

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

**Interaktion freier Fettsäuren mit der Cyclooxygenase 1
und deren Einfluss auf die Hämostase in vitro**

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

vorgelegt von

Hannah Viktoria Foerster

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Tobias Zeus

Zweitgutachter: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock

*Ich widme diese Arbeit
meinem Ehemann Ramy,
unserer Tochter Philippa
und
unserer Familie.*

Publikationen:

- Mourikis P, Zako S, Dannenberg L, Nia AM, Heinen Y, Busch L, **Richter H**, Hohlfeld T, Zeus T, Kelm M, Polzin A. Lipid lowering therapy in cardiovascular disease: From myth to molecular reality. *Pharmacol Ther.* 2020 Sep;213:107592. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107592. Epub 2020 May 31. PMID: 32492513.
- Mourikis P, Dannenberg L, Zako S, Helten C, M'Pembele R, **Richter H**, Hohlfeld T, Jung C, Zeus T, Kelm M, Veulemans V, Polzin A. Impact of Transcatheter Aortic Valve Implantation on Thrombin Generation and Platelet Function. *Thromb Haemost.* 2021 Mar 23. doi: 10.1055/s-0041-1725190. Epub ahead of print. PMID: 33759144.
- Dannenberg L, M'Pembele R, Mourikis P, Helten C, Zako S, Ahlbrecht S, **Richter H**, Zikeli D, Benkhoff M, Huhn-Wientgen R, Thienel M, Levkau B, Kelm M, Petzold T, Polzin A. Rivaroxaban reduces thromboxane induced platelet aggregation - the forgotten Compass Arm? *Platelets.* 2021 Mar 31:1-3. doi: 10.1080/09537104.2021.1905159. Epub ahead of print. PMID: 33788669.

Teile dieser Doktorarbeit 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.

I. Zusammenfassung (deutsch)

Die Thrombozytenaggregation als Teil der Hämostase spielt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen.

Einige Studien konnten bereits positive Effekte bei der Nahrungsergänzung mit langkettigen, ungesättigten Fettsäuren („Fischölen“) nachweisen.

Die REDUCE-IT-Studie untersuchte die Auswirkungen der täglichen Einnahme von 4g Ethyl-Eicosapentaensäure (IPE) auf das kardiovaskuläre Risiko. Dabei zeigten sich weniger ischämische Ereignisse bei gleichzeitig vermehrter Blutungsneigung, weshalb ein Einfluss auf die Thrombozytenfunktion vermutet wird. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bisher dennoch unklar.

Diese Arbeit untersuchte den Einfluss der Fettsäuren IPE, EPA und DHA auf die Thrombozytenfunktion und Hämostase *in vitro*.

Dem Blut bzw. Plasma gesunder Probanden wurden EPA, IPE und DHA in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben.

Die Stimulation erfolgte mittels Arachidonsäure (ARA), Adenosindiphosphat (ADP) und Kollagen (Coll). Die Thrombozytenaggregation wurde mittels Lichttransmissions- (LTA) und Multielektrodenaggregometrie (MEA) quantifiziert.

In Abhängigkeit von der Fettsäurekonzentration konnte eine signifikante Hemmung nachgewiesen werden.

In der LTA zeigte sich unter ARA-Stimulation eine Reduktion des Aggregationsmaximums (MoA) um bis zu 66,9 % (EPA), 58,4 % (DHA) und 30,9 % (IPE). In der MEA bestätigte sich der hemmende Effekt mit einer Reduktion der Thrombozytenaggregation um bis zu 84,6 AU (DHA) und 30,2 AU (EPA). In Kombination mit Acetylsalicylsäure (ASS) zeigten EPA, DHA und IPE einen additiven hemmenden Effekt. TXB₂-ELISA-Analysen deuten auf eine verminderte COX1-vermittelte Thromboxanbildung hin. Langkettige, ungesättigte Fettsäuren hemmen somit die COX1-abhängige Thrombozytenaggregation *in vitro*. Dies erklärt teilweise die in klinischen Studien beobachtete Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse unter Omega-3-Fettsäure-Supplementierung bei gleichzeitig erhöhter Blutungsneigung. Die Ergebnisse unterstützen die Theorie einer COX1-vermittelten antithrombotischen Wirkung freier Fettsäuren mit potenzieller klinischer Relevanz für die Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen.

II. Zusammenfassung (englisch)

Platelet aggregation as part of hemostasis plays a key role in the pathophysiology of various cardiovascular diseases. Some studies have already demonstrated positive effects of dietary supplementation with long-chain unsaturated fatty acids (“fish oils”).

The REDUCE-IT study investigated the effects of daily intake of 4 g ethyl eicosapentaenoic acid (IPE) on cardiovascular risk. In this context, fewer ischemic events were observed, accompanied by an increased tendency to bleed, suggesting an influence on platelet function.

However, the underlying mechanism remains unclear.

This work investigated the influence of the fatty acids IPE, EPA, and DHA on platelet function and hemostasis *in vitro*. EPA, IPE, and DHA were added to the blood or plasma of healthy volunteers in different concentrations. Stimulation was performed using arachidonic acid (ARA), adenosine diphosphate (ADP), and collagen (Coll). Platelet aggregation was quantified by light transmission aggregometry (LTA) and multiple electrode aggregometry (MEA). Depending on the fatty acid concentration, a significant inhibition could be demonstrated.

In LTA, under ARA stimulation, a reduction of the maximum of aggregation (MoA) by up to 66.9% (EPA), 58.4% (DHA), and 30.9% (IPE) was observed. In MEA, the inhibitory effect was confirmed, showing a reduction in platelet aggregation of up to 84.6 AU (DHA) and 30.2 AU (EPA). In combination with acetylsalicylic acid (ASA), EPA, DHA, and IPE showed an additive inhibitory effect. TXB₂ ELISA analyses indicate a decreased COX-1–mediated thromboxane formation.

Thus, long-chain unsaturated fatty acids inhibit COX-1–dependent platelet aggregation *in vitro*.

This partly explains the reduction of cardiovascular events observed in clinical studies under omega-3 fatty acid supplementation, together with an increased bleeding tendency. The results support the theory of a COX-1–mediated anti-thrombotic effect of free fatty acids with potential clinical relevance for the prevention of cardiovascular diseases.

III. Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>arachidonic acid</i> / Arachidonsäure
abs.	absolut
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
ALA	<i>alpha-linolenic acid</i> / alpha-Linolensäure
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ARA	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
BD	Becton, Dickinson and Company
bzw.	beziehungsweise
CD62P	P-Selectin
Coll	Kollagen
COX-1/-2	Cyclooxygenase-1/-2
CT	<i>Clotting Time</i> / Gerinnungszeit
DHA	<i>docosahexaenoic acid</i> / Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPA	<i>eicosapentaenoic acid</i> / Eicosapentaensäure
EtOH	Ethanol
EVT	endovaskuläre Therapie
FFA	<i>free fatty acids</i> / freie Fettsäuren
GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa-Komplex
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IPE	<i>Icosapent-Ethyl</i> /Eicosapentaensäureethylester
KI	Konfidenzintervall
LA	<i>linoleic acid</i> / Linolsäure
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LOX	Lipoxygenase

LTA 4/5	Leukotrien A 4/5
LTB 4/5	Leukotrien B 4/5
LTC 4/5	Leukotrien C 4/5
LTD 4/5	Leukotrien D 4/5
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
MEA	Multielektrodenaggregometrie
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MoA	<i>Maximum of Aggregation/</i> Aggregationsmaximum [%]
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OCS	<i>open canalicular system/</i> offenes Kanalsystem
o. g.	oben genannt
PAP	Plättchenarmes Plasma
PG	Prostaglandin
PGE 2/3	Prostaglandin E 2/3
PGI 2/3	Prostaglandin I 2/3
PLC	Phospholipase C
PRP	Plättchenreiches Plasma
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids/</i> mehrfach ungesättigte Fettsäuren
rpm	<i>rounds per minute/</i> Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation/</i> Standardabweichung
Stlsg.	Stammlösung
TF	<i>Tissue Factor/</i> Gewebsthromboplastin
TM	Thrombozytenmedium
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXA ₃	Thromboxan A ₃
TXB ₂	Thromboxan B ₂
vWF	von-Willebrand-Faktor
ω-3/ ω-6	Omega-3/ Omega-6

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Arachidonsäure (ARA)	8
Abbildung 2: Strukturformel von Eicosapentaensäure (EPA).....	9
Abbildung 3: Strukturformel von Docosahexaensäure (DHA)	9
Abbildung 4: Strukturformel von Icosapent-Ethyl (IPE)	10
Abbildung 5: Stoffwechselwege der mehrfach ungesättigten ω -3- und ω -6-Fettsäuren	11
Abbildung 6: Metabolismus der mehrfach ungesättigten ω -3- und ω -6-Fettsäuren	12
Abbildung 7: Darstellung einer Aggregationskurve und der Ergebnisse der LTA mittels Apact 4004	23
Abbildung 8: Darstellung der Messergebnisse des Multiplate-Analyzers von Roche Deutschland Holding GmbH	27
Abbildung 9: Nachweis verschiedener Aktivierungswege	28
Abbildung 10: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von EPA in vier verschiedenen Konzentrationen	32
Abbildung 11: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von DHA in vier verschiedenen Konzentrationen	34
Abbildung 12: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von IPE in vier verschiedenen Konzentrationen	35
Abbildung 13: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von 1 mM EPA und nach Zugabe von 30 μ M ASS	38
Abbildung 14: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von DHA, DHA und EPA und nach Zugabe von 30 μ M ASS	43
Abbildung 15: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von 1 mM IPE und nach Zugabe von 30 μ M ASS	46
Abbildung 16: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von EPA in vier verschiedenen Konzentrationen	48
Abbildung 17: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von EPA in vier verschiedenen Konzentrationen	49
Abbildung 18: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von DHA in vier verschiedenen Konzentrationen	50

Abbildung 19: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von DHA in vier verschiedenen Konzentrationen	52
Abbildung 20: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von IPE in vier verschiedenen Konzentrationen	53
Abbildung 21: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von IPE in vier verschiedenen Konzentrationen	54
Abbildung 22: Ergebnisse des TXB ₂ -ELISA bei Zugabe von EPA in vier verschiedenen Konzentrationen	55
Abbildung 23: Ergebnisse des TXB ₂ -ELISA bei Zugabe von IPE in vier verschiedenen Konzentrationen	56
Abbildung 24: Ergebnisse des TXB ₂ -ELISA bei Zugabe von 1 mM EPA und nach Zugabe von 30 µM ASS	62
Abbildung 25: Ergebnisse des TXB ₂ -ELISA bei Zugabe von 1 mM IPE und nach Zugabe von 30 µM ASS	67

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialübersicht mit Herstellern	19
Tabelle 2: Übersicht der LTA-Versuchsansätze	26
Tabelle 3: Übersicht der Multielektrodenaggregometrie-Versuchsansätze	29

VI. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen und Bedeutung der Hämostase	1
1.1.1	Thrombozyten	1
1.1.2	Hämostase	1
1.1.3	Hemmung der primären Hämostase	5
1.1.4	Acetylsalicylsäure	6
1.2	Freie Fettsäuren	7
1.2.1	Arachidonsäure	7
1.2.2	Eicosapentaensäure	8
1.2.3	Docosahexaensäure	9
1.2.4	Eicosapentaensäureethylester	10
1.3	COX-vermittelter Fettsäurestoffwechsel	10
1.4	Effekte von Fettsäuren auf das kardiovaskuläre Risiko	12
1.5	Ziele der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Studiendesign	15
2.2	Proband*innenkollektiv	15
2.3	Material	16
2.3.1	Materialübersicht	16
2.3.2	Lösungen und Puffer	19
2.3.3	Fettsäure-Lösungen	21
2.3.4	Probengewinnung und -Aufbereitung	22
2.4	Methoden	23
2.4.1	Lichttransmissionsaggregometrie	23
2.4.2	Multielektrodenaggregometrie	26
2.4.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	29
2.5	Statistische Auswertung der Messergebnisse	30
3	Ergebnisse	31

3.1	Lichttransmissionsaggregometrie	31
3.1.1	Interaktionen mit Fettsäuren	31
3.1.2	Interaktionen mit ASS	36
3.2	Multielektrodenaggregometrie	46
3.2.1	Interaktionen mit Fettsäuren	46
3.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	54
3.3.1	TXB ₂ -Assay unter Interaktion mit Fettsäuren	54
3.3.2	TXB ₂ -Assay unter Interaktion mit ASS und Fettsäuren	56
4	Diskussion	68
4.1	Hauptergebnisse	68
4.2	Biochemie des Einflusses von FFA auf die Thrombozytenfunktion	79
4.3	Bedeutung von Fettsäuren für das kardiovaskuläre Risiko	81
4.4	Limitationen	83
4.5	Schlussfolgerung	85
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	86
6	Danksagung	90

1 Einleitung

1.1 Grundlagen und Bedeutung der Hämostase

1.1.1 Thrombozyten

Thrombozyten, auch als Blutplättchen bezeichnet, sind kleine, scheibenförmige und kernlose Zellfragmente im Blut mit einem Durchmesser von etwa 2 bis 4 Mikrometern.[1] Ihre Genese ist durch die Abspaltung von Zytoplasmaanteilen aus Megakaryozyten im Knochenmark bedingt, wobei der Prozess durch das Hormon Thrombopoetin gesteuert wird.[2]

Die mittlere Lebensdauer von Thrombozyten im zirkulierenden Blut beträgt etwa zehn Tage, bevor ein Abbau in der Milz und der Leber durch das retikuloendotheliale System erfolgt.[3] Die normale Konzentration im peripheren Blut liegt bei gesunden Erwachsenen zwischen 150.000 und 450.000 Thrombozyten pro Mikroliter, wobei die Zahl der Thrombozyten variieren kann.[4]

Die primäre Funktion von Thrombozyten besteht in der Blutstillung (Hämostase), wobei die Zellen zudem eine relevante Rolle in der Immunabwehr und bei Entzündungsprozessen spielen.[5]

Hierbei erfolgt die Identifizierung pathogener Mikroorganismen beispielsweise über sogenannte *Toll-like*-Rezeptoren, wobei nach Erkennung pathogener Organismen antimikrobielle Substanzen freigesetzt werden.[6] Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Thrombozyten nach ihrer Aktivierung proinflammatorische Mediatoren ausscheiden und somit aktiv zur Regulation immunologischer und inflammatorischer Reaktionen beitragen.[7]

Aus pathophysiologischer Sicht tragen Thrombozyten allerdings auch zur Bildung von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen bei, die eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen haben.[8]

1.1.2 Hämostase

Die Hämostase ist ein physiologischer Mechanismus zur Blutstillung, der in zwei Hauptabschnitte untergliedert wird: die primäre und die sekundäre Hämostase.[9] Die sekundäre Hämostase umfasst wiederum zwei wesentliche Sig-

Einleitung

nalkaskaden: das extrinsische und das intrinsische Gerinnungssystem.[10] Die Prozesse innerhalb der sekundären Hämostase laufen allerdings nach aktuellen Erkenntnissen nicht in einer linearen Abfolge, sondern in einer synchronen und interagierenden Weise ab.[11]

Das zellgebundene Modell nach Hoffman et al. (2001) wird in der aktuellen Forschung als die physiologisch plausibelste Darstellung des Zusammenspiels der zellulären und plasmatischen Hämostase betrachtet. Das wesentliche Ziel der Hämostase besteht darin, ein Gleichgewicht zwischen erhöhter Gerinnungsneigung (Hyperkoagulabilität) und gesteigerter Blutungsneigung (Hypokoagulabilität) herzustellen und damit die Blutgerinnung zu regulieren.[12]

Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase kann in drei zentrale Phasen unterteilt werden: die Initiation und Aktivierung (1), die Sekretion aus Granula mit Mediatorenfreisetzung (2) und die Thrombusbildung (3).

Die Initiation und Aktivierung (1) wird durch eine Schädigung des Endothels eingeleitet, bei der subendotheliales Kollagen freigelegt wird. Dieses Kollagen dient als Bindungspartner für den von-Willebrand-Faktor (vWF), der aus dem Blutplasma stammt.[13] Der vWF wiederum interagiert über den Glykoprotein(GP)-Ib-IX-V-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche mit dem freigelegten Kollagen.[14] Diese Bindung leitet sowohl die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßläsion als auch deren Aktivierung ein.

Ein weiterer Signalweg führt über die direkte Bindung von Kollagen an den Thrombozytenrezeptor GPVI, sowie das Integrin $\alpha 2\beta 1$, was zusätzlich zur Thrombozytenaktivierung beiträgt.[14] Zentral ist in der Folge die Aktivierung des Integrins $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa), das nach Konformationsänderung multiple Liganden, vor allem Fibrinogen, binden kann, was die Thrombozytenaggregation fördert.[15]

Einleitung

Die Aktivierung der Thrombozyten löst die nächste Phase der Sekretion von Mediatoren aus den Granula der Thrombozyten (2) aus. Hierbei werden zwei Formen der Granula frei: α -Granula und dense-Granula.

α -Granula enthalten eine Vielzahl bioaktiver Substanzen wie vWF, Gerinnungsfaktoren (II, V, XI, XIII), Fibronektin sowie das Adhäsionsmolekül p-Selektin (CD62P).[16, 17] Diese Stoffe werden durch Fusion der Granula mit dem offenen Kanalsystem (OCS) oder direkt mit der Zellmembran über SNARE-Proteine in den Extrazellarraum freigesetzt.[18, 19] Während vWF und Fibronektin zur Ausbildung und Stabilisierung des entstehenden Thrombus beitragen, wird CD62P in die Thrombozytenmembran eingebaut und verstärkt über die Bindung an entsprechende Rezeptoren die Aggregation sowie die Interaktion mit Fibrin.[20]

Die dense-Granula setzen hingegen niedermolekulare Aktivatoren wie Adenosindiphosphat (ADP), Kalzium und Serotonin frei.[21] Diese Mediatoren verstärken die Thrombozytenaktivierung zusätzlich. ADP bindet dabei an die purinergen Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂, was eine Signalverstärkung bewirkt.[22] Parallel wird über die Cyclooxygenase 1 (COX-1) Arachidonsäure zu Thromboxan A₂ (TXA₂) umgewandelt. Dabei handelt es sich sowohl um einen potenten autokrinen als auch parakrinen Aktivator der Thrombozytenaggregation.[23]

Daraufhin tritt die letzte Phase der primären Hämostase mit der Bildung eines thrombozytenreichen Thrombus (3) ein.

Aktiviert Thrombozyten verändern ihre Morphologie von der ursprünglichen scheibenförmigen Struktur in eine rundliche Form mit ausgeprägten Fortsätzen. [7] Diese Fortsätze werden Pseudopodien genannt und dienen der Vernetzung untereinander.[24] Über den GPIIb/IIIa-Komplex binden die Thrombozyten an Fibrinogen als Brückenmolekül und ermöglichen die Ausbildung stabiler Zell-Zell-Kontakte.[25] Hieraus entwickelt sich ein vorläufiger und instabiler weißer Thrombus, der das verletzte Endothel der Gefäßwand vorerst abdichtet.[26]

Sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase beschreibt die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade mit dem Ziel der Bildung eines Fibrinnetzwerks zur Stabilisierung des Thrombus aus der primären Hämostase. Dieser komplexe Prozess gliedert sich funktionell in zwei Startwege (extrinsischen und intrinsischen Prozess), die in einer gemeinsamen Endstrecke münden.[27]

Der extrinsische Weg beginnt nach Gefäßverletzung mit der Freisetzung von Gewebsthromboplastin (auch *Tissue Factor*, TF bzw. Faktor III) aus geschädigten Zellen. Dieser bindet an Faktor VII im Plasma und aktiviert ihn zu Faktor VIIa. Gemeinsam mit Phospholipiden und Kalziumionen bildet der Komplex aus TF und F VIIa ein aktives Enzym-System, das in der Lage ist, die Faktoren IX und X in ihre aktiven Formen IXa bzw. Xa zu überführen.[28] Faktor Xa katalysiert anschließend die Umwandlung von Prothrombin (Faktor II) in Thrombin (Faktor IIa). Thrombin spielt eine Schlüsselrolle im weiteren Verlauf der Gerinnung. Zum einen aktiviert Thrombin Fibrinogen (Faktor I) zu Fibrin (Faktor Ia), zum anderen werden auch die Faktoren XI, VIII und X aktiviert.[28, 29]

Der intrinsische Weg wird durch negativ geladene Oberflächen, wie beispielsweise freiliegendes Kollagen, ausgelöst. Hierbei wird mit Hilfe der Kofaktoren Präkallikrein und Kininogen der Faktor XII zu XIIa aktiviert. Der aktivierte Faktor XIIa fördert die eigene Verstärkung, indem er Präkallikrein zu Kallikrein umwandelt.[21] In der Folge wird der Faktor XI zu XIa aktiviert, der dann den Faktor IX in IXa überführt. Auch dieser Teil der Kaskade wird durch Thrombin verstärkt, das zusätzlich die Aktivierung von Faktor VIII übernimmt.[28]

Der aktivierte Faktor IXa bildet zusammen mit Faktor VIIIa, Phospholipiden und Kalziumionen den sogenannten intrinsischen Tenase-Komplex. Dieser ist besonders effizient in der Aktivierung von Faktor X zu Xa und leitet die gemeinsame Endstrecke der beiden Systeme ein.[29]

Beide Wege führen zur Bildung von Faktor Xa, welcher mit dem Kofaktor Va den Prothrombinase-Komplex bildet.[11] Dieser katalysiert die Umwandlung von Pro-

thrombin zu Thrombin. Thrombin spaltet anschließend Fibrinogen zu Fibrinmonomeren, die sich zu einem Fibrinnetzwerk zusammenlagern.[9]

Durch die Aktivierung von Faktor XIII wird das Fibrinnetzwerk zusätzlich quervernetzt, was die mechanische Stabilität des Thrombus deutlich erhöht.[30] In dieses Netzwerk können sich auch Erythrozyten einlagern, wodurch ein robuster und stabiler Thrombus (roter Thrombus) entsteht.[10, 30]

1.1.3 Hemmung der primären Hämostase

Die Hemmung der Thrombozytenaggregation (TAH) ist eine zentrale Säule in der antithrombotischen Therapie, insbesondere in der Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse. Zur therapeutischen Anwendung kommen verschiedene Wirkstoffklassen, die gezielt in die Signalwege der Thrombozytenaktivierung eingreifen. Hierbei können drei wesentliche Zielstrukturen und Mechanismen identifiziert werden: (1) Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1), (2) Blockade des ADP-Rezeptors (P2Y₁₂-Rezeptor), (3) Hemmung der Thrombozytenvernetzung über den GPIIb/IIIa-Rezeptor

Hemmung der Cyclooxygenase 1 (COX-1)

Eine Form der TAH ist die irreversible Hemmung der COX-1 durch Acetylsalicylsäure (ASS).[31] Die Eigenschaften und Wirkweise der Substanz werden weiterführend detailliert betrachtet und sind von fundamentaler Bedeutung für viele Therapieregime zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen.[32]

Die Hemmung der primären Hämostase durch ASS wird dabei vermittelt über die verminderte TXA₂-Synthese in Thrombozyten aus Arachidonsäure.[33]

Blockade des ADP-Rezeptors

ADP-Rezeptorblocker verhindern die Bindung von Adenosindiphosphat (ADP) an den P2Y₁₂-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche.[34] Dieser Rezeptor gehört zur Gruppe der G_i-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR).[35] Nach Aktivierung hemmt er die intrazelluläre cAMP-Produktion, was eine Verstärkung der Thrombozytenaktivierung zur Folge hat.[36] Pharmakologisch eingesetzte Antagonisten sind zum Beispiel Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor und Cangrelor.

Hemmung der Thrombozytenvernetzung

Eine weitere Wirkstoffklasse richtet sich gegen den Glykoprotein-Komplex GpIIb/IIIa, der für die Fibrinogen-vermittelte Quervernetzung aktivierter Thrombozyten verantwortlich ist. Eine Inhibition kann zum Beispiel mittels Abciximab (ein monoklonaler Antikörper) oder Tirofiban erfolgen. Aufgrund ihres Potenzials für eine starke Hemmung der sekundären Hämostase werden sie selektiv bei Hochrisikokonstellationen wie der perkutanen Koronarintervention (PCI) eingesetzt.[37]

1.1.4 Acetylsalicylsäure

Die Acetylsalicylsäure (ASS) ist eine chemische Verbindung, die auf die Salicylsäure zurückzuführen ist, welche erstmals im Jahr 1838 aus der Weidenrinde extrahiert wurde.[38] Dieser Naturstoff wird seit der Antike aufgrund seiner schmerzlindernden und fiebersenkenden Eigenschaften geschätzt. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts gelang es der Firma Bayer, durch chemische Modifikation der Salicylsäure deren acetylierte Form – die heute gebräuchliche ASS – zu synthetisieren.[39]

Die pharmakologische Wirkung von ASS beruht auf der irreversiblen Hemmung des Enzyms COX-1.[40] Dieser Prozess wird durch Acetylierung eines zentralen Serinrests (Position 530) induziert, was die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandin H₂ blockiert.[41] Da dieses Zwischenprodukt eine Vorstufe des prothrombotisch wirkenden Thromboxan A₂ (TXA₂) ist, führt die COX-1-Hemmung zu einer reduzierten Thrombozytenaktivierung.[42]

Aufgrund seiner blutgerinnungshemmenden Eigenschaften findet ASS in der klinischen Praxis eine breite Anwendung. So wird es sowohl in niedriger oraler Dosierung (100 mg täglich) zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse bei kardiovaskulären Risikopatienten als auch in höherer intravenöser Dosierung als Bestandteil der Akuttherapie beim akuten Koronarsyndrom eingesetzt.[43]

1.2 Freie Fettsäuren

Freie Fettsäuren (FFA) fungieren im menschlichen Organismus als Metabolite, die eine Vielzahl von physiologischen Funktionen übernehmen. FFA werden besonders an der Schnittstelle zwischen Energiestoffwechsel, Immunantwort und Entzündungsregulation vermutet. Nach aktuellem Wissensstand scheinen FFA in vielfältige Prozesse involviert zu sein und werden mittlerweile nicht nur als Energieträger betrachtet.[44]

Einerseits dienen FFAs zur Energiegewinnung, insbesondere in Phasen des Fastens oder gesteigerten Energiebedarfs. Andererseits agieren sie als Signalmoleküle, indem sie an eine bestimmte Klasse G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die sogenannten Free Fatty Acid Receptors (FFARs), binden. Diese Rezeptoren erkennen unterschiedliche Kettenlängen freier Fettsäuren und vermitteln über komplexe intrazelluläre Signalwege vielfältige Effekte auf den Organismus.[45]

Zu den durch FFARs regulierten Prozessen lassen sich unter anderem die Glukoseverwertung, die Insulinsensitivität sowie die Modulation entzündlicher Reaktionen zählen. [46] Damit scheinen freie Fettsäuren zu Regulatoren des Stoffwechsels und der Immunfunktion beizutragen.[47] Darüber hinaus beeinflussen FFAs durch ihre strukturelle Integration in die Zellmembranen die Zellstabilität und wirken auf zelluläre Signaltransduktionsprozesse, wodurch es zur Kontrolle von oxidativem Stress kommt.[48]

Darüber hinaus liegen Hinweise vor, dass FFA eine antibakterielle Wirkung durch direkte Beschädigung der bakteriellen Zellmembran und des Energiestoffwechsels der Mikroorganismen besitzen.[49]

1.2.1 Arachidonsäure

Arachidonsäure ist eine mehrfach ungesättigte Omega-6-Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen und vier Doppelbindungen ($C_{20:4}$, $C_{20}H_{32}O$). Sie ist ein zentraler Bestandteil von Phospholipiden in Zellmembranen, insbesondere in Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen. Als Vorläufer bioaktiver Lipidmediato-

ren spielt sie eine entscheidende Rolle in inflammatorischen Prozessen und der Hämostase.[50]

Im Rahmen der primären Hämostase ist Arachidonsäure wesentlich an der Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten beteiligt. Nach Zellaktivierung, etwa durch vaskuläre Verletzung, wird Arachidonsäure über Phospholipase A₂ aus Membranphospholipiden freigesetzt. Anschließend erfolgt eine enzymatische Umwandlung durch Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) zu instabilen Endoperoxiden (PGG₂ und PGH₂), aus denen durch thrombozytäre Thromboxan-Synthase das Thromboxan A₂ (TXA₂) gebildet wird.[51]

Darüber hinaus steht Arachidonsäure im Wechselspiel mit antiaggregatorischen Lipidmediatoren wie Prostacyclin (PGI₂), das primär in Endothelzellen synthetisiert wird und antagonistisch auf TXA₂ wirkt. Das Gleichgewicht dieser Mediatoren ist essenziell für eine kontrollierte Hämostase und die Vermeidung pathologischer Thrombenbildung.[52]

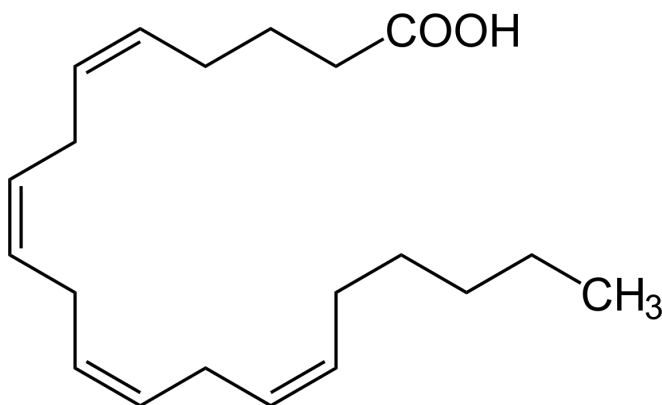


Abbildung 1: Strukturformel von Arachidonsäure (ARA)

Chemische Strukturformel mit 20 Kohlenstoffatomen und vier Doppelbindungen [Eigene Darstellung]

1.2.2 Eicosapentaensäure

Die Eicosapentaensäure (EPA) ist eine mehrfach ungesättigte Omega-3-Fettsäure (ω -3 PUFA) mit 20 Kohlenstoffatomen und fünf Doppelbindungen (C20:5, C₂₀H₃₀O₂). Diese Fettsäure kommt natürlicherweise vor allem in Fischöl vor. EPA hat eine strukturelle Ähnlichkeit zur Arachidonsäure (AA/ARA, C20:4), die chemisch einer Omega-6-Fettsäure entspricht. In Thrombozyten wird ARA haupt-

sächlich durch die COX-1 metabolisiert, wodurch TXA_2 entsteht, welches einen potenten Agonisten der Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung darstellt.[51, 53] Die endotheliale COX-1 bildet aus EPA Prostaglandin I₃ (PGI₃), das in vitro eine thrombozytenhemmende Wirkung zeigte.[54]

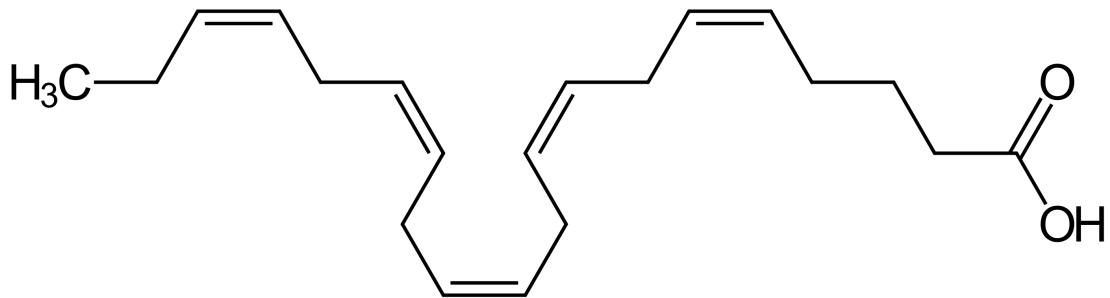


Abbildung 2: Strukturformel von Eicosapentaensäure (EPA)

Chemische Strukturformel mit 20 Kohlenstoffatomen und fünf Doppelbindungen (C20:5) [Eigene Darstellung]

1.2.3 Docosahexaensäure

Docosahexaensäure (DHA) ist eine mehrfach ungesättigte Omega-3-Fettsäure (ω -3 PUFA) mit 22 Kohlenstoffatomen und sechs Doppelbindungen (C22:6, C₂₂H₃₂O₂). DHA kommt natürlicherweise in Fischöl vor und ist ein wesentlicher Bestandteil von Zellmembranen, insbesondere im Gehirn und in der Retina. Aufgrund ihrer chemischen Struktur gehört DHA wie EPA zur Gruppe der langkettigen Omega-3-Fettsäuren. Ein Unterschied zeigt sich durch die größere Kettenlänge und eine zusätzliche Doppelbindung. Auch DHA weist strukturelle Ähnlichkeiten zur ARA (C20:4) auf.

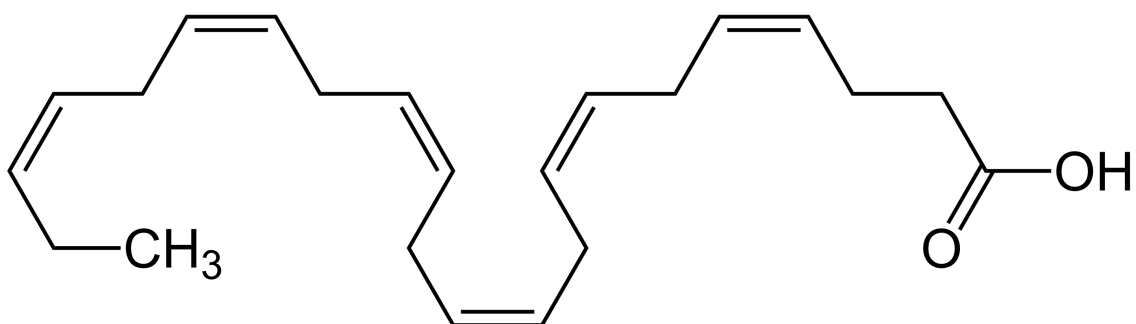


Abbildung 3: Strukturformel von Docosahexaensäure (DHA)

Chemische Strukturformel mit 22 Kohlenstoffatomen und sechs Doppelbindungen (C22:6) [Eigene Darstellung]

1.2.4 Eicosapentaensäureethylester

Eicosapentaensäureethylester (IPE, auch Icosapent-Ethyl, $C_{22}:5$, $C_{22}H_{34}O_2$) ist die ethylveresterte Form von EPA. IPE wurde speziell entwickelt, um eine gezielte und hochdosierte Versorgung mit EPA zu ermöglichen. Nach der Einnahme wird IPE durch Lipasen im Darm zu EPA umgewandelt, das anschließend als aktiver Metabolit in den Blutkreislauf aufgenommen wird.[55]

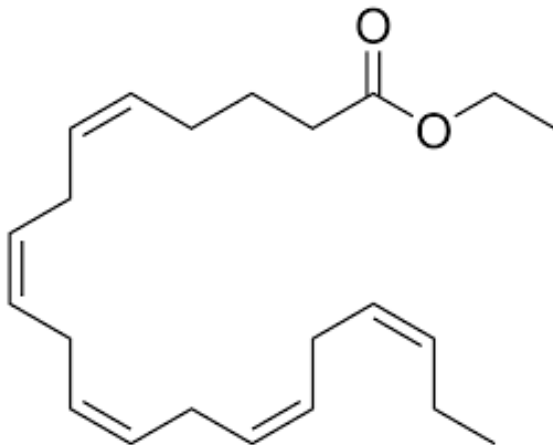


Abbildung 4: Strukturformel von Icosapent-Ethyl (IPE)

Chemische Strukturformel mit 22 Kohlenstoffatomen und fünf Doppelbindungen [Eigene Darstellung]

1.3 COX-vermittelter Fettsäurestoffwechsel

Wie EPA, DHA, IPE und Arachidonsäure gehören auch die Fettsäuren Linolsäure (LA, $C_{18}:2$) und alpha-Linolensäure (ALA, $C_{18}:3$), aus denen sie metabolisiert werden, zu den mehrfach ungesättigten, langkettigen Fettsäuren. Eine Gemeinsamkeit dieser Fettsäuren besteht in der Doppelbindung jenseits von C9. Zur Synthese dieser Doppelbindung besitzt der menschliche Organismus keine Möglichkeit. Entsprechend müssen diese Fettsäuren über die Nahrung aufgenommen werden. Daher werden diese Fettsäuren als essenziell bezeichnet.[44]

Aus LA und ALA entstehen durch Elongasen und Desaturasen längerkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA, EPA und Arachidonsäure.

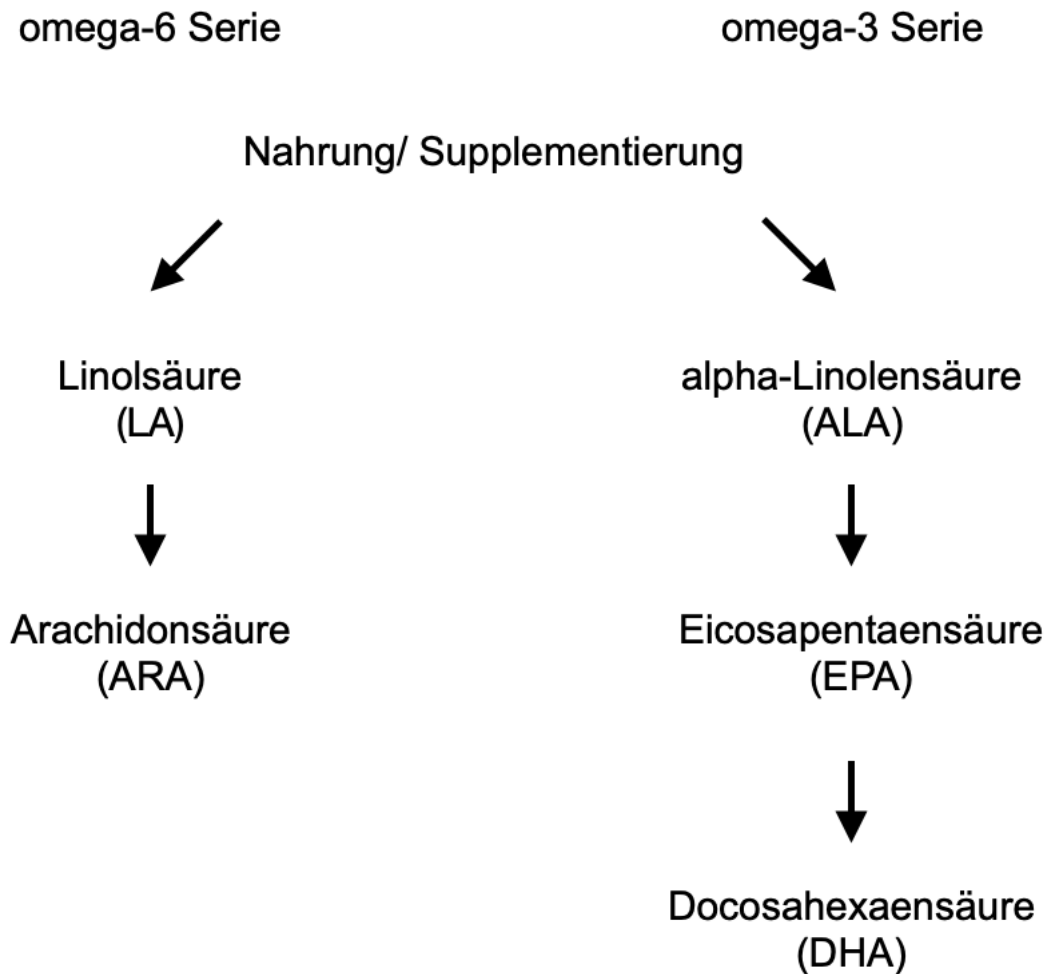


Abbildung 5: Stoffwechselwege der mehrfach ungesättigten ω -3- und ω -6-Fettsäuren

[Eigene Darstellung]

Die anschließende Verstoffwechselung der o. g. mehrfach ungesättigten Fettsäuren erfolgt durch Cyclooxygenasen (COX) und Lipoxygenasen (LOX).

Die Cyclooxygenase wandelt IPE, EPA und DHA zu antikoagulatorischen Metaboliten wie Serie-III-Prostanoiden wie Prostaglandin E3 (PGE3), Prostaglandin I3 (PGI3), Thromboxan A3 (TXA3) und die Lipoxygenase zu Serie-V-Leukotrien A5, B5, C5 und D5 (LTA5, LTB5, LTC5, LTD5) um.

Auch Arachidonsäure wird durch die Cyclooxygenase 1 verstoffwechselt. ARA wird dabei zu Serie-II-Prostaglandinen wie Prostaglandin E2 (PGE2), Prostaglandin I2 (PGI2) und Thromboxan A2 (TXA2) und Serie-IV-Leukotrienen wie Leukotrien A4, B4, C4 und D4 (LTA4, LTB4, LTC4 und LTD4) metabolisiert.[56]

Den aus ARA entstehenden Metaboliten konnten bereits eine proinflammatorische Wirkung sowie die Eigenschaft, eine Vasokonstriktion hervorzurufen und die Thrombozytenaggregation anzuregen, nachgewiesen werden. [44]

Um die Thrombozytenaktivierung im Rahmen der primären Hämostase zu beurteilen, bietet sich die Analyse der TXB₂-Spiegel im Plasma an.

TXB₂ ist ein stabiler Metabolit von TXA₂, der aus ARA über COX-1 gebildet wird und für die autokrine und parakrine Aktivierung von Thrombozyten verantwortlich ist.[57]

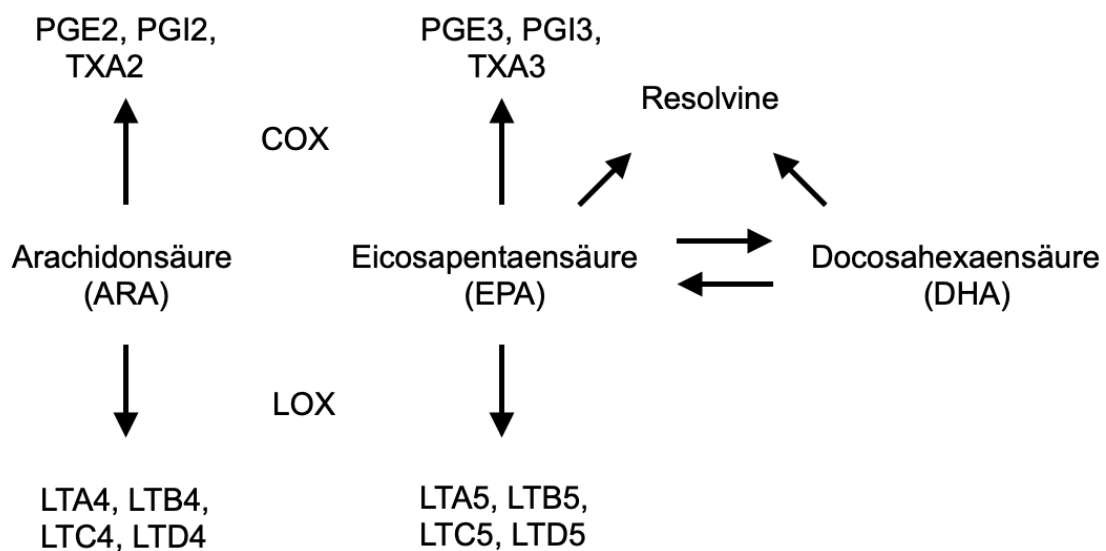


Abbildung 6: Metabolismus der mehrfach ungesättigten ω -3- und ω -6-Fettsäuren

[Eigene Darstellung]

1.4 Effekte von Fettsäuren auf das kardiovaskuläre Risiko

Seit vielen Jahren sind Omega-3-Fettsäuren, insbesondere EPA und DHA, Gegenstand von kardiovaskulärer Forschung. Hierbei wird das Potenzial eines protektiven Effekts auf das Herz-Kreislauf-System untersucht. Eine präventive Therapiemaßnahme zur Reduktion von kardiovaskulären Erkrankungen spielt im Hinblick auf die epidemiologische Bedeutung eine entscheidende Rolle.[58] Grundstein der Beobachtungen war eine Studie in einer Population mit hohem Fischkonsum in Grönland, die trotz fett- und cholesterinreicher Ernährung eine niedrige Rate an kardiovaskulären Erkrankungen zeigte.[59] Diese Studie gab

Einleitung

Hinweise darauf, dass bestimmte marine Fettsäuren, wie sie in Fischöl vorkommen, eine präventive Wirkung auf das kardiovaskuläre Risiko entfalten könnten.[59]

Zur weiteren Untersuchung dieser Ergebnisse wurden in den letzten Jahren mehrere Studien durchgeführt, um den präventiven Nutzen von Omega-3-Fettsäuren bei kardiovaskulären Erkrankungen zu prüfen.

Die ASCEND-Studie untersuchte Patienten mit Diabetes ohne manifeste Herzkreislauf-Erkrankung, die entweder 1 g Omega-3-Fettsäuren täglich oder Placebo erhielten, wobei kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von *Major Adverse Cardiac Events* (MACE) festgestellt werden konnte.[60] Die Ergebnisse der VITAL-Studie, die EPA (640 mg) und DHA (380 mg) zur Primärprävention untersuchte, konnten ebenfalls keine Reduktion des kardiovaskulären Risikos nachweisen.[61]

Die Beobachtungen der oben genannten Studien wurden durch die STRENGTH-Studie ergänzt. In dem methodischen Aufbau dieser Studie wurden Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko und dauerhafter Statin-Therapie mittels hoher Dosen EPA und DHA behandelt, wobei ebenfalls keine Reduktion von MACE im Vergleich zu Maisöl als Placebo festgestellt werden konnten.[62]

Im Jahr 2019 wurden im Rahmen der REDUCE-IT-Studie über 8.000 Patienten mit manifester kardiovaskulärer Erkrankung (sekundäre Prävention) oder mit Diabetes mellitus und mindestens einem weiteren Risikofaktor (primäre Prävention) eingeschlossen. Die Probanden wurden randomisiert und erhielten entweder zweimal täglich 2 g IPE (insgesamt 4 g/Tag) oder ein entsprechendes Placebo auf Mineralölbasis, wobei der mittlere Beobachtungszeitraum 4,9 Jahre betrug.[63] Hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils traten unter Therapie mit dem Ester aus EPA leicht erhöhte Raten von Vorhofflimmern und kleineren Blutungskomplikationen auf, ohne Zunahme schwerwiegender oder tödlicher Blutungen.[63]

Die REDUCE IT-Studie umfasste den kombinierten primären Endpunkt von kardiovaskulären Ereignissen (kardiovaskulären Tod, nicht-tödlichen Myokardinfarkt, nicht-tödlichen Schlaganfall, koronare Revaskularisationen sowie instabile

Angina pectoris mit Hospitalisierung), wobei unter IPE-Therapie eine signifikante Reduktion des Endpunkts um ungefähr 25 % im Vergleich zur Placebogruppe (Hazard Ratio 0,75; $p < 0,001$) zu verzeichnen war.[63]

Ein ähnlicher Studienaufbau wurde in der JELIS-Studie aus Japan gewählt, die bei über 18.000 Patienten mit Hypercholesterinämie und Statin-Therapie eine tägliche Gabe von 1,8 g EPA untersuchte und dabei eine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse zeigte.[64]

1.5 Ziele der Arbeit

Der Mechanismus, der den Erkenntnissen aus klinischen Studien wie der REDUCE IT- und JELIS-Studie zugrunde liegt, ist weiterhin nicht eindeutig geklärt. Die Rolle, die mehrfach ungesättigte freien Fettsäuren dabei spielen und wie die Supplementierung dieser zu einer Reduktion ischämischer Ereignisse und einer leichten Steigerung von Blutungsereignissen führen kann, ist Gegenstand aktueller Studien. Auch die Arbeit beschäftigt sich mit o. g. Zusammenhang.

Es ergeben sich daher folgende Fragestellungen:

- a) Welche Effekte haben FFA, auch konzentrationsabhängig, auf die Thrombozytenfunktion?
- b) Wie werden diese Effekte vermittelt und welche Enzyme spielen dabei eine Rolle?
- c) Welche Wirkung zeigen FFA in Anwesenheit von Acetylsalicylsäure auf die Hämostase?
- d) Welche Rolle spielen freie Fettsäuren im Hinblick auf das kardiovaskuläre Risiko?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Das Studiendesign orientierte sich an den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki. Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Studiennummer 5823R genehmigt. Vor der Blutentnahme erhielten alle Teilnehmenden eine umfassende mündliche und schriftliche Aufklärung. Eine schriftliche Einwilligungserklärung wurde von sämtlichen Probanden eingeholt.

2.2 Proband*innenkollektiv

Vor Einschluss erfolgte eine ausführliche mündliche und schriftliche Aufklärung aller Probanden.

Als Ausschlusskriterien galten ein Alter unter 18 Jahren, eine Einnahme von Medikamenten mit Einfluss auf die Thrombozytenfunktion (insbes. Thrombozytenfunktionshemmer, NSAR-Analgetika) innerhalb der letzten sieben Tage, hämatologische Erkrankungen und Erkrankungen mit Störung der Hämostase, kardiovaskuläre Vorerkrankungen, maligne Vorerkrankungen und eine eingeschränkte Nierenfunktion.

Zusammenfassend handelte es sich bei allen Probanden um gesunde Probanden ohne Vorerkrankungen oder die Notwendigkeit einer regelmäßigen Medikamenteneinnahme.

2.3 Material

2.3.1 Materialübersicht

Material	Produktinformation und Hersteller
<u>Verbrauchsmaterial</u>	
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.® <i>Motion pipette tips</i> 10, 50, 100, 300 und 1000 µl, Combitips® <i>advanced</i> 2,5, 10 mL, Eppendorf <i>Serological Pipettes</i> 5, 10, 25 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Pipettenspitzen, 350 µl, 1000 Stück, lose verpackt, für Multiplate®-Analyzer, Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen	Greiner Bio-One International GmbH 15, 50 mL, Kremsmünster, Österreich
Messzellen	Test Cells für Multiplate®-Analyzer, Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
	Küvette Micro im Dispo-System, CuvCARD, befüllt mit Mixern, für Apact 4004, LABiTec® GmbH, Ahrensburg, Deutschland

Material und Methoden

Reaktionsgefäße	Eppendorf <i>Safe-Lock-Tubes</i> , 0,1, 0,5, 2 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
-----------------	---

Reagenzien, Stimulantien,

Puffer

Acetylsalicylsäure	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
--------------------	---

Adenosin-5'-diphosphat	<i>Adenosine 5'-diphosphate sodium salt, bacterial</i> , ≥95% (HPLC), SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA über Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
------------------------	---

ADPtest	3 x 1 mL, Adenosindiphosphat 0,2 mM für Multiplate® Analyzer, Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
---------	---

Arachidonsäure	Oxford Biomedical Research, Oxford, Michigan, USA
----------------	---

ASPItest	3 x 1 ml, Arachidonsäurereagenz 15 mM für Multiplate® Analyzer, Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
----------	---

Aqua, dest. (MilliQ)	Millipore-Anlage, innerhalb des Labors
----------------------	--

Material und Methoden

cis-5,8,11,14,17-Eicosapenta- enoic acid	≥99%, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA über Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahe- xaenoic acid	≥98%, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA über Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	10x, modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, ster- ile-filtered, suitable for cell culture, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA, über Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eicosapentaensäureethylester	200 mg, European Pharmacopoeia Reference Standard, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	ROTIPURAN® ≥99,8%, p.a., CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Indometacin	98,5-100,5%, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA über Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung	NaCl 0,9%, Fresenius-Infusionslö- sung, Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg, Deutschland

Material und Methoden

Kollagen	Kollagen Reagens HORM Suspension, Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich
Tris-Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

ELISA-Kits

TXB2 Assay	Thromboxane B2 ELISA Kit (480 strips), Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA über Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
------------	---

Tabelle 1: Materialübersicht mit Herstellern

2.3.2 Lösungen und Puffer

Acetylsalicylsäure-Lösung

Um eine 5 mM Stammlösung der Acetylsalicylsäure (ASS) zu erhalten, wurde entsprechend des Molekulargewichts 1,8 mg ASS in 1 mL Thrombozytenmedium-Puffer (TM) gelöst.

Die im Versuchsansatz angestrebte Zielkonzentration von 30 μ M wurde erreicht, indem 5 μ L der Arbeitslösung mit einer Konzentration von 1,5 mM ASS in den Versuchsansatz hinzugegeben wurde.

Die 1,5 mM der Arbeitslösung wurden durch eine Verdünnung um den Faktor 1: 3,33 in TM erreicht.

Adenosin-5`-diphosphat-Lösung

Durch das Lösen von 2 mg ADP in 486 μ L MilliQ entstand eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mM ADP. Um eine Konzentration von 250 μ M in der

Material und Methoden

Gebrauchslösung zu erreichen, wurde die Stammlösung um den Faktor 1:10 und im Anschluss erneut 1: 4 mit MilliQ-Wasser verdünnt.

Die angestrebte Konzentration im Versuchsansatz lag bei 0,5 μM ADP. Daraus folgt bei einem Verdünnungsfaktor von 1: 50 im Versuchsansatz ein Erreichen der Zielkonzentration von 0,5 μM durch Zugabe von 0,5 μL der Gebrauchslösung.

Alkoholische NaOH

Lösung von 100 mM NaOH in Ethanol für 2,5 M in Lösung

Arachidonsäure-Lösung

Verwendet wurde eine 100 mM-Arachidonstammlösung in Ethanol. Die Gebrauchslösung wurde hergestellt mit 100 μL der ARA-Stammlösung und 100 μL alkoholischer NaOH.

Anschließend erfolgte ein Versalzen unter N_2 und die lichtgeschützte Lagerung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Es erfolgte die Lösung der Gebrauchslösung in 150 μL Tris am Tag des Versuchs.

Nach Lösung mittels Tris-Puffer entstand eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mM. Die angestrebte Konzentration der Arbeitslösung von 25 mM wurde erreicht durch eine Verdünnung um den Faktor 4 mittels Tris-Puffer.

Durch die Zugabe von 5 μL in den Versuchsansatz wurde bei einem Verdünnungsfaktor von 1: 50 die angestrebte Konzentration von 0,5 mM erreicht.

EDTA

77 mM

Indomethacin-Lösung

Es erfolgte das Lösen von 4 mg in 222 μL EtOH abs. am Versuchstag zur gebrauchsfertigen Lösung.

Kollagen-Lösung

Die Ausgangskonzentration des Kollagen Reagens HORM beträgt 1 mg/mL. Um die Zielkonzentrationen von 250 $\mu\text{g/mL}$ und 100 $\mu\text{g/mL}$ in der Arbeitslösung zu

Material und Methoden

erhalten, wurde das Kollagen Reagens HORM entsprechend 1: 4 und 1: 10 verdünnt.

Im Versuchsansatz sollte eine Konzentration von 5 µg/mL erreicht werden. Dies gelang auch hier durch die Zugabe von 5 µL in den Versuchsansatz und einer durch die Zugabe erneut stattfindenden Verdünnung um den Faktor 1:50.

Thrombozytenmedium-Puffer (pH 7,4)

134 mM NaCl	MG = 58,44 g/mol	→ 1,960 g/250 mL
12 mM NaHCO ₃	MG = 84,01 g/mol	→ 0,252 g/250 mL
2,9 mM KCl		
0,36 mM NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	MG = 137 g/mol	→ 0,012 g/250 mL
1 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	MG = 203,31 g/mol	→ 0,051 g/250 mL
5 mM Hepes	MG = 238,30 g/mol	→ 0,289 g/250 mL

Tris-Puffer (pH 7,4)

50 mM

2.3.3 Fettsäure-Lösungen

Entsprechend des jeweiligen Molekulargewichts der einzelnen Fettsäuren wurde der Lösungskoeffizient für eine Endkonzentration in der Stammlösung (Stlsg.) von 200 mM berechnet.

25 mg Docosahexaensäure wurden dementsprechend in 380,5 µL Ethanol abs. (EtOH) gelöst, 10 mg Eicosapentaensäure in 165 µL EtOH abs. und 200 mg Eicosapentaensäureethylester in 1,5125 ml EtOH abs. gelöst.

Im Rahmen der Versuche wurde mit 5 unterschiedlichen Konzentrationen der Fettsäuren gearbeitet. Die Zielkonzentrationen in den Versuchsansätzen waren dabei 1, 0,75, 0,5, 0,25 und 0,05 mM.

Die Konzentrationen der Gebrauchslösungen lagen bei 100, 75, 50, 25 und 5 mM.

Um diese Konzentrationen zu erreichen, wurde die Stlsg. von 200 mM im ersten Schritt 1: 2 verdünnt, um eine Lösung mit einer Konzentration von 100 mM zu erreichen. Diese Lösung wurde dann 1:1,33, sowie 1:2 verdünnt, um Konzentrationen von 70 und 50 mM zu erzeugen. Die entstandene 50 mM-Lösung wurde erneut 1: 2, sowie 1:10 verdünnt, um die 25- und 5 mM-Lösung zu generieren.

Die Gebrauchslösung wurde, orientiert an dem Volumen des Versuchsansatzes, in entsprechender Menge (2,5 µl bei LTA oder 6 µl bei MEA) hinzugefügt, um bei einem dadurch erneuten Verdünnungseffekt um den Faktor 50 o. g. Zielkonzentration zu erreichen.

Die Gebrauchslösungen wurden dauerhaft lichtgeschützt bei -20 °C bzw. während der Versuche auf Eis gelagert.

2.3.4 Probengewinnung und -Aufbereitung

Den Probanden wurde nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Aufklärung unter aseptischen Bedingungen maximal 30 ml Blut entnommen. Genutzt wurden dafür 2,7 ml fassende BD Vacutainer® Plus-Citratröhrchen aus Kunststoff (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und das BD Safety-Lok™ -Blutentnahmeset (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Bei dem im Röhrchen befindlichen Antikoagulanzen handelt es sich um 3,2% Tri-Natrium-Citrat 109 mM im Verhältnis 1:10.

2.4 Methoden

2.4.1 Lichttransmissionsaggregometrie

Bei der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born [65] handelt es sich um eine auch im klinischen Alltag verwendete laborchemische Untersuchungsmethode, die für die Diagnostik und Überwachung von Gerinnungsstörungen Anwendung findet.

Gemessen wird dabei der Anteil eines LED-Lichtsignals (740nm), der nach Passage einer mit Blutplasma gefüllten Küvette am Detektor registriert wird. Die Evaluation erfolgt somit photometrisch.

Die maximale optische Dichte besteht im Ruhezustand der Thrombozyten. Mit zunehmender Aggregation nach Induktion durch einen Stimulus steigt die Lichtdurchlässigkeit des Plasmas. Anhand von Schwankungen der Intensität des am Detektor gemessenen Lichtsignals können Rückschlüsse auf das Ausmaß der stattgehabten Aggregation gezogen werden.

Die Aggregation wird durch das Programm in Echtzeit graphisch dargestellt, gemessen wurde das Aggregationsmaximum (MoA) [%].

Verwendet habe ich für die Versuche mittels LTA das Apect 4004 mit der dazugehörigen APACT LPC-Software (Labitec GmbH, Ahrensburg, Deutschland).

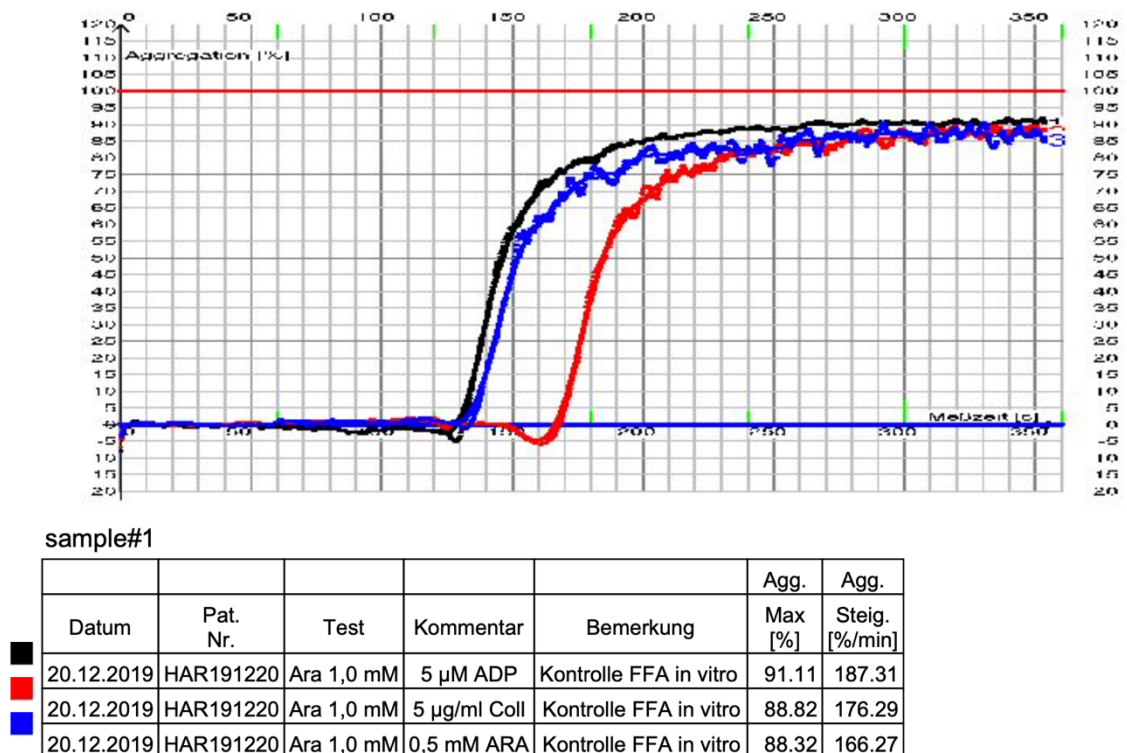


Abbildung 7: Darstellung einer Aggregationskurve und der Ergebnisse der LTA mittels Apect 4004

Für die Untersuchung mittels LTA wurde das Blut bei 1200 rpm (rounds per minute) (Minifuge RF, Heraeus, Sepatech) für 10 Minuten bei RT (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der entstandene Überstand, im Folgenden genannt plättchenreiches Plasma (PRP), wurde abpipettiert und in ein 15 ml fassendes Zentrifugationsröhrchen überführt.

210 µL des PRP wurden in ein 0,5-mL-fassendes Reaktionsgefäß überführt und bei 13200 rpm (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Dabei trennen sich zellulärer und flüssiger Anteil, sodass ein Pellet und der entsprechende Überstand, auch plättchenarmes Plasma (PAP), entstehen. Mittels PRP wurde das Aggregometer genullt. Das PAP wurde im Rahmen der LTA als 100-%-Referenz zur Eichung des Aggregometers verwendet. Diese Eichung wurde probandenspezifisch wiederholt.

Aggregation mit freien Fettsäuren

Nach Eichung des Aggregometers mit PRP und PAP des jeweiligen Probanden wurden 4 Versuchsansätze gleichzeitig untersucht.

In jedem Versuchsansatz wurden 200 µL Plasma und 50 µL TM verwendet.

Den Ansätzen wurden zuerst 2,5 µL der unterschiedlichen Fettsäurekonzentrationen hinzugefügt.

Im Anschluss wurden diese sofort in das Aggregometer überführt und mittels integriertem Magnetprüher einmalig gemischt. Die Ansätze wurden 4 Minuten bei 37,4°C (Solltemperatur) inkubiert. Danach wurden die Ansätze unter ständiger Vermischung durch die Magnetprüher weitere 2 Minuten inkubiert. Während dieser zwei Minuten zeichnete die Software die nachher als Referenz genutzte Nulllinie auf. Nach diesen insgesamt 6 Minuten wurden 5 µL des Stimulus hinzugefügt und weitere 6 Minuten gemessen.

Bei den verwendeten Stimuli handelte es sich um Arachidonsäure (ARA) 0,5 mM, Adenosin-5'-diphosphat (ADP) 5 µM und Kollagen (Coll) 5 µg/mL.

Um die Reaktion zu beenden, wurde nach insgesamt 12 Minuten die Aggregation mit 15 µL EDTA 70 mM und 3,75 µL Indometacin, entsprechend 67,56 µg, gestoppt.

Interaktion mit ASS

Um die Interaktion der freien Fettsäuren mit ASS zu untersuchen, wurde den Versuchsansätzen mit 1 mM EPA, IPE oder DHA, sowie der Kombination aus 0,75 mM EPA und 0,25 mM DHA, 30 μ M ASS hinzugefügt.

Auch hier wurde eine Negativkontrolle mit 2,5 μ L EtOH anstelle der Fettsäure und 30 μ M ASS durchgeführt.

Dazugegeben wurden 5 μ L der 1,5 mM-ASS-Gebrauchslösung unmittelbar vor der Zugabe der Fettsäure in den Versuchsansatz. Anschließend war der Versuchsablauf wie oben geschildert.

Für jeden Probanden wurden 3 Kontrollansätze untersucht, in denen sich nur 200 μ L Plasma, 50 μ L TM und 2,5 μ L EtOH befanden, stimuliert mit ARA, ADP und Kollagen.

Jeder Ansatz wurde nach Beendigung der Versuche in ein 500 μ L-fassendes Reaktionsgefäß überführt und bei 13200 rpm (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) in Zellpellet und PAP getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und erneut in ein 500 μ L-fassendes Reaktionsgefäß überführt. Beide Anteile wurden im Anschluss lichtgeschützt bei -80 °C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

		Stimulus, jeweils 5 µL		
	jeweils 2,5 µL	ADP 5 µM	Coll 5 µg/mL	ARA 0,5 mM
Kontrolle	EtOH abs.	A1*	B1*	C1*
EPA	1 mM	A2*	B2*	C2*
	0,5 mM	A3	B3	C3
	0,25 mM	A4	B4	C4
	0,05 mM	A5	B5	C5
DHA	1 mM	A6*	B6*	C6*
	0,5 mM	A7	B7	C7
	0,25 mM	A8	B8	C8
	0,05 mM	A9	B9	C9
IPE	1 mM	A10*	B10*	C10*
	0,5 mM	A11	B11	C11
	0,25 mM	A12	B12	C12
	0,05 mM	A13	B13	C13
EPA +DHA	0,75 + 0,25 mM	A14*	B14*	C14*

Tabelle 2: Übersicht der LTA-Versuchsansätze

Übersicht über die einzelnen Versuchansätze mit Angaben der ZK im Versuchsansatz, *Ansätze, die auch in Interaktion mit 30 µM ASS untersucht wurden

2.4.2 Multielektrodenaggregometrie

Um die Ergebnisse der LTA zu überprüfen und den Einfluss freier Fettsäuren auf die Hämostase *in vitro* in Vollblut zu untersuchen, wurden die Versuche mittels Multielektrodenaggregometrie (MEA) angeschlossen.

Auch die MEA zählt zu den gängigen laborchemischen Untersuchungsmethoden im Rahmen der Gerinnungs- und Thrombozytenfunktionsdiagnostik und dient der Überwachung entsprechender Erkrankungen.

Das Messprinzip der MEA beruht auf Änderungen der Impedanz, dem elektrischen Widerstand, zwischen zwei Elektroden.

Mit zunehmender Aggregation steigt die Impedanz zwischen den zwei sich in der Messzelle befindenden Elektroden durch das sich bildende Gerinnsel an den Elektroden.

Die Veränderung der Impedanz wird gemessen und graphisch dargestellt.

Die Ergebnisse der Aggregation, vergleichbar mit dem MoA (%) in der LTA, werden bei der MEA in *Aggregation Units* (AU) angegeben. Die Geschwindigkeit (*Velocity*) des Aggregationsprozesses wird in AU/min angegeben.

Für die Versuche wurde mit dem Multiplate® Analyzer und dem dazugehörigen Programm (Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland) gearbeitet.

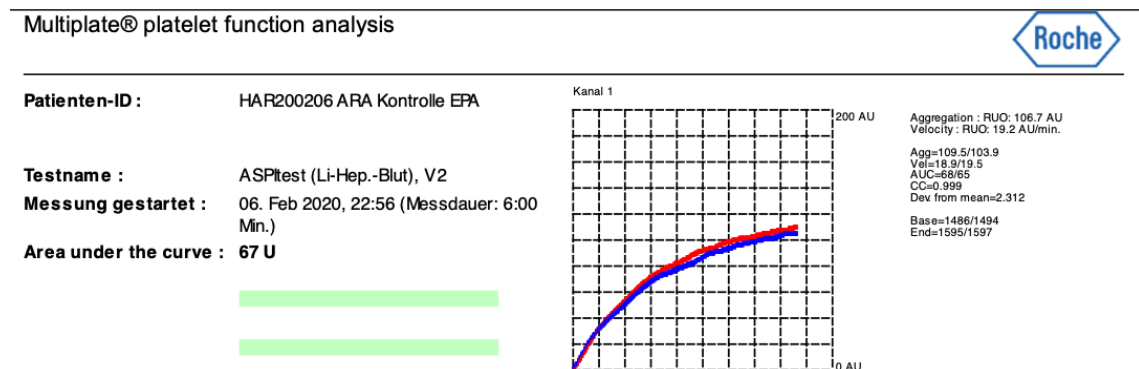


Abbildung 8: Darstellung der Messergebnisse des Multiplate-Analyzers von Roche Deutschland Holding GmbH

Mit freundlicher Erlaubnis der Roche Deutschland Holding GmbH

Der Multiplate® Analyzer bietet die Möglichkeit, 5 Ansätze gleichzeitig zu untersuchen. Versuchsablauf, Inkubations- und Messzeit wurden orientierend an der Durchführung der LTA gewählt, um die Vergleichbarkeit beider Methoden zu gewährleisten.

Daher wurden im Rahmen der Versuche zu Beginn jedes Messdurchgangs jeweils 5 Messzellen vorbereitet, indem 300 µL isotonische Kochsalzlösung in die Messzelle gegeben wurden. Im Anschluss daran habe ich erst 300 µL Vollblut und unmittelbar danach 6 µL der entsprechenden Fettsäure in entsprechender Konzentration hinzugefügt.

Durch das angeschlossene Pipettierprogramm wurde nach Zugabe des Vollblutes der Magnetrührer gestartet, um den Ansatz initial zu mischen. Nach einer

Inkubationszeit von 6 Minuten bei 37,2°C (Solltemperatur) habe ich 20 µL des Induktors hinzugegeben.

Als Induktoren wurden der ASPItest (Roche) mit einer 15 mM-Arachidonsäure-Lösung und der ADPtest (Roche) mit einer 0,2 mM-ADP-Lösung verwendet. Nach Zugabe von 20 µL Stimulus in 600 µL Ansatz und bei einem Verdünnungsfaktor von 1: 31 ergibt sich für den ASPItest eine Wirkkonzentration von 0,484 mM und für den ADPtest eine Wirkkonzentration von 6,45 µM im Versuchsansatz.

Da der COLtest (Roche) nicht mehr kommerziell erhältlich ist, wurde eine Gebrauchslösung mit der von Roche angegebenen Aktivität des COLtests von 100 µg/mL mittels des Kollagen Reagens HORM hergestellt und verwendet. Auch hier ergibt sich bei der Zugabe von 20 µL in 600 µL ein Verdünnungsfaktor von 1: 31 und damit eine Wirkkonzentration von 3,2 µg/mL im Versuchsansatz.

Nach Zugabe des Induktors wurde die Messung unter ständiger Suspension mittels Magnetrührer durch das Programm gestartet und nach 6 Minuten Messzeit automatisch beendet.

Die Versuchsansätze wurden nach Beendigung der Versuche verworfen.

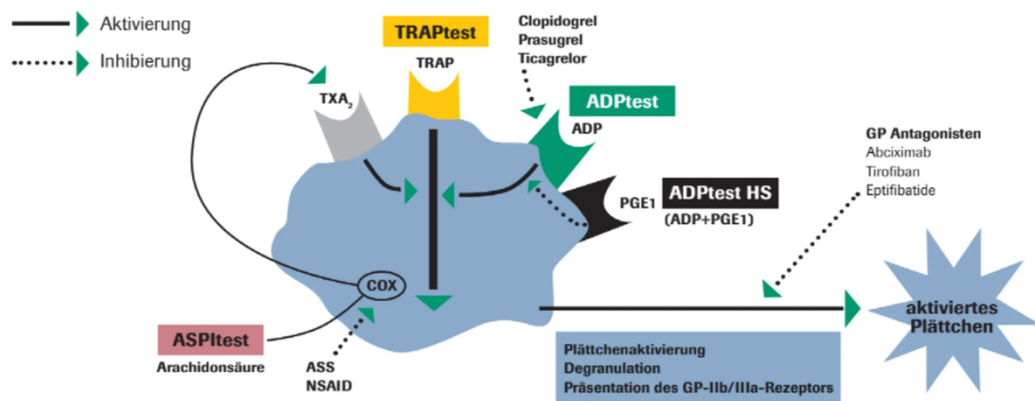


Abbildung 9: Nachweis verschiedener Aktivierungswege

Mit freundlicher Erlaubnis der Roche Deutschland Holding GmbH

Roche Deutschland Holding GmbH [66]

		Stimulus, jeweils 20 µL		
jeweils 6 µL		ADPtest	Coll	ASPItest
		6,45 µM	3,2 µg/ml	0,484 mM
Kontrolle	EtOH abs.	A1	B1	C1
EPA	1 mM	A2	B2	C2
	0,5 mM	A3	B3	C3
	0,25 mM	A4	B4	C4
	0,05 mM	A5	B5	C5
IPE	1 mM	A6	B6	C6
	0,5 mM	A7	B7	C7
	0,25 mM	A8	B8	C8
	0,05 mM	A9	B9	C9
DHA	1 mM	A10	B10	C10
	0,5 mM	A11	B11	C11
	0,25 mM	A12	B12	C12
	0,05 mM	A13	B13	C13

Tabelle 3: Übersicht der Multielektrodenaggregometrie-Versuchsansätze

2.4.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Thromboxan B₂ ELISA

Um die Thromboxan B₂-Spiegel im Plasma zu bestimmen, wurde ein ELISA verwendet (Thromboxane B₂-ELISA-Kit (480 strip wells), Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA über Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland).

Für die TXB₂-Assays wurden die bei -80 °C gelagerten Proben des PAP aus den LTA-Versuchen verwendet. Dazu wurden diese initial langsam bei RT auftauen gelassen und anschließend gut gemischt.

Die verwendeten Proben wurden initial um den Faktor 1: 200 mit einem, dem Kit beigegebenen Elisa-Buffer verdünnt.

Das Assay wurde entsprechend der beigefügten Anleitung durchgeführt. Die Analyse der ELISA-Platten erfolgte mit dem FLUOstar® Omega Microplate Reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) bei 420 nm.

Anhand der Standardreihe wurden über die MARS Datenanalyse Software (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) die Messergebnisse der Proben berechnet.

Im Rahmen der Auswertung wurde der o. g. Verdünnungsfaktor wieder mit einberechnet und die Ergebnisse entsprechend angepasst.

2.5 Statistische Auswertung der Messergebnisse

Um die erhobenen Daten statistisch auszuwerten, wurde das Programm GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA) verwendet. Um normalverteilte Daten zu analysieren, wurde ein gepaarter T-Test angewendet. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Lichttransmissionsaggregometrie

3.1.1 Interaktionen mit Fettsäuren

Nachfolgend dargestellt sind die Ergebnisse der LTA nach Zugabe der drei Fettsäuren EPA, DHA und IPE in vier verschiedenen Konzentrationen und unter Stimulation mit ADP, Kollagen und Arachidonsäure. Betrachtet wird dabei die Reduktion des *Maximum of Aggregation* (MoA) in Prozent (%).

EPA

In der ADP-induzierten Aggregation (A) zeigte sich bereits bei niedrigen EPA-Konzentrationen eine Tendenz zur Hemmung der gemessenen Aggregation. Eine signifikante Reduktion der Aggregation in Prozent (%) ließ sich allerdings erst bei Konzentrationen von $\geq 500 \mu\text{M}$ EPA im Verhältnis zur Kontrolle (con) nachweisen. Die Reduktion bei Zugabe von $500 \mu\text{M}$ EPA betrug 17,37% vom Kontrollwert (con vs. $500 \mu\text{M}$: Standardabweichung in % (SD) 10,62 %, 95 %-Konfidenzintervall (KI) [-25,54 bis -9,202], $p = 0,0012$). Bei Zugabe von $1000 \mu\text{M}$ EPA zeigte sich eine Reduktion von 14,95 % (con vs. $1000 \mu\text{M}$: SD 11,55 %, 95%-KI [-23,83 bis -6,075], $p = 0,0046$).

Stimuliert mit Kollagen (B) konnte ebenfalls eine signifikante Hemmung der Aggregation beobachtet werden. Bei Zugabe von $250 \mu\text{M}$ EPA zeigte sich eine Reduktion der Aggregation um 5,36 % zum Kontrollwert (con vs. $250 \mu\text{M}$: SD 3,949 %, 95%-KI [-9,012 bis -1,708], $p = 0,0115$). Unter Zugabe von $500 \mu\text{M}$ EPA konnte in diesem Versuchsansatz kein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Eine Tendenz ist dennoch deutlich mit einer Reduktion des MoA um 6,477% (con vs. $500 \mu\text{M}$: SD 8,74 %, 95%-KI [-13,20 bis 0,2418], $p = 0,0569$). Die Versuchsansätze, bei denen $1000 \mu\text{M}$ EPA hinzugegeben wurden, zeigten wiederum deutlich signifikante Ergebnisse mit einer Hemmung der Aggregation um 17,91 % (con vs. $1000 \mu\text{M}$: SD 20,25 %, 95%-KI [-33,48 bis -2,347], $p = 0,0291$).

Unter Stimulation mit ARA (C) war die beobachtete Hemmung der Aggregation am stärksten ausgeprägt. In diesen Versuchsansätzen zeigte sich eine signifi-

Ergebnisse

kante Hemmung der Aggregation wie bei Stimulation durch Kollagen bereits bei Zugabe von 250 μM EPA mit zunehmender Signifikanz bei steigender EPA-Konzentration. Die Zugabe von 250 μM EPA führte zu einer Minderung der Aggregation um 24,2 % (con vs. 250 μM : SD 25,62 %, 95%-KI [-47,90 bis -0,5113], $p = 0,0465$). Nach Zugabe von 500 μM EPA konnte eine Hemmung der Aggregation um 45,77 % beobachtet werden (con vs. 500 μM : SD 35,84 %, 95%-KI [-83,38 bis -8,159], $p = 0,026$). Am deutlichsten zeigte sich die Hemmung nach Zugabe von 1000 μM EPA mit einer Reduktion des MoA um 66,93% (con vs. 1000 μM : SD 27,1 %, 95%-KI [-91,99 bis -41,87], $p = 0,0006$).

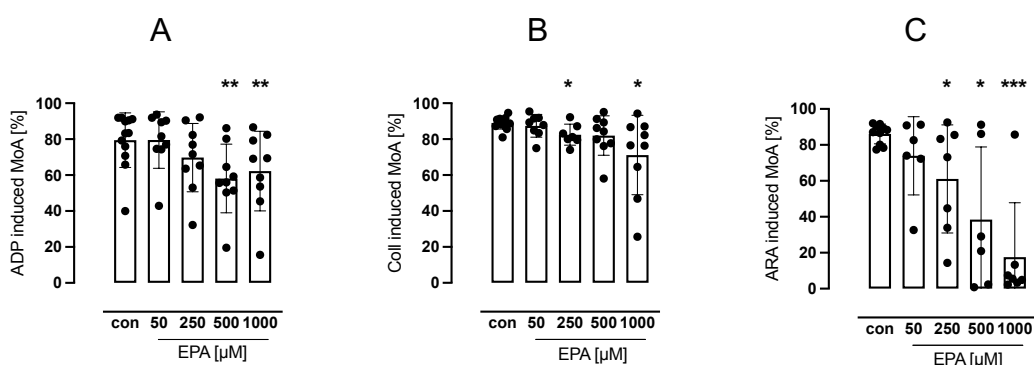


Abbildung 10: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von EPA in vier verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Aggregationsergebnisse als MoA in % unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, $n = 7-12$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, MoA [%] = Maximum of Aggregation, con = Kontrolle, EPA = Eicosapentaensäure, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

DHA

Auch bei Zugabe von DHA zeigte sich in der induzierten Aggregation bereits bei niedrigen Fettsäurekonzentrationen eine Tendenz zur Hemmung der gemessenen Aggregation.

Eine signifikante Hemmung ließ sich dabei in Abhängigkeit vom Stimulus bereits ab 50 μM DHA (C) nachweisen.

Unter Stimulation mit ADP (A) zeigte sich die Aggregation bei Zugabe von 250 μM DHA um 6,74% vermindert (con vs. 250 μM : SD 6,29 %, 95%-KI [-12 bis -1,482], $p = 0,0191$).

Ergebnisse

Mit steigender DHA-Konzentration auf 500 μM nahm auch die Hemmung der Aggregation auf 10,26 % vom Ausgangswert zu (con vs. 500 μM : SD 3,555%, 95%-KI [-13,23 bis -7,288], $p = <0,0001$).

Am stärksten ausgeprägt war auch hier die Hemmung konzentrationsabhängig nach Zugabe von 1000 μM DHA um 14,91 % (con vs. 1000 μM : SD 5,265 %, 95%-KI [-19,31 bis -10,51], $p = < 0,0001$).

Unter Stimulation mit Kollagen (B) trat eine signifikante Hemmung erst bei Zugabe von 500 μM DHA oder mehr auf.

Die durch Zugabe von 500 μM DHA messbare Hemmung der Aggregation betrug 5,073 % vom Kontrollwert (con vs. 500 μM : SD 3,83 %, 95%-KI [- 8,274 bis - 1,871], $p = 0,0072$).

Bei Zugabe von 1000 μM betrug die Reduktion 13,31 % (con vs. 1000 μM : SD 4,847 %, 95%-KI [-17,36 bis -9,258], $p = 0,0001$).

Unter Stimulation mit ARA (C) konnte eine signifikante Minimierung des MoA bereits bei Zugabe von 50 μM DHA um 2,365 % nachgewiesen werden (con vs. 50 μM : SD 2,65 %, 95%-KI [-4,58 bis -0,1498], $p = 0,0395$).

Die Hemmung der Aggregation nahm dabei fettsäurekonzentrationsabhängig zu. So betrug die Reduktion 5,417 % vom Kontrollwert nach Zugabe von 250 μM DHA (con vs. 250 μM : SD 3,418 %, 95%-KI [-8,578 bis -2,256], $p = 0,0057$), nach Zugabe von 500 μM sogar schon 43,06 % (con vs. 500 μM : SD 37,52 %, 95%-KI [-74,42 bis -11,69], $p = 0,0141$) und nach Zugabe von 1000 μM 58,41 % (con vs. 1000 μM : SD 18,85 %, 95%-KI [-74,17 bis 42,65], $p = <0,0001$).

Ergebnisse

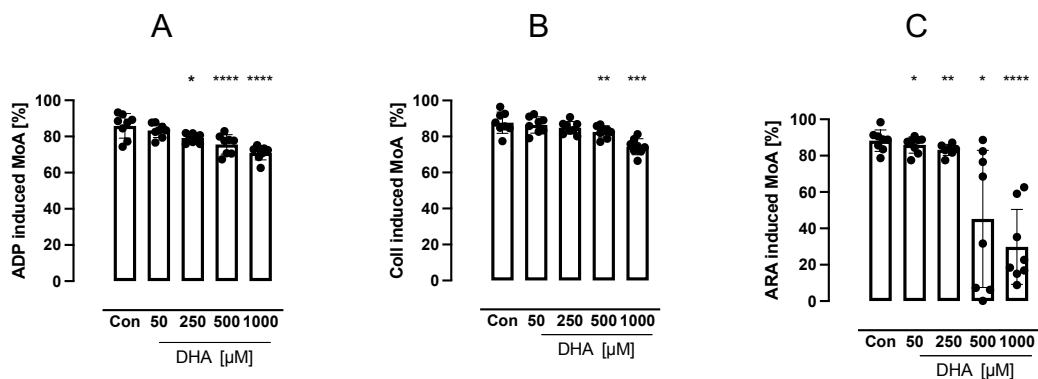


Abbildung 11: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von DHA in vier verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Aggregationsergebnisse als MoA in % unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, $n = 8$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, MoA [%] = Maximum of Aggregation, con = Kontrolle, DHA = Docosahexaensäure, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

IPE

Um die Untersuchungen in der LTA zu vervollständigen, wurde abschließend die Hemmung der Aggregation nach Zugabe von IPE untersucht. Auch dabei zeigte sich die vorbeschriebene Tendenz zur Hemmung der Aggregation bereits bei einer Konzentration von 50 µM IPE.

Unter Stimulation mit ADP (A) und nach Zugabe von 250 µM IPE zeigte sich das MoA (%) um 6,061 % vom Kontrollwert reduziert (con vs. 250 µM: SD 6,476, 95%-KI [-12,05 bis -0,07159], $p = 0,0481$). Nach Zugabe von 500 µM betrug die Reduktion 16,35 % (con vs. 500 µM: SD 7,729 %, 95%-KI [-23,5 bis -9,206], $p = 0,0014$) und nach Zugabe von 1000 µM sogar 25,53 % (con vs. 1000 µM: SD 8,782 %, 95%-KI [-32,28 bis -18,78], $p = <0,0001$).

In den Versuchsansätzen, die mit Kollagen (B) stimuliert wurden, war die Hemmung nach Zugabe von ≥ 250 µM IPE am deutlichsten ausgeprägt. So betrug die Reduktion des Messwertes 7,73 % vom Kontrollwert nach Zugabe von 250 µM IPE (con vs. 250 µM: SD 5,282 %, 95%-KI [-12,61 bis -2,845], $p = 0,0082$).

Wie in bisher allen beschriebenen Ansätzen war auch hier die Hemmung der Aggregation in Abhängigkeit von der Fettsäurekonzentration zunehmend. Nach Zugabe von 500 µM betrug die Reduktion des Messwertes bereits 16,15 % (con

Ergebnisse

vs. 500 μM : SD 6,791 %, 95%-KI [-22,44 bis -9,864], $p = 0,0008$) und bei 1000 μM IPE sogar 28,07 % (con vs. 1000 μM : SD 10,16 %, 95%-KI [-35,88 bis -20,25], $p = <0,0001$).

Nach Zugabe von 250 μM und unter Stimulation mit ARA (C) konnte eine Hemmung der Aggregation um 6,027 % vom Kontrollwert gemessen werden (con vs. 250 μM : SD 4,003 %, 95%-KI [-10,23 bis -1,827], $p = 0,0142$).

Die beobachtete Hemmung nahm auch hier bei steigender Fettsäurekonzentration zu. Die gemessene Reduktion lag nach Zugabe von 500 μM bereits bei 12,53 % (con vs. 500 μM : SD 4,619 %, 95%-KI [-17,38 bis -7,686], $p = 0,0012$). Nach Zugabe von 1000 μM betrug die Reduktion schließlich 23,63 % vom Ausgangswert (con vs. 1000 μM : SD 7,007 %, 95%-KI [-30,98 bis -16,28], $p = 0,0004$).

Als Ausnahme fällt hier das Messergebnis bei Zugabe von 50 μM IPE unter Stimulation durch ARA auf. Dabei zeigt sich die Aggregation signifikant um 5,2225 % gesteigert (con vs. 50 μM : SD 4,73 %, 95%-KI [0,2608 bis 10,19], $p = 0,0425$).

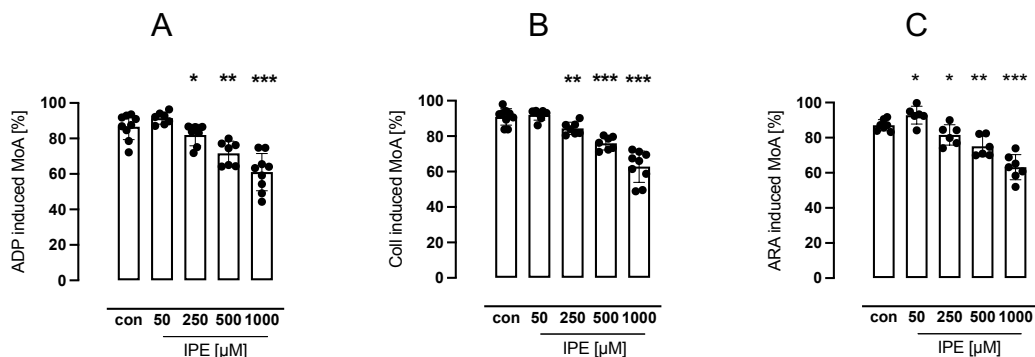


Abbildung 12: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von IPE in vier verschiedenen Konzentrationen

Dargestellt sind die Aggregationsergebnisse als MoA in % unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, $n = 6-9$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, MoA [%] = Maximum of Aggregation, con = Kontrolle, IPE = Eicosapentaensäureethylester, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

3.1.2 Interaktionen mit ASS

Nachfolgend dargestellt sind die Ergebnisse der LTA nach Zugabe der drei Fettsäuren EPA, DHA und IPE, jeweils dosiert mit 1 mM unter Stimulation mit ADP, Kollagen und Arachidonsäure. Zusätzlich untersucht wurde die Interaktion der jeweiligen Fettsäure mit 30 μ M ASS (Acetylsalicylsäure) *in vitro*. Betrachtet wurde dabei die Reduktion des *Maximum of Aggregation* (MoA) in Prozent (%).

EPA

Unter Stimulation mit ADP (A) konnte nach Zugabe von 30 μ M ASS eine Hemmung der Thrombozytenaggregation um 10,78 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (con vs. 30 μ M ASS: SD 4,828 %, 95%-KI [-15,85 bis -5,716], $p = 0,0028$).

Entsprechend der Ergebnisse der LTA in den Versuchsansätzen ohne ASS zeigte sich nach Zugabe von 1 mM EPA eine Reduktion der Aggregation um 24,28 % (con vs. 1 mM EPA: SD 20,36 %, 95%-KI [-45,64 bis -2,912], $p = 0,033$).

In dem Versuchsansatz, in dem die Auswirkung von 30 μ M ASS und 1 mM EPA in Kombination untersucht wurde, konnte im Vergleich zur Kontrolle sogar eine Hemmung der Aggregation um 34,2 % gemessen werden (con vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 17,45 %, 95%-KI [-52,51 bis -15,88], $p = 0,0049$).

Im direkten Vergleich zwischen der Aggregationshemmung nach Zugabe von 30 μ M ASS und nach Zugabe von 30 μ M ASS, sowie 1 mM EPA in Kombination, konnte eine um 23,41 % stärkere Hemmung der Aggregation nachgewiesen werden, als nach alleiniger Zugabe von 30 μ M ASS (30 μ M ASS vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 12,96 %, 95%-KI [-37,01 bis -9,814], $p = 0,0069$).

Ein weniger stark, aber dennoch signifikant ausgeprägter Effekt lässt sich nachweisen, vergleicht man die alleinige Zugabe von 1 mM EPA mit der Zugabe von 30 μ M ASS und 1 mM EPA. Dabei zeigt sich die Aggregation um 9,92 % reduziert (1 mM EPA vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 9,044 %, 95%-KI [-19,41 bis -0,4292], $p = 0,0435$).

Ergebnisse

In den Versuchsansätzen stimuliert mit Kollagen (B), ließen sich folgende Ergebnisse ableiten:

Nach Zugabe von 30 μ M ASS zeigte sich die Aggregation mit deutlicher, aber nicht signifikant um 14,95 % gehemmt (con vs. 30 μ M ASS: SD 17,08 %, 95%-KI [-32,87 bis 2,98], $p = 0,085$).

Nach Inkubation mit 1 mM EPA zeigte sich eine deutliche und nahezu signifikante Reduktion um 26,2 % (con vs. 1 mM EPA: SD 25,07 %, 95%-KI [-52,51 bis 0,1129], $p = 0,0507$).

Ein deutlich signifikantes Ergebnis zeigte sich nach Zugabe von 30 μ M ASS und 1 mM EPA mit einer Hemmung der Aggregation um 36,63 % im Vergleich zur Kontrolle (con vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 24,9 %, 95%-KI [-62,76 bis -10,5], $p = 0,0155$).

Im direkten Vergleich zwischen der Aggregationshemmung nach Zugabe von 30 μ M ASS und nach Zugabe von 30 μ M ASS, sowie 1 mM EPA in Kombination, konnte eine um 21,68 % stärkere Hemmung der Aggregation nachgewiesen werden, als nach alleiniger Zugabe von 30 μ M ASS (30 μ M ASS vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 18,89 %, 95%-KI [-41,51 bis -1,856], $p = 0,0375$).

Auch im Vergleich zwischen alleiniger Zugabe von 1 mM EPA und der Kombination von 30 μ M ASS und 1 mM EPA lässt sich eine Reduktion um 10,43 % nachweisen (1 mM EPA vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 18,72 %, 95%-KI [-30,07 bis 9,209], $p = 0,2304$). Dieses Ergebnis stellt sich allerdings in der Analyse als nicht signifikant dar.

Die Hemmung der Aggregation in den Versuchsansätzen stimuliert mit ARA(C) zeigte sich nach Zugabe von 30 μ M mit 79,3 % im Vergleich zur Kontrolle (con vs. 30 μ M ASS: SD 4,951 %, 95%-KI [-91,6 bis -67], $p = 0,0013$) am deutlichsten reduziert.

Auch die Zugabe von 1 mM EPA führte hierbei zu einer Hemmung des MoA um 74,72 % (con vs. 1 mM EPA: SD 7,812 %, 95%-KI [-94,13 bis -55,32], $p = 0,0036$). Wie bereits zuvor unter Stimulation mit ADP und Kollagen konnte auch hier nach Inkubation von 30 μ M ASS in Kombination mit 1 mM EPA eine im Vergleich zur

Ergebnisse

Kontrolle deutlichere Hemmung um 81,31 % nachgewiesen werden (con vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 5,477 %, 95%-KI [-94,92 bis -67,7], $p = 0,0015$).

Nach Analyse der Ergebnisse aus der Kombination von 30 μ M ASS und 1 mM EPA im Vergleich zur alleinigen Zugabe von ASS zeigte sich mit - 2,011 % eine Tendenz zur, aber nicht signifikante Reduktion der Aggregation (30 μ M ASS vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 2,529 %, 95%-KI [-8,295 bis 4,272], $p = 0,3023$). Ein ähnliches Ergebnis ergab die Analyse der Kombination aus 30 μ M ASS und 1 mM EPA im Vergleich zur alleinigen Zugabe von 1 mM EPA. Hierbei zeigte sich das MoA im Mittel um 6,587 % reduziert (1 mM EPA vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 7,388 %, 95%-KI [-24,94 bis 11,77], $p = 0,2625$). Auch dieses Ergebnis stellte sich trotz bestehender Tendenz als nicht signifikant dar.

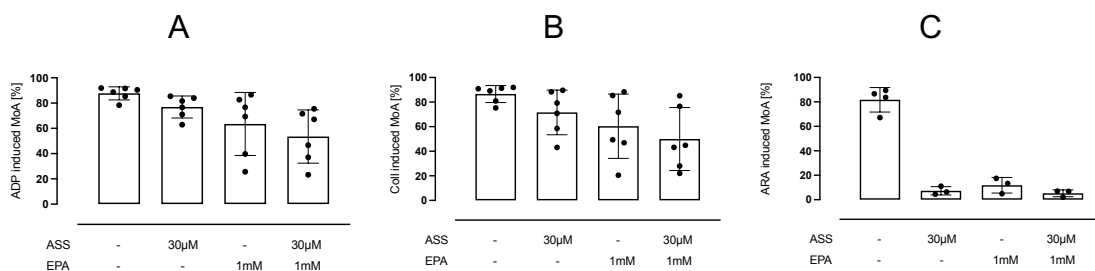


Abbildung 13: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von 1 mM EPA und nach Zugabe von 30 μ M ASS

Dargestellt sind die Aggregationsergebnisse als MoA in % unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus und nach Zugabe von 30 μ M ASS, $n = 3-6$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, MoA [%] = Maximum of Aggregation, con = Kontrolle, EPA = Eicosapentaensäure, ASS = Acetylsalicylsäure, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

DHA

Auf die erneute Darstellung von 1 mM und 250 μ M DHA wurde im Rahmen der Kombinationsversuche verzichtet, da dies bereits zuvor erfolgt ist. Verwiesen wird dafür auf die Ergebnisse der LTA. Die Ergebnisse des Einflusses von DHA und die Versuche in Interaktion mit ASS wurden zeitgleich und mit identischer Probandengruppe erzielt, sodass ein direkter Vergleich möglich ist.

Ergänzt wurde in diesem Zusammenhang lediglich die Untersuchung der Aggregation nach Zugabe von 750 μ M EPA.

Im Vergleich zum Kontrollansatz stellte sich die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit ADP (A) um 4,3 % geringer dar nach Zugabe von 30 μ M ASS (con vs. 30 μ M ASS: SD 4,593 %, 95%-KI [-8,14 bis -0,4602], $p = 0,033$).

Die Zugabe von 30 μ M ASS und 1 mM DHA führte in der Messung zu einer Reduktion um 15,14 % des MoA im Vergleich zum Kontrollansatz (con vs. 30 μ M ASS + 1 mM DHA: SD 5,304 %, 95%-KI [-19,58 bis -10,71], $p = < 0,0001$).

Vergleicht man das Ergebnis der Aggregation nach alleiniger Zugabe von 30 μ M ASS mit dem Ergebnis nach Zugabe von 30 μ M ASS und 1 mM DHA, so zeigt sich das MoA nach Zugabe der Kombination um 10,84 % geringer (30 μ M ASS vs. 30 μ M ASS + 1 mM DHA: SD 5,734 %, 95%-KI [-15,63 bis -6,048], $p = 0,0011$).

Nach Inkubation mit 750 μ M EPA war die Thrombozytenaggregation im Vergleich zum Kontrollansatz um 22,7 % geringer (con vs. 750 μ M EPA: SD 13,47 %, 95%-KI [-33,96 bis -11,44], $p = 0,002$).

Die Kombination aus 750 μ M EPA und 250 μ M DHA führte zu einem im Vergleich zum Kontrollansatz um 36 % geringeren MoA (con vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 14,97 %, 95%-KI [-48,52 bis -23,49], $p = 0,0003$).

Um 13,3 % höher zeigte sich das Aggregationsergebnis nach alleiniger Inkubation mit 750 μ M EPA im Vergleich zum Aggregationsergebnis nach Inkubation mit 750 μ M EPA und 250 μ M DHA in Kombination (750 μ M EPA vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 15,03 %, 95%-KI [0,7347 bis 25,87], $p = 0,0408$).

Ergebnisse

Im Vergleich zum Kontrollansatz stellte sich das MoA nach Zugabe der Kombination von EPA und DHA, sowie 30 μ M ASS um 31,33 % reduziert dar (con vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA + 30 μ M ASS: SD 11,57 %, 95%-KI [-41,01 bis -21,66], $p = 0,0001$).

Im Vergleich zum Versuchsansatz nach alleiniger Zugabe von 30 μ M ASS reduzierte die Kombination aus EPA und DHA das MoA um 31,7 % mehr (30 μ M ASS vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 14,46 %, 95%-KI [-43,8 bis -19,61], $p = 0,0004$).

Auch die Kombination aus EPA, DHA und ASS reduzierte die Thrombozytenaggregation um 27,03 % mehr als 30 μ M ASS allein (ASS 30 μ M vs. ASS 30 μ M + 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 10,84 %, 95%-KI [-36,1 bis -17,97], $p = 0,0002$). In den analysierten Ansätzen stellte sich das Ergebnis der Thrombozytenaggregation nach Zugabe von EPA und DHA im Mittel um 4,67 % geringer dar als nach Zugabe von EPA, DHA und ASS in Kombination (750 μ M EPA + 250 μ M DHA vs. 30 μ M ASS + 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 7,466 %, 95%-KI [-1,572 bis 10,91], $p = 0,1202$). Dieses Ergebnis ist allerdings nicht signifikant.

Stimuliert mit Kollagen (B) reduzierte die Zugabe von 30 μ M ASS die Thrombozytenaggregation nicht signifikant um im Mittel 0,5363 % (con vs. 30 μ M ASS: SD 4,122 %, 95%-KI [-3,982 bis 2,91], $p = 0,7238$).

Verglichen mit der reinen Zugabe von 30 μ M ASS zeigte sich im Vergleich zum Kontrollansatz bei der Zugabe von ASS und 250 μ M DHA eine signifikante Reduktion der Aggregation um 21,72 % (con vs. 30 μ M ASS + 1 mM DHA: SD 6,626 %, 95%-KI [-27,25 bis -16,18], $p = <0,0001$).

Die Kombination aus 30 μ M ASS und 1 mM DHA reduzierte das MoA um 21,18 % mehr als die alleinige Inkubation mit 30 μ M ASS (30 μ M ASS vs. 30 μ M ASS + 1 mM DHA: SD 4,965 %, 95%-KI [-25,33 bis -17,03], $p = < 0,0001$).

Das Ergebnis der Thrombozytenaggregation stellte sich im Vergleich zum Kontrollansatz nach Zugabe von 750 μ M EPA um 16,21 % reduziert dar (con vs. 750 μ M EPA: SD 13 %, 95%-KI [-27,08 bis -5,348], $p = 0,0096$).

Ergebnisse

Auch die Kombination aus 750 μ M EPA und 250 μ M DHA führte zu einer Reduktion des MoA im Vergleich zum Kontrollansatz um 47,77 % (con vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 15,4 %, 95%-KI [-60,64 bis -34,9], $p = < 0,0001$).

Im Vergleich zur Kombination aus 750 μ M EPA und 250 μ M DHA zeigt sich nach alleiniger Zugabe von 750 μ M EPA ein um 31,56 % höheres Aggregationsergebnis (750 μ M EPA vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 9,672 %, 95%-KI [23,47 bis 39,64], $p = < 0,0001$).

Die Kombination aus 750 μ M EPA, DHA und ASS führte zu einem um 50,75 % reduzierten MoA (con vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA + 30 μ M ASS: SD 16,84 %, 95%-KI [-64,83 bis -36,67], $p = < 0,0001$).

Auch im Vergleich zum Versuchsansatz mit 30 μ M ASS zeigte sich das Aggregationsergebnis nach Zugabe der Kombination aus EPA und DHA um 47,23 % mehr reduziert (30 μ M ASS vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 13,11 %, 95%-KI [-58,2 bis -36,27], $p = < 0,0001$).

Die Kombination aus EPA, DHA und ASS reduzierte das MoA sogar um 50,22 % im Vergleich zur alleinigen Zugabe von ASS (ASS 30 μ M vs. ASS 30 μ M + 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 15 %, 95%-KI [-62,76 bis -37,68], $p = < 0,0001$).

Anders als nach Stimulation mit ADP zeigte sich das MoA unter Stimulation mit Kollagen und nach Zugabe von EPA, DHA und ASS nicht signifikant, aber deutlich näher an der Signifikanz, um im Mittel 2,984 % geringer als nach alleiniger Zugabe von EPA und DHA (750 μ M EPA + 250 μ M DHA vs. 30 μ M ASS + 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 4,021 %, 95%-KI [-6,346 bis 0,3782], $p = 0,0740$).

Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Ansätze stimuliert mit ARA (C) dargestellt.

Nach Zugabe von 30 μ M ASS konnte dabei eine Reduktion der Thrombozytenaggregation im Vergleich zum Kontrollansatz um 81,69 % gemessen werden (con vs. 30 μ M ASS: SD 8,517 %, 95%-KI [-88,81 bis -74,57], $p = < 0,0001$).

Ein ähnliches Ergebnis ergab die Messung beim Ansatz nach Zugabe von 30 μ M ASS und 1 mM DHA. Dabei zeigte sich das MoA um 75,63 % gemindert (con vs. 30 μ M ASS + 1 mM DHA: SD 6,225 %, 95%-KI [-80,83 bis -70,42], $p = < 0,0001$).

Im direkten Vergleich dieser beiden Ansätze zeigte sich nach Inkubation mit der Kombination aus 30 μ M ASS und 1 mM DHA ein um 6,066 % höheres MoA als nach alleiniger Inkubation mit 30 μ M ASS (30 μ M ASS vs. 30 μ M ASS + 1 mM DHA: SD 2,951 %, 95%-KI [3,6 bis 8,533], $p = 0,0007$).

Nach Zugabe von 750 μ M EPA konnte eine Reduktion des MoA um 49,77 % im Verhältnis zum Kontrollansatz gemessen werden (con vs. 750 μ M EPA: SD 39,26 %, 95%-KI [-82,59 bis -16,95], $p = 0,0089$).

Eine Kombination aus 750 μ M EPA und 250 μ M DHA steigerte dabei die Hemmung des MoA verglichen mit dem Kontrollansatz auf 77,13 % (con vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 13,39 %, 95%-KI [-88,32 bis -65,93], $p = < 0,0001$).

So zeigte sich nach Inkubation mit der Kombination aus EPA und DHA ein um 27,36 % stärker reduziertes Aggregationsergebnis als nach alleiniger Zugabe von EPA (750 μ M EPA vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 29,84 %, 95%-KI [2,412 bis 52,31], $p = 0,0358$).

Die Zugabe der Kombination aus 750 μ M EPA, 250 μ M DHA und 30 μ M ASS führte zu einer Reduktion des MoA um 83,38 % im direkten Vergleich zum Kontrollansatz (con vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA + 30 μ M ASS: SD 6,861 %, 95%-KI [-89,11 bis -77,64], $p = < 0,0001$).

Vergleicht man das Ergebnis nach alleiniger Inkubation mit 30 μ M ASS mit dem Ergebnis nach Zugabe von 750 μ M EPA und 250 μ M DHA, so zeigte sich die Thrombozytenaggregation nach Zugabe von ASS 30 μ M um im Mittel 4,564 % stärker reduziert als nach Zugabe der Kombination aus EPA und DHA (ASS 30 μ M vs. 750 μ M EPA + 250 μ M DHA: SD 14,29 %, 95%-KI [-7,381 bis 16,51], $p =$

Ergebnisse

0,3963). Dieses Ergebnis präsentiert sich als nicht signifikant bei dennoch bestehender Tendenz.

Auch im Vergleich zur Messung nach alleiniger Zugabe von 30 μM ASS zeigte sich eine nicht signifikante, aber dennoch im Mittel vorhandene Reduktion der Aggregation bei zusätzlicher Gabe der Kombination von EPA und DHA, zusätzlich zu 30 μM ASS, um 1,658 % (ASS 30 μM vs. ASS 30 μM + 750 μM EPA + 250 μM DHA: SD 3,654 %, 95%-KI [-4,74 bis 1,37], $p = 0,2334$).

Auch im Vergleich zur Kombination der zwei Fettsäuren EPA und DHA zeigte sich das MoA nach Zugabe der Kombination aus beiden Fettsäuren mit ASS 30 μM um 6,249 % stärker reduziert (750 μM EPA + 250 μM DHA vs. 30 μM ASS + 750 μM EPA + 250 μM DHA: SD 11,59 %, 95%-KI [-15,94 bis 3,44], $p = 0,1711$). Auch dieses Ergebnis stellt sich trotz deutlicher Tendenz als nicht signifikant dar.

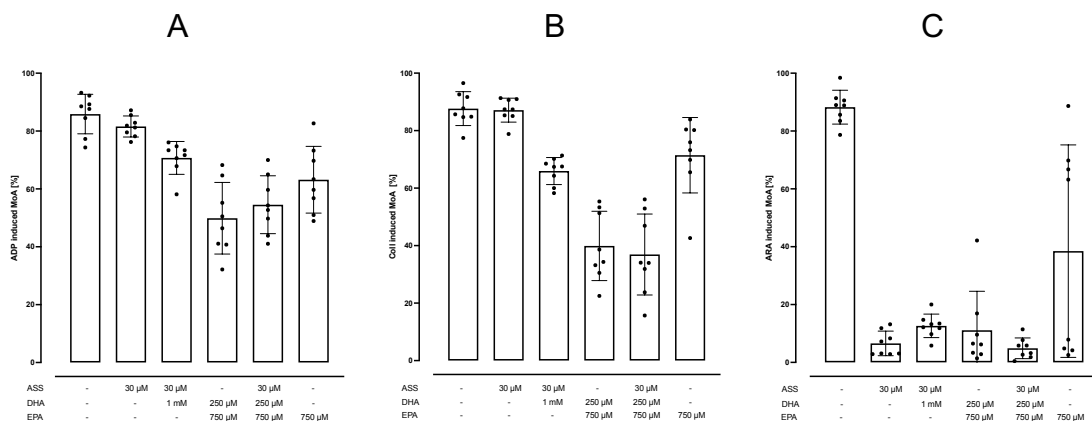


Abbildung 14: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von DHA, EPA und ASS. Die Abbildung zeigt die Aggregation (MoA in %) für ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus und nach Zugabe von 30 μM ASS.

Dargestellt sind die Aggregationsergebnisse als MoA in % unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus und nach Zugabe von 30 μM ASS, $n = 8$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, MoA [%] = Maximum of Aggregation, con = Kontrolle, DHA = Docosahexaensäure, EPA = Eicosapentaensäure, ASS = Acetylsalicylsäure, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

IPE

Im Folgenden dargestellt, sind die Ergebnisse nach Stimulation mit ADP (A).

Nach Zugabe von 30 μ M ASS konnte bei diesem Probandenkollektiv eine Reduktion des MoA um 9,031 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (con vs. 30 μ M ASS: SD 2,466 %, 95%-KI [-11,62 bis -6,443], $p = 0,0003$).

Auch nach Inkubation mit 1 mM IPE zeigte sich eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation um 24,45 % (con vs. 1 mM IPE: SD 7,489 %, 95%-KI [-32,31 bis -16,6], $p = 0,0005$).

Eine Kombination aus 30 μ M ASS und 1 mM IPE führte sogar zu einer Hemmung der Aggregation um 32,87 % im Vergleich zur Kontrolle (con vs. 30 μ M ASS + 1 mM IPE: SD 7,617 %, 95%-KI [-40,86 bis -24,87], $p = 0,0001$).

Eine Kombination aus 30 μ M ASS und 1 mM IPE führte im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 30 μ M zu einer um 23,84 % stärkeren Hemmung der Aggregation (30 μ M ASS vs. 30 μ M ASS + 1 mM IPE: SD 7,074 %, 95%-KI [-31,26 bis -16,41], $p = 0,0004$).

Auch im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 1 mM IPE zeigte sich nach Inkubation mit der Kombination aus 30 μ M ASS und 1 mM IPE eine um 8,413 % stärker gehemmte Aggregation (1 mM IPE vs. 30 μ M ASS + 1 mM IPE: SD 5,305 %, 95%-KI [-13,98 bis -2,846], $p = 0,0116$).

Nach Stimulation mit Kollagen (B) und nach Zugabe von 30 μ M ASS zeigte sich im Mittel im Vergleich zum Kontrollansatz eine Reduktion des MoA um 6,331 % (con vs. 30 μ M ASS: SD 11,43 %, 95%-KI [-18,32 bis 5,661], $p = 0,2328$). Dieses Ergebnis ist nach Analyse allerdings nicht signifikant.

Eine Zugabe von 1 mM IPE führte zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation um 24,11% (con vs. 1 mM IPE: SD 4,388 %, 95%-KI [-28,72 bis -19,51], $p = <0,0001$).

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich das MoA nach Inkubation des Plasmas mit 30 μ M und 1 mM IPE sogar um 28,96 % reduziert (con vs. 30 μ M ASS + 1 mM IPE: SD 6,284 %, 95%-KI [-35,56 bis -22,37], $p = <0,0001$).

Ergebnisse

Vergleicht man die Aggregationsergebnisse nach alleiniger Inkubation mit 30 μ M ASS und nach Inkubation mit der Kombination aus 30 μ M ASS und 1 mM IPE, so zeigt sich nach Zugabe der Kombination aus ASS und IPE eine 22,63 % stärker reduziertes MoA (30 μ M ASS vs. 30 μ M ASS + 1 mM IPE: SD 10,15 %, 95%-KI [-33,28 bis -11,98], $p = 0,0028$).

Im direkten Vergleich des Aggregationsergebnisses nach Inkubation mit 30 μ M ASS und 1 mM IPE und der alleinigen Inkubation mit 1 mM IPE zeigte sich das MoA nur nahezu signifikant, aber im Mittel dennoch um 4,849 % mehr reduziert (1 mM IPE vs. 30 μ M ASS + 1 mM IPE: SD 5,392 %, 95%-KI [-10,51 bis 0,8093], $p = 0,0788$).

In den Versuchsansätzen, stimuliert mit ARA, stellte sich das MoA nach Zugabe von 30 μ M um 55,92 % (con vs. 30 μ M ASS: SD 39,63 %, 95%-KI [-154,4 bis 42,53], $p = 0,1345$) und nach Zugabe von 1 mM IPE um 40,14 % (con vs. 1 mM IPE: SD 29,91 %, 95%-KI [-114,5 bis 34,16], $p = 0,1457$) reduziert dar. Beide Ergebnisse zeigen eine deutliche Tendenz, stellten sich aber als nicht signifikant dar.

Anders als die beiden erstgenannten Ergebnisse zeigte sich im Vergleich zum Kontrollansatz das Aggregationsergebnis nach Zugabe von 30 μ M ASS und 1 mM IPE deutlich signifikant um 84,15 % reduziert (con vs. 30 μ M ASS + 1 mM IPE: SD 7,659 %, 95%-KI [-103,2 bis -65,12], $p = 0,0028$).

Im direkten Vergleich der Ergebnisse nach Zugabe von 30 μ M ASS und der Kombination von 30 μ M ASS und 1 mM IPE zeigte sich das MoA um 28,22 % mehr reduziert (30 μ M ASS vs. 30 μ M ASS + 1 mM IPE: SD 44,47 %, 95%-KI [-138,7 bis 82,23], $p = 0,3682$).

Auch im Vergleich des Einflusses der Kombination aus ASS und IPE mit IPE allein war die Thrombozytenaggregation 44 % stärker reduziert (1 mM IPE vs. 30 μ M ASS + 1 mM IPE: SD 37,28 %, 95%-KI [-136,6 bis 48,6], $p = 0,1776$).

Ergebnisse

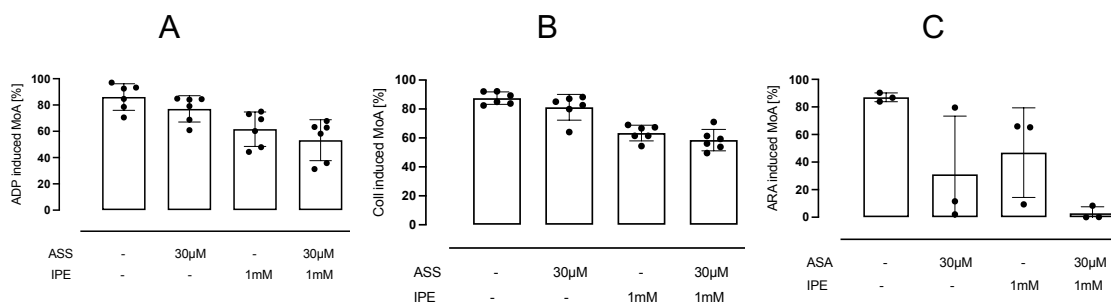


Abbildung 15: Ergebnisse der LTA bei Zugabe von 1 mM IPE und nach Zugabe von 30 µM ASS

Dargestellt sind die Aggregationsergebnisse als MoA in % unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus und nach Zugabe von 30 µM ASS, n = 3–6 (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, MoA [%] = Maximum of Aggregation, con = Kontrolle, IPE = Eicosapentaensäureethylester, ASS = Acetylsalicylsäure, * = p < 0,05, ** = p < 0,0099, *** = p < 0,0009).

3.2 Multielektrodenaggregometrie

3.2.1 Interaktionen mit Fettsäuren

Im Folgenden werden die Ergebnisse der MEA nach Zugabe der drei Fettsäuren EPA, DHA und IPE in vier verschiedenen Konzentrationen und unter Stimulation mit ADP, Kollagen und Arachidonsäure dargestellt. Betrachtet werden dabei die Aggregation, dargestellt in *Aggregation Units* (AU) und die Aggregationsgeschwindigkeit (*Velocity*), dargestellt in *Aggregation Units pro Minute* (AU/min).

EPA

Aggregation

Auch in der Multielektrodenaggregometrie konnte eine signifikante Reduktion der Aggregation nach Zugabe der drei Fettsäuren in unterschiedlicher Konzentration und unter Stimulation mit ADP, Kollagen und Arachidonsäure nachgewiesen werden.

Unter Stimulation mit ADP (A) betrug die Reduktion der Aggregation 15,08 *Aggregation Units* (AU) vom Kontrollwert (con vs. 250 µM: SD 13,94 AU, 95%-KI [-

Ergebnisse

25,79 bis -4,365], $p = 0,0118$). Eine deutliche Zunahme der Hemmung der Aggregation konnte im Vergleich von 250 μM zu 500 μM nicht beobachtet werden. Dennoch zeigte sich auch nach Zugabe von 500 μM EPA die Aggregation signifikant um 15,32 AU gemindert (con vs. 500 μM : SD 14,22 AU, 95%-KI [-26,26 bis -4,389], $p = 0,012$).

Nach Zugabe von 1000 μM EPA konnte eine Minderung der Aggregation um 18,17 AU beobachtet werden (con vs. 1000 μM : SD 13,39 AU, 95%-KI [-28,46 bis -7,877], $p = 0,0036$).

Nach Stimulation mit Kollagen (B) zeigte sich die Aggregation erst nach Zugabe von 500 μM EPA signifikant gemindert. Dennoch bestand bereits in niedriger Konzentration eine Hemmungstendenz ohne signifikante Messwerte. Dabei betrug die Reduktion des Messergebnisses nach Zugabe von 500 μM 14,34 AU vom Kontrollwert (con vs. 500 μM : SD 19,92 AU, 95%-KI [-28,59 bis -0,08964], $p = 0,0489$). Nach Zugabe von 1000 μM betrug die gemessene Hemmung 25,53 AU vom Ausgangswert (con vs. 1000 μM : SD 24,87 AU, 95%-KI [-43,32 bis -7,74], $p = 0,0101$).

In den Versuchsansätzen unter Stimulation mit ARA waren die Messergebnisse ähnlich wie nach Stimulation mit Kollagen. So war die Aggregation erst nach Zugabe von 500 μM EPA mit einer Reduktion um 9,96 AU (con vs. 500 μM : SD 11,8 AU, 95%-KI [-18,4 bis -1,519], $p = 0,0257$) signifikant gemindert.

Nach Zugabe von 1000 μM EPA nahm die Hemmung auf 30,23 AU (con vs. 1000 μM : SD 22,29 AU, 95%-KI [-46,18 bis -14,28], $p = 0,002$) zu.

Ergebnisse

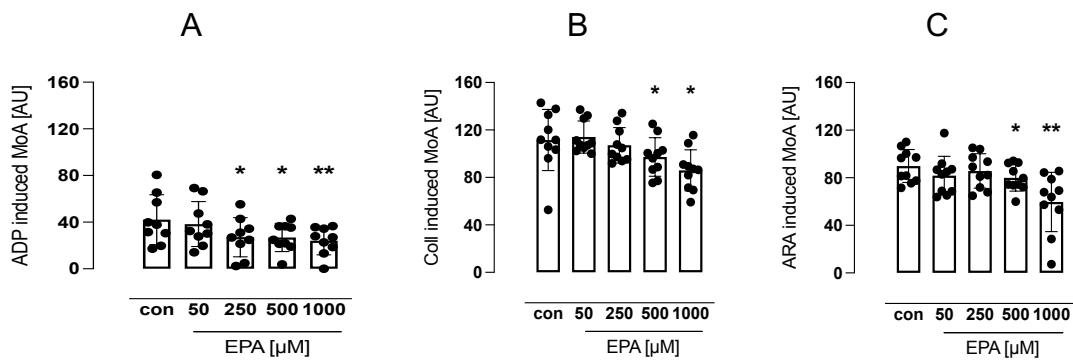


Abbildung 16: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von EPA in vier verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Aggregationsergebnisse in *Aggregation Units* (AU) unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, n = 9–10 (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, con = Kontrolle, EPA = Eicosapentaensäure, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

Aggregationsgeschwindigkeit

Betrachtet man die Aggregationsgeschwindigkeit nach Stimulation mit ADP (A), so zeigt sich diese bereits nach Zugabe von 250 µM EPA um 0,7 AU (con vs. 250 µM: SD 0,9274 AU/min, 95%-KI [-1,413 bis 0,001283], $p = 0,0533$) und nach Zugabe von 500 µM um 1,111 AU/min (con vs. 500 µM: SD 1,488 AU/min, 95%-KI [-2,255 bis 0,03253], $p = 0,0554$) reduziert. Diese Ergebnisse sind allerdings in den untersuchten Ansätzen nicht signifikant.

Ein statistisch signifikantes Messergebnis konnte erst nach Zugabe von 1000 µM EPA nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich die Aggregationsgeschwindigkeit um 1,756 AU/min (con vs. 1000 µM: SD 1,414 AU/min, 95%-KI [-2,843 bis -0,6684], $p = 0,0058$) vermindert.

Auch nach Stimulation mit Kollagen (B) konnte eine Verminderung der Aggregationsgeschwindigkeit nachgewiesen werden. So betrug die Reduktion dieser nach Zugabe von 500 µM EPA 2,440 AU/min (con vs. 500 µM: SD 2,838 AU/min, 95%-KI [-4,47 bis -0,4096], $p = 0,0237$) und nach Zugabe von 1000 µM 4,450 AU/min (con vs. 1000 µM: SD 4,317 AU/min, 95%-KI [-7,538 bis -1,362], $p = 0,0098$).

Ergebnisse

In den Versuchsansätzen nach Stimulation mit ARA (C) stellte sich die Aggregationsgeschwindigkeit nach Zugabe von 500 μM EPA ebenfalls signifikant um 1,43 AU/min (con vs. 500 μM : SD 1,871 AU/min, 95%-KI [-2,769 bis -0,09124], $p = 0,0388$) und nach Zugabe von 1000 μM um 4,04 AU/min (con vs. 1000 μM : SD 3,012 AU/min, 95%-KI [-6,194 bis -1,886], $p = 0,0022$) reduziert dar.

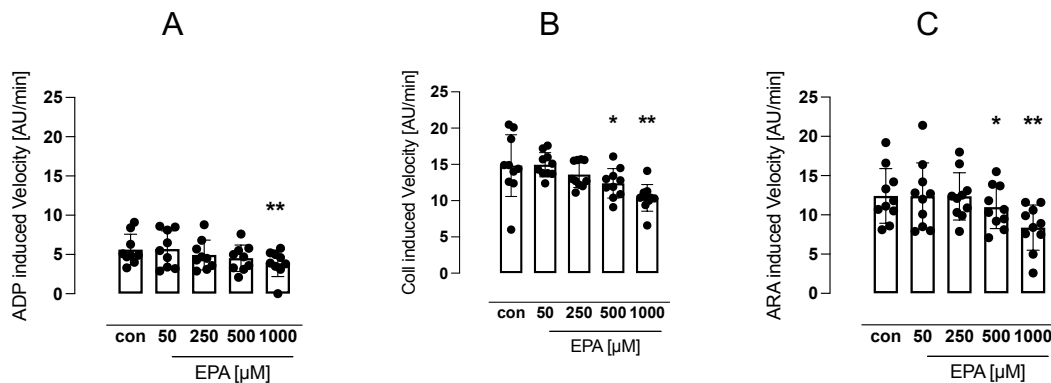


Abbildung 17: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von EPA in vier verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Aggregationsgeschwindigkeitsmessung (*Velocity*) in *Aggregation Units/min* (AU/min) unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, $n = 9-10$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, con = Kontrolle, EPA = Eicosapentaensäure, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

DHA

Aggregation

Die Messergebnisse der MEA waren in den Versuchsansätzen nach Zugabe von DHA stimulusübergreifend am deutlichsten darzustellen.

Bei Stimulation mit ADP (A) stellte sich die Aggregation bereits nach Zugabe von 50 μM DHA reduziert um 9,188 AU (con vs. 50 μM : SD 10 AU, 95%-KI [-17,55 bis -0,8271], $p = 0,0355$) dar.

Fettsäurekonzentrations-abhängig nahm die gemessene Hemmung deutlich zu. So reduzierte sich die Aggregation nach Zugabe von 250 μM um 10,06 AU (con vs. 250 μM : SD 9,356 AU, 95%-KI [-17,88 bis -2,24], $p = 0,0188$), nach Zugabe von 500 μM um 13,04 AU (con vs. 500 μM : SD 10,4 AU, 95%-KI [-21,74 bis -4,339], $p = 0,0094$) und nach Zugabe von 1000 μM um 16,01 AU (con vs. 1000 μM : SD 11,67, 95%-KI [-25,77 bis -6,259], $p = 0,006$).

Ergebnisse

Gleiches galt für die Messergebnisse der Versuchsansätze, stimuliert mit Kollagen (B). Auch hierbei ließ sich eine signifikante Reduktion des Messergebnisses im Vergleich zum Kontrollwert um 16,19 AU (con vs. 50 μ M: SD 9,131 AU, 95%-KI [-23,82 bis -8,554], $p = 0,0015$) bereits nach Zugabe von 50 μ M DHA nachweisen. Die Hemmung der Aggregation zeigte sich auch hier mit steigender Fettsäurekonzentration deutlicher ausgeprägt. Nach Zugabe von 250 μ M reduzierte sich die Aggregation um 26,05 AU (con vs. 250 μ M: SD 12,2 AU, 95%-KI [-36,1 bis -16], $p = 0,0005$).

Nach Zugabe von 500 μ M reduzierte sich die Aggregation um 38,38 AU (con vs. 500 μ M: SD 12,51 AU, 95%-KI [-48,84 bis -27,91], $p = <0,0001$) und nach Zugabe von 1000 μ M sogar um 56,13 AU (con vs. 1000 μ M: SD 13,33 AU, 95%-KI [-67,27 bis -44,98], $p = <0,0001$).

Stimuliert mit Arachidonsäure (C) war die Hemmung der Aggregation ebenfalls deutlich ausgeprägt. Nach Zugabe von 250 μ M DHA konnte eine Hemmung der Aggregation um 16,91 AU (con vs. 250 μ M: SD 8,546 AU, 95%-KI [-24,06 bis -9,768], $p = 0,0008$) und nach Zugabe von 500 μ M um 51,14 AU (con vs. 500 μ M: SD 9,143 AU, 95%-KI [-58,78 bis -43,49], $p = <0,0001$) nachgewiesen werden. Besonders deutlich zeigte sich die Reduktion der Aggregation nach Zugabe von 1000 μ M DHA mit einer Reduktion der Aggregation um 84,64 AU (con vs. 1000 μ M: SD 11,56 AU, 95%-KI [-94,3 bis -74,98], $p = <0,0001$).

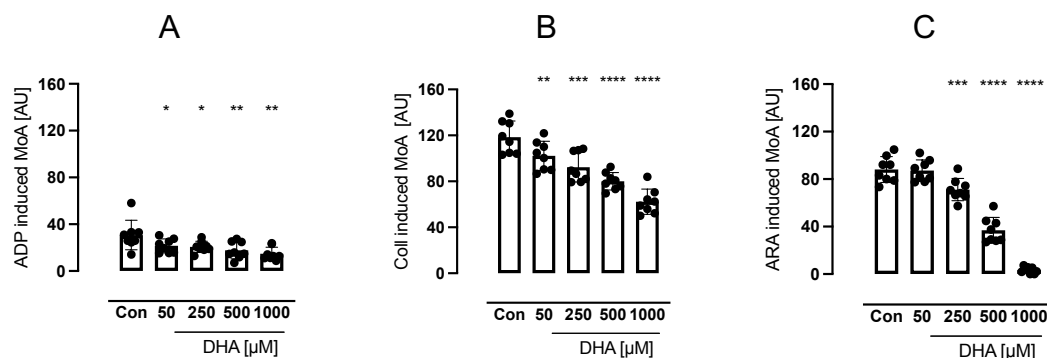


Abbildung 18: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von DHA in vier verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Aggregationsergebnisse in *Aggregation Units* (AU) unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, $n = 8$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, con = Kontrolle, DHA = Docosahexaensäure, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

Aggregationsgeschwindigkeit

Entsprechend der Ergebnisse der Aggregation stellte sich auch die Reduktion der Aggregationsgeschwindigkeit nach Zugabe von DHA sehr deutlich dar.

So zeigte sich unter Stimulation mit ADP (A) nach Zugabe von 50 μM eine signifikante Reduktion um 0,9 AU/min (con vs. 50 μM : SD 0,9957 AU/min, 95%-KI [-1,732 bis -0,06757], $p = 0,0377$). Nach Zugabe von 250 oder 500 μM DHA zeigte sich kein signifikantes Messergebnis.

Nach Zugabe von 1000 μM allerdings, zeigte sich wieder eine signifikante Hemmung der Aggregationsgeschwindigkeit um 1,463 AU/min (con vs. 1000 μM : SD 1,144 AU/min, 95%-KI [-2,419 bis -0,5062], $p = 0,0086$).

In den Versuchsansätzen, die mit Kollagen (B) stimuliert wurden, stellte sich die Minderung der Aggregationsgeschwindigkeit nach Zugabe von allen vier untersuchten Fettsäurekonzentrationen signifikant dar.

Unter Zugabe von 50 μM DHA war die Geschwindigkeit bereits um 2,425 AU/min (con vs. 50 μM : SD 1,352 AU/min, 95%-KI [-3,555 bis -1,295], $p = 0,0014$) reduziert. Fettsäurekonzentrationsabhängig nahm die Ausprägung der Hemmung der Aggregationsgeschwindigkeit zu. Nach Zugabe von 250 μM betrug die Hemmung bereits 3,838 AU/min (con vs. 250 μM : SD 2,706 AU/min, 95%-KI [-6,099 bis -1,576], $p = 0,0051$). Die Zugabe von 500 μM führte zu einer Reduktion um 6,175 AU/min (con vs. 500 μM : SD 2,117 AU/min, 95%-KI [-7,945 bis -4,405], $p = <0,0001$) und die Zugabe von 1000 μM um 7,888 AU/min (con vs. 1000 μM : SD 1,664 AU/min, 95%-KI [-9,279 bis -6,496], $p = <0,0001$).

Auch unter Stimulation mit ARA (C) zeigte sich die Aggregationsgeschwindigkeit nach Zugabe von 250 μM DHA um 2,6888 AU/min (con vs. 250 μM : SD 1,556 AU/min, 95%-KI [-3,99 bis -1,385], $p = 0,0018$) signifikant reduziert.

Hierbei zeigte sich ebenfalls eine fettsäurekonzentrationsabhängige Zunahme der Reduktion der Messergebnisse. Nach Zugabe von 500 μM stellte sich die Geschwindigkeit um 6,275 AU/min (con vs. 500 μM : SD 2,267 AU/min, 95%-KI [-8,17 bis -4,38], $p = 0,0001$) und nach Zugabe von 1000 μM um 10,19 AU/min

Ergebnisse

(con vs. 1000 μ M: SD 2,81 AU/min, 95%-KI [-12,54 bis -7,838], $p = <0,0001$) reduziert dar.

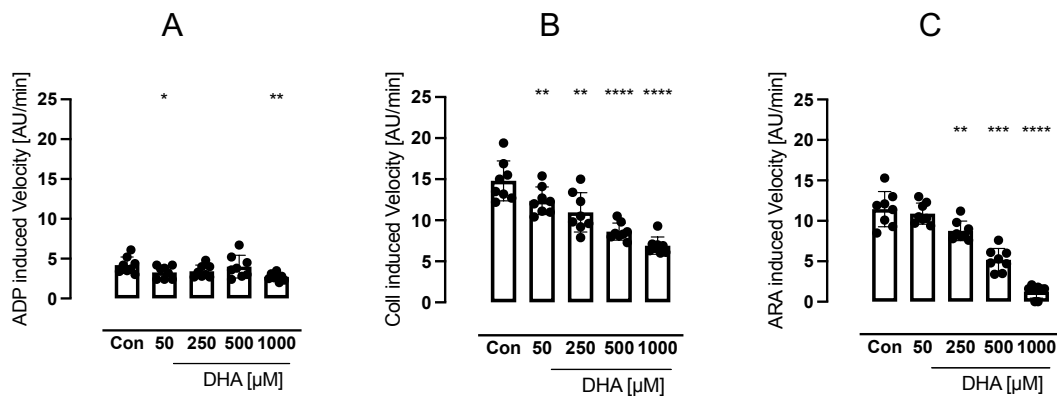


Abbildung 19: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von DHA in vier verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Aggregationsgeschwindigkeitsmessung (*Velocity*) in *Aggregation Units/min* (AU/min) unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, $n = 8$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, con = Kontrolle, DHA = Docosahexaensäure, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

IPE

Aggregation

Anders als nach Zugabe von EPA und DHA und unter Stimulation von ADP, Kollagen und ARA, konnte nach Zugabe von 500 μ M IPE in lediglich einem Versuchsansatz unter Stimulation mit ADP (A) eine signifikante Reduktion der Aggregation um 7,275 AU vom Ausgangswert (con vs. 500 μ M: SD 7,034 AU, 95%-KI [-13,16 bis -1,395], $p = 0,0222$) nachgewiesen werden.

Die Versuchsansätze nach Stimulation mit Kollagen (B) und ARA (C) zeigten keine signifikanten Ergebnisse oder Tendenz zur Reduktion der Messwerte im Vergleich zum Kontrollwert.

Ergebnisse

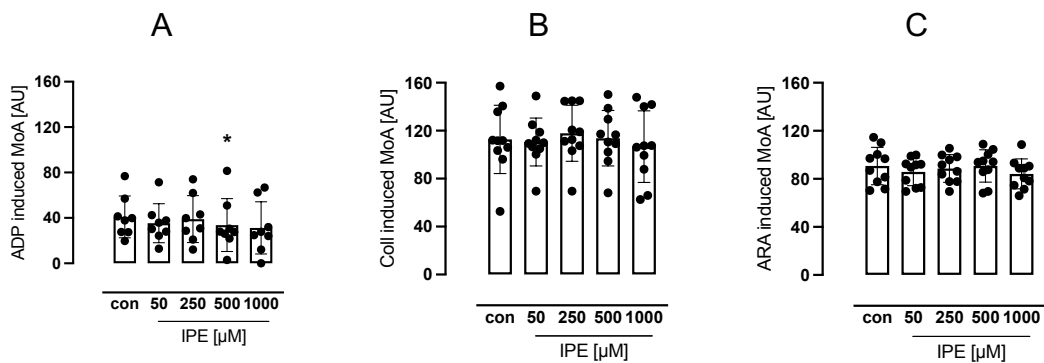


Abbildung 20: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von IPE in vier verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Aggregationsergebnisse in *Aggregation Units* (AU) unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, $n = 8-10$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, con = Kontrolle, IPE = Eicosapentaensäureethylester, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

Aggregationsgeschwindigkeit

Auch die Untersuchung der Aggregationsgeschwindigkeit nach Zugabe von IPE und unter Stimulation mit ADP, Kollagen oder ARA zeigte keine signifikanten Ergebnisse.

Lediglich nach Zugabe von 50 μ M IPE und nach Stimulation mit ADP (A) zeigte sich eine Tendenz mit einer Reduktion der Geschwindigkeit um 0,6375 AU/min (con vs. 50 μ M: SD 0,7633 AU/min, 95%-KI [-1,276 bis 0,0006631], $p = 0,0502$).

Gleiches galt für den Ansatz nach Zugabe von 1000 μ M IPE, stimuliert mit ARA (C). Dabei zeigte sich eine Reduktion um 1,15 AU/min (con vs. 1000 μ M: SD 1,641 AU/min, 95%-KI [-2,324 bis 0,02412], $p = 0,0539$) und damit eine Tendenz zur Reduktion der Aggregationsgeschwindigkeit.

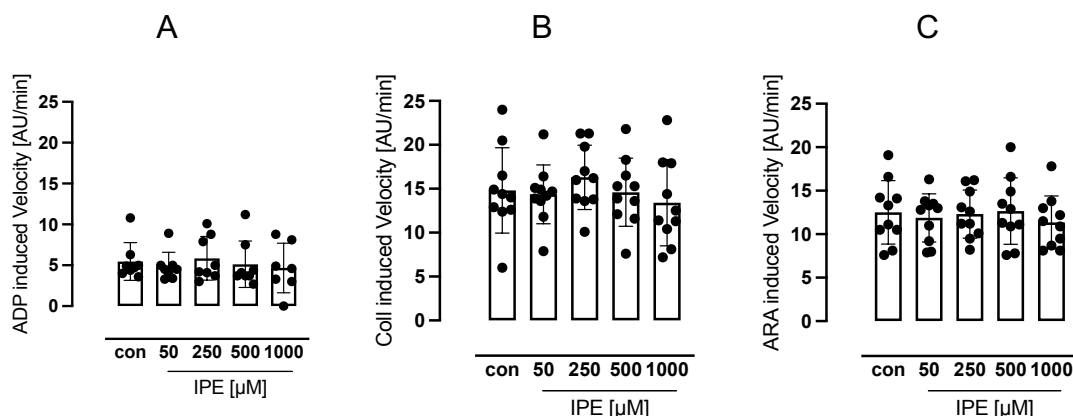


Abbildung 21: Ergebnisse der MEA bei Zugabe von IPE in vier verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Aggregationsgeschwindigkeitsmessung (*Velocity*) in *Aggregation Units/min* (AU/min) unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, $n = 8-10$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, con = Kontrolle, IPE = Eicosapentaensäureethylester, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

3.3.1 TXB₂-Assay unter Interaktion mit Fettsäuren

Nachfolgend dargestellt sind die Ergebnisse der TXB₂-Spiegel, ermittelt mittels ELISA aus dem Plasma der Untersuchungen der LTA nach Zugabe von EPA, DHA und IPE, jeweils stimuliert mit ADP, Kollagen und Arachidonsäure. Die Ergebnisse stellten sich nach Analyse mit wenigen Ausnahmen als nicht signifikant dar.

Im Folgenden beschrieben sind die signifikanten Ergebnisse.

EPA

Unter Stimulation mit ARA (C₂) zeigte sich der TXB₂-Spiegel signifikant um 1218 pg/ml reduziert (con vs. 500 µM: SD 1134 pg/ml, 95%-KI [-2407 bis -28,28], $p = 0,0464$).

Ergebnisse

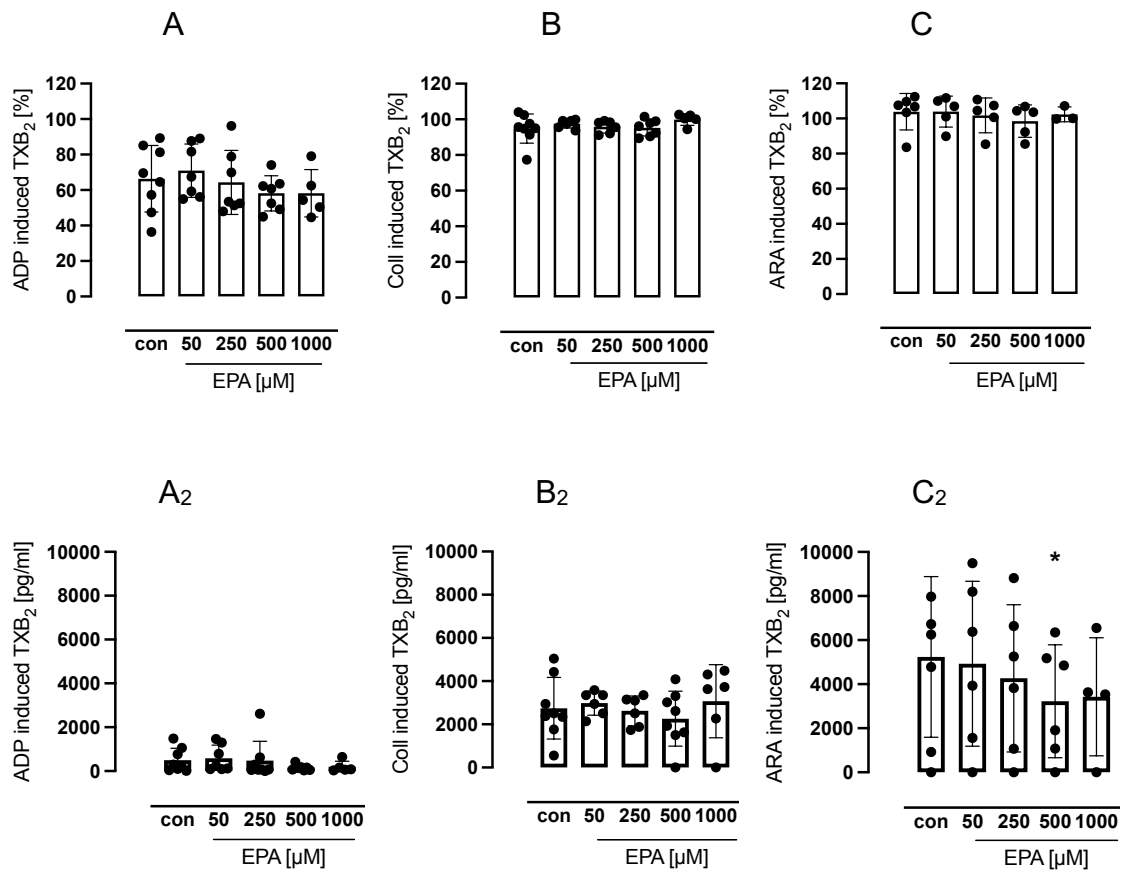


Abbildung 22: Ergebnisse des TXB₂-ELISA bei Zugabe von EPA in vier verschiedenen Konzentrationen

Dargestellt sind die Ergebnisse der TXB₂-Bestimmung als absolute Werte in pg/ml und in % unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, n = 3–8 (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, MoA [%] = Maximum of Aggregation, con = Kontrolle, EPA = Eicosapentaensäure, * = p < 0,05, ** = p < 0,0099, *** = p < 0,0009).

IPE

In den Versuchsansätzen der LTA stimuliert mit ARA (C) stellte sich der TXB₂-Spiegel nach Inkubation mit 250 μM IPE um 2,965 % reduziert dar (con vs. 250 μM : SD 2,415 %, 95%-KI [-5,5 bis -0,4302], p = 0,0299).

Auch im Versuchsansatz mit 1000 μM IPE zeigte sich der TXB₂-Spiegel im Plasma um 1,432 % reduziert (con vs. 1000 μM : SD 1,135, 95%-KI [-2,623 bis -0,2404], p = 0,0272).

Ergebnisse

In absoluten Werten ist ein signifikantes Ergebnis nur im Versuchsansatz nach Inkubation mit 250 μM IPE und unter Stimulation mit ARA (C_2) nachweisbar. Dabei zeigt sich der TXB_2 -Spiegel um 2233 pg/ml reduziert (con vs. 250 μM : SD 2129 pg/ml , 95%-KI [-4202 bis -264,5], $p = 0,322$).

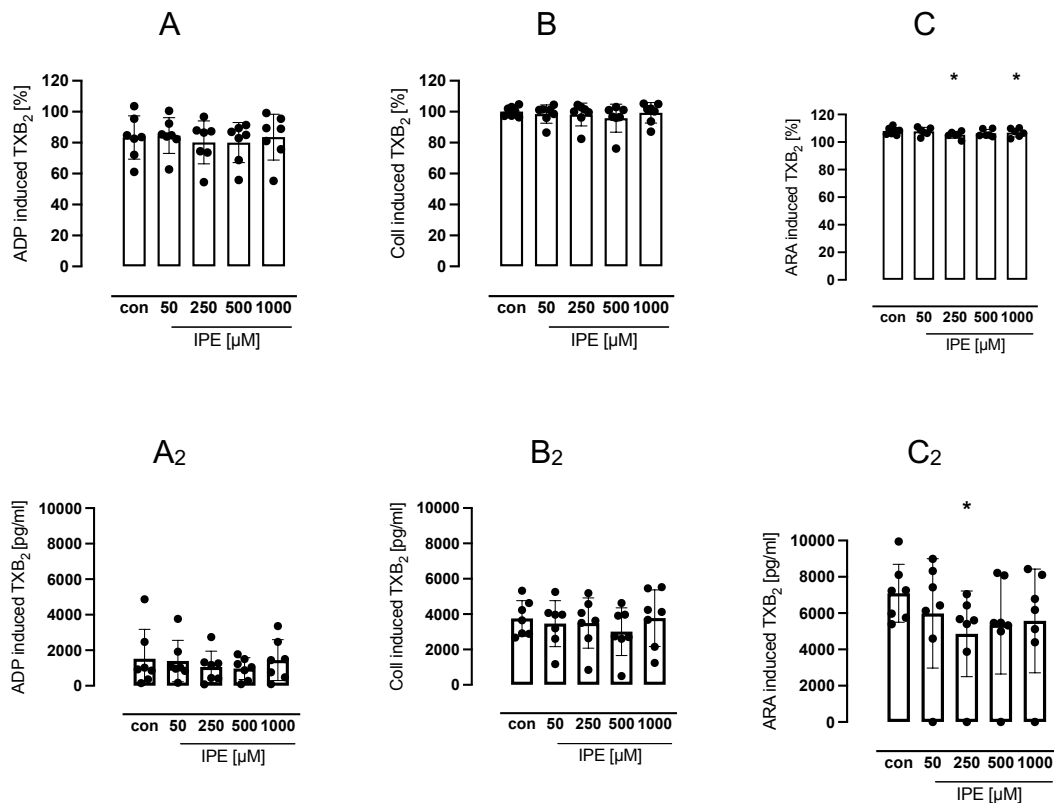


Abbildung 23: Ergebnisse des TXB_2 -ELISA bei Zugabe von IPE in vier verschiedenen Konzentrationen

Dargestellt sind die Ergebnisse der TXB_2 -Bestimmung als absolute Werte in pg/ml und in % unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus, $n = 6-7$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, MoA [%] = Maximum of Aggregation, con = Kontrolle, IPE = Eicosapentaensäureethylester, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

3.3.2 TXB_2 -Assay unter Interaktion mit ASS und Fettsäuren

Im Folgenden dargestellt sind die Ergebnisse der ELISA-Analyse der TXB_2 -Spiegel aus dem Plasma der LTA-Versuche zur Untersuchung der Interaktion der freien Fettsäuren EPA und IPE mit 30 μM ASS. Verwendet als Stimulus wurden auch hier ADP, Kollagen und Arachidonsäure.

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind sowohl in relativen Zahlen in %, als auch in absoluten Zahlen in pg/ml beschrieben und dargestellt.

EPA

In den Versuchsansätzen stimuliert mit ADP (A) stellte sich der TXB₂-Spiegel nach Inkubation mit 30 µM ASS um im Mittel 44,98 % reduziert dar (con vs. 30 µM ASS: SD 6,237 %, 95%-KI [-50,75 bis -39,21], $p = < 0,0001$).

Auch nach alleiniger Inkubation mit 1 mM EPA zeigte sich der TXB₂-Wert um 8,922 % geringer als im Vergleich zur Kontrolle (con vs. 1 mM EPA: SD 4,55 %, 95%-KI [-13,7 bis -4,146], $p = 0,0049$).

Nach Zugabe von 30 µM ASS und 1 mM EPA war der gemessene TXB₂-Wert um 22,92 % geringer als im Kontrollansatz (con vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 5,361 %, 95%-KI [-28,55 bis -17,3], $p = 0,0001$).

Im direkten Vergleich zeigte sich der TXB₂-Spiegel im Ansatz nach alleiniger Zugabe von 30 µM ASS um 20,32 % geringer als nach Zugabe von 30 µM ASS und 1 mM EPA (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 4,322 %, 95%-KI [15,79 bis 24,86], $p = < 0,0001$).

Der im Plasma nach Inkubation mit 1 mM EPA und 30 µM ASS in Kombination gemessene TXB₂-Wert war im Mittel um 14 % geringer, als nach Inkubation mit nur 1 mM EPA (1 mM EPA vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 9,121 %, 95%-KI [-23,57 bis -4,428], $p = 0,0132$).

Absolute Zahlen

In absoluten Zahlen reduzierte die Zugabe von 30 µM ASS den TXB₂-Spiegel im Plasma nach Stimulation mit ADP (A₂) um 1355 pg/ml (con vs. 30 µM ASS: SD 652,9 pg/ml, 95%-KI [-1958 bis -750,8], $p = 0,0015$).

Auch nach Zugabe von 1 mM EPA konnte der TXB₂-Spiegel um 666,9 pg/ml reduziert gemessen werden (con vs. 1 mM EPA: SD 398,5 pg/ml, 95%-KI [-1085 bis -248,7], $p = 0,0094$).

Ergebnisse

Im Vergleich zum Kontrollansatz zeigte sich der TXB₂-Spiegel nach Zugabe von 1 mM EPA und 30 µM ASS um im Mittel 1226 pg/ml reduziert (con vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 687,8 pg/ml, 95%-KI [-1948 bis -504,1], $p = 0,0073$).

Eine Kombination von 1 mM EPA und 30 µM ASS führte zu einem um 174,3 pg/ml höheren Messwert des TXB₂-Spiegels als die alleinige Inkubation mit 30 µM ASS (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 66,78 pg/ml, 95%-KI [104,3 bis 244,4], $p = 0,0014$).

Wie auch in relativen Zahlen stellte sich der TXB₂-Spiegel im Plasma nach Inkubation mit 1 mM EPA im Vergleich zum Ansatz nach Inkubation mit 1 mM EPA und 30 µM ASS um im Mittel 55,9 pg/ml niedriger dar (1 mM EPA vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 539,8 pg/ml, 95%-KI [-1125 bis 7,461], $p = 0,0521$). Dieses Ergebnis stellt sich allerdings als knapp nicht signifikant dar.

Im Folgenden dargestellt sind die Ergebnisse der ELISA-Analyse aus dem Plasma der Ansätze, stimuliert mit Kollagen (B).

Nach Zugabe von 30 µM ASS konnte ein um 24,12 % reduzierter TXB₂-Spiegel nachgewiesen werden (con vs. 30 µM ASS: SD 7,009 %, 95%-KI [-31,48 bis -16,76], $p = 0,0004$).

Auch nach Zugabe von 1 mM EPA zeigte sich der TXB₂-Spiegel mit deutlicher Tendenz, aber nicht signifikant um im Mittel 3,477 % geringer als im Kontrollansatz (con vs. 1 mM EPA: SD 3,616 %, 95%-KI [-7,272 bis 0,3183], $p = 0,0652$).

Der gemessene TXB₂-Spiegel aus dem Plasma des Ansatzes nach Inkubation mit 30 µM ASS und 1 mM EPA in Kombination ergab im Vergleich zum Kontrollansatz einen um 10,47 % geringeren Messwert (con vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 5,025 %, 95%-KI [-15,74 bis -5,194], $p = 0,0038$).

Vergleicht man die Messergebnisse aus dem Plasma nach Inkubation mit der Kombination aus ASS und EPA mit dem Ergebnis nach alleiniger Inkubation mit 30 µM ASS, so ergab sich nach Analyse aus dem Kombinationsansatz ein um 13,65 % höherer TXB₂-Spiegel als aus dem Plasma des Ansatzes nach alleiniger Zugabe von 30 µM ASS (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 9,567 %, 95%-KI [3,613 bis 23,69], $p = 0,0174$).

Ergebnisse

Anders als zuvor beschrieben in Bezug auf ASS, zeigte sich nach Messung des TXB₂-Spiegels aus dem Plasma nach Zugabe der Kombination von EPA und ASS ein um 6,99 % geringerer Messwert als aus dem Plasma des Ansatzes nach alleiniger Inkubation mit 1 mM EPA (1 mM EPA vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 2,432 %, 95%-KI [-9,542 bis -4,438], $p = 0,0009$).

Absolute Zahlen

Auch in absoluten Zahlen zeigte sich nach Stimulation der TXB₂-Spiegel aus den Ansätzen, stimuliert mit Kollagen (B₂) und nach Zugabe von 30 µM ASS reduziert. Die Reduktion im Vergleich zum Kontrollansatz aus der LTA betrug dabei 2655 pg/ml (con vs. 30 µM ASS: SD 944,6 pg/ml, 95%-KI [-3646 bis -1663], $p = 0,001$).

Auch die Analyse des TXB₂-Spiegels aus dem Plasma nach Zugabe von 1 mM EPA ergab entsprechend dem Ergebnis in relativen Zahlen einen nicht signifikanten, aber im Mittel um 781,5 pg/ml geringeren Messwert als der Messwert ermittelt aus dem Plasma des Kontrollansatzes (con vs. 1 mM EPA: SD 763,6 pg/ml, 95%-KI [-1583 bis 19,82], $p = 0,054$).

Die Kombination aus 30 µM ASS und 1 mM EPA führte im Plasma zu einem um 1874 pg/ml geringeren TXB₂-Messwert als im Plasma des Kontrollansatzes (con vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 1110 pg/ml, 95%-KI [-3039 bis -710], $p = 0,009$).

Vergleicht man die TXB₂-Messwerte aus dem Plasma der Ansätze nach alleiniger Zugabe von 30 µM ASS und nach Zugabe von 30 µM ASS und 1 mM EPA, so zeigte sich ein um 780,3 pg/ml höherer Messwert aus dem Plasma des Ansatzes untersucht nach Zugabe der Kombination von 30 µM ASS und 1 mM EPA (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 365,5 pg/ml, 95%-KI [396,7 bis 1164], $p = 0,0034$).

Anders stellte sich das Ergebnis im Vergleich zwischen dem Messwert aus dem Kombinationsansatz und dem Messwert nach alleiniger Zugabe von 1 mM EPA dar. Dabei war im Plasma des Kombinationsansatzes ein um 1093 pg/ml geringerer TXB₂-Spiegel als im Plasma des Ansatzes nach alleiniger Zugabe von 1

Ergebnisse

mM EPA nachweisbar (1 mM EPA vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 721,3 pg/ml, 95%-KI [-1850 bis -335,9], $p = 0,0138$).

Analysiert man die TXB₂-Spiegel aus dem Plasma der Ansätze stimuliert mit ARA (C), so zeigte sich der TXB₂-Spiegel nach Zugabe von 30 μ M ASS um 8,688 % reduziert (con vs. 30 μ M ASS: SD 2,878 %, 95%-KI [-13,27 bis -4,108], $p = 0,0091$).

Nicht signifikant, aber im Mittel um 0,7767 % geringer, stellte sich der TXB₂-Spiegel aus dem Plasma des LTA-Ansatzes nach Zugabe von 1 mM EPA im Vergleich zum TXB₂-Spiegel aus dem Kontrollansatz dar (con vs. 1 mM EPA: SD 4,288 %, 95%-KI [-11,43 bis 9,876], $p = 0,7834$)

Auch der Messwert des TXB₂-Spiegels aus dem Plasma nach Inkubation mit der Kombination aus 30 μ M ASS und 1 mM EPA zeigte sich nicht signifikant, aber mit bestehender Tendenz um 5,977 % geringer als der Messwert ermittelt aus dem Plasma des Kontrollansatzes (con vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 4,541 %, 95%-KI [-17,26 bis 5,303], $p = 0,1502$).

Im Vergleich zum Messwert aus dem Plasma des Ansatzes nach alleiniger Inkubation mit 30 μ M ASS scheint der TXB₂-Messwert im Plasma des Ansatzes nach Inkubation mit 30 μ M ASS und 1 mM EPA, um im Mittel 3,763 % höher zu sein (30 μ M ASS vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 2,144 %, 95%-KI [-1,563 bis 9,09], $p = 0,0933$). Dieses Ergebnis präsentiert sich als knapp nicht signifikant.

Im Kontrast dazu, zeigt sich der TXB₂-Messwert aus dem Plasma des Kombinationsansatzes im Vergleich zum Ansatz nach alleiniger Inkubation mit 1 mM EPA um signifikante 5,2 % geringer (1 mM EPA vs. 30 μ M ASS + 1 mM EPA: SD 0,7662 %, 95%-KI [-7,103 bis -3,297], $p = 0,0072$).

Absolute Zahlen

Die zuvor in relativen Zahlen beschriebenen Ergebnisse lassen sich auch in absoluten Zahlen berechnet nachvollziehen.

Ergebnisse

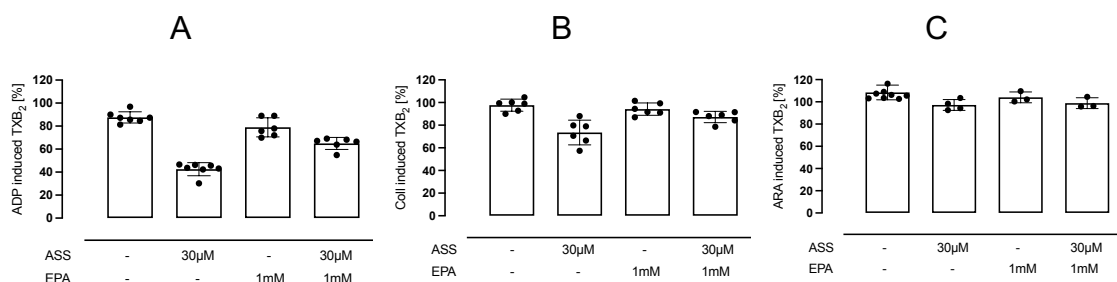
So war der TXB₂-Spiegel im Plasma nach Inkubation mit 30 µM ASS um 2925 pg/ml geringer als im Kontrollansatz (con vs. 30 µM ASS: SD 601,8 pg/ml, 95%-KI [-3882 bis -1967], $p = 0,0023$).

Auch im Plasma nach Zugabe von 1 mM EPA zeigte sich der TXB₂-Spiegel nicht signifikant, aber mit bestehender Tendenz um im Mittel 77,6 pg/ml geringer als im Kontrollansatz (con vs. 1 mM EPA: SD 2100 pg/ml, 95%-KI [-5293 bis 5138], $p = 0,9548$).

Ebenfalls nicht signifikant, aber im Mittel um 1945 pg/ml reduziert, stellte sich der Messwert des TXB₂-Spiegels aus dem Plasma des Ansatzes nach Inkubation mit 30 µM ASS und 1 mM EPA im Vergleich zum Messwert aus dem Plasma des Kontrollansatzes dar (con vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 1466 pg/ml, 95%-KI [-5588 bis 1697], $p = 0,1484$).

Vergleicht man den TXB₂-Spiegel aus dem Plasma nach Inkubation mit 30 µM ASS mit dem Spiegel aus dem Plasma nach Inkubation mit 30 µM ASS und 1 mM EPA, so zeigt sich der Messwert im Kombinationsansatz nicht signifikant, aber gemittelt um 1021 pg/ml höher als im Ansatz nach alleiniger Zugabe von 30 µM ASS (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 917,8 pg/ml, 95%-KI [-1259 bis 3301], $p = 0,1938$).

Verglichen mit dem Messwert aus dem Plasma nach alleiniger Zugabe von 1 mM EPA ergab sich ein um 1868 pg/ml geringerer TXB₂-Spiegel aus dem Plasma des Kombinationsansatzes aus 1 mM EPA und 30 µM ASS (1 mM EPA vs. 30 µM ASS + 1 mM EPA: SD 829,5 pg/ml, 95%-KI [-3928 bis 192,6], $p = 0,0599$). Dieser Wert präsentierte sich nur knapp nicht signifikant.



Ergebnisse

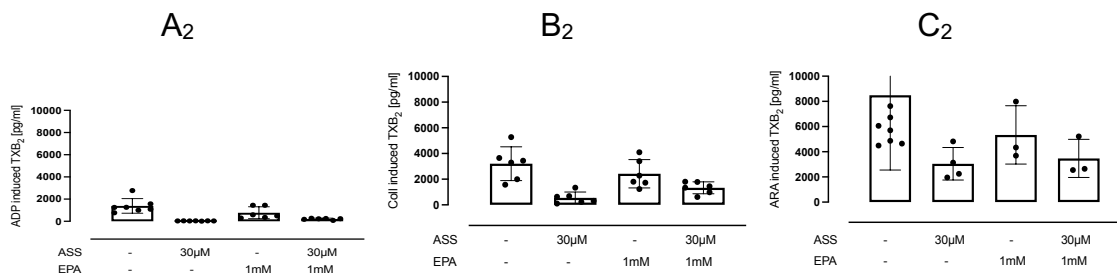


Abbildung 24: Ergebnisse des TXB₂-ELISA bei Zugabe von 1 mM EPA und nach Zugabe von 30 µM ASS

Dargestellt sind die Ergebnisse der TXB₂-Bestimmung als absolute Werte in pg/ml und in % unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus und nach Zugabe von 30 µM ASS, n = 3–9 (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, MoA [%] = Maximum of Aggregation, con = Kontrolle, EPA = Eicosapentaensäure, ASS = Acetylsalicylsäure, * = p < 0,05, ** = p < 0,0099, *** = p < 0,0009).

IPE

Neben den Ansätzen nach Zugabe von EPA und in Interaktion mit ASS wurden auch die TXB₂-Spiegel aus dem Plasma der Ansätze nach Inkubation mit IPE und in Interaktion mit ASS analysiert.

So stellte sich der Messwert des TXB₂-Spiegels im Plasma des Ansatzes, stimuliert mit ADP (A), nach Zugabe von 30 µM ASS um 46,73 % geringer dar als im Plasma des Kontrollansatzes (con vs. 30 µM ASS: SD 16,54 %, 95%-KI [-60,56 bis -32,91], p = < 0,0001).

Der TXB₂-Messwert aus dem Plasma nach Inkubation mit 1 mM IPE stellte sich um durchschnittlich 5,212 % höher dar als der Spiegel im Kontrollansatz (con vs. 1 mM IPE: SD 12,5 %, 95%-KI [-7,902 bis 18,33], p = 0,3538). Dieses Ergebnis war nicht signifikant.

Deutlicher ausgeprägt war die Reduktion des TXB₂-Spiegels im Plasma nach Inkubation mit 30 µM ASS und 1 mM IPE in Kombination im Vergleich zum Spiegel im Plasma des Kontrollansatzes. Dieser zeigte sich dabei um 48,02 % signifikant reduziert (con vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 24,37 %, 95%-KI [-73,59 bis -22,45], p = 0,0048).

Ergebnisse

Nicht signifikant und nur um 0,2 % geringer stellte sich der TXB₂-Messwert aus dem Plasma nach Inkubation mit der Kombination aus 30 µM ASS und 1 mM IPE im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 30 µM ASS dar (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 8,175 %, 95%-KI [-8,779 bis 8,379], $p = 0,9545$).

Vergleicht man allerdings die Spiegel aus dem Plasma nach Inkubation mit ASS und IPE in Kombination mit dem Spiegel aus dem Plasma nach alleiniger Inkubation mit 1 mM IPE, so ergab sich ein signifikant um 53,23 % geringerer Messwert im Plasma des Ansatzes nach Zugabe von ASS und IPE (1 mM IPE vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 17,32 %, 95%-KI [-71,41 bis -35,05], $p = 0,0007$).

Absolute Zahlen

Auch der absolute Messwert des TXB₂-Spiegels zeigte sich im Plasma des Ansatzes stimuliert mit ADP (A₂) und nach Zugabe von ASS um signifikante 1059 pg/ml reduziert (con vs. 30 µM ASS: SD 584,7 pg/ml, 95%-KI [-1547 bis -569,8], $p = 0,0014$).

Wie bereits in relativen Zahlen gezeigt, ergab sich aus dem Plasma des Ansatzes nach Zugabe von 1 mM IPE ein gemittelt 504,8 pg/ml höherer TXB₂-Spiegel als im Kontrollansatz (con vs. 1 mM IPE: SD 1143 pg/ml, 95%-KI [-694,7 bis 1704], $p = 0,3288$). Dieses Ergebnis war nicht signifikant.

Signifikant geringer stellte sich der ermittelte TXB₂-Spiegel aus dem Plasma nach Zugabe von 30 µM ASS und 1 mM IPE im Vergleich zum Plasma aus dem Kontrollansatz dar. Dieser war dabei um 944,3 pg/ml niedriger (con vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 663,3 pg/ml, 95%-KI [-1640 bis -248,2], $p = 0,0175$).

Nicht signifikant und nur um 7,439 pg/ml geringer stellte sich der TXB₂-Messwert aus dem Plasma nach Inkubation mit der Kombination aus 30 µM ASS und 1 mM IPE im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 30 µM ASS dar (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 27,6 pg/ml, 95%-KI [-21,52 bis 36,4], $p = 0,5382$).

Im Vergleich zum TXB₂-Spiegel aus dem Plasma nach alleiniger Zugabe von 1 mM IPE stellte sich der TXB₂-Spiegel aus dem Plasma des Ansatzes nach Inkubation mit 1 mM IPE und 30 µM ASS um 1449 pg/ml geringer dar (1 mM IPE vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 1341 pg/ml, 95%-KI [-2857 bis -41,28], $p = 0,0456$).

Ergebnisse

Der Messwert des TXB₂-Spiegels im Plasma des Ansatzes stimuliert mit Kollagen (B) nach Zugabe von 30 µM ASS stellte sich um 28,82 % geringer dar als im Plasma des Kontrollansatzes (con vs. 30 µM ASS: SD 21,36 %, 95%-KI [-47,68 bis -11,96], p = 0,0055).

Der TXB₂-Messwert aus dem Plasma nach Inkubation mit 1 mM IPE stellte sich wie bei ADP nicht signifikant, aber um durchschnittlich 1,247 % höher dar als der Spiegel im Kontrollansatz (con vs. 1 mM IPE: SD 2,541 %, 95%-KI [-1,42 bis 3,914], p = 0,2833).

Deutlicher ausgeprägt war die Reduktion des TXB₂-Spiegels im Plasma nach Inkubation mit 30 µM ASS und 1 mM IPE in Kombination im Vergleich zum Spiegel im Plasma des Kontrollansatzes. Dieser zeigte sich dabei um 21,65 % signifikant reduziert (con vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 17,79 %, 95%-KI [-40,32 bis -2,979], p = 0,0308).

Der TXB₂-Spiegel im Plasma des Ansatzes nach Zugabe von 30 µM ASS und 1 mM IPE stellte sich um 10,88 % höher dar als im Plasma des Ansatzes nach alleiniger Zugabe von 30 µM ASS (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 10,34 %, 95%-KI [0,01957 bis 21,73], p = 0,0497).

Im direkten Vergleich des Spiegels aus dem Plasma nach Inkubation mit ASS und IPE in Kombination mit dem Spiegel aus dem Plasma nach alleiniger Inkubation mit 1 mM IPE, ergab sich ein signifikant um 22,9 % geringerer Messwert im Plasma des Ansatzes nach Zugabe von ASS und IPE (1 mM IPE vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 16,42 %, 95%-KI [-40,13 bis -5,665], p = 0,0189).

Absolute Zahlen

Um 2450 pg/ml reduziert stellte sich der TXB₂-Spiegel im Plasma des Ansatzes nach Zugabe von 30 µM ASS im Vergleich zum Ergebnis aus dem Plasma des Kontrollansatzes, stimuliert mit Kollagen (B₂), dar (con vs. 30 µM ASS: SD 1303 pg/ml, 95%-KI [-3540 bis -1361], p = 0,0011).

Wie bereits in relativen Zahlen nachweisbar, so ergab sich aus dem Plasma des Ansatzes nach Zugabe von 1 mM IPE ein gemittelt nicht signifikant um 511,8

Ergebnisse

pg/ml höherer TXB₂-Spiegel als im Kontrollansatz (con vs. 1 mM IPE: SD 756,9 pg/ml, 95%-KI [-282,5 bis 1306], p = 0,1585).

Signifikant geringer mit 2690 pg/ml stellte sich der ermittelte TXB₂-Spiegel aus dem Plasma nach Zugabe von 30 µM ASS und 1 mM IPE im Vergleich zum Plasma aus dem Kontrollansatz dar (con vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 1235 pg/ml, 95%-KI [-4224 bis -1157], p = 0,0082).

Anders als in relativen Zahlen nicht signifikant, aber ebenfalls gemittelt mit 214,8 pg/ml höher stellte sich das Messergebnis des TXB₂-Spiegels aus dem Plasma des Ansatzes nach Zugabe von 30 µM ASS und 1 mM IPE im Vergleich zum Plasma des Ansatzes nach alleiniger Zugabe von 30 µM ASS dar (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 347,3 pg/ml, 95%-KI [-216,4 bis 646], p = 0,2389). Vergleicht man die Spiegel aus dem Plasma nach Inkubation mit ASS und IPE in Kombination mit dem Spiegel aus dem Plasma nach alleiniger Inkubation mit 1 mM IPE, so ergab sich ein um 2999 pg/ml geringerer Messwert im Plasma des Ansatzes nach Zugabe von ASS und IPE (1 mM IPE vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 1628 pg/ml, 95%-KI [-5020 bis -978,3], p = 0,0146).

Ähnliche Ergebnisse wie zuvor beschrieben ergaben die Analysen der TXB₂-Spiegel aus dem Plasma der mit ARA (C) stimulierten Ansätze.

In diesen Versuchsansätzen stellte sich der TXB₂-Spiegel nach Inkubation mit 30 µM ASS um im Mittel 8,978 % reduziert dar (con vs. 30 µM ASS: SD 4,054 %, 95%-KI [-15,43 bis -2,527], p = 0,0214)

Der TXB₂-Messwert aus dem Plasma nach Inkubation mit 1 mM IPE stellte sich um durchschnittlich 1,498 % geringer dar als der Spiegel im Kontrollansatz (con vs. 1 mM IPE: SD 2,876 %, 95%-KI [-6,075 bis 3,08], p = 0,3743). Dieses Ergebnis stellte sich als nicht signifikant dar.

Signifikant geringer stellte sich der ermittelte TXB₂-Spiegel aus dem Plasma nach Zugabe von 30 µM ASS und 1 mM IPE im Vergleich zum Plasma aus dem Kontrollansatz dar. Dieser war dabei um 12,61 % niedriger (con vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 4,867 %, 95%-KI [-20,35 bis -4,863], p = 0,014).

Ergebnisse

Nicht signifikant geringer stellte sich der TXB₂-Messwert aus dem Plasma nach Inkubation mit der Kombination aus 30 µM ASS und 1 mM IPE im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 30 µM ASS dar. Die Differenz betrug dabei 3,63 % (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 5,634 %, 95%-KI [-12,6 bis 5,336], p = 0,2879).

Der im Plasma nach Inkubation mit 1 mM IPE und 30 µM ASS in Kombination gemessene TXB₂-Wert war im Mittel um 11,11 % geringer als nach Inkubation mit nur 1 mM IPE (1 mM IPE vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 3,439 %, 95%-KI [-16,58 bis -5,638], p = 0,0075).

Absolute Zahlen

Stimuliert mit ARA (C₂) und nach Inkubation mit 30 µM ASS ergab sich, wie bereits in relativen Zahlen beschrieben, ein um 2961 pg/ml reduzierter TXB₂-Spiegel im Plasma im Vergleich zum Kontrollansatz (con vs. 30 µM ASS: SD 588,1 pg/ml, 95%-KI [-3896 bis -2025], p = 0,0021).

Nicht signifikant, aber im Mittel um 761,1 pg/ml geringer stellte sich der gemessene TXB₂-Spiegel im Plasma nach Inkubation mit 1 mM IPE im Vergleich zum Plasma des Kontrollansatzes dar (con vs. 1 mM IPE: SD 1448 pg/ml, 95%-KI [-3065 bis 1543], p = 0,3704).

Signifikant geringer mit 3863 pg/ml stellte sich der ermittelte TXB₂-Spiegel aus dem Plasma nach Zugabe von 30 µM ASS und 1 mM IPE im Vergleich zum Plasma aus dem Kontrollansatz dar (con vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 1752 pg/ml, 95%-KI [-6650 bis -1075], p = 0,0216).

Nicht signifikant um 902,2 pg/ml geringer stellte sich der TXB₂-Messwert aus dem Plasma nach Inkubation mit der Kombination aus 30 µM ASS und 1 mM IPE im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 30 µM ASS dar (30 µM ASS vs. 30 µM ASS + 1 mM IPE: SD 1436 pg/ml, 95%-KI [-3187 bis 1383], p = 0,2979)

Vergleicht man allerdings die Spiegel aus dem Plasma nach Inkubation mit ASS und IPE in Kombination mit dem Spiegel aus dem Plasma nach alleiniger Inkubation mit 1 mM IPE, so ergab sich ein geringerer Messwert im Plasma des Ansatzes nach Zugabe von ASS und IPE. Die Differenz zwischen den beiden An-

Ergebnisse

sätzen betrug dabei signifikante 3102 pg/ml (1 mM IPE vs. 30 μ M ASS + 1 mM IPE: SD 686,9 pg/ml, 95%-KI [-4195 bis -2009], $p = 0,0029$).

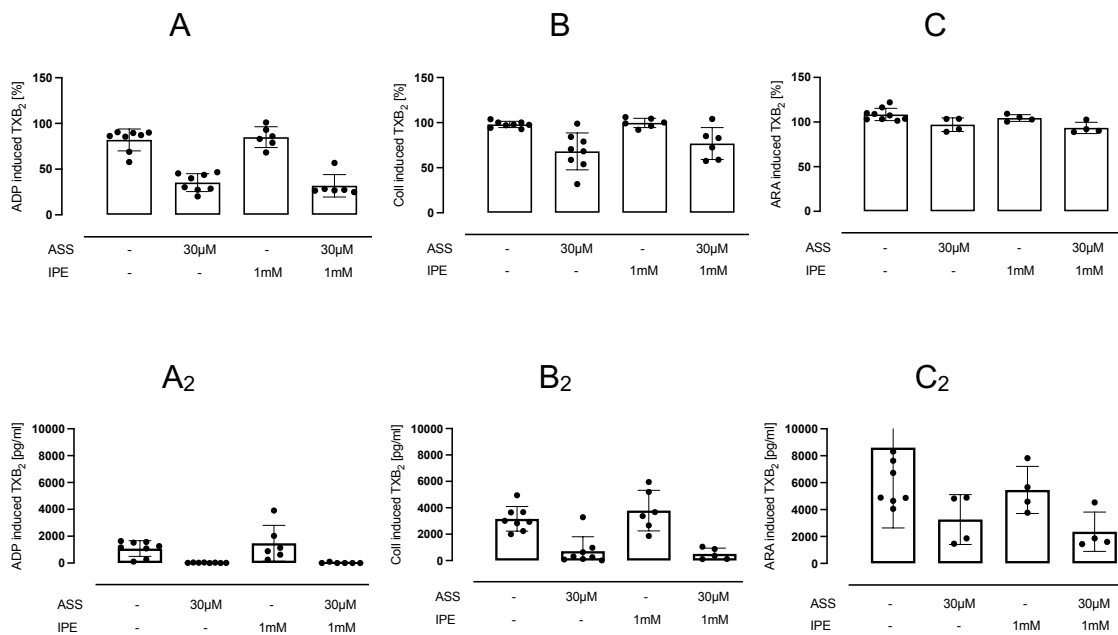


Abbildung 25: Ergebnisse des TXB₂-ELISA bei Zugabe von 1 mM IPE und nach Zugabe von 30 μ M ASS

Dargestellt sind die Ergebnisse der TXB₂-Bestimmung als absolute Werte in pg/ml und in % unter Verwendung von ADP (A), Kollagen (B) und Arachidonsäure (C) als Stimulus und nach Zugabe von 30 μ M ASS, $n = 4-9$ (ADP = Adenosindiphosphat, Coll = Kollagen, ARA = Arachidonsäure, MoA [%] = Maximum of Aggregation, con = Kontrolle, IPE = Eicosapentaensäureethylester, ASS = Acetylsalicylsäure, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,0099$, *** = $p < 0,0009$).

4 Diskussion

4.1 Hauptergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EPA, DHA und IPE *in vitro* signifikante Effekte auf Thrombozyten haben und damit möglicherweise einen protektiven Effekt auf kardiovaskuläre Erkrankungen haben könnten. Die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

1. EPA, DHA und IPE hemmen die Thrombozytenaggregation im Plasma
2. EPA, DHA und IPE hemmen auch in Anwesenheit von ASS mit additivem Effekt die Thrombozytenaggregation im Plasma
3. EPA und DHA hemmen in Kombination auch in Anwesenheit von ASS mit additivem Effekt die Thrombozytenaggregation im Plasma
4. EPA und DHA hemmen die Aggregation und Aggregationsgeschwindigkeit in Vollblut
5. ASS hemmt die TXB₂-Freisetzung aus Thrombozyten
6. ASS und EPA, bzw. ASS und IPE hemmen die TXB₂-Synthese stärker als die Fettsäure, nicht aber als ASS allein

Lichttransmissionsaggregometrie – Interaktion mit Fettsäuren

Anhand der Ergebnisse, ermittelt im Rahmen der Versuche mit Lichttransmissionsaggregometrie, kann angenommen werden, dass alle drei verwendeten Fettsäuren die Thrombozytenaggregation im Plasma hemmen.

Dies zeigt sich deutlich ab Konzentrationen von 250 µM, in einigen Versuchsansätzen bereits ab 50 µM und unabhängig vom Stimulus. Die Hemmung der Aggregation nahm dabei in Abhängigkeit von der Fettsäurekonzentration zu.

Stimuliert mit Arachidonsäure war die Hemmung in Abhängigkeit von der Fettsäurekonzentration und im Vergleich zu den anderen verwendeten Stimuli am ausgeprägtesten. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass, wie in bereits frühen Untersuchungen gezeigt, ARA und die daraus entstehenden Metabolite einen stimulierenden Effekt auf den Metabolismus von EPA haben.[67]

Diskussion

Gleichzeitig zeigte sich unter Stimulation mit Arachidonsäure außer nach Inkubation mit IPE die größte Streubreite.

Bezieht man die Streubreite auf die Fettsäuren, so zeigt sich nach Zugabe von EPA stimulusübergreifend die größte Streubreite der Ergebnisse.

Beides ist möglicherweise zurückzuführen auf individuelle Unterschiede bezüglich der Sensibilität der Thrombozyten im Probandenplasma auf die einzelnen Stimuli und Fettsäuren.

Betrachtet man jeweils die Ergebnisse nach Zugabe von 1000 μM der Fettsäure, so zeigte sich, dass stimuliert mit ADP, IPE das größte Hemmpotenzial mit einer Hemmung des MoA um 25,53 %, gefolgt von EPA mit 14,95 % und DHA in nur geringem Abstand mit 14,91 % besitzt.

Auch in Bezug auf die Stimulation mit Kollagen zeigte IPE die am stärksten ausgeprägte Hemmung mit einer Reduktion der Thrombozytenaggregation um 28,07 %, wieder gefolgt von EPA mit 17,91 % und DHA mit 13,31 %, wobei EPA in diesem Fall mit 4,6 % das im Vergleich zu DHA deutlich ausgeprägtere Hemmpotenzial zeigte als zuvor nach Stimulation mit ADP.

Im Falle der Ansätze, stimuliert mit Arachidonsäure, ergaben die Ergebnisse, anders als in den Ansätzen stimuliert mit ADP oder Kollagen, dass EPA mit 66,93 % den größten hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenaggregation zu besitzen scheint. Auch DHA zeigte eine deutlich hemmende Wirkung mit einer Reduktion des MoA um 58,41 %. Der geringste, aber immer noch deutlich ausgeprägte Effekt ließ sich bei IPE mit einer Hemmung der Thrombozytenaggregation um 23,63 % nachweisen.

Als Ausnahme zu erwähnen gilt bei der LTA das Ergebnis nach Zugabe von 50 μM IPE und unter Stimulation mit Arachidonsäure. Dabei war das MoA deutlich signifikant gesteigert im Vergleich zum Kontrollansatz. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass zumindest niedrige Konzentrationen von IPE einen prokoagulatorischen Effekt haben könnten. Dies könnte zusammenhängen mit der Umwandlung der Fettsäuren durch die Cyclooxygenase 1.

Auch unter Stimulation mit ADP zeigt sich diese Tendenz trotz nicht signifikantem Ergebnis deutlich.

Ob eine Steigerung des MoA auch unter Stimulation mit Kollagen und nach Zugabe von 50 μ M IPE erreicht würde, muss weiter untersucht werden.

Anhand der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Einnahme von freien Fettsäuren im Rahmen der Nahrungsergänzung einen gerinnungshemmenden Effekt und damit einen protektiven Effekt auf das Herz-Kreislauf-System haben könnte.

Lichttransmissionsaggregometrie – Interaktion mit ASS

Dass Acetylsalicylsäure die Thrombozytenaggregation über eine Hemmung der Cyclooxygenase 1 hemmt, ist lange bekannt. [68]

Dies konnte durch die Ergebnisse der LTA mit Ausnahme der Versuchsansätze stimuliert mit Kollagen und im Falle der Versuchsansätze nach Zugabe von IPE und stimuliert mit Arachidonsäure bestätigt werden.

In den Ansätzen ohne signifikantes Ergebnis ist davon auszugehen, dass die Erhöhung der Probandenzahl das Ergebnis beeinflussen könnte, da sich eine deutliche Tendenz zur Hemmung abzeichnet.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob ungesättigte, langkettige freie Fettsäuren einen Einfluss auf den hemmenden Effekt von ASS besitzen und wenn ja, in welcher Form die untersuchten freien Fettsäuren mit ASS interagieren.

Dabei besonders interessant ist die Fragestellung, ob freie Fettsäuren einen additiven Effekt auf die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch ASS haben.

EPA

Die Ergebnisse der LTA zeigen deutlich, dass die Zugabe von ASS und 1 mM EPA in Kombination zu einer stärkeren Hemmung der Aggregation als ASS und EPA jeweils allein führt.

Im Vergleich zu Kontrolle hemmt die Kombination aus ASS und EPA signifikant. Auch im Vergleich nach Zusatz von nur ASS 30 μ M oder 1 mM EPA hemmt die Kombination aus Fettsäure und ASS die Thrombozytenaggregation stimulusunabhängig signifikant stärker. Als Ausnahme zu erwähnen, gelten dabei die An-

Diskussion

sätze stimuliert mit Arachidonsäure. Dabei zeigte sich nach Zugabe der Kombination von ASS und EPA im Vergleich zur alleinigen Zugabe von ASS und EPA eine deutliche, aber in der Analyse als nicht signifikant berechnete Tendenz zur verstärkten Hemmung.

IPE

Auch ASS und 1 mM IPE führten in Kombination zu einer stärkeren Hemmung der Aggregation als ASS und IPE jeweils allein.

Wie bereits bei EPA und ASS, konnte auch diese Kombination im Vergleich zur Kontrolle ein signifikantes Ergebnis in Bezug auf die Hemmung der Thrombozytenaggregation erzielen.

Auch hier zeigten sich stimulusunabhängig im Vergleich zu den Ansätzen nach alleiniger Inkubation mit ASS 30 µM oder 1 mM IPE eine signifikant stärkere Hemmung nach Zugabe der Kombination aus ASS und IPE.

Lediglich unter Stimulation mit Kollagen zeigte sich die Thrombozytenaggregation nach Zugabe der Kombination aus ASS und IPE im Vergleich zu dem Ergebnis nach alleiniger Zugabe von 1 mM IPE zwar deutlich, aber nicht signifikant reduziert.

DHA

Im Falle von DHA wurden o. g. Untersuchungen ebenfalls durchgeführt, ergänzt durch Untersuchungen nach Zugabe einer Kombination aus EPA und DHA im Verhältnis 3: 1.

Verglichen mit dem MoA des Kontrollansatzes und stimuliert mit ADP und Kollagen hemmten ASS und DHA in Kombination signifikant und ebenfalls stärker als jeweils allein.

Dieser Effekt konnte allerdings unter Stimulation mit Arachidonsäure nicht erzielt werden. Dabei zeigte die alleinige Zugabe von ASS einen signifikant stärkeren hemmenden Effekt als die Kombination aus ASS und DHA – warum?

Im Vergleich zu 1 mM DHA alleine hemmte die Kombination aus DHA und ASS allerdings stärker.

Kombination aus EPA + DHA

Da in den vorherigen Versuchen nicht erfolgt, wurden zur Vervollständigung und zu Vergleichszwecken untersucht, ob 750 μM EPA in der LTA das MoA signifikant hemmen. In den Versuchsansätzen konnte stimulusunabhängig nachgewiesen werden, dass auch die Inkubation mit 750 μM EPA die Thrombozytenaggregation signifikant hemmt.

Aus den vorherigen Versuchen ist bereits bekannt, dass das MoA durch die Zugabe von 250 μM DHA reduziert wird und somit von einem aggregationshemmenden Effekt auch dieser Fettsäurekonzentration ausgegangen werden kann.

Auch die Kombination aus 250 μM DHA und 750 μM EPA reduzierte unabhängig vom verwendeten Stimulus das MoA und bewies somit eine signifikant hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation im Plasma.

Interessant ist dabei, ob die o. g. Kombination auch eine stärker hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation zeigte als die Fettsäuren jeweils allein.

Und auch hier konnte stimulusunabhängig gezeigt werden, dass die Kombination aus EPA und DHA mit einer sich ergebenden Gesamtkonzentration von 1 mM FFA eine signifikant stärkere Hemmung des MoA hervorrief als die Fettsäuren in den Konzentrationen von 250 μM und 750 μM jeweils allein.

Somit ist davon auszugehen, dass die Kombination zweier Fettsäuren keineswegs zu einer Konkurrenz um die Bindungsstelle des verstoffwechselnden Enzyms und damit zu einer gegenseitigen Wirkaufhebung führt, sondern vielmehr zu einer verstärkten Wirkung durch die reine Steigerung der zu antikoagulatorisch wirkenden Metaboliten verstoffwechselten Fettsäuremenge. Demnach ist die Kombination zweier Fettsäuren der alleinigen Supplementierung vermeintlich überlegen.

Fraglich ist jedoch, ob 1 mM der Fettsäuren DHA, EPA und IPE der Kombination aus EPA und DHA unterlegen sind. Dazu müsste *in vitro* weiterführenden Untersuchungen angestellt werden.

Aus klinischen Studien lässt sich bisher allerdings kein eindeutiger Vorteil der Kombination zweier Fettsäuren in Präparaten der Nahrungsergänzung ableiten. Vielversprechende Ergebnisse wurden bisher mit einem reinen IPE-Präparat im

Rahmen der REDUCE IT-Studie und mit einem reinen EPA-haltigen Präparat im Rahmen der JELIS-Studie erzielt.[63, 64]

Vergleicht man die Ergebnisse des MoA nach Inkubation mit der Kombination aus 750 μM EPA und 250 μM mit dem Ergebnis nach Zugabe von 30 μM ASS, so lässt sich feststellen, dass stimuliert mit ADP, Kollagen die Fettsäurekombination das MoA stärker reduziert als ASS. Somit kann davon ausgegangen werden, dass über diesen Stimulationsweg der primären Hämostase die Fettsäurekombination der Therapie mit ASS überlegen ist.

In den Ansätzen stimuliert mit ARA konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Dabei zeigte ASS die signifikant stärker hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation.

Dies könnte möglicherweise streuungsbedingt sein betrachtet man die Verteilung der Ergebnisse. Eine Erhöhung der Probandenzahl könnte an dieser Stelle Aufschluss bringen. Sollte sich das Ergebnis dennoch bestätigen, so könnte eine Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein, dass ARA als verwendeter Stimulus, wie auch ASS und die FFA ebenfalls an die COX bindet. Die ausgeprägteren Konkurrenzverhältnisse könnten abhängig von der Affinität das Ergebnis erklären.

Bestehende Studien zu diesem Thema konnten bereits zeigen, dass EPA und Arachidonsäure eine ähnliche Bindungsaffinität an der COX1 besitzen.[69]

Hemmt die Kombination aus EPA, DHA und ASS stärker als ASS alleine?

Wie bereits zuvor in Bezug auf die Fettsäuren EPA, DHA und IPE in der Konzentration von 1 mM untersucht, stellte sich auch bei der Kombination aus EPA und DHA die Frage, ob diese einen additiven Effekt auf die Wirkung von ASS haben und somit eine Kombinationstherapie der alleinigen Gabe von ASS überlegen wäre?

Anhand der Ergebnisse, die unter Stimulation mit ADP und Kollagen eine signifikante und unter Stimulation mit ARA zwar keine signifikante aber dennoch mit deutlicher Tendenz bestehende Reduktion des MoA im Vergleich zur alleinigen Zugabe von ASS zeigten, ist davon auszugehen, dass auch die kombinierte Gabe von EPA und DHA mit ASS der alleinigen Gabe von ASS überlegen wäre.

Hemmt die Kombination aus EPA, DHA und ASS stärker als EPA und DHA zusammen?

Auch im Vergleich zur alleinigen Zugabe von EPA und DHA in Kombination, scheint die Dreierkombination aus EPA und DHA mit ASS eine, stärkeren thrombozytenaggregationshemmenden Effekt zu haben. Die erhobenen Ergebnisse stellten sich unter Verwendung von Kollagen und ARA als Stimuli als nicht signifikant dar, aber mit bestehender, deutlicher Tendenz. Bei Kollagen war diese Tendenz deutlicher ausgeprägt mit einem Ergebnis näher an der Signifikanz als bei Arachidonsäure.

Im Falle der Ansätze stimuliert mit ADP zeigte sich das MoA unter Zugabe von EPA und DHA nicht signifikant, aber stärker reduziert als nach Zugabe von ASS in Kombination mit den beiden Fettsäuren. Eine Erhöhung der Probandenzahl könnte auch hier Aufschluss bringen.

Zusammenfassend ist also anhand der Ergebnisse anzunehmen, dass eine Kombination aus ASS und freier Fettsäure eine Effektsteigerung bezüglich der Hemmung der Thrombozytenaggregation mit sich bringt. Die Kombination aus Nahrungsergänzung mit freien Fettsäuren und einer medikamentösen Therapie mit ASS könnte entsprechend der alleinigen Nahrungsergänzung, wie auch der alleinigen Therapie mit ASS überlegen sein.

Multielektrodenaggregometrie – Interaktion mit Fettsäuren

Um die Frage zu beantworten, ob die drei verwendeten Fettsäuren die Thrombozytenaggregation auch in Vollblut hemmen, wurden die Untersuchungen mittels MEA angeschlossen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl EPA als auch DHA die Thrombozytenaggregation in Vollblut signifikant hemmen. Ein signifikantes Ergebnis und damit eine deutliche Hemmung der Aggregation konnte bei EPA ab Konzentrationen von 500 μM stimulusübergreifend, im Falle der Stimulation durch ADP bereits ab Konzentrationen von 250 μM EPA nachgewiesen werden.

Betrachtet man die Ergebnisse nach Zugabe von DHA, so zeigen diese, dass DHA bereits ab Konzentrationen von 50 μM zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenaggregation führte. Nur unter Stimulation mit Arachidonsäure

zeigte sich eine signifikante Hemmung erst ab einer zugegebenen Menge von 250 μM .

Untersucht man den Effekt von IPE auf die Thrombozytenaggregation, so konnte in den Versuchen nur in wenigen Fällen ein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Ein Rückschluss auf den Effekt von IPE auf die Thrombozytenaggregation in Vollblut *in vitro* lassen diese Ergebnisse nicht zu und werden im Folgenden entsprechend nicht weiter beleuchtet.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass in Bezug auf IPE die Multiplate-Ergebnisse uneindeutig sind wäre die Verwendung von Vollblut in diesen Ansätzen.

Mit Ausnahme der Stimulation mit ADP scheint DHA in Vollblut den stärksten hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation zu haben und auch die Streubreite stellt sich stimulusübergreifend am geringsten dar. Dies stellt einen Unterschied zu den Ergebnissen der LTA dar. Dabei zeigte unter Stimulation mit ADP und Kollagen IPE und unter Stimulation mit ARA EPA das ausgeprägteste hemmende Potenzial. DHA zeigte in Plasma und unter Stimulation mit ADP und Kollagen die geringste hemmende Wirkung aller drei untersuchten Fettsäuren.

Auch in der MEA, genau wie bereits zuvor beschrieben bei der LTA, stellte sich die Aggregation nach Zugabe von DHA und EPA stimuliert mit Arachidonsäure in Abhängigkeit der Fettsäurekonzentration und im Vergleich zu den anderen verwendeten Stimuli am ausgeprägtesten dar.

Wie bereits zuvor beschrieben gilt auch hier die Vermutung, dass diese Beobachtung darauf zurückzuführen, dass ARA und die daraus entstehenden Metabolite einen stimulierenden Effekt auf den Metabolismus von EPA haben.[67]

Weiterführend ist entsprechend davon auszugehen, dass sich dieser Effekt auch auf den Metabolismus von DHA als Produkt der Verstoffwechselung von EPA zeigt.

Die geringste Ausprägung des hemmenden Effektes zeigte sich in der MEA unter Stimulation mit ADP.

Betrachtet man die zusätzlich im Rahmen der MEA untersuchte Aggregationsgeschwindigkeit lässt sich festhalten, dass auch diese durch Zugabe der ungesättigten Fettsäuren reduziert wird.

Vergleicht man an dieser Stelle EPA und DHA miteinander, so zeigt sich, dass nach Stimulation mit ARA und Kollagen DHA die Aggregationsgeschwindigkeit deutlich stärker hemmt als EPA. Unter Stimulation mit ADP zeigt EPA mit nur geringem Abstand zu DHA die stärker hemmende Wirkung.

Beiden Fettsäuren gemein ist, dass unter Stimulation mit ADP die Aggregationsgeschwindigkeit mit der geringsten Ausprägung gehemmt ist.

Nach Zugabe von DHA konnte die stärkere Reduktion der Geschwindigkeit unter Stimulation mit ARA beobachtet werden. Nach Zugabe von EPA war dieser Effekt mit nur kleiner Differenz unter Stimulation mit Kollagen zu beobachten.

Auch hier weisen die Ergebnisse, erhoben nach Zugabe von DHA die geringere Streubreite auf.

Betrachtet man die verwendeten Stimuli, fällt, anders als bei der LTA kein Stimulus durch eine besonders ausgeprägte Streubreite der Ergebnisse auf.

TXB₂-ELISA

Die Analyse der TXB₂-Spiegel mittels ELISA aus dem Plasma der LTA-Versuche zur Untersuchung des Einflusses der freien Fettsäuren auf die Thrombozytenaktivität *in vitro* erbrachten nur wenige Fällen signifikante Ergebnisse. Anhand der wenigen signifikanten Ergebnisse zeichnete sich eine Reduktion der TXB₂-Spiegel nach Zugabe der FFA im Vergleich zum Kontrollansatz ab. Dennoch lässt sich kein sicherer Rückschluss aus diesen Ergebnissen ziehen.

Dies kann grundsätzlich möglicherweise auf eine Interaktion der im Kit enthaltenen markierenden AK für TXB₂ mit PGE₂ oder den im Plasma enthaltenen, in EtOH gelösten Fettsäuren bedingt sein.

An dieser Stelle muss aber nochmals betont werden, dass die Ergebnisse der TXB₂-ELISA zur Untersuchung der Spiegel aus dem Plasma der LTA-Versuche „Interaktion mit ASS“ nach Zugabe von 1 mM der jeweiligen Fettsäure signifikante oder mit deutlicher Tendenz reduzierte TXB₂-Spiegel nachweisen.

Eine erneute Untersuchung mit frischen Plasmaproben nach Inkubation mit Fettsäuren könnte Aufschluss bringen.

Im Folgenden wird näher darauf eingegangen, dennoch sollte auch an dieser Stelle bereits erwähnt werden, dass eine deutliche Inkongruenz der Ergebnisse der TXB₂-Elisa aus dem Plasma der LTA-Ansätze zur Untersuchung des Einflusses der FFA im Vergleich zu den Ergebnissen der TXB₂-ELISA aus dem Plasma der LTA-Ansätze zur Untersuchung der FFA in Interaktion mit ASS besteht.

TXB₂-ELISA – Interaktion mit ASS

Nicht nur, um den Effekt der FFA auf den TXB₂-Spiegel und die Interaktion mit ASS beurteilen zu können, sondern auch, um eine valide Kontrolle zu haben, ob die Untersuchung mittels ELISA geglückt ist, wurde der TXB₂-Spiegel aus Plasma nach Zugabe von 30 µM gemessen. Es ist bekannt, dass ASS die TXB₂-Synthese über Bindung an die COX 1 hemmt.[33]

Dies konnte anhand der Ergebnisse bestätigt werden. In den analysierten Plasmen aus der LTA konnte nach Zugabe von ASS und unabhängig vom Stimulus ein signifikant reduzierter TXB₂-Spiegel nachgewiesen werden.

Reduzieren 1 mM der entsprechenden Fettsäure die TXB₂-Spiegel im Plasma?
Eine signifikante TXB₂-Reduktion konnte nach Zugabe von 1 mM EPA und unter Stimulation mit ADP gemessen werden. Unter Stimulation mit Kollagen und nach Zugabe von 1 mM EPA stellte sich der TXB₂-Spiegel nahezu signifikant reduziert.

Nach Stimulation mit Arachidonsäure und Inkubation mit 1 mM EPA, sowie 1 mM IPE zeigte sich eine Tendenz zur Reduktion, allerdings mit deutlich nicht signifikantem Ergebnis.

Im Kontrast dazu zeigte sich bei den im Plasma nach Zugabe von 1 mM IPE und nach Stimulation mit ADP und Kollagen gemessenen TXB₂-Spiegeln zwar keine signifikante, aber dennoch im Mittel leichte Erhöhung.

Mit Ausnahme des im Plasma nach Stimulation mit ARA und nach Zugabe von 1 mM EPA gemessenen TXB₂-Spiegels, der sich nur tendenziell geringer darstellt,

zeigt sich stimulusunabhängig und bei beiden untersuchten Fettsäuren eine signifikante Reduktion des TXB₂-Spiegels im Plasma verglichen mit dem Spiegel des Kontrollansatzes.

Besonders interessant ist weiterführend, ob die Kombination aus ASS und FFA den TXB₂-Spiegel stärker als ASS und die FFA allein senkt.

In Bezug auf die im Plasma nach alleiniger Inkubation mit 30 µM ASS gemessenen TXB₂-Spiegel stellten sich die TXB₂-Spiegel in den Plasmen der Ansätze nach Zugabe von EPA und 30 µM ASS stimulusunabhängig teilweise sogar signifikant höher dar. Im Falle der TXB₂-Spiegel gemessen im Plasma nach Zugabe von IPE und ASS konnte keine eindeutige Tendenz gezeigt werden. Als Ausnahme zu erwähnen, gilt hier der Ansatz stimuliert mit Kollagen, in dem der TXB₂-Spiegel nach Zugabe von ASS und IPE in Kombination signifikant höher war als nach alleiniger Inkubation mit ASS.

Vergleicht man den TXB₂-Spiegel aus dem Plasma des Kombinationsansatzes aus FFA und ASS mit dem TXB₂-Spiegel aus dem Plasma nach alleiniger Zugabe der Fettsäure, so kann festgehalten werden, dass stimulusübergreifend und im Falle beider untersuchten Fettsäuren der TXB₂-Spiegel im Plasma des Kombinationsansatzes geringer ist als im Plasma des Ansatzes nach alleiniger Inkubation mit der jeweiligen Fettsäure.

Die beschriebenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine Einnahme der Kombination aus ASS und FFA in Bezug auf die Synthese von TXB₂ und damit TXA₂ im menschlichen Plasma mit den entsprechenden Folgen für Hämostase und Herz-Kreislaufsystem der alleinigen Supplementierung von FFA überlegen ist, nicht aber der alleinigen Einnahme von ASS.

Dies passt allerdings nicht zu den Ergebnissen der LTA, die einen eindeutig additiven Effekt zeigen und legt eine Interaktion der entstehenden Metabolite mit denen im Kit enthaltenen AK für TXB₂ umso näher.

Insgesamt scheint die Untersuchung der TXB₂-Spiegel mittels des verwendeten Kits erschwert. Eine Interaktion mit EtOH, in dem die Fettsäuren gelöst wurden, kann allerdings ausgeschlossen werden, da EtOH sowohl in den Kontrollansatz

als auch in den Ansatz mit ASS hinzugegeben wurde, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Eine Interaktion mit den Metaboliten, entstanden, aus den zu untersuchenden Fettsäuren, ist dabei deutlich wahrscheinlicher, aufgrund der Ähnlichkeit zu TXB₂.

4.2 Biochemie des Einflusses von FFA auf die Thrombozytenfunktion

Die Ergebnisse der LTA geben Hinweise darauf, dass die Hemmung der Thrombozytenaggregation im Plasma durch eine kompetitive Hemmung der Cyclooxygenase entsteht. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass EPA auf molekularer Ebene kompetitiv zu Arachidonsäure an die aktive Stelle der thrombozytären Cyclooxygenase 1 bindet. Dadurch wird die Bildung von prokoagulatorisch wirkendem TXA₂ aus Arachidonsäure abgeschwächt.[69]

Es entsteht also zwischen der zu prokoagulatorisch wirkenden Metaboliten (PGE₂, PGI₂, TXA₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄) verstoffwechselten Arachidonsäure im Plasma und den drei verwendeten Fettsäuren, die zu Prostanoiden und Leukotrienen (PGE₃, PGI₃, TXA₃, LTB₅, LTC₅, LTD₅) umgebaut werden, die antiinflammatorische und antikoagulatorische Wirkung besitzen, eine Konkurrenz um die Bindungsstelle.[44]

Diesbezüglich konnten Analysen bereits zeigen, dass EPA und Arachidonsäure eine ähnliche Bindungsaffinität an der COX1 besitzen.[69] Dies stützt zusätzlich die Hypothese dieser Arbeit.

Aus den zuvor dargestellten Ergebnissen der Analyse mittels ELISA ergibt sich allerdings nur in wenigen Fällen eine signifikante Reduktion des TXB₂-Spiegels. Dies kann grundsätzlich möglicherweise auf eine Interaktion der im Kit enthaltenen markierenden Antikörper (AK) für TXB₂ mit anderen Eicosanoiden oder den im Plasma enthaltenen, in EtOH gelösten Fettsäuren bedingt sein. An dieser Stelle muss aber nochmals erwähnt werden, dass die Ergebnisse der TXB₂-ELISA zur Untersuchung der Spiegel aus dem Plasma der LTA-Versuche „Inter-

Diskussion

aktion mit ASS“ nach Zugabe von 1 mM der jeweiligen Fettsäure signifikante oder mit deutlicher Tendenz reduzierte TXB₂-Spiegel nachweisen.

Diese und weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass die TXB₂-Konzentration im Plasma nach Zugabe bzw. Supplementierung von EPA auch in *ex vivo* untersuchten Plasmen reduziert war.[69]

Dies legt nahe, dass die antithrombotische Wirkung der freien Fettsäuren Cyclooxygenase-1-abhängig ist.

TXB₂ stellt dabei einen guten Marker dar, da es ein stabiler Metabolit von TXA₂ ist. TXA₂ wird aus ARA durch die COX-1 metabolisiert und ist für die autokrine und parakrine Aktivierung von Thrombozyten verantwortlich.[57]

Eine Reduktion von TXB₂ steht somit im Einklang mit einer verminderten Thrombozytenreaktivität und könnte klinisch bedeutsam sein, da erhöhte TXB₂-Werte mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert sind und möglicherweise zur Risikoreduktion in REDUCE-IT und JELIS beitragen.[70]

Wie bereits zuvor beschrieben, legt das Ergebnis nach Zugabe von 50 µM IPE und unter Stimulation mit Arachidonsäure nahe, dass niedrige IPE-Konzentrationen prokoagulatorische Effekte haben könnten. Dies könnte zurückzuführen sein auf das bei niedrigen Fettsäurekonzentrationen zugunsten der prokoagulatorisch wirkenden Arachidonsäure verschobene Verhältnis und damit möglicherweise auf eine präferierte Verstoffwechselung auch der Fettsäure IPE zu prokoagulatorischen Metaboliten.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der LTA-Versuche zur Untersuchung der Interaktion mit ASS, so lässt sich festhalten, dass EPA, DHA und IPE einen additiven Effekt auf die bestehende thrombozytenaggregationshemmende Wirkung von ASS zu besitzen scheinen.

In Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass ASS die Bildung von antiinflammatorischen Metaboliten, gebildet aus EPA und DHA anregt. Diese Metabolite werden als Resolvine, gebildet aus EPA und DHA und Protektine, sowie Maresine, gebildet aus DHA bezeichnet.[71]

Diese Erkenntnisse legen nahe, dass auch die Bildung antikoagulatorischer Metabolite aus EPA, DHA und IPE durch die ASS-Wirkung verstärkt werden könnte.

Ebenfalls gezeigt werden konnte, dass ASS die intrazellulären Konzentrationen von Linolensäure, der Vorläufer der Fettsäuren EPA und DHA, sowie ARA, EPA und DHA selbst erhöht. Wie zuvor beschrieben entstehen also aus genannten Fettsäuren vermutlich ASS-vermittelt vasodilatatorisch (NO-vermittelt), thrombozytenaggregationshemmende und antiinflammatorisch wirkende Metabolite.[72]

4.3 Bedeutung von Fettsäuren für das kardiovaskuläre Risiko

Die aktuelle Evidenz zur Bedeutung von EPA, IPE und DHA zur Senkung des kardiovaskulären Risikos ist umstritten. Einerseits zeigten die STRENGTH-, VITAL- und ASCEND-Studie keinen signifikanten Nutzen einer Omega-3-Supplementation (meist als Kombination aus EPA und DHA in moderater Dosierung) im Hinblick auf die Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse.[60-62]

Andererseits konnte in der REDUCE IT-Studie (Bhatt et al. 2019) eine Reduktion der Endpunkte kardiovaskulärer Ereignisse (kardiovaskulärer Tod, nicht-tödlicher Myokardinfarkt, nicht-tödlicher Schlaganfall, koronare Revaskularisationen sowie instabile Angina pectoris) beobachtet werden.[63]

Ein bemerkenswerter Aspekt der REDUCE-IT-Beobachtungen war, dass die beobachtete Risikoreduktion durch EPA/DHA-Kombinationspräparaten mit deutlich höheren Plasmakonzentrationen von reinem EPA erzielt wurden. Dies gibt Hinweise auf eine mögliche dosisabhängige Wirkung von EPA beziehungsweise IPE. [69]

In der REDUCE IT-Studie konnten über die Supplementierung von IPE die höchsten Plasmakonzentrationen von EPA gemessen werden. Im Mittel lag diese bei 476 µM. Diese Konzentrationen konnten durch die Supplementierung freier Fettsäuren über andere Präparate nicht erreicht werden.[62, 63]

Auch die Fettsäureplasmakonzentrationen der Patient/-innen der STRENGTH-Studie sind bekannt. Diese erhielten ein Kombinationspräparat aus insgesamt 4 g EPA/DHA. Dabei lag die Plasmakonzentration von EPA bei gemittelt lediglich

296 μM . Diese Konzentration zeigte keinen Nutzen in Bezug auf kardiovaskuläre Ereignisse.[62]

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten liefern hierzu eine Erklärung. Eine Zugabe von 250 μM der entsprechenden Fettsäuren, in diesem Fall insbesondere EPA, zeigte nur einen geringen antikoagulatorischen Effekt. Dieses Ergebnis legt nahe, dass für einen klinisch relevanten präventiven Effekt auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Sinne von thromboembolischen Ereignissen hohe Dosierungen erforderlich sind.

Darüber hinaus zeigt diese experimentelle Arbeit, dass auch die Zusammensetzung der Fettsäuren eine wesentliche Rolle in Bezug auf die thrombozytenhemmende Wirkung spielt.

In früheren Studien wurde eine stärkere Hemmung der Thrombozytenaggregation durch DHA als durch EPA beschrieben.[73]

Anders als in diesen Studien konnten die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass EPA und IPE eine stärkere hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation zu besitzen scheinen.

Ebenso scheint die Kombination aus EPA und DHA mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM den allen drei einzelnen Fettsäuren in einer Konzentration von 1 mM überlegen zu sein.

Relevant bezüglich einer Nahrungsergänzung mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist auch immer die Wirkung dieser auf den Triglyceridspiegel im Blut. Studien konnten zeigen, dass die untersuchten Fettsäuren, insbesondere EPA, einen thrombozytenaggregationshemmenden Effekt besitzen, unabhängig von einer Wirkung auf den Triglyceridspiegel.[74]

Auch wenn die meisten Studien die Untersuchung der Wirkung von EPA in den Vordergrund stellen, was mit einer Restwahrscheinlichkeit einhergeht, dass IPE als Vorstufe von EPA eine zum Teil andere Wirkung zeigen könnte, so lässt sich dennoch zusammenfassend sagen, dass diese Arbeit in Zusammenschau mit den Ergebnissen bestehender Studien deutlich zeigt, dass die verwendeten mehrfach ungesättigten Fettsäuren EPA, DHA und IPE neben den bekannten

antiinflammatorischen und lipidsenkenden Effekten auch antithrombotische Eigenschaften besitzen.[75]

4.4 Limitationen

Insbesondere die Eigenschaften der verwendeten Fettsäuren sollten an dieser Stelle genannt werden, da diese die Übertragbarkeit der *in vitro*-Versuche auf den Menschen erschweren. Beispielhaft zu nennen ist dabei, dass DHA im menschlichen Organismus bevorzugt in Membranen des Gehirns und der Retina eingebaut wird. Dies kann zu einer unregelmäßigen Verteilung von EPA, IPE und DHA führen und somit die Wirkung von DHA an Thrombozyten limitieren.[76]

Nicht zuletzt beeinflussen auch die chemischen Eigenschaften die pharmakokinetische Wirkung, da insbesondere EPA in Kombinationspräparaten als Carbon-säure und nicht als Ethylester wie in dem in der REDUCE IT-Studie verwendeten Präparat vorliegt.[77]

Unabhängig von den Limitationen bestehend aufgrund der chemischen Eigenschaften der verwendeten Materialien, sind auch andere Gründe zu nennen, die die Aussagekraft der Arbeit limitieren.

Das Probandenkollektiv, dessen Plasma im Rahmen der durchgeführten Versuche Verwendung fand, war zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesund. Insbesondere lagen keine kardiovaskulären Erkrankungen oder Erkrankungen, die das kardiovaskuläre Risiko erhöhen, vor. Zudem nahmen die Probanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Medikamente ein.

Diese Punkte erschweren die Übertragbarkeit auf ein Patientenkollektiv, für das die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse relevant sind.

Auch die Anzahl der Probanden in den einzelnen Versuchsansätzen sollte als Limitation gesehen werden, da es sich um eine geringe Probandenzahl handelt.

Darüber hinaus war die Probandenzahl in einigen der Versuchsansätze gering. Bei Ergebnissen, die sich nach Analyse nahezu signifikant zeigten, ist davon auszugehen, dass die Erweiterung des Probandenkollektivs und damit eine Erhö-

Diskussion

hung der analysierbaren Probandenzahl ein signifikantes Ergebnis zeigen könnte.

Messfehler oder Messungenauigkeiten können bei den vielen einzelnen Schritten im Rahmen der Untersuchungen selbstverständlich nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Gleiches gilt für die Einhaltung immer gleicher Untersuchungsbedingungen. Diese konnten über den Zeitraum der Untersuchungen nicht immer identisch gehalten werden.

Insbesondere in Bezug auf die Zeit zwischen Blutentnahme und Untersuchung und die Zeit zwischen Untersuchung A und Untersuchung B (beispielsweise die Analyse der Plasmen aus den LTA-Versuchen mittels TXB2-Elisa).

4.5 Schlussfolgerung

In dieser Dissertation konnten antithrombotische, durch Thrombozyten vermittelte Effekte nach Zugabe von mehrfach ungesättigten Fettsäuren am Beispiel von EPA, DHA und IPE nachgewiesen werden. Dieser Mechanismus beruht eindeutig auf einer Hemmung der Thrombozytenfunktion. Eine besondere Relevanz erhalten die erhobenen Ergebnisse durch die bisher widersprüchlichen Erkenntnisse früherer klinischer und präklinischer Studien *in vitro*, sowie *in vivo*.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Supplementierung der Fettsäuren EPA, DHA und IPE über eine konzentrationsabhängige Hemmung der Thrombozyten einen positiven Effekt auf das Herz-Kreislauf-System im Sinne der Prävention thromboembolischer kardiovaskulärer Ereignisse haben könnten.

Außerdem liefern sie präklinische Evidenz für die in aktuellen klinischen Studien wie der REDUCE-IT- und JELIS-Studie beobachtete Reduktion ischämischer Ereignisse und zum Teil erhöhter Blutungsneigung bei den Probanden. Diese scheint allerdings angesichts des Nutzens vernachlässigbar.

Zusätzlich lässt sich sagen, dass anhand der Ergebnisse auch die Kombination aus der Supplementierung freier Fettsäuren und einer medikamentösen Therapie mit ASS der Monotherapie überlegen ist. Eine grundsätzliche Kombination im Rahmen der medikamentösen Therapie oder Prävention kardiovaskulärer Ereignisse wäre entsprechend denkbar und sinnvoll.

Diese Arbeit schafft somit eine weitere Grundlage für zukünftige klinische Studien mit hochdosiertem EPA, IPE oder DHA bei Patienten und Patientinnen mit positivem kardiovaskulären Risikoprofil und damit einem hohen Risiko, ein ischämisches Ereignis zu erleiden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3348-54.
2. Kaushansky, K., *Thrombopoiesis*. Semin Hematol, 2015. **52**(1): p. 4-11.
3. Kaplan, J.E. and T.M. Saba, *Platelet removal from the circulation by the liver and spleen*. Am J Physiol, 1978. **235**(3): p. H314-20.
4. Ross, D.W., et al., *Stability of hematologic parameters in healthy subjects. Intraindividual versus interindividual variation*. Am J Clin Pathol, 1988. **90**(3): p. 262-7.
5. Cox, D., S.W. Kerrigan, and S.P. Watson, *Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(6): p. 1097-107.
6. Jenne, C.N., R. Urrutia, and P. Kubes, *Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity*. Int J Lab Hematol, 2013. **35**(3): p. 254-61.
7. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *[The role of platelets in haemostasis, thrombosis, immune defense and inflammation]*. Dtsch Med Wochenschr, 2008. **133**(21): p. 1130-5.
8. Lievens, D. and P. von Hundelshausen, *Platelets in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2011. **106**(5): p. 827-38.
9. Boon, G.D., *An overview of hemostasis*. Toxicol Pathol, 1993. **21**(2): p. 170-9.
10. Dahlback, B., *Blood coagulation*. Lancet, 2000. **355**(9215): p. 1627-32.
11. Versteeg, H.H., et al., *New fundamentals in hemostasis*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 327-58.
12. Hoffman, M. and D.M. Monroe, 3rd, *A cell-based model of hemostasis*. Thromb Haemost, 2001. **85**(6): p. 958-65.
13. Emsley, J., et al., *Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1*. Cell, 2000. **101**(1): p. 47-56.
14. Shida, Y., et al., *Analysis of the role of von Willebrand factor, platelet glycoprotein VI-, and alpha2beta1-mediated collagen binding in thrombus formation*. Blood, 2014. **124**(11): p. 1799-807.
15. Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt, *Cell adhesion mechanisms in platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 403-12.
16. Gremmel, T., A.L. Frelinger, 3rd, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology*. Semin Thromb Hemost, 2024. **50**(8): p. 1173-1186.
17. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates*. Blood Rev, 2009. **23**(4): p. 177-89.
18. Escolar, G. and J.G. White, *The platelet open canalicular system: a final common pathway*. Blood Cells, 1991. **17**(3): p. 467-85; discussion 486-95.
19. Feng, D., et al., *Subcellular distribution of 3 functional platelet SNARE proteins: human cellubrevin, SNAP-23, and syntaxin 2*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4006-14.
20. Golebiewska, E.M. and A.W. Poole, *Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond*. Blood Rev, 2015. **29**(3): p. 153-62.
21. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis*. Toxicol Pathol, 2011. **39**(1): p. 273-80.
22. Mills, D.C., *ADP receptors on platelets*. Thromb Haemost, 1996. **76**(6): p. 835-56.

Literatur- und Quellenverzeichnis

23. Hanasaki, K. and H. Arita, *Characterization of thromboxane A₂/prostaglandin H₂ (TXA₂/PGH₂) receptors of rat platelets and their interaction with TXA₂/PGH₂ receptor antagonists*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(20): p. 3923-9.
24. Clemetson, K.J., *Platelets and primary haemostasis*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 220-4.
25. Scridon, A., *Platelets and Their Role in Hemostasis and Thrombosis-From Physiology to Pathophysiology and Therapeutic Implications*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(21).
26. Rumbaut, R.E. and P. Thiagarajan, in *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. 2010: San Rafael (CA).
27. Smith, S.A., R.J. Travers, and J.H. Morrissey, *How it all starts: Initiation of the clotting cascade*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2015. **50**(4): p. 326-36.
28. Stassen, J.M., J. Arnout, and H. Deckmyn, *The hemostatic system*. Curr Med Chem, 2004. **11**(17): p. 2245-60.
29. Monagle, P. and P. Massicotte, *Developmental haemostasis: secondary haemostasis*. Semin Fetal Neonatal Med, 2011. **16**(6): p. 294-300.
30. Mackman, N., R.E. Tilley, and N.S. Key, *Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(8): p. 1687-93.
31. Fijalkowski, L., et al., *Acetylsalicylic Acid-Primus Inter Pares in Pharmacology*. Molecules, 2022. **27**(23).
32. Harker, L.A. and J.L. Ritchie, *The role of platelets in acute vascular events*. Circulation, 1980. **62**(6 Pt 2): p. V13-8.
33. Fontana, P., et al., *Antiplatelet therapy: targeting the TxA₂ pathway*. J Cardiovasc Transl Res, 2014. **7**(1): p. 29-38.
34. Thomas, M.R. and R.F. Storey, *The future of P₂Y₁₂ receptor antagonists*. Platelets, 2015. **26**(5): p. 392-8.
35. Foster, C.J., et al., *Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs*. J Clin Invest, 2001. **107**(12): p. 1591-8.
36. Tang, J., et al., *Platelet Inhibition Agents: Current and Future P₂Y₁₂ Receptor Antagonists*. Curr Vasc Pharmacol, 2015. **13**(5): p. 566-77.
37. Neumann, F.J., et al., *2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization*. Eur Heart J, 2019. **40**(2): p. 87-165.
38. Norn, S., et al., *[From willow bark to acetylsalicylic acid]*. Dan Medicinhist Arbog, 2009. **37**: p. 79-98.
39. Schror, K., *[100 years of successful drug discovery. The history of aspirin]*. Pharm Unserer Zeit, 2009. **38**(4): p. 306-13.
40. Loll, P.J., D. Picot, and R.M. Garavito, *The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(8): p. 637-43.
41. Bhagwat, S.S., et al., *Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂*. Nature, 1985. **315**(6019): p. 511-3.
42. Patrono, C., G. Davi, and G. Ciabattini, *Thromboxane biosynthesis and metabolism in relation to cardiovascular risk factors*. Trends Cardiovasc Med, 1992. **2**(1): p. 15-20.

Literatur- und Quellenverzeichnis

43. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2018. **39**(2): p. 119-177.
44. Wiktorowska-Owczarek, A., M. Berezinska, and J.Z. Nowak, *PUFAs: Structures, Metabolism and Functions*. Adv Clin Exp Med, 2015. **24**(6): p. 931-41.
45. Kimura, I., et al., *Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease*. Physiol Rev, 2020. **100**(1): p. 171-210.
46. Oh, D.Y. and W.S. Lagakos, *The role of G-protein-coupled receptors in mediating the effect of fatty acids on inflammation and insulin sensitivity*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(4): p. 322-7.
47. Al Mahri, S., et al., *Free Fatty Acid Receptors (FFARs) in Adipose: Physiological Role and Therapeutic Outlook*. Cells, 2022. **11**(4).
48. Miyamoto, J., et al., *Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(4): p. 450.
49. Desbois, A.P. and V.J. Smith, *Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **85**(6): p. 1629-42.
50. Chopra, A., *1-[(11)C]Arachidonic acid*, in *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. 2004: Bethesda (MD).
51. Marnett, L.J., et al., *Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 22903-6.
52. Rukoyatkina, N., et al., *Multifaceted effects of arachidonic acid and interaction with cyclic nucleotides in human platelets*. Thromb Res, 2018. **171**: p. 22-30.
53. Arita, H., T. Nakano, and K. Hanasaki, *Thromboxane A₂: its generation and role in platelet activation*. Prog Lipid Res, 1989. **28**(4): p. 273-301.
54. Kobzar, G., et al., *Comparison of anti-aggregatory effects of PGI₂, PGI₃ and iloprost on human and rabbit platelets*. Cell Physiol Biochem, 2001. **11**(5): p. 279-84.
55. Wang, X., et al., *The Road to Approval: a Perspective on the Role of Icosapent Ethyl in Cardiovascular Risk Reduction*. Curr Diab Rep, 2020. **20**(11): p. 65.
56. Smith, W.L., *Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(1): p. 27-37.
57. Capra, V., et al., *Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(2): p. 126-37.
58. Vaduganathan, M., A.S. Venkataramani, and D.L. Bhatt, *Moving Toward Global Primordial Prevention in Cardiovascular Disease: The Heart of the Matter*. J Am Coll Cardiol, 2015. **66**(14): p. 1535-1537.
59. Bang, H.O., J. Dyerberg, and A.B. Nielsen, *Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos*. Lancet, 1971. **1**(7710): p. 1143-5.
60. Group, A.S.C., et al., *Effects of n-3 Fatty Acid Supplements in Diabetes Mellitus*. N Engl J Med, 2018. **379**(16): p. 1540-1550.
61. Manson, J.E., et al., *Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease*. N Engl J Med, 2019. **380**(1): p. 33-44.

62. Nicholls, S.J., et al., *Effect of High-Dose Omega-3 Fatty Acids vs Corn Oil on Major Adverse Cardiovascular Events in Patients at High Cardiovascular Risk: The STRENGTH Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2020. **324**(22): p. 2268-2280.
63. Bhatt, D.L., et al., *Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia*. N Engl J Med, 2019. **380**(1): p. 11-22.
64. Yokoyama, M., et al., *Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis*. Lancet, 2007. **369**(9567): p. 1090-8.
65. Born, G.V., *Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal*. Nature, 1962. **194**: p. 927-9.
66. Roche. *Testmenü - Nachweis verschiedener Aktivierungswege*. [cited 2025 13.06.2025]; Available from: <https://www.roche.de/diagnostik/produkte-loesungen/systeme/multiplate-analyzer>
67. Morita, I., et al., *Stimulation of eicosapentaenoic acid metabolism in washed human platelets by 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid*. J Biol Chem, 1983. **258**(17): p. 10197-9.
68. Vane, J.R. and R.M. Botting, *The mechanism of action of aspirin*. Thromb Res, 2003. **110**(5-6): p. 255-8.
69. Mourikis, P., et al., *Icosapent ethyl reduces arterial thrombosis by inhibition of cyclooxygenase-1-induced platelet reactivity*. Sci Transl Med, 2025. **17**(799): p. eado0610.
70. Pastori, D., et al., *Urinary 11-dehydro-thromboxane B2 is associated with cardiovascular events and mortality in patients with atrial fibrillation*. Am Heart J, 2015. **170**(3): p. 490-7 e1.
71. Poorani, R., et al., *COX-2, aspirin and metabolism of arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their physiological and clinical significance*. Eur J Pharmacol, 2016. **785**: p. 116-132.
72. Das, U.N., *COX-2 inhibitors and metabolism of essential fatty acids*. Med Sci Monit, 2005. **11**(7): p. RA233-7.
73. Lagarde, M., et al., *In vitro and in vivo bimodal effects of docosahexaenoic acid supplements on redox status and platelet function*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2018. **138**: p. 60-63.
74. Nosaka, K., 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**: p. 173-179.
75. O'Connell, T.D., et al., *Mechanistic insights into cardiovascular protection for omega-3 fatty acids and their bioactive lipid metabolites*. Eur Heart J Suppl, 2020. **22**(Suppl J): p. J3-J20.
76. Mason, R.P., P. Libby, and D.L. Bhatt, *Emerging Mechanisms of Cardiovascular Protection for the Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020. **40**(5): p. 1135-1147.
77. Chevalier, L. and M. Plourde, *Comparison of pharmacokinetics of omega-3 fatty acid supplements in monoacylglycerol or ethyl ester in humans: a randomized controlled trial*. Eur J Clin Nutr, 2021. **75**(4): p. 680-688.

6 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm für die Möglichkeit eine Dissertation in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Universitätsklinik Düsseldorf angefertigt haben zu dürfen.

Außerdem gilt mein aufrichtiger Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Amin Polzin, sowie meinem Zweitbetreuer Herrn Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld für ihre Betreuung.

Sie standen mir während des Projekts beratend und unterstützend zur Seite.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. med. Tobias Zeus und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock für die Erstellung der Gutachten zu meiner Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Arbeitsgruppe und den Mitarbeitern des kardiologischen und pharmakologischen Labors für Ihre Ideen, unterstützenden Worte und Zeit, die sie sich für mich genommen haben.

Ein ebenso besonderer Dank gilt der Familie meines Mannes, die mich während des Studiums und dieses Projektes stets unterstützt haben. Nicht zuletzt Ihretwegen hatte ich die Motivation, diese Dissertation fertigzustellen. Aus Ihrer Sicht, kam es wohl nie in Frage, aufzugeben.

Mein wohl größtes und aufrichtigstes Danke möchte ich meinem Mann, Ramy, aussprechen, der mich über die vielen Jahre dieses Promotionsvorhabens stets unterstützt hat. Es war eine Zeit voller Höhen und Tiefen und diese Doktorarbeit stand nicht nur einmal davor, zu scheitern. Du hast mich darin bestärkt, weiterzumachen und nur mit Dir konnte ich dieses Projekt jetzt beenden. Ich danke Dir für die Kraft, die du mir gegeben hast, Deine motivierenden Worte und dafür, dass Du mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast.