

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

Verringerung der arteriellen Thrombose durch Inhibition der
Cyclooxygenase-1 vermittelten Thrombozytenaktivierung durch
Icosapent- Ethyl (IPE)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Laura Wildeis

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Zweitgutachter: PD Dr. med. Christian Buchbender

“Whoever saves one life saves the world entire.”

Talmud, Mishnah Sanhedrin 4:5

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Mourikis P*, Benkhoff M*, **Wildeis L***, Barcik M, Helten C, Coman C, Solari FA, Krahn D, Dannenberg L, Ahlbrecht S, Zikeli D, Utz A, Trojovsky K, Richter H, Al Kassis G, M'Pembele R, Zako S, Huckenbeck T, Bauer S, Schmitz D, Pfeiler S, Gerdes N, Dücker C, Pircher J, Zhe Z, Thienel M, Ul Ain Q, Keul P, Kirkby N, Sohn D, Budach W, Hohlfeld T, Schrör K, Levkau B, Zeus T, Verhelst SHL, Ahrends R, Sickmann A, Mitchell J, Mora S, Manson JE, Bhatt DL, Landmesser U, Massberg S, Kelm M, Petzold T, Polzin A. *Icosapent ethyl reduces arterial thrombosis by inhibition of cyclooxygenase-1-induced platelet reactivity*. *Sci Transl Med*. 2025 May 21;17(799):eado0610. doi: 10.1126/scitranslmed.ado0610. Epub 2025 May 21. PMID: 40397711.

* *authors contributed equally*

Zusammenfassung

Die Supplementierung mit mehrfach ungesättigten Omega-3 Fettsäuren (ω -3 *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse wird kontrovers diskutiert. Besonders im Fokus stehend ist Icosapent- Ethyl (IPE), der Ethylester der Eicosapentaensäure (EPA). EPA weist eine strukturelle Ähnlichkeit mit Arachidonsäure (AA) auf, welche ein essenzielles Substrat für die Cyclooxygenase-1 (COX-1) in Thrombozyten darstellt und eine zentrale Rolle in der thrombozytären Aktivierung und der Pathogenese ischämischer Ereignisse spielt. Die Hypothese dieser Arbeit war, dass EPA auf der Ebene der COX-1 mit AA um die Bindungsstelle konkurriert, was zu einer reduzierten Thrombozytenaktivierung und einer verminderten Bildung arterieller Thromben führt.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* und *ex vivo* Versuchsansätze durchgeführt. Im *in vivo* Modell wurde mithilfe der intravitralen Mikroskopie die Thrombusbildung in Mäusen nach IPE- Gabe analysiert. Für die *in vitro* und *ex vivo* Analysen wurden humane Proben nach IPE- Behandlung untersucht. Hierbei kamen verschiedene Methoden zur Anwendung, darunter Flusskammerexperimente zur Untersuchung der Thrombozytenadhäsion unter physiologischen Flussbedingungen, Aggregometrie, Durchflusszytometrie, sowie Granulafreisetzungstests. Darüber hinaus wurden Proteom- und Lipidom Analysen durchgeführt, um Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellmembran und in der Signaltransduktion zu detektieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Behandlung mit IPE bei Mäusen die Bildung arterieller Thromben signifikant reduziert. Humane *ex vivo* Untersuchungen ergaben ebenfalls eine verminderte Thrombozytenaktivierung, -adhäsion und -aggregation, sowie eine reduzierte Freisetzung von alpha- und dichten Granula.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein bislang wenig untersuchter antithrombotischer Wirkmechanismus von EPA aufgezeigt werden. EPA interagiert direkt mit der COX-1 und konkurriert mit AA um die aktive Bindungsstelle. Durch diese kompetitive Hemmung wird die Synthese prothrombotischer Eicosanoide reduziert, was zu einer Hemmung der Thrombozytenaktivierung und einer Abschwächung der arteriellen Thrombosebildung führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Erkenntnisse über die molekulare Wirkweise von EPA und tragen zum besseren Verständnis der potenziellen kardioprotektiven Wirkung einer PUFA Supplementierung bei.

Abstract

The potential benefit of omega-3 polyunsaturated fatty acid (ω -3 PUFA) supplementation in preventing cardiovascular events remains a topic of debate. Icosapent ethyl (IPE) is the ethyl ester of eicosapentaenoic acid (EPA). EPA, as bioactive metabolite of IPE, shares structural similarities with arachidonic acid (AA), a key substrate for platelet cyclooxygenase-1 (COX-1) that plays a crucial role in platelet activation and the pathogenesis of ischemic events. Based on this, we hypothesized that EPA competes with AA at the COX-1 binding site, thereby preventing platelet activation and arterial thrombosis.

To investigate this hypothesis, *in vivo* effects of IPE were assessed by intravital microscopy of thrombus formation in mice. Additionally, *in vitro* and *ex vivo* experiments were conducted to evaluate the effects of IPE and EPA on platelet function in patients receiving IPE treatment. These experiments included flow chamber assays to measure platelet adhesion, aggregometry to assess platelet aggregation, flow cytometry for the analysis of platelet activation markers, and granule release assays to quantify alpha and dense granule secretion. Proteome and lipidome analyses were performed to detect molecular changes in platelet signaling and membrane composition. Pharmacodynamic studies confirmed a competitive interaction between EPA and AA at this site.

In summary, this study identified a novel antithrombotic mechanism of EPA. EPA binds directly and competitively to COX-1, displacing AA and thereby inhibiting the synthesis of prothrombotic eicosanoids. This competitive inhibition reduces platelet reactivity and arterial thrombosis, contributing to a better understanding of the potential cardioprotective effects of ω -3 PUFA supplementation.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
ApoC-III	Apolipoprotein C-III
ASA	Acetylsalicylsäure
AUC	Area under the curve
COX-1/ 2	Cyclooxygenase-1/ -2
DHA	Docosahexaensäure
DGAT	Diacylglycerol-O-Acyltransferase
EPA	Eicosapentaensäure
EGTA	Ethylenglycolbis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
IPE	Icosapent- Ethyl
KHK	Koronare Herzkrankheit
LC/MS	Liquid chromatography mass spectrometry
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
LPL	Lipoproteinlipase
MEA	Multiplate Impendanz Aggregometrie
MoA	Maximum of Aggregation
PAP	Plättchenarmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
PCI	Perkutane Koronarintervention
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure
RCT	Randomisierte- kontrollierte Studien
RT	Raumtemperatur
SREBP-1c	Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c
TXA2	Thromboxan A2
TXB2	Thromboxan B2
VLDL	Very- low- density Lipoprotein

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Hämostase	2
1.2 Thrombozyten	3
1.2.1 Alpha und dichte Granula	3
1.2.2. Lipidom und Proteomanalyse der Thrombozyten	5
1.3. Mehrfach ungesättigte Omega-3 Fettsäuren (PUFAs)	5
1.3.1. Rolle der PUFAs in der arteriellen Thrombose	7
1.4 Ziele der Arbeit und Hypothese	8
2. Methoden	9
2.1. Studiendesign	9
2.2. Experimenteller Teil	9
2.3. Klinisch- translationaler Teil	10
2.4. Probandenkollektiv	10
2.5. Probengewinnung	12
2.6 Versuchstiere	12
2.7 In- vivo Modell der arteriellen Thrombusbildung	13
2.8 Histologische Analyse	13
2.9 Tailbleeding Assay	13
2.10. Photoaffinitätsmarkierung	14
2.11. In Silico Docking Analyse	15
2.12. Lichttransmissionsaggregometrie (LTA)	15
2.13. Multiplate® Impedanz Aggregometrie	17
2.14. Adenosintriphosphat (ATP) Release Assay	18
2.15. Durchflusszytometrie	19
2.16. Calcium- signaling mittels Durchflusszytometrie	20
2.17. Flusskammerversuche	21
2.18. Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA)	22
2.19. Lipidom- Analyse (Shotgun-Lipidomics)	22
2.20. Phospho-/ Proteomanalyse mittels LC/ MS (Liquid- Chromatographie-Massenspektrometrie)	24
2.21. Statistische Analyse	26
3. Ergebnisse	27
3.1. EPA reduziert die Thrombozytenaggregation, -adhäsion, -aktivierung, sowie die Degranulation und das Calcium-Signaling in vitro	27
3.2. IPE reduziert die Bildung arterieller Thromben in vivo und beeinflusst die Blutungszeit	33
3.3. Modulation der intrazellulären Proteinphosphorylierung durch EPA-Behandlung in vitro	34

3.4. EPA induzierte Thrombozytenhemmung ist unabhängig von Triglyceriden und der Membranlipidzusammensetzung	37
3.5. Kompetitive Hemmung der thrombozytären COX-1 durch EPA in vitro	40
3.6. Analyse der Bindungsinteraktion zwischen EPA und thrombozytärer COX-1	42
3.7. Perorale IPE- Supplementierung reduziert die Thrombozytenreaktivität	43
4. Diskussion	45
4.1. Plasmakonzentrationsabhängige Wirksamkeit von EPA in klinischen Studien	45
4.2. Einfluss des EPA/ DHA Gehalts der Präparate auf die kardiovaskuläre Wirksamkeit	46
4.4. Sicherheitsprofil von EPA: Blutungsrisiko und COX- 1 Hemmung	47
4.5. Kardioprotektive Wirkung von EPA durch Thrombozytenmodulation	48
4.6. Klinische Implikationen: EPA in der kardiovaskulären Prävention	48
4.7. Patientenselektion, Kombinationstherapien und optimale Dosierung	49
5. Schlussfolgerung	51
Literaturverzeichnis	52

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere auch die Koronare Herzkrankheit (KHK) und ihre Folgen gehören nach wie vor zu den primären Todesursachen der westlichen Bevölkerung¹. Es ist aktuell nicht nur eine Stagnation der Erkrankungszahlen zu verzeichnen, vielmehr zeigt sich durch eine zunehmend älter werdende Bevölkerung sowie diverse Lifestyle- Faktoren eine stete Zunahme der Erkrankungs- und Mortalitätsraten².

Eine umfassende Kenntnis der Pathogenese dieses Erkrankungskomplex ist zur erfolgreichen Therapie, zur Steigerung der Lebensqualität und der Lebensdauer der Patienten essenziell. Der akute Myokardinfarkt stellt eine schwerwiegende Komplikation der KHK dar und resultiert in den meisten Fällen aus der Ruptur oder Erosion einer atherosklerotischen Plaque mit nachfolgender Bildung eines intraluminalen Thrombus. Diese arterielle Thrombose wird primär durch die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten sowie durch die plasmatische Gerinnungskaskade vermittelt, was letztlich zu einer kritischen Perfusionsminderung des Myokards führt³. Die pathophysiologischen Mechanismen umfassen eine Dysfunktion des Endothels, eine gesteigerte inflammatorische Aktivität innerhalb der Plaques sowie eine erhöhte prothrombotische Thrombozytenreaktivität. Begünstigend wirken metabolische Risikofaktoren, wie eine Dyslipidämie (hierbei insbesondere eine Hypercholesterinämie und LP(a)- Erhöhung), eine arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Lifestylefaktoren, wie Adipositas und Nikotinabusus⁴.

Arterielle Thrombosen stellen somit eine häufige kardiovaskuläre Pathologie mit begleitend hoher Morbidität und Mortalität dar. Die Funktion der Thrombozyten, als zentrale Elemente der zellulären Blutgerinnung, spielt bei dem zugrundeliegenden Pathomechanismus eine entscheidende Rolle⁵. Die derzeitigen Therapieregime fokussieren auf eine Reduktion der Thrombozytenreaktivität, womit einem zukünftigen Gefäßverschluss im Rahmen der Sekundärprävention bei Risikopatienten vorgebeugt werden soll⁶. Ein Eingriff in das sensible System zwischen pro- und antithrombotischen Signalen entspricht jedoch einem zweiseitigen Schwert. Es besteht so nämlich das Risiko einer durch die Antithrombotika ausgelösten erhöhte Blutungsneigung der Patienten bei zu hoher Dosierung der Präparate, die einem Wiederholungsrisiko ischämischer Ereignisse bei zu geringer Dosierung auf der anderen Seite

gegenübersteht. In besonderer Weise einflussnehmend auf die Funktion der Thrombozyten sind Fettsäuren. So konnte gezeigt werden, dass die Fluidität der Membranen sich signifikant mit der Zusammensetzung der Thrombozyten verändert⁷. Inwiefern die Fluidität direkten Einfluss auf die Thrombozytenfunktion und des Outcome der Patienten hat, muss in weiteren Studien analysiert werden.

1.1 Hämostase

Die Hämostase ist ein essenzieller, mehrschrittiger physiologischer Prozess, dessen Ziel es ist, Blutungen durch die Bildung von Gerinnseln und Fibrinnetzen zu stillen. Dieses fein abgestimmte System setzt sich aus der primären und der sekundären Hämostase zusammen.

Die primäre, auch als zelluläre Hämostase bezeichnete Phase, beschreibt die sofortige Reaktion der Thrombozyten auf eine Gefäßverletzung. Sie umfasst drei zentrale Schritte: Adhäsion, Aktivierung und Aggregation. Im ersten Schritt, der Adhäsion, binden die Thrombozyten mithilfe des von- Willebrand- Faktors an die freigelegten subendothelialen Kollagenfasern der verletzten Gefäßwand⁸. Die Thrombozyten verändern dabei ihre Form, bilden Pseudopodien aus und setzen aktiv gerinnungsfördernde Stoffe wie Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan A₂ und Fibrinogen aus ihren Granula frei⁹. Diese Substanzen verstärken die Thrombozytenaktivierung und fördern die Rekrutierung weiterer Thrombozyten.

Im darauffolgenden Aggregationsschritt vernetzen sich die aktivierten Thrombozyten über Fibrinogen und bilden einen Thrombus, der primär aus Thrombozyten besteht und den entstandenen Endotheldefekt vorübergehend abdichtet¹⁰.

Die sekundäre Hämostase, auch als plasmatische Hämostase bezeichnet, wird durch das Koagulationssystem initiiert. Sie dient der Stabilisierung des primären Thrombus durch die Bildung eines fibrinreichen Netzwerks. Im Verlauf der plasmatischen Gerinnungskaskade wird in einer Serie enzymatischer Aktivierungen Thrombin generiert, welches die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert^{11, 12}. Das resultierende Fibrinnetz stabilisiert den zuvor gebildeten Thrombus. Diese finale Vernetzung sorgt für eine dauerhafte Abdichtung der Gefäßverletzung¹³.

1.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten sind entscheidenden Blutzellen für die Blutgerinnung und die Bildung arterieller Thromben. Der Normbereich dieser Zellen im Blut gesunder Menschen liegt zwischen 150 000- 400 000 pro Mikroliter¹⁴. Die 2- 4µm großen, kernlosen Zellen entstehen im Rahmen der Thrombopoese aus Vorläuferzellen im Knochenmark, den Megakaryozyten. Die Megakaryozyten stellen mit einer Größe von 35- 160 Mikrometern die größten Zellen im Knochenmark dar, wobei ein besonderes Merkmal ihre Polyploidie ist. Polyploidie bezeichnet die Vervielfältigung der DNA ohne nachfolgende Zellteilung, was für die massive Produktion von Thrombozyten erforderlich ist¹⁵. Während der Thrombozytenausreifung entwickeln sich zunächst Proplättchen aus den Megakaryozyten, die sich anschließend weiter differenzieren und bis zu 1000 reife Thrombozyten bilden. In ihrer Gesamtheit können aus einem Megakaryozyten etwa 5000 bis 8000 Thrombozyten entstehen¹⁶. Diese Zellen zirkulieren durchschnittlich fünf bis sieben Tage im Blutkreislauf, bevor sie durch Phagozytose, hauptsächlich in der Milz, abgebaut werden¹⁷.

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt durch verschiedene Reize, wie z. B. eine Gefäßverletzung, bei der sie über die Freisetzung von Granula eine Vielzahl an Faktoren und Signalmolekülen abgeben. Diese Sekretionsprodukte gehen weit über die klassische Funktion der Blutstillung hinaus. So spielen Thrombozyten eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort durch Zell- Zell- Interaktionen und sind an inflammatorischen Prozessen beteiligt¹⁸. Sie setzen proinflammatorische Zytokine und Chemokine frei, die die Migration und Aktivierung von Immunzellen unterstützen und eine Brücke zwischen Hämostase und Immunologie schlagen¹⁹. Diese multifunktionalen Eigenschaften machen Thrombozyten zu zentralen Akteuren in der Hämostase und Inflammation.

1.2.1 Alpha und dichte Granula

Thrombozyten enthalten zwei Haupttypen von Granula, alpha-Granula und *dense*, oder dichte Granula, die beide eine entscheidende Rolle in der Hämostase und Wundheilung spielen.

Alpha- Granula sind mit ca. 50- 80 pro Plättchen die häufigsten spezialisierten Organellen der Thrombozyten. Sie haben eine Größe von etwa 200- 500 nm und enthalten über 300 lösliche Proteine und Mediatoren, darunter Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, sowie verschiedene Gerinnungsfaktoren²⁰. Bei der Aktivierung der Thrombozyten führt ein Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels zur Fusion der alpha- Granula mit der Thrombozytenmembran. Dieser Prozess wird durch SNARE- Proteine (*soluble N-ethylmaleimide- sensitive factor attachment receptor*) vermittelt, welche die Exozytose der Granula ermöglichen²¹.

Die freigesetzten Mediatoren spielen eine zentrale Rolle in der Hämostase: von Willebrand Faktor und Fibrinogen fördern die Bildung eines stabilen Thrombus durch Vermittlung der Thrombozytenadhäsion an die subendotheliale Matrix und die Quervernetzung aktivierter Thrombozyten über Glykoprotein IIb/ IIIa (Integrin α IIb β 3)²². P- Selektin (CD62P), das durch die Fusion der Granulamembran mit der Thrombozytenmembran an die Zelloberfläche transportiert wird, erleichtert die Bindung von Thrombozyten an Leukozyten und trägt so zur lokalen Entzündungsreaktion und Gewebereparatur bei²³.

Dense-, delta- oder dichte Granula sind kleinere Organellen, die im Vergleich zu alpha-Granula in sehr viel geringerer Anzahl vorhanden sind und eine Größe von 150- 300 nm aufweisen²⁴. Diese Granula sind besonders reich an niedrigmolekularen, bioaktiven Molekülen, darunter ADP, Adenosintriphosphat (ATP) und Kalziumionen²⁵.

Das in den dichten Granula enthaltene ADP ist ein wichtiger Aktivator der Thrombozytenaggregation. Nach der Freisetzung bindet es an P2Y₁₂- Rezeptoren auf der Oberfläche anderer Thrombozyten, was deren Aktivierung und die Expression von Glykoprotein IIb/ IIIa fördert, einem zentralen Adhäsionsrezeptor für Fibrinogen²⁶. Diese Signalwege verstärken die Thrombozytenaggregation und stabilisieren den Thrombus.

ATP, das ebenfalls in dichten Granula gespeichert ist, wird in geringeren Mengen als ADP freigesetzt. Es kann über P2X₁-Rezeptoren auf Thrombozyten wirken und trägt durch seine depolarisierende Wirkung zusätzlich zur Aktivierung bei²⁷.

Kalziumionen (Ca^{2+}) sind essenzielle sekundäre Botenstoffe, die eine zentrale Rolle in der Thrombozytenaktivierung und der plasmatischen Gerinnung spielen²⁸. Nach der

Stimulation thrombozytärer Rezeptoren, wie P2Y₁₂, führt die Aktivierung der Phospholipase C zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat, welches die Ca²⁺ Freisetzung aus intrazellulären Speichern induziert²⁹. Zusätzlich setzen die dichten Granula gespeicherte Kalziumionen frei, was den intrazellulären Ca²⁺ Spiegel weiter erhöht³⁰. Dies fördert die Aktivierung der Proteinkinase C und Ras- *related* Protein 1, was zur Konformationsänderung von αIIbβ₃ und damit zur Thrombozytenaggregation führt³¹. Gleichzeitig wird die Degranulation von alpha- und dichten Granula verstärkt, wodurch es zur weiteren positiven Rückkopplung kommt. Zudem induziert Ca²⁺ die Phosphatidylserin- Exposition auf der Thrombozytenmembran, welche die Gerinnungskomplexe Tenase und Prothrombinase stabilisiert und die Thrombinbildung fördert³².

1.2.2. Lipidom und Proteomanalyse der Thrombozyten

Die Lipidom- und Proteomanalyse sind Schlüsseltechniken in der experimentellen Forschung, um molekulare Mechanismen auf zellulärer Ebene zu untersuchen und Veränderungen in der Zellphysiologie zu erfassen. Während die Lipidomanalyse eine detaillierte Erfassung der Lipidzusammensetzung von Zellmembranen, sowie auch aller weiterer in der Probe vorhandenen freien Fette ermöglicht, untersucht die Proteomanalyse die Gesamtheit der exprimierten Proteine, einschließlich ihrer Modifikationen. Diese kombinierte Analyse ist von besonderer Bedeutung, um den Einfluss der Lipidzusammensetzung auf membrangebundene Signalprozesse und Proteinfunktionen zu verstehen. Die Lipidzusammensetzung beeinflusst die Eigenschaften biologischer Membranen maßgeblich, insbesondere die Membranfluidität, Viskosität und Organisation von sogenannten „*Lipid Rafts*“, welche als Plattformen für die Signaltransduktion fungieren³³. Moderne Methoden wie Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC/ MS) ermöglichen eine präzise Quantifizierung der verschiedenen Lipidklassen und deren Dynamik³⁵.

1.3. Mehrfach ungesättigte Omega-3 Fettsäuren (PUFAs)

Omega- 3 Fettsäuren sind langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, deren biochemische Eigenschaften maßgeblich durch ihre Kettenlänge und die Anzahl der Doppelbindungen bestimmt werden. Zentrale PUFAs biologischer Prozesse sind

Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure. Eicosapentaensäure (EPA, C20:5) besitzt 20 Kohlenstoffatome und fünf Doppelbindungen, während Docosahexaensäure (DHA, C22:6) aus 22 Kohlenstoffatomen und sechs Doppelbindungen besteht³⁵. EPA ist ein essenzieller Bestandteil biologischer Membranen und kommt ubiquitär in biologischen Systemen vor. Besonders hohe Konzentrationen finden sich in fettreichen Seefischarten wie Makrele, Lachs und Hering³⁶. Im menschlichen Organismus dient EPA als Ausgangssubstrat für die Biosynthese verschiedener Eicosanoide, darunter Prostaglandine und Leukotriene, welche eine zentrale Rolle in der Modulation der Immunantwort, sowie der Regulation des Gefäßtonus und des Blutdrucks einnehmen³⁸. Die Position der Doppelbindungen in Cis-Konfiguration führt zu charakteristischer Formierung der Kohlenwasserstoffkette, wodurch EPA und DHA eine weniger dichte Anordnung innerhalb der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran ermöglichen³⁸. Diese strukturellen Eigenschaften erhöhen die Membranfluidität und beeinflussen die laterale Diffusion von Membranproteinen wie Rezeptoren und Signalproteinen³⁹.

Icosapent- Ethyl (IPE), der Ethylester der EPA, wurde 2021 zur Reduktion des Risikos kardiovaskulärer Ereignisse bei erwachsenen Patienten mit Hypertriglyceridämie und hohem kardiovaskulärem Risiko trotz Statintherapie zugelassen⁴⁰. Nach oraler Aufnahme wird IPE im Dünndarm durch Carboxylesterasen hydrolysiert, wobei Ethanol freigesetzt und freies EPA absorbiert wird. Anschließend erfolgt ein überwiegend an Lipoproteine gebundener Transport im Blutkreislauf⁴¹. Dieser Prozess ermöglicht eine signifikante Erhöhung des EPA-Spiegels im Plasma und eine effektive Senkung der Triglyceridwerte⁴². Die Reduktion der Triglyceridspiegel durch EPA erfolgt über mehrere komplementäre Mechanismen. Zunächst hemmt EPA die hepatische Synthese und Sekretion von *very-low-density* Lipoproteinen (VLDL), die für den Transport von Triglyceriden im Plasma verantwortlich sind. Dies geschieht durch die Hemmung der Diacylglycerol-O-Acyltransferase, einem Schlüsselenzym der Triglyceridsynthese⁴³. Darüber hinaus fördert EPA die β -Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien der Hepatozyten, wodurch freie Fettsäuren vermehrt abgebaut und für die Triglyceridbildung weniger verfügbar sind⁴⁴. Ein weiterer zentraler Mechanismus ist die Hemmung der Lipogenese durch die Herunterregulation des *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*, einem Transkriptionsfaktor, der die Synthese von Fettsäuren und Triglyceriden reguliert⁴⁵. Zusätzlich steigert EPA die Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL), die die Hydrolyse von Triglyceriden in VLDL und

Chylomikronen katalysiert und somit deren Abbau und Aufnahme in peripheres Gewebe fördert⁴⁶. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Reduktion der Expression von Apolipoprotein C- III (ApoC- III), das die Lipoproteinlipase hemmt und somit die Clearance von Triglyceriden verzögert. Durch die Senkung von ApoC- III wird der Abbau von Triglyceriden beschleunigt und deren Plasmakonzentration effektiv gesenkt⁴⁷.

Neben der lipidsenkenden Wirkung zeichnet sich IPE durch ein multifaktorielles Wirkprofil aus, das bisher nicht vollständig aufgeklärt ist. Zu den vermuteten kardioprotektiven Mechanismen zählen die Hemmung der Makrophagen- Infiltration in atherosklerotische Plaques, eine verbesserte endotheliale Funktion sowie die Stabilisierung der fibrösen Plaquekappe⁴⁸. Zudem wird EPA eine antioxidative und entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben, die möglicherweise zur Reduktion kardiovaskulärer Komplikationen beiträgt⁴⁹. Der genaue Wirkmechanismus EPAs in Bezug auf die Thrombozytenfunktion in diesem Gefüge ist bisher jedoch unklar.

1.3.1. Rolle der PUFAs in der arteriellen Thrombose

Epidemiologische Studien haben wiederholt eine inverse Assoziation zwischen der Aufnahme von ω - 3 PUFA und dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen aufgezeigt⁵⁰. Erhöhte Plasmaspiegel von ω - 3 PUFA, insbesondere von EPA und DHA, wurden mit einer verminderten Inzidenz von Herz- Kreislauf- Ereignissen wie Myokardinfarkt und arteriellen Thrombosen assoziiert⁵¹. Dieser Zusammenhang wurde in zahlreichen randomisierten klinischen Studien (RCT) untersucht, um den potenziellen Nutzen einer ω - 3 PUFA Supplementierung für die kardiovaskuläre Prävention zu bewerten. Jedoch haben diese RCTs widersprüchliche Ergebnisse geliefert: Während die REDUCE- IT Studie eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse durch die Verabreichung von IPE dokumentierte⁵², konnten andere Studien wie ASCEND⁵³, VITAL⁵⁴, OMEMI⁵⁵ und STRENGTH⁵⁶, die verschiedene Kombinationen und Dosierungen von EPA und DHA untersuchten, keine signifikanten kardiovaskulären Vorteile nachweisen. Die JELIS- Studie, die eine niedrigere Dosis von reinem EPA in einer japanischen Population evaluierte, berichtete ebenfalls über eine Risikoreduktion⁵⁶, während auch die RESPECT- EPA Studie IPE mit einer niedrigeren Rate ischämischer Ereignisse in Verbindung brachte⁵⁷. Die

Diskrepanzen zwischen den Studien könnten auf Unterschiede in der Dosierung, der Zusammensetzung der Präparate (reines EPA vs. EPA und DHA-Kombinationen) und den erreichten Plasmakonzentrationen von EPA zurückzuführen sein⁵⁸. Die Ergebnisse der REDUCE- IT und JELIS Studien legen nahe, dass die kardiovaskulären Vorteile von hochdosiertem EPA nicht ausschließlich durch die Senkung der Triglyceridspiegel erklärbar sind. Während in JELIS auch Patienten mit normwertigen oder nur leicht erhöhten Triglyceridwerten eingeschlossen waren, umfasste REDUCE- IT ausschließlich Patienten mit erhöhten Triglyceridwerten (≥ 135 mg/ dl), sodass keine direkten Aussagen zum Nutzen bei normwertigen Triglyceridwerten möglich sind. Subgruppenanalysen aus REDUCE- IT zeigen jedoch, dass der protektive Effekt von IPE über alle Triglycerid- Tertile hinweg konsistent war, einschließlich Patienten mit nur moderat erhöhten Werten (81–150 mg/ dl)^{59,60}. Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche Mechanismen, wie entzündungshemmende, antithrombotische und membranstabilisierende Effekte, eine Rolle spielen könnten. Zudem wurde in beiden Studien eine leicht erhöhte Inzidenz geringgradiger Blutungsereignisse bei den mit EPA behandelten Patienten beobachtet^{52,60}. Eine plausible Hypothese zur Erklärung dieser Effekte ist die strukturelle Ähnlichkeit von EPA mit Arachidonsäure (AA), einer ω - 6 PUFA, die als Substrat für die thrombozytäre COX- 1 dient. AA wird zu TXA2 metabolisiert, einem potenten Mediator der Thrombozytenaggregation und Vasokonstriktion, der eine zentrale Rolle in der Pathogenese arterieller Thrombosen spielt^{61,62}. EPA könnte kompetitiv an COX- 1 binden und so die TXA2- Synthese hemmen, was zu einer dosisabhängigen antithrombotischen Wirkung führt. Dieser Mechanismus könnte zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse in RCTs beitragen, insbesondere in Bezug auf die variablen antithrombotischen Effekte von EPA in den jeweiligen Studienmodellen und Patientenkollektiven.

1.4 Ziele der Arbeit und Hypothese

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war es zu analysieren, ob IPE antithrombozytäre Effekte durch COX-1 Inhibition vermittelt, die zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos in der REDUCE-IT-Studie beitragen könnte. Analysiert wurden die Auswirkungen von IPE auf die Thrombozytenfunktion bei Patienten und auf arterielle

Thrombosen im murinen Modell. Zusätzlich wurde der antithrombozytären Effekte von EPA im humanen *in vitro* Modell untersucht.

Zudem sollte untersucht werden, inwieweit sich die Komposition des Lipidoms und Proteoms der humanen Thrombozyten im Verlauf einer zehntägigen Einnahme von IPE verändert (Analyse der thrombozytären Komposition, respektive der Freisetzung an den Zeitpunkten 0 und 10 Tage nach täglicher Einnahme).

2. Methoden

2.1. Studiendesign

Die Daten der vorliegenden Dissertation basieren auf zwei aufbauenden Teilen: Der erste Teil entspricht einer experimentellen Untersuchung des Einflusses der EPA auf die humane Thrombozytenfunktion *ex vivo*, sowie einer murinen *in vivo* Analyse. Im klinisch- translationalen Teil erfolgte eine Analyse der *in vivo* Modulation thrombozytärer Reaktivität, sowie der Kompositionsveränderung des Lipidoms und Proteoms humaner Thrombozyten. Dafür wurden insgesamt 25 Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, welche eine Supplementation mittels IPE (2x 2g täglich, Vazkepa®, Amarin) erhielten, welche hier in den ersten zehn Tagen analysiert wurde.

2.2. Experimenteller Teil

Für den experimentellen Teil der Arbeit wurde der Einfluss von EPA auf die Funktion humaner Plättchen untersucht. Hierzu wurde dem Blut freiwilliger, gesunder Spender EPA in aufsteigender Dosierung zugeführt, inkubiert und die Thrombozytenreaktivität mittels verschiedener labortechnischer Instrumente untersucht, auf die im Folgenden vertiefend eingegangen wird. Zur Analyse herangezogen wurden die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA), die Multiplate- Impedanz- Aggregometrie (MEA), Flusskammerversuche, Adenosintriphosphat- *Release Assays* (ATP- *release Assays*), Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*), sowie *Enzyme linked immunosorbent Assays* (ELISA) zur Bestimmung der Thromboxan B2 Konzentration. In Kooperation mit dem Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, Ahrends Lab, erfolgte die Bestimmung der Komposition des thrombozytären Lipidoms; in Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften

(ISAS e.V. Dortmund) führten wir eine Analyse des (Phospho-) Proteoms der Thrombozyten durch.

2.3. Klinisch- translationaler Teil

In die Studie wurden 25 Patienten eingeschlossen, welche eine IPE- Einnahme nach dem Schema der REDUCE- IT Studie (4g täglich)⁵² erhielten. Die Einnahmedauer betrug 10 Tage, wobei eine Blutabnahme am Tag vor Ersteinnahme IPEs (t0), nach fünftägiger Einnahme von 4g IPE täglich (t5) und nach zehntägiger Einnahme IPEs durchgeführt wurde.

Zudem erfolgte der Einschluss von 370 Patienten mit KHK und Acetylsalicylsäure (ASA) Medikation, sowie die Analyse der Thrombozytenfunktion mittels LTA. Die Ergebnisse wurden mit den Plasma- Triglyceridspiegeln des Patientenkollektivs korreliert.

2.4. Probandenkollektiv

Für den experimentellen, wie auch für den klinisch- translationalen Teil der Arbeit wurden an den Versuchsaufbau angepasste Kriterien definiert, die im Folgenden erläutert werden.

Einschlusskriterien des Patientenkollektivs:

- Schriftliches Einverständnis nach ärztlicher Aufklärung
- Einwilligungsfähigkeit
- Alter \geq 18 Jahre

Ausschlusskriterien des Patientenkollektivs:

- Nicht einwilligungsfähige Probanden
- Begleiterkrankungen, die mit der geplanten Thrombozyten Reaktivitätsmessung interferieren könnten, insbesondere
 - o Bekannte Erkrankungen der Hämostase
 - o Hämatoonkologische Erkrankungen
 - o Eingeschränkte Nierenfunktion
 - o Maligne Neoplasien

Für das entsprechende zweite Patientenkollektiv mit ASA Medikation wurden folgende Kriterien definiert:

Einschlusskriterien des Patientenkollektivs:

- Schriftliches Einverständnis nach ärztlicher Aufklärung
- Koronare Herzkrankheit (1-, 2-, 3- Gefäß- KHK)
- ASA Medikation (100mg, 1-0-0)
- Einwilligungsfähigkeit
- Alter \geq 18 Jahre

Ausschlusskriterien des Patientenkollektivs:

- Nicht einwilligungsfähige Probanden
- Begleiterkrankungen, die mit der geplanten Thrombozyten Reaktivitätsmessung interferieren könnten, insbesondere
 - o Bekannte Erkrankungen der Hämostase
 - o Hämatonkologische Erkrankungen
 - o Eingeschränkte Nierenfunktion
 - o Maligne Neoplasien

Das Studiendesign entspricht der Deklaration von Helsinki und wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Nr. 5823R).

Vor jeder Blutentnahme wurde jede Probandin und jeder Proband über den geplanten Eingriff aufgeklärt. Angaben zu Probanden-, respektive Patientencharakteristika wurden anamnestisch erfragt oder den Arztbriefen stationärer Aufenthalte entnommen. Für die Analyse relevante klinische Parameter (Entzündungsparameter, Zellzahl insb. Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Nierenretentionsparameter und GFR, Leberparameter, Herzenzyme und Lipidstatus) wurden den routinemäßig im Rahmen des stationären Aufenthalt bestimmten Laboranalysen entnommen. Die Ermittlung der Werte erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf (Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik).

2.5. Probengewinnung

Die Blutabnahme erfolgte durch aseptische Punktion der V. mediana cubiti oder des Rete venosum dorsalis manus mittels einer 21G *Butterfly*- Punktionsnadel (BD *Vacutainer*® *Safety-Lok*TM, New Jersey, USA). Das Vollblut wurde in standardisierten, 2,7ml fassenden Probenröhrchen (BD *Vacutainer*®, Becton Dickson, USA) gesammelt, welche als Antikoagulant Natriumcitrat in einem Verhältnis von 1:10 zum Vollblut enthalten. Die Proben wurden innerhalb von 20 Minuten labortechnisch weiterverarbeitet und, falls im Rahmen des Protokolls erforderlich, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zu jeweiligen weiteren Messung bei -80°C gelagert.

Ist methodenabhängig zur Bestimmung der Thrombozytenreaktivität eine isolierte Analyse des plättchenreichen Plasmas (PRP) notwendig, erfolgt die Isolierung aus dem Vollblut nach folgendem Schema: das Citrat- antikoagulierte Vollblut wird in den initialen Probenröhrchen bei Raumtemperatur (RT) für zehn Minuten bei 270x g zentrifugiert. Daraufhin kann die obere Phase, die dem PRP entspricht, vorsichtig mittels einer 1000µl Pipette von der Leukozyten- reichen Schicht, dem sogenannten *Buffy-coat* und den an den Boden sedimentierten Erythrozyten, getrennt und in ein weiteres Probengefäß überführt werden. Zur Gewinnung von plättchenarmen Plasma (PAP), welches beispielsweise zur Eichung des Lichttransmissionsaggregometers notwendig ist, wird PRP bei Raumtemperatur und 13200x g für 5 Minuten zentrifugiert.

2.6 Versuchstiere

Vor Durchführung von Tierversuchen erfolgte eine Zertifizierung mittels FELASA F048/16, sowie eine Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV, NRW, 81- 02.04.2020.A319). Die Tierversuche erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Marcel Benkhoff und Maike Barcik. Es wurden männliche, zu Versuchsbeginn 11 bis 13 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse aus dem *Janvier Laboratory* (Le Genest- Saint- Isle, Frankreich) bezogen. Tiere der ASA-Versuchsgruppe erhielten 30 Minuten vor der Induktion der arteriellen Thrombose via oraler Gavage ASA in einer gewichtsadaptierten Dosierung von 12,5 mg/ kg Körpergewicht. Die Verabreichung von IPE (*TCI Chemicals*) erfolgte alle zwei Tage ebenfalls oral in einer Dosierung von 2g/ kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 14 Tagen.

2.7 In vivo Modell der arteriellen Thrombusbildung

Die arterielle Thrombose wurde durch eine Gefäßverletzung induziert, die mittels mit Eisen(III)-chlorid getränktem Lösungsträger verursacht wurde. Zuvor wurden die Tiere mittels einer Anästhesie aus Ketamin (Ketanest® 100mg/kg, i.p.) und Xylazin (Rompun® 10mg/kg, i.p.) betäubt und eine ausreichende Narkosetiefe durch Testung des Zwischenzehenreflex sichergestellt. Der Träger wurde für 3 Minuten auf die Außenseite der zuvor freipräparierten Arteria carotis communis gelegt. Zur Visualisierung der Thrombozyten wurde ein mit DYLight 488 markierter GP-1b Antikörper (0,1µg/g, Klon: X488, Emfret) injiziert. Die Versuchsdauer betrug 60 Minuten. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse kam ein Leica DM6 FS-Mikroskop zum Einsatz. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Leica LAS X-Software.

2.8 Histologische Analyse

Nach der Thrombusinduktion (t= 60min) wurden die Thromben isoliert, in *Tissue-Tek* (Sakura) eingebettet und bei -80 °C gelagert. Zur Erstellung der Gewebeschnitte wurde ein Kryotom (CM3050, Leica) verwendet, wobei Schnittdicken von 10 µm angefertigt wurden. Die Fixierung der Proben erfolgte mit 4% Formaldehyd, gefolgt von einer Blockierung mit 10% Schafserum. Anschließend wurden die Schnitte mit Antikörpern, die sich gegen CD41 (MWRReg30, eBioscience) zur Identifikation der Thrombozyten, respektive Fibrinogen (A0080, Dako) richteten inkubiert. Nachfolgend wurden fluorochrommarkierte Sekundärantikörper (Alexa488, Alexa555 und Alexa594 Konjugat, Thermo Fisher) zur Detektierung beigefügt und inkubiert. Die Bildaufnahmen wurden mittels eines Leica DM6B Fluoreszenzmikroskops durchgeführt; die Analyse der Bilder erfolgte hier mittels ImageJ Software.

2.9 Tailbleeding Assay

Zur Durchführung des Tail- Bleeding- Assays wurden die Mäuse ebenfalls mit einer intraperitonealen Injektion eines Anästhetikums aus Ketamin (100 mg/ kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/ kg Körpergewicht) sediert. Vor Beginn des Experiments wurde das Körpergewicht jeder Maus mit Hilfe einer Präzisionswaage erfasst, um mögliche Unterschiede im Volumenverlust relativ zum Körpergewicht

korrekt zu bewerten. Die Tiere wurden anschließend in Bauchlage auf einer auf 37 °C vorgewärmten Heizplatte positioniert, um eine Normothermie während des gesamten Versuchs sicherzustellen.

Zur Induktion der Blutung wurde ein 5 mm langes Segment der Schwanzspitze nach Sicherstellung einer ausreichenden Anästhesie amputiert. Der abgetrennte Bereich wurde unmittelbar danach in ein Röhrchen mit vorgewärmter (37°C), isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) getaucht, um den Blutverlust zu detektieren und eine homogene Flüssigkeitsumgebung sicherzustellen. Der Blutungszeitraum betrug maximal 30 Minuten, unabhängig davon, ob die Blutung zuvor spontan gestoppt war, um auch potenzielle Nachblutungen zu detektieren.

Zur quantitativen Analyse des Blutverlusts wurden die gesammelten Proben bei 1500x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die Blutzellen vom umgebenden Plasma zu trennen. Der Überstand wurde verworfen, während die Erythrozyten in 2 ml Lysepuffer (pH 7,4) resuspendiert und lysiert wurden, um das enthaltene Hämoglobin freizusetzen. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurden die Proben erneut bei 2000x g für fünf Minuten zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen.

Die Hämoglobinkonzentration wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen, da das Hämoglobin in diesem Bereich eine maximale Absorption aufweist. Zur Bestimmung des Gesamtblutverlusts wurde eine Standardkurve verwendet, die durch die Lyse definierter Blutvolumina von Mäusen erstellt wurde. Dadurch konnte der Blutverlust jedes Tieres präzise in Mikrolitern berechnet werden^{63,64}.

2.10. Photoaffinitätsmarkierung

Die Markierungsexperimente wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Verhelst durchgeführt. Die Dünnschichtchromatographie (TLC) wurde auf vorbeschichteten Kieselgelplatten (60F254) von Merck angewandt und mithilfe von UV- Licht bei 254 nm und 365 nm visualisiert. Die Kernresonanzspektroskopie (NMR) erfolgte auf einem Bruker Avance III HD 600 System (600 MHz für ¹H, 150 MHz für ¹³C NMR), und die Spektren wurden anhand chemischer Verschiebungen (δ in ppm), Multiplizitäten und Kopplungskonstanten (J in Hz) dokumentiert. Für LC- MS Analysen wurde ein Thermo Scientific MSQ Plus ESI-Spektrometer mit einer XBridge C18-Säule (5 μ m) genutzt,

während hochauflösende MS-Messungen (HRMS) auf einem Thermo LTQ Orbitrap Velos Pro durchgeführt wurden.

Das Zielmolekül wurde durch Umkehrphasen- HPLC (0,1 % TFA in H₂O/Acetonitril) gereinigt. EPA (11 µL, entsprechend 0,03 mmol) wurde zusammen mit Reagenzien wie HOBt und EDC- HCl in Dichlormethan (DCM) unter Argon gelöst und 10 Minuten gerührt, bevor 2-(3-(But-3-yn-1-yl)-3H-diazirin-3-yl)ethan-1-amin hinzugefügt und weitere 4 Stunden gerührt wurde. Nach Aufreinigung und Trocknung wurde das Produkt als blassgelbes Öl extrahiert (2,8 mg, 20 %).

Rekombinantes humanes COX- 1 Protein (Abcam) wurde in 20 µL Reaktionspuffer (50 mM HEPES, pH 7,4) angesetzt. Das *Photo- Crosslinking* erfolgte unter UV- Licht (365 nm) bei Raumtemperatur. Die Sonde (S1) wurde im Puffer auf 5 µM verdünnt und mit 50 ng COX- 1 für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe unmodifizierten EPAs (10-facher Konzentrationsüberschuss zur Kontrollprobe) und erneuter UV- Bestrahlung für 30 Minuten wurde eine Lösung aus TAMRA- Azid, THPTA, CuSO₄ und Natriumascorbat hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und mittels SDS- PAGE getrennt. Das fluoreszenzmarkierte Protein wurde mithilfe eines Amersham Typhoon 5- Fluoreszenzscanners (ex 550/ em 570) detektiert und mit der *Software* ImageJ ausgewertet⁶⁵.

2.11. *In Silico* Docking Analyse

Die virtuelle *Docking*- Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Dücker (Institut für klinische Pharmakologie, Universitätsklinik Göttingen) basierend auf einer etablierten Methodik durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mithilfe von AutoDock Vina unter Verwendung struktureller Datensätze aus PubChem und der Protein Data Bank. Diese Daten wurden für das Molekül- Docking und die weiterführende Visualisierung herangezogen, wofür die Software PyMOL genutzt wurde⁶⁶⁻⁶⁹.

2.12. Lichttransmissionsaggregometrie (LTA)

Die LTA nach Born ist eine standardisierte und zuverlässige Methode zur Bestimmung der Thrombozytenreaktivität⁷⁰. Das Messprinzip basiert auf einer Detektion des vom Aggregometer emittierten Lichts, welches durch die probengefüllten Küvetten strahlt.

Durch die vom Ausmaß der Aktivierung abhängige Aggregation der Thrombozyten verändert sich die Dichte des Probenmediums und konsekutiv die Transmission des Lichts. Die Ergebnisse wurden als Maximum der Aggregation (MoA) in Prozent gegenüber des zuvor geeichten Grundwertes angegeben.

Das wie zuvor beschrieben gewonnene PRP wurde ebenso wie das PAP vorbereitet. Das PAP wurde zur Kalibrierung des Lichttransmissionsaggregometers (APACT 4004 LABiTec®, Ahrensburg, Deutschland) genutzt, dabei erfolgte vor jedem Patientenwechsel eine neue Kalibrierung mit dem jeweilig patientenspezifischen PAP. So konnte sichergestellt werden, dass interindividuelle Unterschiede zu keiner Interferenz mit der eigentlichen Messung führen. Die Basis eines jeden Messdurchlaufs bildet eine mit 200µl PRP und 50µl Thrombozytenmedium (134 mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 2,9mM KCl, 0,36mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 1mM MgCl₂ x 6H₂O, 5mM HEPES) gefüllte Küvette. Die Proben werden zur Generierung einer Referenzlinie nach vierminütiger Ruhephase zunächst für zwei Minuten unter kontinuierlicher Rührung mittels integriertem Magnetrührer inkubiert. Die Induktion der thrombozytären Aggregation erfolgt bei Minute sechs mittels Zugabe von AA (0,5 mM, Oxford Biomedical Research), ADP (5 µM, Sigma) oder Kollagen (2 µg/ml, Nycomed). Die Thrombozytenaggregation wird nachfolgend bis Minute zehn erfasst. Eine charakteristische Aggregationskurve umfasst die Bestimmung der *Baseline*-Werte, die nach Zugabe der Stimulantien erfolgende Veränderung der Thrombozytenmorphologie (*shape change*) und kurzzeitiger Negativierung der abgeleiteten Kurve, sowie die konsekutiver Aggregation und die durch das Aggregometer detektierte, vermehrte Lichttransmission.

Neben Kontrollmessungen, bei welchen alleinig eine Stimulation des jeweiligen PRP erfolgte, wurden die *ex vivo* Analysen unter Präinkubation mit ansteigenden EPA-Konzentrationen (250µM, 500µM und 1000µM, Sigma Aldrich) und nachfolgender Stimulation durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für sechs Minuten bei 37°C. In weiteren Versuchsschritten wurde eine kompetitive Wirkungen auf die COX-1 zwischen EPA und Acetylsalicylsäure (30µM, ASA, Sigma Aldrich) fokussiert, hierbei wurde zunächst eine Inkubation mit ASA und nachfolgend mit EPA (1000µM) durchgeführt.

ASA wurde in NaCl, EPA in Ethanol gelöst und nach Zielkonzentration verdünnt. Um Verfälschungen der Ergebnisse durch den Zusatz von Ethanol oder Wasser zu

vermeiden, wurden die entsprechenden Kontrollproben ebenfalls mit identischen Volumina Ethanol, respektive Wasser behandelt.



Abb. 1: Repräsentative Aggregationskurve (APACT 4004).

Nach 120 s erfolgte eine Zugabe des Stimulanz, in diesem Fall AA, nach Präinkubation mit aufsteigenden Konzentrationen EPAs (schwarz = Zugabe von Ethanol in entsprechender Konzentration, rot= EPA 250 μ M, blau= EPA 500 μ M, grün= EPA 1000 μ M).

2.13. Multiplate® Impedanz Aggregometrie

Die Multiplate® Impedanzaggregometrie (MEA) ist ein Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion in Vollblut, ohne dass eine weitere Aufreinigung oder Aufarbeitung der Blutprobe notwendig ist. Im Vergleich zur LTA stellt diese Methode die Untersuchung der Thrombozytenfunktion im Vollblut, d.h. unter Vorhandensein der übrigen Blutbestandteile dar. Diese direkte Untersuchung der Thrombozyten bietet eine realistischere Einschätzung der Thrombozytenaktivität und -funktion. Darüber hinaus lässt sich ein Einfluss von Erythrozyten eruieren ⁷¹.

Für die impedanzaggregometrischen Untersuchungen mittels *Multiplate Analyzer*® (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurden 300 μ l citratantikoaguliertes Vollblut mit 300 μ l isotonischer Kochsalzlösung (0,9% Natriumchlorid) gemischt. Die Thrombozytenaktivierung wurde durch Zugabe von 20 μ l der jeweiligen Testlösungen induziert: AA (1 mM, ASPItest®), ADP (6,4 μ M, ADPtest®) oder Kollagen (3,2 μ g/ml, COLtest®). Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von sechs Minuten, und die Ergebnisse wurden als Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) angegeben, was eine quantitative Darstellung der Thrombozytenaktivität ermöglicht.

2.14. Adenosintriphosphat (ATP) Release Assay

ATP spielt eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaktivierung und der arteriellen Thrombose. ATP wirkt über P2X1-Rezeptoren auf Thrombozyten und führt zu erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen und Formveränderungen⁷². Zusätzlich ist ATP in den dichten Granula der Thrombozyten gespeichert und die Messung dessen ist ein Marker für die Freisetzung dieser thrombozytären Granula⁷³. Für die quantitative Analyse der ATP- Freisetzung, somit der Freisetzung dichter Granula nach Thrombozytenaktivierung wurde eine Biolumineszenzanalyse, wie zuvor beschrieben, durchgeführt⁷⁴. Der Versuch basiert hierbei auf einem Luciferase Assay: ATP wird zusammen mit Luciferin durch die Luciferase in Adenyl Luciferin umgesetzt, welches nachfolgend unter aeroben Bedingungen zu Oxyluciferin, Adenosinmonophosphat und Kohlenstoffdioxid zerfällt. Das dabei emittierte Licht ist proportional zur Konzentration des initial in der Probe vorhandenen ATP.

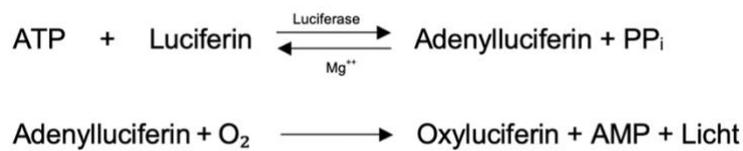


Abb. 2: Reaktionsgleichung des Luciferase Assay.

Zusammenfassend wurden humane Thrombozyten aus Vollblutproben mittels CGS- (1,7 mM Zitronensäure, 18,3 mM Trinatriumcitrat, 10 mM Glukose, 120 mM Natriumchlorid) und Tyrodes Puffer (137 mM Natriumchlorid (NaCl), 2,9 mM Kaliumchlorid (KCl), 0,34 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), 12 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), 5 mM HEPES, 5 mM Glukose, 1 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂), 1 mM Calciumchlorid (CaCl₂)) gewaschen, indem die Probe abzentrifugiert (1000x g, 10min., Raumtemperatur) und auf das vorherige Ausgangsvolumen resuspendiert wurde. Dieser Vorgang wurde wiederholt und das Pellet anschließend auf das Ausgangsvolumen mittels Tyrodes- Puffer aufgefüllt und resuspendiert. Final lag so eine aufgereinigte Thrombozytenlösung vor.

Zudem wurde ein *ATP- Assay-Kit* (FLAA, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) verwendet, um die Konzentrationen von durch Thrombozyten freigesetztem ATP nach der Induktion der Thrombozytenaktivierung zu bestimmen. Es wurden dabei je 100µl der aufgereinigten Thrombozyten in eine transparente 96 Well Platte (Greiner) gegeben und analog zu den vorherig beschriebenen Versuchen aufsteigende Mengen

EPA (f.c. 250µM, 500µM, 1000µM) respektive des Stimulanz (AA, ADP, Kollagen) zugegeben, resuspendiert und für sechs Minuten bei 37°C inkubiert. Im letzten Schritt wurde der entsprechend der Sensitivität zehnfach verdünnte *ATP Assay Mix* (FLAAM) hinzugegeben. Die Messung erfolgte ohne Verzögerungen direkt im Anschluss an die Zugabe im *FLUOstar Omega Microplate Reader* (BMG Labtech). Es wurden folgende Einstellungen gewählt: Lumineszenz, *Emission lense*, Messung von 150 Intervallen à 1s, *Gain* 3600, *Target value* 40%. Eine ATP- Standardkurve wurde nach Herstelleranweisungen (FLAAS) täglich vor der Messung zur Kalibrierung und nachfolgenden Berechnung vorbereitet und gemessen. Das in Ethanol gelöste EPA wurde entsprechend verdünnt und allen Vergleichsuntersuchungen identische Konzentrationen des Lösungsmittel zugegeben.

2.15. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde angewandt, um die Oberflächenmarker- Expression der Thrombozyten auf Einzelzellebene zu bewerten⁷⁵. Unter Zuhilfenahme unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, welche an spezifische Antikörper gekoppelt sind, können Oberflächenmarker gebunden und analysiert werden. Citrat-antikoaguliertes Vollblut wurde zehn Minuten bei 270x g zentrifugiert, um PRP zu generieren. 100µl PRP wurden sechs Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend sechs Minuten bei 37°C mit AA stimuliert. Danach wurden die folgenden Antikörper zur Lösung hinzugefügt und 30 Minuten unter Abschirmung von Licht bei 37°C inkubiert: PAR-1- FITC (Alomone Labs), PAR-4- FITC (Alomone Labs), PAC-1-FITC (antibodies.com), P2Y12- BV421 (BioLegend), gpVI- Alexa-Fluor647 (BD), CD154- BV421 (BD), CD41/61- APC-Cy7/ PE (Miltenyi), CD42b- PE-Cy7 (Thermo Fisher) und CD62P- BV421 (BD). Hieraus zusammengestellt wurden folgende 3 FACS- Panel:

Panel 1:

PAR- 1	FITC
P2Y12	BV421
gpVI	Alexa Fluor 647
CD41/61	APC Cy7

Panel 2:

PAR-4	FITC
CD154	BV421
CD42b	PECy7
CD41/61	PE

Panel 3:

PAC-1	FITC
CD62P	BV421
CD41/61	APC Cy7

Die Antikörper- PRP- Lösung wurde vor der Messung mit dem *FACSVerse™*- Durchflusszytometer (BD) 1:100 in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt und entsprechend der Kanäle in einzelnen Ansätzen gemessen. Die Daten wurden mit der *FlowJo-Software* (BD) verarbeitet und analysiert.

2.16. Calcium- signaling mittels Durchflusszytometrie

Die intrazellulären Calcium- Ionen- Konzentrationen wurden ebenfalls mittels Durchflusszytometrie gemessen. Das, wie zuvor beschrieben gewonnene Blut wurde bei 270x g für zehn Minuten bei Raumtemperatur ohne zusätzlichen Bremsvorgang zentrifugiert, um PRP zu gewinnen. PRP (300 µl) wurde mit Fura Red-AM (6,12 µM, Thermo Fisher) und Fluo-4-AM (3,2 µM, Thermo Fisher) für 15 Minuten unter Abschirmung vor Lichteinstrahlung bei 37 °C unter konstantem Rühren gefärbt.

Die fluoreszenzmarkierten Thrombozyten (10 µl) wurden entweder mit 490 µl eines calciumbasierten Puffers, welcher 10 mM CaEGTA enthielt, oder mit 490 µl eines calciumfreien Puffers beigemischt. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei maximalen und minimalen Calciumspiegeln wurden Ionomycin (3 µg/ml, Sigma), Nigericin (2 µg/ml, Sigma) und CCCP (10 µM, Sigma) zugesetzt.

Für weitere Versuche wurden 10 µl der gefärbten Thrombozyten in 490 µl HEPES- Tyrode- Thrombozytenpuffer zugegeben, der entweder ASA (30 µM), EPA in unterschiedlichen Konzentrationen (250 µM, 500 µM, 1000 µM) oder eine Kombination

aus ASA (30 μM) und EPA (1000 μM) enthielt. Sämtliche Proben wurden für 30 Minuten unter Abschirmung vor Sonnenlicht bei 37 °C unter kontinuierlichem Rühren inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben vorsichtig in entsprechende Röhrchen für die Durchflusszytometrie überführt. Die Fluoreszenzintensitäten bei maximalen und minimalen Calciumspiegeln wurden mit eines *FACS- VerseTM*- Durchflusszytometers (BD) gemessen. Die Baseline- Calciumspiegel wurden über 80 Sekunden aufgezeichnet, woraufhin AA in einer Finalkonzentration von 0,5 mM zugegeben wurde. Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentrationen wurden über einen Zeitraum von 2 Minuten gemessen.

Das Fluo-4/ Fura-Red-Intensitätsverhältnis wurde mithilfe der FlowJo-Software (BD) berechnet. Es wurde eine zeitkinetische Analyse durchgeführt, bei der die zeitabhängigen Daten des Fluoreszenzintensitätsverhältnisses in Calcium- Ionen- Konzentrationen umgerechnet wurden, wie zuvor von Assinger et al. beschrieben⁷⁶.

2.17. Flusskammerversuche

Die Thrombozytenadhäsion wurde mittels Durchflusskammer- Experimenten (BioFluxTM 200) analysiert. Die Kanäle der Durchflusskammer wurden mit Kollagen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder homogenisiertem menschlichem atherosklerotischem Plaquematerial beschichtet und für 1 Stunde inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS (10 Minuten, 5dyn/ cm^2) erfolgte die Spülung der Kanäle mit 0,5% Rinderserumalbumin (in PBS, Sigma-Aldrich), sodass unspezifische Bindungen blockiert werden.

Citratantikoaguliertes Vollblut wurde mit Calcein AM (4 μM , Thermo Fisher Scientific) für 30 Minuten im Dunkeln gefärbt, bevor es in die Kammer eingebracht wurde. Das Vollblut wurde mit einem Schubdruck von 10 dyn/ cm^2 für 10 Minuten mit laminarem Fluss durch die Kanäle perfundiert. Bilder wurden mit dem Mikroskop *Nikon Eclipse TE2000-U* aufgenommen und die Ergebnisse mit der Bioflux- MontageTM Software analysiert. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil der von Thrombozyten bedeckten Fläche der Kapillare angegeben. Falls erforderlich, wurden Proben vor der Messung der Thrombozytenadhäsion sechs Minuten lang bei 37°C mit dem Versuchsaufbau entsprechenden Konzentrationen EPAs (250 μM , 500 μM und 1000 μM) inkubiert.

2.18. Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Bestimmung von TXB2 erfolgt als Surrogatmarker für TXA2. TXB2 ist das inaktive Stoffwechselprodukt von TXA2 und im Gegensatz zu TXA2, welches nur für wenige Sekunden stabil⁷⁷ und daher nicht für die hier durchgeführten Messungen geeignet ist, nicht an der Thrombozytenaktivierung beteiligt.

Für die Messungen wurden citratantikoagulierte Blutproben vorbereitet und mit verschiedenen Einzelsubstanzen und Kombinationen, analog zu den LTA- Messung (siehe oben), inkubiert. Nach der Inkubation wurde das PRP für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (13200x g). Der Überstand wurde von dem unten abgesetzten Pellet isoliert und die Proben sofort durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (LN2) konserviert. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung von TXB2 wurde ein kommerzielles ELISA Kit (Cayman Chemicals, Nr. 501020) verwendet. Die Probenbearbeitung und Analyse erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Es erfolgte eine Verdünnung der generierten Proben mit dem mitgelieferten ELISA- Puffer im empfohlenen Verhältnis (1:10). Die ELISA- Reaktionsplatte, beschichtet mit TXB2- Antikörpern, wurde mit den Proben inkubiert. TXB2 band dabei an seinen spezifischen Antikörper und verblieb auf der Platte. Die Konzentration des gebundenen TXB2 wurde mittels einer Fluoreszenzreaktion in einem automatisierten Detektor (Fluostar Omega, BMG Labtech) gemessen.

2.19. Lipidom- Analyse (Shotgun-Lipidomics)

Diese Analyse wurde in Kooperation und unter Anleitung des AhrendsLab Wien unter Leitung von Prof. Dr. Robert Ahrends und in Zusammenarbeit mit Cristina Coman durchgeführt.

Zunächst wurden 16ml Vollblut direkt in einer mit 4ml ACD- Puffer (116 mM Natriumcitrat, 70mM Zitronensäure, 110mM Glucose, pH 4,6) vorgefüllten Spritze (20ml, Braun, Deutschland) abgenommen. Das Probengemisch wurde in zwei 15ml Greiner aufgeteilt (2x 10ml) und bei 200x g 20min bei RT zentrifugiert (Bremse 0). Das so generierte PRP wurde in 50ml Greiner (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) umgefüllt und die Thrombozytenkonzentration bestimmt. Die Greiner wurden anschließend mit 35ml Tyrode- Puffer (137mM NaCl, 2,6mM KCl, 12mM NaHCO₃, pH 6,5) aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung bei 900x g für 10min unter RT

zentrifugiert, der Überstand verworfen und dass so generierte Pellet mit der jeweils notwendigen Menge Tyrode- Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Die dazu notwendige Puffermenge errechnete sich zur Erreichung einer Konzentration von 1×10^8 Thrombozyten pro Probe à 100µl Probenvolumen. Vor Stimulation wurden die Thrombozyten 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Es erfolgte die Aufteilung in eine Kontrollprobe ohne Stimulation, eine AA stimulierte Probe und eine mit EPA inkubierte Probe. Die Stimulationsdauer betrug jeweils sechs Minuten. Anschließend wurden die Proben bei 640x g für fünf Minuten bei RT zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung des Pellet erfolgte bei -80°C. Zusammengefasst wurden folgend zunächst 225 µl gekühltes Methanol (MeOH) auf das Pellet gegeben und die Proben mittels Ultraschallbehandlung homogenisiert. Nachfolgend wurden 750 µl Methyltertbutylether (MTBE) zusammen mit einem angepassten Standardpuffer (Mouse Splash, Cholesterol-d7, Cer/Sph Mix II, Avanti Polar Lipids) hinzugefügt. Die Proben wurden eine Stunde bei 950x g und 4°C inkubiert. Zur Phasentrennung wurden 188 µl Aqua dest. zugegeben. Nach zehninütiger Zentrifugation bei 10000x g wurde die obere organische Phase abgetrennt und unter Stickstoff getrocknet, während der unteren wässrigen Phase Methanol zugesetzt wurde. Nach Proteinpräzipitation bei -20°C für 2 Stunden und anschließender Zentrifugation (30 Minuten, 13500g) wurde das Proteinpellet in einem Puffer (1% SDS, 150mM NaCl, 50mM Tris Puffer, pH 8,5) gelöst. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verwendet, um die Proteinkonzentration mittels BCA- Assay (Thermo Fisher Scientific) zu bestimmen, welche für die Normalisierung, respektive zur Eichung der Lipidom- Experimente genutzt wurde.

Lipidextrakte wurden in einer Lösung aus IPA/ MeOH/ CHCl₃ (4:2:1) mit 7,5 mM Ammoniumacetat suspendiert und mittels *TriVersa NanoMate* (Advion Biosciences) in ein Exploris 240 Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) infundiert. Im positiven und negativen Modus wurden folgende Parameter verwendet: Ionisierungsspannung ±1,25 kV, Rückdruck 0,95 psi, Kapillartemperatur 250°C, S-Lens-Level 60%, EASY-IC aktiviert. Vollständige MS- Spektren wurden mit einer Auflösung von 240 000 erfasst, gefolgt von einer datenunabhängigen Akquisition (DIA) mit 1 Da Intervall. MS/ MS- Spektren wurden mit einer Auflösung von 60 000 und einer Precursor- Isolationsbreite von 1 Da aufgezeichnet.

Die Spektren wurden in den LipidXplorer (Version 1.2.8) importiert und mit einem *MasterScan*- Datenbankabgleich unter folgenden Bedingungen analysiert: Massentoleranz 5 ppm, m/z- Bereich 350- 1100 (positiver Modus) und 350- 1200 (negativer Modus), Mindestbelegung 0,25, Intensitätsschwelle 5×10^3 . Die Identifikation der Lipide erfolgte gemäß Herzog et al., durch Abgleich der m/z-Werte der monoisotopischen Peaks mit den entsprechenden Elementarzusammensetzungen⁷⁹. Die *Molecular Fragmentation Query Language* (MFQL) wurde genutzt, um Vorläufer- und Fragmentationen abzugleichen und Lipidspezies zu identifizieren. Die Ergebnisse wurden mittels *ixPostman* (LIFS) und durch das AhrendsLab entwickelte R- Skripte weiterverarbeitet.

2.20. Phospho-/ Proteomanalyse mittels LC/ MS (*Liquid-Chromatographie- Massenspektrometrie*)

Blutproben von Patienten wurden, wie bereits zuvor beschrieben, gewonnen. Anschließend wurden EGTA und Apyrase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in Endkonzentrationen von 3 mM respektive 0,2 U/ ml hinzugefügt. Das PRP wurde durch Zentrifugation bei 200x g für 10 Minuten isoliert. Das PRP wurde in ein Greiner-Röhrchen (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) überführt und im Verhältnis 1:1 mit CGS-Puffer (NaCl 120 mM, Citrat 12,9 mM, Glucose 30 mM) verdünnt.

Das verdünnte PRP wurde anschließend für 10 Minuten bei 70x g zentrifugiert, und der Überstand in ein neues Greiner- Röhrchen überführt, sodass Lymphozyten, sowie weitere ungewollte kleinere Blutbestandteile und Débris entfernt werden konnten. Danach erfolgte eine zweite Zentrifugation bei 400x g für 10 Minuten, um die Thrombozyten zu pelletieren und zu konzentrieren. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Thrombozytenpellets in 3000 µl CGS-Puffer resuspendiert, für einen weiteren Waschschrift erneut zentrifugiert (400x g, 10 Minuten) und der Überstand wiederum vorsichtig entfernt. Schließlich wurden die gereinigten Thrombozyten in 200 µl HEPES- Puffer (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, Glucose 10 mM) resuspendiert und die Thrombozytenkonzentration auf 6×10^8 / ml eingestellt.

Für die Experimente erfolgte eine Aufteilung des Materials auf drei Proben für *in vitro* Experimente bzw. zwei Proben für *ex vivo* Experimente: eine unbehandelte Kontrollprobe, eine mit AA stimulierte Probe sowie eine vor der Stimulation mit EPA

präinkubierte Probe. Die stimulierten Proben wurden für sechs Minuten bei 37 °C mit AA inkubiert, während die EPA behandelten Proben zusätzlich vor der Stimulation für sechs weitere Minuten inkubiert wurden. Analog erfolgte ein Ruhen der nicht mit EPA behandelten Proben vor Stimulation. Die Behandlung wurde durch Zugabe eines Lysepuffers beendet, der 1% Natriumdodecylsulfat (SDS), 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl sowie jeweils eine Tablette PhosStop und cOmplete Mini (Roche, Basel, Schweiz) pro 10 ml enthielt.

Die folgende Analyse wurde in Kooperation und unter Anleitung des ISAS Instituts Dortmund, Prof. Dr. Sickmann sowie Frau Solari, durchgeführt.

Die Proteinkonzentration lysierter Thrombozytenkonzentrate wurde mittels Bicinchoninsäure- Assay (Pierce, Thermo-Fisher Scientific) bestimmt. Cysteine wurden durch Zugabe von 10mM Dithiothreitol für 30 Minuten bei 56°C reduziert und freie Sulfhydrylgruppen mit 30mM Iodacetamid für 30 Minuten unter Abschirmung vor Sonnenlicht alkyliert. Proben von 200µg Protein wurden einer Ethanol-fällung unterzogen, indem 10 Volumina- Äquivalente gekühlten Ethanols zugegeben, die Proben 1 Stunde bei -40 °C inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 20000x g und 4°C zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 6M Harnstoff gelöst und über 16 Stunden bei 37°C mit Trypsin (1:20, Enzym: Protein) unter Zugabe von 0,1M Harnstoff, 2mM CaCl₂ und 50mM Ammoniumbicarbonat verdaut.

Die gewonnenen Peptide wurden mittels C18- Festphasen- Tips (SPEC C18 AR, Agilent Technologies) entsalzt und unter Vakuum getrocknet. Zur Anreicherung phosphorylierter Peptide wurden IMAC Fe(III)- NTA- Kartuschen (AssayMAP Bravo Plattform) verwendet. Die Kartuschen wurden mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) in Acetonitril (ACN) vorbehandelt und mit Ladepuffer (0,1% TFA in 80% ACN) äquilibriert. Peptide wurden in Ladepuffer gelöst, geladen, gewaschen und phosphorylierte Peptide mit 1 % Ammoniak in 10 % Ameisensäure eluiert.

Die Analyse globaler und phosphorylierter Peptide erfolgte mittels nano LC- MS/ MS (U3000 RSLCnano gekoppelt an Q Exactive HF, Thermo Scientific). Nach einer Vortrennung auf der Trap- Säule (Acclaim PepMap100 C18; 100 µm x 2 cm) wurden Peptide auf einer analytischen Säule (Acclaim PepMap100 C18; 75 µm x 50 cm) mit einem Gradienten (3- 40 % ACN, 0,1 % FA) über 95 Minuten bei 60°C getrennt. Globale Proteome wurden im DDA- Modus mit einer MS- Auflösung von 60.000 und einer MS/ MS-Auflösung von 15. 000 (top15) analysiert. Zur Phosphoproteomanalyse

wurden angepasste Parameter genutzt, einschließlich einer dynamischen Ausschlusszeit von 20 Sekunden.

Rohdaten wurden in *Proteome Discoverer 2.4* ausgewertet und gegen die *Uniprot*-Datenbank (November 2019) abgeglichen. *Mascot* und *Sequest HT* wurden für die Proteinidentifikation verwendet, wobei Carbamidomethylierung (fix) sowie Oxidation von Methionin und Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin (variabel) berücksichtigt wurden.

Für die Datenanalyse wurden globale Proteome und Phosphopeptide mittels eines internen (ISAS Lab) Bioinformatik-Tools („Intt“) verarbeitet. Nach Filterung basierend auf einer Kovarianz (CV <15 %) und Normalisierung durch *global rank-invariant set* Methode wurden 1711 Proteine und 5180 Phosphopeptide identifiziert.

2.21. Statistische Analyse

Alle Statistische Analysen wurden unter Verwendung der IBM SPSS-Software (New York, USA) sowie der *GraphPad-Prism*-Statistiksoftware (GraphPad Software Inc, San Diego) durchgeführt. Die Prüfung der Normalverteilung der Daten erfolgte durch mehrere Tests, darunter der Kolmogorov-Smirnov-Test, der D'Agostino-Pearson-Test sowie durch die Analyse von QQ-Plots und Histogrammen. Für die Analyse von kontinuierlichen Variablen, die einer Normalverteilung folgten, wurde der t-Test verwendet, während für nicht normalverteilte Variablen der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz kam. Kategorische Variablen wurden je nach Eignung mit dem Chi-Quadrat-Test oder dem *Fisher's exact* Test analysiert. Der Vergleich von drei oder mehr Gruppen wurde durch ANOVA-Analysen, den Friedman-Test oder die *Mixed-Effects*-Analyse durchgeführt, je nachdem, welche Methode für den speziellen Datensatz am entsprechend passend war. Ein p-Wert unter 0,05 ($p < 0,05$) wurde als statistisch signifikant festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. EPA reduziert die Thrombozytenaggregation, -adhäsion, -aktivierung, sowie die Degranulation und das *Calcium-Signaling in vitro*

Um den genauen Einfluss von EPA auf die Funktion und Aktivität von Thrombozyten zu untersuchen, wurden umfassende *in vitro* Analysen durchgeführt. Zunächst wurde im Flusskammersystem (Bioflux) geprüft, wie sich EPA, als bioaktiver Metabolit von IPE, auf die thrombozytäre Adhäsion und Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen auswirkt. Hierbei wurden Kollagen sowie humanes atherosklerotisches Plaquematerial als Substrate verwendet. Die Behandlung mit EPA führte zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenadhäsion (Kontrolle: 29,6 % \pm 20,7 % vs. EPA 1000 μ M: 6,8 % \pm 3,7 %, $p=0,0345$) sowie zu einer geringeren Thrombuslast auf dem Plaquematerial (Abb. 3a- c). Darüber hinaus zeigte sich eine abgeschwächte thrombozytäre Aggregationsreaktion nach Stimulation mit Plaquematerial (Abb. 3d).

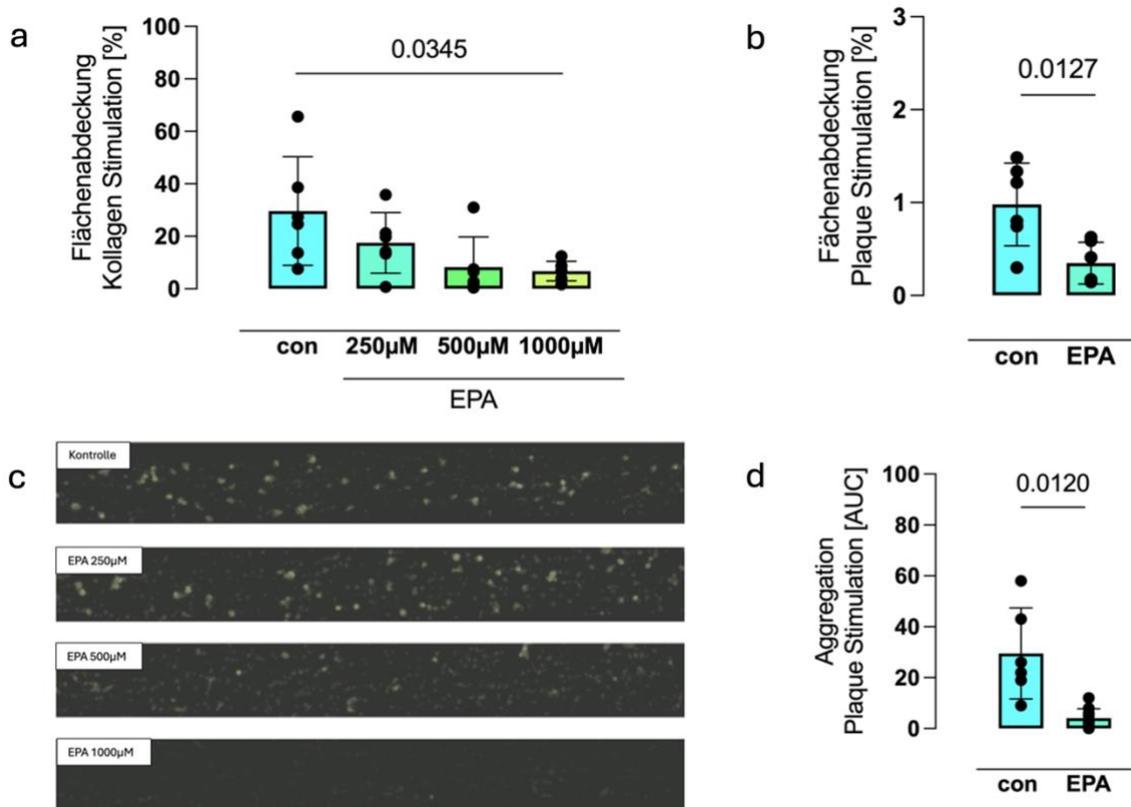


Abb. 3: Wirkung von EPA auf thrombozytäre Funktionen *in vitro*: Adhäsion und Aggregation
a) EPA hemmte die Thrombozytenadhäsion in einer kollagenbeschichteten Flusskammer signifikant (ANOVA, $p = 0,0345$; Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0367$; $n=6$). b) EPA hemmt die

Thrombozytenadhäsion, an mit humanem Plaquematerial beschichteten Flusskammern, ebenfalls signifikant (gepaarter t- Test, $p=0,0120$; $n=6$). c) Repräsentative Bilder der Flusskammer zeigen die Kontrolle, sowie zunehmende EPA- Konzentrationen von oben nach unten. d) Die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit humanem Plaquematerial zeigt sich durch EPA ebenfalls signifikant reduziert (gepaarter t-Test, $p=0,0120$; $n=6$).

Um die Effekte von EPA auf die Thrombozytenaggregation weiter zu analysieren, wurden sowohl die LTA im PRP als auch die MEA im Vollblut durchgeführt. In beiden Messsystemen zeigte sich eine ähnliche Änderung der Thrombozytenfunktion: Im PRP wurde eine signifikante Reduktion der Aggregationsantwort nach EPA- Zugabe festgestellt (Kontrolle: $83,0 \% \pm 6,3 \%$ vs. EPA $1000 \mu\text{M}$: $20,9 \% \pm 36,3 \%$, $p=0,0055$), welche sich im Vollblut ebenfalls als deutliche Hemmung der Thrombozytenaggregation bestätigte (Abb. 4a- h).

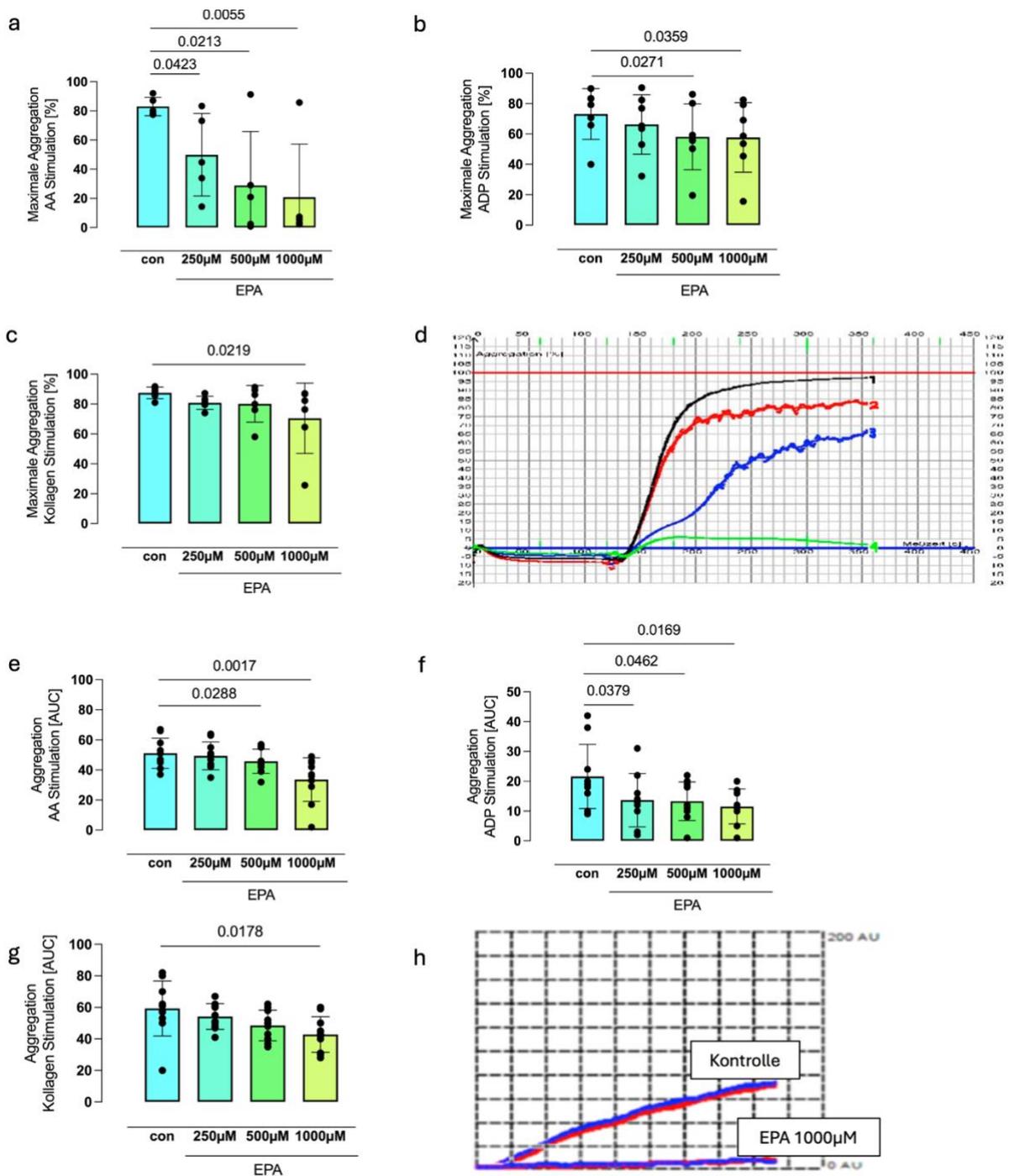


Abb. 4: Wirkung von EPA auf thrombozytäre Funktionen *in vitro*: Aggregation
a) EPA hemmte die durch AA induzierte Thrombozytenaggregation in der Lichttransmissionsaggregometrie signifikant (Friedman-Test, $p = 0,0099$; Dunnett's Test: Kontrolle vs. 250µM: $p=0,0423$; Kontrolle vs. 500 µM EPA: $p=0,0213$; Kontrolle vs. 1000 µM EPA: $p=0,0055$; $n=5$).
b) EPA hemmte die ADP (ANOVA, $p=0,0061$; Dunnett's Test: Kontrolle vs. 500 µM EPA: $p=0,0271$; Kontrolle vs. 1000 µM EPA: $p=0,0359$; $n=6$) sowie c) die Kollagen induzierte (Friedman-Test, $p=0,0412$; Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 µM EPA: $p=0,0219$; $n=6$) Aggregation konzentrationsabhängig. d) Eine repräsentative Grafik des AACT® Lichttransmissionaggregometers (schwarz = Kontrolle, rot = 250 µM EPA, blau = 500 µM EPA, grün = 1000 µM EPA). e) EPA hemmte zudem die AA induzierte Thrombozytenaggregation in der Impedanzaggregometrie signifikant (ANOVA, $p = 0,0017$; Dunnett's

Test: Kontrolle vs. 1000 μM EPA: $p = 0,0060$; $n = 10$). f) EPA inhibiert ebenso die ADP (ANOVA-analysis, $p=0.0060$; Dunnett's Test: Kontrolle vs. 250 μM EPA: $p=0,0379$, Kontrolle vs. 500 μM : $p=0,0462$, Kontrolle vs. 1000 μM EPA: $p=0,0169$, $n=9$), sowie Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation im Vollblut (ANOVA-analysis, $p=0.0049$; Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μM EPA: $p=0.0178$, $n=10$) h) Repräsentative Aggregationskurven für Kontrolle und 1000 μM EPA.

Zusätzlich wurde die Wirkung von EPA auf die Degranulation humaner Thrombozyten untersucht. Im *ATP-Release-Assay* zeigte sich eine verminderte ATP-Freisetzung im PRP, welches sich in einer reduzierten Freisetzung dichter Granula widerspiegelt (Abb. 5a). Weiterhin wurde die Aktivität der COX-1 anhand der Bildung von TXB2 als stabiler Metabolit von TXA2 analysiert. Die EPA-Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der TXB2-Produktion (Abb. 5b). Die Freisetzung von alpha-Granula wurde ebenfalls durch EPA beeinflusst, welches sich in einer verringerten Expression von P-Selektin (CD62P) nach Stimulation der Thrombozyten widerspiegelte (Abb. 5c, d).

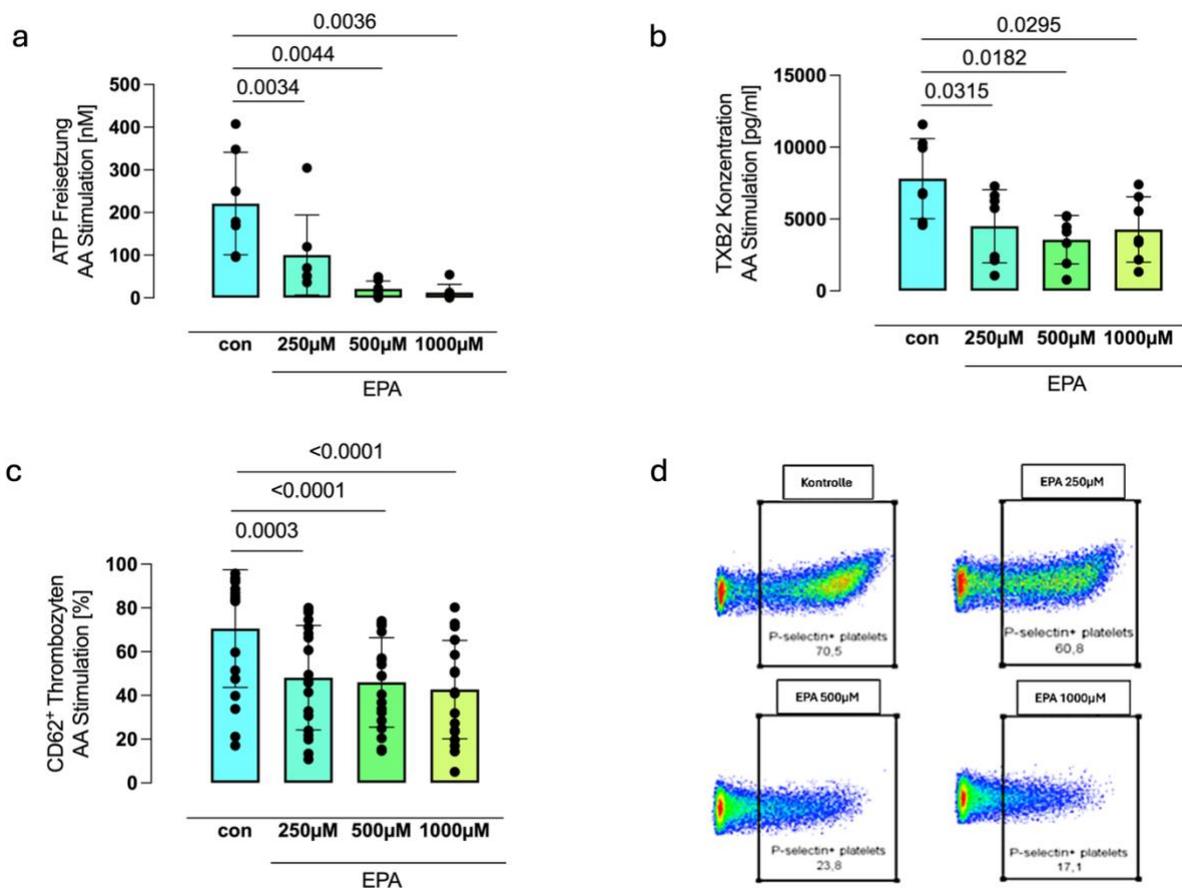


Abb. 5: Wirkung von EPA auf thrombozytäre Funktionen *in vitro*: Granula Freisetzung
a) EPA hemmte die durch AA induzierte Freisetzung von ATP signifikant (ANOVA, $p=0,0031$; Dunnett's

Test: Kontrolle vs. 250 μM EPA: $p=0,0034$; Kontrolle vs. 500 μM EPA: $p=0,0044$; Kontrolle vs. 1000 μM EPA: $p=0,0036$ $n = 6$). b) Die AA induzierte Freisetzung von TXB₂ wurde durch EPA signifikant reduziert (ANOVA, $p = 0,0132$; Dunnett`s Test: Kontrolle vs. 250 μM EPA: $p=0,0315$; Kontrolle vs. 500 μM EPA: $p=0,0182$; Kontrolle vs. 1000 μM EPA: $p=0,0295$; $n = 7$). c) Die Expression von P- Selektin nach AA Stimulation wurde durch EPA signifikant vermindert (ANOVA, $p < 0,0001$; Dunnett`s Test: Kontrolle vs. 250 μM EPA: $p = 0,0003$; Kontrolle vs. 500 μM EPA: $p < 0,0001$; Kontrolle vs. 1000 μM EPA: $p < 0,0001$; $n = 19$). d) Repräsentative Durchflusszytometrie Plots (Kontrolle: 70,5% CD62⁺ Thrombozyten nach AA Stimulation; EPA 250 μM : 60,8%; EPA 500 μM : 23,8%; EPA 1000 μM : 17,1%).

Darüber hinaus wurde die thrombozytäre Aktivierung auf Einzelzellebene untersucht. Die Zugabe von EPA bewirkte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Aktivierungsantwort auf verschiedene Agonisten, darunter AA, ADP und Kollagen. Diese Hemmung wurde anhand einer verringerten Expression der Aktivierungsmarker CD41/ 61, CD40, CD40L und PAC- 1 quantifiziert (Abb. 6a- d). Zusätzlich wurde das durch AA induzierte intrazelluläre Calcium- Signaling als Anstieg der Calciumkonzentration im Probenreagenz nach Stimulation der Thrombozyten analysiert. Die EPA- Vorinkubation führte zu einer signifikanten Reduktion des Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation der Thrombozyten im Vergleich zur Kontrollprobe, welches mittels Durchflusszytometrie dargestellt wurde (Abb. 6e- f).

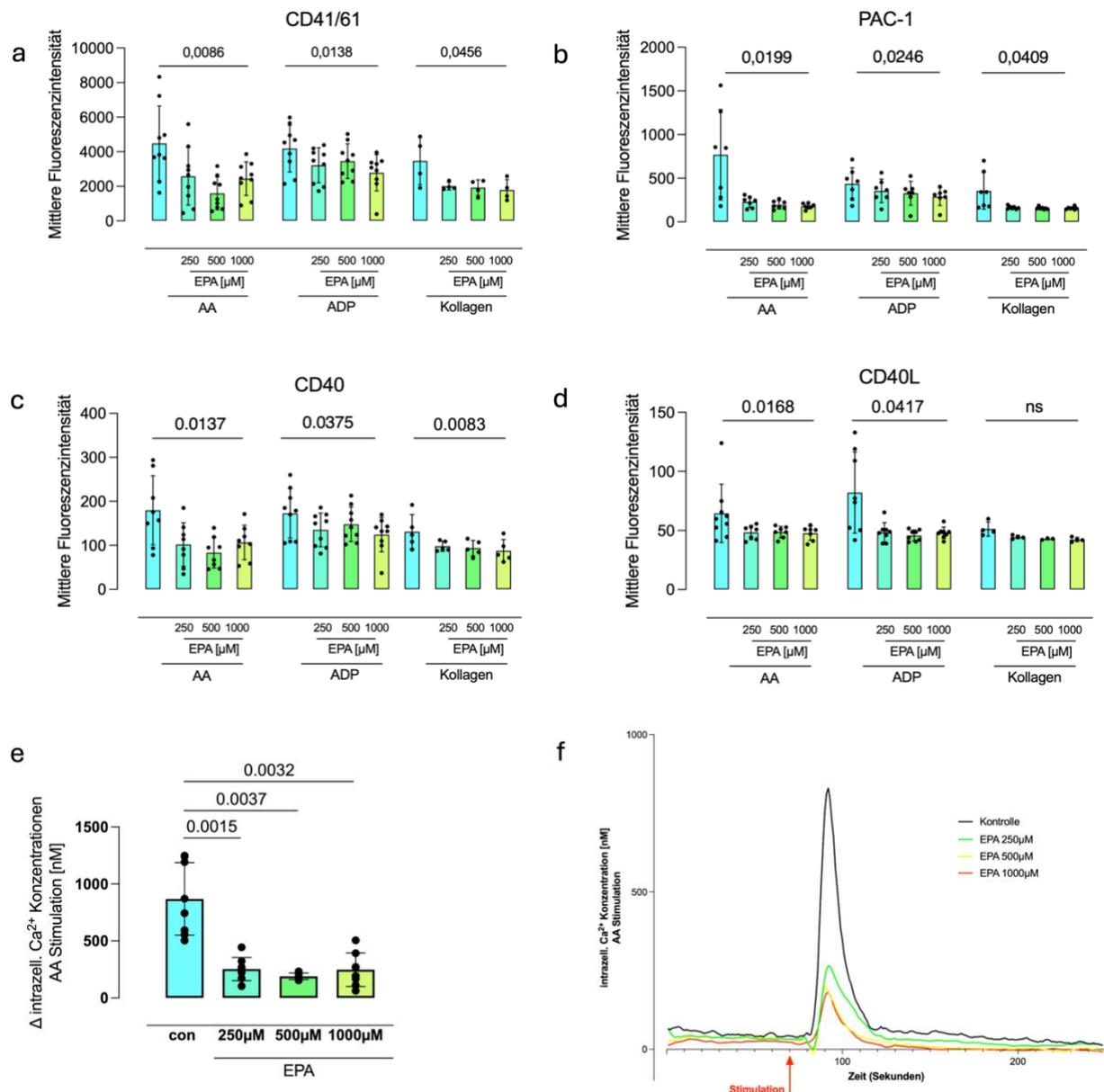


Abb. 6: Wirkung von EPA auf thrombozytäre Funktionen *in vitro*: Marker und Ca^{2+} Freisetzung
a) EPA reduzierte die durch AA (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0086$; $n=9$), ADP (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0138$; $n=9$), sowie Kollagen (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0456$; $n=4$) induzierte Expression von CD41/61. b) EPA reduzierte die durch AA (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0199$; $n=7$), ADP (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0246$; $n=7$), sowie Kollagen (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0409$; $n=6$) induzierte Expression von PAC- 1, ebenso wie für c) CD40: AA (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0137$; $n=9$), ADP (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0375$; $n=9$), Kollagen (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0083$; $n=5$) und d) CD40L: AA (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0168$; $n=9$), ADP (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0416$; $n=9$), nicht jedoch für Kollagen (Dunnett's Test: Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=ns$; $n=5$). e) EPA hemmte die durch AA induzierte Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration signifikant (*Mixed- Effects- Analyse*, $p = 0,0004$; Dunnett's Test: Kontrolle vs. 250 μ M EPA: $p=0,0015$; Kontrolle vs. 500 μ M EPA: $p=0,0037$; Kontrolle vs. 1000 μ M EPA: $p=0,0032$; $n = 6$). Repräsentative Darstellung

der intrazellulären Calciumänderungen nach AA Stimulation über die Zeit in Sekunden (schwarz = Kontrolle, grün = 250 μ M EPA, gelb = 500 μ M EPA, rot = 1000 μ M EPA).

3.2. IPE reduziert die Bildung arterieller Thromben in vivo und beeinflusst die Blutungszeit

Aufbauend auf den *in vitro* Ergebnissen zur hemmenden Wirkung von EPA auf thrombozytäre Funktionen wurde in einem murinen Fe(III)- Chlorid Verletzungsmodell der A. carotis untersucht, inwieweit eine langfristige orale IPE- Supplementierung die arterielle Thrombosebildung *in vivo* beeinflusst. Insgesamt erhielten die Versuchstiere eine IPE- Supplementierung über 14 Tage. Mithilfe der Intravitalmikroskopie wurde die Zeit bis zur vollständigen Gefäßokklusion analysiert. In der IPE- Gruppe war diese signifikant verlängert (Kontrolle: 9,4 min \pm 1,6 min vs. IPE: 60 min \pm 0, $p < 0,0001$), gefolgt von einer früher einsetzenden Reperfusion in den mit IPE- behandelten Tieren. Neben der verzögerten Gefäßokklusion war auch die maximale Größe gebildeter Thromben nach IPE- Supplementierung deutlich reduziert (Abb. 7a- c). Die histologische Analyse der gebildeten Thromben zeigte eine verminderte Expression des Thrombozytenmarkers CD41 sowie eine reduzierte Fibrinogenablagerung. Darüber hinaus wiesen die Thromben in der IPE- Gruppe eine weniger dichte und kompakte Struktur auf (Abb. 7d- f). Zusätzlich wurde der Einfluss von IPE auf hämostatische Parameter mittels eines murinen *Tail-Bleeding-Assays* untersucht. Die IPE- Behandlung führte zu einer signifikanten Verlängerung der Blutungszeit sowie zu einem erhöhten Blutverlust im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 7g, h).

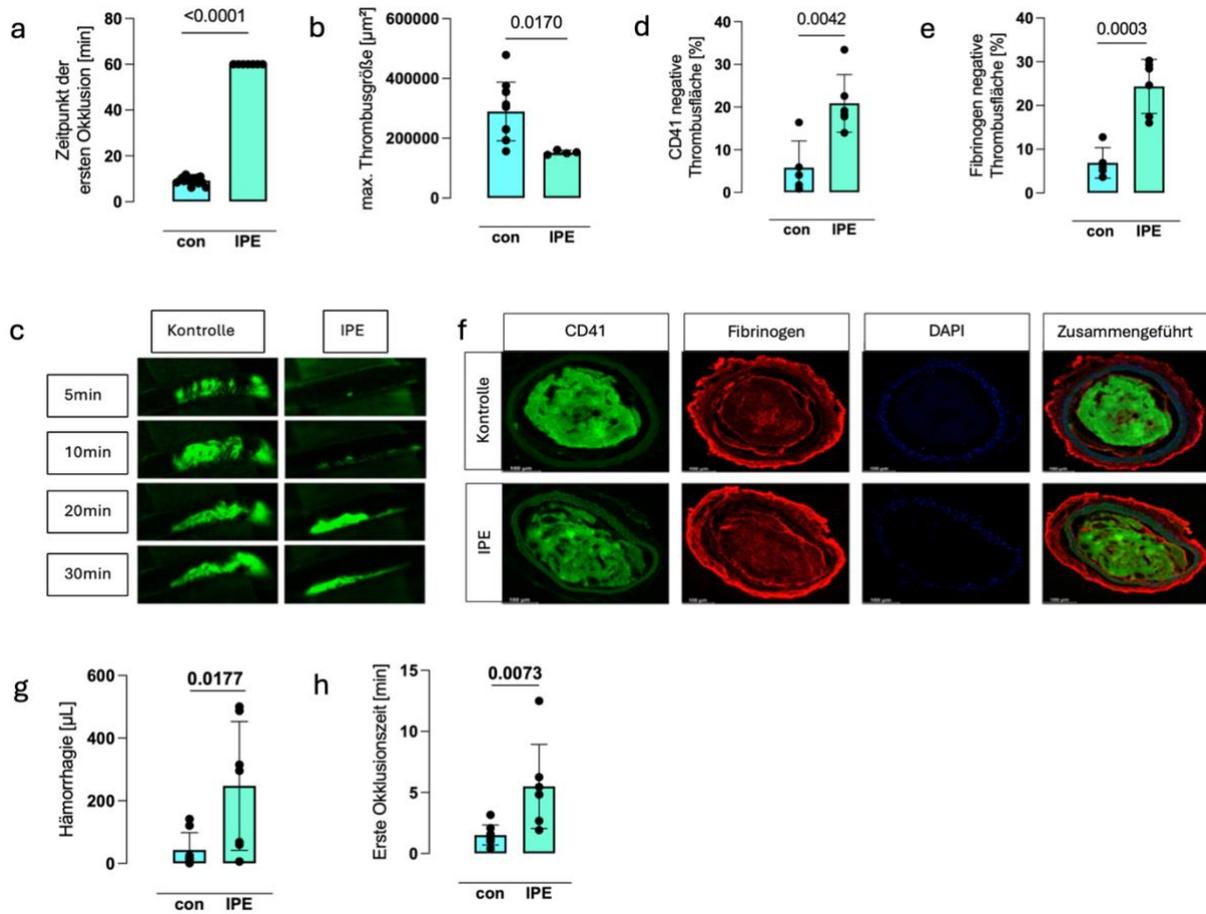


Abb. 7: Wirkung von EPA auf thrombozytäre Funktionen *in vivo*: Okklusion und Hämorrhagie
a) IPE verkürzte die Zeit bis zur ersten Gefäßokklusion (ungepaarter t- Test, $p < 0,0001$; $n_{\text{Kontrolle}}=15$, $n_{\text{IPE}}=7$) und b) verringerte die maximale Thrombusgröße (ungepaarter t- Test, $p=0,0170$; $n_{\text{Kontrolle}}=15$, $n_{\text{IPE}}=7$) in einem *in vivo* Modell der arteriellen Thrombusbildung in der A. carotis. c) Repräsentative Aufnahmen arterieller Thromben der A. carotis zu Messzeitpunkten 5, 10, 20, 30 min nach Gefäßverletzung in Kontrolltieren, sowie IPE- behandelten Tieren. d) Der CD41- negative Thrombusanteil als Fläche ausgewertet, (ungepaarter t-Test, $p = 0,0042$; $n_{\text{Kontrolle}}=5$, $n_{\text{IPE}}=6$) sowie e) der Fibrinogen- negative Thrombusanteil (ungepaarter t-Test, $p = 0,0003$; $n_{\text{Kontrolle}}=5$, $n_{\text{IPE}}=6$) waren in der IPE- Gruppe signifikant erhöht. f) Repräsentative histologische Aufnahmen nach Färbung zur Darstellung von CD41, Fibrinogen, der Zellkerne, sowie der Überlagerung der Färbungen in Kontrolltieren, sowie IPE- behandelten Tieren. g) Im Mausmodell führte IPE im *Tail- Bleeding- Assay* zu einem signifikant erhöhten Blutverlust, (ungepaarter t-Test, $n=7$, $p=0,0177$) sowie zu einer h) verlängerten Blutungszeit (ungepaarter t-Test, $n=7$, $p=0,0073$), als Zeit bis zur ersten Okklusion.

3.3. Modulation der intrazellulären Proteinphosphorylierung durch EPA-Behandlung *in vitro*

Um die molekularen Mechanismen, die der durch EPA induzierten Veränderung der

Thrombozytenphysiologie zugrunde liegen, weiter aufzuklären, wurde eine umfassende *in vitro* Analyse des Phosphoproteoms sowie des Proteoms in isolierten humanen Thrombozyten durchgeführt. Die Behandlung mit EPA führte zu weitreichenden Veränderungen in der intrazellulären Proteinphosphorylierung und hob insbesondere die durch AA induzierte Phosphorylierung auf (Abb. 8a, b).

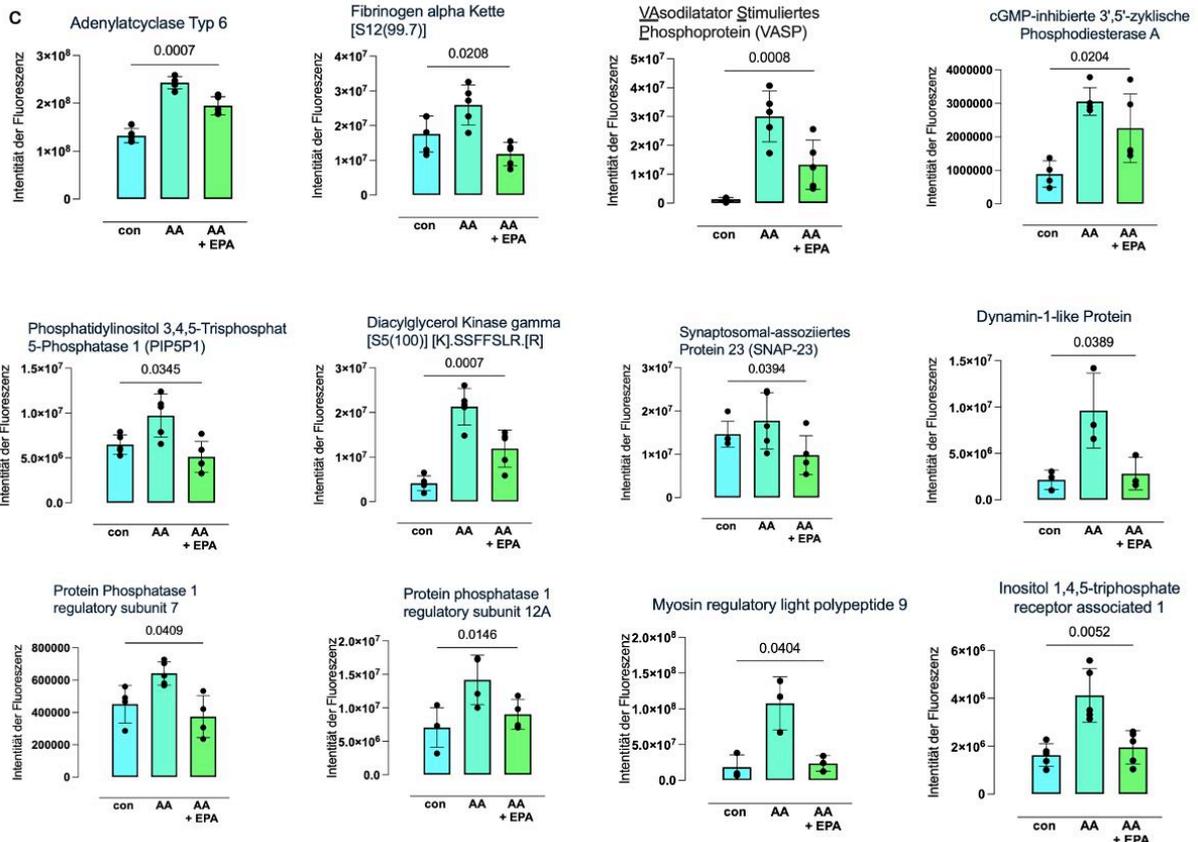
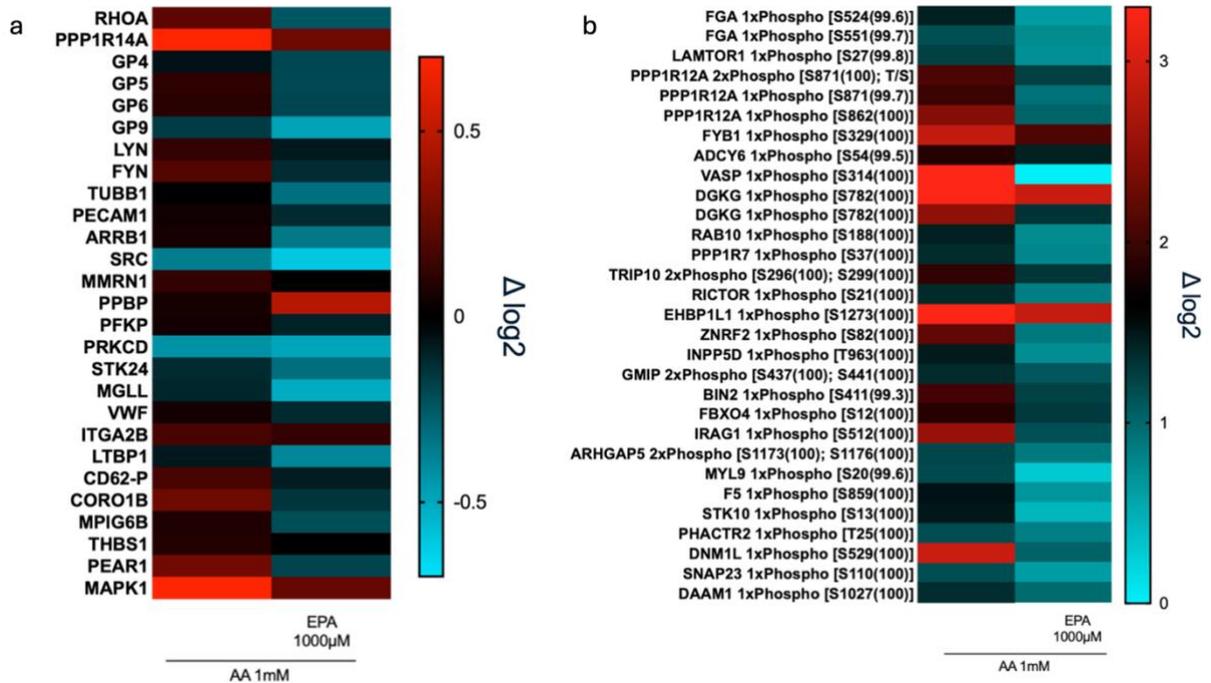


Abb. 8: Intrazellulären Proteinphosphorylierung durch EPA- Behandlung *in vitro*

a) *Heatmap* zur Darstellung der Proteom- Veränderungen der Vergleichsgruppen AA Stimulation und AA Stimulation nach EPA Präinkubation, ausgewertet als relative Änderung des \log_2 zur Kontrolle. Es zeigt sich insgesamt eine Herunterregulation, welche sich als Farbverschiebung in Richtung blau, entsprechend einer relativen Änderung um z.B. -0,5 zeigt. b) *Heatmap* der Phosphoproteom- Änderung im gleichen Versuchsansatz. c) Beispiele regulierter Proteine in verschiedenen intrazellulären Signalwegen der Thrombozyten, die Aggregation, Degranulation und Formveränderung beeinflussen: Adenylatcyclase Typ 6 ($p=0,0007$; Kontrolle vs. AA: $p=0,0002$; AA vs. AA + EPA: $p=0,0389$; $n=5$), Fibrinogen alpha Kette [S12(99.7)] ($p=0,0208$; AA vs. AA + EPA: $p=0,0078$ $n=5$), Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein ($p=0,0008$; Kontrolle vs. AA: $p=0,0031$, $n=5$), cGMP-inhibierte 3',5'-zyklische Phosphodiesterase A ($p=0,0204$; Kontrolle vs. AA: $p=0,0477$, $n=4$), Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate 5-Phosphatase 1 ($p=0,0345$; Kontrolle vs. AA: $p=0,0477$, $n=5$), Diacylglycerolkinase Gamma ($p=0,0007$; Kontrolle vs. AA: $p=0,0015$; AA vs. AA + EPA: $p=0,0419$; $n=5$), Synaptosomal-assoziiertes Protein 23 ($p=0,0394$, AA vs. AA + EPA: $p=0,0228$, $n=5$), *Dynammin-1-like* Protein ($p=0,0389$, AA vs. AA + EPA: $p=0,0023$, $n=3$), *Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7* ($p=0,0409$; AA vs. AA + EPA: $p=0,0395$, $n=4$), *Protein Phosphatase 1 regulatory subunit 12A (myosin phosphatase-target)* ($p=0,0146$; Kontrolle vs. AA: $p=0,0343$, $n=4$) und *Myosin regulatory light polypeptide 9* ($p=0,0404$, AA vs. AA + EPA: $p=0,0395$, $n=3$), Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor-assoziiertes Protein 1 ($p = 0,0052$; AA vs. AA + EPA: $p=0,0241$; $n = 5$) (jeweils ANOVA-Analyse und Dunnett's Test für multiple Vergleiche).

Insgesamt zeigte sich, dass EPA insbesondere die Phosphorylierung von Proteinen reguliert, die essenzielle Funktionen in der Thrombozytenaktivierung übernehmen. Dazu zählen Proteine, die an der Thrombozytenaggregation (Fibrinogen-Alpha-Kette, Adenylatzyklase Typ 6, Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein), an der Synthese sekundärer Botenstoffe (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat-5-Phosphatase 1), an der Zytoskelettregulation (Dynammin-1-ähnliches Protein, Myosin-regulatorisches Leichtkettenpolypeptid 9), an der Degranulation (Synaptosomal-assoziiertes Protein 23) sowie an der intrazellulären Calciumfreisetzung (Diacylglycerol-Kinase Gamma) (Abb. 8c) beteiligt sind.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die EPA- Inkubation auch eine Veränderung des thrombozytären Lipidoms bewirkt und somit potenziell die funktionellen Reaktionsmuster der Thrombozyten beeinflusst. Die Analyse des Gesamtlipidprofils ergab jedoch keine signifikanten Veränderungen durch die EPA-Behandlung (Abb. 9a, b).

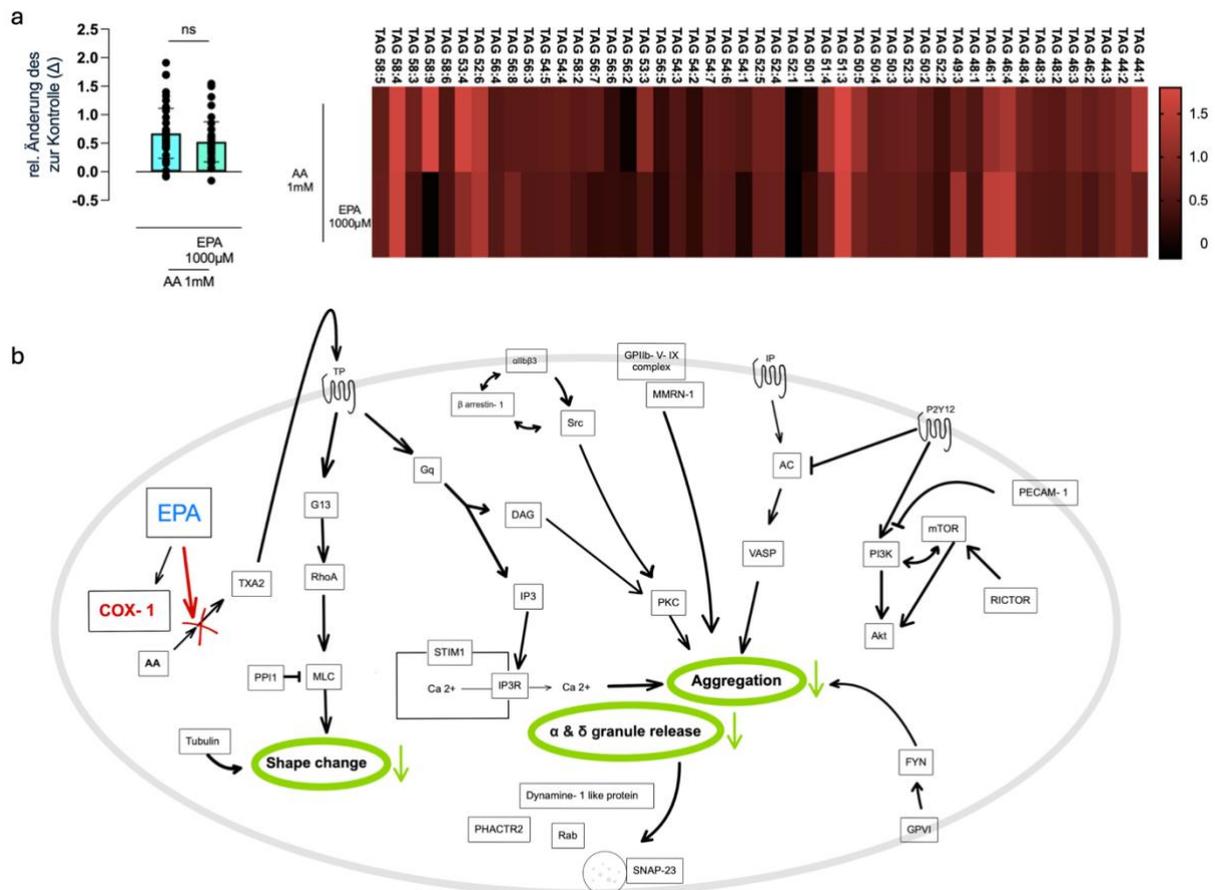


Abb. 9: Veränderung des thrombozytären Lipidoms durch EPA *in vitro* und Reaktionsüberblick
a) Relative Änderung zur Kontrolle der für das thrombozytäre Metabolom relevanten Lipide. EPA führt zu keiner signifikanten Änderung. Rechts daneben abgebildet eine *Heatmap* zu gleichem Versuchsaufbau mit Abbildung Metabolom-relevanter Lipide in Einzeldarstellung. b) Schematische Darstellung der durch AA vermittelten Thrombozytenaktivierung und der inhibitorischen Effekte von EPA über die COX-1- Interaktion. EPA reduziert die TXA2 Synthese und beeinflusst nachgeschaltete Signalwege, die Formveränderung (*shape change*), Granula-Freisetzung (*alpha und dense granule release*) und Aggregation der Thrombozyten steuert.

3.4. EPA induzierte Thrombozytenhemmung ist unabhängig von Triglyceriden und der Membranlipidzusammensetzung

Um zu überprüfen, ob die verminderte thrombozytäre Reaktivität mit einer Reduktion der Triglyceridkonzentration assoziiert ist, wurde die Thrombozytenfunktion bei 370 Patienten unter ASA Therapie (100mg, 1-0-0) in der LTA untersucht. Die Analyse ergab keine signifikante Korrelation zwischen dem durch AA induzierten maximalen Aggregationswert und den Triglyceridspiegeln (Abb. 10a). Die Studienteilnehmer wiesen ein Durchschnittsalter von $67,8 \pm 12,25$ Jahren auf, wobei 60,8 % männlich

und 23,3 % adipös waren. Eine detaillierte Übersicht weiterer Patienteneigenschaften findet sich in der nachfolgenden Tabelle.

Tabelle 1: Patientencharakteristika (n=370)

Alter, Jahre (Mittelwert \pm SD)	67.8 \pm 12.25
Männliches Geschlecht, Anzahl (%)	225(60.8%)
Adipositas, Anzahl (%)	86(23.3%)
BMI (kg/m ²)	28.3 \pm 2.24
Raucher, Anzahl (%)	138(37.3%)
Hypercholesterinämie, Anzahl (%)	93(25.31%)
Arterielle Hypertonie, Anzahl (%)	291(78.6%)
Diabetes mellitus, Anzahl (%)	107(28.9%)
Koronare Herzkrankheit, Anzahl (%)	282(76.1%)
1-Gefäß KHK, Anzahl (%)	52(14.2%)
2-Gefäß KHK, Anzahl (%)	37(10%)
3-Gefäß KHK, Anzahl (%)	192(51.9%)
HFrEF, Anzahl (%)	144(38.9%)
Z.n. MI, Anzahl (%)	178(21.1 %)
Z.n. PCI, Anzahl (%)	185(50%)
Z.n. TIA/ Stroke, Anzahl (%)	57(15.4 %)
Z.n. CABG, Anzahl (%)	83(22.4%)
Chronische Niereninsuffizienz, Anzahl (%)	162 (43.8 %)

SD= Standardabweichung, BMI= *body mass index*, HFrEF= *heart failure with reduced ejection fraction*, MI= Myokardinfarkt, PCI= Perkutane Koronarintervention, CABG= *coronary artery bypass graft*, Bypass, TIA= *transient ischemic attack*

Im nächsten Schritt wurde die Bedeutung EPAs für die Thrombusbildung *in vivo* im Tiermodell untersucht. Zur Überprüfung, ob IPE die Thrombozytenantworten und die arterielle Thrombusbildung *in vivo* reduziert, wurde die Thrombusbildung mittels ASA vorbehandelter Wildtyp Mäusen visualisiert. Tatsächlich zeigte die IPE-Vorbehandlung keinen zusätzlichen Effekt auf die Thrombusbildung, da die Zeit bis zur ersten Okklusion des Gefäßes, die Dauer der ersten Okklusion und die Thrombusgröße unverändert blieben (ASA: 121.974 $\mu\text{m}^2 \pm 77.183 \mu\text{m}^2$ vs. ASA + IPE: 161.821 $\mu\text{m}^2 \pm 76.925 \mu\text{m}^2$, $p > 0,05$) (Abb. 10b- e).

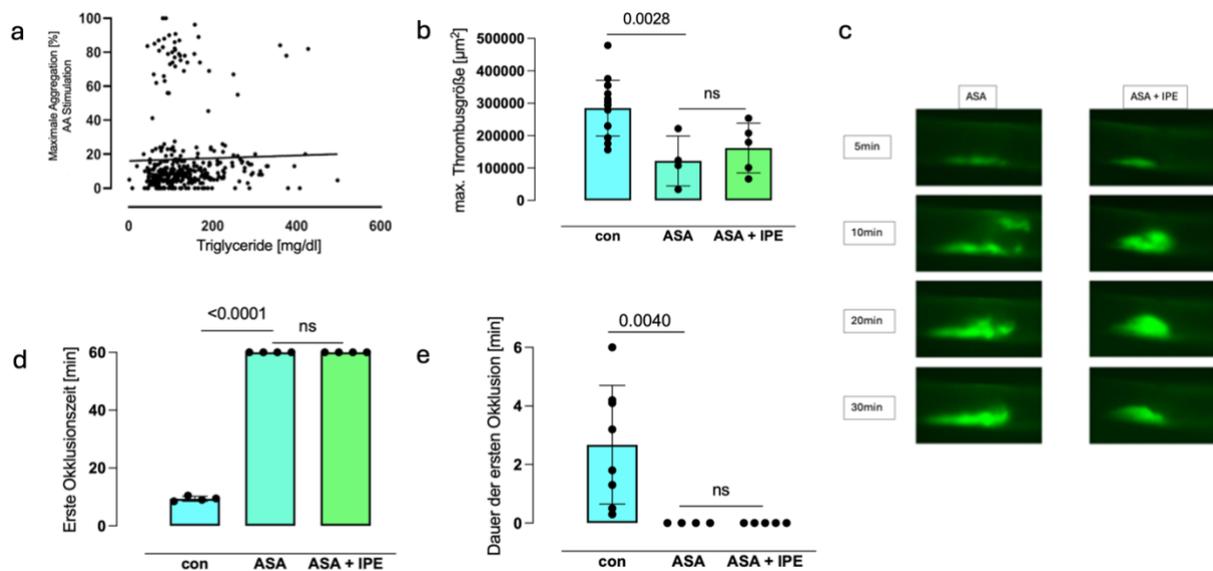


Abb. 10: Interaktion EPAs mit Triglyceridplasmaspiegeln und Einfluss auf die Thrombusbildung *in vivo*
 a) Die durch AA induzierte Thrombozytenreaktivität als Aggregationsmaximum nach AA Stimulation gemessen in der LTA ist unabhängig von dem Plasma- Triglyceridspiegel (Pearson-Korrelation, $n=370$, $p=0,6235$, $R^2=0,0006556$, $r=0,02560$). b) Nach pharmakologischer Inhibition der thrombozytären COX-1 durch ASA zeigte die IPE- Supplementierung keinen Effekt auf die maximale Thrombusgröße (ungepaarter t-Test, $p > 0,05$; $n_{\text{Kontrolle}}=16$, $n_{\text{ASA}}=4$, $n_{\text{ASA+IPE}}=5$). c) Repräsentative Aufnahmen arterieller Thromben der A. carotis zu Messzeitpunkten 5, 10, 20, 30 min nach Gefäßverletzung in ASA, sowie ASA und IPE behandelten Tieren. d) Auch die Zeit bis zur ersten Okklusion (ungepaarter t-Test, $p>0,05$; $n=4$) und e) die Dauer der ersten Okklusion (ungepaarter t-Test, $p>0,05$; $n=4$) in einem *in vivo* Modell der Karotisthrombose zeigt keinen signifikanten Effekt.

Um die potenzielle Beteiligung der Thrombozytenmembran, respektive der Lipidkomposition an den antithrombotischen Effekten von IPE zu untersuchen, wurde die Freisetzung und Zusammensetzung von Membranlipiden während der Thrombozytenaktivierung analysiert. Dabei zeigte sich, dass das Verhältnis von AA zu EPA nach Stimulation der Thrombozyten durch die IPE- Supplementierung unverändert blieb (Abb. 11a, b). Dies lässt darauf schließen, dass die durch IPE induzierte Reduktion der Thrombozytenreaktivität nicht durch strukturelle Modifikationen der Membranzusammensetzung vermittelt wird. Stattdessen beruht der Mechanismus höchstwahrscheinlich auf einer direkten kompetitiven Hemmung der thrombozytären COX-1 durch EPA.

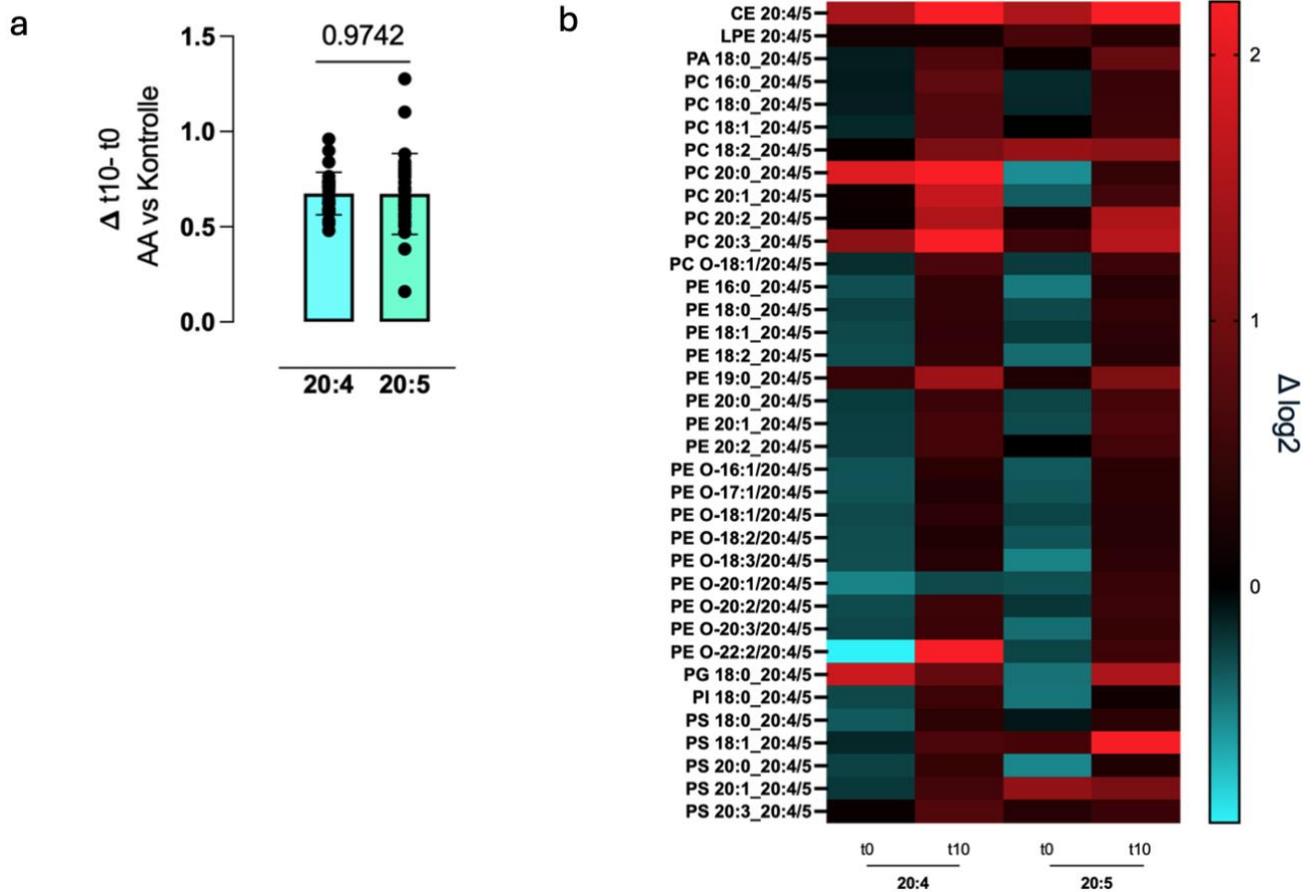


Abb. 11: Zusammensetzung thrombozytärer Membranlipiden unter EPA
a) Die Veränderung des AA/ EPA- Verhältnisses ($\Delta t_{10}-t_0$) während der Thrombozytenaktivierung *ex vivo* unterschied sich nach IPE- Supplementierung nicht signifikant (ungepaarter t-Test, $p>0,05$; $n=27$).
b) Relative Veränderungen des \log_2 (Δ) in AA- stimulierten Proben im Vergleich zur Kontrolle sind für t_0 , entsprechend vor Einnahme, und t_{10} , entsprechend 10 Tage nach Behandlungsbeginn, als *Heatmap* dargestellt. Nach 10 Tagen IPE- Behandlung zeigten AA stimulierte Proben signifikant höhere Konzentrationen von Lipiden mit 20:4 oder 20:5- Fettsäureresten.

3.5. Kompetitive Hemmung der thrombozytären COX-1 durch EPA *in vitro*

Basierend auf den vorhergehenden Analysen zur Wirkung von EPA auf die Thrombozytenfunktion wurde untersucht, ob der antithrombotische Effekt über eine direkte Interaktion mit der thrombozytären COX- 1 vermittelt wird. Hierzu wurde die Thrombozytenaktivität unter pharmakologischer COX- 1 Blockade durch ASA in einer Konzentration von 30 μM analysiert, was in etwa einer täglichen oralen Dosierung von 100 mg entspricht. In Gegenwart von ASA zeigte EPA keinen zusätzlichen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion, die durch AA induzierte Aggregation oder die Thromboxansynthese (Abb.12a-c). Die Blockade des Thromboxanrezeptors mit

Ramatroban, einem TXA₂/ Prostaglandin- H₂ Rezeptor- Antagonist, führte nach Vorbehandlung mit EPA zu keinen zusätzlichen hemmenden Effekten (Abb. 12d). Um eine direkte kompetitive Interaktion zwischen EPA und AA auf die COX- 1 nachzuweisen, wurde die Reversibilität der EPA- induzierten COX-1 Hemmung durch ansteigende AA-Konzentrationen untersucht. Mit zunehmender AA- Konzentration wurde die Hemmung durch EPA schrittweise aufgehoben (0,5 mM AA: 25,8 % ± 31,4 % vs. 1 mM AA: 78,3 % ± 4,7 %, p=0,0111; 1 mM AA vs. 2 mM AA: 65,9 % ± 20,9 %, p=0,0397). Im Gegensatz dazu blieb die durch ASA verursachte COX- 1 Hemmung unabhängig von der AA Konzentration bestehen, was die irreversible Bindung von ASA an COX- 1 bestätigt (Abb. 12e). Diese Ergebnisse legen nahe, dass EPA eine reversible, kompetitive Hemmung von COX- 1 vermittelt, die durch hohe Konzentrationen von AA überwunden werden kann.

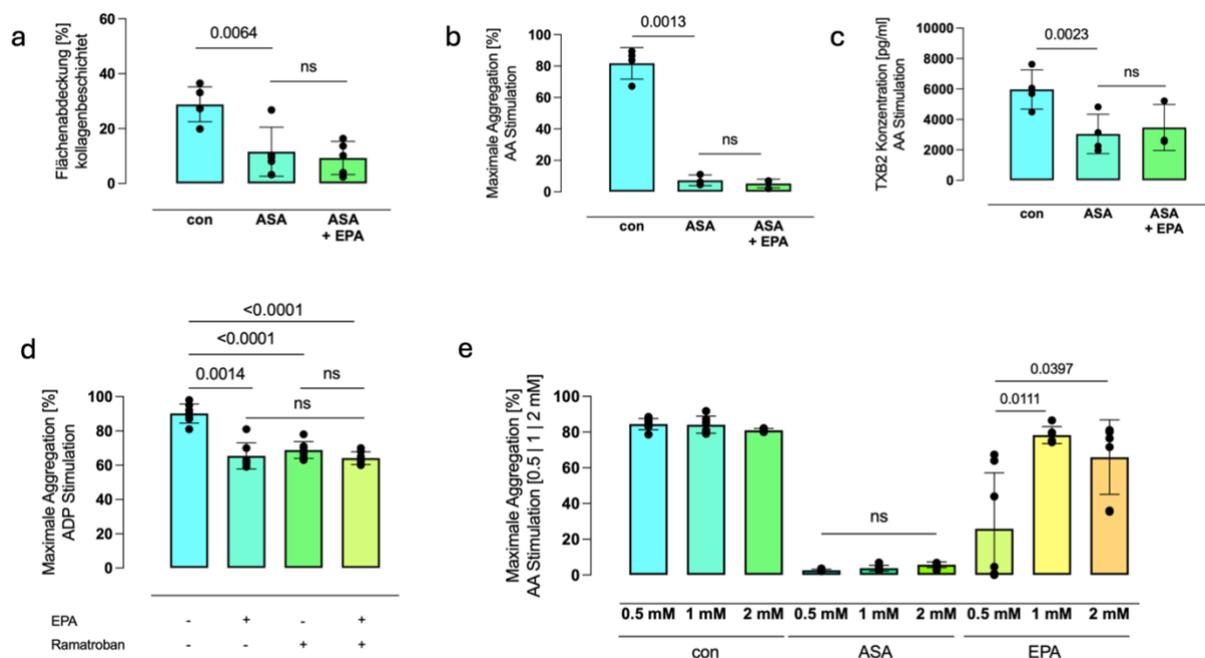


Abb. 12: Thrombozytenaktivität unter pharmakologischer COX- 1 Blockade und EPA
a) Nach Inhibition der COX- 1 durch ASA zeigte EPA keinen zusätzlichen Effekt auf die Thrombozytenadhäsion in einer kollagenbeschichteten Flusskammer, gemessen als Flächenabdeckung in Prozent (gepaarte t-Tests, p>0,05; n=4). b) Auch auf die Thrombozytenaggregation hatte EPA nach COX- 1 Hemmung mit ASA keinen zusätzlichen Einfluss (gepaarte t-Tests, p > 0,05; n = 4). c) Ebenso zeigte EPA keinen zusätzlichen Effekt auf die AA-induzierte TXB₂ Freisetzung nach Vorbehandlung mit ASA (gepaarte t-Tests, p>0,05; n=4). d) Ramatroban bewirkte keinen zusätzlichen inhibitorischen Effekt auf die Thrombozytenaggregation in EPA- behandelten Proben (ANOVA, p<0,001; n=8; Tukey-Test für multiple Vergleiche: Kontrolle vs.

EPA: $p=0,0014$; Kontrolle vs. Ramatroban: $p<0,0001$; Kontrolle vs. EPA + Ramatroban: $p<0,0001$; EPA vs. EPA + Ramatroban: $p=0,5255$; Ramatroban vs. EPA + Ramatroban: $p=0,4470$). e) Der inhibitorische Effekte von EPA wurden durch steigende Konzentrationen von AA aufgehoben (ANOVA, $p=0,0313$; Dunnett's Test: 0,5mM vs. 1mM: $p=0,0111$; 0,5mM vs. 2mM: $p=0,397$; $n=7$), während die Effekte von ASA unverändert blieben (ANOVA, $p>0,05$; $n=7$).

3.6. Analyse der Bindungsinteraktion zwischen EPA und thrombozytärer COX-1

Zur experimentellen Bestätigung der direkten Interaktion von EPA mit dem aktiven Zentrum der COX- 1 wurde eine kovalente chemische Sonde für die Photoaffinitätsmarkierung entwickelt. Die Markierungsexperimente wurden an rekombinanter humaner COX- 1 durchgeführt. Dabei erfolgte das Photo- Crosslinking unter UV-Bestrahlung (365 nm) bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Herolab UV-8 S/L Lichtquelle. Die fluoreszenzmarkierte COX- 1 wurde anschließend durch *in-Gel-Scanning* detektiert, wodurch die COX- 1 der Thrombozyten als direkte Bindungsstelle für EPA *in vitro* identifiziert werden konnte (Abb. 13a). Zusätzlich wurde mittels virtuellen *Dockings* analysiert, ob EPA direkt an COX- 1 bindet. Die Berechnungen ergaben eine Positionierung mit hoher Affinität, bei der die Carboxylgruppe von EPA in Richtung einer der hydrophilen Regionen nahe des Zielkanals ausgerichtet war. Gleichzeitig blockierte die aliphatische Kette von EPA den hydrophoben Bereich des Kanals, der in Richtung der aktiven Bindungsstelle um Serin 530 und Tyrosin 385 der thrombozytären COX- 1 verläuft. Um die Validität der *in silico* Analyse zu bestätigen, wurde die Positionierung von AA innerhalb des COX-1 Enzyms mit Kristallstrukturen verglichen. Die beobachtete Überlappung zwischen den beiden Strukturen deutet auf eine zuverlässige Modellierung des virtuellen *Dockings* hin. Ein analoges *Docking* Experiment mit EPA in die COX- 1 Struktur ergab eine sehr ähnliche Positionierung und Affinität im Vergleich zu AA. Dies weist darauf hin, dass EPA auf ähnliche Weise an das aktive Zentrum der COX- 1 bindet und somit potenziell mit AA um die Enzymbindung konkurriert (Abb. 13b).

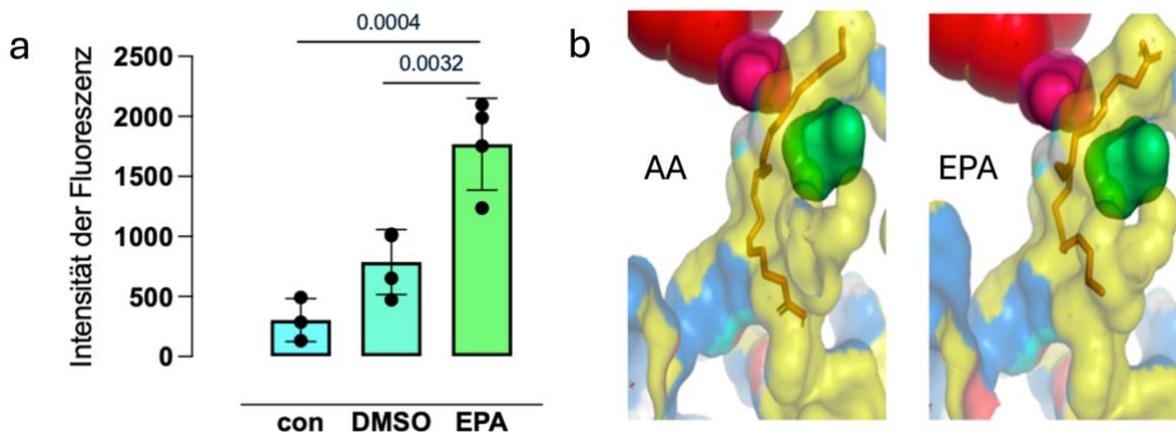


Abb. 13: *In silico Docking* Analyse: COX- 1 als Zielstruktur von AA und EPA
a) Die Photoaffinitätsmarkierung identifizierte die thrombozytäre COX-1 als Zielstruktur von EPA *in vitro* (ANOVA, $p=0,0005$; Dunnett's Test: DMSO vs. EPA (fluoreszenzmarkiert): $p=0,0032$; EPA (fluoreszenzmarkiert) vs. Kontrolle: $p=0,0004$; $n=4$). b) *In silico Docking* Analysen zeigten eine vergleichbare Bindungsaffinität von EPA und AA an das aktive Zentrum der thrombozytäre COX- 1.

3.7. Perorale IPE- Supplementierung reduziert die Thrombozytenreaktivität

Zur Beurteilung der Auswirkungen einer oralen IPE- Behandlung auf die Thrombozytenfunktion wurde das Blut von 25 Patienten zu drei Zeitpunkten analysiert: vor Beginn der Supplementierung (t_0), nach fünf Tagen (t_5) sowie nach zehn Tagen IPE- Einnahme (t_{10}). Um die Therapieadhärenz der Patienten zu überprüfen, wurde das thrombozytäre Lipidprofil vor und nach zehn Tagen IPE-Supplementierung (2x 2 g täglich, 1-0-1) bestimmt. In Übereinstimmung mit den Erwartungen zeigte sich ein signifikanter Anstieg von 20:5- haltigen Lipiden in der Thrombozytenmembran nach zehn Tagen (t_0 : 14,1 pmol/mg \pm 13 pmol/mg vs. t_{10} : 63,7 pmol/mg \pm 60,1 pmol/mg, $p<0,0001$) (Abb. 14a).

Die funktionelle Analyse der Thrombozyten ergab eine reduzierte Adhäsion an Kollagen unter arteriellen Flussbedingungen nach zehn Tagen IPE-Supplementierung (t_0 : 22,3 % \pm 7,1 % vs. t_{10} : 13,7 % \pm 3,1 %, $p=0,0259$) (Abb.14b). Darüber hinaus führte die Behandlung zu einer verminderten thrombozytären Aggregationsantwort auf AA (Abb. 14c). Die Untersuchung der sekretorischen Funktion der Thrombozyten ergab eine Reduktion der ATP- Freisetzung, die als Marker für die Degranulation der *dense* Granula dient und für eine vollständige Thrombozytenaktivierung essenziell ist (t_0 : 130,7 nM \pm 20,4 nM vs. t_{10} : 95,9 nM \pm 12 nM, $p=0,0002$) (Abb. 14d). Auch die P-

Selektin (CD62P) Expression, die als Indikator für die Alpha- Granula Sekretion nach Stimulation gilt, zeigte sich nach IPE- Behandlung verringert (Abb. 14e). Zudem zeigte sich nach zehn Tagen eine signifikante Reduktion der TXB2 Konzentration, die als Surrogatmarker für die COX-1 Aktivität, respektive der TXA2 Konzentration dient (t0: 2039 ng/ml \pm 872 ng/ml vs. t10: 1324 ng/ml \pm 586 ng/ml, p=0,0455) (Abb. 14f).

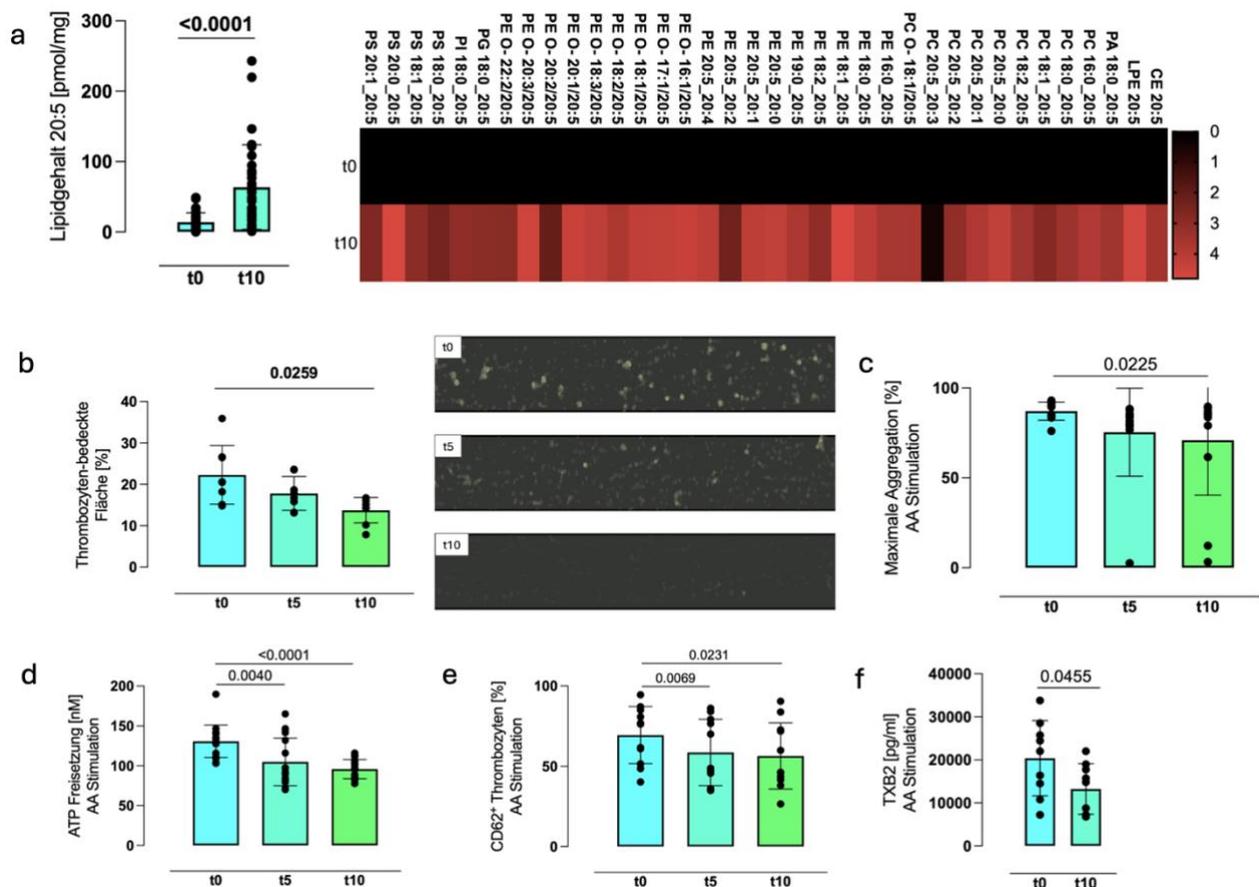


Abb. 14: Thrombozytenreaktivität unter peroraler IPE- Supplementierung t0= vor IPE- Supplementierung, t10= 10 Tage nach Beginn der IPE- Supplementierung a) Nach 10 Tagen IPE- Supplementierung zeigte sich die Menge an 20:5- haltigen Lipiden in der Thrombozytenmembran signifikant erhöht (Wilcoxon-Test, $p < 0,0001$; $n = 29$), wie auch in der rechts neben dem Graphen dargestellten *Heatmap* erkennbar, die die Konzentrationsänderung zwischen t0 und t10 der 20:5- haltigen Lipide zeigt. b) Die Thrombozytenadhäsion an einer kollagenbeschichteten Flusskammer war nach IPE- Supplementierung reduziert (ANOVA, $p = 0,0259$; Dunnett`s Test: t0 vs. t10: $p = 0,0425$, $n = 4$). Rechts daneben dargestellt eine repräsentative Abbildung der Flusskammer. c) Die durch AA induzierte Thrombozytenaggregation war nach IPE- Supplementierung gehemmt (*Mixed-Effects*- Analyse, $p = 0,0225$; Dunnett`s Test: t0 vs. t5: $p = 0,0039$; t0 vs. t10: $p = 0,0141$; $n = 7$). d) Die ATP-Freisetzung nach AA Stimulation aus Thrombozyten war nach IPE-Supplementierung reduziert (Friedman-Test, $p = 0,0001$; Dunnett`s Test: t0 vs. t5: $p = 0,0040$; t0 vs. t10: $p = 0,0002$; $n = 12$). e) Die AA-induzierte P- Selektin- Expression wurde durch IPE- Supplementierung signifikant gehemmt (Friedman-

Test, $p=0,0038$; Dunnetts's Test: t_0 vs. t_5 : $p=0,0069$; t_0 vs. t_{10} : $p=0,0231$; $n=9$). f) Die TXB₂-Freisetzung nach Stimulation der Thrombozyten mit AA (gepaarter t-Test, $p=0,0455$; $n = 9$) war nach 10 Tagen IPE-Supplementierung reduziert.

4. Diskussion

Mit den gezeigten Daten konnt ein dosisabhängiger, antithrombotischer Effekt von EPA nachgewiesen werden, der möglicherweise zur Erklärung der teils widersprüchlichen Ergebnisse der RCTs zur kardiovaskulären Wirksamkeit von ω -3-PUFAs beiträgt. Die Ergebnisse zeigen, dass EPA die Bildung arterieller Thromben *in vivo* reduziert, die Thrombozytenreaktivität *ex vivo* und *in vitro* signifikant hemmt, relevante Signalwege der Thrombozytenmodulation beeinflusst und eine direkte, kompetitive Interaktion mit AA auf der Ebene der COX- 1 eingeht.

4.1. Plasmakonzentrationsabhängige Wirksamkeit von EPA in klinischen Studien

Mehrere RCTs zur ω -3- PUFA- Supplementierung zeigten inkonsistente Ergebnisse hinsichtlich der kardiovaskulären Endpunktreduktion. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Studien besteht in den erreichten EPA- Plasmakonzentrationen. Während REDUCE-IT (4 g IPE täglich) eine signifikante Senkung des relativen Risikos kardiovaskulärer Ereignisse um 25 % dokumentierte, konnten Studien mit niedrigeren EPA- Plasmaspiegeln, wie ASCEND, VITAL, OMEMI oder STRENGTH, keine signifikanten Effekte nachweisen⁵²⁻⁵⁶. Die gezeigten *in vitro* Ergebnisse legen nahe, dass EPA Konzentrationen von 250 μ M nur eine geringe hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaktivität ausüben, während Konzentrationen von ≥ 500 μ M zu einer deutlichen Reduktion der Thrombozytenaggregation führten. Diese Beobachtung stimmt mit den in REDUCE-IT (mittlerer EPA-Plasmaspiegel: 476 μ M), JELIS (558 μ M) und RESPECT-EPA (464 μ M) erreichten Werten überein, sowie auch mit einer hier erreichten relevanten Risikoreduktion⁵⁶⁻⁵⁷. Im Gegensatz dazu lagen die errechneten EPA- Plasmaspiegel in STRENGTH (296 μ M), VITAL (~ 75 μ M) und ASCEND (~ 85 μ M) deutlich niedriger, was eine unzureichende Hemmung der Thrombozytenaktivierung erklären könnte^{53,54,79}. Diese Daten legen nahe, dass eine wirksame Reduktion der Thrombozytenreaktivität erst bei ausreichend hohen EPA-

Spiegeln eintritt und somit die Dosierung der ω -3- PUFA entscheidend für den klinischen Nutzen ist.

4.2. Einfluss des EPA/ DHA Gehalts der Präparate auf die kardiovaskuläre Wirksamkeit

Neben der Dosierung könnte auch die Zusammensetzung der ω -3- PUFA Präparate eine Rolle spielen. Während REDUCE-IT ausschließlich hochdosiertes IPE enthielt, wurden in STRENGTH und anderen Studien Mischpräparate aus EPA und DHA verwendet. DHA weist strukturelle Ähnlichkeiten mit EPA auf, unterscheidet sich jedoch in seiner metabolischen Verarbeitung und biologischen Wirkung⁸⁰. Insbesondere hemmt DHA die COX-1 in deutlich geringerem Maße als EPA⁸¹ und zeigt eine geringere kompetitive Verdrängung von AA⁸². Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum Studien mit EPA/ DHA-Kombinationen weniger eindeutige Ergebnisse lieferten. Zudem deuten nunmehr Studien darauf hin, dass EPA und DHA unterschiedliche biologische Zielstrukturen und Wirkmechanismen aufweisen. Während EPA bevorzugt auf vaskuläre Strukturen zu wirken scheint, übernimmt DHA insbesondere im zentralen Nervensystem neuroprotektive Funktionen^{83,84}. Eine direkte Vergleichsstudie zwischen hochdosiertem EPA und einer EPA/ DHA-Kombination könnte helfen, den spezifischen Beitrag von DHA im Kontrast zu EPA zur kardiovaskulären Prävention besser zu verstehen und durch zielgerichteten Einsatz der einzelnen Präparate unter Berücksichtigung der Wirkprofile, das *Outcome* der Patienten weiter zu verbessern.

4.3. Hemmung der COX- 1 und kompetitiver Wirkmechanismus zwischen EPA und ASA

Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die TXA2 Bildung sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* durch EPA signifikant gehemmt wurde. TXA2 ist ein zentraler Mediator der Thrombozytenaktivierung und spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese arterieller Thrombosen⁸⁵. Da TXA2 über die COX- 1 synthetisiert wird, ist die kompetitive Verdrängung von AA durch EPA ein plausibler Mechanismus für die antithrombotische Wirkung. Dies wurde durch die hier dargestellten experimentellen Ergebnisse bestätigt, die zeigten, dass EPA direkt an der aktiven Bindungsstelle der

COX- 1 interagiert und dadurch die TXA₂- Synthese sowie die nachfolgende Thrombozytenaktivierung hemmt. Interessanterweise konnte kein zusätzlicher antithrombotischer Effekt von EPA bei Mäusen nachgewiesen werden, die bereits mit ASA vorbehandelt wurden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass EPA nach vollständiger irreversibler Blockade der COX keinen Effekt mehr ausübt. Dennoch könnte die längere Plasmahalbwertszeit von EPA im Vergleich zu ASA, etwa 80 Stunden im *Steady-State* gegenüber nur 20 Minuten für ASA^{86,87}, eine klinisch relevante Ergänzung zur etablierten ASA Therapie darstellen. Hier ist insbesondere das Phänomen der *high- on- treatment- platelet- reactivity* zu nennen, das bei bis zu 30% der Patienten unter ASA Therapie zu beobachten ist und mit einer erhöhten Rate thrombotischer Ereignisse assoziiert ist⁸⁸. Ursachen für diese Abschwächung der ASA Wirkung sind beispielsweise Diabetes mellitus, chronische Inflammation und Adipositas, welche mit einem gesteigerten Thrombozytenumsatz einhergehen. Ebenso sind eine unzureichende enterale Bioverfügbarkeit, genetische Polymorphismen oder Arzneimittelinteraktionen möglich, wodurch es zu einer interindividuell variablen kardioprotektiven Wirkung kommen kann⁸⁹. Hier könnte EPA einen therapeutischen Zusatznutzen bieten, da es eine kontinuierliche Modulation der Thrombozytenfunktion ermöglicht, welche auch bei Einnahmefehlern eine konstante Wirkung zeigen kann.

4.4. Sicherheitsprofil von EPA: Blutungsrisiko und COX- 1 Hemmung

Ein klinisch besonders relevanter Aspekt der IPE- Therapie ist das potenzielle Blutungsrisiko. In der REDUCE-IT-Studie zeigte sich die Rate an geringfügigen Blutungen numerisch, jedoch nicht statistisch signifikant erhöht, während schwere Blutungen nicht häufiger auftraten als unter Placebo⁵². Dies könnte mit der spezifischen Hemmung der COX-1 durch EPA zusammenhängen. Während ASA, wie bereits beschrieben, eine vollständige und irreversible Hemmung der TXA₂ Synthese bewirkt, die über die gesamte Lebensdauer der Thrombozyten anhält⁹⁰, führt EPA zu einer kompetitiven, dosisabhängigen, aber reversiblen Reduktion der TXA₂ Produktion. Diese Unterschiede im Wirkmechanismus könnten erklären, warum EPA in klinischen Studien mit einer geringeren Blutungsrate assoziiert war als klassische Thrombozytenaggregationshemmer wie ASA oder P2Y₁₂-Inhibitoren^{91,92}. Dennoch sind weitere Untersuchungen erforderlich, um das Sicherheitsprofil von IPE

insbesondere bei Patienten mit bereits erhöhtem Blutungsrisiko, etwa unter oraler Antikoagulation oder mit beispielsweise zerebrovaskulären Vorschäden, genauer zu evaluieren.

4.5. Kardioprotektive Wirkung von EPA durch Thrombozytenmodulation

Die in dieser Arbeit gewonnenen experimentellen Daten belegen erste klinischen Beobachtungen zum Effekt von EPA in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse. In einer Studie zur frühzeitigen Gabe von EPA nach perkutaner Koronarintervention (PCI) bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigte sich eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse, obwohl keine Veränderung der Triglyceridspiegel beobachtet wurde⁹³. Dies legt nahe, dass der protektive Effekt von EPA primär durch eine Modulation der Thrombozytenfunktion und nicht durch eine Senkung der Triglyceridwerte vermittelt wird. Diese Hypothese wird durch die Subgruppenanalyse der JELIS- Studie gestützt, in der EPA auch bei Patienten mit bereits niedrigen Blutfettwerten signifikante kardiovaskuläre Vorteile zeigte⁵⁶. Die Ergebnisse der REDUCE-IT-Studie belegen, dass eine tägliche Supplementierung mit 4 g IPE das relative Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse senkt. Bemerkenswert ist auch hier, dass dieser Vorteil unabhängig von den Lipidparametern war, was darauf hindeutet, dass EPA über pleiotrope Mechanismen wirkt. Diese umfassen die Hemmung der Thrombozytenaggregation und entzündungsmodulatorische Effekte⁵².

4.6. Klinische Implikationen: EPA in der kardiovaskulären Prävention

Die zunehmende Evidenz für die kardioprotektive Wirkung von EPA wirft die Frage auf, wie dieses ω -3- Fettsäure- Derivat optimal in bestehende Präventions- und Behandlungsstrategien integriert werden kann. Besonders Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko, bestehender Atherosklerose oder Hypertriglyzeridämie könnten von einer gezielten EPA- Supplementierung profitieren. Neben REDUCE-IT konnten auch RESPECT-EPA und JELIS eine signifikante kardiovaskuläre Risikoreduktion unter EPA nachweisen, selbst bei Patienten mit gut kontrollierten LDL- Werten⁵²⁻⁵⁷. Es kann spekuliert werden, dass auch Patienten unabhängig von einer

Hypertriglyceridämie von einer EPA Supplementierung profitieren könnten. Dies muss jedoch durch weitere klinische Studien evaluiert werden, um Indikationen und Kriterien für eine Supplementierung zu definieren. Insbesondere Patienten mit Diabetes mellitus, die ein erhöhtes thrombotisches Risiko aufweisen, sowie Patienten nach akutem Koronarsyndrom könnten von einer EPA- Therapie profitieren. Erste experimentelle und klinische Daten deuten darauf hin, dass EPA möglicherweise die Plaque- Stabilität verbessert und entzündliche Prozesse in der Atherosklerose moduliert, wodurch es eine ergänzende Wirkung zur LDL- Senkung durch Statine entfalten könnte, welche insbesondere auch durch die Wirkung auf die Thrombozyten im Plaque selbst hervorgerufen werden kann^{94,95}. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass EPA die Endothelfunktion verbessert, oxidativen Stress reduziert und somit das Risiko für vaskuläre Komplikationen weiter senken könnte. Insbesondere sind so Mechanismen im Fokus, die in der Pathogenese des Diabetes eine zentrale Rolle spielen und deren Dysfunktionalität durch EPA verbessert werden kann⁹⁶.

4.7. Patientenselektion, Kombinationstherapien und optimale Dosierung

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse bleibt die Frage nach dem optimalen Einsatz von EPA in der klinischen Praxis offen. Ein zentrales Thema ist die Selektion geeigneter Patientengruppen, da nicht alle kardiovaskulären Hochrisikopatienten gleichermaßen von EPA zu profitieren scheinen. Während die positiven Effekte bei Patienten mit Hypertriglyceridämie, bestehender Atherosklerose oder Diabetes mellitus gut dokumentiert sind, fehlen derzeit belastbare Daten zur Wirksamkeit in anderen Populationen, wie beispielsweise Patienten mit normwertigen Blutfettwerten oder mit chronischem Koronarsyndrom⁹⁷. Ein weiteres relevantes Thema ist die Interaktion mit anderen antithrombotischen Therapien, insbesondere mit ASA und P2Y12-Inhibitoren. Dies legt nahe, dass EPA vor allem in Kombination mit Statinen und möglicherweise neuen lipidsenkenden Substanzen wie PCSK9- Inhibitoren oder Bempedoinsäure sinnvoll sein könnte, während die additive Wirkung in der dualen Thrombozytenhemmung noch genauer untersucht werden muss. Auch steht zur Diskussion, ob eine EPA- Supplementierung mit einer erhöhte Inzidenz von Vorhofflimmern korreliert. Es zeigt sich in einer Metaanalyse unter Zusammenschau von sieben Studien (VITAL⁹⁸, ASCEND⁵³, STRENGTH⁷⁹, Risk Prevention Study⁹⁹, REDUCE-IT⁵², GISSI-HF¹⁰⁰, OMEMI⁵⁵) eine Steigerung des Gesamtrisiko für die

Entwicklung von Vorhofflimmern um 1,25 (Hazard Ratio)¹⁰¹. Ebenso finden sich jedoch Daten, die diese Aussage widerlegen, respektive zeigen, dass eine Supplementierung EPAs keine Änderung der Inzidenz von Vorhofflimmern bewirkt¹⁰². Bei uneindeutiger Datenlage sind somit weitere Studien zur Risikoeinschätzung erforderlich. Klinisch kann eine Risiko- Stratifizierung anhand CHARGE- AF oder C₂HES₂-Score vor Therapieeinleitung empfohlen werden^{103,104}. Zusätzlich zur Nutzen- Risiko- Abwägung müssen noch offene Fragen zur optimalen Dosierung und Formulierung geklärt werden. So könnte eine Kombination EPAs mit leitliniengerechter Antikoagulation zu einem weiteren Anstieg des Blutungsrisikos führen.

Der Unterschied in den Ergebnissen von Studien mit reinem IPE (REDUCE-IT) im Vergleich zu Mischpräparaten mit DHA (STRENGTH) deutet darauf hin, dass hier auch die Wahl der ω -3- Fettsäure entscheidend für den klinischen Nutzen ist^{52,79}. Neben einer direkte Vergleichsstudie zwischen hochdosiertem EPA und einer EPA/ DHA-Kombination, wäre somit auch ein Vergleich zwischen Patientenkollektiven unterschiedlichen Risikoprofils notwendig, um den spezifischen Beitrag von EPA, respektive EPA/ DHA zur kardiovaskulären Prävention besser einordnen zu können. Zukünftige Studien sollten sich daher gezielt auf den klinischen Nutzen von EPA in Kombination mit modernen Präventionsstrategien konzentrieren, um klare Therapieempfehlungen für den Einsatz im klinischen Alltag zu ermöglichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit eine mechanistische Erklärung für die beobachtete kardiovaskuläre Risikoreduktion unter EPA- und IPE- Supplementierung. Der antithrombotische Effekt ist dosisabhängig, wobei Plasmaspiegel über 500 μ M erforderlich zu sein scheinen, um eine klinisch relevante Hemmung der Thrombozytenfunktion zu erreichen. Die kompetitive COX- 1 Hemmung durch EPA, die Modulation der Thrombozytenlipidzusammensetzung und die Hemmung spezifischer Signalwege tragen wesentlich zu diesem Effekt bei. Unterschiedliche Ergebnisse in RCTs lassen sich vermutlich durch Variationen in der Dosierung, der Plasmakonzentration und der Zusammensetzung der ω -3- PUFA-Präparate erklären. Die längere Plasmahalbwertszeit von EPA könnte zudem ein Vorteil gegenüber ASA sein und in bestimmten klinischen Situationen eine sinnvolle Ergänzung darstellen. Weitere Studien sind erforderlich, um den optimalen Einsatz von EPA in der kardiovaskulären Prävention und Therapie zu definieren, insbesondere in Kombination mit bestehenden antithrombotischen Strategien.

5. Schlussfolgerung

Neben den bekannten Wirkungen von EPA auf entzündliche Prozesse und den Lipidstoffwechsel konnte mit dieser Arbeit ein zusätzlicher antithrombotischer Effekt nachgewiesen werden. Die Supplementierung mit ω -3-PUFAs in Form von IPE führt zu einer direkten, kompetitiven Interaktion von EPA mit AA auf der Ebene der COX-1. Dies resultiert in einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenfunktion und einer verminderten Bildung arterieller Thromben. Die dosisabhängige Hemmung der Thrombozytenaktivität durch ω -3-PUFAa lässt sich auf deren direkte Wirkung auf die COX-1 zurückführen. Diese Mechanismen könnten teilweise die heterogenen Studienergebnisse erklären, die durch den Einsatz unterschiedlicher ω -3-PUFA Präparate bedingt sind.

Literaturverzeichnis

1. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study [published correction appears in *J Am Coll Cardiol.* 2021 Apr 20;77(15):1958-1959. doi: 10.1016/j.jacc.2021.02.039.]. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76(25):2982-3021. doi:10.1016/j.jacc.2020.11.010
2. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association [published correction appears in *Circulation.* 2020 Jan 14;141(2):e33. doi: 10.1161/CIR.0000000000000746.]. *Circulation.* 2019;139(10):e56-e528. doi:10.1161/CIR.0000000000000659
3. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med.* 2013;368(21):2004-2013. doi:10.1056/NEJMra1216063
4. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(23):2129-2138. doi:10.1016/j.jacc.2009.09.009
5. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res.* 2018;122(2):337-351. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310795
6. Mackman N, Bergmeier W, Stouffer GA, Weitz JI. Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(5):333-352. doi:10.1038/s41573-020-0061-0
7. Levental KR, Malmberg E, Symons JL, et al. Lipidomic and biophysical homeostasis of mammalian membranes counteracts dietary lipid perturbations to maintain cellular fitness. *Nat Commun.* 2020;11(1):1339. Published 2020 Mar 12. doi:10.1038/s41467-020-15203-1
8. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:395-424. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.395
9. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007;109(12):5087-5095. doi:10.1182/blood-2006-12-027698
10. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8(11):1227-1234. doi:10.1038/nm1102-1227

11. Monroe DM, Hoffman M. The coagulation cascade in cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2009;13(1):1-9. doi:10.1016/j.cld.2008.09.014
- 12 Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for?. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1504-1514. doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00298.x
13. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):1015-1022. doi:10.1161/01.ATV.0000130465.23430.74
14. Gremmel T, Frelinger AL 3rd, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2024;50(8):1173-1186. doi:10.1055/s-0044-1786387
15. Machlus KR, Italiano JE Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol.* 2013;201(6):785-796. doi:10.1083/jcb.201304054
16. Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(210):3-22. doi:10.1007/978-3-642-29423-5_1
17. Bodrova VV, Shustova ON, Khaspekova SG, Mazurov AV. Laboratory Markers of Platelet Production and Turnover. *Biochemistry (Mosc).* 2023;88(Suppl 1):S39-S51. doi:10.1134/S0006297923140031
18. Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):264-274. doi:10.1038/nri2956
19. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2007;100(1):27-40. doi:10.1161/01.RES.0000252802.25497.b7
20. Everts PA, Lana JF, Alexander RW, et al. Profound Properties of Protein-Rich, Platelet-Rich Plasma Matrices as Novel, Multi-Purpose Biological Platforms in Tissue Repair, Regeneration, and Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2024;25(14):7914. Published 2024 Jul 19. doi:10.3390/ijms25147914
21. Whiteheart SW. Platelet granules: surprise packages. *Blood.* 2011;118(5):1190-1191. doi:10.1182/blood-2011-06-359836
22. Ruggeri ZM. Platelet adhesion under flow. *Microcirculation.* 2009;16(1):58-83. doi:10.1080/10739680802651477
23. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3378-3384. doi:10.1172/JCI27196
24. Heijnen HF, Debili N, Vainchencker W, Breton-Gorius J, Geuze HJ, Sixma JJ. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood.* 1998;91(7):2313-2325.

25. Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annu Rev Med.* 1979;30:119-134. doi:10.1146/annurev.me.30.020179.001003
26. Gachet C, Hechler B. The platelet P2 receptors in thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(2):162-167. doi:10.1055/s-2005-869521
27. Mahaut-Smith MP, Jones S, Evans RJ. The P2X1 receptor and platelet function. *Purinergic Signal.* 2011;7(3):341-356. doi:10.1007/s11302-011-9224-0
28. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009;7(7):1057-1066. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x
29. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2341-2349. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207522
30. Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J. Platelet activation. *Blood Rev.* 1995;9(3):143-156. doi:10.1016/0268-960x(95)90020-9
31. Cosemans JM, Angelillo-Scherrer A, Mattheij NJ, Heemskerk JW. The effects of arterial flow on platelet activation, thrombus growth, and stabilization. *Cardiovasc Res.* 2013;99(2):342-352. doi:10.1093/cvr/cvt110
32. Davlouros P, Xanthopoulou I, Mparampoutis N, Giannopoulos G, Deftereos S, Alexopoulos D. Role of Calcium in Platelet Activation: Novel Insights and Pharmacological Implications. *Med Chem.* 2016;12(2):131-138. doi:10.2174/157340641202160208195923
33. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 2010;327(5961):46-50. doi:10.1126/science.1174621
34. Han X, Gross RW. Shotgun lipidomics: multidimensional MS analysis of cellular lipidomes. *Expert Rev Proteomics.* 2005;2(2):253-264. doi:10.1586/14789450.2.2.253
35. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids.* 2001;36(9):1007-1024. doi:10.1007/s11745-001-0812-7
36. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(4):469-484. doi:10.1016/j.bbailip.2014.08.010
37. Calder PC. Eicosanoids. *Essays Biochem.* 2020;64(3):423-441. doi:10.1042/EBC20190083
38. Wassall SR, Stillwell W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(1):24-32. doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.011

39. Sherratt SCR, Juliano RA, Copland C, Bhatt DL, Libby P, Mason RP. EPA and DHA containing phospholipids have contrasting effects on membrane structure. *J Lipid Res.* 2021;62:100106. doi:10.1016/j.jlcr.2021.100106
40. Bhatt DL, Steg PG, Miller M, et al. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med.* 2019;380(1):11-22. doi:10.1056/NEJMoa1812792
41. Mason RP, Libby P, Bhatt DL. Emerging Mechanisms of Cardiovascular Protection for the Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(5):1135-1147. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313286
42. Backes J, Anzalone D, Hilleman D, Catini J. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis.* 2016;15(1):118. Published 2016 Jul 22. doi:10.1186/s12944-016-0286-4
43. Rustan AC, Nossen JO, Christiansen EN, Drevon CA. Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme A:1,2-diacylglycerol acyltransferase. *J Lipid Res.* 1988;29(11):1417-1426.
44. Jump DB. Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14(2):115-120. doi:10.1097/MCO.0b013e328342991c
45. Rustan AC, Nossen JO, Christiansen EN, Drevon CA. Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme A:1,2-diacylglycerol acyltransferase. *J Lipid Res.* 1988;29(11):1417-1426.
46. Backes J, Anzalone D, Hilleman D, Catini J. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis.* 2016;15(1):118. Published 2016 Jul 22. doi:10.1186/s12944-016-0286-4
47. Borén J, Packard CJ, Taskinen MR. The Roles of ApoC-III on the Metabolism of Triglyceride-Rich Lipoproteins in Humans. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:474. Published 2020 Jul 28. doi:10.3389/fendo.2020.00474
48. Fredman G, Serhan CN. Specialized pro-resolving mediators in vascular inflammation and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2024;21(11):808-823. doi:10.1038/s41569-023-00984-x
49. Watanabe Y, Tatsuno I. Prevention of Cardiovascular Events with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Mechanism Involved. *J Atheroscler Thromb.* 2020;27(3):183-198. doi:10.5551/jat.50658
50. Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(20):2047-2067. doi:10.1016/j.jacc.2011.06.063

51. Mozaffarian D, Lemaitre RN, King IB, et al. Plasma phospholipid long-chain ω -3 fatty acids and total and cause-specific mortality in older adults: a cohort study. *Ann Intern Med.* 2013;158(7):515-525. doi:10.7326/0003-4819-158-7-201304020-00003
52. Bhatt DL, Steg PG, Miller M, et al. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med.* 2019;380(1):11-22. doi:10.1056/NEJMoa1812792
53. ASCEND Study Collaborative Group, Bowman L, Mafham M, et al. Effects of n-3 Fatty Acid Supplements in Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 2018;379(16):1540-1550. doi:10.1056/NEJMoa1804989
54. Manson JE, Cook NR, Lee IM, et al. Marine n-3 Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *N Engl J Med.* 2019;380(1):23-32. doi:10.1056/NEJMoa1811403
55. Kalstad AA, Myhre PL, Laake K, et al. Effects of n-3 Fatty Acid Supplements in Elderly Patients After Myocardial Infarction: A Randomized, Controlled Trial. *Circulation.* 2021;143(6):528-539. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052209
56. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis [published correction appears in Lancet. 2007 Jul 21;370(9583):220]. *Lancet.* 2007;369(9567):1090-1098. doi:10.1016/S0140-6736(07)60527-3
57. Miyauchi K, Iwata H, Nishizaki Y, et al. Randomized Trial for Evaluation in Secondary Prevention Efficacy of Combination Therapy-Statin and Eicosapentaenoic Acid (RESPECT-EPA). *Circulation.* 2024;150(6):425-434. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.123.065520
58. Abdelhamid AS, Brown TJ, Brainard JS, et al. Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;3(3):CD003177. Published 2020 Feb 29. doi:10.1002/14651858.CD003177.pub5
59. Bhatt DL, Steg PG, Miller M, et al. Reduction in First and Total Ischemic Events With Icosapent Ethyl Across Baseline Triglyceride Tertiles. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(8):1159-1161. doi:10.1016/j.jacc.2019.06.043
60. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis [published correction appears in Lancet. 2007 Jul 21;370(9583):220]. *Lancet.* 2007;369(9567):1090-1098. doi:10.1016/S0140-6736(07)60527-3

61. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol.* 1991;68(7):11B-15B. doi:10.1016/0002-9149(91)90379-y
62. Rocca B, Patrono C. Determinants of the interindividual variability in response to antiplatelet drugs. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1597-1602. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01380.x
63. Liu Y, Jennings NL, Dart AM, Du XJ. Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail bleeding assay in mice. *World J Exp Med.* 2012;2(2):30-36. Published 2012 Apr 20. doi:10.5493/wjem.v2.i2.30
64. Ferrière S, Peyron I, Christophe OD, et al. A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood.* 2020;136(6):740-748. doi:10.1182/blood.2019004334
65. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-675. doi:10.1038/nmeth.2089
66. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc.* 2016;11(5):905-919. doi:10.1038/nprot.2016.051
67. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455-461. doi:10.1002/jcc.21334
68. Rimon G, Sidhu RS, Lauver DA, et al. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(1):28-33. doi:10.1073/pnas.0909765106
69. Malkowski MG, Ginell SL, Smith WL, Garavito RM. The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science.* 2000;289(5486):1933-1937. doi:10.1126/science.289.5486.1933
70. BORN GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962;194:927-929. doi:10.1038/194927b0
71. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:133-148. Published 2015 Feb 18. doi:10.2147/VHRM.S44469
72. Erhardt JA, Pillarisetti K, Toomey JR. Potentiation of platelet activation through the stimulation of P2X1 receptors. *J Thromb Haemost.* 2003;1(12):2626-2635. doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00453.x

73. Cho JH, Wool GD, Tjota MY, Gutierrez J, Mikrut K, Miller JL. Functional Assessment of Platelet Dense Granule ATP Release. *Am J Clin Pathol*. 2021;155(6):863-872. doi:10.1093/ajcp/aqaa196
74. Wang L, Li Y, Guo R, et al. Optimized bioluminescence analysis of adenosine triphosphate (ATP) released by platelets and its application in the high throughput screening of platelet inhibitors. *PLoS One*. 2019;14(10):e0223096. Published 2019 Oct 10. doi:10.1371/journal.pone.0223096
75. Jayasinghe SN. Reimagining Flow Cytometric Cell Sorting. *Adv Biosyst*. 2020;4(8):e2000019. doi:10.1002/adbi.202000019
76. Assinger A, Volf I, Schmid D. A novel, rapid method to quantify intraplatelet calcium dynamics by ratiometric flow cytometry. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122527. Published 2015 Apr 7. doi:10.1371/journal.pone.0122527
77. Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep*. 2008;60(1):3-11.
78. Herzog R, Schwudke D, Schuhmann K, et al. A novel informatics concept for high-throughput shotgun lipidomics based on the molecular fragmentation query language. *Genome Biol*. 2011;12(1):R8. doi:10.1186/gb-2011-12-1-r8
79. Nicholls SJ, Lincoff AM, Garcia M, 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):2268-2280. doi:10.1001/jama.2020.22258
80. Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(20):2047-2067. doi:10.1016/j.jacc.2011.06.063
81. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):1751-1756. doi:10.1073/pnas.0334211100
82. Tull SP, Yates CM, Maskrey BH, et al. Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. *PLoS Biol*. 2009;7(8):e1000177. doi:10.1371/journal.pbio.1000177
83. Deckelbaum RJ, Calder PC. Editorial: Is it time to separate EPA from DHA when using omega-3 fatty acids to protect heart and brain?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2020;23(2):65-67. doi:10.1097/MCO.0000000000000632
84. Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci*. 2015;7:52. Published 2015 Apr 21. doi:10.3389/fnagi.2015.00052

85. Patrono C, Rocca B. The future of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Annu Rev Med*. 2010;61:49-61. doi:10.1146/annurev-med-020209-171035
86. Dovizio M, Bruno A, Tacconelli S, Patrignani P. Mode of action of aspirin as a chemopreventive agent. *Recent Results Cancer Res*. 2013;191:39-65. doi:10.1007/978-3-642-30331-9_3
87. Braeckman RA, Stirtan WG, Soni PN. Pharmacokinetics of Eicosapentaenoic Acid in Plasma and Red Blood Cells After Multiple Oral Dosing With Icosapent Ethyl in Healthy Subjects. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2014;3(2):101-108. doi:10.1002/cpdd.84
88. M'Pembele R, Ahlbrecht S, Helten C, et al. High On-Treatment Platelet Reactivity: Aspirin versus Clopidogrel. *Pharmacology*. 2023;108(1):83-89. doi:10.1159/000527816
89. Stolarek W, Kasprzak M, Sikora J, Siemińska E, Grzešek G. High on-treatment platelet reactivity to aspirin in patients after myocardial infarction. *Biomed Pharmacother*. 2022;147:112618. doi:10.1016/j.biopha.2022.112618
90. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A₂ as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol*. 1991;68(7):11B-15B. doi:10.1016/0002-9149(91)90379-y
91. Gaziano JM, Brotons C, Coppolecchia R, et al. Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2018;392(10152):1036-1046. doi:10.1016/S0140-6736(18)31924-X
92. Costa F, Montalto C, Branca M, et al. Dual antiplatelet therapy duration after percutaneous coronary intervention in high bleeding risk: a meta-analysis of randomized trials. *Eur Heart J*. 2023;44(11):954-968. doi:10.1093/eurheartj/ehac706
93. Nosaka K, Miyoshi T, Iwamoto M, et al. Early initiation of eicosapentaenoic acid and statin treatment is associated with better clinical outcomes than statin alone in patients with acute coronary syndromes: 1-year outcomes of a randomized controlled study. *Int J Cardiol*. 2017;228:173-179. doi:10.1016/j.ijcard.2016.11.105
94. Calder PC. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(7):1073-1080. doi:10.1002/mnfr.201100710
95. Cawood AL, Ding R, Napper FL, et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) from highly concentrated n-3 fatty acid ethyl esters is incorporated into advanced atherosclerotic plaques and higher plaque EPA is associated with decreased plaque inflammation and increased stability. *Atherosclerosis*. 2010;212(1):252-259. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.022

94. Sherratt SCR, Libby P, Dawoud H, Bhatt DL, Mason RP. Eicosapentaenoic Acid Improves Endothelial Nitric Oxide Bioavailability Via Changes in Protein Expression During Inflammation. *J Am Heart Assoc.* 2024;13(14):e034076. doi:10.1161/JAHA.123.034076
96. Bhat S, Sarkar S, Zaffar D, Dandona P, Kalyani RR. Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease and Diabetes: a Review of Recent Evidence. *Curr Cardiol Rep.* 2023;25(2):51-65. doi:10.1007/s11886-022-01831-0
97. Egalini F, Rossi M, Massussi M, et al. Eicosapentaenoic Acid: between Cardiovascular Benefits and the Risk of Atrial Fibrillation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2024;24(6):651-663. doi:10.2174/0118715303280825231122153024
98. Albert CM, Cook NR, Pester J, et al. Effect of Marine Omega-3 Fatty Acid and Vitamin D Supplementation on Incident Atrial Fibrillation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2021;325(11):1061-1073. doi:10.1001/jama.2021.1489.
99. Risk and Prevention Study Collaborative Group, Roncaglioni MC, Tombesi M, et al. n-3 fatty acids in patients with multiple cardiovascular risk factors [published correction appears in *N Engl J Med.* 2013 May 30;368(22):2146]. *N Engl J Med.* 2013;368(19):1800-1808. doi:10.1056/NEJMoa1205409
100. Aleksova A, Masson S, Maggioni AP, et al. n-3 polyunsaturated fatty acids and atrial fibrillation in patients with chronic heart failure: the GISSI-HF trial. *Eur J Heart Fail.* 2013;15(11):1289-1295. doi:10.1093/eurjhf/hft103
101. Gencer B, Djousse L, Al-Ramady OT, Cook NR, Manson JE, Albert CM. Effect of Long-Term Marine ω -3 Fatty Acids Supplementation on the Risk of Atrial Fibrillation in Randomized Controlled Trials of Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation.* 2021;144(25):1981-1990. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055654.
102. Albert CM, Cook NR, Pester J, et al. Effect of Marine Omega-3 Fatty Acid and Vitamin D Supplementation on Incident Atrial Fibrillation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2021;325(11):1061-1073. doi:10.1001/jama.2021.1489
103. Goudis C, Daios S, Dimitriadis F, Liu T. CHARGE-AF: A Useful Score For Atrial Fibrillation Prediction?. *Curr Cardiol Rev.* 2023;19(2):e010922208402. doi:10.2174/1573403X18666220901102557
104. Haybar H, Shirbandi K, Rahim F. C₂HEST score for atrial fibrillation risk prediction models: a Diagnostic Accuracy Tests meta-analysis. *Egypt Heart J.* 2021;73(1):104.

Published

2021

Dec

4.

doi:10.1186/s43044-021-00230-0.

