

Lipide und Lipoproteine in der Kardioprotektion

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Marcel Benkhoff

aus Ahaus

Düsseldorf, März 2022

aus dem Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

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

Berichtersteller:

1. PD Dr. med. Amin Polzin

2. Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2022
(bitte bei der Abgabe Ihrer Dissertation noch offenlassen)

Zusammenfassung

Lipide und Lipoproteine sind in mannigfaltiger Ausführung Bestandteile des menschlichen Organismus. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Genese kardiovaskulärer Erkrankungen. Vor kurzem wurde jedoch erstmalig eine mögliche kardioprotektive Wirkung entdeckt. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) wurden in der Vergangenheit in großen, randomisierten Studien hinsichtlich einer möglichen kardiovaskulären Risikoreduktion untersucht. Es wurde jedoch keine Risikoreduktion beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde in der REDUCE-IT-Studie, in der Icosapent ethyl (IPE), der Ethylester der Eicosapentaensäure (EPA), untersucht wurde, ein geringeres Risiko für ischämische Ereignisse bei mit IPE-behandelten Patient*innen festgestellt. Der zugrundeliegende Mechanismus dahinter blieb jedoch unklar. Interessanterweise war das Blutungsrisiko der mit IPE-behandelten Patient*innen erhöht. Daher untersuchten wir in dieser Arbeit eine mögliche thrombozytenhemmende Wirkung von IPE. Sowohl in-vivo als auch ex-vivo wurde die Thrombozytenfunktion in verschiedenen Settings analysiert. Untersucht wurden die Thrombozytenadhäsion, -aggregation sowie die Degranulierung. Zusätzliche Proteom- und Lipidomanalysen wurden durchgeführt, um den molekularen Wirkmechanismus zu bestimmen. Um die Ergebnisse zu untermauern und eine Abhängigkeit von der Cyclooxygenase-1 (COX-1) nachzuweisen, wurden Mausversuche mit Knochenmarkschimären durchgeführt. Ein bisher unbekannter Wirkmechanismus von IPE/EPA auf Thrombozyten wurde identifiziert. Wir konnten nachweisen, dass es sich um eine direkte, kompetitive Interaktion von EPA mit der Arachidonsäure im aktivem Zentrum der COX-1 handelt.

Nicht nur Omega-3-Fettsäuren, wie EPA, können sich positiv auf das kardiovaskuläre System auswirken. Das high-density Lipoprotein (HDL) ist seit Jahrzehnten dafür bekannt das „gute Cholesterin“ zu sein. Tatsächlich ist HDL für die Ausscheidung von Cholesterol aus dem Körper wichtig. Das HDL hat allerdings auch direkte kardioprotektive Eigenschaften. Erstaunlich war deshalb, dass eine einfache Erhöhung des HDL-Spiegels bei Risikopatient*innen nicht zu einem verbesserten Auskommen führte. Vielmehr zeigt sich, dass das HDL bei verschiedenen Erkrankung seine Funktionalität verliert. In dieser Arbeit wurde das HDL diabetischer Patient*innen untersucht. Dafür wurde es Mäusen kurz vor einem akuten Myokardinfarkt injiziert. Im Vergleich zum HDL gesunder Proband*innen zeigte sich, dass die kardioprotektive Wirkung vollständig aufgehoben war. Außerdem korrelierte die Dysfunktionalität mit dem HbA1c-Wert der Spender. Der genaue Mechanismus und die Möglichkeiten zur Wiederherstellung der kardioprotektiven Eigenschaften des HDL sollte in zukünftigen Studien adressiert werden.

Summary

Lipids and lipoproteins are components of the human organism in various forms. They are key players in genesis of cardiovascular diseases. However, a potential role in cardioprotection was revealed recently. PUFAs (Polyunsaturated Fatty Acids) have been investigated in the past in large, randomized trials regarding cardiovascular risk reduction. However, no risk reduction was observed. In contrast, the REDUCE-IT trial, investigating Icosapent ethyl (IPE), the ethyl ester of Eicosapentaenoic acid (EPA), found reduced risk of ischemic events in IPE-treated patients. The mechanism behind remained unclear. Interestingly, bleeding rate was higher in IPE treated patients. Hence, in this study we investigated a potential antiplatelet effect of IPE. Both in-vivo and ex-vivo platelet function was analyzed in different settings. Platelet adhesion, aggregation as well as degranulation of platelets was investigated. Additional proteomic and lipidomic analyses were performed to determine the molecular mechanism of action. To support the findings and demonstrate a cyclooxygenase-1 (COX-1) dependency, murine experiments were performed on bone marrow chimeras. A previously unknown mechanism of action of EPA on platelets was identified. We were able to demonstrate, that is a direct, competitive interaction of EPA with arachidonic acid around the active site of COX-1.

Not only omega-3-fatty acids, such as EPA, can have positive effects on the cardiovascular system. High-density lipoprotein (HDL) has been known for years to be the "good cholesterol". In fact, HDL is important for the elimination of cholesterol from the body. However, HDL also has direct cardioprotective effects. It was therefore surprising that increasing HDL levels in high-risk patients did not lead to improved outcome. Rather, HDL was identified to lose its functionality in various disease conditions. In this work, the HDL of diabetic patients was studied. For this purpose, it was injected into mice shortly before acute myocardial infarction. Compared to the HDL of healthy subjects, it was shown that cardioprotection was completely blunted. Furthermore, dysfunctionality correlated positively with the HbA1c level. The exact mechanism and options to restore HDLs cardioprotective properties will be investigated in future investigations.

Abkürzungsverzeichnis:

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	TTC	heart rate, Herzfrequenz	HR
Acetylsalicylsäure	ASS	high-density Lipoprotein	HDL
Adenosindiphosphat	ADP	Icosapent ethyl	IPE
Adenosintriphosphat	ATP	Inositol-3-Phosphat	IP ₃
akuter Myokardinfarkt	AMI	intraperitoneal	i.p.
Allophycocyanin	APC	Ischämie/Reperfusion	I/R
Arachidonsäure	ARA	left anterior descending artery	LAD
<i>area at risk</i>	AAR	Lichttransmission-	
<i>area under curve</i>	AUC	aggregometrie	LTA
Baseline	BL	Lipoxygenase	LOX
bovines Serumalbumin	BSA	low-density Lipoprotein	LDL
Carbonylcyanide-m-		maximum of aggregation	MoA
chlorophenylhydrazone	CCCP	Multiplate Impedanz Analyse	MIA
cardiac output,		phosphatgepufferte Salzlösung	PBS
Herzminutenvolumen	CO	plättchenarmes Plasma	PAP
Cluster of Differentiation	CD	plättchenreiches Plasma	PRP
Cyclooxygenase-1	COX-1	Prostaglandin E1	PGE ₁
Diacylglycerol	DAG	Raumtemperatur	RT
Docosahexaensäure	DHA	Schlagvolumen	SV
Durchflusszytometrie (=fluorescence-		<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-</i>	
<i>activated cell sorting</i>)	FACS	<i>factor attachment receptor</i>	SNARE
Eicosapentaensäure	EPA	Sphingosin-1-Phosphat	S1P
Ejektionsfraktion	EF	<i>synaptosomal-associated</i>	
enddiastolisches Volumen	EDV	<i>proteins</i>	SNAP
endsystolisches Volumen	ESV	Thromboxan A2	TXA2
<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>		Thromboxan B2	TXB2
	ELISA	Typ-2 Diabetes mellitus	T2DM
Fluorescein	FITC	Triglyceride	TG
Glykoprotein	GP	von-Willebrand-Faktor	vWF

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der akute Myokardinfarkt.....	1
1.2	Gleichgewicht zwischen Thrombusbildung und Blutung: die Hämostase	2
1.3	Thrombozyten	2
1.3.1	Thrombozytenaktivierung.....	3
1.3.2	Die Cyclooxygenase in der Thrombozytenaggregation.....	6
1.4	Lipide und Lipoproteine	7
1.4.1	Lipide	7
1.4.2	Lipoproteine	8
1.5	Eicosapentaensäure	9
1.5.1	Biochemie.....	9
1.5.2	Studienlage.....	9
1.6	High-density Lipoprotein (HDL).....	12
1.6.1	Allgemeines	12
1.6.2	Studienlage.....	12
1.7	Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	13
1.8	Diabetes mellitus.....	14
1.8.1	HbA1c-Wert.....	15
1.9	Fragestellung und Hypothese	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Methoden.....	17
2.1.1	Proband*innen für in-vivo Untersuchungen.....	17
2.1.2	Blutabnahme	17
2.1.3	Lichttransmissionsaggregometrie (LTA)	17
2.1.4	Multiplate Impedance Analyse (MIA)	19
2.1.5	Thrombozytenadhäsion in einer Flusskammer	19
2.1.6	Adenosintriphosphat-Freisetzungssassay (ATP-release).....	20
2.1.7	Thromboxan B2-Messung mittels ELISA	22
2.1.8	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS).....	22
2.1.9	Versuchstiere.....	25
2.1.10	Bestrahlung und Bildung von COX-1-defizienten Chimären	25
2.1.11	In-vivo Thrombusformation (intravital Mikroskopie)	26
2.1.12	Ischämie/Reperfusion-Versuch (I/R) zur Induktion eines akuten Myokardinfarktes.	27
2.1.13	Murine transthorakale Echokardiographie	28

2.1.14	Tailbleeding Assay	29
2.1.15	Histologische Untersuchungen	30
2.2	Extern durchgeführte Arbeiten	33
2.2.1	In-silico Docking.....	33
2.2.2	Proteom und Phosphoproteomanalysen der Thrombozyten	33
2.2.3	Lipidomanalysen der Thrombozyten.....	34
2.2.4	Extraktion von high-density lipoprotein (HDL).....	35
2.3	Statistische Analyse.....	36
2.4	Weitere Laborutensilien.....	36

3 Ergebnisse Teil 1: Einfluss von Eicosapentaensäure auf die arterielle Thrombusformation durch Cyclooxygenase-1-abhängige Inhibition der Thrombozytenreaktivität..... 37

3.1	Der Einfluss von IPE auf die arterielle Thrombose und die Thrombozytenfunktion im Mausmodell.....	37
3.1.1	IPE reduziert die arterielle Thrombose in-vivo	37
3.1.2	IPE verlängert die Blutungszeit in-vivo.....	40
3.2	Die Supplementation von IPE reduziert die Thrombozytenaggregation, Adhäsion und Degranulation.....	41
3.2.1	Patient*innencharakteristika und Versuchsaufbau	41
3.2.2	Reduzierte ARA-induzierte Aggregation in der LTA	42
3.2.3	Verminderte p-Selektin Sekretion aus ARA-aktivierten Thrombozyten	43
3.2.4	Reduzierte ARA-induzierte ATP-Freisetzung aus Thrombozyten	44
3.2.5	Bildung von TXB2 nach Stimulation der Thrombozyten	45
3.2.6	Veränderte Lipidkomposition der Thrombozytenmembran durch IPE-Einnahme ..	47
3.3	EPA inhibiert die Thrombozytenaggregation, -Adhäsion und -Degranulation und das intrazelluläre Calcium Signalling konzentrationsabhängig.....	49
3.3.1	Reduktion der Thrombozytenadhäsion in-vitro	49
3.3.2	Reduktion der Aggregation durch EPA-Inkubation in-vitro	50
3.3.3	Reduktion der Thrombozytendegranulierung in-vitro	52
3.3.4	Reduktion des intrazellulären Calcium Signalling durch EPA.....	54
3.4	EPA verringert den Effekt von ARA auf das Thrombozytenproteom und Phosphoproteom in verschiedenen intrazellulären Signalwegen.....	55
3.4.1	Heatmap zum (Phospho-)Proteom ARA-aktivierter Thrombozyten in-vitro	55
3.4.2	Analyse ausgewählter Phosphoproteine.....	56
3.5	EPA und ARA agieren kompetitiv um die thrombozytäre COX-1	59
3.5.1	EPA zeigt keinen Effekt auf die Thrombozytenfunktion bei pharmakologischer COX-1-Inhibition	59
3.5.2	EPA und ARA agieren kompetitiv	60

3.5.3	Keine veränderte Freisetzung von ARA und EPA aus der Thrombozytenmembran nach zehntägiger IPE-Supplementation	61
3.5.4	Eine virtuelle Docking Analyse zeigt ähnliche Affinitäten von ARA und EPA im aktiven Zentrum der COX-1	62
3.6	Die pharmakologische COX-1-Inhibition, sowie die genetische COX-1-Defizienz heben den EPA-Effekt in der arteriellen Thrombusformation auf	63
3.6.1	Pharmakologische COX-1-Inhibitor	63
3.6.2	Genetische COX-1-Defizienz.....	63
4	Ergebnisse Teil 2: Einfluss von HDL auf das Auskommen AMI in der Maus.....	67
4.1	Versuchsaufbau.....	67
4.2	Das HDL von Typ 2-Diabetikern zeigt keine Kardioprotektion.....	68
4.2.1	Einfluss von HDL und dmHDL auf die kardiale Funktion 24h nach AMI.....	69
4.3	Das HDL gesunder Proband*innen verbessert das kardiale Remodelling	70
4.3.1	Reduktion der Narbengröße 21 Tage nach AMI.....	70
4.3.2	Verbesserte kardiale Funktion 21 Tage nach AMI	71
4.4	Mögliche Gründe für den unterschiedlichen Effekt von HDL und dmHDL auf das Auskommen nach ischämischem Akutereignis	72
4.4.1	Status der diabetischen Erkrankung	72
4.4.2	Level des S1P im HDL.....	73
5	Diskussion.....	74
5.1	Diskussion zu Versuchsteil 1.....	74
5.1.1	Limitationen dieses Versuchsteils	82
5.1.2	Zusammenfassung.....	83
5.2	Diskussion zu Versuchsteil 2.....	86
5.2.1	Limitationen dieses Versuchsteils	87
6	Literaturverzeichnis.....	89

1 Einleitung

1.1 Der akute Myokardinfarkt

Der akute Myokardinfarkt (AMI) ist trotz aller Forschungserfolge in den letzten Jahrzehnten weiterhin eine der häufigsten Todesursachen weltweit [1]. Allein in Deutschland starben im Jahr 2019 über 40.000 Personen an einem kardiovaskulären Akutereignis [2]. Der Hauptgrund für die Entstehung eines AMI ist die Genese eines Thrombus, der zur Okklusion einer Koronararterie führt. Die daraus resultierende Durchblutungsstörung (Ischämie) löst im Anschluss die bekannte Symptomatik aus.

Die meisten Thromben, die zu einem AMI führen, entstehen nach einer sog. atherosklerotischen Plaqueruptur [3]. Bei einer atherosklerotischen Erkrankung kommt es zur pathologischen Einlagerung von Cholesterolem und seinen Estern in die Tunica Intima, die innere Wand der Blutgefäße. Durch eine Reihe pathologischer Prozesse bildet sich daraufhin der atherosklerotische Plaque. Kommt es zu einer Ruptur eines solchen Plaques, beginnt die Thrombusformation, in der Thrombozyten die entscheidende Rolle spielen [4, 5].

Die Thrombusformation ist ein hochkomplexer Prozess an dem Thrombozyten mit der endothelialen und subendothelialen Matrix des Blutgefäßes interagieren [5]. Es kommt zu einer Aktivierung der Thrombozyten durch die Freisetzung verschiedenen Mediatoren aus der Gefäßwand (u.a. Von-Willebrand-Faktor, Kollagen) und daraufhin zur Adhäsion an die subendotheliale Matrix über Integrine (bspw. Glykoprotein Ib-Rezeptor) [6]. Verschiedene intrazelluläre Signalwege werden daraufhin aktiviert. Die Aktivierung des Glykoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa, CD41/CD61) führt zur Bindung von Fibrinogen [7]. Die Bindung von Fibrinogen ist der Beginn der Quervernetzung unter den Thrombozyten und der arterielle Thrombus entsteht.

Hauptaufgabe der notfallmedizinischen Behandlung eines/r Herzinfarktpatienten/in ist die Revaskularisation des betroffenen Gewebes, sodass eine normale Durchblutung der Koronargefäße wieder gewährleistet ist [8]. Beim Vergleich der Prävalenz eines AMI in der deutschen Bevölkerung [9] mit der Mortalitätsrate fällt auf, dass ein sehr großer Anteil der Patient*innen das kardiovaskuläre Akutereignis überlebt. Unmittelbar nach AMI beginnen im Herzen Umbauarbeiten, das sog. Remodelling. Dieses ist gekennzeichnet durch den Tod der Kardiomyozyten, Inflammationsprozesse und die Vernarbung des vom Infarkt betroffenen Gewebes [10]. Die Qualität und Quantität dieser Vorgänge determinieren das Langzeitauskommen nach AMI hinsichtlich der kardialen Funktion [11]. Ein pathologisches Remodelling kann zur kardialen Dysfunktion über eine Herzinsuffizienz bis hin zum kardiovaskulären Tod führen [12, 13].

Das Auskommen nach AMI und damit die Lebensqualität der Betroffenen, kann über zwei entscheidende Wege beeinflusst werden. Zum einen kann die arterielle Thrombusformation gehemmt werden, was zu einer geringeren Chance eines schweren kardiovaskulären Akutereignisses führt. Zum anderen sollte das Remodelling nach AMI im Fokus des Forschungsinteresses stehen, da dies für die Langzeitprognose nach AMI von essenzieller Bedeutung ist.

1.2 Gleichgewicht zwischen Thrombusbildung und Blutung: die Hämostase

Die Hämostase, also die Blutgerinnung, ist ein sehr komplexer Prozess, an dem viele Zellen, humorale Faktoren und Gewebe beteiligt sind. Ziel dieses Prozesses ist es ein Gleichgewicht zwischen übermäßiger Blutung und zu viel Gerinnung zu schaffen [14]. Aus historischen und didaktischen Gründen lässt sich die Hämostase in zwei Phasen unterteilen.

Die primäre Hämostase hat das Ziel einen primären, noch instabilen Thrombus zu bilden und eine Gefäßläsion so schnell wie möglich abzudichten [15]. Thrombozyten spielen dabei die zentrale Rolle, indem sie selbst der wichtigste Teil des primären Thrombus darstellen. Darüber hinaus tragen sie durch die Freisetzung von Mediatoren zur verstärkten Gerinnung und Aggregation bei. In der zweiten Phase, der sekundäre Hämostase, werden verschiedene humorale Gerinnungsfaktoren kaskadenartig aktiviert. Am Ende dieser „Gerinnungskaskade“ entsteht das unlösliche Fibrin, welches sich netzartig im primären Thrombus bildet und diesen stabilisiert [15]. Wie schon erwähnt, lassen sich beide Phasen im Grunde nicht strikt voneinander trennen, sondern laufen parallel ab [16].

1.3 Thrombozyten

Thrombozyten sind diskusförmige, kernlose, zirkulierende Blutzellen, die durch die Abschnürung aus Megakaryozyten im Knochenmark gebildet werden [17]. Sie haben eine Lebensdauer von etwa ein bis zwei Wochen, bevor sie hauptsächlich in der Milz abgebaut werden [15]. Die Konzentration im Blut liegt bei etwa 150-300.000/ μ L [18]. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Adhäsion und Aggregation, um Verletzungen eines Blutgefäßes zu verschließen und so einen möglichen Blutverlust zu minimieren. Um einen geregelten Blutfluss zu gewährleisten, finden diese Prozesse nicht konstitutiv statt, sondern lediglich nach vorheriger Aktivierung. Aktivierte und somit aggregierende Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Thrombusbildung und damit auch in der Entstehung ischämischer Ereignisse, wie AMI oder Schlaganfall [19, 20]. Daher ist die medikamentöse

Primär- und Sekundärprävention der wichtigste Eckpfeiler der Behandlung dieser Akutereignisse [21].

1.3.1 Thrombozytenaktivierung

Die Aktivierung der Thrombozyten ist ein komplexer Prozess, der mit morphologischen und biochemischen Veränderungen einhergeht. Ausgelöst wird dieser Prozess u.a. durch den Kontakt zu subendothelialen Kollagenfasern und Von-Willebrand-Faktor (vWF). Diese aktivieren die Thrombozyten über ihre jeweiligen Rezeptoren. Kollagenfasern binden an das Glykoprotein Ia/IIa, während vWF an das Glykoprotein Ib bindet [14, 15, 18]. Über intrazelluläre Stoffwechselwege kommt es zur Aktivierung von GP IIb/IIIa, welches über Bindung an Fibrinogen an der Vernetzung der Thrombozyten beteiligt ist (s. Abb.1).

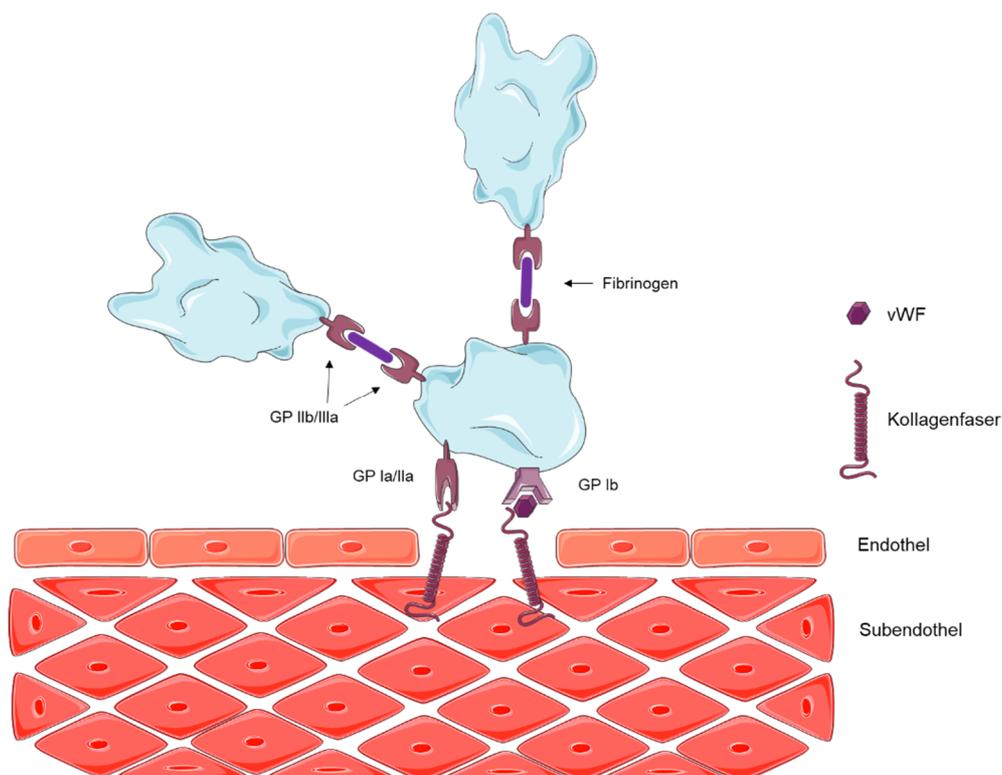


Abb.1: Aggregation aktivierter Thrombozyten an einem Endotheldefekt, adaptiert nach [15]

Nach einem Endotheldefekt treten subendotheliale Kollagenfasern an die Oberfläche. Diese tragen den von-Willebrand Faktor (vWF). Thrombozyten können über das Glykoprotein Ia/IIa (GP Ia/IIa) und das Glykoprotein Ib (GP Ib) an Kollagen und vWF binden. Die daraus resultierende Thrombozytenaktivierung führt letztlich zur Aktivierung von Glykoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). Fibrinogenfasern können an diesen Rezeptor binden, womit die Aggregation der Thrombozyten beginnt.

Eine Aktivierung von Thrombozyten kann jedoch durch eine Vielzahl von Aktivatoren vermittelt werden (s. Abb.2). Zusätzlich werden negativ geladene Phospholipide an die Zelloberfläche verlagert. Diese haben eine hohe Affinität zu den Gerinnungsfaktoren, sodass eine additive Gerinnung des Blutes in diesem Bereich ebenfalls stattfinden kann [14, 22]. Die Aggregation der Thrombozyten wird über die Freisetzung von löslichen Mediatoren aus Granula parakrin verstärkt [23]. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Freisetzung von Thromboxan A2 (TXA2), sowie von Adenosindiphosphat (ADP).

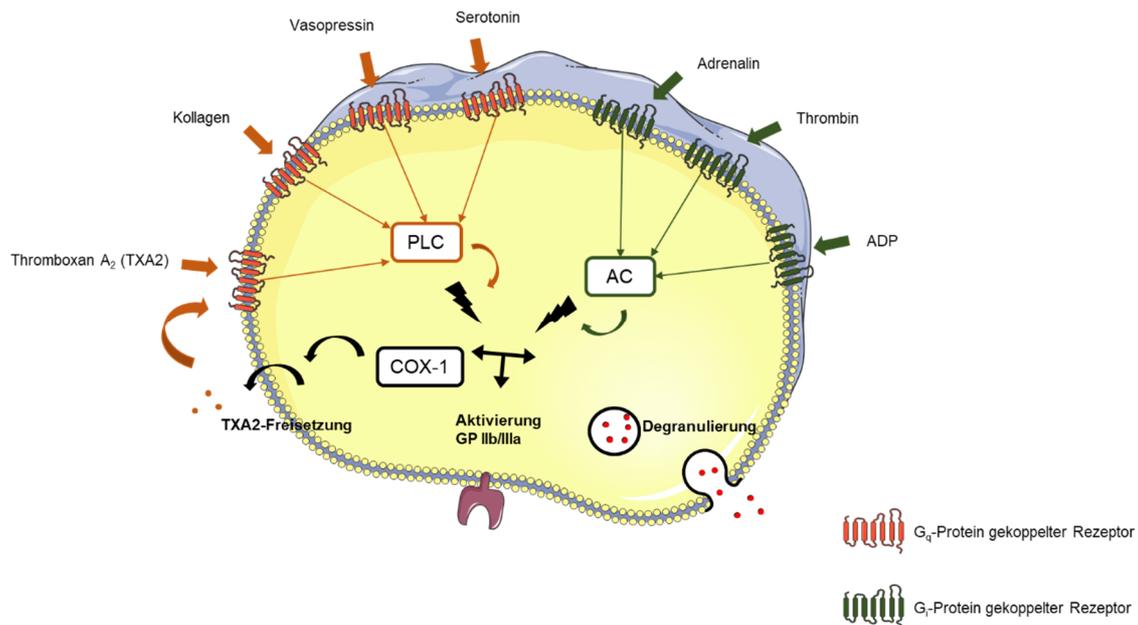


Abb.2: Mechanismus der Thrombozytenaktivierung, adaptiert nach [15]

Die Thrombozytenaktivierung kann über verschiedene Mediatoren und Stoffwechselwege erfolgen. Am Ende des Signalkaskade kommt es zur Freisetzung von auto- und parakrin wirkenden Substanzen, sowie zur Aktivierung des GP IIb/IIIa. Beides trägt zur fortlaufenden und weiteren Aggregation bei.

AC = Adenylatcyclase, COX-1 = Cyclooxygenase-1, PLC = Phospholipase C

1.3.1.1 Alpha-Granula

Thrombozyten beinhalten eine Vielzahl verschiedener Granula, die nach der Thrombozytenaktivierung mit der äußeren Zellmembran verschmelzen und Mediatoren freisetzen. Mehr als die Hälfte aller in Thrombozyten vorhandenen Granula sind *alpha*-Granula [24]. Neuere Sekretomanalysen zeigen, dass die 200-500nm [25] großen Granula über hundert lösliche Proteine und Mediatoren freisetzen können [26, 27]. Kommt es zu einer Thrombozytenaktivierung und dem damit verbundenen Anstieg von Calciumionen im Zytosol, sorgen SNARE-Proteine (SNARE = soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) für die Fusion von Granulamembran und Thrombozytenmembran. Wichtige Vertreter dieser Proteine sind die *vesicle-associated membrane proteins* (VAMP) [28], sowie die *synaptosomal-associated proteins* (SNAP), deren Rolle bei der Freisetzung der *alpha*-Granula gut beschrieben ist [29, 30]. Drei der wichtigsten Mediatoren, die aus *alpha*-Granula freigesetzt werden sind vWF [31], Fibrinogen [32] und p-Selektin [33]. Während vWF und Fibrinogen in die Umgebung freigesetzt werden und dort für eine vermehrte Thrombusformation sorgen, gelangt p-Selektin (auch CD62P) durch das Verschmelzen von Granulamembran und Thrombozytenmembran auf die Zelloberfläche des aktivierten Thrombozyten. Dort spielt es zusammen mit anderen Glykoproteinen durch Thrombozyten-Fibrin und Thrombozyten-Thrombozyten-Bindungen eine wichtige Rolle in der fortlaufenden Thrombozytenaggregation [34]. Die Freisetzung von *alpha*-Granula ist demnach essenziell für eine physiologische Thrombozytenaggregation.

1.3.1.2 **Dense-Granula**

Neben den *alpha*-Granula sind *dense*-Granula von entscheidender Bedeutung in der parakrinen Aktivierung von Thrombozyten. Diese sind deutlich kleiner als *alpha*-Granula [25] und über deren Genese und Funktion ist deutlich weniger bekannt [35]. Wahrscheinlich reguliert die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA die Freisetzung der *dense*-Granula [36]. Innerhalb der *dense*-Granula befinden sich u.a. ADP, Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin und Calciumionen [33]. Da ADP einen starken Aktivator der Thrombozytenaggregation darstellt, führt die Freisetzung zu einer auto- und parakrinen Verstärkung der Aggregation. Die Freisetzung von Calcium ist von entscheidender Bedeutung für die Gerinnungskaskade, in der Calciumionen als Co-Faktoren essenziell sind.

1.3.1.3 **Die Rolle freier zytosolischer Calciumionen in der Thrombozytenaggregation**

In beinahe allen Zellen des menschlichen Körpers spielt Calcium als *second messenger* eine wichtige Rolle in unterschiedlichsten physiologischen Prozessen [37]. Auch in aktivierten Thrombozyten ist die agonisteninduzierte Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration für die Aggregation und Thrombusformation essenziell [38]. Freie Calciumionen werden hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum gespeichert und bei der Aktivierung von Thrombozyten aus diesen Speichern in das Zytosol abgegeben [39]. Dieser Reiz führt u.a. zur Aktivierung der Phospholipase A2, die Arachidonsäure (ARA) aus der Thrombozytenmembran freisetzen kann. Über die Verstoffwechslung durch die Cyclooxygenase-1 (COX-1) und die Thromboxan-Synthase wird TXA2 gebildet. Die Freisetzung von TXA2 ist über die Bindung an seinen entsprechenden Rezeptor ein starker auto- und parakriner Stimulus für die Thrombozytenaggregation [40]. Die Aktivierung des Thromboxan-Rezeptors führt über die Aktivierung der Phospholipase C zur Bildung von Inositol-3-Phosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Während DAG zusätzliche intrazelluläre Stoffwechselwege aktiviert, führt IP₃ zu einer weiteren Freisetzung von Calcium aus seinen Speicherorten [41] und somit zur Forcierung der Thrombozytenaggregation. Darüber hinaus ist die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration entscheidend für die Umorganisation des Aktinzytoskelets (shape change) [42], Degranulierung und die Aktivierung von GPIIb/IIIa [43]. Zusammengefasst ist die Änderung der freien zytosolischen Calciumkonzentration entscheidend für die physiologische Thrombozytenaggregation und Thrombusformation.

1.3.2 Die Cyclooxygenase in der Thrombozytenaggregation

Die Cyclooxygenase kommt im menschlichen Körper in zwei Isoformen vor [44]. Während die COX-2-Expression durch entzündliche Prozesse induziert wird, wird die COX-1 konstitutiv in vielen verschiedenen Körperzellen und Geweben exprimiert [15, 45]. In Thrombozyten nimmt die COX-1 eine zentrale Rolle ein. Die Thrombozytenaggregation beginnt mit der Aktivierung durch externe Stimuli wie Kollagen, ADP oder TXA₂. Die Stimulation führt im Verlauf u.a. zu einer Aktivierung der Phospholipase A₂, die ARA aus der Plasmamembran freisetzen kann. ARA wird in der Folge durch die COX-1 über Prostaglandin G₂ zu Prostaglandin H₂ verstoffwechselt. Die in den Thrombozyten vorkommende Thromboxan-Synthase bildet daraus nun TXA₂ [46], welches eine starker auto- und parakriner Mediator der Thrombozytenaggregation darstellt. Die Wichtigkeit der COX-1 in der Thrombozytenaggregation wird nicht zuletzt durch die jahrzehntelange Anwendung von Acetylsalicylsäure (ASS) als Thrombozytenaggregationshemmer deutlich [47]. Dieser Wirkstoff ist in der Lage die COX-1 durch Acetylierung irreversibel zu hemmen [48] und findet seit Jahrzehnten eine breite Anwendung in der Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse.

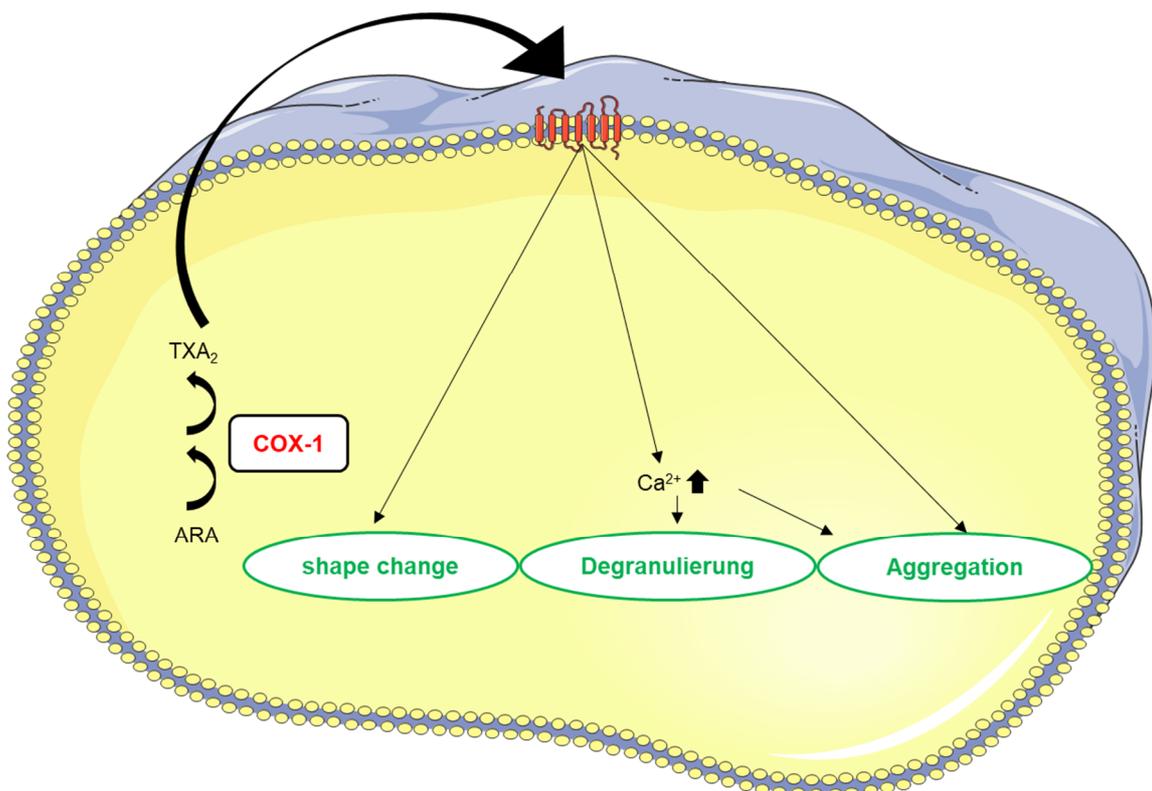


Abb.3: Die zentrale Rolle der Cyclooxygenase-1 in der Thrombozytenaggregation, adaptiert nach [49]

1.4 Lipide und Lipoproteine

1.4.1 Lipide

Unter Lipiden versteht man eine Reihe hydrophober, wasserunlöslicher Stoffe. Diese Stoffe zeichnen sich durch eine geringe Polarität aus, die chemisch gesehen durch lange Kohlenwasserstoffketten entsteht. Im menschlichen Organismus nehmen Lipide essenzielle Rollen in verschiedenen Organen und Stoffwechselwegen ein. Sie dienen als Hauptkomponenten für die Zellmembranen, als Energiespeicher oder als Signalmoleküle. Der gängige Begriff „Fett“ ist als Bezeichnung für diese Stoffgruppe unzureichend. Fette sind lediglich eine Klasse innerhalb der Lipide, jedoch vereint man weitere Stoffklassen unter dem Sammelbegriff der Lipide. Eine mögliche Einteilung kann wie folgt getroffen werden [50, 51]:

1. *Fettsäuren*: Dabei handelt es sich um Carbonsäuren mit langer Kohlenwasserstoffkette. Man unterscheidet gesättigte Fettsäuren ohne Doppelbindungen und ungesättigte Fettsäuren mit Doppelbindungen innerhalb der Kohlenwasserstoffkette. Wichtige Vertreter der ungesättigten Fettsäuren sind Arachidonsäure und Eicosapentaensäure (s.1.5.).
2. *Triglyceride*: Diese sind mit Glycerol veresterte Fettsäuren. Triglyceride sind üblicherweise gemeint, wenn von Fetten gesprochen wird. Sie sind Hauptbestandteil der Lipide unserer Nahrung und dienen als wichtiger Energiespeicher im Körper.
3. *Phospholipide*: Sie bilden die Hauptkomponente der Zellmembranen. Es handelt sich dabei um mit Phosphatidsäure veresterte Fettsäuren. Sie haben eine amphiphile Struktur mit einem polaren und einem lipophilen Ende.
4. *Sphingolipide*: Wie auch Phospholipide gehören Sphingolipide zu den Bestandteilen der Zellmembranen. Auch sie verfügen über einen amphiphilen Charakter. Strukturell handelt es sich dabei um eine Verbindung aus einer Fettsäure und dem Aminoalkohol Sphingosin.
5. *Isoprenoide*: Unter diesem Namen fasst man Verbindungen zusammen, die auf Isopreneinheiten aufbauen. Wichtige Vertreter dieser Substanzklasse sind die Steroide und die Carotinoide.

1.4.2 Lipoproteine

Lipoproteine sind nicht-kovalente Verbindungen aus Lipiden und Proteinen. Sie bilden im menschlichen Organismus Mizellenartige Partikel mit einem hydrophoben Inneren und einer hydrophilen Außenseite. Die physiologische Aufgabe aller Lipoproteine ist der Transport von Lipiden innerhalb des Körpers, wobei die verschiedenen Lipoproteine jeweils unterschiedliche Mengen an Cholesterin und Triglyceriden enthalten. Die Bezeichnung der verschiedenen Lipoproteine erfolgt aus historischen Gründen anhand ihrer Dichte. Eine Einteilung lässt sich allerdings auch aufgrund ihrer Aufgaben im Organismus vornehmen:

1. *Chylomikronen*: Sie werden in der Darmwand gebildet. Ihre Hauptaufgabe besteht darin Triglyceride aus dem Darm über das Blut in Leber-, Fett- oder Muskelzellen zu transportieren [52].
2. *Very low-density Lipoproteine (VLDL)*: Diese Lipoproteine werden in der Leber gebildet und transportieren Triglyceride zu Leber-, Fett- oder Muskelzellen [15].
3. *Intermediate-density Lipoproteine (IDL)*: Hierbei handelt es sich um VLDL-Partikel, die den Großteil der Triglyceride bereits an ein Gewebe abgegeben haben. Sie treten lediglich für eine kurze Zeit auf, ehe sie zu LDL-Partikel werden [15].
4. *Low-density Lipoproteine (LDL)*: Diese Lipoproteine werden in Leberzellen gebildet. Ihre Hauptaufgabe ist der Transport von Cholesterin aus der Leber zu den restlichen Körperzellen.
5. *Lipoprotein a*: Es ähnelt strukturell sehr dem LDL. Es ist ein sehr wichtiger, derzeit nicht beeinflussbarer Risikofaktor für Atherosklerose [15]. Es wirkt prothrombotisch [53].
6. *High-density Lipoprotein (HDL)*: s. 1.6.

1.5 Eicosapentaensäure

1.5.1 Biochemie

Bei der Eicosapentaensäure (EPA) handelt es sich um eine ungesättigte Fettsäure mit einer Kettenlänge von 20 Kohlenstoffatomen. Sie besitzt insgesamt fünf Doppelbindungen an den Positionen 5, 8, 11, 14 und 17 und gehört damit zu den Omega-3-Fettsäuren. EPA kommt in allen Organismen vor, ist aber besonders in fettem Seefisch angereichert [54]. Im menschlichen Körper ist EPA Ausgangsstoff einiger Eicosanoide, die wichtige Funktionen in der Immunabwehr, der Blutgerinnung und der Blutdruckregulation einnehmen [45]. Im März 2021 ist ein Arzneimittel mit Icosapent-Ethyl (IPE), dem Ethylester EPAs, zur „Reduzierung des Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse bei mit Statin behandelten erwachsenen Patient*innen mit hohem kardiovaskulärem Risiko und erhöhten Triglyceridwerten“ zugelassen worden [55]. IPE wird im Körper über verschiedene Wege zum aktiven Metaboliten EPA verstoffwechselt. Dieses führt zu einer signifikanten Reduktion von Triglyceriden (TG) im Plasma. Das Wirkprofil von IPE ist dennoch multifaktoriell und noch nicht vollständig geklärt [55]. Mögliche weitere Effekte sind eine Verbesserung der Makrophagen-Akkumulation, eine Verbesserung der endothelialen Funktion, verbesserte Stabilität der fibrösen Kappen, sowie antioxidative, entzündungshemmende und thrombozytenaggregationshemmende Effekte [55].

1.5.2 Studienlage

In den letzten Jahrzehnten entwickelte sich eine Vielzahl von Studien, die den Einfluss von EPA in verschiedensten Indikationen untersucht haben. Dabei tritt zum einen die Wirkung auf die Psyche und psychische Erkrankungen in den Vordergrund. So soll EPA stimmungsaufhellend sein. Dementsprechend zeigen sich erste positive Studienergebnisse bei Depressionen [56, 57] oder Schizophrenie [58]. Der Einfluss auf die Psyche ist höchstinteressant, allerdings für diese Arbeit weniger relevant. Entscheidend sind hier die beschriebenen antiinflammatorischen [59] und kardioprotektive Wirkungen. Die Kardioprotektion von Omega-3-Fettsäuren, insbesondere von EPA, wird seit Jahren kontrovers diskutiert [60]. Auch in großen randomisierten, kontrollierten Studien zeigte sich kein einheitliches Bild. In der VITAL-Studie konnte bei einer täglichen Dosierung von 1g mariner Omega-3-Fettsäure keine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse bei Männern über 50 Jahren und Frauen über 55 Jahren festgestellt werden [61]. Die Daten aus der ASCEND-Studie zeigen ebenfalls keinen klaren Benefit einer täglichen Einnahme von 4g IPE [62]. Dem gegenüber steht u.a. eine Studie aus dem Jahr 2007, in der die Einnahme von 1,8g EPA täglich zu einem reduzierten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patient*innen mit erhöhten Cholesterolspiegeln führte [63]. Die REDUCE-IT-Studie

konnte mit einer Dosis von 4g IPE täglich, bei Patient*innen mit Statin-Therapie und erhöhten TG-Blutwerten, eine signifikante Reduktion des kardiovaskulären Risikos zeigen [64]. Diese Ergebnisse führten auch zur Aufnahme in die aktuelle Leitlinie der *European Society of Cardiology (ESC)* zur Behandlung von Dyslipidämien [65]. Eine signifikante Reduktion der TGs wurde in der REDUCE-IT-Studie erreicht, allerdings scheint der gefundene Effekt auf die kardiovaskulären Ereignisse zu groß, als dass er allein darauf beruht [66]. Die reine TG-Reduktion mit Fibraten führte beispielsweise nicht zu einem verbesserten kardiovaskulärem Auskommen [67, 68]. Dies lässt den Schluss zu, dass die kardiovaskulären Ereignisse weniger durch die reine TG-Reduktion, sondern vielmehr durch andere, weniger bekannte Effekte reduziert wurden. Eine multifaktorielle Wirkung von EPA/IPE ist in Grundzügen bereits erforscht. Neben antiinflammatorischen [69] und antioxidativen Effekten, sind zahlreiche potenzielle biologische Effekte bekannt [70]. Eine Wirkung auf thrombozytärer Ebene wurde bereits vor über 40 Jahren belegt, ohne allerdings einen Wirkmechanismus zu identifizieren [71]. Die Ergebnisse aus der REDUCE-IT-Studie lassen auch hier diesen Rückschluss zu. So zeigten sich im Trend deutlich mehr Blutungsereignisse in der IPE-behandelten Gruppe [64]. Darüber hinaus handelt es sich bei EPA um strukturellen Analogon zur ARA (s. Abb. 4).

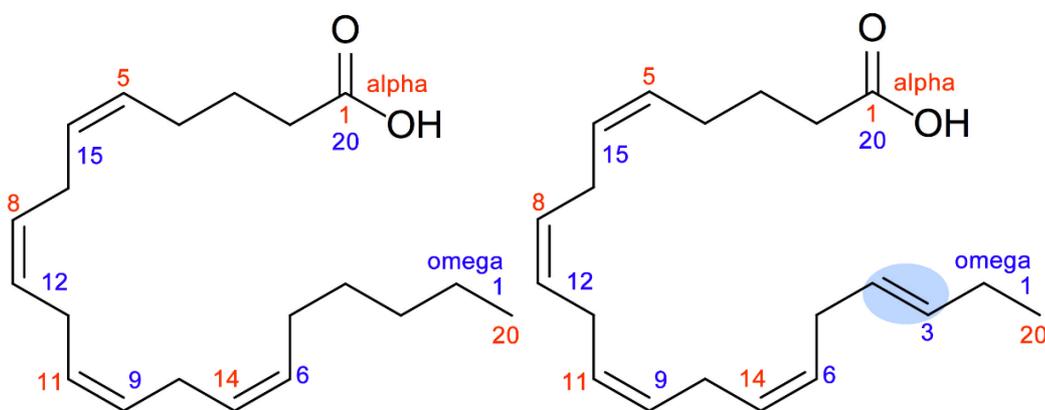


Abb.4: Struktureller Vergleich von Arachidonsäure und Eicosapentaensäure [72]

Links: Arachidonsäure, eine C20-Fettsäure mit 4 Doppelbindungen, Rechts: Eicosapentaensäure, eine C20-Fettsäure mit 5 Doppelbindungen

ARA ist das wichtigste Substrat der COX-1 im Thrombozyten. Die Synthese von TXA₂ aus ARA ist ein entscheidender Schritt in der Aktivierung und Aggregation [73] und darauffolgend in der Bildung der arteriellen Thrombose, die ein kardiovaskuläres Ereignis begründen kann [74]. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit von EPA zur ARA, könnte es hier zu einer direkten Interaktion kommen, die in dieser Arbeit untersucht werden soll. Infolge einer möglichen Verdrängung von ARA können systemische und lokale entzündungshemmende Effekte von EPA auftreten. Auch eine Hemmung der Aggregation könnte so begründet werden. Grund hierfür könnte eine verschobene Stoffwechsellage sein. COX und Lipoxygenase (LOX) bilden aus ARA stark aggregatorischen und

inflammatorischen Zytokine. Bei steigender EPA-Konzentration könnten COX und LOX vermehrt Mediatoren bilden, die maximal schwach aggregatorisch und inflammatorisch sind [75]. Die direkte klinische Bedeutung einzelner Beobachtungen ist jedoch nicht klar [55].

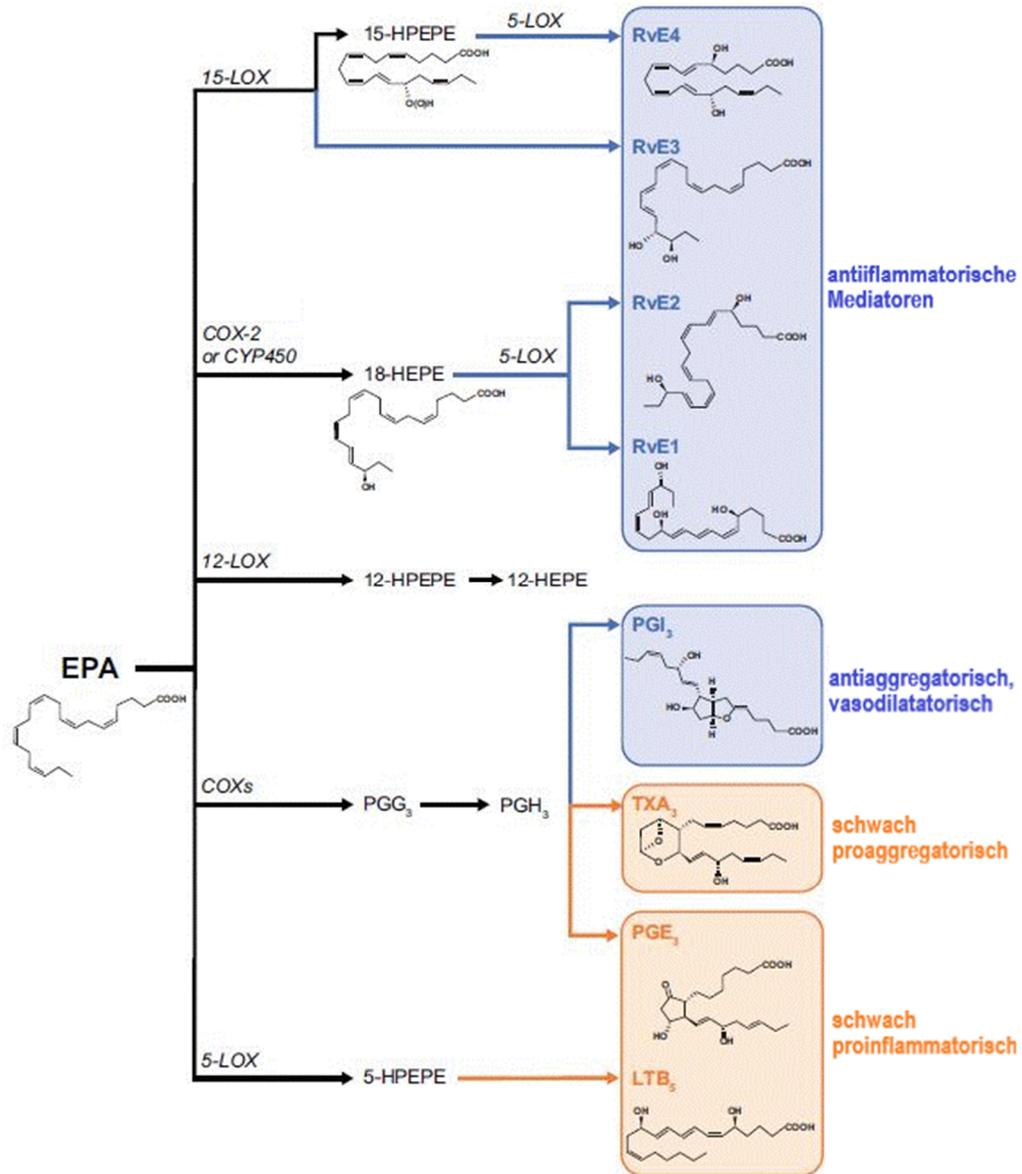


Abb.5: bioaktive Metabolite von EPA, adaptiert nach [75]

EPA wird durch COX und LOX zu antiinflammatorischen Resolvinen und antiaggregatorischen PGI₃ metabolisiert. Die proaggregatorischen und proinflammatorischen Mediatoren, die aus EPA entstehen sind schwach wirksam. COX = Cyclooxygenase; EPA= Eicosapentaensäure; HEPE = Hydroxyeicosapentaensäure; HPEPE = Hydroperoxyeicosapentaensäure; LOX = Lipoxygenase; LT = Leukotrien; PG = Prostaglandin; Rv = Resolvin; TX = Thromboxan

1.6 High-density Lipoprotein (HDL)

1.6.1 Allgemeines

Als HDL bezeichnet man etwa 8 - 13nm große Transportvehikel aus Proteinen und Lipiden mit einer Dichte von 1,063 – 1,210g/mL [65]. Diese bilden nur eine von mehreren Lipoprotein-Klassen, die im menschlichen Körper für den Transport lipophiler Substanzen wie TGs, Fettsäuren und Cholesterol verantwortlich sind. Die Bezeichnung *high-density* (engl. hohe Dichte) hat historische Gründe nach dem Verhalten in der Ultrazentrifugation.

Die Synthese von HDL ist außerordentlich komplex. Das Vorläuferprotein, prä- β -HDL, wird hauptsächlich im Intestinum und in der Leber gebildet. Es ist in der Lage aus Makrophagen in der Gefäßwand Cholesterol aufzunehmen, wodurch reifes HDL entsteht [15]. Innerhalb des HDL-Partikels wird Cholesterol über die Lecithin-Cholesteryl-Acyltransferase (LCAT) verestert. Die entstanden Cholesterolester können dann einerseits über das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) auf das low-density Lipoprotein (LDL) übertragen werden, wodurch Cholesterol für den Aufbau von Zellmembranen zur Verfügung steht. Andererseits kann das HDL über den Scavenger-Rezeptor B1 (SRBI) in die Leber aufgenommen werden, wo es über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden kann. In beiden Fällen spricht man vom reversen Cholesteroltransport [15]. Zusammengefasst nimmt HDL eine zentrale Rolle des Cholesterolstoffwechsels ein, da es für den Rücktransport von Cholesterol in die Leber verantwortlich ist. Dies ist von besonderer Bedeutung, da erhöhte Cholesterolspiegel und somit auch erhöhte LDL-Spiegel (als Hauptträger der Cholesterols) ein erhöhtes atherosklerotisches Plaquerisiko zeigen [76, 77]. Aus diesem Grund war und ist HDL wichtiger Bestandteil der kardiovaskulären Forschung.

1.6.2 Studienlage

Die Studienlage zum Thema HDL in der Kardioprotektion ist mannigfaltig und die Ergebnisse uneinheitlich. In Mausversuchen war HDL in der Lage den kardialen Schaden nach Ischämie/Reperfusion zu reduzieren [78, 79]. Dies lässt sich u.a. in einer direkten Interaktion von HDL auf Thrombozyten begründen [80, 81]. Der pharmakologische Ansatz HDL durch sog. CETP-Inhibitoren im Plasma zu erhöhen und so das kardiovaskuläre Risiko zu senken, scheiterte im humanen Setting allerdings in mehreren großen randomisierten, kontrollierten Studien [82, 83]. Neben dem Versuch HDL direkt zu beeinflussen und damit einen Benefit für die Patient*innen zu erzielen, steht HDL auch als Prädiktor für kardiovaskuläre Erkrankungen im Zentrum des Interesses. Hier zeigt die aktuellen Studienlage ebenfalls kein einheitliches Bild. Während große Metastudien in den letzten Jahren HDL als wichtigen Prädiktor für das kardiovaskuläre Risiko [84, 85] bzw. für den

kardiovaskulären Tod [86] herausarbeiteten, zeigte sich bei neueren Analysen mit mendelscher Randomisierung keine Vorhersagekraft von HDL-Plasmaspiegeln auf die koronare Herzkrankheit [87] oder AMI [88]. Untersuchungen mit Patient*innen, die aufgrund einer Genmutation niedrige HDL-Plasmaspiegel haben, konnten kein erhöhtes Risiko für einen AMI feststellen [89].

Die Heterogenität in den Befunden aktueller Studien lässt die Vermutung zu, dass weniger die Quantität als vielmehr die Qualität des HDL von entscheidender Bedeutung für dessen Wirkung ist [84, 90]. Ein möglicher Grund könnte das Sphingolipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) sein. Dieses ist Bestandteil des HDL [91] und vermittelt eine Reihe der positiven HDL-Funktionen. Bekannte Effekte des HDL-S1P sind beispielsweise eine positive Wirkung auf die Endothelfunktion [92, 93], die Angiogenese [94] und der Schutz von Kardiomyozyten in-vivo gegen Ischämie und Reperfusionsschaden [79]. Es sind bereits Krankheitsbilder bekannt, bei denen ein verringerter S1P-Gehalt im HDL mit der Inzidenz dieser Krankheit korreliert wird. So ist der HDL-S1P-Gehalt in Patient*innen mit koronarer Herzkrankheit niedriger als bei Gesunden [95]. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Patient*innen mit koronarer Atherosklerose. Auch bei diesem Krankheitsbild korreliert der HDL-S1P-Gehalt negativ mit der Schwere der Erkrankung [96]. Die Wirkungen und Wirkmechanismen von HDL sind bis heute erst zum Teil verstanden, aber eine mögliche Dysfunktionalität über einen verminderten S1P-Gehalt scheint aktuell ein vielversprechender Ansatz der Forschung zu sein. In dieser Arbeit soll eine mögliche Dysfunktionalität des HDL diabetischer Patient*innen untersucht werden.

Aufgrund der aktuell herrschenden Unklarheit, ob HDL als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse herangezogen werden kann und aufgrund der möglichen Dysfunktionalität in vielen Krankheitsbildern gibt es in den aktuellen Therapieleitlinien keine spezifischen Ziele für HDL-Plasmaspiegel [65].

1.7 Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

S1P ist ein bioaktives Sphingolipid mit zahlreichen Funktionen im Immun- und kardiovaskulären System [97, 98]. Es wird von Sphingosinkinasen aus Sphingosin durch die Übertragung eines Phosphatrestes in nahezu allen Körperzellen gebildet [99]. Die größte Quelle für das Plasma-S1P bilden die Erythrozyten. Dementsprechend lässt sich ihre Zellzahl positiv mit der Konzentration an S1P im Plasma korrelieren [100]. Neben den Erythrozyten können auch Thrombozyten hohe Konzentrationen von S1P speichern, da ihnen die S1P-abbauende Lyase fehlt [101, 102]. Während der Thrombozytenaktivierung kann S1P über verschiedene Wege freigesetzt werden [103,

104]. Daraufhin vermittelt es besonders kardioprotektiven Effekte, beispielweise durch Inhibition der Apoptose [105].

Der größte Teil des S1P im Blut ist an HDL gebunden [91]. Über diesen „Transporter“ kann es seine Wirkungen über fünf spezifische S1P-Rezeptoren vermitteln [106]. Die pharmakologisch eingesetzten S1P-Analoga, wie Fingolimod, Ozanimod oder Siponimod, finden derzeit noch keine Anwendungen bei kardiovaskulären Erkrankungen. Zugelassen sind diese immunmodulierenden Arzneistoffe allesamt zur Therapie unterschiedlicher Formen der multiplen Sklerose [107-109]. In Tierversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass Fingolimod eine positive Wirkung auf das Remodelling nach AMI besitzt [110]. Insofern wird die Modulation der S1P-Wirkung auch in der Zukunft Gegenstand weitere Forschung sein und es bleibt abzuwarten, ob sich S1P-Analoga wie Fingolimod auch im klinischen Alltag kardiovaskulärer Erkrankungen bewähren können.

1.8 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus, im Volksmund auch „Zuckerkrankheit“ genannt, ist eine Stoffwechselstörung mit chronischer Hyperglykämie. Der Name der Erkrankung lässt sich mit „honigsüßer Durchfluss“ übersetzen und beschreibt ein Hauptsymptom der Erkrankung [111]. Das übermäßige Ausscheiden von Zucker mit dem Urin konnte bereits von Ärzten in der Antike festgestellt werden. Ihren pathologischen Ursprung hat die Erkrankung in einem relativen oder absoluten Insulinmangel. Da Insulin für die Verstoffwechslung von Kohlenhydraten entscheidend ist, verbleibt bei einem Insulinmangel mehr Zucker im Blut. Dieses löst über die Zeit einige Komplikationen aus. Besonders betroffen sind hierbei das Nerven- und das Blutgefäßsystem [15].

Die Erkrankung Diabetes mellitus lässt sich in verschiedene Typen unterteilen. Beim Typ-1 Diabetes zeigt sich ein absoluter Insulinmangel. Meist liegt eine Zerstörung der insulinbildenden Zellen der Bauchspeicheldrüse vor. Eine Insulinsubstitution ist für diese Patient*innen unumgänglich. Mehr als 90% aller Diabetespatient*innen leiden unter einem sog. Typ-2 Diabetes (T2DM). Bei dieser Erkrankung liegt ein relatives Insulindefizit vor. Die Bauchspeicheldrüse kann zwar noch Insulin produzieren, jedoch den Bedarf der Patient*innen nicht mehr decken. Weitere Formen der Erkrankungen sind sehr spezifisch zu definieren. Ein Beispiel ist der Gestationsdiabetes, welcher bei Schwangeren auftreten kann.

Der Diabetes mellitus hat Einfluss auf unzählige Gewebe und Stoffwechselwege im menschlichen Organismus. Diese sind für diese Arbeit zumeist irrelevant. Von besonderer Bedeutung ist hier der Einfluss der Erkrankung auf HDL und S1P. Eine Dysfunktionalität

des HDL diabetischer Patient*innen wurde bereits beschrieben [90]. Diese wird mit einem geringer Gehalt an S1P assoziiert [112]. Diese Beobachtungen konnten bisher lediglich in in-vitro und ex-vivo Untersuchungen bestätigt werden. Eine in-vivo Analyse steht noch aus und ist Bestandteil dieser Arbeit. Zur Charakterisierung der diabetischen Patient*innen steht als Laborparameter der HbA1c-Wert zur Verfügung.

1.8.1 HbA1c-Wert

Der HbA1c-Wert ist der sog. Langzeit-Blutzuckerwert. Dieser ermöglicht einen Rückschluss auf den durchschnittlichen Blutglukosewert der letzten acht Wochen. Es handelt sich dabei um den glykolisierten Anteil des Hämoglobins [113]. Da kurzfristige Blutzuckerspitzen keinen relevanten Einfluss auf diesen Wert haben, eignet er sich, um den Status der diabetischen Erkrankung sicher ermitteln zu können. Er dient somit als Kontrollparameter für eine diabetische Behandlung. Der HbA1c-Wert wird zumeist in Prozent angegeben und liegt bei gesunden Personen bei etwa 4-6%.

1.9 Fragestellung und Hypothese

Die vorgestellten Daten zeigen ein sehr heterogenes, aber auch vielversprechendes Bild für die Wirkung von Lipiden und Lipoproteinen in der Kardioprotektion. In der letzten Dekade ist der Fokus auf die Fettsäure EPA gerückt und zum ersten Mal konnte ein positiver Effekt in einer großen, randomisierten, kontrollierten Studie aufgezeigt werden. Kleinere Studien konnten im Mausmodell des AMI bereits einen positiven Effekt von EPA auf das Überleben und das Auftreten einer Herzinsuffizienz zeigen [69]. Obwohl es eine Vielzahl von Hinweisen und Theorien gibt, wie EPA seinen positiven Effekte vermittelt, ist es bislang gänzlich unklar, ob EPA mit Thrombozyten interagiert. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur ARA, die über die COX-1 eine zentrale Rolle in der Thrombozytenaktivierung und Aggregation spielt, liegt hier einer Interaktion nahe. In der vorliegenden Arbeit werden daher der Einfluss auf die Thrombozyten und die Signalwege über die EPA seinen Einfluss vermittelt in verschiedenen Modellen untersucht. Es ergibt sich daraus folgende Hypothese:

Eicosapentaensäure reduziert die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaktivierung und die arterielle Thrombose über eine direkte, kompetitive Interaktion um die Cyclooxygenase-1

Weiterhin soll mit HDL auch ein Lipoprotein untersucht werden. Im Fokus steht hier der Einfluss einer möglichen Dysfunktionalität von HDL diabetischer Patient*innen auf die Kardioprotektion und das kardiale Remodelling postischämisch. Dieses soll mittels murinen Ischämie/Reperfusionversuchen und entsprechenden Analysen des HDL determiniert werden. Für diesen zweiten Versuchsteil ergibt sich folgende Hypothese:

*Das HDL diabetischer Patient*innen ist dysfunktional und schützt das murine Herz im Vergleich zum HDL gesunder Proband*innen nicht mehr. Seine Dysfunktionalität begründet sich in der Erkrankung selbst und lässt sich mit der Schwere der Erkrankung sowie mit HDL-S1P-Spiegeln korrelieren.*

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Proband*innen für in-vivo Untersuchungen

Insgesamt wurden 25 gesunde Proband*innen in diese Untersuchung eingeschlossen. Die Proband*innen erhielten eine zehntägige IPE-Supplementation (Vascepa, Amarin) in der Dosierung 2 x 2g täglich. Diese Dosierung wurde auf Basis der REDUCE-IT Studie [64] so gewählt. Ausschlusskriterien waren antithrombotische Medikation, hämatologische Erkrankungen, maligne Neoplasien, eingeschränkte Nierenfunktion oder ein Alter unter 18 Jahren. Alle Proband*innen gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Eine Blutentnahme wurde vor der ersten Einnahme, sowie an Tag 5 und Tag 10 nach Beginn der Supplementation durchgeführt. Anschließend wurde das Blut folgenden Untersuchungsmethoden zugeführt: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA), Multiplate Impedance Analyse (MIA), Durchflusszytometrie (FACS), Adenosintriphosphat (ATP)-Freisetzungssassay und Flusskammerexperimenten. Des Weiteren wurde der Thromboxan B2 (TXB2) -Gehalt im Blut mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt. Analysen der Lipidkomposition der Thrombozytenmembran sowie des Thrombozytenproteoms wurden vor der ersten Einnahme und an Tag 10 nach Beginn der Supplementation ebenfalls durchgeführt.

Die Studie entspricht der Deklaration von Helsinki und wurde von der Universität Düsseldorf genehmigt.

2.1.2 Blutabnahme

Das Proband*innenblut wurde durch eine periphervenöse Blutentnahme mittels 21G Blutentnahmeset (BD Vacutainer® Safety Lok) in 2,7mL Citratvacuvetten (BC Vacutainer®) entnommen. Das Verhältnis von Vollblut und antikoagulierender Citratlösung entsprach dabei einem Verhältnis von 1:10. Das Blut wurde innerhalb der nächsten 20 Minuten den jeweiligen Versuchen zugeführt.

2.1.3 Lichttransmissionsaggregometrie (LTA)

Die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) ist eine zuverlässige Methode zur Evaluation der Thrombozytenfunktion [114]. Durch Lichttransmissionsmessung wird im Zeitverlauf die Aggregation der Thrombozyten verfolgt und graphisch dargestellt (s. Abb.6). In dieser Arbeit wurde als *read-out* die maximale Aggregation (*maximum of aggregation*, MoA) verwendet.

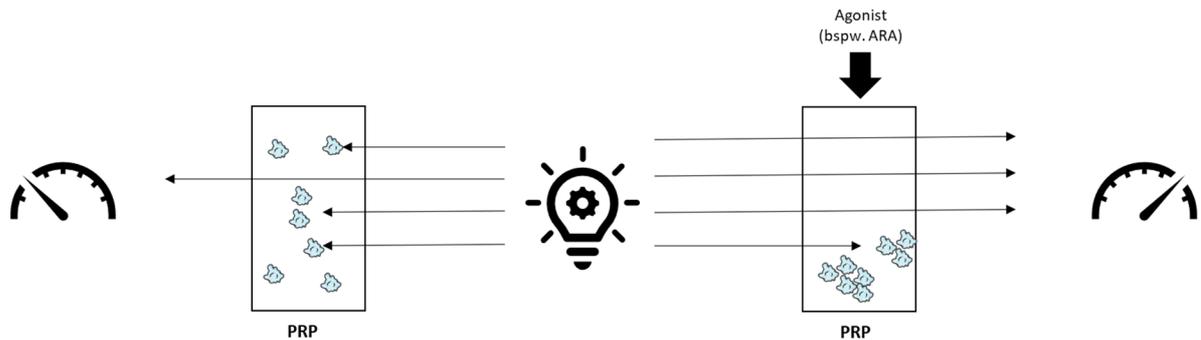


Abb.6: Prinzip der LTA

Bei diesem Versuch wird die Lichttransmission durch eine Messkuvette ermittelt. Bei plättchenreichem Plasma (PRP) sind die Thrombozyten im Plasma verteilt und verhindert, dass Licht durch die Kuvette scheint. Dementsprechend wird nur wenig Lichttransmission aufgezeichnet (links). Bei Zugabe eines entsprechenden Agonisten aggregieren die Thrombozyten im PRP. Sie bilden Aggregate und das Licht kann leichter durch die Messkuvette scheinen. Der Detektor misst nun eine höhere Lichttransmission (rechts).

Citrat-antikoaguliertes Vollblut wurde für zehn Minuten bei 270g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, um PRP zu generieren. Ein Teil des PRP wurde direkt im Anschluss ein weiteres Mal bei 1800g für fünf Minuten bei RT zentrifugiert um plättchenarmes Plasma (PAP) zur erhalten. Das PAP wird als Hintergrundmessung und zur Kalibrierung des Aggregometers (APACT 4004, LABiTec®) benötigt.

Bei in-vitro Untersuchungen wurde das PRP mit verschiedenen EPA-Konzentrationen (250µM, 500µM, 1000µM, Sigma Aldrich) für sechs Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Induktion der Aggregation durch Arachidonsäure (ARA, 0,5mM in 50nM Tris-HCL, Oxford Biomedical Research), Adenosindiphosphat (ADP, 5µM, Sigma Aldrich), Kollagen (2µg/mL, Nycomed) oder homogenisiertes humanes atherosklerotisches Plaquematerial. Das homogenisierte Plaquematerial wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Petzold (Medizinische Klinik und Poliklinik I, Klinikum der Universität München, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung des Materials erfolgte wie zuvor schon beschrieben [115]. In einigen Versuchsteile wurde nacheinander mit Acetylsalicylsäure (ASS, Sigma Aldrich, 30µM für sechs Minuten) und EPA (1mM) inkubiert. EPA wurde in Ethanol gelöst und verdünnt. Die entsprechenden Vergleichs- und Kontrolluntersuchungen wurden mit einem identischen Volumen Ethanol durchgeführt.

Bei in-vivo Untersuchungen wurde das identische Protokoll verwendet. Da die Einnahme von IPE/EPA bereits oral erfolgte, ist eine Inkubation mit EPA vor der Aggregation nicht notwendig und entfiel entsprechend.

2.1.4 Multitplate Impedance Analyse (MIA)

Bei der Multitplate Impedance Analyse (MIA) handelt es sich um ein Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion direkt im antikoagulierten Vollblut. Eine weitere Aufreinigung bzw. Aufarbeitung der Blutprobe ist nicht notwendig [116]. Im Vergleich zur LTA kann bei dieser Analysenmethode die Thrombozytenfunktion direkt im physiologischen Umfeld untersucht werden.

Für die impedanzaggregometrischen Untersuchungen mittels Multiplate Analyzer® (Roche) wurden 300µL citrat-antikoaguliertes Blut mit 300µL isotonischer Kochsalzlösung vermischt. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgte mit 20µL vorgefertigten Testlösungen für ARA (1mM, ASPItest®, Roche), ADP (6,4µM, ADPtest®, Roche) und Kollagen (3,2µg/mL, COLtest®, Roche) oder mit homogenisiertem humanem atherosklerotischem Plaquematerial. Die Ergebnisse sind angegeben als Fläche unter der Kurve (*area under curve*, AUC), wobei die Messdauer drei Minuten betrug.

2.1.5 Thrombozytenadhäsion in einer Flusskammer

Die Thrombozytenadhäsion wurde in einer mit kollagen- oder humanem Plaquematerial beschichteten Flusskammer (low-shear, Fluxion Bioscience) untersucht. Dazu wurde einer 48-well Platte mit Kollagen (10µg/mL) oder homogenisiertem humanem Plaquematerial bei 2dyn/cm² für eine Stunde beschichtet. Als Pumpensystem wurde das BioFlux™ 200 (Fluxion Bioscience) verwendet. Im Anschluss an die einstündige Inkubationszeit wurden die Kapillaren der Kammer mit PBS für zehn Minuten bei 5dyn/cm² gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, erfolgte daraufhin das 15-minütige Spülen mit 0,5%-iger Lösung aus bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma Aldrich) in PBS.

Das citrat-antikoagulierte Blut wurde mit Calcein AM (4µM, Thermo Fisher Scientific) im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss an die 30-minütige Inkubationszeit wurde das Blut unter arteriellen Flussbedingungen von 10dyn/cm² für zehn Minuten durch die Flusskammer perfundiert. Nachdem das in den Kapillaren verbliebene Blut für zwei Minuten bei 2dyn/cm² mit PBS ausgespült wurde, konnten mittels Fluoreszenzmikroskops (Nikon Eclipse TE 2000-U) und hochauflösender Kamera (Nikon DS-qi2) Bilder der Kapillaren angefertigt werden. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Herstellsoftware BioFlux Montage™. Als Ergebnis erhält man die „*platelet-covered area*“, also die Thrombozytenadhäsion in Prozent. Falls nötig, wurden die Proben mit verschiedenen EPA-Konzentrationen (250µM, 500µM, 1000µM) für sechs Minuten bei 37°C direkt vor der Perfusion durch die Flusskammer inkubiert. Sofern eine sechsminütige Präinkubation mit ASS (30µM) nötig war, wurde diese vor der EPA-Inkubation durchgeführt. EPA wurde in Ethanol gelöst und

verdünnt. Die entsprechenden Vergleichs- und Kontrolluntersuchungen wurden mit einem identischen Volumen Ethanol durchgeführt.

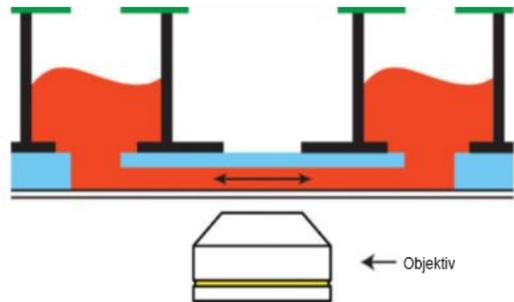


Abb.7: Schematische Aufbau einer BioFlux-Messung [117]

2.1.6 Adenosintriphosphat-Freisetzungssassay (ATP-release)

Dieser Versuch analysiert die Freisetzung von ATP aus Thrombozyten. Dies stellt wiederum ein etabliertes Mittel dar, die Freisetzung von *dense*-Granula zu beurteilen [118]. Die chemische Grundlage dieses Versuches ist ein Luciferase-Assay (s. Abb.8). Bei diesem Assay wird ATP zusammen mit Luciferin durch die Luciferase umgesetzt. Das entstandene Adenyl-luciferin zerfällt nun zu Adenosinmonophosphat, Sauerstoff und Oxyluciferin. Dabei wird Licht emittiert. Die Intensität der Lichtemission ist proportional zur Konzentration des ATP.

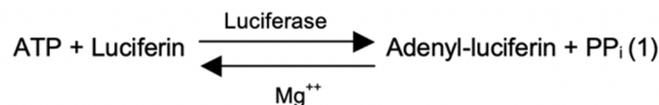


Abb. 8: Reaktionsgleichung des verwendeten Luciferase-Assays

Das citrat-antikoagulierte Blut wurde für zehn Minuten bei 200g und RT zentrifugiert, um PRP zu erhalten. Zu dem PRP wurde Prostaglandin E1 (PGE1, Cayman Chemicals, gelöst in PBS) auf eine Konzentration von 50nM hinzugefügt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von ACD-Lösung in einem Volumen von 12,5% des PRP-Volumens. Die Proben wurden nach einer fünfminütigen Ruhezeit bei 1000g für zehn Minuten zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte erneut bei RT. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit CGS Puffer gewaschen. Dabei wurde das Pellet resuspendiert und erneut bei RT und 1000g für zehn Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde erneut der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wird nun mit Tyrodes Puffer resuspendiert. Das Volumen des Puffers muss dem Ursprungsvolumen des PRP entsprechen.

100µL der Thrombozytensuspension wurden nun in ein Well einer transparenten 96-well-Platte mit U-Boden (Greiner) überführt. Daraufhin wurde EPA in einer definierten

Konzentration (250 μ M, 500 μ M, 1000 μ M) zu den Thrombozyten gegeben und bei 37°C für sechs Minuten inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von 1mM ARA, worauf eine weitere sechsminütige Inkubation bei 37°C folgte. Zuletzt wurde die auf 37°C erwärmte Lösung des ATP Assay Mix (Sigma Aldrich) hinzugefügt und unmittelbar im Fluostar Omega (BMG Labtech) bei folgenden Einstellungen gemessen: Emissionslinse, 150 Messintervalle je 1 Sekunde, Gain 3600, Target value 40%.

Eine Standardreihe wurde mit dem ATP-Standard (Sigma Aldrich) entsprechend der Herstelleranweisungen gemessen und diente als Berechnungsgrundlage. EPA wurde in Ethanol gelöst und verdünnt. Die entsprechenden Vergleichs- und Kontrolluntersuchungen wurden mit einem identischen Volumen Ethanol durchgeführt.

ACD-Lösung: Natriumcitrat 3,4mg/mL (Sigma Aldrich)
Zitronensäure 1,3mg/mL (Sigma Aldrich)
Glukose 20,0mg/mL (Sigma Aldrich)
Wasser, mit Natriumhydroxid (Sigma Aldrich) auf pH 4,6 eingestellt

CGS Puffer: Zitronensäure 1,7mM (Sigma Aldrich)
Natriumcitrat 18,3mM (Sigma Aldrich)
Glukose 10mM (Sigma Aldrich)
Natriumchlorid 120mM (Sigma Aldrich)
Prostaglandin E1 50nM (Cayman Chemicals)
Wasser

Tyrodes Puffer: Natriumchlorid 137mM (Sigma Aldrich)
Kaliumchlorid 2,9mM (Sigma Aldrich)
Dinatriumhydrogenphosphat 0,34mM (Sigma Aldrich)
Natriumhydrogencarbonat 12mM (Sigma Aldrich)
HEPES 5mM (Sigma Aldrich)
Glukose 5mM (Sigma Aldrich)
Magnesiumchlorid 1mM (Sigma Aldrich)
Calciumchlorid 1mM (Sigma Aldrich)

2.1.7 Thromboxan B2-Messung mittels ELISA

Die Messung von Thromboxan B2 (TXB2) ist stellvertretend für TXA2. TXB2 selbst ist ein inaktives Produkt aus TXA2, welches im Gegensatz zu TXA2 nicht an der Aktivierung der Thrombozyten beteiligt ist. TXA2 ist allerdings nur wenige Sekunden stabil [44, 119] und steht deshalb für eine Messung im wässrigen Milieu nicht zur Verfügung.

Die citrat-antikoagulierten Blutproben wurden wie bei der LTA-Messung vorbereitet und mit den verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen inkubiert. Der prinzipielle Versuchsaufbau gleicht dem der LTA-Versuche (s. 2.1.3). Nach der Inkubation wurde das PRP für fünf Minuten bei RT und 13200g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und unmittelbar im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bis zur Messung wurden die Proben bei -80°C gelagert. Zur Messung von TXB2 wurde ein fertiges Elisa Kit (Cayman Chemicals, Nr. 501020) verwendet. Die Probenbearbeitung und Analyse erfolgte entsprechend der Herstellerhinweise. Die mit TXB2-Antikörper beschichteten Platte wird mit den Proben inkubiert. Dabei bindet das TXB2 an seinen entsprechenden Antikörper und verbleibt so auf der Platte. Über eine Fluoreszenzreaktion kann nun die Konzentration an gebundenen TXB2 ermittelt werden.

2.1.8 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse einzelner Zellpopulationen innerhalb einer Probe. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen besteht die Möglichkeit innerhalb einer Probe verschiedenste Zellen zu markieren, im Anschluss zu sortieren und zu analysieren. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind an spezifische Antikörper gekoppelt, die wiederum an spezifische Oberflächenstrukturen von Zellen binden können.

2.1.8.1 p-Selektin Detektion als Maß für die *alpha*-Granula Sekretion [120]

In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde citrat-antikoaguliertes Blut bei RT für zehn Minuten bei 300g zentrifugiert um PRP zu erhalten. Im Anschluss wurden 100µL des PRPs für sechs Minuten bei 37°C inkubiert. Bei in-vitro Untersuchungen erfolgte die Inkubation zusammen mit verschiedenen Konzentrationen von EPA (250µM, 500µM, 1000µM, EPA, Sigma Aldrich). Im Anschluss daran wurde die PRP-Probe mittels ARA (1mM, Oxford Biomedical Research), ADP (5µM, Sigma Aldrich) oder Kollagen (2µg/mL, Nycomed) für weitere sechs Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die zweite sechsminütige Inkubation erfolgte die Zugabe der Antikörper. Dazu wurden die Antikörper (CD42b-PE-Cy7, Invitrogen; CD62P-BV421, BD) entsprechend der Herstelleranweisungen verdünnt und zur PRP-Probe hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten bei

37°C wurde die Antikörper-PRP-Probe im Verhältnis 1:100 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Sigma Aldrich) verdünnt und mittels FACSVerse™(BD) gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte im Anschluss mit der Software Flow-Jo™ (BD). EPA wurde in Ethanol gelöst und verdünnt. Die entsprechenden Vergleichs- und Kontrolluntersuchungen wurden mit einem identischen Volumen Ethanol durchgeführt.

2.1.8.2 Intrazelluläres Thrombozyten Calcium Signalling

Intrazelluläre Calciumionen werden mittels Durchflusszytometrie nach einer neuartigen Methoden analysiert, die erstmal 2015 vorgestellt wurde [121].

Citrat-antikoaguliertes Blut wurde bei 270g für zehn Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert, um PRP zu erhalten. Ein Aliquot von 300µL PRP wurde im Anschluss mit Fura Red-AM (6,12µM, Invitrogen) und Flou-4-AM (3,2µM, Invitrogen) inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 37°C für 15 Minuten unter ständigem Schütteln. Zehn Mikroliter der Probe wurden nun mit 490µL calciumfreien Kalibrierungspuffer (Invitrogen) oder 490µL Kalibrierungspuffer mit 10mM Calcium-EGTA (Invitrogen) versetzt. Dies diente als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Die zu untersuchende Probe wurde mit 490µl HEPES-Tyrode-Thrombozytenpuffer versetzt, der entweder ASS (30µM) oder EPA in verschiedenen Konzentrationen (250µM, 500µM, 1000µM) oder EPA (1000µM) und ASS (30µM) enthielt. Allen Proben wurde Ionomycin (3µg/mL, Sigma Aldrich), Nigericin (2µg/mL, Sigma Aldrich) und Carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazon (CCCP, 10µM, Sigma Aldrich) hinzugefügt. EPA wurde in Ethanol gelöst und verdünnt. Die entsprechenden Vergleichs- und Kontrolluntersuchungen wurden mit einem identischen Volumen Ethanol durchgeführt.

Im Anschluss wurden die Proben für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Proben in ein FACS-Röhrchen überführt. Mittels FACSVerse™ wurde die Fluoreszenzintensität der Positiv- und Negativkontrolle aufgenommen. Im Anschluss erfolgt die Messung der zu untersuchenden Proben, indem die Baseline Calciumlevel für 80 Sekunden aufgezeichnet wurden. Danach erfolgte die Zugabe von ARA (0,5mM, Oxford Biomedical Research) und die Veränderungen der Calciumkonzentrationen wurden für zwei Minuten aufgezeichnet. Eine Analyse der Daten erfolgte durch meine Kollegin Samantha Ahlbrecht mit der Software FlowJo™ (BD) nach der Methode von A. Assinger et al [121].

HEPES-Tyrode-Thrombozytenpuffer (pH 7,4):

Natriumchlorid 140mM	(Sigma Aldrich)
Kaliumchlorid 3mM	(Sigma Aldrich)
Natriumhydrogencarbonat 16,6mM	(Sigma Aldrich)
HEPES 10mM	(Sigma Aldrich)
Glukose 5,5 mM	(Sigma Aldrich)
Humanes Serumalbumin 0,5%	(Sigma Aldrich)

2.1.8.3 Differenzierung von CD45.1- und CD45.2-positiven Zellen

Die Untersuchung diente der Erfolgskontrolle bei der murinen Chimärenbildung (s. 2.1.10). Untersucht wurde das Verhältnis von CD45.1- und CD45.2-positiven Leukozyten. Diese Analyse ist weit verbreitet und ein Verhältnis von ca. 80% auf Seiten der Spenderzellen gilt als Erfolg [122, 123]. Die CD45.2 Zellen stammen aus dem injizierten Knochenmark des Spendertieres, während die CD45.1 Zellen aus dem Empfängertier stammen.

Für diese Analyse wurde den Versuchstieren jeweils am Versuchsende heparin-antikoaguliertes Blut entnommen. Es wurde bei RT mit 1000g für zehn Minuten zentrifugiert und im Anschluss das Plasma verworfen. Die verbliebenen Zellen wurde in fünf Milliliter Erylysepuffer (Apotheke der Universitätsklinik Düsseldorf, isotonische Ammoniumchloridlösung) gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden zehn Milliliter PBS ergänzt und vorsichtig durchmischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 350g für fünf Minuten. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet in PBS suspendiert. Das Volumen des PBS entsprach dabei dem ursprünglichen Blutvolumen der Probe. 100µL der Suspension wurden erneut zentrifugiert (350g, 5 Minuten, RT) und der Überstand erneut verworfen. Das entstandene Zellpellet wurden nun in 49µL PBS, 0,5µL CD45.1-Antikörper (APC-CD45.1, BioLegend) und 0,5µL CD45.2-Antikörper (FITC-CD45.2, BioLegend) resuspendiert und im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach der zwanzigminütigen Inkubationszeit wurden 100µL PBS zur Probe hinzugegeben und es wurde erneut bei 350g für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 200µL PBS suspendiert und mittels FACSVerse™(BD) gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte im Anschluss mit der Software Flow-Jo™ (BD).

2.1.9 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) unter den Aktenzeichen 81-02.04.2018.A143 und 81-02.04.2020.A319 genehmigt.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich männliche C57BL6/J-Mäuse verwendet, die über Janvier Labs (53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen wurden. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 11-13 Wochen alt und wogen 20-30g. Die Haltung und Pflege der Versuchstiere erfolgte durch das Fachpersonal und in den Räumlichkeiten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle Tiere wurden entsprechend der Empfehlungen und Vorgaben der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (Felasa) in einem zirkadianen 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus bei einer Raumtemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Trinkwasser und Futter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Versuchstiere, die zur Bildung von Chimären verwendet wurden, waren CD45.1-C57BL6/J-Mäuse. Diese unterscheiden sich im Vergleich zu den sonst verwendeten Mäusen lediglich im Subtyp des CD45-Antigens. Das macht eine spätere Erfolgskontrolle möglich. Diese Tiere wurden ebenfalls über Janvier Labs bezogen.

Sofern eine Behandlung der Tiere erfolgte, sah diese wie folgt aus:

IPE (TCI Chemicals) 2mg/g Körpergewicht alle 2 Tage für 2 Wochen per oraler Gavage

Kontrollbehandlung isotonische Kochsalzlösung

ASS (Sigma Aldrich) 12,5mg/g Körpergewicht 30 Minuten vor Thrombusinduktion

Kontrollbehandlung isotonische Kochsalzlösung:

HDL (Extraktion AG Levkau) 43µg/g Körpergewicht 30 Minuten vor Ischämie (i.v.)

Kontrollbehandlung 0,5% BSA-Lösung in isotonischer Kochsalzlösung

2.1.10 Bestrahlung und Bildung von COX-1-defizienten Chimären

Die Bildung von COX-1-defizienten Chimären erfolgt mittels Knochenmarkstransplantation. Die Versuchstiere wurden an einem Tag zwei Ganzkörper-Bestrahlungen im Abstand von fünf Stunden (2x6,5Gy) zugeführt (Gulmay RS225, 0,2 Cu, 175kV, 15mA), um alle Knochenmarkszellen zu zerstören. Direkt im Anschluss an die zweite Bestrahlung wurde den Tieren das aufgereinigte Knochenmark (Gesamtvolumen 150 µl) von megakaryozytären und endothelialen COX-1-defizienten Mäusen (B6;129S4-

Ptgs1tm1.1Hahe/J;B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J) in die laterale Schwanzvene injiziert. Das Knochenmark wurde freundlicherweise von Prof. Jane Mitchell (Cardiothoracic Pharmacology, National Heart & Lung Institute, Imperial College London, London, UK) zur Verfügung gestellt. Kontrolltiere erhielten das Knochenmark der Wildtyp-Wurfgeschwister.

Um die Tiere vor Infektionen zu schützen, wurde das Trinkwasser der Tiere in den ersten drei Wochen nach der Transplantation mit dem Antibiotikum Enrofloxacin (10mg/L, Sigma Aldrich) versetzt. Das Trinkwasser-Antibiotikum-Lösung wurde alle drei Tage frisch angesetzt und den Tieren in lichtundurchlässigen Flaschen zur Verfügung gestellt. Im Anschluss an die dreiwöchige Antibiotikagabe wurde den Tieren eine weitere Regenerationszeit von drei Wochen gewährt, bevor sie in den Versuch starten. Der Erfolg der Transplantation wurde nach Versuchsende mittels FACS-Analyse der Thrombozyten nachgewiesen (s.2.1.8).

2.1.11 In-vivo Thrombusformation (intravital Mikroskopie)

Die Versuchstiere erhielten präemptiv die Narkose aus Ketamin (Ketanest® 100mg/kg, i.p.) und Xylazin (Rompun® 10mg/kg, i.p.). Zusätzlich wurde ihnen ein thrombozytenspezifischer Antikörper (0,1µg/g, GPIIb-DyLight 488, X488, Emfret) intravenös appliziert. Das ermöglichte die spätere Visualisierung der Thrombozyten während der Thrombusformation. Vor Beginn des Eingriffes wurde die Maus im Halsbereich mit Enthaarungscreme (Veet, Reckitt Benckiser) enthaart. Die Temperatur der Maus wurde permanent mittels Rektalsonde (Testo 108, Testo AG) kontrolliert und sollte im Bereich von 37-38°C liegen.

Bei fehlendem Zwischenzehenreflex wurde die Arteria carotis rechtsseitig freipräpariert, um daraufhin einen Gefäßthrombus zu induzieren. Dazu wurde ein mit Eisen(III)chlorid (10% in PBS) getränktes Filterpapier auf das freipräparierte Gefäß gelegt und für drei Minuten dort belassen. Die Bildung der arteriellen Thrombusformation wurde im Anschluss unter einem Fluoreszenzmikroskop (LeicaDM6FS) für 60 Minuten beobachtet und aufgenommen. Die anschließende Analyse der Daten erfolgte mit der Software LasX (Leica).

2.1.12 Ischämie/Reperfusions-Versuch (I/R) zur Induktion eines akuten Myokardinfarktes

Bei diesem Versuch handelt es sich um einen operativen Eingriff zur Induktion AMI bei der Maus. Hierfür erfolgte eine halbe Stunde präemptiv eine Analgesie des Versuchstieres mit Buprenorphin (0,1mg/kg s.c., Temgesic®, Indivior Europe Ltd.). Nach der 30-minütigen Einwirkzeit erfolgte die Einleitung der Narkose des Versuchstieres. Hierfür wurde es in einer durchsichtigen Inhalationskammer gesetzt und mit 3% Isofluran (Piramal) in Raumluft narkotisiert. Ein fehlender Zwischenzehenreflex zeigte die vollständige Anästhesie an, sodass die Maus mit einer rosa Venenverweilkanüle (Vasofix Safety Kanüle 20 G 1,1x25 mm, B.Braun) intubiert werden konnte. Die Narkose des intubierten Tieres erfolgte kontinuierlich über einen speziellen murinen Respirator (MiniVent Type 845, Hugo Sachs) mit 2% Isofluran in mit 40% Sauerstoff angereicherter Raumluft. Um ein Auskühlen des Tieres zu verhindern, wurde die Maus für den Eingriff auf einen beheizten OP-Tisch (heated small animal op-table, 50-1247, Hugo Sachs) verbracht und die Temperatur mittels Rektalsonde dauerhaft kontrolliert. Des Weiteren wurde ein Oberflächen EKG (Powerlab 8/35, Software: LabChart, ADInstruments) zur Kontrolle des OP-Erfolgs abgeleitet. Zusätzlich wurde auf die Augen eine Dexpanthenol-haltige Augensalbe (Bepanthen Augensalbe, Bayer AG) aufgetragen, um ein Austrocknen zu verhindern. Da alle Versuchstiere bereits vor diesem Eingriff eine echokardiographische Untersuchung durchliefen (s. 2.1.13), war der Thorax bereits enthaart, sodass eine weitere Enthaarung nicht mehr notwendig war.

Nach Abschluss aller Vorbereitungen wurde der Thorax zwischen der dritten und vierten Rippe eröffnet und das Herz freipräpariert. Der linke Koronararterie (*left anterior descending artery*, LAD) wurde unterstochen und mit einem 7-0 Prolene-Faden (Ethicon) angeschlungen. Die beiden Enden des Fadens wurden durch einen dünnen Kunststoffschlauch gezogen, sodass der Kunststoffschlauch den Blutfluss durch die Arterie stoppte und eine Ischämie auslöste (s. Abb.9).

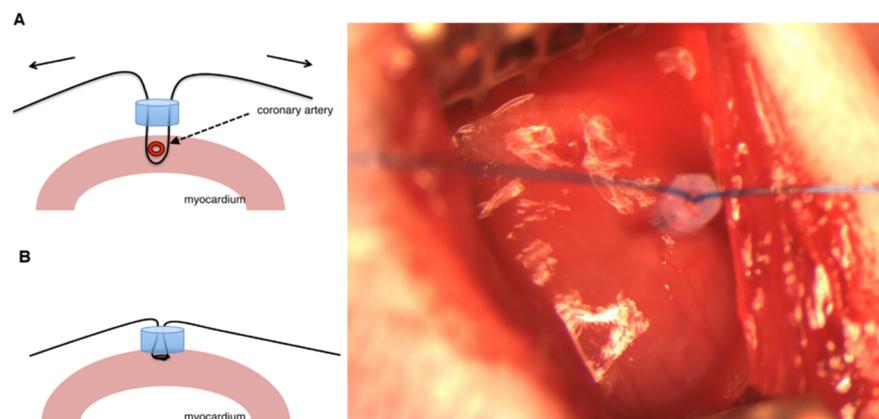


Abb.9: Darstellung der Ischämieinduktion, links: Schematisch [124], rechts: reale Darstellung

Nach 30-minütiger Ligation der LAD folgte die Reperfusionphase. Der Kunststoffschlauch wurde entfernt und die Enden des Fadens zu einem lockeren Knoten verschlungen. Der Faden musste in der Einstichstelle verbleiben, um eine spätere Infarktgrößenbestimmung zu ermöglichen (s. 2.1.15). Die Rippen wurden mit einem 4-0 Seidefaden (Ethicon) verschlossen und die Haut mit 5-0 Prolene (Ethicon) vernäht. Nach Abschluss der Operation wurde die Naht mit einer Octenidin-haltigen Lösung (Octenisept, SCHÜLKE & MAYR GmbH) desinfiziert. Daraufhin wurde die Maus extubiert und bis zum vollständigen Erwachen unter einer Wärmelampe im Haltungskäfig beobachtet. Postoperativ erfolgte eine Analgesie durch Buprenorphin (0,1mg/kg s.c.) im Abstand von 4 Stunden in der Hellphase (7-19 Uhr) sowie nachts über das Trinkwasser (0,009mg/mL) für mindestens zwei, maximal drei Tage.

2.1.13 Murine transthorakale Echokardiographie

Zur Beurteilung der kardialen Funktion wurden zu definierten Zeitpunkten vor und nach der Induktion des AMI echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde das Versuchstier in eine durchsichtige Inhalationskammer gesetzt und dort einem Luftgemisch aus 3% Isofluran (Piramal), 40% Sauerstoff und 57% Raumluft ausgesetzt. Nach dem Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe (fehlender Zwischenzehenreflex) erfolgte die Positionierung auf einer vorgewärmten Ableitungsplatte in Rückenlage. Die Narkose wurde dabei über eine Nasenmaske mit 2% Isofluran, 40% Sauerstoff und 58% Raumluft aufrechterhalten. Das Tier wurde an den Extremitäten auf den EKG-Kontaktstellen fixiert. Dafür wurde vorab eine kleine Menge Elektrodencreme (Gello GmbH Geltechnik) auf die EKG-Kontaktstellen gegeben. Die innere Körpertemperatur wurde mittels Rektalsonde kontrolliert und bei 37-38°C gehalten. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurde Dexpanthenol-haltige Augensalbe (Bepanthen Augensalbe, Bayer AG) appliziert. Die Vitalparameter der Maus wurden kontinuierlich kontrolliert. Nach Abschluss der Vorbereitungen wurde im Bereich des Thorax Veet Enthaarungscreme (Reckitt Benckiser) aufgetragen und nach kurzer Einwirkzeit enthaart. Um eine korrekte Ankopplung des Schallkopfes zu gewährleisten wurde vorgewärmtes Ultraschallgel (Aquasonic, Roeser Mecical) luftblasenfrei auf den Thorax appliziert. Es folgte die Aufnahme der parasternalen langen Achse (PSLA, s. Abb.10) und der parasternalen kurzen Achse (SAX) des linken Ventrikels mit einem hochauflösendem Ultraschallgerät (Vevo 3100, Visual Sonics, Fujifilm) und einem 18-38 MHz Schallkopf MS400 (Visual Sonics, Fujifilm). Nach Abschluss der Aufnahmen erfolgte die Narkoseausleitung. Das Versuchstier wurde in einen Haltungskäfig zurückgesetzt und bis zum vollständigen Erwachen unter einer Wärmelampe gehalten und beobachtet. Die anschließende Datenanalyse erfolgte mit der Software VevoLab 3.2.6.

(Visual Sonics, Fujifilm). Aus den Aufnahmen konnten folgende kardiale Parameter ermittelt werden: Ejektionsfraktion (EF), Schlagvolumen (SV), enddiastolisches- und endsystolisches Volumen (ESV, EDV), Herzfrequenz (*heart rate* HR), Herzminutenvolumen (*cardiac output* CO).

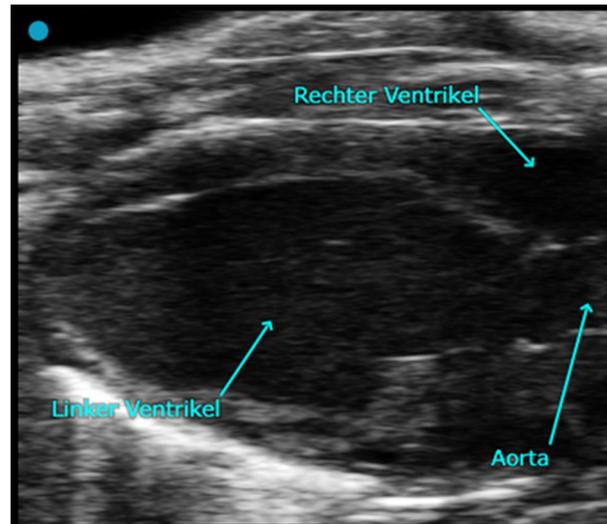


Abb.10: Beispielhafte Aufnahme der parasternalen langen Achse

2.1.14 Tailbleeding Assay

Um die Auswirkungen der IPE-Supplementation auf die Thrombozytenfunktion bestimmen zu können, wurde ein sog. Tailbleeding Assay durchgeführt. Als Anhaltspunkt für das erstellte Protokoll dienten hierbei aktuelle Veröffentlichungen [125, 126]. Die Versuchstiere wurden mit Ketamin (Ketanest ®100mg/kg, i.p.) und Xylazin (Rompun ®10mg/kg, i.p.) narkotisiert. Nach Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe wurden die Tiere auf eine beheizte Arbeitsplatte (37°C) gelegt. Dort liegend wurden die letzten fünf Millimeter der Schwanzspitze mit einer Schere abgeschnitten. Unmittelbar danach wurde der Schwanz in 50mL auf 37°C erwärmte isotonische Kochsalzlösung gehängt. Die Schwanzspitze hing dabei etwa zwei Zentimeter unter der Wasseroberfläche und etwa fünf Zentimeter unter dem Körperriveau (s. Abb.11). Die Blutung aus der Schwanzspitze wurde nun für eine halbe Stunde beobachtet. Während der Beobachtungszeit wurden jeweils die Zeiten der Okklusionen, also der Blutungsstopps notiert. Da die Blutung bei vielen Tieren nach der ersten Okklusion erneut begann, erhielt man so eine Zeit bis zur ersten und bis zur letzten Okklusion. Das über die Zeit verlorene Blutvolumen wurde ebenfalls bestimmt. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde das Blut in der isotonischen Kochsalzlösung bei RT und 1500g für fünf Minuten zentrifugiert. Die überschüssige Kochsalzlösung wurde im Anschluss entfernt, sodass das Zellpellet verblieb. Dieses wurde nun für zehn Minuten mit „Erylysepuffer“ (Apotheke der Universitätsklinik Düsseldorf, isotonische Ammoniumchloridlösung) lysiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei RT und 2000g für fünf Minuten zentrifugiert. Aus dem Überstand konnte nun mittels Absorptionmessung bei 550nm die Menge an Hämoglobin

bestimmt werden. Eine Standardreihe wurde mit definierten Blutvolumina angefertigt, sodass so die Berechnung des verlorenen Blutvolumens möglich war.



Abb.11: Tailbleeding Assay

2.1.15 Histologische Untersuchungen

2.1.15.1 Färbung der Thromben nach arterieller Thrombusformation

Nach der 60-minütigen Bildung der Thrombusformation wurde der Thrombus aus der Carotis präpariert und unmittelbar in Tissue-Tek (Sakura) eingebettet. Bis zur weiteren histologischen Analyse wurde der Thrombus bei -80°C gelagert. Der Thrombus wurde mittels Cryotome (CM3050, Leica) mit einer Schnittdicke von $10\mu\text{M}$ geschnitten. Im Anschluss wurden die Schnitte mit 4%-iger Paraformaldehydlösung (VWR) für 15 Minuten fixiert. Daraufhin wurden die Schnitte mit einer vorbereiteten Waschlösung gereinigt und für 15 Minuten mit Triton X-100 (Sigma Aldrich, 50% in Waschlösung) permeabilisiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte nach einem erneuten Waschen nun mit Schafserum (Sigma Aldrich, 10% in Waschlösung) für 15 Minuten bearbeitet. Im Anschluss daran erfolgte die schrittweise Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern. Nach Abschluss der Färbungen wurden die Schnitte gewaschen und mit Mounting Medium incl. Dapi (Vectashield®, VectorLabs) versehen. Anschließend wurden die Bilder mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM6B) aufgenommen und mit der Software ImageJ analysiert.

Primäre Antikörper: CD41a Rat anti-Mouse, PE (eBioscience),

Fibrinogen Rabbit anti-human, unconjugated (Dako)

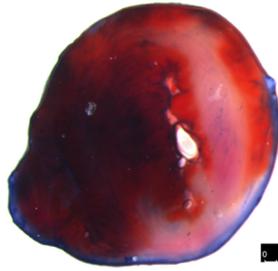
Sekundäre Antikörper: für CD41a: Goat anti Rat, Alexa Fluor 647 (Thermo Fischer)

für Fibrinogen: Goat anti Rabbit, Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher)

Die vorbereitete Waschlösung enthält:	900mL Wasser
	100mL PBS 10x
	1mL Tween 80 (Sigma Aldrich)
	5g bovines Serumalbumin (Sigma Aldrich)

2.1.15.2 Infarktgrößenbestimmung mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung

Diese Färbemethode dient zur Determination der Infarktgröße der murinen Herzen 24 Stunden nach I/R. Dafür wurde das Versuchstier gewogen und dem Gewicht entsprechend mit Ketamin (Ketanest® 100mg/kg, i.p.) und Xylazin (Rompun® 10mg/kg, i.p.) narkotisiert. Bei adäquater Narkosetiefe (fehlender Zwischenzehenreflex) wurde das Tier durch finalen Blutentzug getötet und das Herz entnommen. Das Herz wurde unmittelbar in eisgekühlte isotonische Kochsalzlösung verbracht und dort präpariert. Das kardiale Fett sowie anderweitiges Gewebe wurden entfernt, sodass lediglich das Herz und ein etwa fünf Millimeter langer Teil der Aorta ascendens verblieben. Die Aorta wurde im Anschluss daran auf einer Kanüle befestigt und mit isotonischer Kochsalzlösung blutleer gespült. Mit einem 7-0 Seidefaden (Seraflex) wurde daraufhin die LAD an der Stelle verschlossen, an der noch der lose Faden nach der I/R-Operation verblieben war (s. 2.1.12). Dieser Faden konnte dann entfernt werden. Durch die Kanüle wurde nun eine 0,1%ige Evans Blue-Lösung (gelöst in isotonischer Kochsalzlösung, Sigma Aldrich) in das Herz injiziert, bis sich das Myokard blau färbte. Überschüssige Lösung wurde mit isotonischer Kochsalzlösung abgespült. Nach der Färbung wurde das Herz in handelsüblicher Frischhaltfolie eng eingewickelt und bei -20°C eingefroren. Nach einer Durchfrierzeit von etwa drei Stunden wurde das Herz vom Apex aus in sechs circa ein Millimeter breite Schnitte geteilt. Die Schnitte wurden gewogen und in eine 1%-ige TTC-Lösung (Triphenyltetrazoliumchlorid, Sigma Aldrich, in isotonischer Kochsalzlösung) verbracht. Dort inkubierten sie bei 37°C für fünf Minuten und das gesunde Gewebe setzte TTC zu einem roten Farbstoff um. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden Bilder von der Herzschnitten gemacht (Leica DM6B). Eine Analyse der Bilder erfolgte durch die Software Diskus View (Technisches Büro Hilgers, Königswinter).



- Blau: Evans Blue gefärbter Bereich, nicht von Ischämie betroffen
- Rot: TTC-gefärbter Bereich, von der Ischämie betroffen, aber gesund
- Weiß: ungefärbt, von der Ischämie betroffen, totes Gewebe
- Rot + Weiß: *area at risk* (AAR), Bereich der Ischämie

Abb.12: Beispielbild einer Herzschnittes nach TTC-Färbung

2.1.15.3 Sirius Rot Färbung zur Detektion der Infarktnarbe 21 Tage nach Ischämie/Reperfusion

Das Versuchstier wurde gewogen und dem Gewicht entsprechend mit Ketamin (Ketanest® 100mg/kg, i.p.) und Xylazin (Rompun® 10mg/kg, i.p.) narkotisiert. Bei adäquater Narkosetiefe (fehlender Zwischenzehenreflex) wurde das Tier durch finalen Blutentzug getötet, das Herz mit eisgekühltem PBS gespült und entnommen. Im Anschluss wurde es 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd (VWR) fixiert und zur Entwässerung in das Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie (Universitätsklinikum Düsseldorf) gebracht. Die Entwässerung fand freundlicherweise dort statt. Im Anschluss wurde das Herz in Paraffin eingebettet. Das eingebettete Herz wurde mit einer Schnittdicke von 5µM geschnitten (2035 Biocut, Leica) und anschließend entparaffiniert (Roticlear, Carl Roth). Die Schnitte wurden nun schrittweise mit Hämatoxylinlösung nach Gill II (Carl Roth), Wasser und Pikro-Siriusrot-Lösung (Morphisto) behandelt. Abschließend erfolgte eine Entwässerung mit 100% Ethanol (Carl Roth) und die Trocknung der Schnitte.

2.2 Extern durchgeführte Arbeiten

2.2.1 In-silico Docking

Die virtuelle Docking Analyse wurde von unserem Forschungspartner Dr. Christoph Dücker (Institut für klinische Pharmakologie, Universitätsklinik Göttingen) durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurde eine Analyse in AutoDock™Vina durchgeführt [127]. Dafür wurden strukturelle Daten der Datenbank *pubchem* genutzt. Eine Bearbeitung der Ergebnisse mit anschließender Visualisierung erfolgte mit der Software PyMol™.

2.2.2 Proteom und Phosphoproteomanalysen der Thrombozyten

Zehn Milliliter citrat-antikoaguliertes Blut wurden mit 40µL 0,5M EGTA (Sigma) und 4µL Apyrase (500U/mL, Sigma Aldrich) versetzt und für zehn Minuten bei 200g und RT zentrifugiert. Danach wurde das PRP abgenommen, die Zellzahl mittels Thoma Zählkammer (Brand) bestimmt, und das PRP im Verhältnis 1:2 mit CGS Puffer verdünnt. Nach einer Ruhezeit von zehn Minuten erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei RT für zehn Minuten und 69g. Daraufhin konnten die Leukozyten von den Thrombozyten getrennt werden. Das PRP wurde nun bei RT und 400g für zehn Minuten erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dieser Zentrifugation verworfen und das Zellpellet mit drei Millilitern auf 37°C erwärmten CGS Puffer suspendiert. Nach einer Ruhezeit von zehn Minuten erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 400g für zehn Minuten. Im Anschluss daran wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet wurde mit 37°C warmen HEPES Puffer suspendiert. Das Volumen wurde so gewählt, dass eine Suspension mit 6×10^8 Zellen/mL entstand. Jeweils 100µL der Thrombozytensuspension wurden in drei frischen Eppendorf-Tubes überführt und für 15 Minuten bei 37°C ruhen gelassen. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Stimuli.

1. Keine Stimulation: Zwölf Minuten Inkubation bei 37°C
2. Stimulation mit ARA: Sechs Minuten Inkubation bei 37°C, Zugabe von 1mM ARA, sechs Minuten Inkubation bei 37°C
3. Stimulation mit EPA und ARA: Zugabe von 1mM EPA, sechs Minuten Inkubation bei 37°C, Zugabe von 1mM ARA, sechs Minuten Inkubation bei 37°C

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 1µL Lysepuffer gestoppt. Die Proben wurden gemischt und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurden diese bei -80°C gelagert. Die vorbereiteten Proben wurden zur Untersuchung nach Dortmund geschickt. Die Analyse des Thrombozytenproteoms wurde von unseren Forschungspartner*innen Dr. Albert Sickmann und Dr. Fiorella A. Solari (Leibniz-Institut für

Analytische Wissenschaften – ISAS – e.V., Dortmund) durchgeführt. Die Ergebnisse lagen als Fluoreszenzintensitäten vor.

HEPES Puffer: Natriumchlorid 145mM
 Kaliumchlorid 5mM
 Magnesiumchlorid 1mM
 HEPES 10mM
 Glucose 10mM

Lysepuffer: Phosstop 1 Tablette (Sigma Aldrich)
 cComplete™ 1 Tablette (Roche)
 Natriumdodecylsulfat 1% (Sigma Aldrich)
 Natriumchlorid 150mM
 Tris-HCl 50mM (Sigma Aldrich)
 Wasser ad 10mL

2.2.3 Lipidomanalysen der Thrombozyten

Für diese Analyse wurden 20mL citrat-antikoaguliertes Blut für 20 Minuten bei 200g und RT zentrifugiert. Das PRP wurde abgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer (Brand) bestimmt. Zum PRP wurde auf ein Volumen von 35mL Tyrodes Puffer (pH 6,5) sowie 35µL Aggrastat® Infusionslösung (Tirofiban, MSD Sharp & Dohme GmbH) hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung bei 900g und RT für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde verworfen und das Pellet mit Tyrodes Puffer (pH 7,4) so aufgefüllt, dass eine Zellsuspension mit der Konzentration 1×10^9 /mL entstand. Nach einer Ruhezeit von zwanzig Minuten bei RT wurden jeweils 100µL der Proben in ein frischen Eppendorf-Tube überführt und stimuliert (bei den in-vivo Untersuchungen erfolgte keine Stimulation mit EPA, da sich der Einfluss der Fettsäure bereits über den Blutkreislauf zeigt).

1. Keine Stimulation: Zehn Minuten Inkubation bei RT
2. Stimulation mit ARA: Fünf Minuten Inkubation bei RT, Zugabe von 1mM ARA, fünf Minuten Inkubation bei RT

3. Stimulation mit EPA und ARA: Zugabe von 1mM EPA, fünf Minuten Inkubation bei RT, Zugabe von 1mM ARA, fünf Minuten Inkubation bei RT

Im Anschluss an die Stimulation wurden die Proben bei 640g für fünf Minuten bei RT zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Proben unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Analyse der Probe fand bei unseren Forschungspartner*innen in Wien statt (Institut für analytische Chemie, Universität Wien, Österreich). Die dort analysierten Proben wurden mit Hilfe meiner Kollegin Frau Laura Wildeis ausgewertet. Die Daten wurden im Anschluss zur Verfügung gestellt.

Tyrodes Puffer (pH 7,4): Natriumchlorid 137mM
Kaliumchlorid 2,63mM
Natriumhydrogencarbonat 12mM
Glukose 5,5mM
Mit HEPES auf pH 7,4 eingestellt

Tyrodes Puffer (pH 6,5): Natriumchlorid 137mM
Kaliumchlorid 2,63mM
Natriumhydrogencarbonat 12mM
Glukose 5,5mM
Mit Salzsäure (Sigma Aldrich) auf pH 6,5 eingestellt

ACD-Lösung: Natriumcitrat 3,4mg/mL (Sigma Aldrich)
Zitronensäure 1,3mg/mL (Sigma Aldrich)
Glukose 20,0mg/mL (Sigma Aldrich)
Wasser, mit Natriumhydroxid (Sigma Aldrich) auf pH 4,6 eingestellt

2.2.4 Extraktion von high-density lipoprotein (HDL)

Die Extraktion von HDL aus humanen Blutproben erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bodo Levkau (Institut für molekulare Medizin III, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Hauptverantwortlich waren hier Frau Nathalie Schröder und Herr Jens Vogt. Die

massenspektrometrische Bestimmung der HDL-S1P-Menge fand ebenfalls dort statt. Für die Extraktion wurde PRP gesunder Proband*innen und diabetischer Patient*innen zur Verfügung gestellt: Es erfolgte die Abnahme von etwa 30mL citrat-antikoaguliertem Blut, worauf eine Zentrifugation von zehn Minuten bei 250g und RT folgte. Das PRP wurde der Arbeitsgruppe Levkau anschließend zur Verfügung gestellt.

Die Extraktion selbst erfolgte über mehrere Ultrazentrifugationschritte, sowie die Auftrennung der Plasmabestandteile anhand ihrer Dichte. Abschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt und die aufgereinigten HDL-Proben wurden für weitere Versuche zur Verfügung gestellt.

2.3 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Software SPSS®-Statistics 25 (IBM) und Graphpad-Prism®8 (GraphPad software Inc.) durchgeführt. Zu Beginn jeder Analyse wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Hierfür wurden der Kolmogorov-Smirnov-Test, Shapiro-Wilk-Test, q-q-Plots und Histogramme hinzugezogen. Normalverteilte Daten wurden, je nach Abhängigkeit der Variablen, mit ungepaarten oder gepaarten t-Tests untersucht. Bei nicht-normalverteilten Daten wurden der Wilcoxon-Test (abhängig) oder Mann-Whitney-U-Test (unabhängig) zur Analyse der Daten herangezogen. Beim statistischen Vergleich von drei oder mehr Gruppen wurde eine Anova-Analyse ggf. mit anschließendem Tukey's-multiple-comparison-Test, eine *mixed-effect analysis* oder ein Friedman-Test (nicht-normalverteilt, gepaart, unabhängig) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardabweichung präsentiert. Es wurde ein Konfidenzintervall von 95% festgelegt. P-Werte <0,05 werden als signifikant angesehen.

2.4 Weitere Laborutensilien

Heizblock: Hettich Lab Technology, Model MHR23

Zentrifugen: Eppendorf 5810R

Hettich Lab Technology, 38R/380R/320R

Pipetten: Serie Eppendorf Research® plus

OP-Besteck: Fine Science Tools

Micronadelhalter Barraquer 12mm, B.Braun

3 Ergebnisse Teil 1: Einfluss von Eicosapentaensäure auf die arterielle Thrombusformation durch Cyclooxygenase-1-abhängige Inhibition der Thrombozytenreaktivität

3.1 Der Einfluss von IPE auf die arterielle Thrombose und die Thrombozytenfunktion im Mausmodell

3.1.1 IPE reduziert die arterielle Thrombose in-vivo

Die orale Gabe von IPE über zwei Wochen reduzierte die arterielle Thrombusformation nach Eisen(III)chlorid-Induktion in C57Bl6/J-Mäusen. Dabei verlängerte die IPE-Supplementation die Zeit zur ersten Okklusion (Abb.13 A) der Carotis signifikant ($9,24 \pm 1,63\text{min}$ vs. $60,00 \pm 0,00\text{min}$, ungepaarter t-Test, $p < 0,0001$). Die untersuchten Kontrollmäuse zeigten eine erste Okklusion der Carotis nach etwa neun Minuten. Im Gegensatz dazu konnte bei den IPE-behandelten Tiere keine Okklusion, während der 60-minütigen Aufnahmezeit beobachtet werden. Die Dauer der ersten Okklusion (Abb.13 B) war dementsprechend verkürzt (ungepaarter t-Test, $p = 0,0158$). Zusätzlich war die maximal ermittelte Thrombusgröße (Abb.13 C) ebenfalls signifikant reduziert ($289685 \pm 97920\mu\text{m}^2$ vs. $152325 \pm 7096\mu\text{m}^2$, ungepaarter t-Test, $p = 0,0170$). Die Thrombi der IPE-behandelten Tiere waren im Durchschnitt halb so groß im Vergleich zu denen der entsprechenden Kontrolltiere. Beispielbilder der Thrombusbildung unter IPE und unter Kontrollbedingungen sind unter Abb.14 zu sehen.

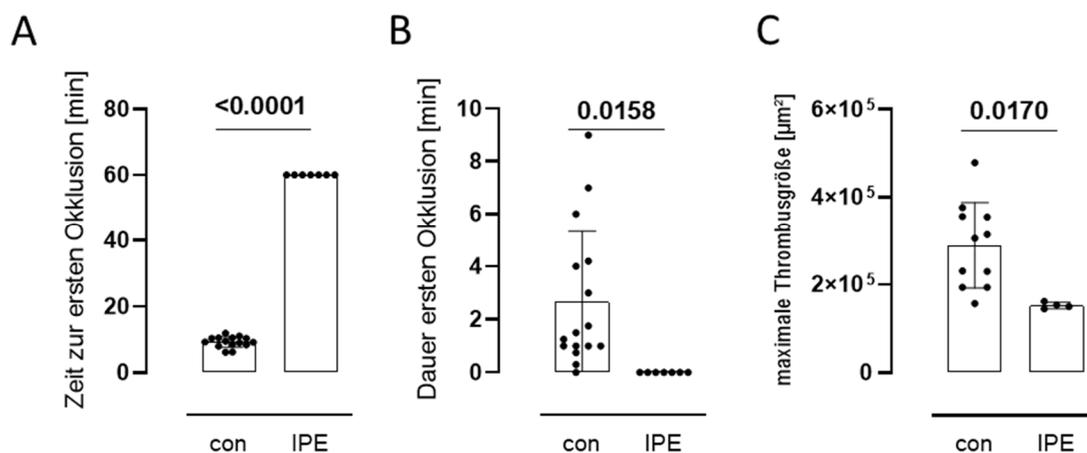


Abb.13: IPE-Gabe über zwei Wochen bei Mäusen reduziert die arterielle Thrombusformation

Die Abbildung zeigt die Zeit zur ersten Okklusion (A), die Dauer der ersten Okklusion (B) sowie die maximale Thrombusgröße (C) im in-vivo-Modell einer arterielle Thrombusformation bei C57BL6/J-Mäusen mit und ohne zweiwöchige IPE-Supplementation.

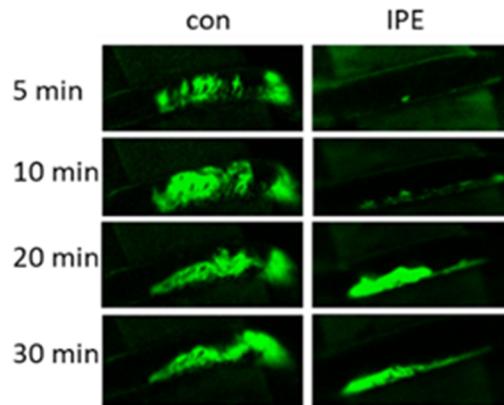


Abb.14: Beispielbilder der Thrombusbildung

3.1.1.1 Histologische Analyse der arteriellen Thromben

Nach Versuchsende wurden die Thromben der Versuchstiere auf Fibrinogen und CD41 untersucht, um die Thromben histologisch zu charakterisieren. Die CD41-positive Fläche (Abb.15 A) innerhalb des Blutgefäßes war signifikant reduziert ($66,6 \pm 7,8\%$ vs. $57,3 \pm 5,7\%$, ungepaarter t-Test, $p=0,0483$), während die CD41-negative Fläche innerhalb des Thrombus (Abb.15 B) erhöht war ($5,8 \pm 6,3\%$ vs. $20,9 \pm 6,7\%$, ungepaarter t-Test, $p=0,0042$). CD41 oder auch Integrin α -IIb ist ein Oberflächenprotein von Thrombozyten [128]. Ein identisches Bild zeigte auch die Analyse der Fibrinogenfärbung. Die Fibrinogen-positive Fläche innerhalb des Gefäßes (Abb.15 C) war signifikant reduziert ($72,1 \pm 8,4\%$ vs. $62,7 \pm 3,0\%$, ungepaarter t-Test, $p=0,296$), während die Fibrinogen-negative Fläche innerhalb des Thrombus (Abb.15 D) signifikant verkleinert war ($6,9 \pm 3,5\%$ vs. $24,4 \pm 6,2\%$, ungepaarter t-Test, $p=0,0003$). Unter Abb.16 sind Beispielbilder der durchgeführten Färbungen beigefügt.

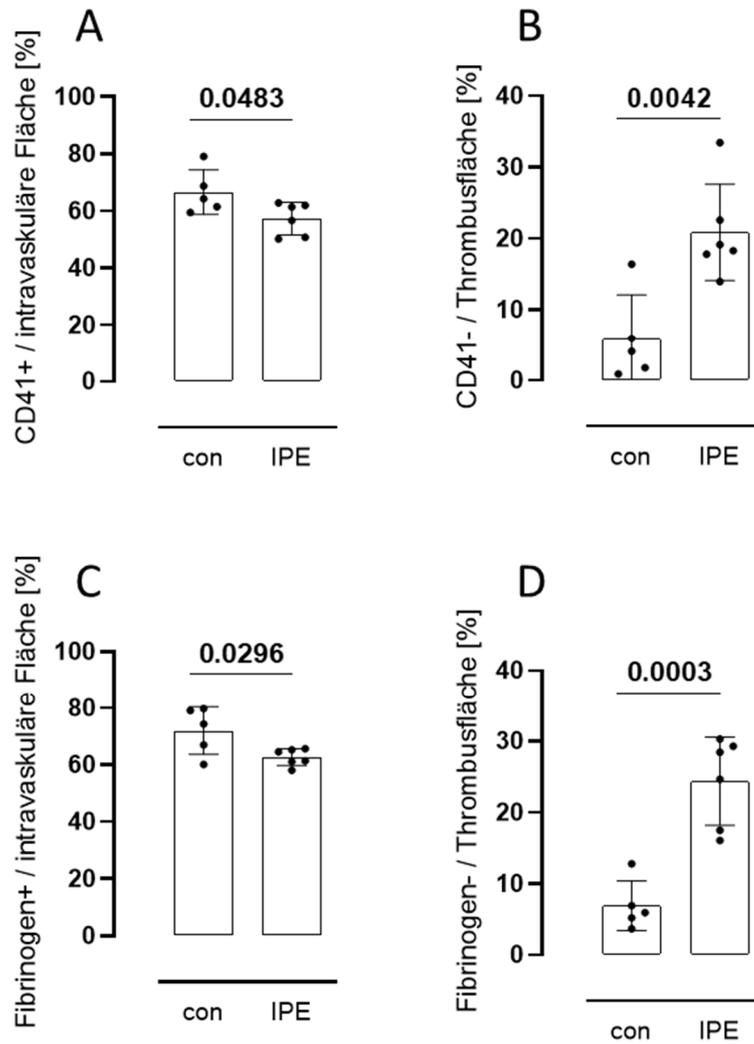


Abb.15: Histologische Analyse der Thromben nach arterieller Thrombusinduktion in IPE-behandelten Mäusen

Die Abbildung zeigt die histologischen Veränderungen von CD41-positivem (A) und Fibrinogen-positivem (C) Gewebe innerhalb der Carotis. Zusätzlich ist die Veränderung von CD41-negativem (B) und Fibrinogen-negativem (D) Gewebe innerhalb der Thrombusfläche dargestellt.

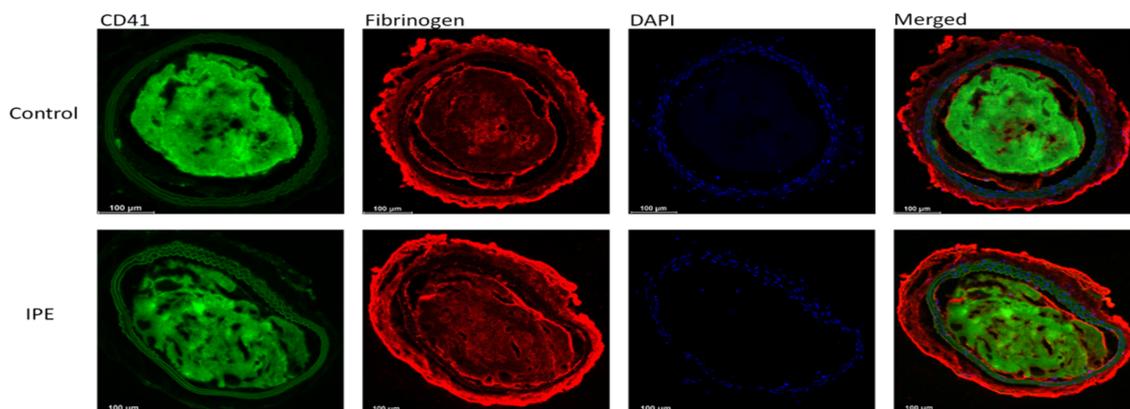


Abb.16: Beispielbilder der histologischen Analyse der Thromben nach arterieller Thrombusinduktion in IPE-behandelten Mäusen

CD41-positives Gewebe ist in grün dargestellt, während Fibrinogen-positives Gewebe in Rot dargestellt ist. DAPI färbt Zellkerne blau

3.1.2 IPE verlängert die Blutungszeit in-vivo

Der Einfluss einer zweiwöchigen IPE-Supplementation auf die Thrombozytenfunktion wurde im Mausmodell anhand eines Tailbleeding Assays bestimmt. Nach der 30-minütigen Beobachtungszeit war der Blutverlust der IPE-Tiere signifikant erhöht. Durchschnittlich verloren die IPE-behandelten Tiere etwa fünfmal so viel Blut im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb.17 A, con: $43,1 \pm 55,1\mu\text{L}$ vs. IPE: $247,6 \pm 205,7$, ungepaarter t-Test, $p=0,0177$). Die Zeit, die bis zum ersten Blutungsstopp verging, war in den Gruppen ebenfalls unterschiedlich (Abb.17 B, con: $1,52 \pm 0,82\text{min}$ vs. IPE: $5,49 \pm 3,45\text{min}$, ungepaarter T-Test, $p=0,0073$). Da die Blutung bei fast allen Tieren nach der ersten Okklusion noch einmal begann, wurde auch die Zeit der letzten Okklusion aufgenommen. Hier zeigte sich, dass die Blutung bei lediglich einem der IPE-behandelten Tiere während der Beobachtungszeit stoppte. Dies geschah erst kurz vor Ende der Beobachtungszeit. Im Gegensatz dazu stoppte die Blutung bei der Hälfte der Kontrolltiere innerhalb der ersten zehn Minuten. Insgesamt ergab sich auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb.17 C, con: $16,79 \pm 10,97\text{min}$ vs. IPE: $39,87 \pm 0,35\text{min}$, Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0107$).

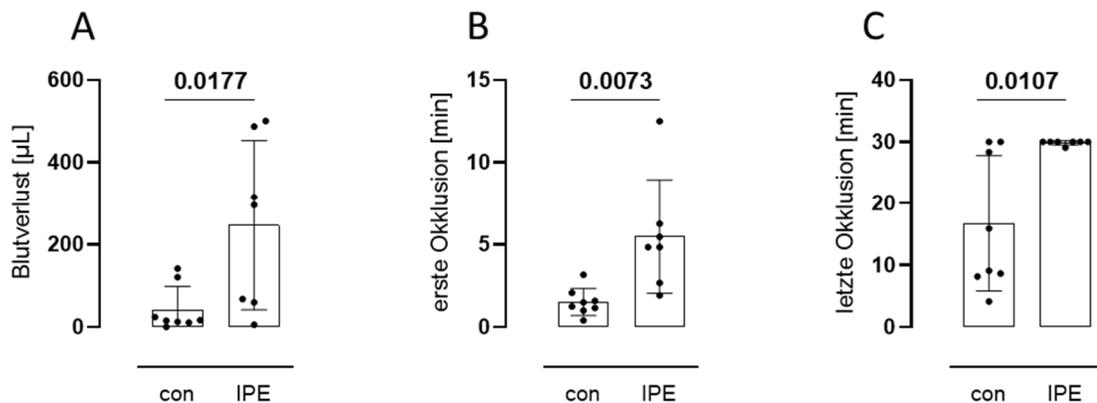


Abb. 17: Verlängerte und vermehrte Blutung unter IPE-Supplementation im Tailbleeding Assay

Der Blutverlust, während der gesamten 30-minütigen Beobachtungszeit ist unter (A) dargestellt. (B) zeigt die Zeit bis zum ersten Blutungsstopp, während (C) die Zeit der letzten detektierten Okklusion innerhalb der Beobachtungszeit zeigt.

3.2 Die Supplementation von IPE reduziert die Thrombozytenaggregation, Adhäsion und Degranulation

3.2.1 Patient*innencharakteristika und Versuchsaufbau

Um den Einfluss einer IPE-Supplementation bei gesunden Proband*innen zu analysieren, wurden 25 Proband*innen in diese Untersuchung eingeschlossen. Die Charakteristika der Proband*innen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Charakteristika	n=25
Alter - Jahre (mean \pm SD)	29.4 \pm 3.4
Männliches Geschlecht – (%)	13 (52%)
Größe – cm (mean \pm SD)	164.7 \pm 42.0
Gewicht – kg (mean \pm SD)	72.1 \pm 17.4
Body mass index (mean \pm SD)	22.3 \pm 6.6

Tabelle 1: Proband*innencharakteristika, erhoben vor Beginn der IPE-Supplementation

Die Proband*innen nahmen täglich 4g IPE nach dem schon beschriebenen Schema ein. Eine Untersuchung der Thrombozyten erfolgte vor der ersten Einnahme (Baseline = BL), sowie an Tag 5 (5 d) und Tag 10 (10 d) nach Beginn der Supplementation. Vor der ersten Einnahme wurden die Laborcharakteristika der Proband*innen erhoben. Diese sind unter Tabelle 2 zu finden.

Laborparameter – mean \pm SD	n=25
Cholesterin – mg/dL	190 \pm 36
Triglyceride – mg/dL	138.6 \pm 75.6
HDL – mg/dL	52.4 \pm 13.5
LDL – mg/dL	122.1 \pm 27.1
FFA - mmol/L	0.19 \pm 0.11
Lp(a) – mg/dL	30.4 \pm 21.3
INR	0.96 \pm 0.05
PTT - sec	25.6 \pm 2.4
Fibrinogen – mg/dL	254.1 \pm 58.8
D-dimers – mg/dL	0.4 \pm 0.3
AT III - %	98.3 \pm 7.8
Kreatinin – mg/dl	0.8 \pm 0.1
GFR – ml/min/m ³	87 \pm 13.4
Harnstoff – mg/dl	29.4 \pm 8.7
Harnsäure – mg/dl	5.2 \pm 1.1
CRP – mg/dl	0.3 \pm 0.3
HbA1c - %	5.3 \pm 0.4
Leukozyten – x1000/ μ l	6 \pm 1.5
Hämoglobin – mg/dl	14.6 \pm 1.5
Hämatokrit - %	44.5 \pm 3.4
Thrombozyten – x1000/ μ l	256 \pm 23.5

Tabelle 2: Laborparameter der Proband*innen vor der ersten Einnahme von IPE

HDL=higt-density Lipoprotein, LDL=low-density Lipoprotein, FFA = Freie Fettsäuren, Lp(a) = Lipoprotein a, INR = Internationale normalisierte Ratio, PTT = Prothrombin Zeit, AT III = Antithrombin III, GFP = geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, CRP = C-reaktives Protein, HbA1c = Hämoglobin A_{1c}

3.2.1.1 Reduktion der Thrombozytenadhäsion in kollagenbeschichteter Flusskammer

Die Einnahme von IPE führt zu einer verringerten Thrombozytenadhäsion auf einer mit Kollagen beschichteten Flusskammer. Die Reduktion der Adhäsion führt zu einem geringeren Signal in der Flusskammeruntersuchung. Beginnend mit einer *platelet-covered area* von $22,3 \pm 7,1\%$ bei den Blutuntersuchungen vor der ersten Einnahme von IPE, zeigte sich bereit nach fünf Tagen der Einnahme eine im Trend kleinere *platelet-covered area* von $17,8 \pm 4,1\%$. Mit Abschluss der Untersuchung nach zehn Tagen zeigte sich eine signifikante Reduktion der *platelet-covered area* auf $13,7 \pm 3,1\%$ (Abb.18, Anova-Analyse, $p=0,0259$). Es konnte somit eine fast 50%ige Reduktion der Thrombozytenadhäsion erreicht werden. Eine Dosisabhängigkeit kann in diesen Ergebnissen ebenfalls erkannt werden. Da die Halbwertszeit von IPE/EPA sehr groß ist, wird der maximale Wirkspiegel erst nach über zwei Wochen erreicht. Die durchgeführten Untersuchungen bilden somit die Aufkonzentrationsphase ab, in der die Wirkspiegeln von IPE ansteigen. Dementsprechend liegt an Tag 10 der Einnahme im Vergleich zu Tag 5 ein höherer Wirkspiegel vor. Exemplarische Bilder zur Flusskammeruntersuchungen an den genannten Zeitpunkten der Einnahme sind ebenfalls in Abbildung 18 zu sehen.

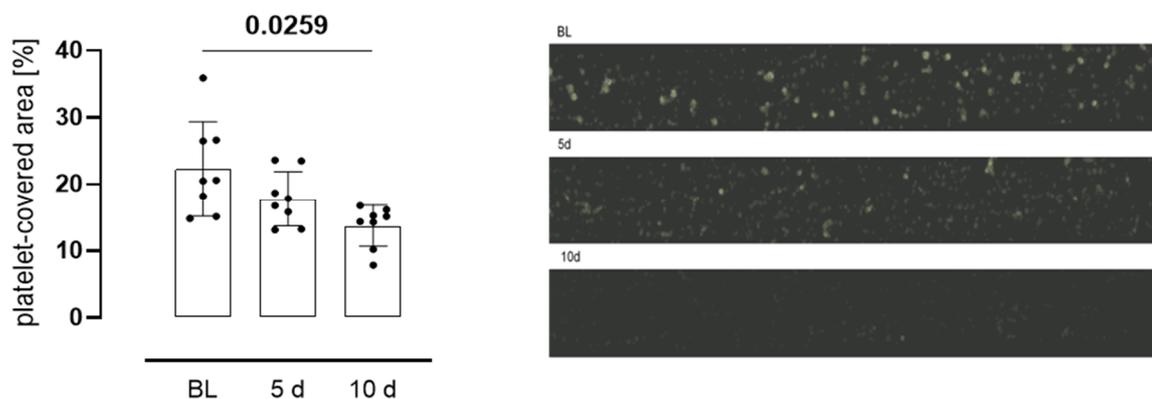


Abb.18: graphische Darstellung der *platelet-covered area* in einer kollagenbeschichteten Flusskammer (links), Beispielbilder dieser Untersuchungen (rechts)

3.2.2 Reduzierte ARA-induzierte Aggregation in der LTA

Das Blut von 13 Proband*innen wurde während und vor der Einnahme von IPE auf seine Aggregationsfähigkeit in der LTA untersucht. Dazu wurden drei verschiedene Stimuli verwendet und die maximale Aggregationsfähigkeit (*maximum of aggregation* = MoA) ermittelt. Unter ARA (Abb.19 A) konnte eine leichte aber signifikant reduzierte Aggregationsfähigkeit nach zehn Tagen der Einnahme beobachtet werden (BL: $87,1 \pm 5,0\%$ vs. 10d: $72,5 \pm 29,8\%$, *mixed-effect analysis*, $p=0,0407$). Unter den Stimuli ADP (Abb.19 B) und Kollagen (Abb.19 C) konnte keine Veränderung der Aggregationsfähigkeit beobachtet

werden (*mixed-effect analysis*, $p > 0,05$). Eine Exemplarische Darstellung der ARA-induzierten Aggregation ist beigefügt (Abb.19 D).

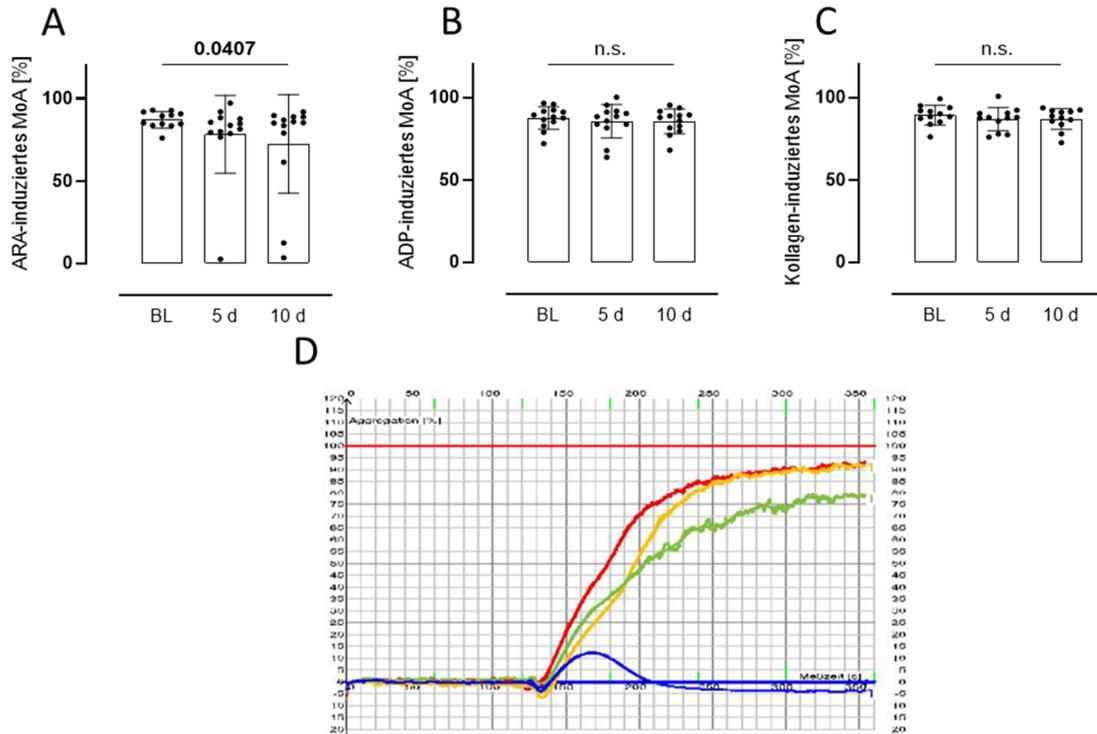


Abb.19: IPE-Supplementation führt zu einer verringerten ARA-induzierten Aggregation in der LTA, während die Aggregation unter ADP und Kollagen unbeeinflusst bleibt.

Die maximale Aggregation unter ARA-Stimulation ist nach 10-tägiger IPE-Einnahme signifikant verringert (A), während es unter ADP (B) und Kollagen (C) zu keinerlei Veränderungen der Aggregationsfähigkeit kommt. n.s.= nicht signifikant, $p < 0,05$. beispielhaft sind unter (D) die Graphen von ARA-induzierten Messungen vor Einnahme (Rot und Gelb), an Tag 5 nach Beginn der Einnahme (Grün) und an Tag 10 nach Beginn der Einnahme (Blau) gezeigt.

3.2.3 Verminderte p-Selektin Sekretion aus ARA-aktivierten Thrombozyten

Das Blut von 13 Proband*innen wurden auf die Fähigkeit der p-Selektinsekretion hin untersucht. P-Selektin (auch CD62 (CD= Cluster of Differentiation)) ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches aus den *alpha*-Granula aktivierter Thrombozyten freigesetzt wird. Es spielt eine entscheidende Rolle in der Thrombozytenaggregation und in der Entwicklung arterieller Thrombosen [129]. Die Untersuchung der p-Selektinsekretion gibt daher einen wichtigen Rückschluss auf den Grad der Aktivierung von Thrombozyten.

Die Einnahme von IPE führte bei den Untersuchungen zu einer signifikant verminderten ARA-induzierten p-Selektinfreisetzung. So zeigte sich ein signifikanter Unterschied in dem Anteil p-Selektin-positiver Thrombozyten zwischen der Baseline (BL)-Analyse vor der ersten IPE-Einnahme und nach zehn Tagen (10 d) der Einnahme unter ARA-Stimulation (Abb.20 A, BL: $69,4 \pm 17,8\%$ vs. 10d: $56,5 \pm 20,6\%$, *mixed-effect analysis*, $p = 0,0456$). Exemplarische FACS-Daten sind in der Abbildung 20 D zu finden. Eine Abhängigkeit zwischen der IPE-Supplementation und der p-Selektinfreisetzung nach ADP- (Abb.20 B, BL: $77,5 \pm 11,2\%$ vs. 10d: $78,5 \pm 7,8\%$, *mixed-effect analysis*, $p > 0,05$) oder

Kollegenstimulation (Abb.20 C, BL: $49,3 \pm 16,6\%$ vs. 10d: $55,5 \pm 20,7\%$, *mixed-effect analysis*, $p > 0,05$) war nicht zu erkennen.

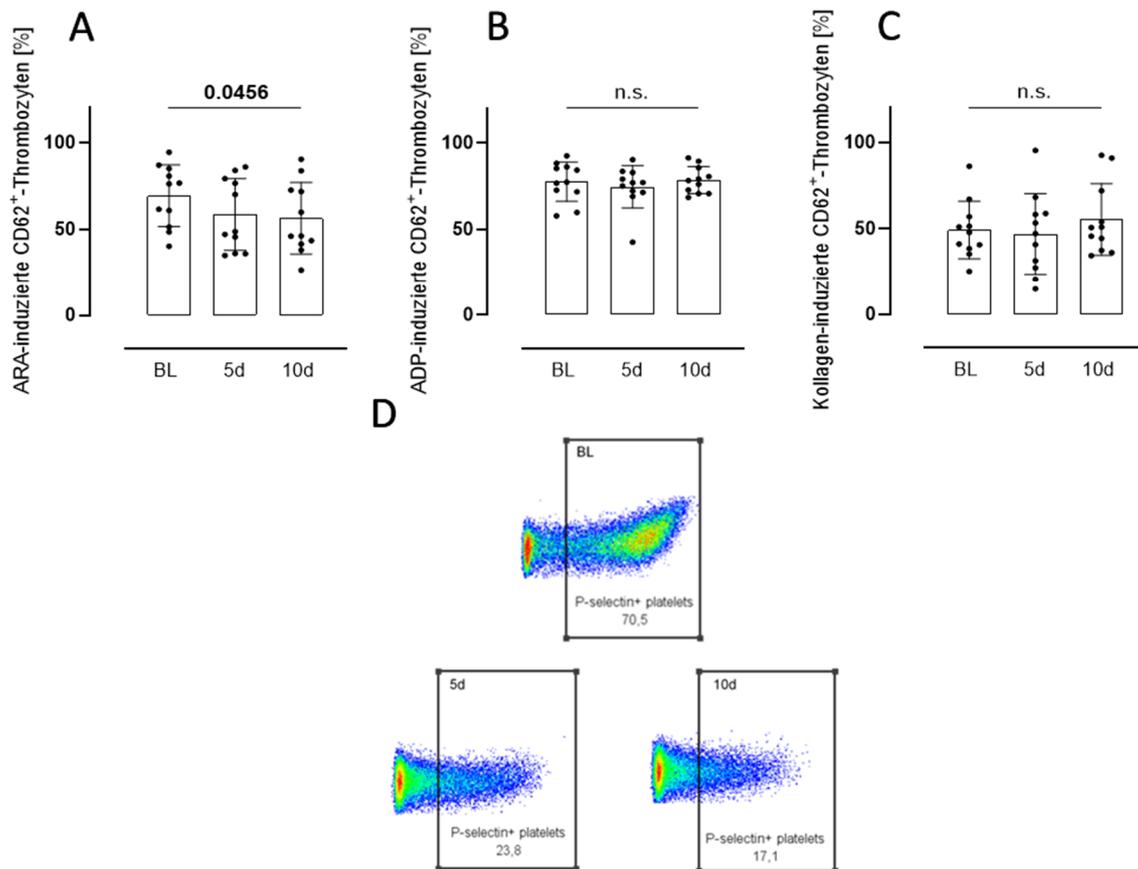


Abb.20: IPE-Supplementation führt zu einer verringerten ARA-induzierten p-Selektinfreisetzung, während die Freisetzung unter ADP und Kollagen unbeeinflusst bleibt.

Der Anteil an CD62(p-Selektin) -positiven-Thrombozyten ist im Zeitverlauf der IPE-Einnahme unter ARA-Stimulation signifikant reduziert (A), während die Stimulation mit ADP (B) und Kollagen (C) zu keiner Veränderung der p-Selektinfreisetzung führt (n.s.= nicht signifikant, $p > 0,05$). Die veränderte Freisetzung unter ARA kann an den Beispielbildern (D) nachvollzogen werden.

3.2.4 Reduzierte ARA-induzierte ATP-Freisetzung aus Thrombozyten

ATP dient bei dieser Untersuchung als Marker für die Freisetzung von *dense*-Granula. Es ist neben ADP, Calciumionen und Serotonin ein Bestandteil dieser Granula [23], die wie *alpha*-Granula auch bei der Aktivierung und Stimulation der Thrombozyten ihre Bestandteile sezernieren.

Für die Analyse der *dense*-Granula Freisetzung wurde das Blut von 17 Proband*innen zu den drei bekannten Zeitpunkten analysiert. Aufgrund der bisherigen Datenlage wurde auf eine Analyse mit ADP und Kollagen verzichtet und lediglich der Einfluss auf die ARA-induzierte ATP-Freisetzung untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der ATP-Freisetzung im Zeitverlauf der IPE-Einnahme. Vor Beginn der Einnahme lag die durchschnittliche Freisetzung von ATP bei $130,7 \pm 20,4\text{nM}$. Durch die Einnahme von IPE über zehn wurde die Freisetzung um mehr als 25% reduziert. Die ATP-Freisetzung lag an

Tag 10 bei $95,9 \pm 12,0\text{nM}$ (Abb.21, Friedman Test, $p=0,0001$). Eine Dosis- bzw. Konzentrationsabhängigkeit konnte auch in diesem Versuch gezeigt werden. Der EPA-Plasmaspiegel liegt an Tag 5 der Einnahme niedriger als an Tag 10. Dementsprechend zeigte sich nach fünf Tagen der Einnahme eine mittlere ATP-Freisetzung von $104,9 \pm 29,9\text{nM}$.

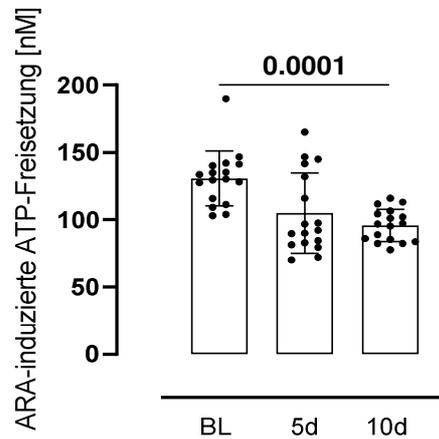


Abb.21: IPE-Supplementation führt zu einer verringerten ARA-induzierten ATP-Freisetzung aus Thrombozyten

3.2.5 Bildung von TXB2 nach Stimulation der Thrombozyten

Als einer der wichtigsten und direkten Effektoren für die Thrombozytenaggregation dient TXA2, welches mit Hilfe der COX-1 gebildet wird [130]. Insofern stellt TXA2 theoretisch den idealen Marker für die COX-1-abhängige Thrombozytenaggregation dar. Da die Halbwertszeit von TXA2 im wässrigen Milieu lediglich bei etwa 30 Sekunden liegt [44, 119], steht TXA2 praktisch für eine Messung nicht zur Verfügung. Bei dieser Messung wurde deshalb auf TXB2 ausgewichen. TXB2 ist das direkte Oxidationsprodukt von TXA2 [44]. Dadurch ermöglicht die TXB2-Messung einen Rückschluss auf die COX-1-anhängige Thrombozytenaggregation.

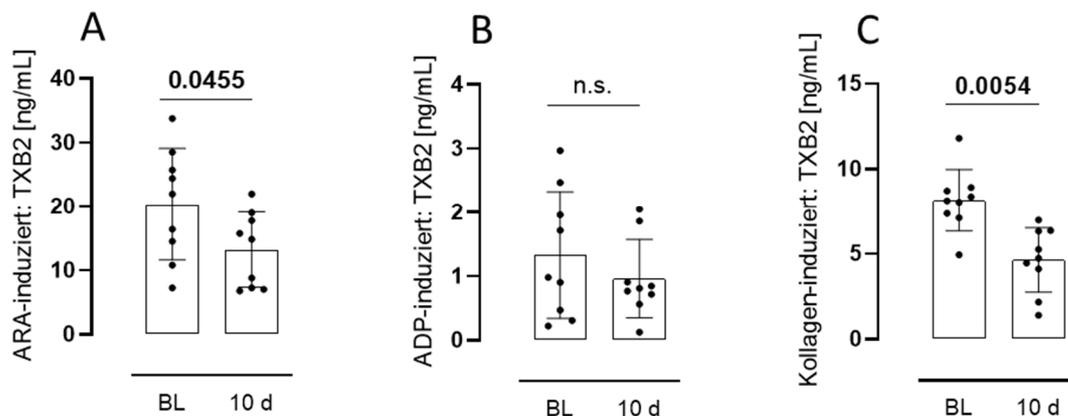


Abb.22: IPE-Supplementation führt zu einer verringerten ARA-induzierten und verringerten Kollageninduzierten TXB2 Bildung in Thrombozyten

Eine zehntägige Supplementation von IPE führt bei gesunden Proband*innen zu reduzierter TXB2-Bildung in Thrombozyten nach ARA-Stimulation (A) und nach Kollagenstimulation (C). Unter ADP-Stimulation (B) tritt kein Unterschied auf.

Das Blut von acht Proband*innen wurde bei dieser Analyse vor der ersten Einnahme (BL) und nach zehn Tagen (10 d) der IPE-Supplementation untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der ARA-abhängigen Bildung von TXB2 (Abb.22 A) um etwa 35% (BL: $20,39 \pm 8,72$ ng/mL vs. 10d: $13,24 \pm 5,86$ ng/mL, gepaarter t-Test, $p=0,0455$). Zusätzlich war auch die kollageninduzierte TXB2-Bildung nach zehn Tagen der IPE-Einnahme signifikant reduziert (Abb.22 C, BL: $8,16 \pm 1,82$ ng/mL vs. 10d: $4,64 \pm 1,89$ ng/mL, gepaarter t-Test, $p=0,0054$). Eine Aktivierung der Thrombozyten mit ADP führte zu keiner signifikanten Veränderung der TXB2-Bildung (Abb.22 B, BL: $1,33 \pm 0,99$ ng/mL vs. 10d: $0,96 \pm 0,61$ ng/mL, gepaarter t-Test, $p>0,05$).

3.2.6 Veränderte Lipidkomposition der Thrombozytenmembran durch IPE-Einnahme

Vor und nach zehntägiger Einnahme von IPE wurden die Thrombozyten der Proband*innen für eine Lipidomanalyse in Wien (Institut für analytische Chemie, Universität Wien, Österreich) vorbereitet. Es zeigte sich eine veränderte Lipidkomposition der Thrombozytenmembran (Abb.24). Die Einnahme von IPE (Ethylester einer C20:5-Fettsäure) führt erwartungsgemäß zu einem vermehrten Einbau von C20:5-fettsäureenthaltenden Lipiden in die Thrombozytenmembran. Dabei wurden die Ergebnisse für 30 untersuchte C20:5-Fettsäuren-Lipide gemittelt und zwischen den Ergebnissen vor und nach zehntägiger Einnahme verglichen (Abb.24, BL: $14,12 \pm 13,02$ pmol/mg vs. 10d: $63,72 \pm 60,14$ pmol/mg, Wilcoxon Test, $p < 0,0001$). Die Menge an Lipiden, die C20:5-Fettsäuren enthielten vervierfachte sich während der zehntägigen Einnahmezeit.

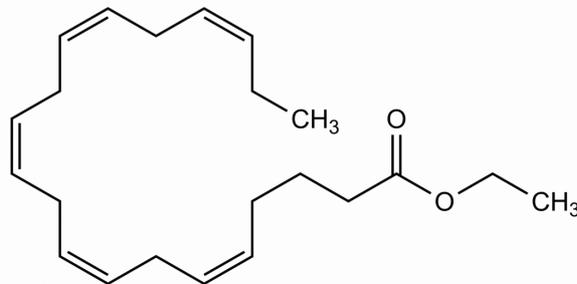


Abb.23: Icosapent Ethyl (IPE) [131], Ethylester einer Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen und 5 Doppelbindungen (C20:5-Fettsäure)

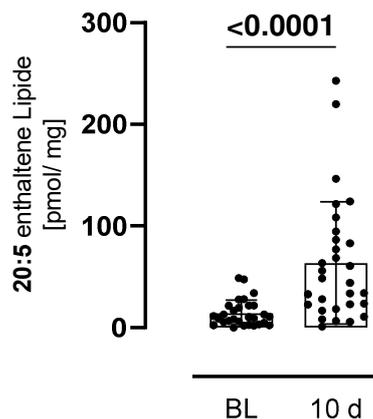


Abb.24: IPE-Supplementation führt zu einer veränderten Lipidkomposition in der Thrombozytenmembran
Die Einnahme von IPE über zehn Tage führt zu einer signifikant erhöhten Menge Lipiden, die C20:5-Fettsäuren enthalten

In einem zweiten Schritt wurden verschiedene Lipide auf ihre Zusammensetzung mit C20:4- und C20:5-Fettsäuren hin untersucht. Das Institut für analytische Chemie in Wien stellte zusammen mit Frau Laura Wildeis folgende Heatmap (Abb.25) zusammen. Aus dieser lassen sich zwei Rückschlüsse ziehen. Zum einen zeigte sich, dass sowohl der Anteil an

Lipiden mit C20:4-Fettsäuren, als auch der Anteil an Lipiden mit C20:5-Fettsäuren in der Thrombozytenmembran nach zehntägiger IPE-Einnahme erhöht waren. Zum andern ist zu erkennen, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Verhältnissen zwischen C20:4- und C20:5-fettsäureenthaltender Lipide gab.

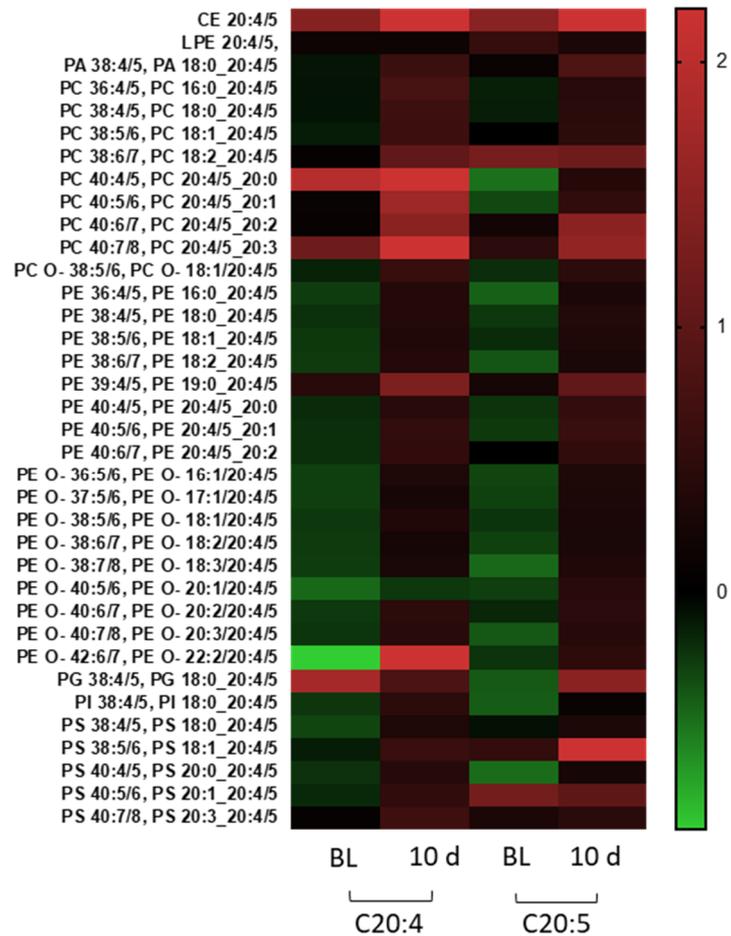


Abb.25: Heatmap zum Vergleich der C20:4- und C20:5-fettsäureenthaltender Lipide nach zehntägiger IPE-Supplementation

Links dargestellt sind Bezeichnungen für die analysierten Lipide. Dabei tauchen folgende Abkürzungen auf: CE = Cholesterolester, LPE = Lysopholipid, PA = Phosphatidsäure, PC = Phosphatidylcholin, PE = Phosphatidylethanolamin, PG = Phosphatidylglycerol, PI = Phosphatidylinositol, PS = Phosphatidylserin, O = Sauerstoff

3.3 EPA inhibiert die Thrombozytenaggregation, -Adhäsion und -Degranulation und das intrazelluläre Calcium Signalling konzentrationsabhängig

3.3.1 Reduktion der Thrombozytenadhäsion in-vitro

Um die Thrombozytenadhäsion nach in-vitro EPA-Inkubation zu analysieren, wurden Flusskammerversuche mit den Thrombozyten gesunder Proband*innen durchgeführt. Es zeigte sich eine reduzierte Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten unter EPA-Inkubation in konzentrationsabhängiger Weise (Abb.26 A). Es erfolgte eine signifikante, schrittweise Reduktion der Adhäsion von $29,60 \pm 20,70\%$ in den Kontrollversuchen ohne Inkubation bis hin zu einer Adhäsion von $6,75 \pm 3,72\%$ (Anova-Analyse, $p=0,0345$) in den Versuchen mit einer vorherigen Inkubation mit $1000\mu\text{M}$ EPA. Exemplarische Bilder der Kapillaren in der Flusskammer sind unter Abb.26 B zu finden.

Eine Inkubation mit $1000\mu\text{M}$ EPA führte bei homogenisiertem humanem Plaquematerial ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenadhäsion in der Flusskammer (Abb.26 C, con: $0,98 \pm 0,44\%$ vs. $1000\mu\text{M}$ EPA: $0,34 \pm 0,22\%$, ungepaarter t-Test, $p=0,0127$).

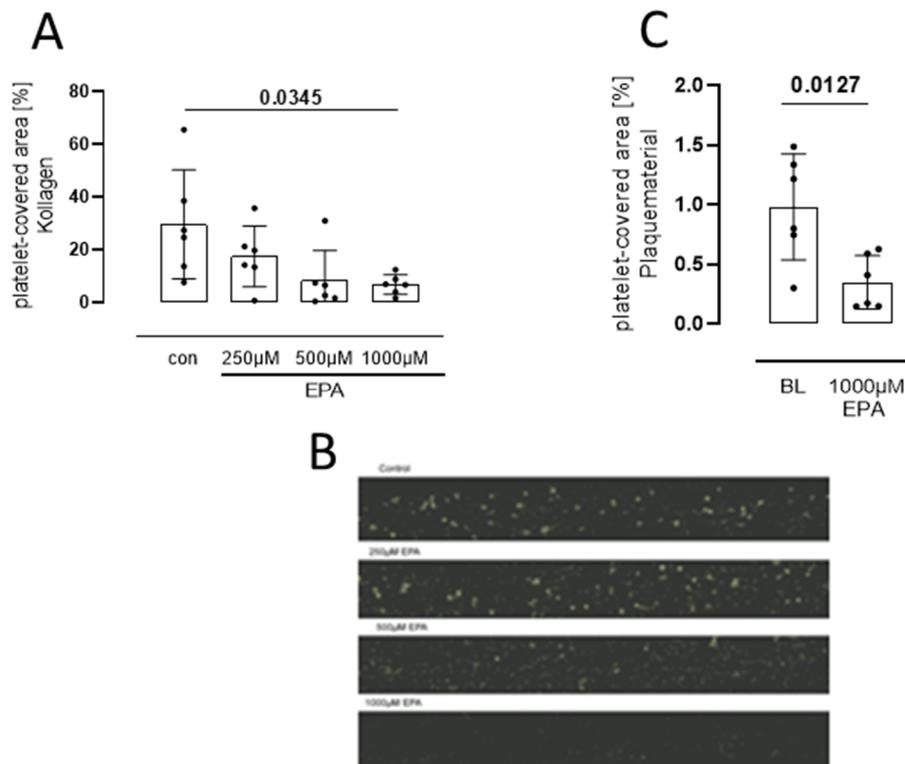


Abb.26: Reduktion der Thrombozytenadhäsion durch in-vitro EPA-Inkubation in der Flusskammer

Dargestellt ist die *platelet-covered area* in Prozent nach vorherigen EPA-Inkubation in einer kollagenbeschichteten Flusskammer (A). Dabei wurden verschiedene EPA-Konzentrationen verwendet, die zur schrittweisen Reduktion der Adhäsion führen. Beispielbilder (B) verdeutlichen das. Eine Reduktion der Adhäsion trat auch bei einer Flusskammer auf, die mit humanem homogenisiertem Plaquematerial beschichtet wurde (C)

3.3.2 Reduktion der Aggregation durch EPA-Inkubation in-vitro

3.3.2.1 In der LTA

Um den Einfluss von EPA auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten zu untersuchen, wurde PRP gesunder Proband*innen mit verschiedenen Stimuli in der LTA untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die ARA-induzierte Aggregationsfähigkeit signifikant und stark herabgesetzt wurde (Abb.27 A). Das durchschnittliche Maximum der Aggregation (MoA) konnte durch die Inkubation von 1000µM EPA auf etwa ein Viertel der Kontrollwerte reduziert werden (con: $82,99 \pm 6,29\%$ vs. 1000µM EPA: $20,87 \pm 36,34\%$, Friedmann Test, $p=0,0055$). Ein beispielhafter Graph ist unter Abb.27 D für die ARA-induzierte Aggregation dargestellt (Grün = Kontrolle, Blau = 250µM EPA, Rot = 500µM EPA, Schwarz = 1000µM EPA).

Eine signifikante Reduktion der Aggregation konnte ebenfalls unter ADP-Stimulation (Abb.27 B, con: $73,19 \pm 16,74\%$ vs. 1000µM EPA: $57,72 \pm 22,90\%$, Anova-Analyse, $p=0,0061$), wie auch unter Kollagenstimulation festgestellt werden (Abb.27 C, con: $87,45 \pm 3,85\%$ vs. 1000µM EPA: $70,44 \pm 23,49\%$, Friedmann Test, $p=0,0412$).

Bei allen verwendeten Stimuli zeigten sich konzentrationsabhängige Effekte (Abb.27 A-C). Der Effekt auf die ARA-induzierte Thrombozytenaggregation war deutlich stärker als der inhibierende Effekt auf die Aggregation mit ADP und Kollagen. Bei diesen beiden Stimuli zeigte sich eine Reduktion der MoA von etwa 20 Prozentpunkten. Dagegen zeigte EPA in der höchsten Konzentration eine Reduktion von etwa 60 Prozentpunkten auf die ARA-induzierte Aggregation.

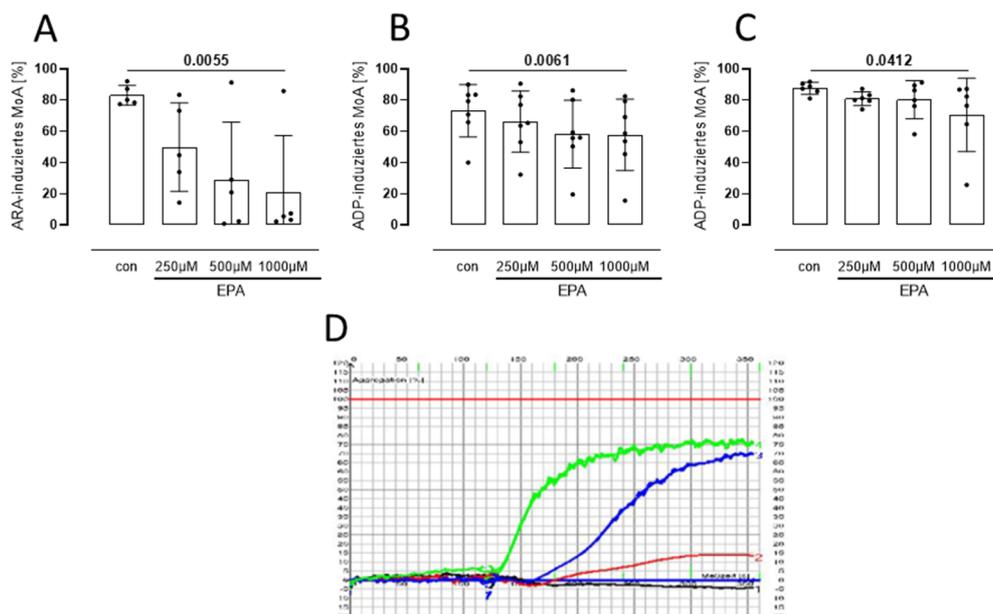


Abb.27: Reduktion der Thrombozytenaggregation durch EPA-Inkubation in-vitro

Dargestellt ist die maximale Aggregation unter vier verschiedenen Bedingungen mit drei verschiedenen Stimuli (ARA (A), ADP (B), Kollagen (C)). Ein exemplarischer Graph für die ARA-induzierte Aggregation unter EPA ist dargestellt (D, Grün=Kontrolle, Blau=250µM EPA, Rot=500µM EPA, Schwarz=1000µM EPA).

3.3.2.2 In der MIA

Um den Einfluss von EPA auf die Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten im Vollblut zu untersuchen, wurde das Blut zehn gesunder Proband*innen in der MIA untersucht. Dabei kamen verschiedene Stimuli zum Einsatz.

Die ARA-induzierte Aggregation wurde durch die Inkubation mit EPA signifikant reduziert (Abb.28 A, con: $51,10 \pm 10,04$ vs. $1000\mu\text{M}$ EPA: $33,60 \pm 14,55$, Anova-Analyse, $p=0,0055$). Die Aggregation unter ADP-Stimulation wurde ebenfalls signifikant reduziert (Abb.28 B, con: $21,33 \pm 12,05$ vs. $1000\mu\text{M}$ EPA: $12,11 \pm 6,43$, Anova-Analyse, $p=0,0060$). Ein identisches Bild zeigte sich auch bei der Aggregation mit Kollagen (Abb.28 C, con: $58,60 \pm 17,09$ vs. $1000\mu\text{M}$ EPA: $42,50 \pm 10,37$, Anova-Analyse, $p=0,0049$). Bei allen drei Stimuli konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung von EPA auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten im Vollblut gezeigt werden. Der stärkste Effekt konnte, wie auch bei den Untersuchungen in der LTA, bei der ARA-induzierten Aggregation ermittelt werden.

Um den möglichen Einfluss von EPA auf die Aggregationsfähigkeit des Blutes nach einer Plaqueruptur zu simulieren, wurde das Blut sechs gesunder Proband*innen mit $1000\mu\text{M}$ EPA inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Stimulation durch homogenisiertes humanes Plaquematerial (Abb.28 D). Eine deutliche und signifikante Reduktion der Aggregation konnte beobachtet werden (con: 30 ± 18 vs. $1000\mu\text{M}$ EPA: 5 ± 4 , gepaarter t-Test, $p=0,0120$).

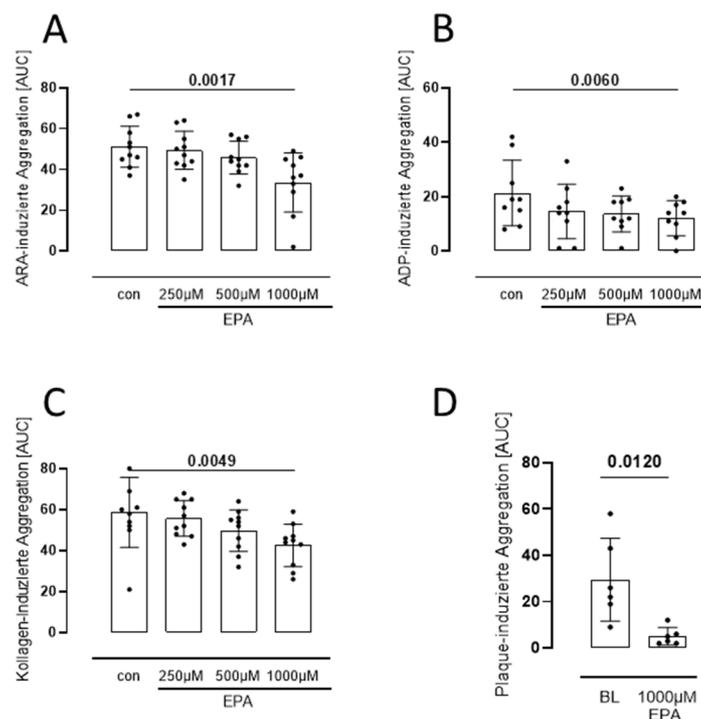


Abb.28: Reduktion der Thrombozytenaggregation im Vollblut durch EPA-Inkubation in-vitro

Dargestellt ist die Aggregation als AUC (Fläche unter der Kurve) unter vier verschiedenen Bedingungen mit drei verschiedenen Stimuli (ARA (A), ADP (B), Kollagen (C)). Die Analyse von Plaque-induzierter Aggregation (D) erfolgte nur mit $1000\mu\text{M}$ EPA.

3.3.3 Reduktion der Thrombozytendegranulierung in-vitro

3.3.3.1 Reduzierte *dense*-Granula-Freisetzung

Um den Einfluss von EPA auf die Degranulierung von *dense*-Granula aus mit ARA aktivierten Thrombozyten zu untersuchen, wurden die Thrombozyten von sieben gesunden Proband*innen analysiert. Dafür wurden sie mit EPA in drei verschiedenen Konzentrationen (250µM, 500µM, 1000µM) inkubiert. Nach Stimulation mit ARA erfolgte die Messung von ATP, welches ein löslicher Bestandteil der *dense*-Granula ist [33]. Eine signifikant verminderte Freisetzung von ATP konnte in diesem Versuch beobachtet werden (Abb.29). Die ATP-Freisetzung wurde unter höheren Konzentrationen (500µM, 1000µM) praktisch vollständig gehemmt. Lag die durchschnittliche ATP-Freisetzung unter Kontrollbedingungen noch bei $221,0 \pm 120,4$ nM, so reduzierte sich die Freisetzung unter 1000µM EPA auf $12,2 \pm 19,3$ nM (Friedmann-Test, $p=0,0002$). Es konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet werden.

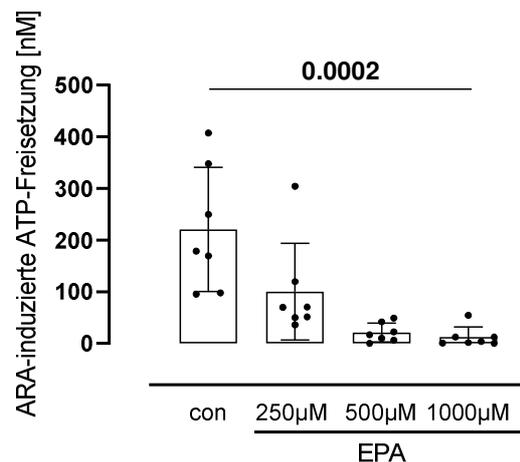


Abb.29: Reduzierte ARA-induzierte *dense*-Granula-Freisetzung nach EPA-Inkubation in-vitro

Dargestellt ist die Freisetzung von ATP aus mit ARA stimulierten Thrombozyten in Anwesenheit von EPA in verschiedenen Konzentrationen

3.3.3.2 Reduzierte *alpha*-Granula-Freisetzung

In diesem Versuch wurde der Einfluss einer EPA-Inkubation auf die Degranulierung der *alpha*-Granula aus Thrombozyten untersucht. Stellvertretend wurde dafür die Expression von p-Selektin untersucht, welches nach der Degranulierung von *alpha*-Granula als transmembranäres Adhäsionsprotein auf der Zelloberfläche detektierbar ist [132]. Dafür wurde das Blut von 19 gesunden Proband*innen analysiert. Nach einmaliger EPA-Inkubation in drei verschiedenen Konzentrationen (250µM, 500µM, 1000µM) erfolgte die Aktivierung der Thrombozyten mit ARA. Im Anschluss wurde der Anteil an p-Selektin-positiven Thrombozyten mittels FACS ermittelt. Eine signifikante Reduktion der p-Selektinexpression konnte beobachtet werden (Abb.30 A, con: $70,57 \pm 26,89\%$; 1000µM EPA: $42,67 \pm 22,49\%$; Anova-Analyse, $p<0,0001$). Im Vergleich der verwendeten EPA-

Dosierungen zeigt sich keine Konzentrationsabhängigkeit. Der maximale Effekt war bereits bei einer Dosierung von 250µM erreicht. Eine weitere Reduktion durch die Erhöhung der EPA-Konzentration konnte nicht verzeichnet werden. Beispielhafte Bilder der FACS-Daten sind beigefügt (Abb.30 B).

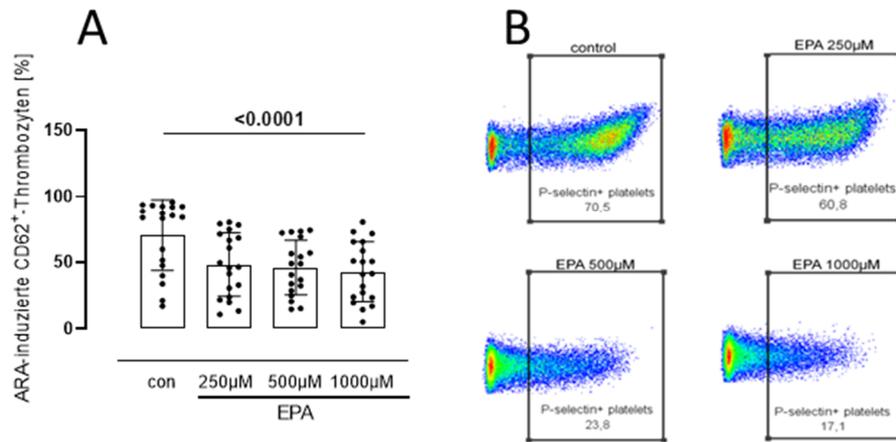


Abb.30: Reduzierte ARA-induzierte *alpha*-Granula-Freisetzung nach EPA-Inkubation in-vitro

Dargestellt der Anteil p-Selektin (CD62) -positiver Thrombozyten nach ARA-Stimulation in Anwesenheit von EPA in verschiedenen Konzentrationen (A). Beispielbilder der FACS-Daten (B) sind beigefügt (oben links: Kontrollbedingungen, oben rechts: Inkubation mit 250µM EPA, unten links: Inkubation mit 500µM EPA, unten rechts: Inkubation mit 1000µM EPA)

3.3.3.3 Verminderte Bildung von TXB2

Die Thrombozyten von sieben gesunden Proband*innen wurden hinsichtlich der TXB2-Bildung untersucht. Die TXB2-Bildung steht stellvertretend für die Freisetzung von TXA2, welches allerdings in wässrigen Lösungen instabil ist und zu TXB2 oxidiert [44]. Die Inkubation von EPA reduzierte die ARA-induzierte Bildung von TXB2 in signifikanter Art und Weise (Abb.31, con: 7,82 ± 2,79ng/mL; 1000µM EPA: 4,27 ± 2,28ng/mL, Anova-Analyse, p=0,0132). Eine Konzentrationsabhängigkeit war innerhalb der untersuchten Dosierungen nicht zu erkennen. Die gemessene TXB2-Konzentration war mit 4,50 ± 2,55ng/mL bei 250µM EPA in etwa so groß wie mit der höchsten untersuchten EPA-Dosierung.

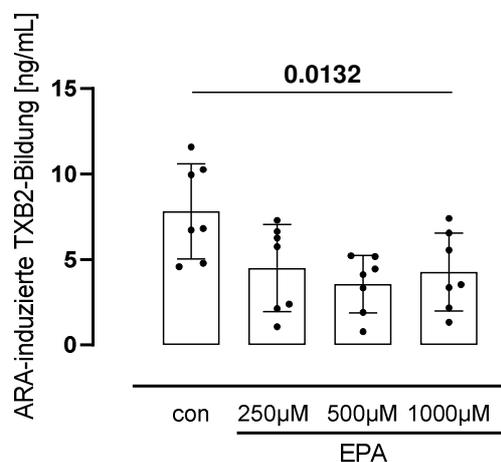


Abb.31: Reduzierte ARA-induzierte Bildung von TXB2 nach EPA-Inkubation in-vitro

3.3.4 Reduktion des intrazellulären Calcium Signalling durch EPA

Nachdem bereits die Wirkung von EPA auf die Degranulierung von *alpha*- und *dense*-Granula gezeigt werden konnte, wurde das intrazelluläre Calcium Signalling in Thrombozyten acht gesunder Proband*innen analysiert. Calcium wird bei der Thrombozytenaktivierung aus intrazellulären Speichern (bspw. Endoplasmatisches Retikulum) in das Zytosol freigegeben. Dort dient es als ein wichtiger *second-messenger*. Ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel ist entscheidend für die Degranulierung von Vesikeln und für die Thrombozytenaggregation [38]. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass sich die maximale intrazelluläre Konzentration freier Calciumionen durch ARA-Stimulation durch eine vorherige EPA-Inkubation reduziert (Abb.32 A). Dieser Befund war signifikant (con: $871,9 \pm 314,4\text{nM}$; $1000\mu\text{M}$ EPA: $301,9 \pm 120,9\text{nM}$, Anova-Analyse, $p=0,0010$). Entsprechend dazu zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Delta zwischen maximaler und minimaler Calciumkonzentration während des Versuches (Abb.32 B, con: $868,5 \pm 318,4\text{nM}$; $1000\mu\text{M}$ EPA: $247,0 \pm 146,5\text{nM}$, Anova-Analyse, $p=0,0015$). Der exemplarische Graph eines Proband*innen (Abb.32 C) ist zur Veranschaulichung beigefügt. Der maximale Effekt konnte in diesem Versuch bereits bei der $250\mu\text{M}$ EPA-Dosis erkannt werden. Eine Steigerung des Effektes zeigte sich bei zunehmender EPA-Konzentration nicht.

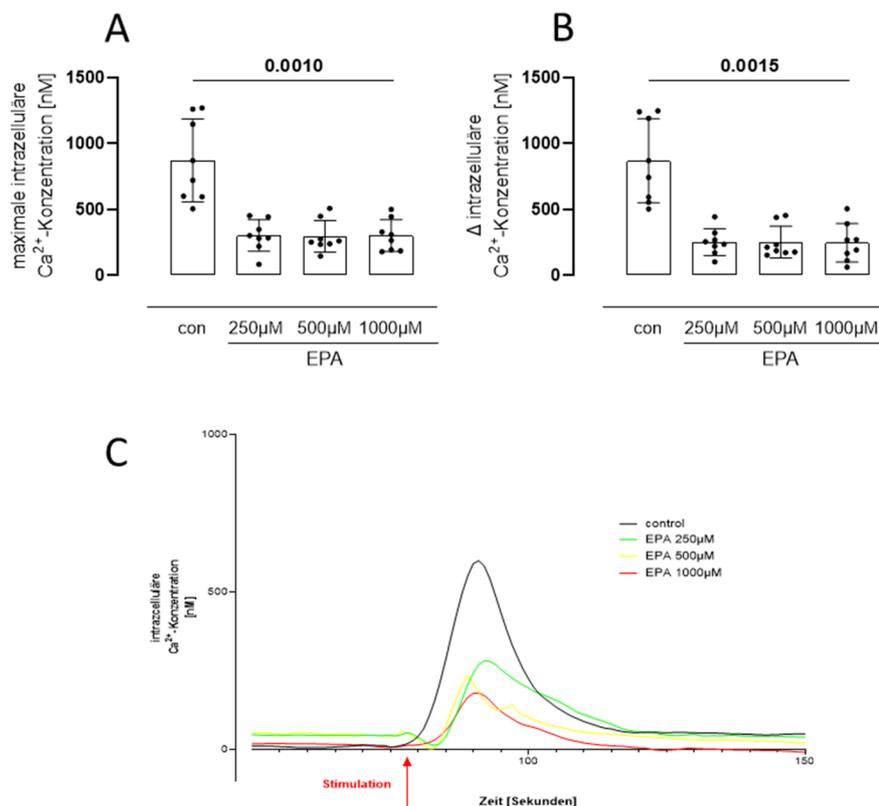


Abb.32: Reduzierte ARA-induzierte Konzentrationen freier Calciumionen in Thrombozyten nach EPA-Inkubation in-vitro

Sowohl die maximale Konzentration freier Calcium (Ca^{2+}) -Ionen (A), als auch das Delta freier intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen (B) ist durch EPA-Inkubation durch ARA-Stimulation vermindert. Die beispielhafte Darstellung eines Graphen (C) veranschaulicht das.

3.4 EPA verringert den Effekt von ARA auf das Thrombozytenproteom und Phosphoproteom in verschiedenen intrazellulären Signalwegen

3.4.1 Heatmap zum (Phospho-)Proteom ARA-aktivierter Thrombozyten in-vitro

Um neben den gezeigten inhibierenden Effekten von EPA eine Aussage über möglicherweise beeinflusste Signalwege zu erhalten, wurde eine Analyse des Proteoms und des Phosphoproteoms in Thrombozyten fünf gesunden Proband*innen durchgeführt. Die Probenvorbereitung, EPA-Inkubation und ARA-Stimulation fanden in Düsseldorf statt. Die Analyse der Proben erfolgte freundlicherweise in Dortmund (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS – e.V). Im ersten Schritt wurde eine sog. Heatmap erstellt. Diese zeigt über eine Farbskala eine relative Veränderung der Menge bestimmter Proteine in den Proben im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollproben. Insgesamt wurden mehrere hundert Proteine untersucht. In dieser Heatmap sind alle Proteine mit signifikanten Veränderungen aufgeführt. Es zeigte eine deutliche Veränderung der Proteinmengen zwischen den ARA-stimulierten Proben und den Proben, die zusätzlich vorher mit EPA inkubiert wurden (Abb.33). Da es sich bei diesem Versuchsaufbau um eine kurzfristige Inkubation in-vitro handelt, ist besonders der Blick auf die Phosphorylierungen der verschiedenen Proteine interessant. Bei insgesamt 30 Phosphoproteinen konnte eine reduzierte Phosphorylierung beobachtet werden (Abb.33 rechts). Eine detaillierte Darstellung ausgewählter Phosphoproteine folgt im nächsten Abschnitt.

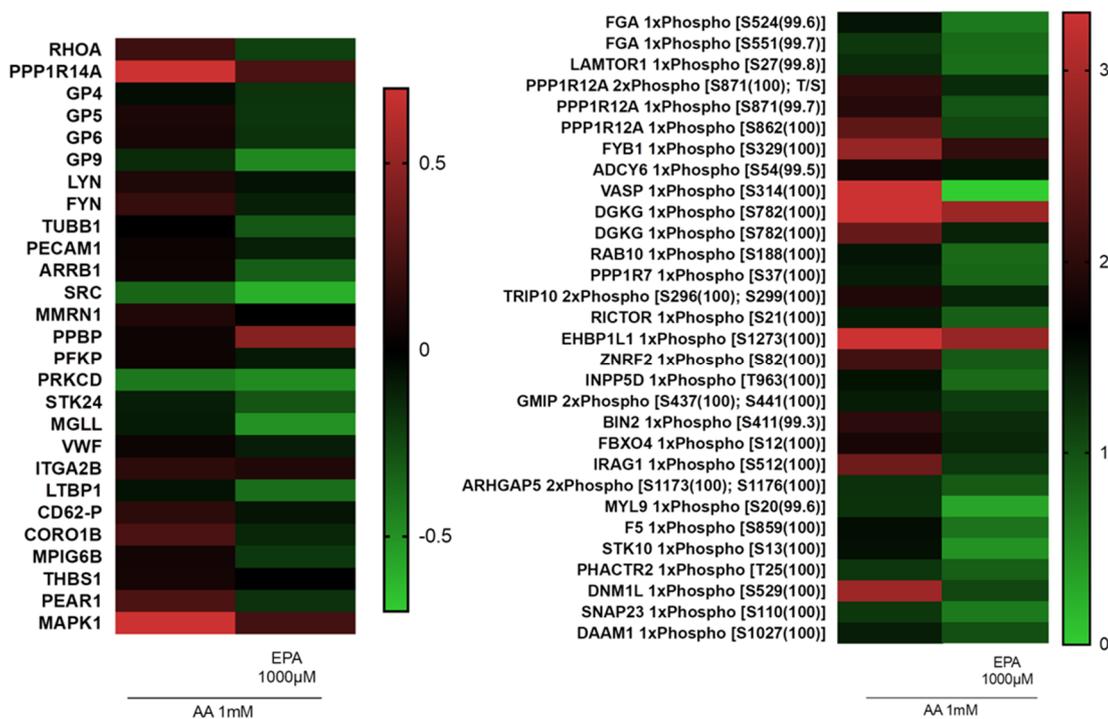


Abb.33: Heatmap der Proteom- (links) und Phosphoproteomanalysen (rechts) nach in-vitro Inkubation mit EPA und ARA-Stimulation

Auf der linken Seite der Heatmaps sind die Proteinennamen entsprechend der aktuell gültigen UniProt-Bezeichnung aufgeführt [133]

3.4.2 Analyse ausgewählter Phosphoproteine

In der Folge werden die Ergebnisse von neun ausgewählten Phosphoproteinen detaillierter erläutert. Die Proteine wurden so gewählt, dass sie einen Rückschluss auf veränderte intrazelluläre Signalwege zulassen. Alle gezeigten Proteine unterschieden sich statistisch nach Anova-Analyse mit anschließendem *Tukey multiple comparison* zwischen der ARA und der ARA+EPA Gruppe. Die phosphorylierte alpha-Kette des Fibrinogens (FGA) war in diesem Versuchsaufbau signifikant verändert (Abb.34 A). Diese wird durch Thrombin nach Aktivierung der Aggregation abgespalten [134]. Erwartungsgemäß führte eine ARA-Stimulation zur Erhöhung der Proteinmenge, während die vorherige Inkubation mit EPA zu einer Reduktion auf Kontrollniveau führte (Anova-Analyse, $p=0,0017$).

Ein ähnliches Bild konnte auch bei der phosphorylierten Adenylatcyclase Type 6 (ADCY6) beobachtet werden (Abb.34 B). Dieses Protein ist für die Synthese von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) verantwortlich. Dieses stellt eine wichtige Regulationsfunktion in der Thrombozytenaggregation dar [135]. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Veränderung (Anova-Analyse, $p=0,0011$).

Die Analyse des Vasodilatator-stimuliertes Phosphoproteins (VASP) bestätigte den inhibierenden Effekt von EPA auf die ARA-induzierte Aggregation (Abb.34 C). VASP ist ein wichtiges Regulatorprotein, welches in phosphorylierter Form die Thrombozytenaktivierung inhibieren kann [136, 137]. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion zwischen den Proben mit EPA-Inkubation im Vergleich zu den Proben, die nur mit ARA stimuliert wurden (Anova-Analyse, $p=0,0074$).

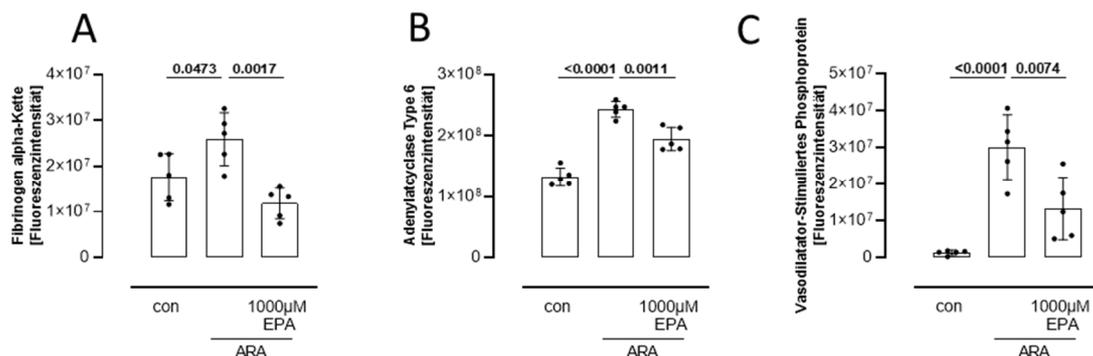


Abb.34: Einfluss einer EPA-Inkubation auf die Phosphorylierung ausgewählter Proteine nach ARA-Stimulation
Dargestellt sind die alpha-Kette des Fibrinogens (A), Adenylatcyclase Type 6 (B) und VASP (C)

Mit der Diacylglycerolkinase gamma (DAGKG) ist die Phosphorylierung eines zentralen Proteins der Thrombozytenaggregation signifikant beeinflusst (Abb.36 A, Anova-Analyse, $p=0,0030$). Die damit verbundene Aktivitätssteigerung führt zu einer vermehrten Verstoffwechslung von DAG, welches ein zentraler Mediator in der Thrombozytenaktivierung ist (s. Abb.35)

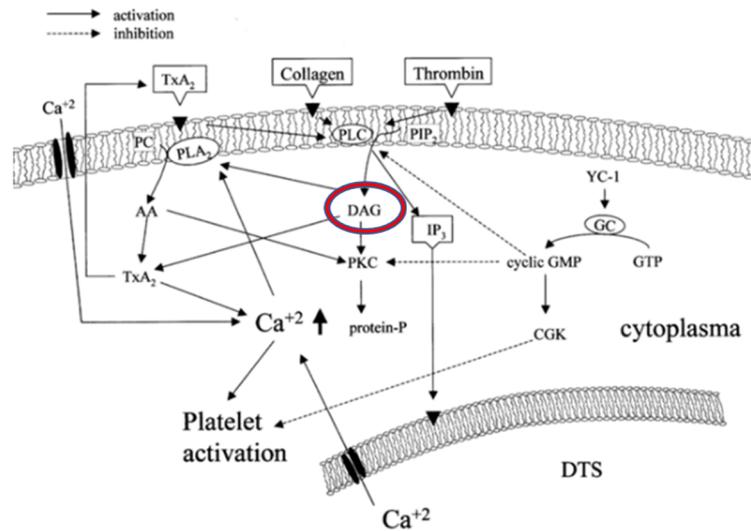


Abb.35: Diacylglycerol als zentraler der Thrombozytenaktivierung [138]

Ein weiteres Protein, welches in der Regulation der Thrombozytenaggregation beteiligt ist, ist die Phosphoinositid-3-Kinase [139]. Dieses wird negativ von der Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-5-Phosphatase 1 reguliert (INPP5D) [140]. Bei diesem Protein konnte ebenfalls eine Veränderung im bekannten Versuchsaufbau detektiert werden (Abb.36 B, Anova-Analyse, $p=0,0047$).

Die regulatorische Untereinheit 7 der Proteinphosphatase 1 (PPP1R7) ist ebenfalls im Prozess der Thrombozytenaggregation beteiligt [141]. Eine Reduktion der Phosphorylierung dieser Untereinheit konnte unter der EPA-Inkubation im Vergleich zur alleinigen ARA-Stimulation beobachtet werden (Abb.36 C, Anova-Analyse, $p=0,0095$).

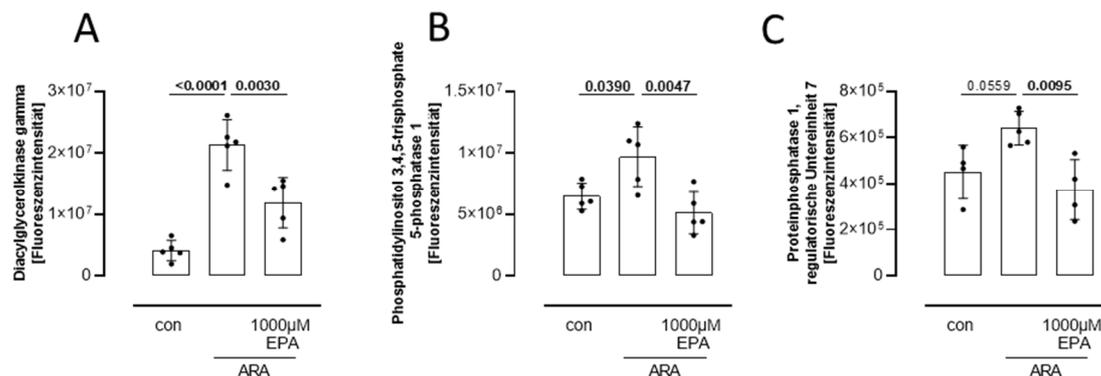


Abb.36: Einfluss einer EPA-Inkubation auf die Phosphorylierung ausgewählter Proteine nach ARA-Stimulation. Dargestellt sind die Diacylglycerolkinase gamma (A), Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-5-Phosphatase 1 (B), und die regulatorische Untereinheit 7 der Proteinphosphatase 1 (C)

Bei der Analyse der phosphorylierten Proteine waren nicht nur solche verändert, die an der Aggregation direkt beteiligt sind, sondern auch Proteine, die in anderen Prozessen eine Rolle spielen. Das phosphorylierte Synaptosomal-assoziierte Protein 23 (SNAP-23) war in den Proben mit vorheriger EPA-Inkubation im Vergleich zur alleinigen ARA-Stimulation

erniedrigt (Abb.37 A, Anova-Analyse, $p=0,0582$). SNAP-23 ist an der Degranulierung von *alpha*- und *dense*-Granula aus aktivierten Thrombozyten beteiligt [142].

Das Dynamin-1-like Protein (DNML1) ist ebenfalls an der Exozytose der Thrombozytengranula beteiligt [143]. Auch hier konnte eine Veränderung der Phosphorylierung im bekannten Versuchsaufbau gezeigt werden (Abb.37 B, Anova-Analyse, $p=0,0430$). Die signifikante Veränderung (Abb.37 C, Anova-Analyse, $p=0,0030$) der Phosphorylierung des Inositol 1,4,5-trisphosphatrezeptors Type 1 deutet auf eine veränderte Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum [144]. Bei allen drei Proteinen, die einen Rückschluss auf die Freisetzung von Calcium oder der Degranulierung zulassen, führte die Inkubation mit EPA auf das jeweilige Kontrollniveau der Proteinphosphorylierung.

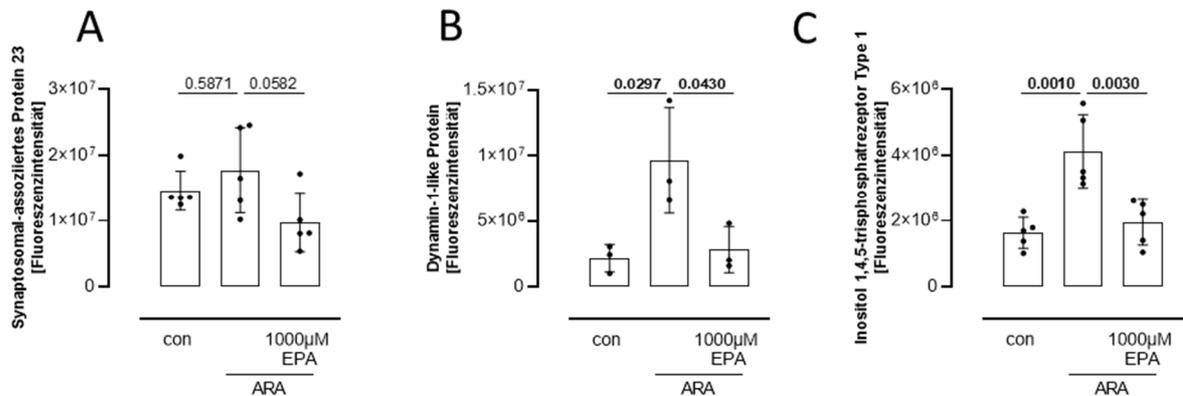


Abb.37: Einfluss einer EPA-Inkubation auf die Phosphorylierung ausgewählter Proteine nach ARA-Stimulation
Dargestellt sind die SNAP-23 (A), Dynamin-1-like Protein (B), und Inositol 1,4,5-trisphosphatrezeptor Type 1 (C)

3.5 EPA und ARA agieren kompetitiv um die thrombozytäre COX-1

3.5.1 EPA zeigt keinen Effekt auf die Thrombozytenfunktion bei pharmakologischer COX-1-Inhibition

Da die bisherigen Ergebnisse eine COX-1-Abhängigkeit vermuten ließen, wurde in den folgenden Versuchen die Thrombozytenfunktion in verschiedenen Analysemethoden unter pharmakologischer COX-1-Blockade untersucht. Dafür wurde ASS als irreversibler Inhibitor der COX-1 gewählt [44] und das Blut gesunder Proband*innen in-vitro analysiert. EPA konnte in der LTA-Messung keinen zusätzlichen Effekt auf die ASS-inhibierte ARA-induzierte Aggregation zeigen (Abb.38 A, gepaarter t-Test, $p > 0,05$). Die Konzentration von ASS (30 μ M) reduzierte die maximale Aggregation der Proben allerdings so stark, dass ein Effekt von EPA kaum detektierbar gewesen wäre. Aus diesem Grund wurden weitere Versuche mit identischem Versuchsaufbau durchgeführt. EPA konnte auch in der ARA-induzierten TXB₂-Bildung (Abb.38 B, gepaarter t-Test, $p = 0,05$), und in der Thrombozytenadhäsion auf einer kollagenbeschichteten Flusskammer (Abb.38 C, ungepaarter t-Test, $p > 0,05$) keinen zusätzlichen Effekt zeigen. In beiden Versuchen wäre eine zusätzliche Reduktion der ASS-Wirkung möglich gewesen. So kann man abschließend zusammenfassen, dass EPA keinen Effekt vermittelt, wenn die thrombozytäre COX-1 bereits durch ASS inhibiert ist.

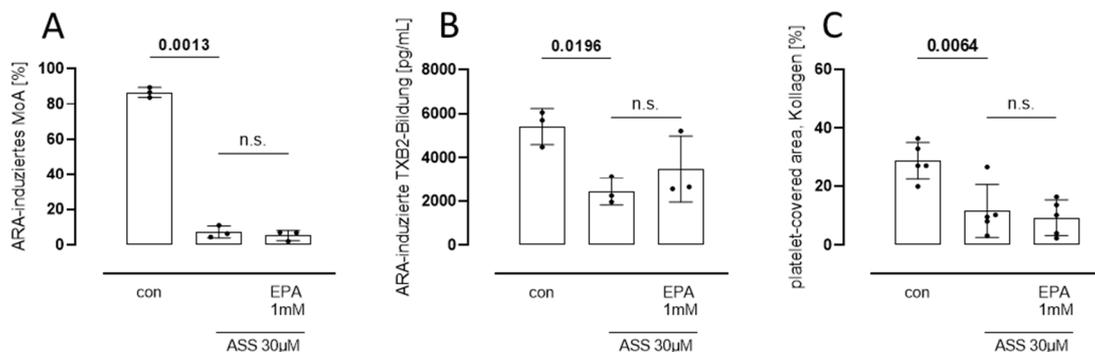


Abb.38: EPA zeigt keinen zusätzlichen Effekt bei vorheriger ASS-Inkubation bei Thrombozyten gesunder Proband*innen in-vitro

(A) In der ARA-induzierten Aggregation, (B) in der ARA-induzierten TXB₂-Bildung, (C) in der Thrombozytenadhäsion in einer kollagenbeschichteten Flusskammer, n.s. = nicht signifikant

3.5.2 EPA und ARA agieren kompetitiv

EPA konnte keinen zusätzlichen Effekt auf die Thrombozytenfunktion zeigen, wenn die COX-1 pharmakologisch irreversibel inhibiert wurde. Der Rückschluss, dass EPA ebenfalls über die COX-1 seine Wirkung vermittelt liegt deshalb nahe. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um eine kompetitive oder irreversible Hemmung handelt, wurden die Aggregationsfähigkeit von EPA-behandelten Thrombozyten mit ansteigenden ARA-Konzentrationen analysiert. Als Vergleich diente der identische Versuchsaufbau mit ASS, als Stellvertreter einer irreversiblen Inhibition der COX-1 (Abb.39). Während steigende ARA-Konzentrationen bei der irreversiblen COX-1-Inhibition keine steigenden Aggregationen zeigten, konnte die maximale Aggregation unter EPA-Vorbehandlung signifikant gesteigert werden (0,5mM: 25,84 ± 31,40%, 1,0mM: 78,29 ± 4,70%, 2,0mM: 65,92 ± 20,85%, Anova-Analyse, p=0,0313). Es scheint eine Verdrängung von EPA durch die steigenden ARA-Konzentrationen zu geben. Dies lässt den Rückschluss einer kompetitiven Hemmung zu.

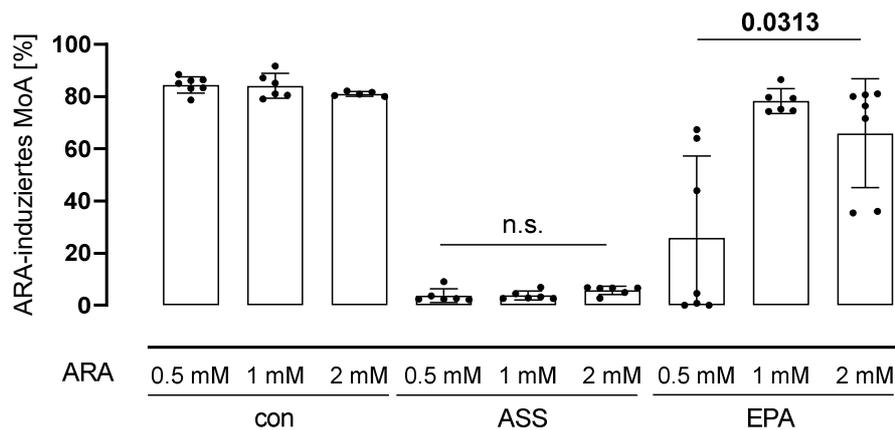


Abb.39: steigende ARA-Konzentrationen können die EPA-Wirkung auf die Aggregationsfähigkeit mindern, bei einer ASS-Inkubation ist dieser Effekt nicht zu sehen, n.s. = nicht signifikant

3.5.3 Keine veränderte Freisetzung von ARA und EPA aus der Thrombozytenmembran nach zehntägiger IPE-Supplementation

Um zu analysieren, ob der IPE/EPA-vermittelte Effekt auf die COX-1 durch eine veränderte Komposition der Thrombozytenmembran vermittelt wird, wurde das Verhältnis von C20:4- und C20:5-Fettsäuren in der Membran untersucht. Eine zehntägige IPE-Supplementation führte nicht zu einem veränderten Verhältnis von C20:4- und C20:5-Fettsäuren (Abb.40). Die Thrombozyten gesunder Proband*innen wurden vor und nach zehntägiger IPE-Supplementation ex-vivo mit ARA stimuliert. Das Verhältnis der C20:4- und C20:5-Fettsäuren zwischen ARA-stimulierten Proben und den Kontrollproben veränderte sich im gleichen Maße (ungepaarter t-Test, $p > 0,05$). Eine veränderte Lipidkomposition der Thrombozytenmembran mit veränderter auto- und parakriner Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung ist demnach nicht der Grund für den antithrombozytären Effekt von IPE/EPA.

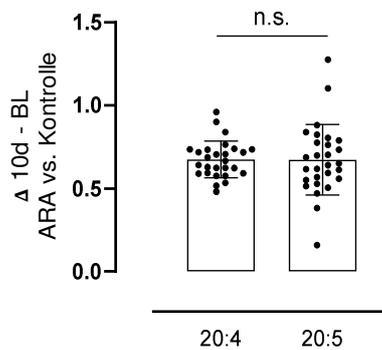


Abb.40: die relativen Veränderungen der Lipidkomposition aus der Thrombozytenmembran sind für C20:4- und C20:5-Fettsäuren nach zehntägiger IPE-Supplementation identisch

3.5.4 Eine virtuelle Docking Analyse zeigt ähnliche Affinitäten von ARA und EPA im aktiven Zentrum der COX-1

Die virtuelle Docking Analyse wurde von unserem Forschungspartner Dr. Christoph Dücker (Institut für klinische Pharmakologie, Universitätsklinik Göttingen) durchgeführt. Die Analyse zeigt, dass ARA als physiologisches und bekanntes Substrat der COX-1 (Abb.41 A) eine ähnliche Affinität für das aktive Zentrum zeigt wie EPA (Abb.41 B). Visualisiert wurde jeweils die Konformation mit der höchsten Affinität. In der Tabelle jeweils rechts daneben sieht man die Affinitäten der neun Konformationen, die die höchsten Affinitätswerte ergaben. Diese Analyse konnte einen weiteren Hinweis auf eine direkte COX-1-Wirkung durch EPA geben.

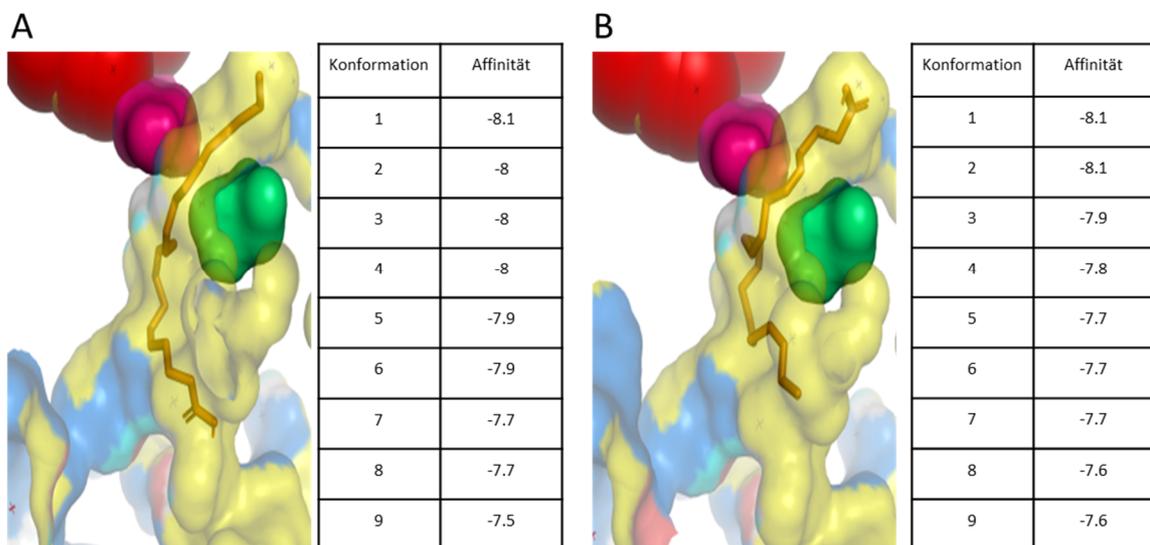


Abb.41: Ergebnisse der virtuellen Docking Analyse

Die Ergebnisse der Analyse mit ARA (A) und EPA (B) in COX-1 zu dargestellt. Jeweils links befindet sich die graphische Darstellung der Konformation mit der höchsten Affinität, wobei die Fettsäuren in orange dargestellt sind. Hydrophobe Bereich sind in Gelb und hydrophile Bereiche in blau zu erkennen. Das aktive Zentrum befindet sich zwischen Serin530 (grün) und Tyrosin385(pink). Der Kofaktor Häm B ist rot dargestellt.

3.6 Die pharmakologische COX-1-Inhibition, sowie die genetische COX-1-Defizienz heben den EPA-Effekt in der arteriellen Thrombusformation auf

3.6.1 Pharmakologische COX-1-Inhibitor

In den vorangegangenen in-vitro Untersuchungen humaner Thrombozyten konnte bereits gezeigt werden, dass die zusätzliche Applikation von EPA zu einer pharmakologischen Inhibition der COX-1 durch ASS keinen ergänzenden Effekt bringt. Dieser Befunde sollte nun in-vivo im Mausmodell bestätigt werden. Dazu wurde Mäusen, denen bereits über 14 Tage IPE appliziert wurde, einmalig mit ASS behandelt. Im Anschluss wurde eine arterielle Thrombose induziert und die Daten der Thrombusformation über die Zeit analysiert. Keine Maus entwickelte während der einstündigen Aufnahmezeit eine vollständige Okklusion der Carotis (Abb.42 A). Aus diesem Grund entfiel auch die Analyse der Dauer der ersten Okklusion. Um dennoch einen möglichen Effekt untersuchen zu können, wurde die maximale Thrombusgröße in beiden Gruppen bestimmt (Abb.42 B). Es zeigte sich kein zusätzlicher Effekt der IPE-Behandlung im Vergleich zur einmaligen pharmakologischen Inhibition der COX-1 durch ASS (ASS: $121974 \pm 77183 \mu\text{m}^2$, IPE+ASS: $161821 \pm 76952 \mu\text{m}^2$, ungepaarter t-Test, $p > 0,05$)

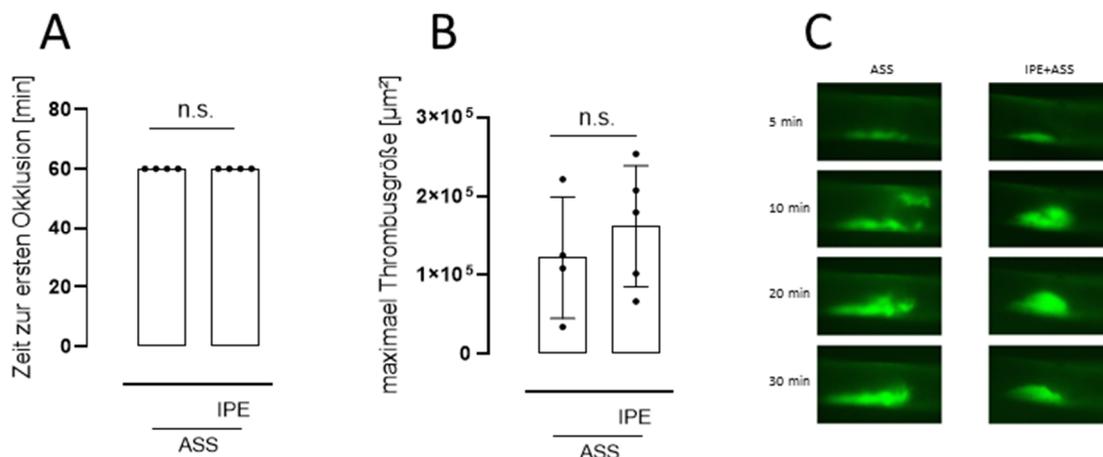


Abb.42: Die Behandlung mit ASS hebt den EPA-vermittelten Effekt auf die arterielle Thrombusbildung in der Maus auf

Dargestellt ist die Zeit zur ersten Okklusion der Carotis (A), die maximale Thrombusgröße (B) sowie exemplarische Beispielbilder beider Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (C), n.s. = nicht signifikant

3.6.2 Genetische COX-1-Defizienz

Um den Einfluss von EPA auf die thrombozytäre COX-1 noch direkter untersuchen zu können, wurde die IPE-Supplementation und die anschließende Analyse der arteriellen Thrombusformation bei murinen Knochenmarkschimären durchgeführt. Bestrahlten, aber sonst gesunden Mäusen wurde das Knochenmark von thrombozytären und endothelialen COX-1-defizienten Mäusen transplantiert. Da das Endothel der Empfängermaus intakt blieb, wurden so Knochenmarkschimären generiert, die lediglich in den Thrombozyten

COX-1-defizient waren. Um den Einfluss der Bestrahlung selbst beurteilen zu können, wurde ebenfalls Mäuse untersucht, die das Knochenmark der Wildtyp-Wurfgeschwister erhielten. Der Chimärismus der Mäuse wurde am Versuchsende mittels FACS-Analyse quantifiziert. Es wurde das Verhältnis von CD45.1-positiven Leukozyten (vom Empfänger Knochenmark gebildet) und CD45.2-positiven Leukozyten (vom Spender Knochenmark gebildet) bestimmt. Durchschnittlich $84,70 \pm 5,34\%$ der Leukozyten stammten aus dem Spender Knochenmark. Da eine durchschnittliche Quote von 80% als Erfolg angesehen wird [122, 123], wurde kein Tier aufgrund eines zu geringen Chimärismus ausgeschlossen. Ein exemplarischer FACS-Plot ist beigefügt (Abb.43)

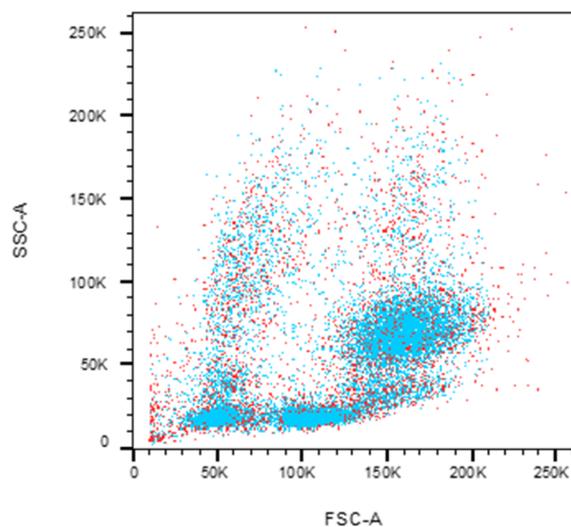


Abb.43: Beispielhafter FACS-Plot einer Chimärismusanalyse

Dargestellt sind Leukozyten (CD45-positive Zellen) eines Knochenmarkschimären Mäus. Die Aufteilung der Zellen erfolgt nach Größe (FSC= forward scatter) und Granularität (SSC= sideward scatter). Die blauen Punkte entsprechen CD45.2-positiven Zellen, die von Spender Knochenmark gebildet wurden, die roten Punkte zeigen CD45.1-positive Zellen, die von Empfänger Knochenmark gebildet wurden

Bei der Analyse der arteriellen Thrombusformation bestrahlter Mäuse zeigte sich bei den Tieren mit funktionsfähiger COX-1 in den Thrombozyten das identische Bild wie bei gesunden Mäusen (Abb.44 A-C). Einen direkten Einfluss der zurückliegenden Bestrahlung, der Antibiotikagabe und des erhöhten Alters konnte nicht festgestellt werden. Die Zeit bis zur ersten Okklusion, die Dauer der ersten Okklusion und die maximale Thrombusgröße wurden durch die IPE-Supplementation wie bekannt signifikant verändert. Bei den Tieren, die das COX-1-defiziente Knochenmark erhielten, war dies nicht der Fall. Bei den Mäusen mit thrombozytäre COX-1-Defizienz konnte keine vollständige Okklusion der Carotis beobachtet werden (Abb.44 A). Dementsprechend konnte auch die Dauer einer möglichen ersten Okklusion nicht analysiert werden (Abb.44 B). Da die thrombozytäre COX-1 essenziell an der Thrombusformation beteiligt ist [145], lag dieses Ergebnisse bereits vor Versuchsbeginn im Erwartungsbereich. Um dennoch eine Aussage über einen möglichen

additiven Effekt vor IPE treffen zu können, wurde die maximale Thrombusgröße untersucht (Abb.44 C). Es konnte kein Unterschied zwischen IPE-behandelten und unbehandelten COX-1-defizienten Mäusen festgestellt werden (ohne IPE: $226538 \pm 100060 \mu\text{m}^2$, mit IPE: $215115 \pm 58949 \mu\text{m}^2$, ungepaarter t-Test, $p > 0,05$). Da die Tierzahl gering und die SD in einer Gruppe etwas erhöht war, wurde zusätzlich histologische Untersuchungen der Thromben durchgeführt.

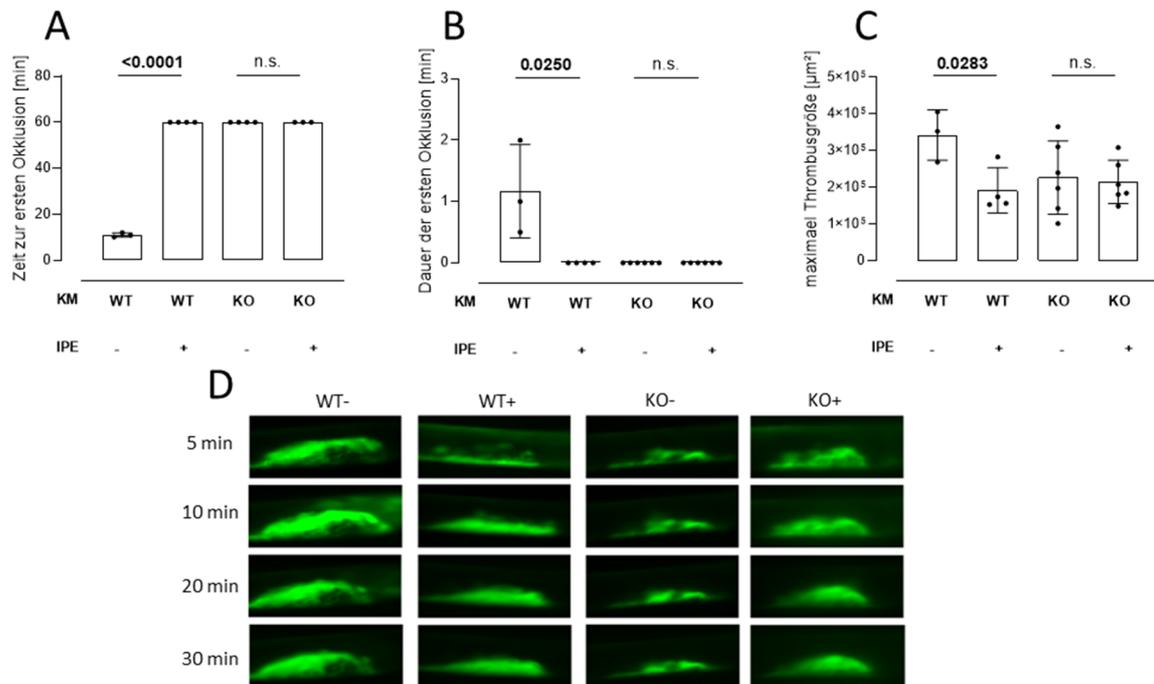


Abb.44: Analyse der arteriellen Thrombusformation COX-1-defizienter Knochenmarkschimären

Abgebildet sind die Zeit zur ersten Okklusion (A), die Dauer der ersten Okklusion (B) und die maximale Thrombusgröße während der 60-minütigen Aufnahme (C). Exemplarische Beispielbilder zu unterschiedlichen Zeitpunkten in allen Versuchsgruppen sind beigefügt (D). n.s. = nicht signifikant, KM = Knochenmark, WT = Wildtyp-Wurfgeschwister, KO = Knockout (COX-1-Defizienz), - = keine Behandlung mit IPE, + = IPE-Behandlung

In der histologischen Analyse der Thromben bestätigte sich das schon bekannte Bild. Die Verteilungsdichte der Thrombozyten wurde mittels CD41-Färbung gemessen. Innerhalb des Blutgefäßes zeigte sich keine Veränderung durch IPE-Supplementation auf den Anteil der CD41-postiven Fläche (Abb.45 A). Ein identisches Bild zeigte auch die Färbung von Fibrinogen (Abb.45 B). Die Lücken innerhalb der Thromben wurden ebenfalls ermittelt. Der Anteil an CD41-negativer (Abb.45 C) und Fibrinogen-negativer (Abb.45 D) Flächen wurde durch eine IPE-Supplementation bei thrombozytärer COX-1-Defizienz nicht verändert (jeweils ungepaarte t-Tests, $p > 0,05$). Die Analyse der bestrahlten Kontrollmäuse bestätigte, dass der Bestrahlungsprozess selbst keinen Einfluss auf die IPE-Wirkung hat. Die Daten zeigen das bereits bekannt Bild (Abb.45 A-D).

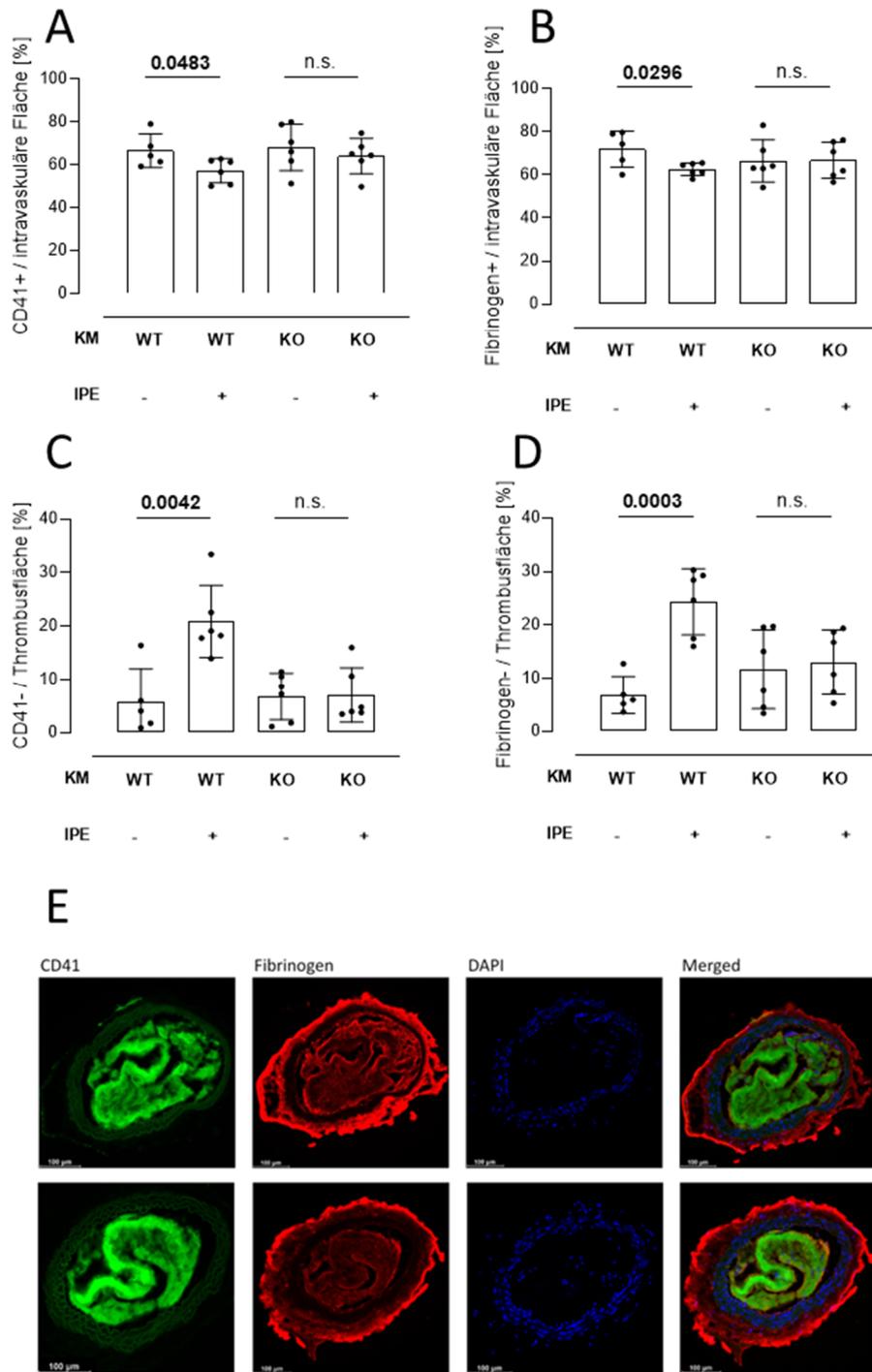


Abb.45: Histologische Analyse der arteriellen Thromben COX-1-defizienter Knochenmarkschimären

Dargestellt sind die Daten für CD41-positives (A) und Fibrinogen-positives (B) Thrombusgewebe innerhalb der Carotis, sowie die CD41-negative (C) und Fibrinogen-negative (D) Fläche innerhalb der Thromben. Beispielhafte Bilder für alle Färbungen sind beigefügt (E). Oben: COX-1-defizientes KM ohne IPE-Gabe, unten: COX-1-defizientes KM mit IPE-Gabe
 CD41-positives Gewebe ist in Grün dargestellt, während Fibrinogen-positives Gewebe in Rot dargestellt ist. DAPI färbt Zellkerne blau, n.s. = nicht signifikant, KM = Knochenmark, WT = Wildtyp-Wurfgeschwister, KO = Knockout (COX-1-Defizienz), - = keine Behandlung mit IPE, + = IPE-Behandlung

4 Ergebnisse Teil 2: Einfluss von HDL auf das Auskommen AMI in der Maus

4.1 Versuchsaufbau

In der Vergangenheit gab es kontroverse Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung von HDL bei akuten ischämischen Ereignissen. So gibt es Analysen, die einen positiven Effekt hoher HDL-Spiegel klar herausarbeiteten [78], wie auch Untersuchungen, die keinen Benefit einer erhöhten HDL-Konzentration feststellen konnten [82, 87]. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der Einfluss einer akuten HDL-Gabe vor einem AMI untersucht. Hierzu wurde zum einen HDL gesunder Proband*innen gewonnen. Zum anderen wurde das HDL dreizehn Typ 2-Diabetiker*innen (Alter: 53 ± 18 Jahre, Gewicht: 102 ± 33 kg, BMI: 32 ± 9 , Anteil Frauen: 23%) isoliert. Dieses wurde in Dosis von $43\mu\text{g/g}$ Körpergewicht gesunden C57BL6/J-Mäusen injiziert. Eine halbe Stunde später erfolgte ein Ischämie/Reperusionsversuch (I/R) zur Induktion eines AMI. Der Einfluss des HDL wurde mittels echokardiographischer Untersuchungen und TTC-Färbung zur Determination der Infarktgröße bestimmt. Insgesamt wurden neun Kontrolltiere, sowie jeweils sieben Tiere mit gesundem HDL und diabetischem HDL (dmHDL) operiert. Ein Tier aus der HDL- und ein Tier aus der dmHDL-Gruppe verstarben vor Versuchsende.

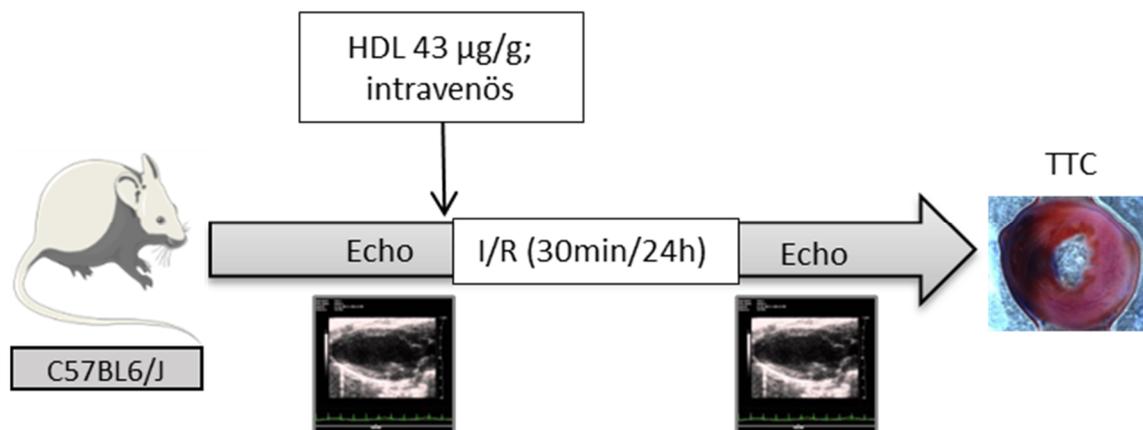


Abb.46: Versuchsaufbau zur Analyse des HDL-Effektes nach akutem Myokardinfarkt

Gesunde C57BL6/J-Mäuse durchlaufen einen Ischämie/Reperusionsversuch (I/R) mit 30-minütiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion im Anschluss. Echokardiographische Untersuchungen finden vor und 24h nach AMI statt. Die HDL-Injektion findet 30 Minuten vor der Ischämie statt. Nach 24-stündiger Reperfusion wird die Infarktgröße mittels TTC-Färbung bestimmt.

4.2 Das HDL von Typ 2-Diabetikern zeigt keine Kardioprotektion

Die Gabe von HDL gesunder Proband*innen führte erwartungsgemäß [79] zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße 24h nach AMI (Abb.47 A, Con: $42,72 \pm 5,70\%$, HDL: $33,04 \pm 4,34\%$, Anova-Analyse, $p=0,0438$). Die Infarktgröße der Tiere, die mit dmHDL behandelt wurden, unterschieden sich hingegen nicht von der Infarktgröße der Kontrolltiere (Abb.47 A, Con: $42,72 \pm 5,70\%$, dmHDL: $42,35 \pm 8,87\%$, Anova-Analyse, $p>0,05$). Das durchschnittlich von der Ischämie betroffene Gebiet (*area at risk* = AAR) war bei allen Versuchsgruppen ähnlich groß und unterschied sich nicht signifikant (Abb.47 B).

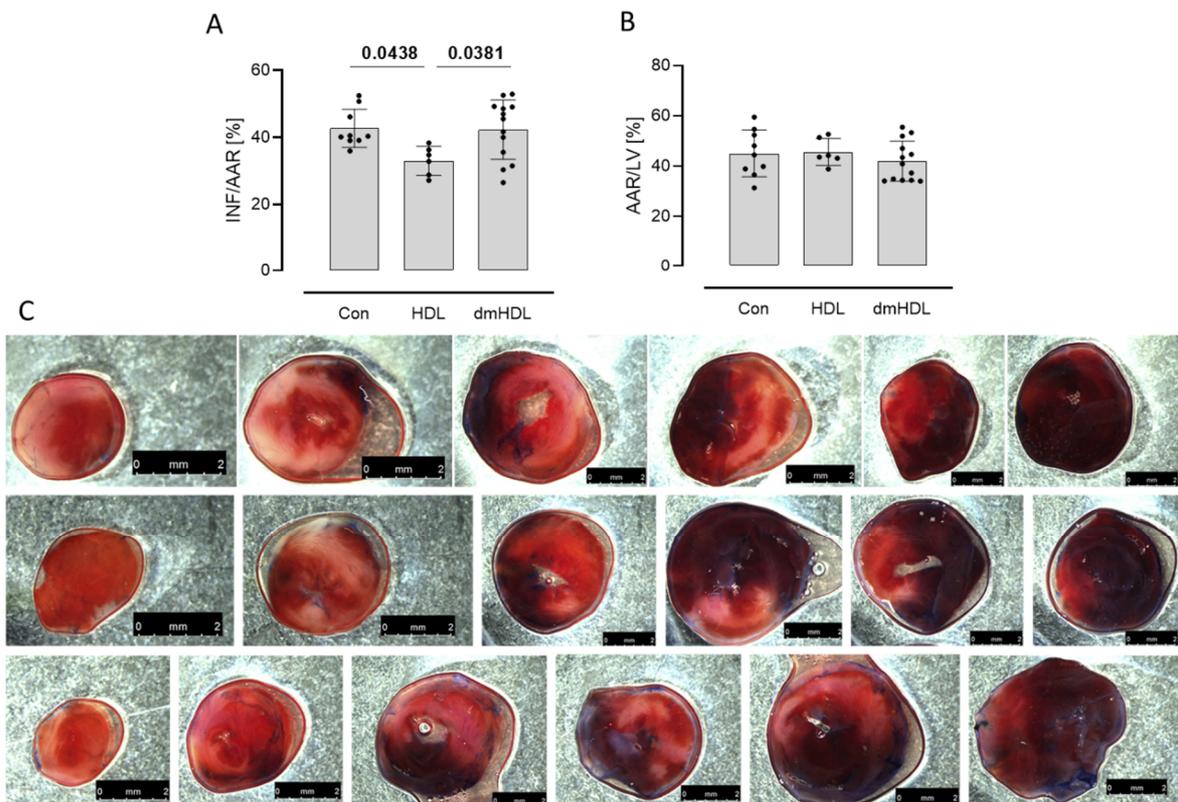


Abb.47: Das HDL gesunder Patient*innen reduziert die Infarktgröße bei Mäusen 24h nach AMI, das HDL diabetischer Patient*innen nicht

Dargestellt ist die Infarktgröße (INF) in Prozent bezogen auf das Ischämiegebiet (A), sowie das durchschnittliche Ischämiegebiet bezogen auf den gesamten linken Ventrikel (B). Beispielhafte Bilder eines TTC-gefärbten Herzens jeder Versuchsgruppe ist beigefügt (C). Oben: Kontrollgruppe, Mitte: HDL-behandelt, Unten: dmHDL-behandelt

4.2.1 Einfluss von HDL und dmHDL auf die kardiale Funktion 24h nach AMI

Die Befunde aus der Infarktgrößenbestimmung wurden durch die kardiale Funktion echokardiographisch bestätigt. Im Vergleich der Kontrollgruppe zur dmHDL-behandelten Gruppe gab es keinerlei Unterschiede in den ermittelten Parametern (Abb.48 A-D, Anova-Analyse, $p > 0,05$). Die Applikation von HDL gesunder Proband*innen führte zu einer verbesserten kardialen Funktion 24h nach AMI. Das Schlagvolumen (Abb.48 B, Con: $20,35 \pm 2,14 \mu\text{L}$, HDL: $27,88 \pm 5,04 \mu\text{L}$, Anova-Analyse, $p = 0,0060$), das Herzminutenvolumen (Abb.48 C, Con: $10,12 \pm 1,01 \text{ mL/min}$, HDL: $14,12 \pm 3,58 \text{ mL/min}$, Anova-Analyse, $p = 0,0060$) und die Ejektionsfraktion (Abb.48 F, Con: $33,53 \pm 3,94\%$, HDL: $40,27 \pm 3,71\%$, Anova-Analyse, $p = 0,0072$) waren signifikant verbessert.

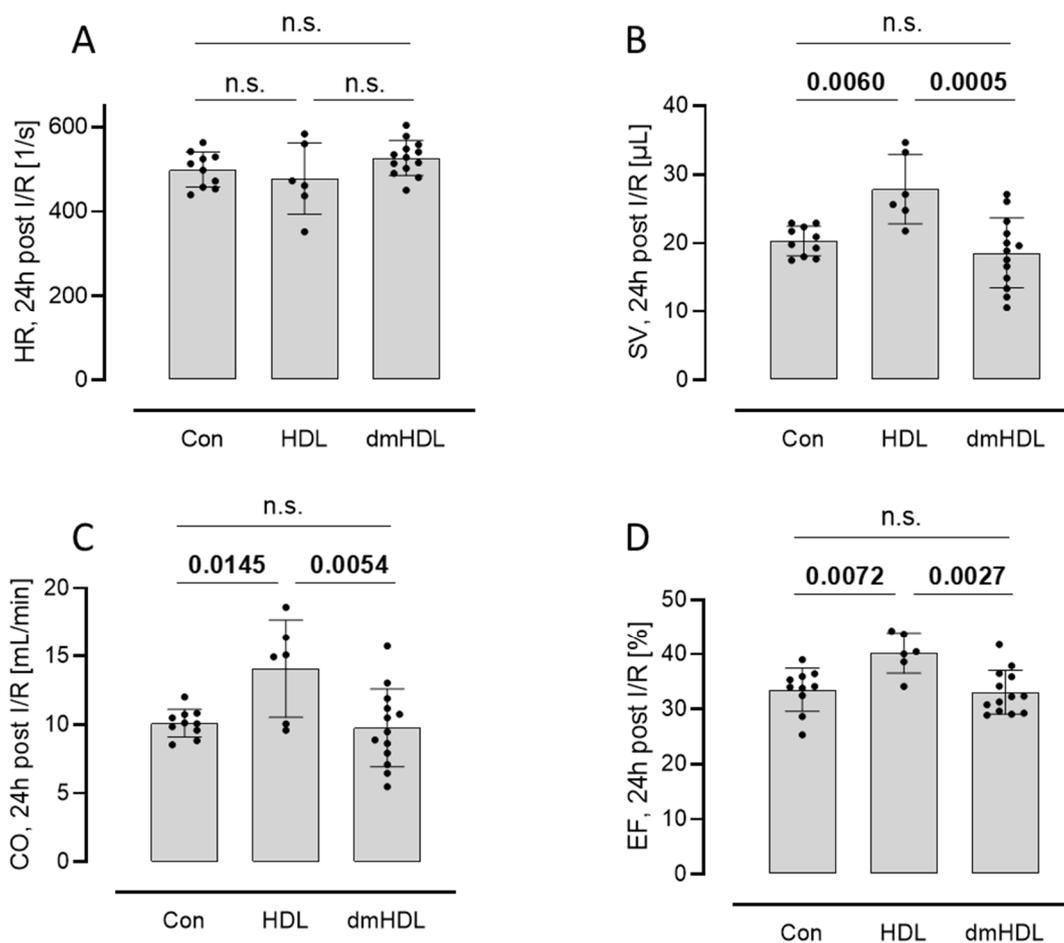


Abb.48: Kardiale Funktion der Versuchsgruppen 24h nach AMI

(A) Die Herzfrequenz (HR) pro Minute, (B) das Schlagvolumen (SV), (C) das Herzminutenvolumen (cardiac output = CO), (D) die Ejektionsfraktion (EF)

4.3 Das HDL gesunder Proband*innen verbessert das kardiale Remodelling

4.3.1 Reduktion der Narbengröße 21 Tage nach AMI

In einem zweiten Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob die einmalige Applikation von HDL gesunder Proband*innen auch zu einem verbesserten Auskommen 21 Tage nach AMI führt. Nach einem kardiovaskulären Akutereignis beginnen im Herzen Umbauarbeiten, das sog. Remodelling. Dieses besteht aus Inflammationsprozessen und einer Vernarbung des betroffenen Gewebes [10]. Die Qualität und Quantität dieser Vorgänge bestimmen das Langzeitauskommen nach AMI hinsichtlich der kardialen Funktion [11]. Stellvertretend für den Einfluss von HDL wurde sich die Größe des Narbengewebes analysiert und die kardiale Funktion 21 Tage nach AMI untersucht. Auf eine Untersuchung von Mäusen mit dmHDL-Applikation wurde aufgrund der fehlenden Effekte im akuten Versuch verzichtet. In den verbleibenden beiden Versuchsgruppen wurden jeweils sechs Mäuse operiert, wobei zwei aus der Kontrollgruppe und eine aus der HDL-Gruppe vorzeitig verstarben.

Die Narbengröße der Tiere, die mit HDL einmalig behandelt wurden, zeigte sich deutlich und signifikant reduziert (Abb.49 A, Con: $29,75 \pm 8,38\%$, HDL: $14,59 \pm 7,88\%$, ungepaarter t-Test, $p=0,0269$). Beispielbilder der Sirius Rot Färbung (Abb.49 B) sind zur Veranschaulichung beigefügt.

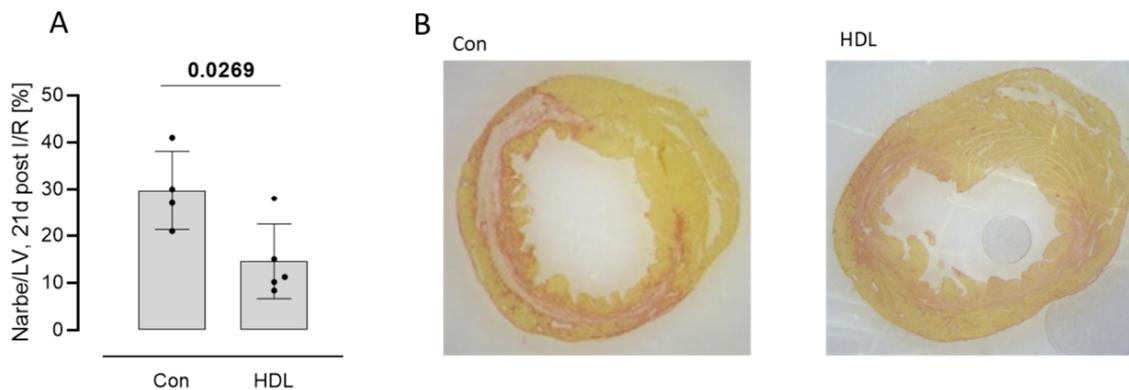


Abb.49: Eine einmalige Applikation von HDL reduziert die Narbengröße 21 Tage nach AMI

Die durchschnittliche Größe der Narbe bezogen auf die Größe des linken Ventrikels ist nach HDL-Behandlung reduziert (A), beispielhafte Bilder der Färbung (B)

4.3.2 Verbesserte kardiale Funktion 21 Tage nach AMI

Mit den bisherigen Ergebnissen einhergehend zeigt sich die kardiale Funktion der HDL-behandelten Tiere deutlich verbessert. Das enddiastolische Volumen (EDV, Abb.50 B) ist in der HDL-behandelten Gruppe signifikant erhöht (Con: $55,22 \pm 4,38\mu\text{L}$, HDL: $63,31 \pm 5,29\mu\text{L}$). Da in beiden Gruppen keine starke Dilatation des linken Ventrikels zu verzeichnen war, wird dieser Befund in der Gesamtbetrachtung weniger Gewicht haben. Die signifikanten und teils deutlichen Unterschiede im Schlagvolumen (Abb.50 D, Con: $13,86 \pm 2,41\mu\text{L}$, HDL: $27,91 \pm 3,40\mu\text{L}$, ungepaarter t-Test, $p=0,0002$), Herzminutenvolumen (Abb.50 E, Con: $7,01 \pm 1,30\text{mL/min}$, HDL: $13,55 \pm 2,13\text{mL/min}$, ungepaarter t-Test, $p=0,0011$) und in der Ejektionsfraktion (Abb.50 F, Con: $25,05 \pm 3,40\%$, HDL: $44,02 \pm 2,79\%$, ungepaarter t-Test, $p<0,0001$) zeigten den positiven Effekt der HDL-Applikation vor I/R auf.

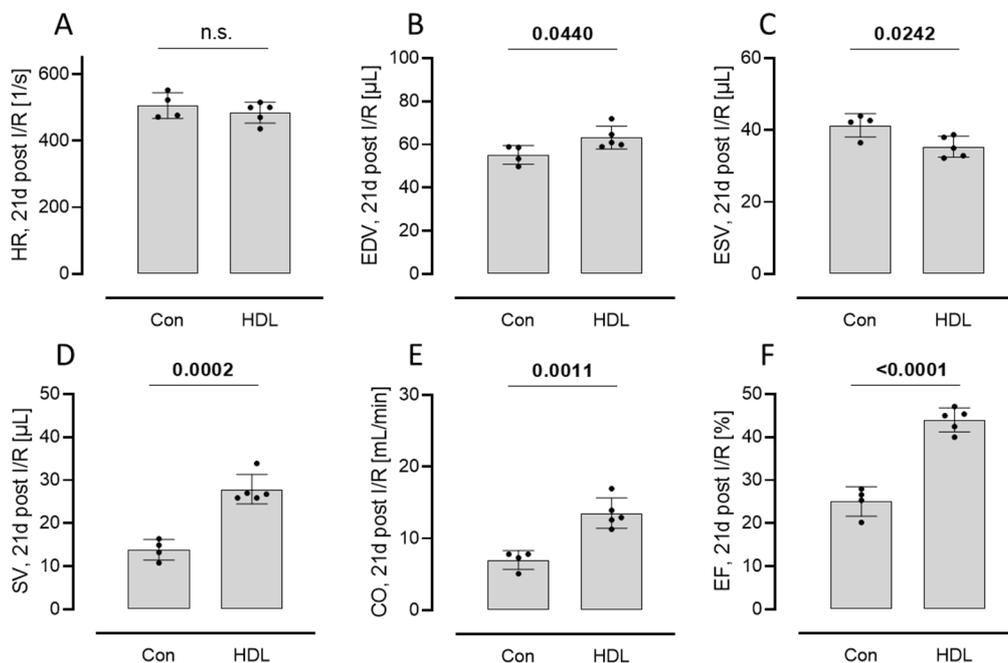


Abb.50: Kardiale Funktion der Behandlungsgruppen 21 Tage nach AMI

Sechs relevante kardiale Funktionsparameter sind echokardiographisch bestimmt worden. (A) Die Herzfrequenz (HR) pro Minute, (B) das enddiastolische Volumen (EDV), (C) das endsystolische Volumen (ESV), (D) das Schlagvolumen (SV), (E) das Herzminutenvolumen (cardiac output = CO), (F) die Ejektionsfraktion (EF)

4.4 Mögliche Gründe für den unterschiedlichen Effekt von HDL und dmHDL auf das Auskommen nach ischämischem Akutereignis

4.4.1 Status der diabetischen Erkrankung

Dass HDL in verschiedenen Erkrankungen seine Funktionalität verliert, ist hinreichend bekannt [146-148]. Ziel vieler Studien war es, die exakten Pathomechanismen dahinter zu verstehen und bis heute ist mechanistisch wenig bekannt [90]. Diese Arbeit hat deshalb nicht das Ziel den Pathomechanismus hinter den bisherigen Befunden genau zu untersuchen, sondern es sollen lediglich erste Hinweise und Diskussionsmöglichkeiten geschaffen werden.

Bereits bekannt ist, dass HDL einen Teil seiner kardioprotektiven Eigenschaften durch das Sphingolipid S1P vermittelt [149]. HDL ist einer der wichtigsten Träger für S1P im Plasma [150]. Ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von HDL-S1P und dem HbA1c-Wert von Diabetikern wurde ebenfalls bereits beschrieben [151]. Daher wurde eine Korrelation zwischen der Infarktgröße der mit dmHDL-behandelten Mäuse und dem HbA1c-Wert des Spenders angefertigt (Abb.51). Optisch zeigte sich eine starke positive Korrelation zwischen Infarktgröße und HbA1c. Eine statistische Signifikanz konnte darüber hinaus ebenfalls festgestellt werden.

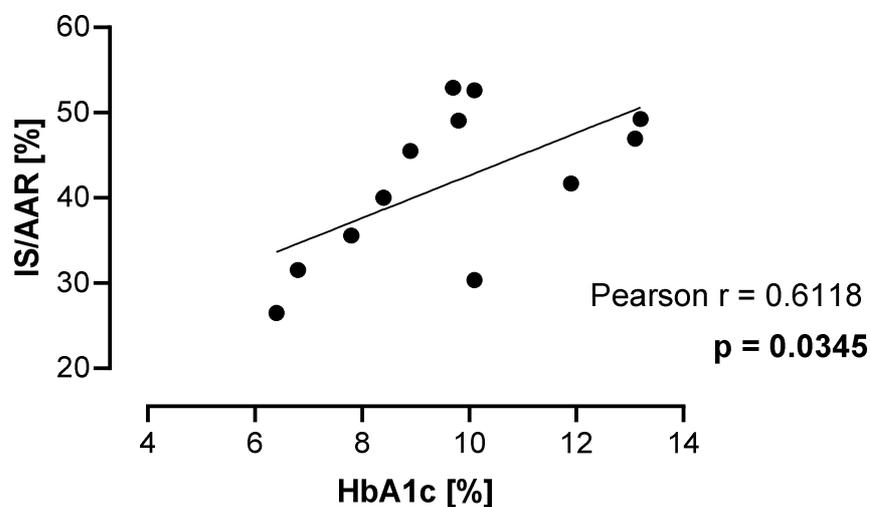


Abb.51: Korrelation von Infarktgröße mit dmHDL-behandelter Mäuse und dem HbA1c der jeweiligen diabetischen Spender

4.4.2 Level des S1P im HDL

In einer abschließenden Analyse sollte der HDL-S1P-Gehalt der Proben untersucht werden, die den Mäusen injiziert wurden (Abb.52 A). Es konnte kein Unterschied in den untersuchten Proben festgestellt werden (HDL: $232,8 \pm 33,0$ pmol/mg, dmHDL: $197,0 \pm 66,9$ pmol/mg, ungepaarter t-Test, $p > 0,05$). Da die Probenanzahl in diesem Versuch gering war, verwundert dies nicht. Dennoch kann in dieser Untersuchung ein Zusammenhang zwischen HDL-S1P und Auskommen nach AMI festgestellt werden. Dementsprechend korrelieren S1P-Gehalt im HDL und Infarktgröße der Maus nicht (Abb.52 B).

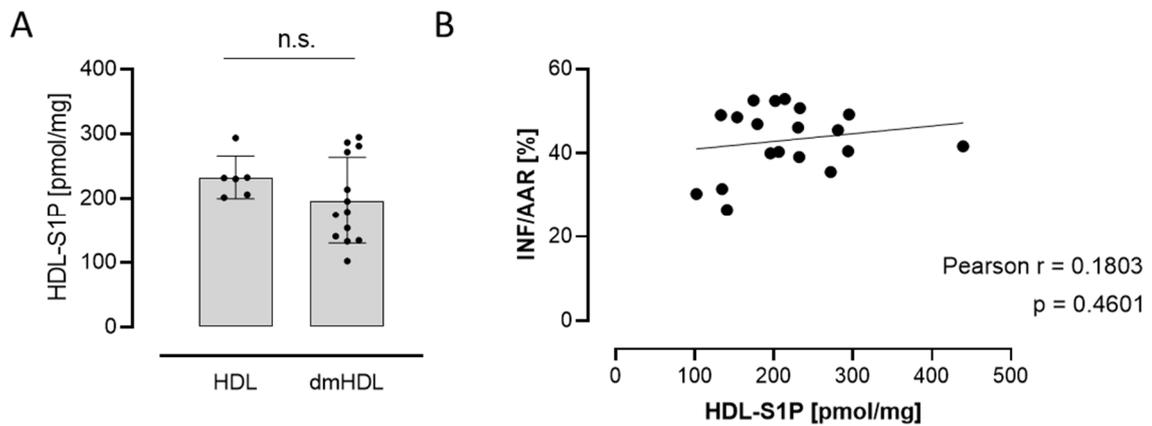


Abb.52: S1P-Gehalt von HDL gesunder und diabetischer Patient*innen (A), sowie die Korrelation aus HDL-S1P und Infarktgröße der Maus (B).

5 Diskussion

5.1 Diskussion zu Versuchsteil 1

In der vorliegenden Arbeit konnte ein neuer Mechanismus der IPE-Wirkung beschrieben werden. Die wichtigsten Befunde aus dem ersten Teil sind:

1. Die Supplementation von IPE führt zu einer reduzierten Thrombusformation in-vivo
2. Die Thrombozytenreaktivität ist nach IPE/EPA-Gabe sowohl in-vitro als auch ex-vivo verringert
3. Der Wirkmechanismus der IPE/EPA-Wirkung beruht auf einem kompetitiven Antagonismus mit ARA um das aktive Zentrum der thrombozytären COX-1

Die Grundlage für diesen Teil der Arbeit ist zum einen der positive Effekt der IPE-Supplementation in der REDUCE-IT-Studie [64]. Hier konnte für Patient*innen unter Statin-Therapie bei weiterhin erhöhten TG-Plasmaspiegeln eine signifikante Reduktion des kardiovaskulären Risikos gezeigt werden. Zum anderen zeigte sich in dieser Studie ein starker, wenn auch nicht signifikanter Trend zu vermehrten Blutungen. Diese Kombination ließ uns, aber auch viele andere Arbeitsgruppen, vermuten, dass eine alleinige Reduktion der TGs nicht ausschlaggebend für den positiven Ausgang der Studie sein konnte. Ein Einfluss auf die Hämostase liegt also nahe. Darüber hinaus sind auch erste antithrombozytäre Effekte beschrieben [152]. Die erste Untersuchung in dieser Arbeit war ein direkter antithrombozytärer Effekt auf die Formation der arteriellen Thrombose im Mausversuch. Erste veröffentlichte Daten mit unterschiedlicher Zusammensetzung von EPA und Docosahexaensäure (DHA) gab es in einem ähnlichen Versuchsaufbau zwar schon [153], dennoch war es notwendig diesen Versuch mit IPE zu wiederholen. IPE ist der Wirkstoff, der nach erfolgreicher Zulassung auch in Europa eingesetzt wird. Aus diesem Grund ist es wichtig, die in-vivo Versuche mit IPE durchzuführen. Dazu wurde eine entsprechend hohe Dosierung gewählt, da in der REDUCE-IT-Studie ebenfalls eine hohe Dosierung von 4g täglich verwendet wurde. Andere Studien, wie VITAL [61], verwendeten eine geringere Dosierung und erreichten kein positives Ergebnis. In einer Studie mit einer Dosierung von 1800 mg IPE pro Tag wurde nach achtwöchiger Behandlung eine hemmende Wirkung auf die ADP-, nicht aber auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation festgestellt [154]. Darüber hinaus ergab die Untersuchung einer Zusammensetzung aus IPE und dem Ethylester der Docosahexaensäure in der gleichen Dosierung wie in REDUCE-IT (4 g/Tag) keine signifikante Wirkung auf die Thrombozytenaggregation bei gesunden Personen [155]. Des Weiteren scheinen die anti-atherosklerotischen Wirkungen von IPE auch nicht in nennenswertem Umfang zur Verringerung des kardiovaskulären Risikos beizutragen, was einen weiteren Mechanismus

wahrscheinlicher macht [156]. Dies lässt den Schluss zu, dass eine ausreichend hohe Dosis verwendet werden muss. Die Reduktion der arterielle Thrombose in der Maus war eindeutig und der Unterschied zwischen IPE-behandelten und unbehandelten Mäusen sehr groß. Es konnte keine Okklusion der Carotis beobachtet werden, während die Carotiden der Vergleichstiere allesamt nach etwa zehn Minuten okkludierten. Histologisch bestätigte sich dieser Befund. Anhand der Analyse von CD41 und Fibrinogen konnte gezeigt werden, dass die Thromben, die sich in der IPE-Gruppe entwickelten weniger dicht waren und durchlässiger wirkten. Zusätzlich zeigte sich im Tailbleeding auch eine verlängerte und vermehrte Blutung der IPE-behandelten Tiere.

Nachdem der Einfluss von IPE auf die arterielle Thrombose gezeigt werden konnte, wurde in das humane Setting gewechselt. Diese Untersuchung hatte verschiedene Ziele, um möglichst viele Informationen aus den Thrombozyten der behandelten Personen gewinnen zu können. Neben der Thrombozytenadhäsion, wurde auch die Aggregation und die Degranulierung untersucht. Zusätzlich wurde auch der Einfluss der IPE-Einnahme auf die Komposition der Thrombozytenmembran analysiert. Diese Untersuchung war von besonderem Interesse, da ARA aus der Lipidmembran freigesetzt wird und im Anschluss über die COX-1 verstoffwechselt wird [15]. Eine Veränderung der Thrombozytenmembran, könnte eine mögliche Erklärung für einen thrombozytären Effekt sein.

Für diese Untersuchungen wurden 25 völlig gesunde, junge Proband*innen untersucht. Es gab keinerlei Auffälligkeiten in den Blutanalysen dieser Proband*innen. Das Einnahmeschema entsprach dabei dem Schema aus der REDUCE-IT-Studie, sodass hier 4g IPE täglich eingenommen wurden. Nach der Einnahme wird IPE von Lipasen im Darm gespalten und über Enterozyten als EPA absorbiert [55]. Die Einnahme von IPE erfolgte über einen Zeitraum von zehn Tagen. Eine Reduktion der Thrombozytenadhäsion konnte bereits nach diesem Zeitraum ermittelt werden. In der kollagenbeschichteten Flusskammer zeigte sich eine starke Reduktion der Adhäsion von etwa 20 auf 10%. Die Untersuchung nach fünf Tagen, also in der Mitte des Einnahmezeitraums, zeigte eine Adhäsion von etwa 15%, sodass wir eine deutliche Wirkungssteigerung mit zunehmender Einnahme erkennen konnten. Nach gängigen pharmakokinetischen Modellen mit einer IPE-Halbwertszeit von ca. 89 Stunden dauert es mehrere Wochen, bis der volle Effekt der IPE-Einnahme zu verzeichnen ist. Für eine längere Studie standen einerseits nicht die Mittel zur Verfügung, zum anderen ist es auch nicht notwendig, da man bereits nach zehn Tagen der Einnahme bei etwa 80% der Sättigungskonzentration angelangt ist und teils deutliche Effekte wahrnehmen konnte. Beispielsweise zeigte sich eine reduzierte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten nach einer zehntägigen Einnahme von IPE. Diese war allerdings nur zu beobachten, wenn ARA als Stimulus verwendet wurde. Da es sich bei der Aggregation von

Thrombozyten um ein „alles oder nichts“-Prinzip handelt [55], war es weniger der Mittelwert aller Proben der hier einen Effekt zeigte, sondern eher die vermehrt auftretenden Proben, die keine Aggregation mehr aufwiesen. Nach zehn Tagen der Einnahme aggregierten die Thrombozyten von zwei der dreizehn untersuchten Proband*innen nicht mehr unter ARA-Stimulus. Unter der Stimulation von ADP und Kollagen konnte keine Veränderung erkannt werden.

Dieses Bild zeigte sich ebenfalls bei der Analyse der p-Selektin-Sekretion. Dieses Adhäsionsmolekül wird nach Aktivierung der Thrombozyten über *alpha*-Granula an die Zelloberfläche verbracht. Dort spielt es eine entscheidende Rolle in der Thrombozytenaggregation und in der Entwicklung arterieller Thrombosen [129]. Unter ADP- und Kollagenstimulation konnte keine Veränderung über die Einnahmezeit beobachtet werden. Unter der Stimulation mit ARA konnte dagegen eine signifikante Reduktion der p-Selektin-positiven Zellen in der FACS-Analyse beobachtet werden. Auch hier scheint es so, als gäbe es starke interindividuelle Unterschiede, denn bei einigen Proband*innen hat sich die Expression von p-Selektin kaum verändert, dafür bei anderen sehr deutlich. Diese Tatsache konnte bereits bei der Aggregation festgestellt werden. Zur Analyse der Freisetzung von *dense*-Granula aus Thrombozyten wurde die Freisetzung von ATP untersucht. Da dieser Versuch aufwendiger ist als die Analyse von p-Selektin wurde hier auf die Untersuchung mit ADP und Kollagen verzichtet. Nach den bisherigen Ergebnissen wurde keine veränderte ATP-Freisetzung erwartet. Unter ARA konnte eine deutliche Reduktion der ARA-induzierten ATP-Freisetzung beobachtet werden. Im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen zeigten sich hier keine interindividuellen Unterschiede, sondern ein einheitliches Bild mit geringer Varianz nach zehn Tagen der Einnahme. Die Freisetzung von ATP wurde um ca. 25% reduziert. Die Freisetzung der *dense*-Granula scheint sensibler zu sein als die Freisetzung der *alpha*-Granula, denn es kommt bei allen Proband*innen einheitlich zu einem starken Effekt nach zehn Tagen. Bereits nach fünf Tagen der IPE-Einnahme zeigte sich eine starke Reduktion der ATP-Freisetzung bei einem Großteil der Proband*innen.

Um die Funktion der Thrombozyten unter der Einnahme von IPE abschließend zu beurteilen, wurde auch die Bildung von TXB2 untersucht. Die COX-1 vermittelte Bildung von TXA2 ist einer der wichtigsten Schritte in der auto- und parakrinen Verstärkung der Thrombozytenaggregation [130, 157]. Da dieses im wässrigen Milieu mit einer Halbwertszeit von 30 Sekunden nicht für eine Messung zur Verfügung steht [44, 119], wird im Allgemeinen das stabile Oxidationsprodukt TXB2 zur Beurteilung hinzugezogen. Dieser Marker ist von besonderer Bedeutung, da seine Erhöhung mit einer gesteigerten Rate an AMI sowie kardiovaskulärem Tod assoziiert ist [158]. Darüber hinaus ist auch eine genetisch erhöhte

TXA₂-Synthese mit einem größerem kardiovaskulären Risiko verbunden [159]. Bei dieser Analyse zeigten sich zum einen hohe interindividuelle Unterschiede und zum anderen eine signifikante Reduktion in der ARA-induzierten TXB₂-Bildung nach zehn Tagen der IPE-Einnahme. Während nach der Stimulation von ADP erneut keine Veränderungen beobachtet werden konnten, zeigte sich unter Kollagenstimulation eine reduzierte TXB₂-Bildung durch die Einnahme von IPE. Der TXB₂-Spiegel war erwartungsgemäß deutlich verringert im Vergleich zu den Levels, die nach ARA-Stimulation erreicht werden konnten.

Die Einnahme von IPE führte zu einer deutlichen Reduktion der ARA-abhängigen Aggregation, Adhäsion und Degranulation, während die IPE-Einnahme auf andere Stimuli wie ADP und Kollagen kaum einen Einfluss hatte. Diese Ergebnisse geben zusammen mit der strukturellen Ähnlichkeit von IPE/EPA zu ARA einen deutlichen Hinweis, dass IPE in den ARA-Stoffwechselweg eingreifen muss. Diese Vermutung wird zu einem späteren Zeitpunkt weiter diskutiert und bestätigt.

Zur Analyse der Thrombozytenmembran wurden isolierte Thrombozyten der Proband*innen vor und nach der zehntägigen Einnahme von IPE nach Wien geschickt, um dort die Lipidkomposition analysieren zu lassen. Erwartungsgemäß führte die Einnahme von IPE zu einem verstärkten Einbau von C_{20:5}-Fettsäuren in die Lipide der Membran. In einem zweiten Schritt wurden die verschiedenen Lipide auf ihre Zusammensetzung mit C_{20:4}- und C_{20:5}-Fettsäuren hin untersucht. Die Analyse des Instituts für analytische Chemie in Wien lässt zwei Rückschlüsse zu. Zum einen zeigte sich, dass sowohl der Anteil an Lipiden mit C_{20:4}-Fettsäuren, als auch der Anteil an Lipiden mit C_{20:5}-Fettsäuren in der Thrombozytenmembran nach zehntägiger IPE-Einnahme erhöht waren. Zum anderen ist zu erkennen, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Verhältnissen zwischen C_{20:4}- und C_{20:5}-fettsäureenthaltender Lipide gab. Der Körper scheint dieses Verhältnis konstant zu halten. Dies lässt den Rückschluss zu, dass ein erhöhter Gehalt von EPA in der Membran nicht der Grund für eine verminderte ARA-abhängige Thrombozytenaktivierung sein kann. Wäre das so, müsste sich das Verhältnis von C_{20:4}- und C_{20:5}-Fettsäuren über die Zeit der Einnahme ändern. Dies ist nicht der Fall, sodass die Wahrscheinlichkeit der PLA₂ ARA aus der Membran freizusetzen gleich bleibt. Das Verhältnis von aus der Membran freigesetzter ARA und EPA bleibt während der IPE-Supplementation nach Aktivierung der Thrombozyten gleich. Eine veränderte Komposition der Thrombozytenmembran kann demnach nicht der Grund für die IPE-vermittelte thrombozytäre Wirkung sein.

Um die bisher gesammelten ex-vivo Daten weiter zu untermauern, wurden in der Folge in-vitro Untersuchungen mit humanen Thrombozyten durchgeführt. Für diese Versuche wurde das aktive Agens EPA verwendet. Die verwendeten Konzentrationen sollten dabei mögliche

Plasmakonzentrationen nach oraler Einnahme widerspiegeln. In der REDUCE-IT Studie wurde ein durchschnittlicher Plasmaspiegel von 476µM erreicht. Dementsprechend wurde in den in-vitro Untersuchungen eine mittlere Konzentration von 500µM verwendet. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung mit der halben, sowie der doppelten Dosierung, um mögliche Dosisabhängigkeiten zu identifizieren.

Die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten wurde in der LTA und im Vollblut in der MIA untersucht. Im Gegensatz zu den ex-vivo Untersuchungen nach IPE-Einnahme konnte hier ein Einfluss von EPA auf alle verwendeten Stimuli festgestellt werden. Der Einfluss auf die ARA-induzierte Aggregation war jedoch am stärksten ausgeprägt. Bei der Aggregation mit ADP und Kollagen war ein signifikanter Effekt erst bei der höchsten EPA-Dosis festzustellen. Dies könnte einen Unterschied zu den ex-vivo Daten dahingehend erklären. Insgesamt gibt es in der Literatur unterschiedliche Daten zum Einfluss von EPA auf ADP- und Kollagen-induzierte Aggregation [154]. Da das Ziel dieser Arbeit u.a. die Analyse des exakten Wirkmechanismus ist, wurde folglich auf die Analyse der Daten mit ADP- und Kollagenstimulation verzichtet.

In der Folge wurde der in-vitro Einfluss von EPA auf die Freisetzung von *alpha*- und *dense*-Granula untersucht. Wie auch ex-vivo konnte EPA in-vitro die Freisetzung beider Granulatypen herabsetzen. Die Freisetzung der *alpha*-Granula wurde dabei in einem ähnlichen Maße gehemmt wie im vergleichbaren ex-vivo Versuch. Die Hemmung der *dense*-Granula Degranulation, gemessen an der ATP Freisetzung, war hingegen deutlich stärker gehemmt als in den vergleichbaren ex-vivo Versuchen. Ein möglicher Grund ist die Isolation der Thrombozyten. Die Menge an EPA, die nach der Isolation und dem Waschen der Thrombozyten noch im Reaktionsgemisch verbleibt, ist verschwindend gering. Der Einfluss auf die Thrombozyten hat bereits im Blut stattgefunden. Im Gegensatz dazu werden die isolierten Thrombozyten in den in-vitro Versuchen erst kurz vor der Stimulation durch ARA mit EPA inkubiert. Durch den Versuchsaufbau wird die Wirkung also voraussichtlich etwas überschätzt. Ganz sicher lassen sich die Ergebnisse von ex-vivo und in-vitro Versuchen aber nicht direkt vergleichen. Nichtsdestotrotz lässt sich hier der Schluss ziehen, dass EPA die Freisetzung der *dense*-Granula konzentrationsabhängig hemmt. Insgesamt bestätigt sich auch die Vermutung, dass die Freisetzung von *dense*-Granula sensibler gehemmt wird als die der *alpha*-Granula. Die ARA-induzierte Bildung von TXB2 ist ebenfalls reduziert. Im Vergleich zu den ex-vivo Daten gibt es hier allerdings keine neuen Erkenntnisse.

Eine Analyse der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern wurde ex-vivo nicht durchgeführt. Bei der in-vitro Analyse konnte eine starke Beeinträchtigung der Calciumfreisetzung innerhalb des Thrombozyten beobachtet werden. Die maximale

Konzentration freier Calciumionen im Zytosol wurde bereits durch die niedrigste EPA-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollproben deutlich reduziert. Eine Dosisabhängigkeit konnte nicht festgestellt werden. Ähnlich wie bei den Versuchen zur ATP-Freisetzung erfolgte die EPA-Inkubation erst nach erfolgreicher Isolation der Thrombozyten aus dem Plasma. Daher könnte der Effekt in-vivo wesentlich schwächer ausfallen. Dennoch bleibt festzuhalten, dass EPA die Freisetzung von Calciumionen nach ARA-Stimulation inhibiert. Dieser Befund ist von essenzieller Wichtigkeit, da Calciumionen eine zentrale Rolle in der Aggregation und Thrombusformation darstellen [38]. Darüber hinaus ist die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration entscheidend für die Umorganisation des Aktinzytoskeletts (shape change) [42], Degranulierung und die Aktivierung von GPIIb/IIIa [43]. Zusammengefasst ist die Änderung der freien zytosolischen Calciumkonzentration durch EPA entscheidend für eine gehemmte Thrombozytenaggregation und Thrombusformation.

In einer abschließenden in-vitro Untersuchung zur Determination des EPA-Effektes auf Thrombozyten wurden Proteomanalysen durchgeführt. Erwartungsgemäß führte eine Aktivierung der Thrombozyten durch ARA zu einer veränderten Expression bei verschiedenen Proteinen. Obwohl Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, können sie über mRNA Proteinsynthese betreiben [160]. Die Inkubationszeit mit ARA dürfte allerdings nicht reichen für eine Proteinneosynthese, sodass hier die posttranslationalen Modifikationen der Proteine beobachtet werden können [161]. Vergleicht man nun das Proteom der Thrombozyten, die zusätzlich zur ARA-Stimulation vorher mit EPA inkubiert wurden, sieht man eine deutliche Reduktion der meisten Proteine. Dies lässt auf eine verminderte Aktivierung schließen. Noch interessanter und aussagekräftiger ist der Blick auf das Phosphoproteom der Thrombozyten. Da Phosphorylierungen eine schnelle Methode der Proteinaktivierung darstellen, sind Phosphorylierungen auch in den Thrombozyten nach vorheriger Aktivierung zu finden. Es zeigt sich, dass EPA einen relevanten inhibierenden Einfluss auf die auto- und parakrine Aktivierung der Thrombozyten hat. Eine Vielzahl von Proteinen, die keine direkte Verbindung zum COX-1-abhängigen Stoffwechselweg haben, sind beeinflusst. So ist zum Beispiel die Phosphorylierung der Adenylatcyclase durch EPA gehemmt. Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle in der Thrombozytenaggregation [135], beispielsweise nach der Aktivierung mit ADP oder Adrenalin. Auch die Phosphorylierung des Enzyms DAG-Kinase ist stark durch EPA abgeschwächt. Dieses spielt eine essenzielle Rolle in der Freisetzung von Calciumionen nach vorheriger Aktivierung von beispielsweise Kollagen oder Thrombin [138]. Neben DAG-Kinase ist auch ein Rezeptor des Inositoltriphosphats durch EPA-Inkubation beeinflusst. Zusammen mit DAG-Kinase spielt dieser eine wichtige Rolle in der Freisetzung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum. Wie schon beschrieben, ist eine erhöhte Konzentration

freier Calciumionen wichtig für die Degranulierung. Bei der Analyse des Phosphoproteoms fällt zusätzlich auf, dass auch Proteine beeinflusst sind, die direkt an der Degranulierung beteiligt sind. So konnte bei den Enzymen SNAP-23 und Dynamin-1-like Protein eine veränderte Phosphorylierung festgestellt werden. Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass eine EPA-Inkubation vor der ARA-Stimulation zu zahlreichen Veränderungen des intrathrombozytären Proteoms führt. Dabei sind nicht nur solche Proteine beeinflusst, die direkt mit dem COX-1-ARA Stoffwechselweg in Verbindung gebracht werden können, sondern auch solche, die auf eine auto- und parakrine Wirkung schließen lassen. Neben dem Einfluss auf Proteine, die für die Aggregation der Thrombozyten verantwortlich sind, konnten auch Veränderungen an Proteinen der Degranulierung beobachtet werden. Die EPA-Inkubation führt also zu multifaktoriellen Effekten innerhalb des Thrombozytenproteoms.

Obwohl EPA auch Effekte zeigte, die sich nicht direkt mit ARA und der COX-1 in Zusammenhang bringen lassen, scheint eine direkte Wirkung auf diesen Stoffwechselweg sicher. Ein sicherer Rückschluss kann aufgrund der bisher diskutierten Daten allerdings nicht getroffen werden. Um einen direkten Effekt zu bestätigen, wurde der EPA-Einfluss unter verschiedenen Bedingungen der COX-1-Inhibition untersucht. Sowohl in der ARA-induzierten Aggregation als auch in der ARA-induzierten Adhäsion und TXB₂-Bildung konnte kein zusätzlicher EPA Effekt beobachtet werden, wenn die COX-1 pharmakologisch durch ASS inhibiert wurde. Als Inhibitor der COX-1 acetyliert ASS einen Serinrest des aktiven Zentrums [15] und hemmt so das Enzym irreversibel. Da EPA nun keine zusätzlichen Effekte hervorrufen kann, liegt der Schluss nahe, dass EPA ebenfalls ins aktive Zentrum der COX-1 muss, um seine Wirkung zu entfalten. Wäre die Hemmung allosterisch, könnte ein zusätzlicher Effekt wahrscheinlich detektiert werden. In der Aggregation wäre das aufgrund der stark hemmenden Wirkung von ASS kaum möglich gewesen. Die Untersuchungen in der Flusskammer und in der TXB₂-Messung hätten allerdings einen zusätzlichen Effekt zugelassen, den EPA nicht zeigen konnte. Zieht man nun die Ergebnisse aus dem in-silico Docking mit in Betracht, liegt eine EPA Wirkung im aktiven Zentrum der COX-1 sehr nahe. Die Affinität von EPA zum aktiven Zentrum der COX-1 ist nahezu identisch mit der Affinität von ARA.

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass EPA über die COX-1 seine antithrombozytären Effekte vermittelt und bereits ausgeschlossen wurde, dass es sich um eine allosterische Inhibition handelt, muss abschließend noch eine kompetitive Hemmung bestätigt werden. Eine irreversible Hemmung des Enzyms scheint aufgrund der EPA-Struktur und seiner Ähnlichkeit zum physiologischen Edukt ARA unwahrscheinlich. Bei einer kompetitiven Hemmung lässt sich das Edukt aus dem aktiven Zentrum des Enzyms

verdrängen, sofern ein zweites Edukt in größerer Konzentration vorliegt. Die ARA-induzierte Aggregation von EPA-inkubierten Thrombozyten nimmt mit steigender ARA-Konzentration zu. Es verdrängt also EPA aus dem aktiven Zentrum und somit handelt es sich um eine klassische kompetitive Hemmung des Enzyms.

Nachdem eine kompetitive Hemmung des aktiven Zentrums der COX-1 in-vitro bestätigt wurde, wurde dieser Effekt abschließend in der arteriellen Thrombusformation im Mausmodell untersucht. Auch hier zeigte sich erwartungsgemäß kein zusätzlicher Effekt von EPA auf ASS-behandelte Mäuse. Abschließend sollte der Einfluss der endothelialen COX-1 auf das System untersucht werden. Die COX-1 kommt nicht nur in den Thrombozyten vor, sondern auch im Gefäßendothel [162]. Dort führt die Umsetzung von ARA allerdings nicht hauptsächlich zum proaggregatorischen TXA₂, sondern es wird Prostacyclin gebildet [163], welches die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten inhibiert [164, 165]. Diesen Einfluss kann eine isolierte Untersuchung von Thrombozyten ex-vivo, wie auch in-vitro nicht leisten, daher sind Versuche in einem adäquaten Mausmodell unabdingbar. Mit der Unterstützung von Prof. Mitchell aus London, waren wir in der Lage Knochenmarkschimären zu generieren. Diese hatten keine thrombozytäre COX-1. Sie besaßen aber noch eine funktionsfähige endotheliale COX-1. Aus den Versuchen zur arteriellen Thrombusbildung lassen sich nun Schlussfolgerungen ziehen. Erstens führt der Bestrahlungsprozess mit anschließender Regenerationszeit bei den Tieren, die WT-Knochenmark erhalten haben, zu den identischen Ergebnissen, die auch schon ohne Bestrahlung in gesunden Mäusen zu beobachten waren. Der Versuchsaufbau hat demnach keinen unbekanntem Einfluss auf die Ergebnisse. Zweitens führt eine Abwesenheit der thrombozytären COX-1 zu einer stark reduzierten Thrombusformation. Das entspricht den Erwartungen, da die COX-1 eine zentrale Rolle in der Formation arterieller Thromben einnimmt. Eine zusätzliche Gabe von IPE konnte zu keiner weiteren Verkleinerung der Thromben führen. Auch der Anteil an CD41 und Fibrinogen-positiven Zellen innerhalb des Thrombus war ähnlich, sodass man von einer identischen „Thrombusdichte“ sprechen kann. Es bleibt also festzuhalten, dass eine IPE-Gabe zu keinem weiteren Effekt führt, wenn die COX-1 der Thrombozyten fehlt. Nach den bisherigen Daten war dies so zu erwarten, da der Wirkmechanismus über die COX-1 bereits in-vitro bestätigt wurde. Der dritte und letzte Rückschluss, den diese abschließende Untersuchung der Chimären zulässt, ist, dass die endotheliale COX-1 keinen messbaren Einfluss auf die Thrombusformation hat. Vergleicht man nur die Tiere, die KO-Knochenmark bekommen haben, fällt auf, dass es keinerlei Unterschiede zwischen IPE-behandelten und unbehandelten Tieren gibt. Die endotheliale COX-1 sollte aber durch die IPE-Behandlung gehemmt sein und weniger Prostacyclin bilden, was zu einer vermehrten Aggregation führen sollte. Dies ist in unserem Versuchsaufbau aber nicht zu beobachten. Die

endotheliale COX-1 hat hier keinen Einfluss. Der ideale Versuchsaufbau, um einen Einfluss der endothelialen COX-1 auszuschließen, wäre die Analyse mit endothelialen COX-1-*knockout* Mäusen. Diese stehen aber nicht zur Verfügung. Nichtsdestotrotz lassen alle gesammelten Daten zusammen den Schluss zu, dass die EPA-vermittelten Effekte auf eine Interaktion mit der thrombozytären COX-1 beruhen.

5.1.1 Limitationen dieses Versuchsteils

Trotz der Vielzahl an Experimenten und der umfangreichen, größtenteils statistisch signifikanten Ergebnisse müssen die Limitationen dieses Versuchsteils diskutiert werden. Die Stichprobengröße ist sowohl bei den humanen als auch bei den murinen Experimenten gering. Es wurden insgesamt 25 Proband*innen untersucht, wobei nicht jede Blutprobe der Proband*innen für alle Experimente genutzt werden konnte. Dies hatte einfache logistische Gründe. Viele Experimente mussten mit frischem Blut durchgeführt werden und konnten nicht parallel ablaufen. Dennoch lässt sich auch mit 25 Proband*innen eine valide Aussage zum Einfluss von IPE/EPA treffen. Das Blut der identischen Patient*innen wurde vor, während und nach der zehntägigen Einnahme untersucht. Daher gibt es keine individuellen Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten.

Alle Proband*innen sind jung und gesund, weshalb sich der Wirkmechanismus von EPA gut herausarbeiten ließ. Eine Übertragbarkeit auf ältere oder erkrankte Menschen ist genau genommen aber nicht zu treffen. Dazu bedarf es größerer Studien.

Weitere Einschränkungen ergeben sich aus den verwendeten Methoden. So ist das Forschungsthema Lipidom der Thrombozyten bisher lediglich oberflächlich erforscht. Folgen von Veränderungen des Lipidoms können bisher noch nicht adäquat abgeschätzt und beurteilt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse aus diesen Versuchen sollten also nie alleinstehend, sondern immer im Kontext mit anderen Ergebnissen interpretiert und diskutiert werden.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den Thrombozyten und der Wirkung von EPA auf die thrombozytäre COX-1. Die dargelegten Ergebnisse zeigen eine eindeutige und direkte Interaktion von EPA mit der thrombozytären COX-1. Allerdings gibt es die COX-1 in vielen Geweben, u.a. im Gefäßendothel. Es ist denkbar, dass EPA auch dort COX-1 vermittelte Effekte erzielen kann, die die Thrombozytenfunktion beeinflussen. Die Versuche mit den thrombozytären KO-Chimären können ein erster Hinweis sein, dass der Einfluss von EPA auf die endotheliale COX-1 gering ist. Abschließend beurteilen ließe sich diese Aussage aber erst mit einem passenden Mausmodell und weiteren Analysen an Endothelzellen.

5.1.2 Zusammenfassung

Um eine mögliche antithrombotische Wirkung im Zusammenhang mit der Einnahme von IPE zu ermitteln, wurden Proband*innen, die mit einer IPE-Behandlung nach dem REDUCE-IT-Schema (2x2g pro Tag) begannen, in diese Studie aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Thrombozytenaggregation, Adhäsion und Degranulierung nach zehn Tagen der IPE-Einnahme inhibiert sind. Das unterstreicht, dass nur eine hohe Dosierung zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos führt. Große Studien mit geringeren Dosierungen konnten keine Risikoreduktion zeigen [61, 62, 166]. Dies lässt auch auf eine konzentrationsabhängige Wirkung schließen, die in fast allen Experimenten beobachtet werden konnte. Die Dosierung von 250µM EPA führte in den in-vitro Versuchen nur selten zu signifikanten Effekten, sodass eine klinische Relevanz niedriger Dosierungen angezweifelt werden darf.

ARA ist das Hauptsubstrat der thrombozytären COX-1 und führt zur Synthese von TXA₂, was zu einer auto- und parakrinen Verstärkung der Thrombozytenaggregation führt. Die COX-1 kann EPA ebenfalls umsetzen. Daraus entsteht TXA₃, welches nur schwach thrombozytenaktivierend wirkt. In dieser Studie wurde eine ähnliche Bindungsaffinität von ARA und EPA an das aktive Zentrum der COX-1 der Thrombozyten gezeigt. Darüber hinaus ergaben weitere Analysen eine kompetitive Inhibition im aktiven Zentrum. Folglich wurde eine Hemmung der Thrombozyten in-vitro, in-vivo und ex-vivo beobachtet. Diese ist auf die Hemmung von COX-1 zurückzuführen. Die COX-1 vermittelt die Synthese von TXA₂, einem der wichtigsten Schritte bei der auto- und parakrinen Thrombozytenaggregation während der Thrombozytenaktivierung [130, 157]. Das (Phospho-)Proteom der Thrombozyten wird signifikant von EPA auf verschiedene Effektoren in unterschiedlichen Signalwegen, die nach der Aktivierung der Thrombozyten beginnen, beeinflusst. Dies unterstreicht die Bedeutung der auto- und parakrinen Thrombozytenaktivierung, da nicht nur COX-1-assoziierte Signalwege durch EPA beeinflusst werden, sondern z.B. auch die VASP- oder Adenylatcyklasephosphorylierung.

Nach der in-vitro Stimulation humaner Thrombozyten mit ARA war die Menge der 20:4- und 20:5-haltigen Lipide am zehnten Tag der IPE-Aufnahme im Vergleich zur Ausgangsmessung signifikant höher. Die relativen Veränderungen bei den Lipiden, die 20:4-Fettsäuren und 20:5-Fettsäuren enthalten, unterschieden sich nicht. Dies unterstreicht die Hypothese, dass eine direkte Interaktion von zirkulierendem EPA und ARA auf der Ebene der COX-1 der Thrombozyten für die thrombozytenaggregationshemmende Wirkung von IPE verantwortlich ist, nicht aber die erhöhte Menge an EPA in der Thrombozytenmembran.

Um den COX-1-abhängigen Mechanismus genauer zu untersuchen, haben wir die arterielle Thrombusbildung in-vivo mit pharmakologischer Blockade und Chimären mit thrombozytärer COX-1-Defizienz untersucht. In Experimenten, bei denen ASS zur Hemmung von COX-1 eingesetzt wurde, zeigten EPA und IPE keine zusätzlichen thrombozytenhemmenden Wirkungen. Bei COX-1-defizienten Chimärenmäusen zeigten IPE-behandelte Mäuse und entsprechende Kontrollmäuse keine Unterschiede bei der Bildung von arteriellen Thromben.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass ein neuer Mechanismus zur Verringerung des kardiovaskulären Risikos durch die Einnahme von IPE entdeckt wurde (s. Abb.53). Die IPE-Einnahme führt zu einer direkten kompetitiven Interaktion von EPA mit ARA auf der Ebene von COX-1 mit der Folge einer verringerten Thrombozytenfunktion und arteriellen Thrombusbildung. Aktuelle Studien bestätigen einen möglichen Benefit für kardiovaskuläre Risikopatient*innen. In der OMEMI-Studie wurden ältere Patient*innen unmittelbar nach einem AMI mit einer Mischung aus EPA und DHA behandelt. Das Risiko für weitere schwere kardiovaskuläre Akutereignisse war dadurch reduziert [167]. Allerdings zeigt sich auch, dass das Risiko für Vorhofflimmern bei diesen Patient*innen erhöht war [168]. Weitere größere Studien werden über die klinische Relevanz der EPA/IPE-Supplementation in der kardiovaskulären Risikoprävention entscheiden müssen. Aktuell laufen zwei große randomisierte Studien, die die Wirkung von IPE im klinischen Bereich weiter untersuchen [169, 170]. Eine der Studien ist RESPECT-EPA (*Randomized Trial for Evaluation in Secondary Prevention Efficacy of Combination Therapy–Statin and EPA*). Diese Studie hat einen ähnlichen Aufbau zur bekannten REDUCE-IT Studie und untersucht, ob EPA bei Patient*innen mit Statintherapie zur Sekundärprävention dienen kann. Die zweite große Studie ist EVAPORATE (*Effect of Vascepa on Improving Coronary Atherosclerosis in People with High Triglycerides Taking Statin Therapy*). Sie untersucht den Einfluss von EPA auf die Progression von koronaren Plaques. Spätestens nach Ende dieser Studien wird feststehen, wie es um die Relevanz der IPE-Supplementation in der Prävention kardiovaskulärer Ereignisse stehen wird.

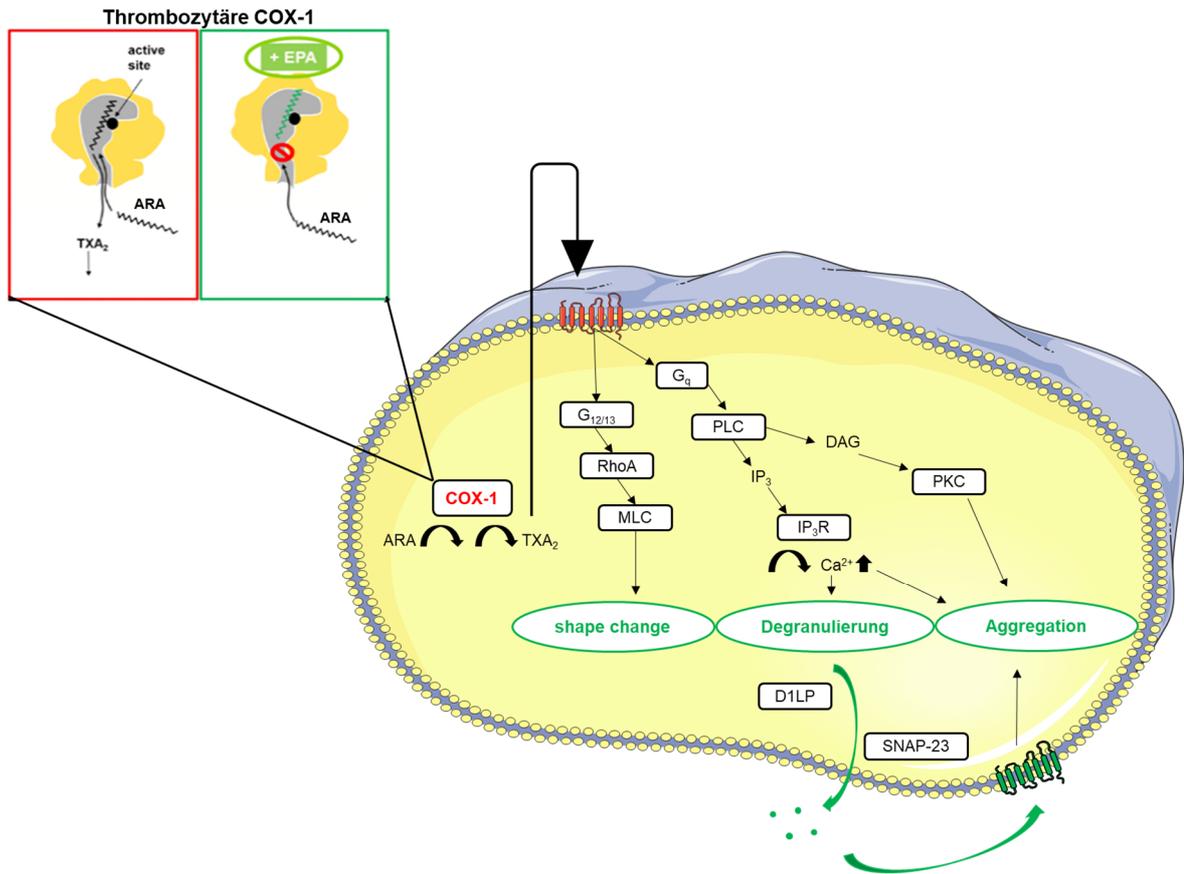


Abb.53: thrombozytärer Wirkmechanismus von EPA

Die COX-1-vermittelte Bildung von TXA₂ aus ARA ist zentral für die Thrombozytenaktivierung. Die Freisetzung von TXA₂ führt zur weiteren Verstärkung der auto- und parakrinen Aktivierung der Thrombozyten. Über den Thromboxanrezeptor werden verschiedene Stoffwechselwege aktiviert. Daraus resultiert eine morphologische Veränderung, die für die Aggregation relevant ist (shape change), sowie die Freisetzung der Granula und die Aggregation. DAG = Diacylglycerol, DL1P = Dynamin-1-like Protein, G_{12/13} = G_{12/13} gekoppeltes G-Protein, G_q = Phospholipase-C-gekoppeltes G-Protein, IP₃ = Inositoltrisphosphat, IP₃R = Inositoltrisphosphatrezeptor, MLC = Myosin-leichte-Kette, PLC = Phospholipase C, PKC = Proteinkinase C SNAP-23 = synaptosomal-associated protein-23, RhoA = Transformationsprotein RhoA

5.2 Diskussion zu Versuchsteil 2

Im zweiten Versuchsteil dieser Arbeit stand das Lipoprotein HDL im Fokus des Interesses. Es konnte festgestellt werden, dass das HDL diabetischer Patient*innen seine positiven Eigenschaften auf das Auskommen nach AMI verliert. Einen Zusammenhang mit der HDL-S1P-Konzentration konnte in diesen Versuchen nicht festgestellt werden. Allerdings liegt eine Korrelation mit dem HbA_{1c} der erkrankten Personen vor.

Zu Beginn dieser Experimente wurde die bereits bekannte positive Eigenschaft des HDL gesunder Proband*innen auf das Auskommen nach I/R-Experimenten bestätigt [78, 171]. Auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte HDL die Infarktgröße um etwa 25% reduzieren. Dies führte entsprechend zu einer deutlich verbesserten kardialen Funktion einen Tag nach AMI. Der positive Effekt des HDL konnte auch in der verkleinerten Narbengröße 21 Tage nach AMI gezeigt werden. Die kardiale Funktion war auch zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu den Kontrollmäusen deutlich verbessert.

Da die reine Erhöhung der HDL-Konzentration in großen Studien keinen Benefit für die Patient*innen zeigte [82, 87], stellt sich die Frage, ob das HDL erkrankter Proband*innen genauso gut wirkt, wie das HDL gesunder Personen. Bereits bekannt ist, dass es Funktionsstörungen des HDL gibt und diese ursächlich an Herz-Kreislauf- und Stoffwechselerkrankungen beteiligt sind [172]. Gründe und Konsequenzen dieser Funktionsstörungen sind mannigfaltig [90] und noch nicht vollends verstanden. Eine solche Dysfunktionalität zeigt sich auch bei der Analyse der Infarktgrößen der Tiere, die dmHDL erhalten haben. Es konnten keine Veränderungen gegenüber den Kontrollen erkannt werden. Die Mäuse hatten auch in der kardialen Funktion ein deutlich verschlechtertes Auskommen gegenüber denen, die HDL gesunder Proband*innen erhielten.

Einen ersten Hinweis auf den Grund der Dysfunktionalität liefert die Korrelation der Infarktgrößen mit den HbA_{1c}-Werten der Spender des dmHDLs. Es zeigte sich eine positive Korrelation dieser beiden Parameter. Es scheint so als würde die Dysfunktionalität mit dem Fortschreiten der diabetischen Erkrankung bzw. mit dem aktuellen Status der Erkrankung korrelieren. Dazu weiß man bereits, dass das HDL-S1P sinkt, wenn der HbA_{1c}-Wert der Patient*innen steigt [151]. Ein Grund dafür ist die zunehmende nicht-enzymatische Glykosylierung des HDL [173]. Ein direkter Zusammenhang zwischen dieser Glykosylierung des dmHDLs konnte bisher in-vitro und ex-vivo gezeigt werden. Dort führte eine verstärkte Glykosylierung, einhergehend mit höheren HbA_{1c}-Werten, zu reduzierten S1P-Gehalten im HDL. Das wiederum sorgte für einen vermehrten Zelltod der Kardiomyozyten [112]. Die durchgeführten Versuche lieferten nun auch in-vivo Daten zu der Abhängigkeit von HbA_{1c} und Funktionalität des HDL. Um diesen Befund mit den HDL-S1P-Werten zu ergänzen, wurden diese im dmHDL sowie im HDL gesunder Proband*innen

bestimmt. In dieser kleinen Stichprobe konnte allerdings kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Größere Analysen konnten dagegen niedrigere HDL-S1P-Werte in diabetischen Patient*innen feststellen [173, 174]. Aufgrund der geringen Stichprobengröße kann man in den dargestellten Experimenten nicht von einer S1P-Abhängigkeit ausgehen. Wenn man allerdings die vorliegende Literatur zu Rate zieht, liegt diese Abhängigkeit trotzdem sehr nahe.

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass das dmHDL seine Funktionalität im AMI verliert. Die Dysfunktionalität nimmt mit steigendem HbA_{1c} der Patient*innen zu. Dieses geht einher mit einem sinkenden Gehalt an S1P im HDL. Auch wenn dieser Befund nicht komplett aus den vorliegenden Versuchen hergeleitet werden kann, so ist im wissenschaftlichen Kontext stark davon auszugehen.

5.2.1 Limitationen dieses Versuchsteils

Wie im ersten Versuchsteil auch, gibt es bei diesem Versuchsteil einige Limitationen, die an dieser Stelle diskutiert werden müssen. Die Zahl der Versuchstiere in diesem Versuchsteil ist gering, sodass man schwerlich einen Rückschluss auf größere Populationen ziehen kann. Trotzdem kann dieser grundlagenwissenschaftliche Versuch klar zeigen, dass die Funktionalität des dmHDL gestört ist. Die Infarktgrößenbestimmung ist zwar eine subjektive Beurteilung, doch wurde diese nur von einer Person durchgeführt. Dies reduziert den Fehler innerhalb der Auswertung deutlich. In den Ergebnissen sieht man eine kleine Standardabweichung, weshalb man in der Infarktgröße signifikante Unterschiede, selbst mit einer geringen Anzahl an Versuchstieren detektieren kann. Aufgrund der niedrigen Versuchstierzahl wurde in der Korrelation zwischen Infarktgröße und HbA_{1c} keine statistische Signifikanz erreicht. Dennoch erscheint es im visuellen Trend eindeutig, dass eine solche Korrelation besteht. Im Kontext aus vorliegenden Daten und der wissenschaftlichen Fachliteratur kann man das Bild der S1P-abhängigen HDL-Dysfunktionalität eindeutig zeichnen.

Eine weitere Einschränkung ist die Tatsache, dass es sich um ein Mausmodell handelt. In-vivo Mausmodelle erzeugen zwar eine stärkere Aussagekraft als reine Zellkultur oder ex-vivo Experimente, jedoch handelt es sich nach wie vor um ein Modell. Als Säugetier hat die Maus Ähnlichkeiten zum menschlichen Organismus, dennoch zeigt die Vergangenheit, dass Ergebnisse aus Mausmodellen nicht zwangsläufig auf den Menschen übertragbar sind. Die Übertragbarkeit ist jedoch nicht das Ziel dieser Versuche. Es handelt sich um Grundlagenwissenschaft auf deren Basis Hypothesen für zukünftige humane Untersuchungen getestet werden können. Größere Studien sind von Nöten, um die

Dysfunktionalität des HDL im diabetischen Patient*innen, aber auch bei anderen Erkrankungen, detaillierter zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. *Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015.* Lancet, 2016. **388**(10053): p. 1459-1544.
2. *Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2019.* 11/2020, Statistisches Bundesamt
3. Goloroush, P., D.M. Yellon, and S.M. Davidson, *Mouse models of atherosclerosis and their suitability for the study of myocardial infarction.* Basic Res Cardiol, 2020. **115**(6): p. 73.
4. Valettas, N. and H.C. Herrmann, *The role of platelets and platelet inhibition in acute myocardial infarction.* Coron Artery Dis, 2003. **14**(5): p. 357-63.
5. Burke, A.P. and R. Virmani, *Pathophysiology of acute myocardial infarction.* Med Clin North Am, 2007. **91**(4): p. 553-72; ix.
6. Mustard, J.F., M.A. Packham, and R.L. Kinlough-Rathbone, *Platelets, blood flow, and the vessel wall.* Circulation, 1990. **81**(1 Suppl): p. I24-7; discussion I40-1.
7. Lefkovits, J., E.F. Plow, and E.J. Topol, *Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine.* N Engl J Med, 1995. **332**(23): p. 1553-9.
8. *NVL Chronische KHK.* 2019(5. Auflage. 1.Version).
9. Gößwald, A., et al., *Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland.* 2013, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
10. Jung, M., et al., *IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation.* Basic Res Cardiol, 2017. **112**(3): p. 33.
11. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair.* Pharmacol Res, 2008. **58**(2): p. 88-111.
12. Berezin, A.E. and A.A. Berezin, *Adverse Cardiac Remodelling after Acute Myocardial Infarction: Old and New Biomarkers.* Dis Markers, 2020. **2020**: p. 1215802.
13. Vieira, J.M., et al., *The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction.* J Clin Invest, 2018. **128**(8): p. 3402-3412.
14. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis.* Toxicol Pathol, 2011. **39**(1): p. 273-80.
15. Mutschler, E., et al., *Mutschler Arzneimittelwirkungen.* Vol. 10. Auflage. 2013: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
16. Hoffman, M. and D.M. Monroe, 3rd, *A cell-based model of hemostasis.* Thromb Haemost, 2001. **85**(6): p. 958-65.
17. Kuter, D.J., *The physiology of platelet production.* Stem Cells, 1996. **14** **Suppl 1**: p. 88-101.
18. Ghoshal, K. and M. Bhattacharyya, *Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis.* ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 781857.
19. Gawaz, M., et al., *Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty.* Circulation, 1996. **93**(2): p. 229-37.
20. Gidlöf, O., et al., *Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression.* Blood, 2013. **121**(19): p. 3908-17, s1-26.
21. Valgimigli, M., et al., *2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS).* Eur Heart J, 2018. **39**(3): p. 213-260.
22. Ruggeri, Z.M., et al., *Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor.* J Clin Invest, 1983. **72**(1): p. 1-12.

23. Golebiewska, E.M. and A.W. Poole, *Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond*. Blood Rev, 2015. **29**(3): p. 153-62.
24. Heijnen, H. and P. van der Sluijs, *Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not?* J Thromb Haemost, 2015. **13**(12): p. 2141-51.
25. Frojmovic, M.M. and J.G. Milton, *Human platelet size, shape, and related functions in health and disease*. Physiol Rev, 1982. **62**(1): p. 185-261.
26. Piersma, S.R., et al., *Proteomics of the TRAP-induced platelet releasate*. J Proteomics, 2009. **72**(1): p. 91-109.
27. Maynard, D.M., et al., *Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(9): p. 1945-55.
28. Polgár, J., S.H. Chung, and G.L. Reed, *Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion*. Blood, 2002. **100**(3): p. 1081-3.
29. Lemons, P.P., D. Chen, and S.W. Whiteheart, *Molecular mechanisms of platelet exocytosis: requirements for alpha-granule release*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(3): p. 875-80.
30. Lai, K.C. and R. Flaumenhaft, *SNARE protein degradation upon platelet activation: calpain cleaves SNAP-23*. J Cell Physiol, 2003. **194**(2): p. 206-14.
31. Ruggeri, Z., *Perspective series: cell adhesion in vascular biology. von Willebrand factor*. J Clin Invest, 1999. **99**: p. 559-564.
32. Kaplan, K., et al., *Platelet alpha-granule proteins: studies on release and subcellular localization*. Blood, 1979. **53**: p. 604-618.
33. Orkin, S.H., et al., *Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood*. Elsevier Health Sciences, 2009: p. 1386.
34. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *Platelets: physiology and biochemistry*. Semin Thromb Hemost, 2005. **31**(4): p. 381-92.
35. Ambrosio, A.L., J.A. Boyle, and S.M. Di Pietro, *Mechanism of platelet dense granule biogenesis: study of cargo transport and function of Rab32 and Rab38 in a model system*. Blood, 2012. **120**(19): p. 4072-81.
36. Jin, J., et al., *RhoA downstream of G(q) and G(12/13) pathways regulates protease-activated receptor-mediated dense granule release in platelets*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(5): p. 835-44.
37. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
38. Varga-Szabo, D., A. Braun, and B. Nieswandt, *Calcium signaling in platelets*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(7): p. 1057-66.
39. Grosse, J., et al., *An EF hand mutation in Stim1 causes premature platelet activation and bleeding in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3540-50.
40. Wu, K.K., *Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis*. J Intern Med, 1996. **239**(1): p. 17-34.
41. Brass, L.F., J.A. Hoxie, and D.R. Manning, *Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation*. Thromb Haemost, 1993. **70**(1): p. 217-23.
42. Hathaway, D.R. and R.S. Adelstein, *Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(4): p. 1653-7.
43. Shattil, S.J. and L.F. Brass, *Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators*. J Biol Chem, 1987. **262**(3): p. 992-1000.
44. Simmons, D.L., R.M. Botting, and T. Hla, *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(3): p. 387-437.
45. Lüllmann, H., K. Mohr, and L. Hein, *Taschenatlas Pharmakologie*. Vol. 7. Auflage. 2015: Georg Thieme Verlag KG.

46. Hall, E.R., W.M. Tuan, and D.L. Venton, *Production of platelet thromboxane A2 inactivates purified human platelet thromboxane synthase*. *Biochem J*, 1986. **233**(3): p. 637-41.
47. Vane, J.R., *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs*. *Nat New Biol*, 1971. **231**(25): p. 232-5.
48. Ornelas, A., et al., *Beyond COX-1: the effects of aspirin on platelet biology and potential mechanisms of chemoprevention*. *Cancer Metastasis Rev*, 2017. **36**(2): p. 289-303.
49. de Groot, P.G., R.T. Urbanus, and M. Roest, *Platelet interaction with the vessel wall*. *Handb Exp Pharmacol*, 2012(210): p. 87-110.
50. Fahy, E., et al., *A comprehensive classification system for lipids*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(5): p. 839-61.
51. Fahy, E., et al., *Lipid classification, structures and tools*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1811**(11): p. 637-47.
52. Redgrave, T.G., *Chylomicron metabolism*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 1): p. 79-82.
53. Enas, E.A., et al., *Elevated lipoprotein(a)--a genetic risk factor for premature vascular disease in people with and without standard risk factors: a review*. *Dis Mon*, 2006. **52**(1): p. 5-50.
54. Goel, A., et al., *Fish, Fish Oils and Cardioprotection: Promise or Fish Tale?* *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(12).
55. *Fachinformation zu Vakzepa 998 mg Weichkapseln*. Amarin Pharmaceuticals, März 2021.
56. Adams, P.B., et al., *Arachidonic acid to eicosapentaenoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression*. *Lipids*, 1996. **31** Suppl: p. S157-61.
57. Burt, V.K., L.L. Altshuler, and N. Rasgon, *Depressive symptoms in the perimenopause: prevalence, assessment, and guidelines for treatment*. *Harv Rev Psychiatry*, 1998. **6**(3): p. 121-32.
58. Peet, M., et al., *Two double-blind placebo-controlled pilot studies of eicosapentaenoic acid in the treatment of schizophrenia*. *Schizophr Res*, 2001. **49**(3): p. 243-51.
59. Rogero, M.M. and P.C. Calder, *Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids*. *Nutrients*, 2018. **10**(4).
60. Shahidi, F. and P. Ambigaipalan, *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits*. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2018. **9**: p. 345-381.
61. Manson, J.E., et al., *Marine n-3 Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer*. *N Engl J Med*, 2019. **380**(1): p. 23-32.
62. Bowman, L., et al., *Effects of n-3 Fatty Acid Supplements in Diabetes Mellitus*. *N Engl J Med*, 2018. **379**(16): p. 1540-1550.
63. Yokoyama, M., et al., *Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis*. *Lancet*, 2007. **369**(9567): p. 1090-8.
64. Bhatt, D.L., et al., *Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia*. *N Engl J Med*, 2019. **380**(1): p. 11-22.
65. Mach, F., et al., *2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS)*. *European Heart Journal*, 2019. **41**(1): p. 111-188.
66. Harris, W.S., *Understanding why REDUCE-IT was positive - Mechanistic overview of eicosapentaenoic acid*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2019. **62**(5): p. 401-405.
67. Bruckert, E., et al., *Fibrates effect on cardiovascular risk is greater in patients with high triglyceride levels or atherogenic dyslipidemia profile: a systematic review and meta-analysis*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011. **57**(2): p. 267-72.
68. Ip, C.K., et al., *Effects of add-on lipid-modifying therapy on top of background statin treatment on major cardiovascular events: A meta-analysis of randomized controlled trials*. *Int J Cardiol*, 2015. **191**: p. 138-48.

69. Takamura, M., et al., *Long-Term Administration of Eicosapentaenoic Acid Improves Post-Myocardial Infarction Cardiac Remodeling in Mice by Regulating Macrophage Polarization*. *J Am Heart Assoc*, 2017. **6**(2).
70. Mason, R.P., P. Libby, and D.L. Bhatt, *Emerging Mechanisms of Cardiovascular Protection for the Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020. **40**(5): p. 1135-1147.
71. Dyerberg, J., et al., *Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?* *Lancet*, 1978. **2**(8081): p. 117-9.
72. <https://www.u-helmich.de/che/lexikon/A/arachidonsaeure.html>. abgerufen am 29.10.2021.
73. Halushka, P.V., C.J. Allan, and K.L. Davis-Bruno, *Thromboxane A2 receptors*. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1995. **12**(2-3): p. 361-78.
74. Harker, L.A. and J.L. Ritchie, *The role of platelets in acute vascular events*. *Circulation*, 1980. **62**(6 Pt 2): p. V13-8.
75. Nelson, J.R., et al., *EPA's pleiotropic mechanisms of action: a narrative review*. *Postgrad Med*, 2021. **133**(6): p. 651-664.
76. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
77. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(2): p. 115-26.
78. Sposito, A.C., et al., *Reciprocal Multifaceted Interaction Between HDL (High-Density Lipoprotein) and Myocardial Infarction*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. **39**(8): p. 1550-1564.
79. Theilmeyer, G., et al., *High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor*. *Circulation*, 2006. **114**(13): p. 1403-9.
80. Nofer, J.R. and M. van Eck, *HDL scavenger receptor class B type I and platelet function*. *Curr Opin Lipidol*, 2011. **22**(4): p. 277-82.
81. van der Stoep, M., S.J. Korporaal, and M. Van Eck, *High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses*. *Cardiovasc Res*, 2014. **103**(3): p. 362-71.
82. Lincoff, A.M., et al., *Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease*. *N Engl J Med*, 2017. **376**(20): p. 1933-1942.
83. Bowman, L., et al., *Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(13): p. 1217-1227.
84. Rader, D.J. and G.K. Hovingh, *HDL and cardiovascular disease*. *Lancet*, 2014. **384**(9943): p. 618-625.
85. Di Angelantonio, E., et al., *Lipid-related markers and cardiovascular disease prediction*. *Jama*, 2012. **307**(23): p. 2499-506.
86. Lewington, S., et al., *Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths*. *Lancet*, 2007. **370**(9602): p. 1829-39.
87. Holmes, M.V., et al., *Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease*. *Eur Heart J*, 2015. **36**(9): p. 539-50.
88. Voight, B.F., et al., *Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study*. *Lancet*, 2012. **380**(9841): p. 572-80.
89. Frikke-Schmidt, R., et al., *Association of loss-of-function mutations in the ABCA1 gene with high-density lipoprotein cholesterol levels and risk of ischemic heart disease*. *Jama*, 2008. **299**(21): p. 2524-32.
90. Levkau, B., *HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications*. *Front Pharmacol*, 2015. **6**: p. 243.
91. Okajima, F., *Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator?* *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1582**(1-3): p. 132-7.

92. Nofer, J.R., et al., *HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3*. J Clin Invest, 2004. **113**(4): p. 569-81.
93. Wilkerson, B.A., et al., *Sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier: high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1*. J Biol Chem, 2012. **287**(53): p. 44645-53.
94. Kimura, T., et al., *High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(7): p. 1283-8.
95. Sattler, K.J., et al., *Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(6): p. 821-32.
96. Sattler, K., et al., *HDL-bound sphingosine 1-phosphate (S1P) predicts the severity of coronary artery atherosclerosis*. Cell Physiol Biochem, 2014. **34**(1): p. 172-84.
97. Hait, N.C., et al., *Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(12): p. 2016-26.
98. Jozefczuk, E., T.J. Guzik, and M. Siedlinski, *Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology*. Pharmacol Res, 2020. **156**: p. 104793.
99. Tani, M., et al., *Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets*. J Lipid Res, 2005. **46**(11): p. 2458-67.
100. Daum, G., et al., *Determinants of Serum- and Plasma Sphingosine-1-Phosphate Concentrations in a Healthy Study Group*. TH Open, 2020. **4**(1): p. e12-e19.
101. Yatomi, Y., et al., *Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum*. J Biochem, 1997. **121**(5): p. 969-73.
102. Hänel, P., P. Andréani, and M.H. Gräler, *Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood*. Faseb j, 2007. **21**(4): p. 1202-9.
103. Ulrych, T., et al., *Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(4): p. 790-8.
104. Polzin, A., et al., *Aspirin inhibits release of platelet-derived sphingosine-1-phosphate in acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2013. **170**(2): p. e23-4.
105. Lecour, S., et al., *Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(5): p. 509-18.
106. Ksiazek, M., et al., *Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate*. J Lipid Res, 2015. **56**(7): p. 1271-81.
107. Kappos, L., et al., *A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2010. **362**(5): p. 387-401.
108. Cohen, J.A., et al., *Safety and efficacy of the selective sphingosine 1-phosphate receptor modulator ozanimod in relapsing multiple sclerosis (RADIANCE): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial*. Lancet Neurol, 2016. **15**(4): p. 373-81.
109. Goodman, A.D., N. Anadani, and L. Gerwitz, *Siponimod in the treatment of multiple sclerosis*. Expert Opin Investig Drugs, 2019. **28**(12): p. 1051-1057.
110. Santos-Gallego, C.G., et al., *Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonist Fingolimod Increases Myocardial Salvage and Decreases Adverse Postinfarction Left Ventricular Remodeling in a Porcine Model of Ischemia/Reperfusion*. Circulation, 2016. **133**(10): p. 954-66.
111. H, O., *Die antiken Diabetes-Synonyme und ihre Wortgeschichte*. Janus, 1964. **Band 51**: p. 193-201.
112. Brinck, J.W., et al., *Diabetes Mellitus Is Associated With Reduced High-Density Lipoprotein Sphingosine-1-Phosphate Content and Impaired High-Density Lipoprotein Cardiac Cell Protection*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(5): p. 817-24.

113. Weykamp, C., *HbA1c: a review of analytical and clinical aspects*. *Ann Lab Med*, 2013. **33**(6): p. 393-400.
114. Cattaneo, M., et al., *Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(6): p. 1029.
115. Brandl, R., et al., *Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by immunocytochemical detection of the cell cycle-related antigen Ki-67*. *Circulation*, 1997. **96**(10): p. 3360-8.
116. Paniccia, R., et al., *Platelet function tests: a comparative review*. *Vasc Health Risk Manag*, 2015. **11**: p. 133-48.
117. Conant, C.G., et al., *Well plate microfluidic system for investigation of dynamic platelet behavior under variable shear loads*. *Biotechnol Bioeng*, 2011. **108**(12): p. 2978-87.
118. Cho, J.H., et al., *Functional Assessment of Platelet Dense Granule ATP Release*. *Am J Clin Pathol*, 2021. **155**(6): p. 863-872.
119. Gryglewski, R.J., *Prostacyclin among prostanoids*. *Pharmacol Rep*, 2008. **60**(1): p. 3-11.
120. Furie, B., B.C. Furie, and R. Flaumenhaft, *A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion*. *Thromb Haemost*, 2001. **86**(1): p. 214-21.
121. Assinger, A., I. Volf, and D. Schmid, *A novel, rapid method to quantify intraplatelet calcium dynamics by ratiometric flow cytometry*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0122527.
122. Yu, K., et al., *A nonmyeloablative chimeric mouse model accurately defines microglia and macrophage contribution in glioma*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2019. **45**(2): p. 119-140.
123. Youshani, A.S., et al., *Non-myeloablative busulfan chimeric mouse models are less pro-inflammatory than head-shielded irradiation for studying immune cell interactions in brain tumours*. *J Neuroinflammation*, 2019. **16**(1): p. 25.
124. Totzeck, M., et al., *A practical approach to remote ischemic preconditioning and ischemic preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury*. *J Biol Methods*, 2016. **3**(4).
125. Ferrière, S., et al., *A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function*. *Blood*, 2020. **136**(6): p. 740-748.
126. Liu, Y., et al., *Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail bleeding assay in mice*. *World J Exp Med*, 2012. **2**(2): p. 30-6.
127. Forli, S., et al., *Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite*. *Nat Protoc*, 2016. **11**(5): p. 905-19.
128. Dumon, S., et al., *Itga2b regulation at the onset of definitive hematopoiesis and commitment to differentiation*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e43300.
129. Merten, M. and P. Thiagarajan, *P-selectin in arterial thrombosis*. *Z Kardiol*, 2004. **93**(11): p. 855-63.
130. Nakahata, N., *Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology*. *Pharmacol Ther*, 2008. **118**(1): p. 18-35.
131. ABDA, *Icosapent-Ethyl/Vazkepa*. Pharmazeutische Zeitung, Govi Verlag, 2021. **58**.
132. Hattori, R., et al., *Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(14): p. 7768-71.
133. <https://www.uniprot.org/>. abgerufen am 27.10.2021.
134. Mosesson, M.W., *Fibrinogen and fibrin structure and functions*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(8): p. 1894-904.
135. Noé, L., et al., *Regulators of platelet cAMP levels: clinical and therapeutic implications*. *Curr Med Chem*, 2010. **17**(26): p. 2897-905.
136. Hauser, W., et al., *Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(14): p. 8120-5.

137. Aszódi, A., et al., *The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function.* *Embo j*, 1999. **18**(1): p. 37-48.
138. Sheu, J.R., et al., *Inhibitory Mechanisms of Metallothionein on Platelet Aggregation in In Vitro and Platelet Plug Formation in In Vivo Experiments.* *Experimental Biology and Medicine*, 2003. **228**(11): p. 1321-1328.
139. Guidetti, G.F., I. Canobbio, and M. Torti, *PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis.* *Adv Biol Regul*, 2015. **59**: p. 36-52.
140. Drayer, A.L., et al., *The family of inositol and phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatases.* *Biochem Soc Trans*, 1996. **24**(4): p. 1001-5.
141. Ma, P., et al., *Dissociation of SHP-1 from Spinophilin during Platelet Activation Exposes an Inhibitory Binding Site for Protein Phosphatase-1 (PP1).* *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119496.
142. Williams, C.M., et al., *Platelet-specific deletion of SNAP23 ablates granule secretion, substantially inhibiting arterial and venous thrombosis in mice.* *Blood Adv*, 2018. **2**(24): p. 3627-3636.
143. Tsuboi, T., H.T. McMahon, and G.A. Rutter, *Mechanisms of dense core vesicle recapture following "kiss and run" ("cavicapture") exocytosis in insulin-secreting cells.* *J Biol Chem*, 2004. **279**(45): p. 47115-24.
144. Gerber, S., et al., *Recessive and Dominant De Novo ITPR1 Mutations Cause Gillespie Syndrome.* *Am J Hum Genet*, 2016. **98**(5): p. 971-980.
145. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation.* *N Engl J Med*, 2008. **359**(9): p. 938-49.
146. Besler, C., et al., *Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease.* *J Clin Invest*, 2011. **121**(7): p. 2693-708.
147. deGoma, E.M., R.L. deGoma, and D.J. Rader, *Beyond high-density lipoprotein cholesterol levels evaluating high-density lipoprotein function as influenced by novel therapeutic approaches.* *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(23): p. 2199-211.
148. Kontush, A. and M.J. Chapman, *Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis.* *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(3): p. 342-74.
149. Sattler, K. and B. Levkau, *Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection.* *Cardiovasc Res*, 2009. **82**(2): p. 201-11.
150. Murata, N., et al., *Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions.* *Biochem J*, 2000. **352 Pt 3**(Pt 3): p. 809-15.
151. Tong, X., et al., *High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin I-2 release in endothelial cells: relationship with HDL-associated sphingosine-1-phosphate.* *Cardiovasc Diabetol*, 2013. **12**: p. 27.
152. Hosogoe, N., et al., *Add-on Antiplatelet Effects of Eicosapentaenoic Acid With Tailored Dose Setting in Patients on Dual Antiplatelet Therapy.* *Int Heart J*, 2017. **58**(4): p. 481-485.
153. Adili, R., et al., *In vivo modeling of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid-mediated inhibition of both platelet function and accumulation in arterial thrombi.* *Platelets*, 2019. **30**(2): p. 271-279.
154. Westerveld, H.T., et al., *Effects of low-dose EPA-E on glycemic control, lipid profile, lipoprotein(a), platelet aggregation, viscosity, and platelet and vessel wall interaction in NIDDM.* *Diabetes Care*, 1993. **16**(5): p. 683-8.
155. Larson, M.K., et al., *Effects of omega-3 acid ethyl esters and aspirin, alone and in combination, on platelet function in healthy subjects.* *Thromb Haemost*, 2008. **100**(4): p. 634-41.

156. Rodriguez-Granillo, G.A. and H.M. Garcia-Garcia, *Underlying mechanisms involved in the icosapent ethyl reduction of cardiovascular events still cannot be attributed to an anti-atherosclerotic effect*. Eur Heart J, 2021. **42**(31): p. 3023-3024.
157. Schror, K., [*Thromboxane antagonism in thrombocytes--pathophysiology, pharmacology and possible clinical significance*]. Wien Klin Wochenschr, 1991. **103**(18): p. 543-53.
158. Eikelboom, J.W., et al., *Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events*. Circulation, 2002. **105**(14): p. 1650-5.
159. McCarthy, N.S., et al., *Genetic variants in PPARGC1B and CNTN4 are associated with thromboxane A2 formation and with cardiovascular event free survival in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT)*. Atherosclerosis, 2018. **269**: p. 42-49.
160. Weyrich, A.S., et al., *Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(2): p. 241-6.
161. Neu, C.T., T. Gutschner, and M. Haemmerle, *Post-Transcriptional Expression Control in Platelet Biogenesis and Function*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(20).
162. Vanhoutte, P.M., *COX-1 and vascular disease*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **86**(2): p. 212-5.
163. Kirkby, N.S., et al., *Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(43): p. 17597-602.
164. Olschewski, H., *Prostacyclins*. Handb Exp Pharmacol, 2013. **218**: p. 177-98.
165. Zhang, X.H., et al., *Increased prostacyclin levels inhibit the aggregation and activation of platelets via the PI3K-AKT pathway in prolonged isolated thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Thromb Res, 2016. **139**: p. 1-9.
166. Nicholls, S.J., et al., *Effect of High-Dose Omega-3 Fatty Acids vs Corn Oil on Major Adverse Cardiovascular Events in Patients at High Cardiovascular Risk: The STRENGTH Randomized Clinical Trial*. Jama, 2020. **324**(22): p. 2268-2280.
167. Kalstad, A.A., et al., *Effects of n-3 Fatty Acid Supplements in Elderly Patients After Myocardial Infarction: A Randomized, Controlled Trial*. Circulation, 2021. **143**(6): p. 528-539.
168. Myhre, P.L., et al., *Changes in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and risk of cardiovascular events and atrial fibrillation: A secondary analysis of the OMEMI trial*. J Intern Med, 2022.
169. Ganda, O.P., et al., *Unmet Need for Adjunctive Dyslipidemia Therapy in Hypertriglyceridemia Management*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(3): p. 330-343.
170. Budoff, M., et al., *Effect of Vascepa (icosapent ethyl) on progression of coronary atherosclerosis in patients with elevated triglycerides (200-499 mg/dL) on statin therapy: Rationale and design of the EVAPORATE study*. Clin Cardiol, 2018. **41**(1): p. 13-19.
171. Theilmeyer, G., et al., *High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor*. Circulation, 2006. **114**(13): p. 1403-9.
172. Huxley, R.R., et al., *Isolated low levels of high-density lipoprotein cholesterol are associated with an increased risk of coronary heart disease: an individual participant data meta-analysis of 23 studies in the Asia-Pacific region*. Circulation, 2011. **124**(19): p. 2056-64.
173. Tong, X., et al., *The compensatory enrichment of sphingosine -1- phosphate harbored on glycosylated high-density lipoprotein restores endothelial protective function in type 2 diabetes mellitus*. Cardiovasc Diabetol, 2014. **13**: p. 82.
174. Chung, M.Y., et al., *Plasma sphingosine 1-phosphate concentrations and cardiovascular autonomic neuropathy in individuals with type 2 diabetes*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 12768.

Danksagung

Mit Abschluss dieser Arbeit möchte ich einigen Personen gesondert danken, denn ohne sie wäre diese Arbeit, ja allein der Weg dorthin, niemals möglich gewesen. Beginnen möchte ich bei Prof. Dr. Malte Kelm, der mir als Direktor der Klinik ermöglicht hat Forschung im kardiovaskulären Forschungslabor zu betreiben und Patient*innen für die Studie einzuschließen. Natürlich möchte ich auch allen Forschungspartner*innen danken, die mit ihrer Arbeit und ihren Analysen zum Gesamtbild dieser Dissertation beigetragen haben sowie allen im Labor, die für einen reibungslosen Ablauf gesorgt haben. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Amin Polzin. Als mein Doktorvater und Leiter der Arbeitsgruppe, in der ich nun seit über drei Jahren arbeite, hat er einen ganz besonderen Einfluss auf mich gehabt. Seine Ideen und sein Enthusiasmus für die Wissenschaft mögen mich zu Beginn oft gefordert haben, zurückblickend kann ich aber festhalten, dass sie vor allem meiner Förderung dienten. Sie haben mir trotz einer engen Betreuung Platz zur wissenschaftlichen Entfaltung gegeben. Herzlichen Dank! Neben dem Leiter der Arbeitsgruppe möchte ich natürlich ganz besonders der Arbeitsgruppe selbst danken. Viele von euch standen und stehen mir täglich mit Rat und Tat zur Seite. Wir sind inzwischen so sehr gewachsen, dass ich euch nicht alle namentlich erwähnen kann. Ganz besonders möchte ich aber Maïke Barcik danken. Sie ist mir nicht nur thematisch innerhalb der Arbeitsgruppe am nächsten, sondern als direkt Sitznachbarin im Büro auch rein räumlich. Sie musste alle emotionalen Auf's und Abs hautnah miterleben und hat dies mit Bravour gemeistert. Danke für deine fachliche, aber besonders für deine mentale Unterstützung.

Einleitend habe ich davon gesprochen, dass es Menschen gibt, denen ich zu verdanken habe, überhaupt den Weg der Dissertation anzutreten. Da sind zum einen meine Freunde, die mich ab dem Kindesalter nahezu täglich begleitet und unterstützt haben. Auch wenn wir uns inzwischen wesentlich seltener sehen, kann ich jederzeit auf euch zählen. Danke für euren Rückhalt. Rückhalt ist ein gutes Stichwort. Vielleicht kann man es noch mit Geborgenheit und Liebe ergänzen. Das ist was ich bei meiner Familie fühle. Die bedingungslose Liebe und die Stärke, die ihr mir gebt, machen mich erst zu dem was ich bin. Das größte Dankeschön geht natürlich an euch: Mama, Papa, Patrick und Anne. Ich liebe euch!

Eidesstattliche Versicherung

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

Düsseldorf, der 14.03.2022

Unterschrift