faktor-VIII zeigen als klassische plasmatische Gerinnungsfaktoren und D-Dimere als Abbauprodukt des Gerinnungsfaktors Ia (Fibrin) eine erhöhte Aktivität der sekundären Gerinnungskaskade auf.

Eine frühe Hyperkoagulabilität bei VHF werden durch kürzlich publizierte Untersuchungsergebnisse von Negreva et al. mit dem Nachweis von erhöhtem vWF-Ag, Fibrinogen und Faktor-VIII-Aktivität bei frühem Vorhofflimmern (135, 136) weiter untermauert. Abschließend ist bei der Betrachtung der frühen Hyperkoagulabilität bei VHF noch anzumerken, dass ein Großteil der hier untersuchten Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen, vWF, Faktor-VIII) als Akute-Phase-Proteine auch wesentlich durch eine systemische Entzündungsreaktion hochreguliert werden können. Dies hebt einmal mehr die enge Verstrickung von Inflammation, Fibrose und Gerinnungssystem hervor.

Inflammation und kardiale Fibrose führen dabei zu endothelialer Dysfunktion, als einen der wesentlichen Mechanismen für Hyperkoagulabilität bei VHF (67, 84).

5.2.2. PAR1 ist bei VHF im Initialstadium hochreguliert

Die deutlich erhöhte Menge an PAR1 auf den untersuchten Immunzellen bei frühem VHF stärken weiter die Annahme eines proinflammatorischen Immunstatus während der Manifestationsphase von VHF.

Der vermehrte extrazelluläre Rezeptornachweis bei gleichzeitig verringertem PAR1-mRNA-Nachweis lassen auf eine bereits stattfindende intrazelluläre Herabregulation der PAR1-Transkription in Folge der vermehrten PAR1-Aktivierung bei frühem VHF schließen.

Die deutlich erhöhte PAR1/PAR2-Ratio bei Patient*innen mit VHF im Vergleich mit der Kontrollgruppe unterstreicht einmal mehr die Wichtigkeit von PAR1, wobei die deutliche Dominanz gegenüber PAR2 zunächst im Gegensatz zu einigen experimentellen Studien zu stehen scheint, die zu zusätzlich zu PAR1- auch auf ein erhöhtes PAR2-Signalling bei VHF schließen ließen.

So ließ sich in vitro in humanem atrialen Gewebe durch synergistische Stimulation mit FXa und zusätzlichem tachykardem Pacing sowohl eine hochregulierte PAR1-, wie auch PAR2-Transkription nachweisen (111) und eine Tryptase-vermittelte PAR2-Stimulation verursachte eine Zunahme von Fibrose (113, 137), sodass eine Hochregulation von PAR2 bei VHF wahrscheinlich erschien.

Dem gegenüber stehen jedoch andere Studienergebnisse, bei welchen sowohl in humanen Endomyokardbiopsien, wie auch im PAR2-knockout-Mausmodell eine geringere PAR2-Expression mit mehr myokardialen Fibrose assoziiert war. Hier stellen die Autoren die Hypothese auf, dass letztendlich das Mengenverhältnis von PAR1 und PAR2 auf der Zelloberfläche entscheidend sein könnte, welche intrazellulären Signalkaskaden aktiviert werden und ob dadurch eine pro- oder kontrafibrotische Zellantwort resultiert (115).

5.2.3. Eine erhöhtes PAR1/PAR2-Ratio könnte zu mehr kardialer Fibrose führen

Die Komplexität des PAR-vermittelten Signallings lässt alleine an Hand des aktivierten PAR-Subtyps keine Voraussage über die dadurch vermittelte Zellantwort zu.

Über Mechanismen, wie das biased signalling, in welchem unterschiedliche PAR-Agonisten den Rezeptor in anderer Lokalisation spalten oder durch intermolekulare Wechselwirkungen von mehreren PAR-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Homo-/ Heterodimerisierung, Rezeptor-

Transaktivierung) kann eine Kopplung von jeweils verschiedenen G-Proteinen oder β -Arrestin mit differenter Zellantwort resultieren (96, 99, 100).

Das PAR1- und PAR2- Signalling scheint dabei eng miteinander verknüpft und eine Mengendominanz von PAR1 gegenüber PAR2 könnte bei Patient*innen mit VHF eine wichtige Komponente für die vermehrte atriale Fibrose bei VHF darstellen.

Bekräftigt wird diese Annahme durch den Nachweis, dass eine Thrombin-vermittelte Transaktivierung von PAR2 durch PAR1 über die Kopplung mit β -Arrestin zu einer Desensibilisierung von PAR1 und dadurch insgesamt zu einer Herabregulation der ansonsten durch PAR1 vermittelten profibrotischen Signalwege führt (138-141).

Daraus resultiert anders herum, dass ein chronischer PAR2-Mangel durch die fehlende PAR2-Transaktivierung von PAR1 entsprechend zu einer Hochregulation des PAR1-Signallings führt, wodurch sich die ausgeprägte myokardiale Fibrose in PAR2-knockout-Mäusen erklären dürfte (115).

Schlussfolgernd scheint die Voraussetzung für eine Homöostase der kardialen extrazellulären Matrix in einem ausgewogenen Verhältnis von PAR1 zu PAR2 zu bestehen. Ein hochreguliertes PAR1- und herabreguliertes PAR2-Signalling führen hingegen zu kardialer Fibrose als wichtige Ursache von Herzrhythmusstörungen, wie Vorhofflimmern (s. **Abbildung-20**).

„Pathophysiologisches Dreieck“ bei VHF

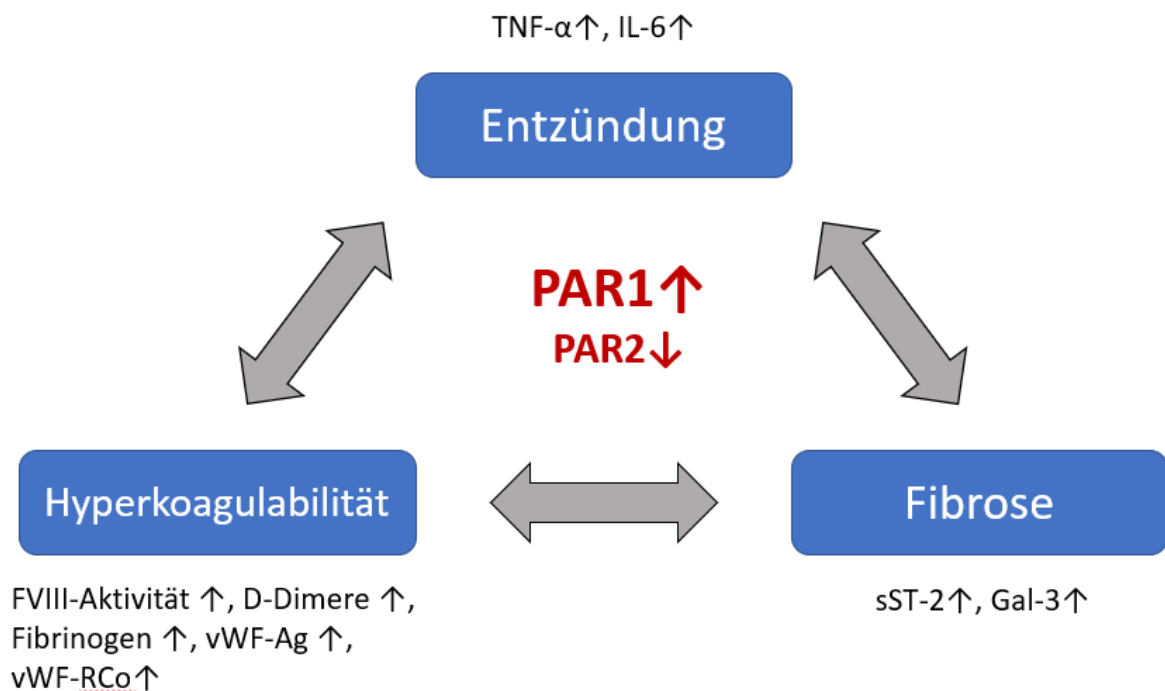


Abbildung 20: Pathophysiologisches Dreieck bei frühem Vorhofflimmern mit Darstellung der Ergebnisse

Frühes Vorhofflimmern (VHF) ist mit erhöhten serologischen Entzündungs-, Fibrose- und Gerinnungsparametern assoziiert. Eine Auslenkung der Homöostase von kardialen PAR1- und PAR-2 Signalling zu Gunsten von PAR1 begünstigt dabei den sich gegenseitig unterhaltenden pathophysiologischen Kreislauf und führt zu mehr kardialer Fibrose als eine der Hauptursachen für Vorhofflimmern.

*PAR= Protease-aktivierter-Rezeptor; TNF- α =Tumornekrosefaktor- α ; IL-6=Interleukin-6; sST-2=soluble ST2; Gal-3=Galectin-3; FVIII=Faktor-VIII; vWF-Ag=von-Willebrand-Faktor-Antigen; vWFF-RCo=von-Willebrand-Faktor-Ristocetin-Cofactor.

5.2.4. PAR1-Signalling ist bei VHF mit proinflammatorischen Prozessen assoziiert

Neben Studien, welche die Hypothese eines PAR1-vermittelten profibrotischen Signallings bei frühem VHF stützen, bekräftigen andere Untersuchungen auch die durch die Ergebnisse dieser Arbeit suggerierte PAR1-assoziierte Hyperinflammation bei VHF.

Beispielsweise korrelierte in Endomyokardbiopsien von Patient*innen mit frühem VHF eine vermehrte PAR1-Expression positiv mit dem Ausmaß der Infiltration von zytotoxischen CD8+-T-Zellen und Natürlichen Killerzellen, sowie mit einer vermehrten kardialen Kollagen-Anreicherung. Und im venösen Blut von Patient*innen mit VHF konnten mehr zytotoxische T-Zellen mit PAR1 als in der Kontrollgruppe, sowie eine vermehrte Thrombin-vermittelte PAR1-Aktivierung nachgewiesen werden (1), woraus sich ein Zusammengang von kardialem PAR1-Signalling mit zytotoxischer T-Zell-Aktivierung, strukturellem Remodeling und Hyperkoagulabilität bei Patient*innen mit VHF ableiten lässt.

5.2.5. NOAK könnten über die Hochregulation von PAR2 protektiv wirken

Auf Grund des deutlich erhöhten Risikos von thromboembolischen Ereignissen, besteht für die Mehrheit der Patient*innen mit VHF die Indikation für eine prophylaktische Medikation mit einem oralen Antikoagulanz (4).

Seit 2009 sind mit der Zulassung von Nicht-Vitamin-K-abhängigen oralen Antikoagulanzen (NOAK) Alternativen zu den klassischen Vitamin-K-Antagonisten (VKA) vorhanden und werden insbesondere in westlichen Ländern, wie z.B. den USA, mittlerweile bevorzugt eingesetzt (116). Dabigatranetexilat wirkt über eine direkte Hemmung von des Gerinnungsfaktor IIa (Thrombin), während Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban Faktor-Xa inhibieren. Über den antikoagulatorischen Effekt hinaus scheinen NOAK auch die über PAR1 und PAR2-vermittelten pleiotropen Effekte von FIIa- und FXa zu hemmen, wodurch sich eine vielversprechende weitere Therapiekomponente für eine Vielzahl von kardiovaskulären Erkrankungen ergeben könnte (91).

In der hier vorliegenden Arbeit war die NOAK-Therapie bei Patient*innen mit VHF mit einer vermehrten PAR2-Expression auf antigenpräsentierenden Zellen und im Trend auch auf den übrigen untersuchten Immunzellreihen assoziiert. Diese Ergebnisse könnten vor dem Hintergrund der in ersten Kohorten nachgewiesenen PAR1-Dominanz gegenüber PAR2 bei neuem VHF auf einen gegenregulatorischen Effekt durch NOAK-Einnahme hinweisen.

Durch die Wiederherstellung eines ausgewogenen PAR1-/PAR2-Oberflächenverhältnisses könnten protektive Effekte hinsichtlich weiterer kardialer Fibrose und atrialem Remodeling resultieren und damit ein weiterer Progress von VHF aufgehalten oder zumindest verzögert werden.

5.2.6. VKA haben keinen Effekt auf das PAR1/2-Signalling

Auch die klassischen Vitamin-K-Antagonisten führen zu einer Reduktion der durch Thrombin- und Faktor-Xa vermittelten Koagulation, was jedoch nicht zu einer Hemmung der PAR-Rezeptor vermittelten pleiotropen Effekte zu führen scheint (91).

Faktor-X und Prothrombin, sowie andere Vitamin-K-abhängige Gerinnungsfaktoren, werden überwiegend in Hepatozyten synthetisiert. Die Gerinnungsaktivität dieser Proteine ist dabei hochgradig von der Fähigkeit abhängig, an die negativ geladene Zellmembran von beispielsweise Thrombozyten zu binden(142).

Diese Fähigkeit wird überwiegend durch eine Gammacarboxyglutamat-(Gla)reiche Domäne vermittelt, welche posttranslational durch das Enzym Gamma-Glutamylcarboxylase bereitgestellt wird. Bei diesem Prozess dient Vitamin-K als essentieller Kofaktor (143).

Vitamin-K-abhängige Gerinnungsfaktoren, welche auf Grund einer Vitamin-K-Antagonisierung ohne Gla-Domäne synthetisiert wurden (englisch: „proteins induced by vitamin K antagonism or absence (PIVKAs)“), sind dementsprechend nur in geringem Maße dazu in der Lage, die nachgeschalteten Gerinnungsfaktoren zu aktivieren.

Die Aktivierung von PAR durch Gerinnungsfaktoren scheint jedoch unabhängig von der Gla-Domäne zu erfolgen (144), sodass VKA nicht zu einer Hemmung der dadurch vermittelten Effekte führt, während die direkte Hemmung von Thrombin oder Faktor-Xa durch NOAKs sowohl ihre Gerinnungsaktivität, wie auch die PAR-Aktivierung inhibiert (s. **Abbildung-21**) (91).

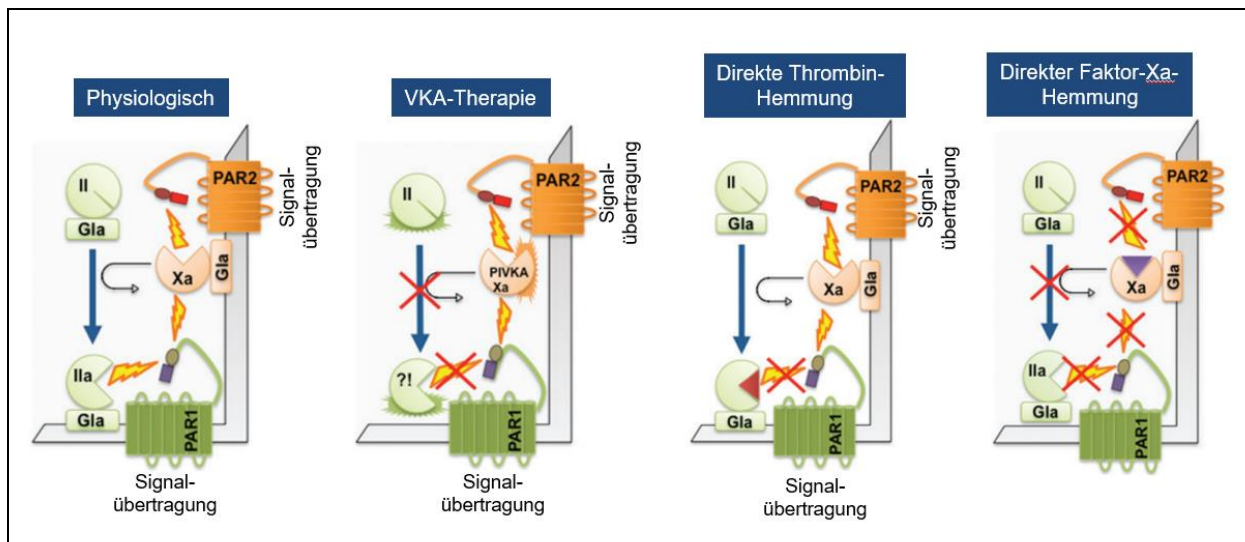


Abbildung 21: Mögliche Auswirkungen von Antikoagulanzen auf die zelluläre Signalübertragung

Thrombin und Faktor Xa enthalten Gla-Domänen, die für eine physiologische Gerinnung notwendig sind. Während der VKA-Behandlung wird jedoch Thrombin oder Faktor Xa ohne Gla-Domäne erzeugt, was deren Gerinnungsaktivität verringert, aber keinen Effekt auf deren Signalübertragungspotenzial über PAR hat. Die Behandlung mit einem direkten Thrombininhibitor führt sowohl zu einer verminderten Gerinnung, als auch zu einer verminderten zellulären Signalübertragung über PAR1, jedoch mit unveränderter Signalübertragungskapazität für Faktor Xa. Durch die Verwendung eines direkten Faktor-Xa-Inhibitors werden sowohl die Gerinnung, als auch die PAR1- und PAR2-Signalübertragungskapazität verändert.

Blutgerinnungsfaktoren werden in römischen Ziffern angegeben und die aktiven Formen sind durch ein kleines „a“ gekennzeichnet. II zeigt Prothrombin und IIa Thrombin an.

*PIVKA=proteins induced by vitamin k antagonism

(Abbildung übersetzt und modifiziert aus Spronk et al. Cardiovasc Res 2014 (91), Verwendung autorisiert durch Oxford University Press am 03.06.2023, Lizenznummer 5561516664755)

5.3. Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in den Kontext klinischer Studien

Thrombin und Faktor-Xa sind über pleiotrope Effekte an der Pathogenese von zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt. Diese Effekte werden zu einem Großteil durch die Aktivierung von PAR-Rezeptoren vermittelt, wobei die Subtypen PAR1 und PAR2 von besonderer Bedeutung scheinen. In der Pathogenese von Artherosklerose sind die beiden Serinproteasen beispielsweise über die Vermittlung von Leukozytenmigration, Angiogenese, Vasokonstriktion, aber auch durch proinflammatorische Effekte beteiligt (90, 91).

Am Herzen bewirkt die FXa-vermittelte Aktivierung von PAR1 und PAR2 eine Zunahme von kardialer Fibrose, Hypertrophie und Inflammationsprozessen, welche mit Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen, wie beispielsweise VHF, assoziiert sind (91, 92).

5.3.1. Reduzieren Faktor-Xa-Inhibitoren das Risiko für die Entstehung von VHF?

Die Ergebnisse der COMPASS-Studie konnten zeigen, dass Patient*innen mit Atherosklerose deutlich von einer Erweiterung der sekundärprophylaktischen Therapie mit 100mg Acetylsalicylsäure (ASS) um eine Minimaldosis von 2x 2,5mg des FXa-Hemmers Rivaroxaban profitieren. So war das Risiko für schwere kardiovaskuläre Ereignissen in der ASS + Rivaroxaban-Gruppe gegenüber der ASS-Gruppe um 24% erniedrigt, wobei die Rate von schweren Blutungen nur diskret anstieg (145).

Der Einsatz von niedrigdosierten VKA mit einem INR < 2,0 zusätzlich zu ASS-100mg hatte in früheren Studien hingegen keinen Vorteil für Patienten*innen mit Atherosklerose ergeben. Die volle Dosierung mit Erreichen eines INR > 2,0 zeigte eine leichte kardiovaskuläre Risikoreduktion, jedoch zu dem Preis einer deutlich erhöhten schweren Blutungsrate (146), sodass von dieser Therapiestrategie abgesehen werden musste.

Es wird davon ausgegangen, dass die Reduktion der schweren kardiovaskulären Ereignisse in der COMPASS-Studie insbesondere auf die pleiotropen Effekten des niedrig dosierten Rivaroxaban zurückzuführen ist (92, 147). Diese umfassen bezogen auf Atherosklerose antiinflammatorische und plaquestabilisierende Effekte und auf das Herz eine geringere kardiale Hypertrophie, Fibrose und strukturelles atriales Remodelling (91, 92), wodurch u.a. auch das Risiko von VHF verringert werden dürfte.

Darüber hinaus wirkt Rivaroxaban auch indirekt inhibierend auf die Thrombozytenaggregation am instabilen artherosklerotischen Plaque. So ist FXa innerhalb der Gerinnungskaskade wesentlich an der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin beteiligt, welches wiederum einen starken Thrombozyten-Aktivator darstellt.

Rivaroxaban scheint jedoch selbst in sehr niedriger Dosierung diese so generierte Thrombinaktivierung in einem deutlichen Ausmaß zu inhibieren (148).

5.3.2. Dabigatranetexilat: Mehr Atherosklerose-bedingte Komplikationen?

Die Atherosklerose der Koranarien und die sich hieraus manifestierende KHK, stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung von VHF dar (4). Interessanterweise hatten die Patienten mit VHF und bestehender OAK mit dem Faktor-IIa-Hemmer Dabigatranetexilat in unserer Arbeit im Ultraschall der Karotiden signifikant größere Messwerte der Intima-Media-Dicke.

FXa-Inhibitoren und FIIa-Inhibitoren hemmen beide die Gerinnungskaskade, an dessen Ende die Umsetzung von Fibrinogen zu Fibrin steht. Der FIIa-Inhibitor Dabigatran setzt an diesem letzten Schritt an, indem es direkt das für diese Umwandlung notwendige Enzym Thrombin hemmt.

Durch die direkte Hemmung von FXa wird hingegen der potente Prothrombinase-Komplex, bestehend aus Gerinnungsfaktor-Va, -Xa und Calcium-Ionen, gehemmt, welcher membrangebunden auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten am Ort einer Plaqueruptur proteolytisch große Mengen Prothrombin (FII) zu Thrombin umsetzt (149).

Faktor-V kann sowohl von Thrombin, wie auch von FXa zu dem für den Prothrombinase-Komplex essentiellen Kofaktor Faktor-Va umgesetzt werden. Hier wurde in vitro gezeigt, dass die Aktivierung von Faktor-V durch FXa jedoch im Vergleich ca. 50 bis 100x effektiver geschieht (150).

Dementsprechend könnte der Plättchen-Prothrombinase-Komplex zu viel Thrombin umsetzen, um alleine durch den Einsatz des direkten FIIa-Inhibitors ausreichend abgeschwächt zu werden. Die Hemmung des Komplexes durch FXa-Inhibitoren könnte durch seine wichtige Rolle an der frühen arteriellen Thrombusentstehung effizienter sein, als die direkte Thrombin-Hemmung durch Dabigatran (147).

Der Verdacht einer insuffizienten Hemmung der Thrombusentstehung an rupturierten arteriellen Plaques legen auch Daten aus der Nicht-Unterlegenheits-Studie von Dabigatran im Vergleich zu

Warfarin (RELY-Studie) und einer anschließend durchgeführten Metaanalyse von 7 randomisiert-kontrollierten Studien nahe, welche ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkt und Akutes Koronarsyndrom unter Dabigatran ergaben (151, 152), auch wenn diese Ergebnisse in einer später durchgeführten Metaanalyse mit zusätzlichem Einschluss von Daten aus Beobachtungsstudien nicht bestätigt werden konnte (153).

Bezüglich unserer Daten ist hier limitierend die Messung der cIMT an nur sehr kleinen Patient*innengruppen, sowie der retrospektive Charakter der Untersuchungen zu erwähnen, sodass die Unterlegenheit von Dabigatran etexilat hinsichtlich atherosklerotisch bedingter Komplikationen weiter als fraglich einzustufen ist.

5.4. Klinische Implikationen und Ausblick

Sowohl Faktor-Xa, wie auch Faktor-IIa binden mit hoher Affinität an PAR1 und können darüber die proinflammatorischen und fibroproliferativen Signalwege initiieren. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen vermehrte PAR1-Expression und gesteigerte PAR1-Dominanz gegenüber PAR2 auf der Zelloberfläche von Immunzellen bei frühem VHF suggeriert ein hochreguliertes PAR1-Signalling bei diesem Krankheitsbild.

Der Einsatz von direkten Faktor-Xa- und Faktor-IIa-Hemmern (NOAK) verspricht über eine verringerte PAR1-Aktivierung und dadurch vermittelte pleiotrope Effekte das Risiko der Entstehung und Progression von VHF und anderen kardiovaskulären Erkrankungen zu verringern. Vitamin-K-Antagonisten hingegen bewirken ihren antikoagulativen Effekt über die Inhibition der posttranslationalen und Vitamin-K-abhängigen Kopplung von unterschiedlichen Gerinnungsfaktoren, wie z.B. FIIa und FXa, mit einer Gammacarboxyglutamat-(Gla)reichen Domäne (143). Die Fähigkeit der Gerinnungsfaktoren IIa und Xa PAR-Rezeptoren zu aktivieren bleibt jedoch unabhängig von der Existenz ihrer Gla-Domäne erhalten, sodass PAR-bedingte pleiotrope Effekte unter VKA-Medikation nicht zu erwarten sind (144).

Der erfolgreiche Einsatz des FXa-Hemmers Rivaroxaban in niedriger Dosierung zusätzlich zu ASS-100mg als potentes Sekundärprophylaktikum für Patient*innen mit schwerer Artherosklerose in der COMPASS-Studie dürfte dazu führen, dass in Zukunft die Anzahl von Patient*innen mit Rivaroxaban in „vaskulärer Dosis“ deutlich ansteigen wird.

Hier ist zu hoffen, dass dies zu weiteren klinischen Studien führt, in welchen die in dieser Arbeit suggerierten protektiven Effekte von NOAK gegenüber mit Fibrose und Hyperinflammation assoziierten Erkrankungen weiter untersucht wird.

Insbesondere sind Untersuchungen notwendig, in welchen der Einfluss einer NOAK-Medikation auf die Entstehung und der Krankheitsprogression von VHF untersucht wird. Auch fehlt es bisher an klinischen Studien, die FIIA- und FXa-Inhibitoren bei VHF direkt vergleichen.

5.6. Limitationen

Für die erste Kohorte (n=100) wurde auf ein möglichst vergleichbares kardiovaskuläres Risikoprofil der eingeschlossenen Probanden von VHF- und Kontrollgruppe geachtet. Dies spiegelt sich z.B. in einem nur minimalen differenten durchschnittlichen CHA₂DS₂-Vasc-Score-Punktwert (4,0 vs. 3,5) wider und auch der Anteil der Patienten mit Herzinsuffizienz zeigte sich in beiden Gruppen ausgeglichen (26% vs. 20%). Auch lag ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis vor, wobei in der VHF-Gruppe etwas mehr Männer eingeschlossen wurden (62% vs. 50%) und auch etwas mehr ältere Patienten >75 Jahre vorhanden waren (50% vs. 25%), was sich potentiell auf die untersuchten Parameter ausgewirkt haben könnte. So ist ein erhöhtes Lebensalter z.B. mit mehr kardialer Fibrose und einem weniger reaktiven Immunsystem assoziiert. Die durchschnittlichen serologischen Entzündungsparameter CRP und PCT zeigten sich in beiden Gruppen jedoch nahezu identisch.

Auch in der zweiten Kohorte (n=70) zeigten sich Charakteristika der Kohorten mit unterschiedlicher gerinnungsaktiver Therapie relativ ähnlich, wobei hier in der ASS-Gruppe etwas weniger Patient*innen mit bekannter Herzinsuffizienz eingeschlossen waren, als in der Faktor-IIa- und FXa-Gruppe (20% vs. 76% vs. 60%), was ebenfalls zu einer Verschiebung von Messwerten geführt haben könnte.

Auch ist limitierend, insb. für die Therapiekohorte, die geringe Größe der eingeschlossenen ASS-Gruppe (n=10) und der FIIa-Gruppe (n=17) anzumerken, da in dieser Gruppengröße bereits einzelne Ausreißer empfindlich den Durchschnitt des untersuchten Parameters beeinflussen können.

6. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass bei frühem VHF eine systemische Hyperinflammation, -fibrose und -koagulation vorliegt. Dies könnte durch eine Dysbalance mit hochregulierten PAR1- und herabregulierten PAR2-Signalling verursacht sein.

Der Einsatz von NOAK scheint bei VHF durch die Hochregulation von PAR2 zu einer Wiederherstellung eines ausgewogenen Verhältnisses zwischen PAR1 und PAR2 beizutragen und könnte dadurch durch eine Herabregulation von proinflammatorischen -und -fibrotischen Prozessen die Krankheitsprogression einschränken und das Risiko für andere mit kardialer Fibrose vergesellschafteten Komorbiditäten senken (s. **Abbildung-22**).

Prospektiv-randomisierte klinische Studien, die gezielt positive pleiotrope Effekte von NOAK bei VHF untersuchen, sowie FIIa- und FXa-Inhibitoren direkt Vergleichen sind dringend notwendig.

„Pathophysiologisches Dreieck“ bei VHF

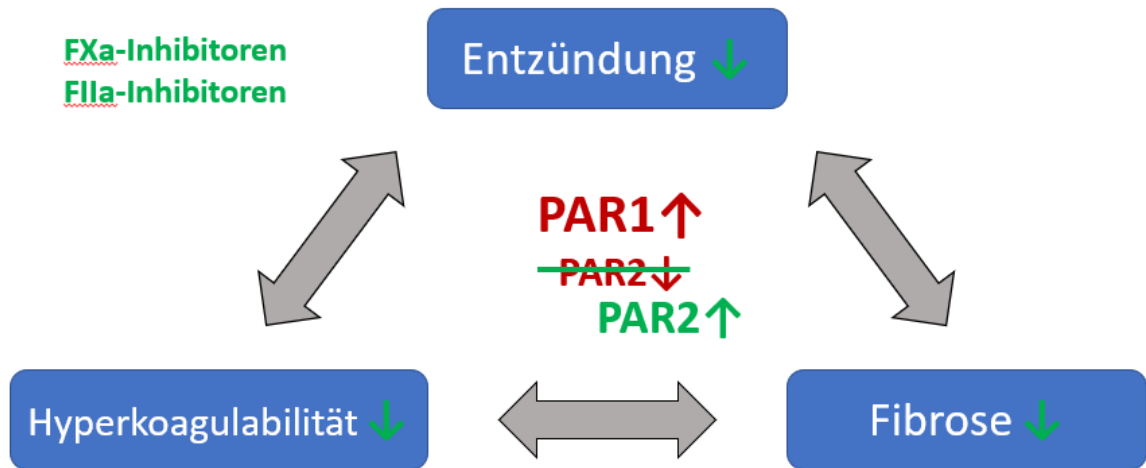


Abbildung 22: Möglicher therapeutischer Effekt von NOAK auf das pathophysiologische Dreieck bei Vorhofflimmern (VHF)

Die Verschiebung des PAR1/PAR2- Signallings zu Gunsten von PAR1 scheint die Entstehung von VHF zu begünstigen.

Der Einsatz von Faktor-IIa- und Faktor-Xa-Inhibitoren könnte über einer Hochregulation des kardialen PAR2-Signallings protektiv gegenüber VHF und anderer mit kardialer Fibrose assoziierter Erkrankungen wirken.

7. Literaturverzeichnis

1. Friebel J, Witkowski M, Wegner M, Blöbaum L, Lammel S, Schencke PA, Jakobs K, Puccini M, Reißner D, Steffens D, Moos V, Schutheiss HP, Landmesser U, Rauch U. Cytotoxic CD8(+) T Cells Are Involved in the Thrombo-Inflammatory Response during First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *Cells*. 2022;12(1).
2. Blöbaum L, Witkowski M, Wegner M, Lammel S, Schencke PA, Jakobs K, Puccini M, Reißner D, Steffens D, Landmesser U, Rauch U, Friebel J. Intestinal Barrier Dysfunction and Microbial Translocation in Patients with First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *Biomedicines*. 2023;11(1).
3. Friebel J, Wegner M, Blöbaum L, Schencke P-A, Jakobs K, Puccini M, Ghanbari E, Lammel S, Thevathasan T, Moos V, Witkowski M, Landmesser U, Rauch-Kröhnert U. Characterization of Biomarkers of Thrombo-Inflammation in Patients with First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(7).
4. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomström-Lundqvist C, Boriani G, Castella M, Dan G-A, Dilaveris PE, Fauchier L, Filippatos G, Kalman JM, La Meir M, Lane DA, Lebeau J-P, Lettino M, Lip GYH, Pinto FJ, Thomas GN, Valgimigli M, Van Gelder IC, Van Putte BP, Watkins CL, Group ESD. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2020;42(5):373-498.
5. Khan IA. Atrial stunning: basics and clinical considerations. *Int J Cardiol*. 2003;92(2-3):113-28.
6. CardioNetworks: Drj CB-S, via Wikimedia Commons. Normal sinus rhythm [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nsr_\(CardioNetworks_ECGpedia\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nsr_(CardioNetworks_ECGpedia).jpg): Wikimedia Commons; 25 July 2007 [12.09.2023].
7. Ewingdo CB-S, via Wikimedia Commons. ECG of atrial fibrillation at 132bpm https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ECG_Atrial_Fibrillation.jpg: Wikimedia Commons; 2020 [cited 2023 12.09.2023].
8. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim YH, McAnulty JH, Jr., Zheng ZJ, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJ. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 2014;129(8):837-47.
9. Ringborg A, Nieuwlaat R, Lindgren P, Jönsson B, Fidan D, Maggioni AP, Lopez-Sendon J, Stepinska J, Cokkinos DV, Crijns HJ. Costs of atrial fibrillation in five European countries: results from the Euro Heart Survey on atrial fibrillation. *Europace*. 2008;10(4):403-11.
10. Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS, D'Agostino RB, Massaro JM, Beiser A, Wolf PA, Benjamin EJ. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004;110(9):1042-6.
11. Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker BH, Stijnen T, Lip GY, Witteman JC. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J*. 2006;27(8):949-53.

12. Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *Am J Med.* 2002;113(5):359-64.
13. Chugh SS, Blackshear JL, Shen WK, Hammill SC, Gersh BJ. Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(2):371-8.
14. Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, Lip GY, Franco OH, Hofman A, Witteman JC, Stricker BH, Heeringa J. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J.* 2013;34(35):2746-51.
15. Kerr C, Boone J, Connolly S, Greene M, Klein G, Sheldon R, Talajic M. Follow-up of atrial fibrillation: The initial experience of the Canadian Registry of Atrial Fibrillation. *Eur Heart J.* 1996;17 Suppl C:48-51.
16. Panizo J, Perea J, Galan L, Jimenez S, Romero R, Ruiz M, Villanueva A, Hinojar R, Ruiz J, Cosio F. The first episode of atrial fibrillation (af): paroxysmal, persistent or uncertain. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2011;34:1320.
17. Nattel S, Guasch E, Savelieva I, Cosio FG, Valverde I, Halperin JL, Conroy JM, Al-Khatib SM, Hess PL, Kirchhof P, De Bono J, Lip GY, Banerjee A, Ruskin J, Blendea D, Camm AJ. Early management of atrial fibrillation to prevent cardiovascular complications. *Eur Heart J.* 2014;35(22):1448-56.
18. Lip GYH, Collet JP, Caterina R, Fauchier L, Lane DA, Larsen TB, Marin F, Morais J, Narasimhan C, Olshansky B, Pierard L, Potpara T, Sarrafzadegan N, Sliwa K, Varela G, Vilahur G, Weiss T, Boriani G, Rocca B. Antithrombotic therapy in atrial fibrillation associated with valvular heart disease: a joint consensus document from the European Heart Rhythm Association (EHRA) and European Society of Cardiology Working Group on Thrombosis, endorsed by the ESC Working Group on Valvular Heart Disease, Cardiac Arrhythmia Society of Southern Africa (CASSA), Heart Rhythm Society (HRS), Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS), South African Heart (SA Heart) Association and Sociedad Latinoamericana de Estimulación Cardíaca y Electrofisiología (SOLEACE). *Europace.* 2017;19(11):1757-8.
19. Lévy S, Maarek M, Coumel P, Guize L, Lekieffre J, Medvedowsky JL, Sebaoun A. Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study. The College of French Cardiologists. *Circulation.* 1999;99(23):3028-35.
20. Rienstra M, Lubitz SA, Mahida S, Magnani JW, Fontes JD, Sinner MF, Van Gelder IC, Ellinor PT, Benjamin EJ. Symptoms and functional status of patients with atrial fibrillation: state of the art and future research opportunities. *Circulation.* 2012;125(23):2933-43.
21. Flaker GC, Belew K, Beckman K, Vidaillet H, Kron J, Safford R, Mickel M, Barrell P. Asymptomatic atrial fibrillation: demographic features and prognostic information from the Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) study. *Am Heart J.* 2005;149(4):657-63.
22. Siontis KC, Gersh BJ, Killian JM, Noseworthy PA, McCabe P, Weston SA, Roger VL, Chamberlain AM. Typical, atypical, and asymptomatic presentations of new-onset atrial fibrillation in the community: Characteristics and prognostic implications. *Heart Rhythm.* 2016;13(7):1418-24.
23. Thrall G, Lane D, Carroll D, Lip GY. Quality of life in patients with atrial fibrillation: a systematic review. *Am J Med.* 2006;119(5):448.e1-19.

24. Zhang YY, Qiu C, Davis PJ, Jhaveri M, Prystowsky EN, Kowey P, Weintraub WS. Predictors of progression of recently diagnosed atrial fibrillation in REgistry on Cardiac Rhythm DisORDers Assessing the Control of Atrial Fibrillation (RecordAF)-United States cohort. *Am J Cardiol.* 2013;112(1):79-84.
25. Watson T, Shantsila E, Lip GY. Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet.* 2009;373(9658):155-66.
26. Wang TJ, Massaro JM, Levy D, Vasan RS, Wolf PA, D'Agostino RB, Larson MG, Kannel WB, Benjamin EJ. A risk score for predicting stroke or death in individuals with new-onset atrial fibrillation in the community: the Framingham Heart Study. *Jama.* 2003;290(8):1049-56.
27. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke.* 1991;22(8):983-8.
28. Boysen G, Nyboe J, Appleyard M, Sørensen PS, Boas J, Somnier F, Jensen G, Schnohr P. Stroke incidence and risk factors for stroke in Copenhagen, Denmark. *Stroke.* 1988;19(11):1345-53.
29. Pollick C, Taylor D. Assessment of left atrial appendage function by transesophageal echocardiography. Implications for the development of thrombus. *Circulation.* 1991;84(1):223-31.
30. Blackshear JL, Odell JA. Appendage obliteration to reduce stroke in cardiac surgical patients with atrial fibrillation. *Ann Thorac Surg.* 1996;61(2):755-9.
31. Brotman DJ, Deitcher SR, Lip GY, Matzdorff AC. Virchow's triad revisited. *South Med J.* 2004;97(2):213-4.
32. Sanfilippo AJ, Abascal VM, Sheehan M, Oertel LB, Harrigan P, Hughes RA, Weyman AE. Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study. *Circulation.* 1990;82(3):792-7.
33. Keren G, Etzion T, Sherez J, Zelcer AA, Megidish R, Miller HI, Laniado S. Atrial fibrillation and atrial enlargement in patients with mitral stenosis. *Am Heart J.* 1987;114(5):1146-55.
34. Predictors of thromboembolism in atrial fibrillation: II. Echocardiographic features of patients at risk. The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators. *Ann Intern Med.* 1992;116(1):6-12.
35. Di Tullio MR, Sacco RL, Sciacca RR, Homma S. Left atrial size and the risk of ischemic stroke in an ethnically mixed population. *Stroke.* 1999;30(10):2019-24.
36. Lip GY, Frison L, Halperin JL, Lane DA. Identifying patients at high risk for stroke despite anticoagulation: a comparison of contemporary stroke risk stratification schemes in an anticoagulated atrial fibrillation cohort. *Stroke.* 2010;41(12):2731-8.
37. Själander S, Själander A, Svensson PJ, Friberg L. Atrial fibrillation patients do not benefit from acetylsalicylic acid. *Europace.* 2014;16(5):631-8.
38. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med.* 2007;146(12):857-67.
39. De Caterina R, Husted S, Wallentin L, Andreotti F, Arnesen H, Bachmann F, Baigent C, Huber K, Jespersen J, Kristensen SD, Lip GY, Morais J, Rasmussen LH, Siegbahn A, Verheugt FW, Weitz JI. Vitamin K antagonists in heart disease: current status and perspectives (Section III). Position paper of the ESC

Working Group on Thrombosis--Task Force on Anticoagulants in Heart Disease. *Thromb Haemost.* 2013;110(6):1087-107.

40. Wan Y, Heneghan C, Perera R, Roberts N, Hollowell J, Glasziou P, Bankhead C, Xu Y. Anticoagulation control and prediction of adverse events in patients with atrial fibrillation: a systematic review. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2008;1(2):84-91.

41. Apostolakis S, Sullivan RM, Olshansky B, Lip GYH. Factors affecting quality of anticoagulation control among patients with atrial fibrillation on warfarin: the SAME-TT₂R₂ score. *Chest.* 2013;144(5):1555-63.

42. Själander S, Sjögren V, Renlund H, Norrving B, Själander A. Dabigatran, rivaroxaban and apixaban vs. high TTR warfarin in atrial fibrillation. *Thromb Res.* 2018;167:113-8.

43. Amin A, Deitelzweig S, Jing Y, Makenbaeva D, Wiederkehr D, Lin J, Graham J. Estimation of the impact of warfarin's time-in-therapeutic range on stroke and major bleeding rates and its influence on the medical cost avoidance associated with novel oral anticoagulant use--learnings from ARISTOTLE, ROCKET-AF, and RE-LY trials. *J Thromb Thrombolysis.* 2014;38(2):150-9.

44. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med.* 1998;339(10):659-66.

45. Morady F. Treatment of paroxysmal atrial fibrillation by pulmonary vein isolation. *Circ J.* 2003;67(7):567-71.

46. Kallergis EM, Goudis CA, Vardas PE. Atrial fibrillation: a progressive atrial myopathy or a distinct disease? *Int J Cardiol.* 2014;171(2):126-33.

47. Goldberger JJ, Arora R, Green D, Greenland P, Lee DC, Lloyd-Jones DM, Markl M, Ng J, Shah SJ. Evaluating the Atrial Myopathy Underlying Atrial Fibrillation: Identifying the Arrhythmogenic and Thrombogenic Substrate. *Circulation.* 2015;132(4):278-91.

48. Rivner H, Mitrani RD, Goldberger JJ. Atrial Myopathy Underlying Atrial Fibrillation. *Arrhythm Electrophysiol Rev.* 2020;9(2):61-70.

49. Olshansky B, Heller EN, Mitchell LB, Chandler M, Slater W, Green M, Brodsky M, Barrell P, Greene HL. Are transthoracic echocardiographic parameters associated with atrial fibrillation recurrence or stroke? Results from the Atrial Fibrillation Follow-Up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(12):2026-33.

50. Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, Weigl J, Gummert J, Hindricks G, Kottkamp H, Dhein S. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart.* 2004;90(4):400-5.

51. Kottkamp H. Atrial fibrillation substrate: the "unknown species"-- from lone atrial fibrillation to fibrotic atrial cardiomyopathy. *Heart Rhythm.* 2012;9(4):481-2.

52. Burstein B, Comtois P, Michael G, Nishida K, Villeneuve L, Yeh YH, Nattel S. Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ Res.* 2009;105(12):1213-22.

53. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation*. 1999;100(1):87-95.
54. Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Rivard L. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis*. 2005;48(1):9-28.
55. Fukumoto K, Habibi M, Ipek EG, Zahid S, Khurram IM, Zimmerman SL, Zipunnikov V, Spragg D, Ashikaga H, Trayanova N, Tomaselli GF, Rickard J, Marine JE, Berger RD, Calkins H, Nazarian S. Association of Left Atrial Local Conduction Velocity With Late Gadolinium Enhancement on Cardiac Magnetic Resonance in Patients With Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016;9(3):e002897.
56. Platonov PG, Mitrofanova LB, Orshanskaya V, Ho SY. Structural abnormalities in atrial walls are associated with presence and persistency of atrial fibrillation but not with age. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(21):2225-32.
57. Luo T, Chang CX, Zhou X, Gu SK, Jiang TM, Li YM. Characterization of atrial histopathological and electrophysiological changes in a mouse model of aging. *Int J Mol Med*. 2013;31(1):138-46.
58. Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(8):802-9.
59. Van Wagoner DR. Oxidative stress and inflammation in atrial fibrillation: role in pathogenesis and potential as a therapeutic target. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;52(4):306-13.
60. Youn JY, Zhang J, Zhang Y, Chen H, Liu D, Ping P, Weiss JN, Cai H. Oxidative stress in atrial fibrillation: an emerging role of NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;62:72-9.
61. Friedrichs K, Klinke A, Baldus S. Inflammatory pathways underlying atrial fibrillation. *Trends Mol Med*. 2011;17(10):556-63.
62. Jacob R, Khan M. Cardiac Biomarkers: What Is and What Can Be. *Indian J Cardiovasc Dis Women WINCARS*. 2018;3(4):240-4.
63. Merino-Merino A, Gonzalez-Bernal J, Fernandez-Zoppino D, Saez-Maleta R, Perez-Rivera JA. The Role of Galectin-3 and ST2 in Cardiology: A Short Review. *Biomolecules*. 2021;11(8).
64. van der Velde AR, Gullestad L, Ueland T, Aukrust P, Guo Y, Adourian A, Muntendam P, van Veldhuisen DJ, de Boer RA. Prognostic value of changes in galectin-3 levels over time in patients with heart failure: data from CORONA and COACH. *Circ Heart Fail*. 2013;6(2):219-26.
65. Chen C, Qu X, Gao Z, Zheng G, Wang Y, Chen X, Li H, Huang W, Zhou H. Soluble ST2 in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation and Prediction of Heart Failure. *Int Heart J*. 2018;59(1):58-63.
66. Harada M, Nattel S. Implications of Inflammation and Fibrosis in Atrial Fibrillation Pathophysiology. *Cardiac Electrophysiology Clinics*. 2021;13(1):25-35.
67. Packer M. Characterization, Pathogenesis, and Clinical Implications of Inflammation-Related Atrial Myopathy as an Important Cause of Atrial Fibrillation. *J Am Heart Assoc*. 2020;9(7):e015343.
68. Spodick DH. Arrhythmias during acute pericarditis. A prospective study of 100 consecutive cases. *Jama*. 1976;235(1):39-41.

69. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation*. 1997;96(4):1180-4.
70. Chen MC, Chang JP, Liu WH, Yang CH, Chen YL, Tsai TH, Wang YH, Pan KL. Increased inflammatory cell infiltration in the atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2008;102(7):861-5.
71. Yamashita T, Sekiguchi A, Iwasaki YK, Date T, Sagara K, Tanabe H, Suma H, Sawada H, Aizawa T. Recruitment of immune cells across atrial endocardium in human atrial fibrillation. *Circ J*. 2010;74(2):262-70.
72. Lazzerini PE, Capecchi PL, Laghi-Pasini F. Systemic inflammation and arrhythmic risk: lessons from rheumatoid arthritis. *Eur Heart J*. 2017;38(22):1717-27.
73. Ahlehoff O, Gislason GH, Jørgensen CH, Lindhardsen J, Charlott M, Olesen JB, Abildstrøm SZ, Skov L, Torp-Pedersen C, Hansen PR. Psoriasis and risk of atrial fibrillation and ischaemic stroke: a Danish Nationwide Cohort Study. *Eur Heart J*. 2012;33(16):2054-64.
74. Kristensen SL, Lindhardsen J, Ahlehoff O, Erichsen R, Lamberts M, Khalid U, Torp-Pedersen C, Nielsen OH, Gislason GH, Hansen PR. Increased risk of atrial fibrillation and stroke during active stages of inflammatory bowel disease: a nationwide study. *Europace*. 2014;16(4):477-84.
75. Lim SY, Bae EH, Han KD, Jung JH, Choi HS, Kim CS, Ma SK, Kim SW. Systemic lupus erythematosus is a risk factor for atrial fibrillation: a nationwide, population-based study. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(6):1019-25.
76. Moon I, Choi EK, Jung JH, Han KD, Choi YJ, Park J, Cho JH, Lee E, Choe W, Lee SR, Cha MJ, Lim WH, Oh S. Ankylosing spondylitis: A novel risk factor for atrial fibrillation - A nationwide population-based study. *Int J Cardiol*. 2019;275:77-82.
77. Aksoy H, Okutucu S, Sayin BY, Oto A. Non-invasive electrocardiographic methods for assessment of atrial conduction heterogeneity in ankylosing spondylitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(11):2185-6.
78. Efe TH, Cimen T, Ertem AG, Coskun Y, Bilgin M, Sahan HF, Pamukcu HE, Yayla C, Sunman H, Yuksel I, Yeter E. Atrial Electromechanical Properties in Inflammatory Bowel Disease. *Echocardiography*. 2016;33(9):1309-16.
79. Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res*. 2014;102(2):258-69.
80. Hu YF, Chen YJ, Lin YJ, Chen SA. Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(4):230-43.
81. Lip GY. Does atrial fibrillation confer a hypercoagulable state? *Lancet*. 1995;346(8986):1313-4.
82. Lip GY, Lowe GD, Rumley A, Dunn FG. Increased markers of thrombogenesis in chronic atrial fibrillation: effects of warfarin treatment. *Br Heart J*. 1995;73(6):527-33.
83. Kumagai K, Fukunami M, Ohmori M, Kitabatake A, Kamada T, Hoki N. Increased intracardiovascular clotting in patients with chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 1990;16(2):377-80.

84. Sajeev JK, Kalman JM, Dewey H, Cooke JC, Teh AW. The Atrium and Embolic Stroke: Myopathy Not Atrial Fibrillation as the Requisite Determinant? *JACC Clin Electrophysiol*. 2020;6(3):251-61.
85. Russo C, Jin Z, Liu R, Iwata S, Tugcu A, Yoshita M, Homma S, Elkind MS, Rundek T, Decarli C, Wright CB, Sacco RL, Di Tullio MR. LA volumes and reservoir function are associated with subclinical cerebrovascular disease: the CABL (Cardiovascular Abnormalities and Brain Lesions) study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013;6(3):313-23.
86. Daccarett M, Badger TJ, Akoum N, Burgon NS, Mahnkopf C, Vergara G, Kholmovski E, McGann CJ, Parker D, Brachmann J, Macleod RS, Marrouche NF. Association of left atrial fibrosis detected by delayed-enhancement magnetic resonance imaging and the risk of stroke in patients with atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(7):831-8.
87. Wiseman SJ, Ralston SH, Wardlaw JM. Cerebrovascular Disease in Rheumatic Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2016;47(4):943-50.
88. Shoamanesh A, Preis SR, Beiser AS, Kase CS, Wolf PA, Vasan RS, Benjamin EJ, Seshadri S, Romero JR. Circulating biomarkers and incident ischemic stroke in the Framingham Offspring Study. *Neurology*. 2016;87(12):1206-11.
89. Jiménez MC, Rexrode KM, Glynn RJ, Ridker PM, Gaziano JM, Sesso HD. Association Between High-Sensitivity C-Reactive Protein and Total Stroke by Hypertensive Status Among Men. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(9):e002073.
90. Kremers BMM, Ten Cate H, Spronk HMH. Pleiotropic effects of the hemostatic system. *J Thromb Haemost*. 2018.
91. Spronk HM, de Jong AM, Crijns HJ, Schotten U, Van Gelder IC, Ten Cate H. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovasc Res*. 2014;101(3):344-51.
92. Gager GM S-MJ. Pleiotropic effects of NOACS. *Austrian Journal of Cardiology*. 2020;27(9-10):335-8.
93. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):245-82.
94. Zhao P, Metcalf M, Bunnnett NW. Biased Signaling of Protease-Activated Receptors. *Frontiers in Endocrinology*. 2014;5.
95. Mosnier LO, Sinha RK, Burnier L, Bouwens EA, Griffin JH. Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46. *Blood*. 2012;120(26):5237-46.
96. Lin H, Trejo J. Transactivation of the PAR1-PAR2 heterodimer by thrombin elicits β -arrestin-mediated endosomal signaling. *J Biol Chem*. 2013;288(16):11203-15.
97. Chung H, Ramachandran R, Hollenberg MD, Muruve DA. Proteinase-activated receptor-2 transactivation of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- β receptor signaling pathways contributes to renal fibrosis. *J Biol Chem*. 2013;288(52):37319-31.

98. El-Daly M, Saifeddine M, Mihara K, Ramachandran R, Triggler CR, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptors 1 and 2 and the regulation of porcine coronary artery contractility: a role for distinct tyrosine kinase pathways. *Br J Pharmacol*. 2014;171(9):2413-25.
99. Lin H, Liu AP, Smith TH, Trejo J. Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2013;65(4):1198-213.
100. O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, Brass LF. Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene*. 2001;20(13):1570-81.
101. Willis Fox O, Preston RJS. Molecular basis of protease-activated receptor 1 signaling diversity. *J Thromb Haemost*. 2020;18(1):6-16.
102. Han X, Nieman MT, Kerlin BA. Protease-activated receptors: An illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost*. 2021;5(1):17-26.
103. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*. 2004;84(2):579-621.
104. O'Brien PJ, Prevost N, Molino M, Hollinger MK, Woolkalis MJ, Woulfe DS, Brass LF. Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J Biol Chem*. 2000;275(18):13502-9.
105. López ML, Soriano-Sarabia N, Bruges G, Marquez ME, Preissner KT, Schmitz ML, Hackstein H. Expression pattern of protease activated receptors in lymphoid cells. *Cell Immunol*. 2014;288(1-2):47-52.
106. Cognato R, Slupsky JR, Jendrach M, Burysek L, Syrovets T, Simmet T. Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood*. 2003;102(7):2645-52.
107. Weithauer A, Rauch U. Role of protease-activated receptors for the innate immune response of the heart. *Trends Cardiovasc Med*. 2014;24(6):249-55.
108. Ramelli G, Fuertes S, Narayan S, Busso N, Acha-Orbea H, So A. Protease-activated receptor 2 signalling promotes dendritic cell antigen transport and T-cell activation in vivo. *Immunology*. 2010;129(1):20-7.
109. Antoniak S, Pawlinski R, Mackman N. Protease-activated receptors and myocardial infarction. *IUBMB Life*. 2011;63(6):383-9.
110. Ito K, Date T, Ikegami M, Hongo K, Fujisaki M, Katoh D, Yoshino T, Anzawa R, Nagoshi T, Yamashita S, Inada K, Matsuo S, Yamane T, Yoshimura M. An immunohistochemical analysis of tissue thrombin expression in the human atria. *PLoS One*. 2013;8(6):e65817.
111. Bukowska A, Zacharias I, Weinert S, Skopp K, Hartmann C, Huth C, Goette A. Coagulation factor Xa induces an inflammatory signalling by activation of protease-activated receptors in human atrial tissue. *Eur J Pharmacol*. 2013;718(1-3):114-23.
112. Pinet C, Algalarrondo V, Sablayrolles S, Le Grand B, Pignier C, Cussac D, Perez M, Hatem SN, Coulombe A. Protease-activated receptor-1 mediates thrombin-induced persistent sodium current in human cardiomyocytes. *Mol Pharmacol*. 2008;73(6):1622-31.

113. Ide J, Aoki T, Ishivata S, Glusa E, Strukova SM. Proteinase-activated receptor agonists stimulate the increase in intracellular Ca²⁺ in cardiomyocytes and proliferation of cardiac fibroblasts from chick embryos. *Bull Exp Biol Med.* 2007;144(6):760-3.
114. Sabri A, Muske G, Zhang H, Pak E, Darrow A, Andrade-Gordon P, Steinberg SF. Signaling properties and functions of two distinct cardiomyocyte protease-activated receptors. *Circ Res.* 2000;86(10):1054-61.
115. Friebel J, Weithauser A, Witkowski M, Rauch BH, Savvatis K, Dörner A, Tabaraie T, Kasner M, Moos V, Bösel D, Gotthardt M, Radke MH, Wegner M, Bobbert P, Lassner D, Tschöpe C, Schutheiss HP, Felix SB, Landmesser U, Rauch U. Protease-activated receptor 2 deficiency mediates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction. *Eur Heart J.* 2019;40(40):3318-32.
116. Navar AM, Kolkailah AA, Overton R, Shah NP, Rousseau JF, Flaker GC, Pignone MP, Peterson ED. Trends in Oral Anticoagulant Use Among 436 864 Patients With Atrial Fibrillation in Community Practice, 2011 to 2020. *J Am Heart Assoc.* 2022;11(22):e026723.
117. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models.* Cham (CH): Springer
- Copyright 2015, The Editor(s) (if applicable) and the Author(s). 2015.
118. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2011;699:1-29.
119. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.1.-5.1.11.
120. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.* 6. ed. Heidelberg: SpringerSpektrum; 2009.
121. thermofisher.com. So funktionieren Taq-man-Assays 2023 [cited 2023/ 20/03]. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/life-science/pcr/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>.
122. Bishara N. Chapter 18 - The Use of Biomarkers for Detection of Early- and Late-Onset Neonatal Sepsis. In: Ohls RK, Maheshwari A, editors. *Hematology, Immunology and Infectious Disease: Neonatology Questions and Controversies (Second Edition).* Philadelphia: W.B. Saunders; 2012. p. 303-15.
123. Effros RB, Dillard L, Zeller E, Naeim F, Walford RL. Strong HLA-DR expression in T cell cultures after activation is necessary for IL-2-dependent proliferation. *Human Immunology.* 1983;8(4):249-54.
124. Alcover A, Alarcón B, Di Bartolo V. Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:103-25.
125. Frunza O, Russo I, Saxena A, Shinde AV, Humeres C, Hanif W, Rai V, Su Y, Frangogiannis NG. Myocardial Galectin-3 Expression Is Associated with Remodeling of the Pressure-Overloaded Heart and May Delay the Hypertrophic Response without Affecting Survival, Dysfunction, and Cardiac Fibrosis. *Am J Pathol.* 2016;186(5):1114-27.
126. Yalcin MU, Gurses KM, Kocyigit D, Canpinar H, Canpolat U, Evranos B, Yorgun H, Sahiner ML, Kaya EB, Hazirolan T, Tokgozoglu L, Oto MA, Ozer N, Guc D, Aytemir K. The Association of Serum Galectin-3 Levels with Atrial Electrical and Structural Remodeling. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2015;26(6):635-40.

127. Aleksova A, Paldino A, Beltrami AP, Padoan L, Iacoviello M, Sinagra G, Emdin M, Maisel AS. Cardiac Biomarkers in the Emergency Department: The Role of Soluble ST2 (sST2) in Acute Heart Failure and Acute Coronary Syndrome—There is Meat on the Bone. *J Clin Med*. 2019;8(2).
128. Okar S, Kaypakli O, Şahin DY, Koç M. Fibrosis Marker Soluble ST2 Predicts Atrial Fibrillation Recurrence after Cryoballoon Catheter Ablation of Nonvalvular Paroxysmal Atrial Fibrillation. *Korean Circ J*. 2018;48(10):920-9.
129. Chang KW, Hsu JC, Toomu A, Fox S, Maisel AS. Clinical Applications of Biomarkers in Atrial Fibrillation. *Am J Med*. 2017;130(12):1351-7.
130. Watanabe T, Takeishi Y, Hirono O, Itoh M, Matsui M, Nakamura K, Tamada Y, Kubota I. C-reactive protein elevation predicts the occurrence of atrial structural remodeling in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Heart Vessels*. 2005;20(2):45-9.
131. Chung MK, Martin DO, Sprecher D, Wazni O, Kanderian A, Carnes CA, Bauer JA, Tchou PJ, Niebauer MJ, Natale A, Van Wagoner DR. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;104(24):2886-91.
132. Leftheriotis DI, Fountoulaki KT, Flevari PG, Parissis JT, Panou FK, Andreadou IT, Venetsanou KS, Iliodromitis EK, Kremastinos DT. The predictive value of inflammatory and oxidative markers following the successful cardioversion of persistent lone atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 2009;135(3):361-9.
133. Marcus GM, Smith LM, Ordovas K, Scheinman MM, Kim AM, Badhwar N, Lee RJ, Tseng ZH, Lee BK, Olgin JE. Intracardiac and extracardiac markers of inflammation during atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2010;7(2):149-54.
134. Henningsen KM, Therkelsen SK, Bruunsgaard H, Krabbe KS, Pedersen BK, Svendsen JH. Prognostic impact of hs-CRP and IL-6 in patients with persistent atrial fibrillation treated with electrical cardioversion. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009;69(3):425-32.
135. Negreva MN, Prodanova K, Vitlianova K, Madjova C. Paroxysmal atrial fibrillation: changes in factor VIII and von Willebrand factor impose early hypercoagulability. *Arch Med Sci Atheroscler Dis*. 2020;5:e140-e7.
136. Negreva MN, Prodanova KS, Vitlianova KD. Paroxysmal atrial fibrillation is associated with early coagulation activity regardless of risk factors for embolism. *Minerva Cardiol Angiol*. 2021;69(3):269-76.
137. McLarty JL, Meléndez GC, Brower GL, Janicki JS, Levick SP. Tryptase/Protease-activated receptor 2 interactions induce selective mitogen-activated protein kinase signaling and collagen synthesis by cardiac fibroblasts. *Hypertension*. 2011;58(2):264-70.
138. Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J. beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J Biol Chem*. 2002;277(2):1292-300.
139. Soh UJ, Trejo J. Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through β -arrestin and dishevelled-2 scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(50):E1372-80.
140. Mercer PF, Chambers RC. Coagulation and coagulation signalling in fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):1018-27.

141. Rothmeier AS, Ruf W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):133-49.
142. Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood.* 1990;76(1):1-16.
143. Stafford DW. The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1873-8.
144. Bae JS, Yang L, Rezaie AR. Factor X/Xa elicits protective signaling responses in endothelial cells directly via PAR-2 and indirectly via endothelial protein C receptor-dependent recruitment of PAR-1. *J Biol Chem.* 2010;285(45):34803-12.
145. Eikelboom JW, Bosch J, Connolly SJ, Tyrwitt J, Fox KAA, Muehlhofer E, Neumann C, Tasto C, Bangdiwala SI, Diaz R, Alings M, Dagenais GR, Leong DP, Lonn EM, Avezum A, Piegas LS, Widimsky P, Parkhomenko AN, Bhatt DL, Branch KRH, Probstfield JL, Lopez-Jaramillo P, Rydén L, Pogossova N, Keltai K, Keltai M, Ertl G, Stoerk S, Dans AL, Lanan F, Liang Y, Zhu J, Torp-Pedersen C, Maggioni AP, Commerford PJ, Guzik TJ, Vanassche T, Verhamme P, O'Donnell M, Tonkin AM, Varigos JD, Vinereanu D, Felix C, Kim JH, Ibrahim KS, Lewis BS, Metsarinne KP, Aboyans V, Steg PG, Hori M, Kakkar A, Anand SS, Lamy A, Sharma M, Yusuf S. Long-Term Treatment with the Combination of Rivaroxaban and Aspirin in Patients with Chronic Coronary or Peripheral Artery Disease: Outcomes During the Open Label Extension of the COMPASS trial. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.* 2022;8(8):786-95.
146. Anand SS, Yusuf S. Oral anticoagulants in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(4 Suppl S):62s-9s.
147. Gurbel PA, Fox KAA, Tantry US, Ten Cate H, Weitz JI. Combination Antiplatelet and Oral Anticoagulant Therapy in Patients With Coronary and Peripheral Artery Disease. *Circulation.* 2019;139(18):2170-85.
148. 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.
149. Tracy PB, Mann KG. Prothrombinase complex assembly on the platelet surface is mediated through the 74,000-dalton component of factor Va. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(8):2380-4.
150. Monković DD, Tracy PB. Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin. *J Biol Chem.* 1990;265(28):17132-40.
151. Uchino K, Hernandez AV. Dabigatran association with higher risk of acute coronary events: meta-analysis of noninferiority randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2012;172(5):397-402.
152. Connolly SJ, Wallentin L, Ezekowitz MD, Eikelboom J, Oldgren J, Reilly PA, Brueckmann M, Pogue J, Alings M, Amerena JV, Avezum A, Baumgartner I, Budaj AJ, Chen JH, Dans AL, Darius H, Di Pasquale G, Ferreira J, Flaker GC, Flather MD, Franzosi MG, Golitsyn SP, Halon DA, Heidbuchel H, Hohnloser SH, Huber K, Jansky P, Kamensky G, Keltai M, Kim SS, Lau CP, Le Heuzey JY, Lewis BS, Liu L, Nanas J, Omar R, Pais P, Pedersen KE, Piegas LS, Raev D, Smith PJ, Talajic M, Tan RS, Tanomsup S, Toivonen L, Vinereanu D, Xavier D, Zhu J, Wang SQ, Duffy CO, Themeles E, Yusuf S. The Long-Term Multicenter Observational Study of Dabigatran Treatment in Patients With Atrial Fibrillation (RELY-ABLE) Study. *Circulation.* 2013;128(3):237-43.

153. Wei AH, Gu ZC, Zhang C, Ding YF, Liu D, Li J, Liu XY, Lin HW, Pu J. Increased risk of myocardial infarction with dabigatran etexilate: fact or fiction? A critical meta-analysis of over 580,000 patients from integrating randomized controlled trials and real-world studies. *Int J Cardiol.* 2018;267:1-7.

8. Eidesstaatliche Versicherung

„Ich, Max Wegner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*PARI-vermittelte Interaktion von Gerinnungs- und Immunsystem in der Pathophysiologie von Vorhofflimmern / PARI-mediated interaction of the coagulation and immune system in the pathophysiology of atrial fibrillation*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Max Wegner hatte Anteil an folgenden Publikationen:

- 1) Friebel J, Witkowski M, Wegner M, Blöbaum L, Lammel S, Schencke PA, Jakobs K, Puccini M, Reißner D, Steffens D, Moos V, Schutheiss HP, Landmesser U, Rauch U. Cytotoxic CD8+ T Cells Are Involved in the Thrombo-Inflammatory Response during First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *Cells*. 2022.

Max Wegner war an der o.g. Publikation folgend beteiligt: Literaturrecherche, Patientenrekrutierung und -charakterisierung, Materialgewinnung, methodische Durchführung der PBMC-Isolation, sowie ELISAs zu Galectin-3 und sST-2, Peer-Review. Aus seiner statistischen Auswertung sind Tabelle-1 und Abbildung-2A hervorgegangen.

- 2) Blöbaum L, Witkowski M, Wegner M, Lammel S, Schencke PA, Jakobs K, Puccini M, Reißner D, Steffens D, Landmesser U, Rauch U, Friebel J. Intestinal Barrier Dysfunction and Microbial Translocation in Patients with First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *Biomedicines*. 2023.

Max Wegner war an der o.g. Publikation folgend beteiligt: Literaturrecherche, Patientenrekrutierung und -charakterisierung, Materialgewinnung, Generation der Plasmaproben, Peer-Review. Aus seiner statistischen Auswertung ist Tabelle-1 hervorgegangen.

- 3) Friebel J, Wegner M, Blöbaum L, Schencke P-A, Jakobs K, Puccini M, Ghanbari E, Lammel S, Thevathasan T, Moos V, Witkowski M, Landmesser U, Rauch-Kröhnert U. Characterization of Thrombo-inflammation in Patients with First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024.

Max Wegner war an der o.g. Publikation folgend beteiligt: Literaturrecherche, Patientenrekrutierung und -charakterisierung, Methodische Umsetzung von PBMC-Isolation, FACS-Durchflusszytometrie und ELISAs, sowie Peer-Review. Aus seiner statistischen Auswertung sind (Tabelle-1), Abb.-1C, Abb. 2B+C., Abb.4A+C+D+E hervorgegangen.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Publikationsliste

1. Friebel J, Weithauser A, Witkowski M, Rauch BH, Savvatis K, Dörner A, Tabaraie T, Kasner M, Moos V, Bösel D, Gotthardt M, Radke MH, Wegner M, Bobbert P, Lassner D, Tschöpe C, Schutheiss HP, Felix SB, Landmesser U, Rauch U. Protease-activated receptor 2 deficiency mediates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction. *Eur Heart J*. 2019 Oct 21;40(40):3318-3332. doi: 10.1093/eurheartj/ehz117. PMID: 31004144.
2. Friebel J, Witkowski M, Wegner M, Blöbaum L, Lammel S, Schencke PA, Jakobs K, Puccini M, Reißner D, Steffens D, Moos V, Schutheiss HP, Landmesser U, Rauch U. Cytotoxic CD8+ T Cells Are Involved in the Thrombo-Inflammatory Response during First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *Cells*. 2022 Dec 29;12(1):141. doi: 10.3390/cells12010141. PMID: 36611934; PMCID: PMC9818535.
3. Blöbaum L, Witkowski M, Wegner M, Lammel S, Schencke PA, Jakobs K, Puccini M, Reißner D, Steffens D, Landmesser U, Rauch U, Friebel J. Intestinal Barrier Dysfunction and Microbial Translocation in Patients with First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *Biomedicines*. 2023 Jan 10;11(1):176. doi: 10.3390/biomedicines11010176. PMID: 36672684; PMCID: PMC9856173.
4. Friebel J, Wegner M, Blöbaum L, Schencke P-A, Jakobs K, Puccini M, Ghanbari E, Lammel S, Thevathasan T, Moos V, Witkowski M, Landmesser U, Rauch-Kröhnert U. Characterization of Thrombo-inflammation in Patients with First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(7):4109. <https://doi.org/10.3390/ijms25074109>.

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Julian Friebe für seine besondere Unterstützung bei jeglichen Anliegen, sowohl während der praktischen Phase in der Klinik und im Labor, wie auch für die anschließende Verfassung der Dissertationsschrift. Insbesondere bedanke ich mich auch für seine Bereitschaft, meine Doktorarbeit für diesen langen Zeitraum zu betreuen, seine Motivation und ständigen Zuspruch für das Gelingen.

Zudem bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr.med. Ursula Rauch-Kröhnert, meiner Zweitbetreuerin, die mir die Anfertigung dieser Dissertation durch die Integration in ihre Arbeitsgruppe und in das Labor erst ermöglichte, sowie für Ihre Durchsicht und Korrekturvorschläge.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiter*innen der AG „Thrombose- und Hämostaseforschung“ der Charité am Campus Benjamin Franklin für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit, sowie deren Einführung in die unterschiedlichen Labormethoden und zahlreich geleisteten Hilfestellungen.

Ganz besonderer Dank gebührt nicht zuletzt auch meiner Ehefrau Diana Carolina Castillo Ruiz für den andauernden Rückhalt, sowie die große Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit.

13. Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie

Name, Vorname:
Wegner, Max
Emailadresse: max.wegner@charite.de
Matrikelnummer:
217789
Promotionsbetreuer*in:
Prof. Dr.med. Ursula Rauch-Kröhnert
Promotionsinstitution:
Klinik für Kardiologie - Campus Benjamin Franklin

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzschke

Postanschrift:

Charitéplatz 1 | 10117 Berlin

Besucher*innenanschrift:

Sauerbruchweg 3 | 10117 Berlin



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass *Max Wegner* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben in Anspruch genommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

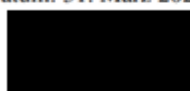
- 29.03 2023

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Schwächen von Tests auf Normalverteilung erläutert
- Verwendung nicht-parametrischer Testverfahren empfohlen
- Unterschied von Pearson- und Spearman-Korrelation besprochen
- Typ 1-Fehler-Kumulierung erklärt
- Allgemeine Hinweise zur Darstellung der Ergebnisse

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das iBike übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 31. März 2023



Lukas Moedl
2023.03.31 14:41:02
+02'00'

Unterschrift Berater*in