

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie

**Assoziation des akuten Koronarsyndroms mit kritischen
Veränderungen des thrombozytären Lipidoms**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Harm, Tobias

2022

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Gawaz
2. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Hofbeck
3. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Seyfarth

Tag der Disputation: 27.07.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1. Epidemiologie und Nomenklatur.....	10
1.2. Thrombozytäres Lipidom.....	11
1.3. Ziele der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden	16
2.1. Studienpopulation	16
2.2. Thrombozytäre Lipidom-Analyse.....	18
2.3. Follow-Up-Untersuchung.....	20
2.4. Experimentelle Daten	20
2.4. <i>Ex vivo</i> Plättchen-abhängige Thrombusbildung	21
2.5. Plättchen-Impedanzaggregometrie.....	22
2.6. Quantifikation der P-Selectin-abhängigen Plättchenaktivierung.....	24
2.7. Thrombelastographie	26
3. Ergebnisse	27
3.1 Charakterisierung des thrombozytären Lipidoms in der koronaren Herzerkrankung	27
3.1.1. Thrombozytäre Glycerophospholipide als Risikomarker des ACS.....	31
3.1.2. Einfluss einer Statintherapie auf das thrombozytäre Lipidom	37
3.1.3. P2Y ₁₂ -Inhibitor-assoziierte Variabilität des thrombozytären Lipidoms ..	39
3.1.4. Dyslipidämie-assoziierte Alterationen des thrombozytären Lipidoms ...	42

3.1.5. Abhängigkeiten der in ACS-Patienten erhöhten Glycerophospholipid-Risikomarker	45
3.1.6. Korrelation des veränderten thrombozytären Lipidoms in Patienten mit ACS und dem Grad myokardialer Schädigung	48
3.1.7. Signifikante Alteration der Glycerophospholipide im Follow-Up.....	50
3.2 Einfluss des signifikant veränderten thrombozytären Lipidoms in Patienten mit ACS auf die Plättchenfunktion.....	53
3.2.1. Signifikant veränderte Thrombusformierung durch Glycerophospholipid-Einwirkung.....	53
3.2.2. Signifikant erhöhte Glycerophospholipid-induzierte Thrombozytenaggregation	56
3.2.3. PC 18:0-medierte Verstärkung der CD62P-Plättchenaktivierung	57
3.2.3. Veränderungen der plasmatischen Gerinnung durch Glycerophospholipide.....	58
4. Diskussion	60
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	60
4.2. Diskussion der Methoden	60
4.2.1. KHK-Kollektiv und thrombozytäre Lipidom-Analyse.....	60
4.2.2. Experimentell untersuchte Glycerophospholipide	61
4.2.3. Experimentelle Methodik.....	62
4.3. Diskussion der Ergebnisse.....	63
4.3.1 Charakterisierung des thrombozytären Lipidoms in Patienten mit ACS	63
4.3.2. Beeinflussung des thrombozytären Lipidoms durch Dyslipidämien	65
4.3.3. Modifikation des thrombozytären Lipidoms mittels P2Y ₁₂ - / HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren	66
4.3.4. Das signifikant veränderte Lipidom in Patienten mit ACS bleibt unbeeinflusst von kardiovaskulären Risikofaktoren und pharmakologischen Therapien	67

4.3.5. Prädiktion des Myokardschadens mittels ACS-assoziiertes Glycerophospholipide.....	69
4.3.6. Konspekt der Follow-Up-Ergebnisse.....	70
4.3.7. Unterschiede der Glycerophospholipid-medierten Thrombusbildung ..	71
4.3.8. Erhöhte Arachidonsäure- und Kollagen-abhängige Thrombozyten-Aggregation durch PC 18:0.....	71
4.3.9. PC 18:0-induzierte P-Selectin-abhängige Plättchenaktivierung.....	72
4.3.10. Thrombelastographische Interpretation des prokoagulaorischen Zustandes in Anwesenheit der Glycerophospholipide	73
4.4. Translatorische Perspektive.....	73
5. Zusammenfassung.....	75
6. Literaturverzeichnis	77
7. Erklärungen zum Eigenanteil.....	85
8. Veröffentlichung.....	86
9. Danksagung.....	87

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 VERÄNDERUNGEN DES THROMBOZYTÄREN LIPIDOMS BEEINFLUSSEN DIE PLÄTTCHENFUNKTION UND PATHOGENESE DES AKUTEN KORONARSYNDROMS	15
ABBILDUNG 2 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FLUSSKAMMERPERFUSION GLYCEROPHOSPHOLIPID-INKUBIERTER PLÄTTCHEN.....	22
ABBILDUNG 3 INTERPRETATION DER PLÄTTCHEN-IMPEDANZAGGREGOMETRIE	23
ABBILDUNG 4 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE P-SELECTIN/CD62P-BESTIMMUNG	25
ABBILDUNG 5 THROMBELASTOGRAPHIE-KURVENSHEMA.....	26
ABBILDUNG 6 ANALYSEN DES THROMBOZYTÄREN LIPIDOMS ZEIGTEN EINE AUSGEPRÄGTE DIVERSITÄT DER DETEKTIERTEN LIPIDE IN PATIENTEN MIT KORONARER HERZERKRANKUNG.....	28
ABBILDUNG 7 GLYCEROPHOSPHOLIPIDE BILDEN DEN GRÖßTEN ANTEIL DES THROMBOZYTÄREN LIPIDOMS IN KHK-PATIENTEN	29
ABBILDUNG 8 GLYCEROPHOSPHOLIPIDE WEISEN DIE HÖCHSTEN KONZENTRATIONEN UND EIN HOHES MAß AN VARIABILITÄT IN PATIENTEN MIT KORONARER HERZERKRANKUNG AUF.....	30
ABBILDUNG 9 THROMBOZYTÄRE GLYCEROPHOSPHOLIPIDE ZEIGEN EINE KRITISCHE HERAUFREGULIERUNG IN PATIENTEN MIT AKUTEM KORONARSYNDROM.....	32
ABBILDUNG 10 HERAUFREGULIERTE THROMBOZYTÄRE GLYCEROPHOSPHOLIPIDE TEILEN SPEZIFISCHE CHARAKTERISTIKA IN PATIENTEN MIT ACS.....	33
ABBILDUNG 11 PC:18:0 ZEIGT DIE GRÖßTE HERAUFREGULIERUNG INNERHALB DES THROMBOZYTÄREN LIPOMS DER PATIENTEN MIT ACS	34
ABBILDUNG 12 KURZKETTIGE GLYCEROPHOSPHOLIPIDE ZEIGEN ERNIEDRIGTE KONZENTRATIONEN IN GESUNDEN PROBANDEN UND AGIEREN ALS KHK-SPEZIFISCHE MARKER	36
ABBILDUNG 13 TRIGLYCERIDE SIND IN ENTSCHEIDENDEM AUSMAß HERAUFREGULIERT IN PATIENTEN MIT EINER STATINTHERAPIE.....	39
ABBILDUNG 14 PATIENTEN MIT P2Y ₁₂ -INHIBITOR-THERAPIE WEISEN HERAUFREGULIERUNGEN SPEZIFISCHER GLYCEROPHOSPHOLIPIDE DES THROMBOZYTÄREN LIPIDOMS AUF	40

ABBILDUNG 15 VERÄNDERTE LIPIDE IN PATIENTEN MIT KHK KÖNNEN UNABHÄNGIG EINER MEDIKAMENTÖSEN THERAPIE ACS-PATIENTEN GEGENÜBER DEM CCS ABGRENZEN	41
ABBILDUNG 16 PATIENTEN MIT ERHÖHTEM LIPOPROTEIN-RISIKOPROFIL ZEIGEN CHARAKTERISTISCHE VERÄNDERUNGEN DER KONSTITUTION DES THROMBOZYTÄREN LIPIDOMS AUF.....	44
ABBILDUNG 17 PATIENTEN MIT EINER KORONAREN HERZERKRANKUNG ZEIGEN HERABREGULIERUNGEN DES THROMBOZYTÄREN LIPIDOMS MIT ÜBERSCHNEIDUNGEN ZU REGULATIONEN DER LIPIDE DURCH EINE PHARMAKOTHERAPIE ODER DYSLIPIDÄMIE	46
ABBILDUNG 18 HERAUFREGULIERTE LIPIDE IN PATIENTEN MIT ACS SIND ROBUSTE ERKRANKUNGS-SPEZIFISCHE MARKER UND BLEIBEN UNBEEINFLUSST DURCH KLINISCHE FAKTOREN	47
ABBILDUNG 19 HERAUFREGULIERTE GLYCEROPHOSPHOLIPIDE IN PATIENTEN MIT ACS, WIE DAS PC18:0, KORRELIERTEN SIGNIFIKANT MIT DEM AUSMAß DER MYOKARDIALEN SCHÄDIGUNG.	48
ABBILDUNG 20 ACS-PATIENTEN WIESEN, VERGlichen MIT DEM CCS, KEINE ERHÖHTE RATE KLINISCHER ENDPUNKTE IM ZWÖLF-MONATS-FOLLOW-UP AUF	51
ABBILDUNG 21 GLYCEROPHOSPHOLIPIDE SIND KRITISCH HERAUFREGULIERT IN VERSTORBENEN PATIENTEN DER FOLLOW-UP-UNTERSUCHUNG.....	52
ABBILDUNG 22 PC18:0 ERHÖHT MAßGEBLICH DIE EX VIVO THROMBUSFOMIERUNG	55
ABBILDUNG 23 KURZKETTIGE GLYCEROPHOSPHOLIPIDE, MIT PC18:0 ALS LEITSUBSTANZ, STEIGERN DIE PLÄTTCHANAGGREGATION.....	56
ABBILDUNG 24 PC18:0-VERMITTELTE SIGNIFIKANTE CD62P-INDUZIERTER PLÄTTCHENAKTIVIERUNG	57
ABBILDUNG 25 SIGNIFIKANT ERHÖHTE LIPIDE IN THROMBOZYTEN DER ACS-PATIENTEN FÜHREN IN EINEN ZUSTAND GESTEIGERTER PLASMATISCHER GERINNUNG.....	59
ABBILDUNG 26 EIN ABERRANTER LIPIDSTOFFWECHSEL IN PATIENTEN MIT ACS MÜNDET IN EINE ÜBEREXPRESSION DES THROMBOZYTÄREN PC18:0.....	65

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 GRUNDCHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOPULATION.....	17
TABELLE 2 EX VIVO EXPERIMENTELL UNTERSUCHTE (GLYCERO-)PHOSPHOLIPIDE	21
TABELLE 3 HERAUFREGULIERTE THROMBOZYTÄRE GLYCEROPHOSPHOLIPIDE IN PATIENTEN MIT ACS SIND IM STANDE, ALS „LIQUID-BIOPSY“, DEN GRAD DES MYOKARDSCHADENS ZU PROGNOSTIZIEREN.	49
TABELLE 4 ZWÖLFMONATIGE FOLLOW-UP UNTERSUCHUNG DER GESAMTKOHORTE	51

Abkürzungsverzeichnis

A	CVD..... Cardiovascular disease
AA.....	<i>Arachidonic acid</i>
ACS	<i>Akutes Koronarsyndrom</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
aPTT	<i>Aktivierte partielle Thromboplastinzeit</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
B	
BMP	<i>Bis(monoacylglycero)phosphat</i>
BSA.....	<i>Bovines Serumalbumin</i>
bzw	<i>Beziehungsweise</i>
C	
CABG.....	<i>Koronararterieller Bypass-Graft</i>
CAR	<i>Acylcarnitin</i>
CCS	<i>Chronisches Koronarsyndrom</i>
CD.....	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cer.....	<i>Ceramid</i>
COL	<i>Kollagen</i>
COX-1.....	<i>Cyclooxygenase-1</i>
CPDA.....	<i>Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin</i>
CRP	<i>Collagen related peptide</i>
D	
DG.....	<i>Diglycerid</i>
DiOC6	<i>Dihexyloxycarbocyanin Iodid</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
E	
EKG.....	<i>Elektrokardiogram</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
F	
FA.....	<i>Fatty Acyl / Fettsäure</i>
FACS.....	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FDR.....	<i>False Discovery Rate</i>
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
FLH	<i>Fluorescence Line Height</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G	
GFP	<i>Grün fluoreszierendes Protein</i>
GFR.....	<i>Glomeruläre Filtrationsrate</i>

H

HDL..... *High Density Lipoprotein*
HMG-CoA 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
hs-cTn I..... *High-sensitivity cardiac troponin I*

I

INR..... *International Normalized Ratio*
IS *Interner Standard*

K

KHK *Koronare Herzerkrankung*
KI *Konfidenzintervall (95%)*

L

LC *Liquid chromatography*
LDL *Low Density Lipoprotein*
LOD *Limit of Detection*
LPA..... *Lysophosphatidsäure*
LPC..... *Lyso-Phosphatidylcholin*
LPE..... *Lyso-Phosphatidylethanolamin*
LPI *Lyso-Phosphatidylinositol*

M

MA *Maximale Amplitude*
MFI..... *Mean Fluorescence Intensity*
MG *Monoacylglycerol*
MI..... *Myokardinfarkt*
MS *Massenspektrometer*
MW *Mittelwert*

N

n..... *Anzahl*
NSTEMI *Nicht-ST-Hebungs-Infarkt*

O

oxLDL..... *Oxidiertes low-density Lipoprotein*
OxPC..... *Oxidiertes Phosphatidylcholin*

P

PBS *Phosphate-buffered saline*
PC *Phosphatidylcholin*
PE *Phycoerythrin*
PG *Phosphatidylglycerol*
PS *Phosphatidylserin*
PTCA *Perkutane transluminale Koronarangioplastie*

Q

QTOF *Quadrupole Time-of-flight*

R

RUV..... *Removal of unwanted variation*

S

SEM *Standard error of the mean*
SERRF *Systematic error removal using random forrest*
SM..... *Sphingomyelin*
SSC..... *Sideward Scatter*
STEMI *ST-Hebungs-Infarkt*

T

TEG..... *Thrombelastographie*
TG *Triglycerid*
TMEM..... *Transmembrane scramblase*
tSNE *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*

U

UHPLC *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

1. Einleitung

Auszüge dieser Arbeit wurden international publiziert (Harm et al., 2021).

1.1. Epidemiologie und Nomenklatur

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) bilden einen Formenkreis der Herz- und Kreislauferkrankungen. Gemeinsamkeit dieser Indisposition ist häufig die Diskrepanz zwischen Sauerstoffbedarf und Bereitstellung des jeweiligen Endorgans. Die Formen der CVD beinhalten, neben weiteren, die Koronare Herzerkrankung (KHK) mit deren Ausprägungen (Sanchis-Gomar et al., 2016, Stewart et al., 2017). Die KHK ist hierbei die klinische Manifestation einer Atherosklerose der Herzkranzgefäße. Als Leitsymptom der KHK gilt die Angina Pectoris mit deren Begleiterscheinungen wie Belastungsdyspnoe oder Einschränkungen der Lebensqualität (Knuuti et al., 2019, Nabel and Braunwald, 2012).

Die KHK subsumiert die Formen des akuten Koronarsyndroms (ACS) sowie das chronische Koronarsyndrom (CCS). Das ACS geht dabei zumeist mit einer akut lebensbedrohenden Gefährdung der Patienten einher und beinhaltet die Klassifikationen akuter Myokardinfarkt, instabile Angina Pectoris sowie den plötzlichen Herztod (Collet et al., 2020, Libby, 2013).

Gemeinsame Präsentation des ACS sind vielfach akut einsetzende thorakale Beschwerden (Collet et al., 2020, Rodriguez and Harrington, 2021). Die Troponin-positiven Infarkttypen des ACS unterscheiden sich weiterhin zwischen elektrokardiographischen ST-Hebungen (STEMI) und fehlenden ST-Hebungen (NSTEMI) (Ibanez et al., 2017, Anderson and Morrow, 2017). Gemäß aktueller Leitlinien erfolgt die komplementäre Unterteilung der stabilen Angina Pectoris in die Klassifikation des CCS (Knuuti et al., 2019). Dieses ist definiert als durch physischen oder psychischen Stress reproduzierbarer Thoraxschmerz. Die pektanginösen Beschwerden sind dabei in Ruhe oder durch Nitroglycerin-Gabe terminierbar (Bundesärztekammer (BÄK), 2019, Knuuti et al., 2019). Erstmanifestationen dieser Erkrankungen verteilen sich bei Männern zu 66% auf den Myokardinfarkt, Frauen

präsentieren sich häufiger mit einer unkomplizierten Verlaufsform der Angina Pectoris (Sanchis-Gomar et al., 2016).

Das akute Koronarsyndrom und die chronische KHK führen die deutsche Todesursachenstatistik an. Dabei verstarben im Jahre 2018 46207 Personen (58,2% männlich) an einem akuten Myokardinfarkt (MI) und 123975 Personen (55% männlich) an einer chronischen KHK (DESTATIS, 2020). Aufgrund dessen zeigen diese beiden Entitäten der Herzkreislauferkrankungen die Merkmale einer Volkskrankheit auf (Bundesärztekammer (BÄK), 2019). Die Lebenszeitprävalenz der chronischen KHK liegt bei 9,3%, die des akuten Myokardinfarkts bei 4,7% (Robert Koch-Institut, 2015). Auffällig ist hierbei die Altersverteilung der Häufigkeiten. Diese reicht von 2,3% (KHK) bzw. 1,5% (MI) bei 40-49-Jährigen bis 22,3% (KHK) bzw. 10,2% (MI) bei 70-79-Jährigen (Robert Koch-Institut, 2015). Zunehmend rücken volkswirtschaftliche Aspekte des Gesundheitswesens in den Fokus. Unter dieser Betrachtung liegen Erkrankungen des kardiovaskulären Formenkreises ebenfalls in Front. 2015 betragen die direkten Kosten der CVD-Behandlung in Deutschland 46,4 Milliarden Euro (13,7%) der gesamten Gesundheitsausgaben. Etwa die Hälfte dieser Gelder entfällt auf Patienten über 65 Jahre. Frauen (540 Euro) sind dabei mit geringeren Pro-Kopf-Kosten assoziiert als Männer (600 Euro) (DESTATIS, 2015). Ziel ist es, durch frühe und adäquate Prävention, Diagnostik und Therapie die Prävalenz, Mortalität und damit verbundene Kosten der KHK und des ACS zu senken (Bundesärztekammer (BÄK), 2019, Ibanez et al., 2017, Knuuti et al., 2019, Collet et al., 2020, Europarat, 2001).

1.2. Thrombozytäres Lipidom

Thrombozyten sind in entscheidendem Ausmaß an der Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms beteiligt (Gawaz et al., 2005, Ruggeri, 2002, Fuchs et al., 2006, Gawaz, 2004). Nach erfolgter koronarer Plaque-Ruptur akkumulieren Plättchen und adhären infolge mit Kollagen. Durch die resultierende Thrombusbildung und dadurch limitierende koronararterielle Perfusion folgen eine myokardiale Ischämie

mit einhergehender typischer Symptomatik (Arroyo and Lee, 1999, Bentzon et al., 2014, Gawaz, 2016, Naghavi et al., 2003). Aufgrund dieser pathophysiologischen Kaskade stellt die antithrombozytäre Therapie einen Grundstein der Behandlung und Sekundärprävention des ACS dar (Lewis et al., 2019). Eine gesteigerte Plättchenaktivität gilt als Risikofaktor für thrombo-ischämische Ereignisse in Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung (Droppa et al., 2015, Geisler et al., 2009, Reny et al., 2016, May et al., 2008). Insbesondere diejenigen Patienten mit einer vermehrten thrombozytären Aktivierung zeigen ein erhöhtes Risiko auf, ungünstige kardiovaskuläre Folgeschäden zu erleiden. Hierzu zählen der akute Myokardinfarkt, der ischämische Schlaganfall und kardiovaskuläre Tod (Reny et al., 2016). Des Weiteren begünstigt eine langanhaltende Plättchenaktivierung thrombo-inflammatorische Prozesse und die Progression der Atherosklerose in KHK-Patienten. Diese Modulation der Pathophysiologie beeinflusst indes die Langzeitprognose der koronaren Herzerkrankung (Reny et al., 2016).

Für etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Dyslipoproteinämien oder Diabetes mellitus konnte eine erhöhte thrombozytäre Aktivierung dargestellt werden (Stellos et al., 2012, Vinik et al., 2001, Cabeza et al., 2004). Dennoch sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht in Gänze verstanden.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Bindung oxidiertes low-density Lipoproteine (oxLDL) und die Aufnahme dieser bei zirkulierenden Thrombozyten in Patienten mit ACS erhöht ist. Das Resultat dieses pathophysiologischen Substrates mündet in eine erhöhte Plättchenaktivität (Stellos et al., 2012, Chatterjee et al., 2017, Peng et al., 2018).

Um dieses pathophysiologische Gefüge näher zu verstehen, rücken breitgefächerte Lipidom-Analysen in den Fokus der modernen, experimentellen Diagnostik. Ziel ist es, mittels eines „untargeted Lipidomics“-Ansatzes Veränderungen der Gesamtheit aller Lipide in thrombozytären Membranen, dem Lipidom, darzustellen. Vorteile dieses Verfahrens sind eine weitreichende Abdeckung der Lipid-Identifikation sowie

ein hohes Maß an Robustheit und Durchsatz (Contrepolis et al., 2018, Chatterjee et al., 2017).

1.3. Ziele der Arbeit

Die Intention dieser Studie ist es, Veränderungen des thrombozytären Lipidoms in einem fortlaufenden, umfangreichen KHK-Kollektiv zu definieren und zu bewerten. Hierbei sollen Alterationen der Lipide hinsichtlich der Akuität der Erkrankung detektiert und Risikomarker des akuten Koronarsyndroms bestimmt werden.

Da diese bisher nicht vorbeschrieben wurden, soll eine detaillierte Darstellung der Marker erfolgen. Jenseits klassischer Risikofaktoren wie Dyslipoproteinämien sollen Patienten-spezifische Divergenzen des Lipid-Metabolismus und der thrombozytären Aktivität dargestellt werden. Dabei bietet insbesondere die Verwendung der „untargeted“ Lipidomik eine tiefgreifende Methode. In Kontrast zu etablierten, jedoch wenig spezifischen Lipoproteinen, können so in Probanden signifikant weitreichendere Substrate dieses Metabolismus gekennzeichnet werden.

Im Sinne der modernen „Targeted-Therapy“ sollen einzelne ACS-assoziierte Lipide, inklusive deren Einflussfaktoren, untersucht werden. Ziel ist es dabei, *ex vivo* eine veränderte Thrombogenität und Plättchenaggregation zu charakterisieren. Dies stellt die beschriebene pathophysiologische Grundlage des ACS dar. Längerfristige Absicht dieser Forschung soll eine gezieltere Detektion von Hochrisikopatienten mit koronarer Herzerkrankung sein. Dabei sollen Lipidveränderungen auf molekularer Ebene genaue Vorhersagen über nachteilige kardiovaskuläre Ereignisse prognostizieren. Somit können das Verständnis und die Aussagekraft des Lipoproteinmetabolismus ergänzt werden. Ferner sollen Analysen der veränderten Lipide so Angriffspunkt maßgeschneiderter pharmakologischer Therapien oder neuer Diagnostika der Behandlungseffektivität bieten. Einflüsse klassischer Behandlungsansätze der KHK, wie HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren oder antithrombozytärer Therapien, auf die Plättchenfunktion sollen so verstanden und ergänzt werden.

Folgende Fragestellungen werden im Verlauf konkret abgehandelt:

i) Welche Lipide tragen zum Aufbau des thrombozytären Lipidoms in KHK-Probanden bei?

ii) Gibt es Unterschiede des thrombozytären Lipidoms bei der Betrachtung hinsichtlich der KHK-Akuität? Wie präsentieren sich veränderte Lipide im akuten Koronarsyndrom?

iii) Welche weiteren Einflussfaktoren des Kollektivs ergeben sich bezüglich Alterationen des thrombozytären Lipidoms?

a) Können Veränderungen des thrombozytären Lipidoms erfasst werden bei Probanden mit vorbestehender HMG-CoA-Reduktase- bzw. P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie?

b) Sind Veränderungen des thrombozytären Lipidoms assoziiert mit etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren, respektive einer Dyslipidämie?

c) Beeinflussen diese Faktoren die Risikomarker aus dem veränderten Lipidom in Patienten mit einem ACS?

d) Korrelieren die Lipid-Risikomarker des ACS mit dem Grad der Erkrankung?

e) Ergeben sich Auffälligkeiten des thrombozytären Lipidoms bei Betrachtung der Follow-Up-Analysen?

iv) Welche Effekte der in Probanden mit einem akuten Koronarsyndrom veränderten Lipide auf die Plättchenfunktion können *in vitro* nachgewiesen werden?

a) Bewirken ACS-assoziierte Glycerophospholipide eine erhöhte Plättchen-abhängige Thrombusbildung?

b) Führen diese Glycerophospholipide zu einer Vermehrung der thrombozytären Aggregation und Aktivierung?

c) Wie lassen sich Modifizierungen der Hämostase unter Einwirkung der Glycerophospholipide skizzieren?

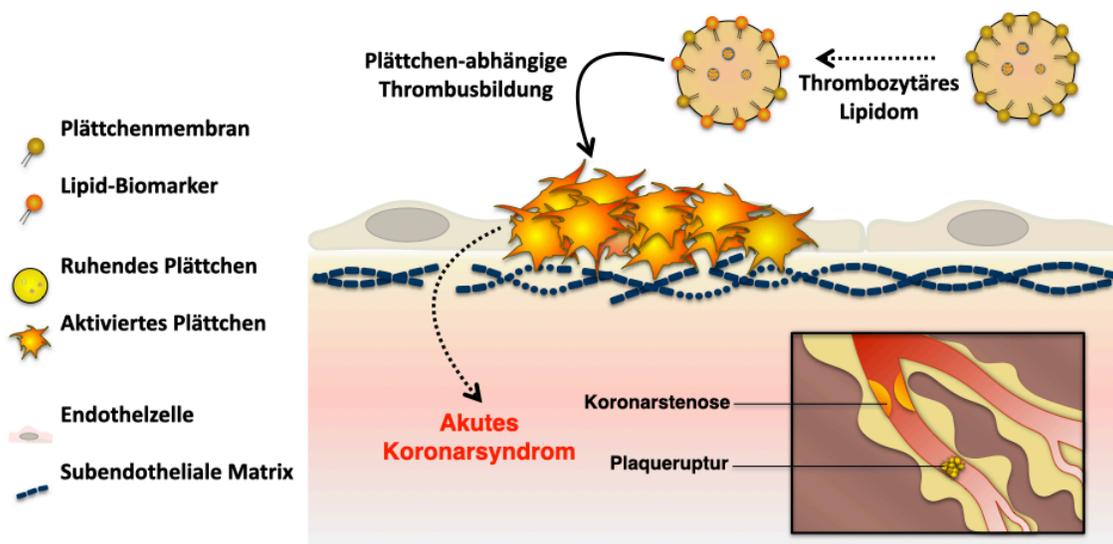


Abbildung 1 Veränderungen des thrombozytären Lipidoms beeinflussen die Plättchenfunktion und Pathogenese des akuten Koronarsyndroms

Die abstrahierte Arbeitshypothese dieser Studie geht von einer Veränderung der Plättchenfunktion durch Alteration des Lipidoms, das heißt der Gesamtheit aller Lipide, der Thrombozyten aus. Abwandlungen des Lipidoms in Probanden mit akutem Koronarsyndrom könnten ferner über die gesteigerte Plättchenaktivität zur Thrombusbildung und damit resultierenden Koronarstenose führen. *Modifiziert aus (Harm et al., 2021).*

2. Material und Methoden

2.1. Studienpopulation

Einhundertneununddreißig (139) Patienten des Universitätsklinikums Tübingen wurden im Zeitraum von Februar bis Mai 2017, nach Abgabe einer Einverständniserklärung, im Sinne des „Informed Consent“ in diese Studie aufgenommen. Diese wurde durch die ansässige Ethik-Kommission genehmigt (270/2011B01) und Experimente gemäß den Standards der Deklaration von Helsinki ausgeübt.

Alle Studienobjekte wurden aufgrund einer symptomatischen koronaren Herzerkrankung (KHK) behandelt und deren Schweregrade anhand einer Koronarangiographie verifiziert. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Klinikaufnahme wurden den Probanden arterielle Vollblutproben entnommen und gelistete klinische Daten erhoben (biographische Parameter, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Medikation, Plasmacholesterin, Blutbild). Die Blutentnahme erfolgte vor Applizierung des „Heparin-Loadings“. Aufgrund der weiterführenden Diagnostik mittels EKG, Koronarangiographie und Laborwerten wurde die Population in Troponin-positives ACS (STEMI und NSTEMI) sowie Troponin-negatives CCS (stabile und instabile Angina Pectoris) gegliedert (Tabelle 1). Deskriptive und induktive Zwischengruppenvergleiche der Population erfolgten unter Verwendung der Software JMP® Version 14.2.0 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) mittels Student's t-Test bei vorliegender Normalverteilung, sowie anhand des Mann-Whitney-U-Tests bei nicht-parametrischen Daten. Mittelwerte und zugehörige Konfidenzintervalle wurden Kohorten-spezifisch berechnet. Diskrete Daten wurden mittels ChiSquare (Pearson) bezüglich derer Unabhängigkeit ausgewertet und die korrespondierende Odds Ratio sowie das 95%-KI berechnet. Signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede der klinischen Daten wurden hervorgehoben (Tabelle 1).

Tabelle 1 Grundcharakteristika der Studienpopulation

139 Probanden wurden in weitere Analysen eingeschlossen und anhand der Befunde in akutes (ACS) oder chronisches Koronarsyndrom (CCS) gruppiert.
 n=Anzahl, OR=Odds Ratio, KI=95% Konfidenzintervall, MW=Mittelwert.

	Gesamt (n=139)	CCS Troponin - (n=100, 71,9%)	ACS Troponin + (n=39, 28,1%)	OR (95% KI)	p- Wert
Männlich, n (%)	101 (72,7)	71 (71,0)	30 (76,9)	0,73 (0,31 – 1,74)	0,482
Alter, Jahre (MW, 95% KI)	70,6 (68,7 – 72,5)	70,4 (68,3 – 72,5)	71,2 (66,9 – 75,4)	-	0,310
Body mass index (MW, 95% KI)	27,1 (26,2 – 27,9)	27,3 (26,3 – 28,3)	26,3 (24,5 – 28,1)	-	0,170
Kardiovaskuläre Risikofaktoren					
Arterielle Hypertonie, n (%)	109 (78,4)	80 (80)	29 (74,4)	1,38 (0,58 - 3,29)	0,468
Hyperlipidämie, n (%)	64 (46,0)	52 (52)	12 (30,8)	2,45 (1,11 - 5,34)	0,024
Diabetes mellitus, n (%)	41 (29,5)	27 (27)	14 (35,9)	0,66 (0,30 – 1,45)	0,302
Raucher, n (%)	23 (16,5)	17 (17)	6 (15,4)	1,13 (0,41 – 3,11)	0,818
Adipositas, n (%)	65 (46,8)	54 (54)	11 (28,2)	2,99 (1,34 – 6,66)	0,006
Vorhofflimmern, n (%)	33 (23,7)	24 (24)	9 (23,1)	1,05 (0,44 – 2,53)	0,909
Früherer CABG, n (%)	13 (9,4)	11 (11)	2 (5,1)	2,29 (0,48 – 10,82)	- 0,285
Früherer MI, n (%)	29 (20,9)	25 (25)	4 (10,3)	2,92 (0,94 – 9,02)	0,055
Nierenfunktion (GFR) (MW, 95% KI)	74,9 (69,7 – 80,1)	73 (67,9 – 78,2)	79,6 (66,5 – 92,8)	-	0,577
Medikation bei Aufnahme					
Acetylsalicylsäure, n (%)	112 (80,6)	83 (83)	29 (74,4)	1,68 (0,69 – 4,09)	0,247
Clopidogrel, n (%)	36 (25,9)	34 (34)	2 (5,1)	9,53 (2,17–41,94)	0,001
Ticagrelor, n (%)	44 (31,7)	31 (31)	12 (30,8)	0,77 (0,35 – 1,67)	0,502
Prasugrel, n (%)	9 (6,5)	6 (6)	3 (7,7)	0,77 (0,18 – 3,23)	0,716
Orale Antikoagulation, n (%)	33 (23,7)	28 (28)	5 (12,8)	2,64 (0,94 – 7,45)	0,056
Angiotensin- converting-enzyme- Inhibitoren, n (%)	71 (51,1)	53 (53)	18 (46,2)	1,32 (0,93 – 2,76)	0,468
Angiotensin-II- Rezeptor- Antagonisten, n (%)	32 (23,0)	25 (25)	7 (17,9)	1,52 (0,60 – 3,88)	0,375

Aldosteron-Antagonisten, n (%)	28 (20,1)	24 (24)	4 (10,3)	2,76 (0,89 – 8,57)	0,070
Ca-Kanal-Antagonisten, N (%)	38 (27,3)	31 (31)	7 (17,9)	2,05 (0,82 – 5,16)	0,121
β-Blocker, n (%)	89 (64,0)	67 (67)	22 (56,4)	1,57 (0,74 – 3,35)	0,243
Diuretika, n (%)	54 (38,8)	42 (42)	12 (30,8)	1,63 (0,74 – 3,58)	0,222
Statine, n (%)	92 (66,2)	76 (76)	16 (41)	4,55 (2,07 – 9,99)	0,001
Plasma-Lipid-Parameter					
LDL (mg/dL) (MW, 95% KI)	96,0 (90,0 – 102,0)	94,1 (86,9 – 101,4)	101,2 (90 – 112,4)	-	0,193
HDL(mg/dL) (MW, 95% KI)	47,6 (44,7 – 50,6)	48,8 (45,2 – 52,4)	44,4 (39,2 – 49,5)	-	0,225
Triglyceride (mg/dL) (MW, 95% KI)	150,4 (134,0 – 166,7)	153,4 (134,2 – 172,5)	142,3 (108,9 – 175,6)	-	0,351
Gesamtcholesterin (mg/mL) (M, 95% KI)	161,2 (153,2 – 169,2)	161 (151,8 – 170,1)	161,7 (144,6 – 178,9)	-	0,936
Thrombozyten (10⁹/l) (MW, 95% KI)	225,1 (210,8 – 239,5)	229,9 (208,3 – 237,5)	230,8 (195 – 266,6)		0,717

2.2. Thrombozytäre Lipidom-Analyse

Lipide isolierter Thrombozyten wurden mittels standardisierten Protokolls (2-Propanol/Wasser) extrahiert und in Kombination mit internen Standards (100 ng/mL Arachidonsäure-d8, sowie 300 ng/mL C18 Ceramide-d7 (d18:1-18:0)) durch einen Kombinationsassay aus Massenspektrometrie und Liquid-Chromatographie analysiert (UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS). Peakintensitäten dieser „non-targeted Lipidomics“-Analyse wurden durch die „MS-Dial“-Software, „Multiquant“ und die „LipidBlast“-Datenbank verifiziert. Eine Normalisierung der Daten erfolgte anhand der Methoden „systematic error removal using random forrest“ (SERRF) und „removal of unwanted variation random“ (RUVrandom). Nach Aufbereitung der Proben und der daraus resultierenden Daten konnten gemäß der „Intention-to-treat“-Analyse 105 Ansätze für die weitere statistische Auswertung einbezogen werden. Detektierte Lipide, als Teil des thrombozytären Lipidoms, wurden durch die „Lipidmaps“-Datenbank klassifiziert und mittels OmniGraffle 7.12 (The Omni Group, Seattle, WA, USA) graphisch kategorisiert.

Die normalisierten Peakintensitäten wurden per „one-way analysis of variance“ (ANOVA) zwischen den klinischen Kohorten verglichen. Hierfür wurde die Software JMP® version 14.2.0 verwendet (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Aufgrund der Datenmenge und der multiplen Hypothesen-Testung wurden signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) mit Hilfe der Falsch-Positiv-Filterung weiter sortiert, um somit die Alpha-Fehler-Kumulierung zu reduzieren. Hierfür wurde der „Sequential-Goodness-of-Fit“-Algorithmus (SGoF) mit der Test-Schwelle $FDR \leq 5\%$; $p < 0,05$ implementiert (Myriads - Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA). Um das signifikant veränderte thrombozytäre Lipidom der ACS-Kohorte dem CCS und weiteren Einflussfaktoren gegenüberzustellen, wurden „t-distributed Stochastic Neighbor Embedding“-Grafiken (t-SNE) erstellt (RStudio Inc. Boston, MA, USA; Package „Rtsne“). Diese non-lineare Methode der Wahrscheinlichkeitsverteilung bedient sich eines Algorithmus der Dimensionsreduktion. Hierdurch können, unter Einbeziehung multipler Parameter, Gemeinsamkeiten mehrerer Objekte zweidimensional dargestellt werden.

Um signifikante Unterschiede des Lipidoms hinsichtlich der Ausprägung der KHK (ACS versus CSS), einer Statin-, P2Y12-Inhibitor-Einnahme bzw. einer vorliegenden Hyperlipidämie darzustellen, wurden Volcano- bzw. Dot-Plots erstellt, welche die jeweiligen Ergebnisse einer ANOVA aufzeigen (JMP®). Markierte Lipide wurden hierfür ebenfalls durch den SGoF-Algorithmus ($p < 0,05$, $FDR < 0,05$) herausgefiltert. Analysen des linearen, signifikanten ($p < 0,05$) Zusammenhangs zwischen hochsensitivem kardialen Troponin I (hs-cTn I, ng/L) und normalisierten Peakintensitäten der Glycerophospholipide erfolgte unter Verwendung der Pearson Produkt-Moment-Korrelationen (JMP®). Signifikante ($p < 0,0001$) multiple Regressionsmodelle hinsichtlich der Vorhersage des hs-cTn I-Spiegels (ng/L) erfolgten unter Kennzeichnung signifikanter Regressionsvariablen (* $p < 0,05$; JMP®).

2.3. Follow-Up-Untersuchung

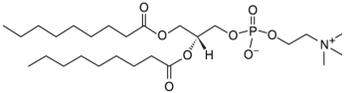
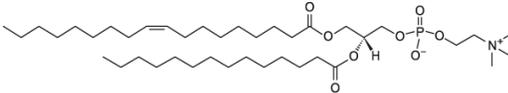
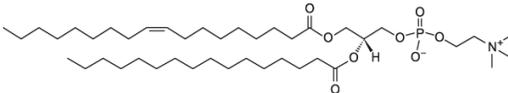
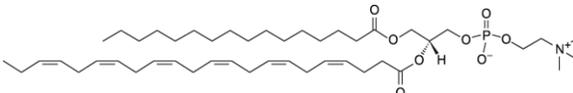
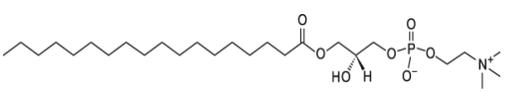
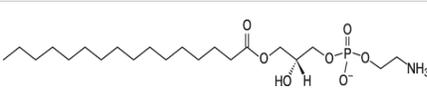
Gemäß aktueller Leitlinien erfolgte die Verlaufsbeobachtung aller Probanden über den Zeitraum von zwölf Monaten nach erfolgreicher Koronarangiographie, da in dieser vulnerablen Phase die Wahrscheinlichkeit für nachteilige Events am höchsten ist (Knuuti et al., 2019). Die Kontaktierung erfolgte telefonisch über behandelnde Hausärzte oder direkt durch die Patienten bzw. bei „In-House“-Rehospitalisierung. Als Endpunkte dieses Follow-Ups wurden die Ereignisse Tod (Gesamtmortalität), Reintervention (PTCA), Schlaganfall bzw. Myokardinfarkt gewählt. Bei den verstorbenen Probanden erfolgte die Analyse des thrombozytären Lipidoms im Vergleich zu nicht verstorbenen Studienobjekten (SGoF $p < 0,05$, FDR $< 0,05$).

2.4. Experimentelle Daten

Lipide, welche Unterschiede im thrombozytären Lipidom der ACS-Probanden im Vergleich zur CCS-Kontrolle aufzeigten, wurden repräsentativ für weitere *ex vivo* Analysen ausgewählt. Um prokoagulatorische Effekte im ACS näher zu untersuchen, wurden synthetische Glycerophospholipide (Tabelle 2) (Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet, um deren Einfluss auf Plättchen-Aggregation, Aktivierung und Thrombusbildung zu testen. PC 16:0-22:6 (Chloroform); Lyso-PC 18:0 (Pulver); LysoPE 16:0 (Pulver); PC 9:0/9:0 (Pulver); PC 18:1-14:0 (Pulver); PC 18:1-16:0 (Pulver) wurden hierfür nach Herstellerempfehlungen in DMSO (Sigma-Aldrich) gelöst und aufbewahrt. Experimentelle Daten (Mittelwert \pm SEM) wurden unter Verwendung der „GraphPad Prism8“-Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) bezüglich ihrer Unterschiede analysiert. Hierfür wurde die „two-way“ ANOVA“ verwendet (Signifikanzniveau $p < 0,05$) und mit dem „Dunnett's post hoc“-Test kombiniert, um durch den paarweisen Mittelwertvergleich signifikante Unterschiede der Messungen darzustellen.

Tabelle 2 *Ex vivo* experimentell untersuchte (Glycero-)Phospholipide

Gebrauchsname, systematischer Name, Strukturformel, Summenformel und Molekulargewicht (*M*) der getesteten Lipid-Analyten. Diese zeigten in der statistischen Auswertung des Lipidoms signifikant unterschiedliche Peakintensitäten in Thrombozyten der ACS-Probanden im Vergleich zum CCS.

PC18:0 (9:0/9:0) <i>1,2-dinonanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>		$C_{26}H_{52}NO_8P$ $M=537,667$
PC32:1(18:1/14:0) <i>1-oleoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>		$C_{40}H_{78}NO_8P$ $M=732,023$
PC34:1 (18:1/16:0) <i>1-oleoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>		$C_{42}H_{82}NO_8P$ $M=760,076$
PC 38:6 (16:0/22:6) <i>1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>		$C_{46}H_{80}NO_8P$ $M=806,103$
Lyso-PC (18:0) <i>1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine</i>		$C_{26}H_{54}NO_7P$ $M=523,683$
Lyso-PE (16:0) <i>1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i>		$C_{21}H_{44}NO_7P$ $M=453,550$

2.4. *Ex vivo* Plättchen-abhängige Thrombusbildung

Die Plättchen-induzierte Thrombusformierung wurde unter Einsatz einer Perfusionsflusskammer (Abbildung 1) näher untersucht. Hierfür wurden 1000µl CPDA-Citrat-Blut klinisch gesunder Spender mit 10µl DiOC6 (Thermo Fisher Scientific Karlsruhe) Fluorochrom-markiert (Inkubation 30min) und mit 10, 25 bzw. 100µM Glycerophospholipiden (Tabelle 2) oder Kontrolle (DMSO) versetzt (Inkubation 30min). Die Perfusion des 5:1 mit PBS- Ca^{2+} (Sigma-Aldrich) diluierten Citrat-Bluts (1000µl) erfolgte über mit 100 µg/ml (Volumen 200µl) Kollagenbeschichtete Objektträger (24 x 60 mm²; Horm Kollagen, SKF-Lösung, Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich). Nach der Beschichtung wurden diese 2h bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert und mit 200µl 1% BSA (Sigma-Aldrich) blockiert. Bei einer niedrigen Schergeschwindigkeit von 500 sec⁻¹ = 4,25 ml/h bzw. hohen

Schergeschwindigkeit von $1700 \text{ sec}^{-1} = 12,86 \text{ ml/h}$, erfolgte nach vollständiger Perfusion eine Auswaschung nicht-adhärenter Thrombozyten durch $1000\mu\text{l}$ PBS- Ca^{2+} . Die mikroskopische Fotodokumentation verlief unter Verwendung des Nikon Eclipse Ti2-A (Nikon, Tokyo, Japan; 20x Vergrößerung, Objektiv CFI Super Plan Fluor ADM, N.A. 0.45; GFP (Grün fluoreszierendes Protein) Filter, 466/40nm Anregung) und der NIS-Elements-Auswertungs-Schablone zur genauen Quantifizierung der anteiligen Thrombusfläche. Hierfür wurden je fünf Bilder aus verschiedenen Quadranten der Flusskammer ausgewertet. Zusätzlich wurden Videos der Thrombusanlagerung (1 „Frame“ / 3sek) erstellt (Abbildung 2).

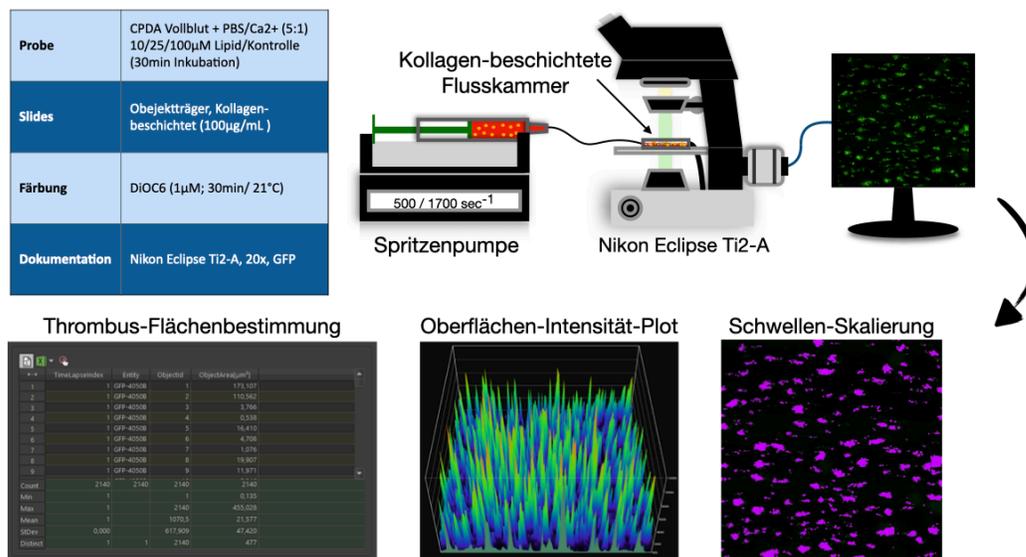


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Flusskammerperfusion Glycerophospholipid-inkubierter Plättchen

Inkubiertes Citratblut wurde jeweils durch eine Kollagen-beschichtete Flusskammer perfundiert. Nach abgeschlossenem Durchlauf wurden je drei mikroskopische Bilder verschiedener Areale (20x Vergrößerung) fotodokumentiert. Diese wurden mittels Schablone (Schwellenskalierung & Oberflächen-Intensität-Adjustierung) ausgewertet. Dabei wurde der Flächenanteil der entstandenen GFP-fluoreszierenden Thromben berechnet. *Modifiziert aus (Harm et al., 2021).*

2.5. Plättchen-Impedanzaggregometrie

Anhand standardisierter Protokolle wurde die thrombozytäre Impedanzaggregometrie durchgeführt (Multiplate Analyzer, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz) (Malehmir et al., 2019) und ausgewertet. Hierbei wurde Hirudin-Vollblut (300µl) klinisch gesunder Spender mit den jeweiligen Glycerophospholipid-Analyten (100µM, Tabelle 2) oder DMSO-Kontrolle 30 Minuten präinkubiert. In der jeweiligen Messküvette erfolgte anschließend die Stimulierung mit 20µL ADP 6,5 µM, Arachidonsäure (AA) 484 µM oder Kollagen 3,2 µg/mL (ADPtest, ASPIttest, COLtest, F. Hoffmann-La Roche). Aufgrund ihrer negativen Ladung lagern sich Thrombozyten an die Messelektroden an. Durch den hieraus resultierenden erniedrigten Stromfluss, sowie eine verminderte Leitfähigkeit, steigt nach dem Ohm'schen Gesetz der Wechselstrom-Widerstand (Impedanz). Bei zunehmender Stimulation der Plättchen und daraus folgender Aggregation steigt die Impedanz proportional. Diese wurde über 6 Minuten als Kurve aufgetragen (Gresele et al., 2019, Kong et al., 2015). Als quantitativer Parameter der Plättchen-Aggregation wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) der einzelnen Messzellen ausgewertet (Abbildung 3).

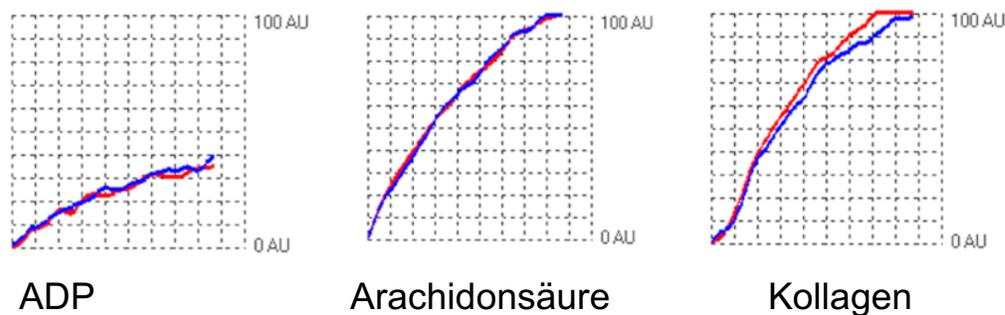


Abbildung 3 Interpretation der Plättchen-Impedanzaggregometrie

Vollblut wurde mit 100 µM Glycerophospholipiden oder DMSO inkubiert und mittels ADP, Arachidonsäure und Kollagen stimuliert. Als Marker der Plättchenaggregation wurde die Impedanz auf der y-Achse (AU) gegen die Zeit aufgetragen (x-Achse, 6 min). Die „Area under the Curve“ (AUC) berechnet sich aus $AU \cdot \text{min} = AUC$; $1U = 10AU \cdot \text{min}$ und gilt als quantitatives Maß der Aggregation.

2.6. Quantifikation der P-Selectin-abhängigen Plättchenaktivierung

Die Glycerophospholipid-induzierte Thrombozytenaktivierung wurde anhand der P-Selectin-Expression unter Verwendung der Durchflusszytometrie bestimmt (FACS-Calibur Durchflusszytometer Becton-Dickinson NJ, USA). Hierfür wurde CPDA-Citrat-Blut klinisch gesunder Probanden 1:50 mit PBS-Ca²⁺ diluiert und hierbei 35µl mit 5µl CD62P FITC + CD42b PE Antikörper vorbehandelt (Beckman Coulter Life Science Krefeld). Anschließend wurde mit dem jeweiligen Glycerophospholipid (100µM, Tabelle 2) bzw. DMSO (100µM) als Kontrolle für 30 Minuten inkubiert. Die Induktion des CD62P als Marker der Plättchenaktivierung wurde jeweils im Ruhezustand, als auch nach 30-minütiger Inkubation mit 5µl collagen related peptide (CRP 0,5µg/ml; Cambcol Laboratories Cambrigeshire, UK) gemessen. Um Thrombozyten-selektive Daten zu erhalten, wurden diese mittels spezifischer CD42b-Antikörper präselektiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo (Becton Dickinson, Abbildung 4).

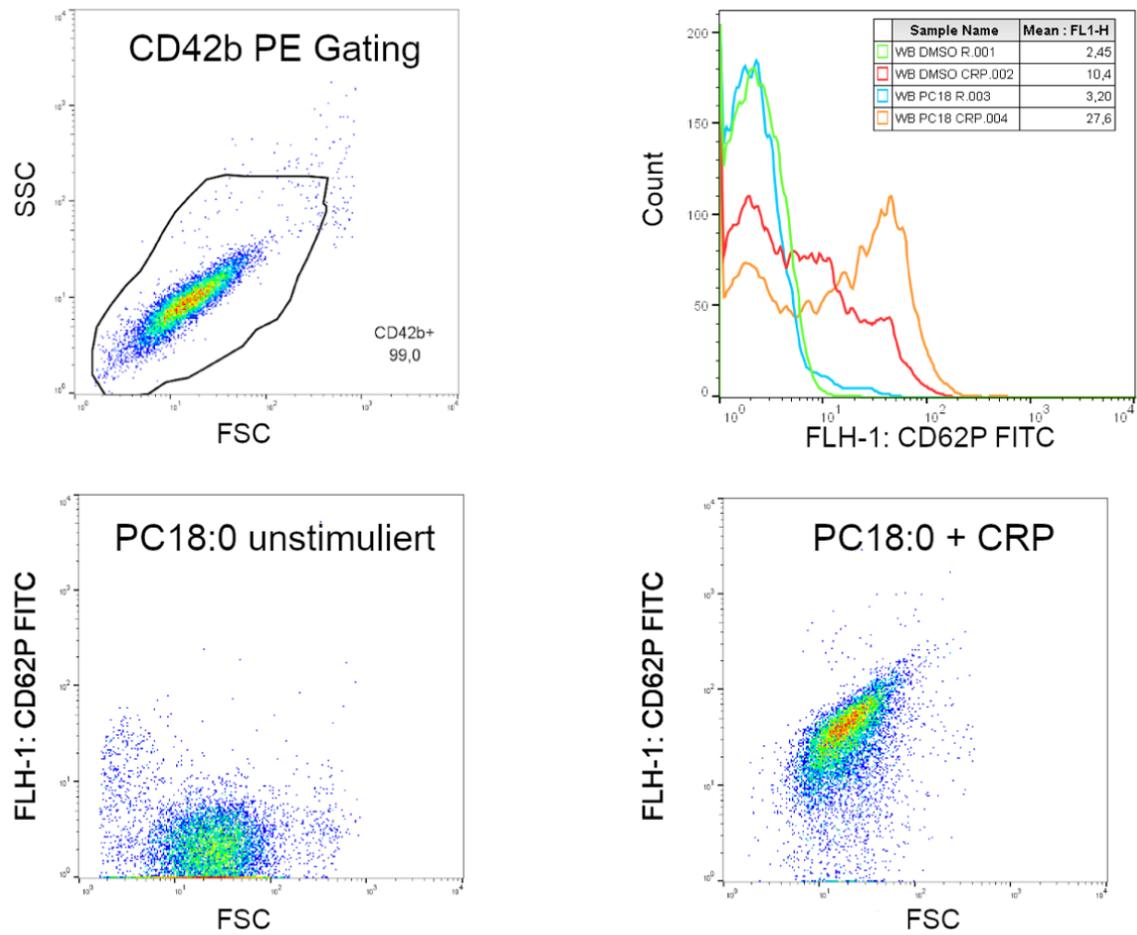


Abbildung 4 Durchflusszytometrische P-Selectin/CD62P-Bestimmung

Die obere linke Grafik bildet das „Gating“ und die Selektion für CD42b-positive Plättchen ab. Die unteren Abbildungen zeigen das CD62P-Expressionsniveau dieser Subpopulationen. Die hierbei linke Abbildung zeigt einen Vollblutansatz mit Inkubation der Glycerophospholipide (z.B. PC 18:0) oder DMSO. Rechts ist der Ansatz mit CRP-Stimulation abgebildet. Die Mittelwerte der CD62P-Fluoreszenz wurden für die weitere Auswertung berechnet und oben rechts exemplarisch als Histogramm dargestellt. FSC= Forward Scatter, SSC= Sideward Scatter, FLH= Fluorescence Line Height PE= Phycoerythrin, FITC= Fluoresceinisothiocyanat.

2.7. Thrombelastographie

Um den Einfluss der Glycerophospholipide auf die Hämostase und prokoagulatorische Prozesse zu untersuchen, wurden 800µl Heparinvollblut gesunder Spender 30 min mit Glycerophospholipiden (100µM) inkubiert und mittels „TEG® 5000“-Analysegerät (Haemonetics S.A. Signy-Avenex, Schweiz) analysiert. Bei der Thrombelastographie führt die Rotation der Probe zur Thrombusbildung mit resultierender Verbindung zwischen Pin mit Torsionsdraht und dem Probengefäß. Hierdurch kann ein Kurvenverlauf im „PlateletMapping®“-Assay erzeugt werden (Abbildung 5). Dieser gliedert sich in die enzymatische Gerinnung (R-Wert), welche Gerinnungsfaktoren (aPTT bzw. INR) abbildet. Der Kurvenanstieg (α -Winkel) und der K Wert repräsentieren die Zeit bis zur Bildung eines 20mm großen Thrombus und sind ein kinetisches Maß der Gerinnungs-Geschwindigkeit. Die maximale Amplitude (MA-Wert) der Kurve dient als Maß der Thrombusfestigkeit (Bowbrick et al., 2003a, Salooja and Perry, 2001).

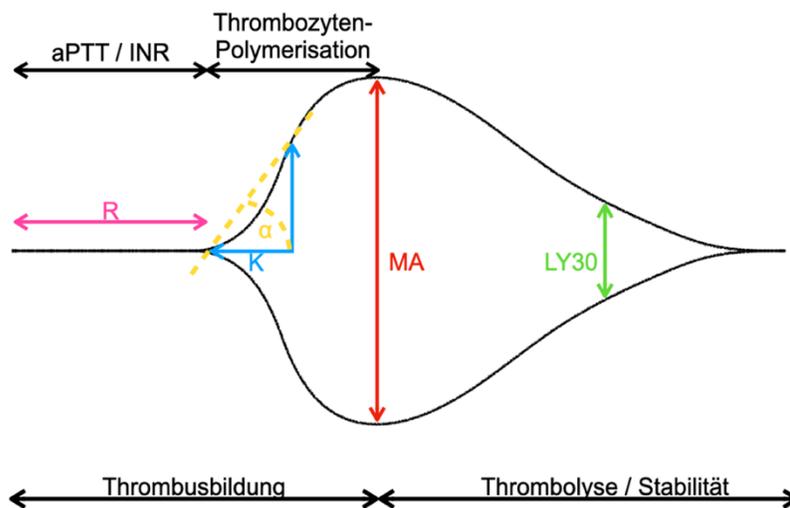


Abbildung 5
Thrombelastographie-
Kurvenschema

Unter Verwendung der „PlateletMapping®“-Auswertung entstehen Proben-spezifische Kurvenverläufe, welche Hinweise auf Interaktionen der Glycerophospholipide mit Gerinnungsfaktoren (R; aPTT / INR), der Thrombusbildung (K, α , MA) und Thrombolysen (LY30) geben. *Modifiziert aus (Dias et al., 2017).*

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des thrombozytären Lipidoms in der koronaren Herzerkrankung

In dieser Studie wurde das thrombozytäre Lipidom einer Kohorte aus einhundertneununddreißig Probanden (139) mit symptomatischer KHK durch einen „untargeted Lipidomics“-Assay näher untersucht. Achtundzwanzig (28) Prozent der Studienpopulation präsentierten sich hierbei mit einem Troponin-positiven ACS.

Unter allen aufbereiteten Proben konnten, nach Filterung nicht verifizierbarer sowie redundanter Signale, neunhundertachtundzwanzig (928) verschiedene Lipide in Thrombozytenmembranen detektiert werden. Diese ließen sich, hinsichtlich ihrer Struktur, in fünf Kategorien, sowie siebzehn (17) korrespondierende Hauptklassen aufschlüsseln (Abbildung 6). Eine quantitative Auswertung des Lipidoms zeigte, dass insbesondere Glycerophospholipide (52,2%), Glycerolipide (24,2%), Sphingolipide (19,0%), Fettsäurederivate (3,7%), und Sterole (0,9%) zum Aufbau der Plättchenmembran beitragen. Die beiden Hauptklassen Phosphatidylcholine (36,3%) und Triglyceride (21,3%) stellen die jeweiligen Hauptvertreter ihrer übergeordneten Lipidkategorie dar und formten, aufgrund eines mehrheitlichen Anteiles des Lipidoms (57,6%), einen Gewichtungsfaktor weiterer Analysen (Abbildung 7). Die Verteilung der Peakintensitäten aller Rohdaten zeigte ein erhebliches Maß an Variabilität. Daher wurden, ausgehend von diesen Signalen, Konzentrationen aller gefilterten Lipide abgeleitet. Durch die Verwendung Klassen-, Kategorie oder „Time-of-Flight“-spezifischer interner Standards (IS) ergab sich eine ebenso ausgeprägte Variabilität der Konzentrationen an Plättchenlipiden. Dies indiziert ein hohes Maß an Heterogenität einzelner thrombozytärer Lipidkategorien in der KHK-Kohorte. Die größte Divergenz individueller Konzentrationen zeigte dabei die Kategorie der Glycerophospholipide (Ratio 10^5). Aufgrund des beschriebenen hohen Anteils dieser Lipide am thrombozytären Lipidom, bildeten Glycerophospholipide ebenfalls die dominanteste Kategorie bezüglich ihrer hohen Masse (Abbildung 8).

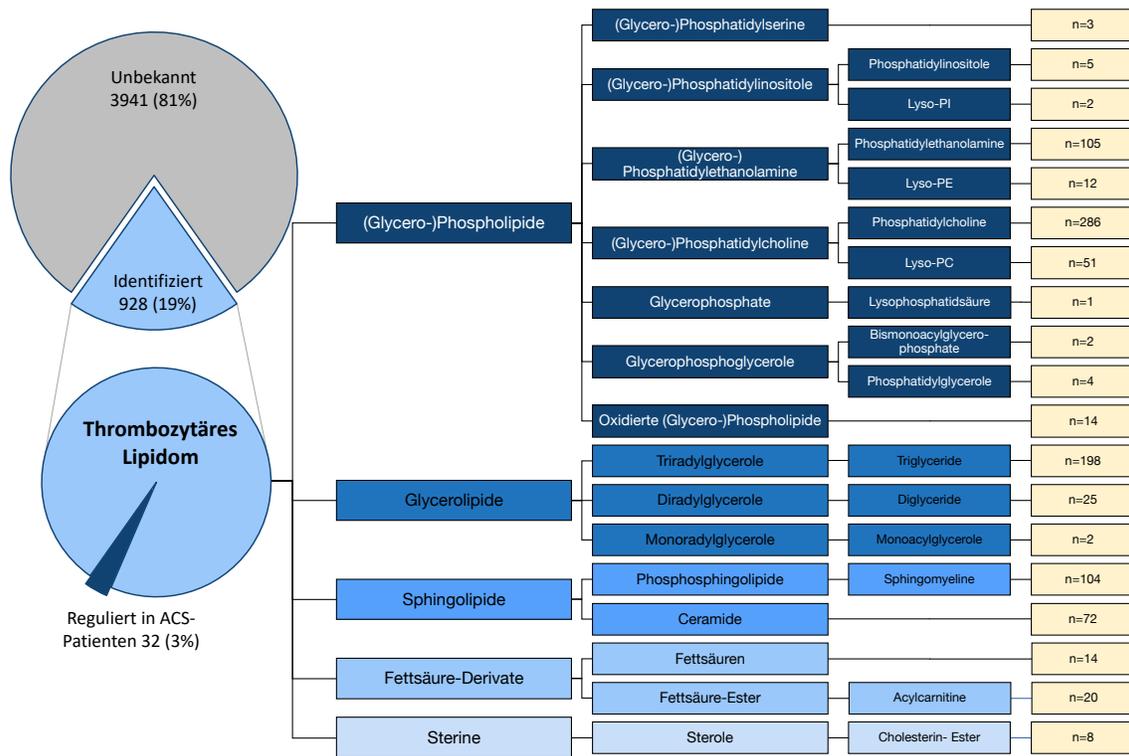


Abbildung 6 Analysen des thrombozytären Lipidoms zeigten eine ausgeprägte Diversität der detektierten Lipide in Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Isolierte Plättchen wurden nach Lipidextraktion mittels UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS analysiert und die Klassifizierung der detektierten Lipide wurde mittels „Lipid-Maps“-Datenbank durchgeführt. Hierbei konnten 928 Lipide in die weitere Analytik eingeschlossen werden. 3941 Substanzen verblieben unklassifiziert. 32 Lipide zeigten eine signifikante Regulierung in Patienten mit einem ACS. Von links nach rechts bestand das Lipidom dieser Arbeit aus fünf Kategorien (Glycerophospholipide, Sphingolipide, Glycerolipide, Fettsäurederivate und Sterine), welche in Hauptklassen subkategorisiert werden konnten. Die äußeren, beige Rechtecke repräsentieren die einzelnen Lipide, welche massenspektrometrisch detektiert und identifiziert wurden in Plättchen der KHK-Probanden (n=928). Dies zeigt ein hohes Maß an Vielfalt der Konstitution des thrombozytären Lipidoms in Patienten mit KHK. *Modifiziert aus (Harm et al., 2021).*

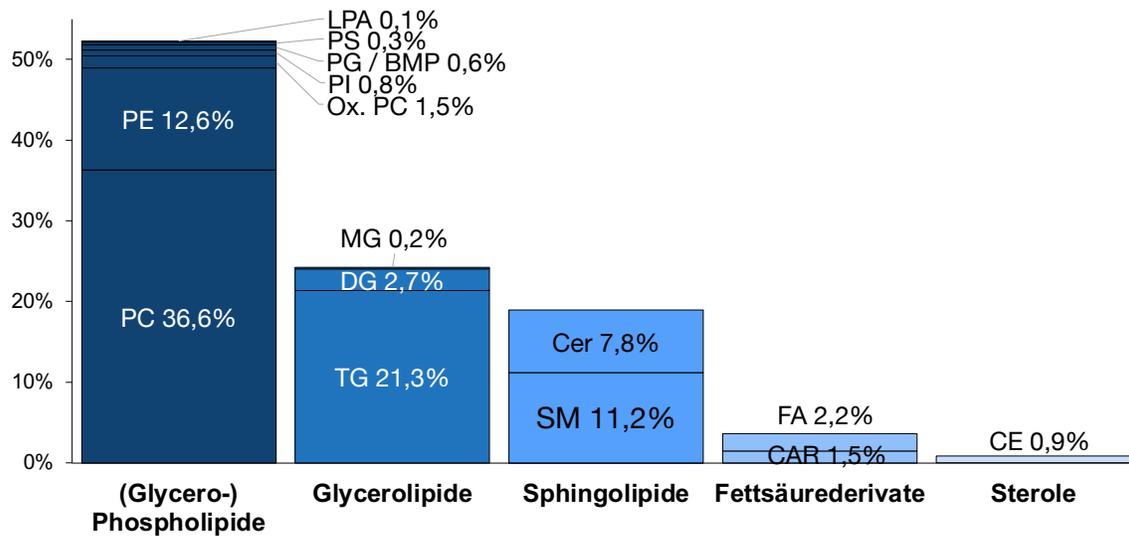


Abbildung 7 Glycerophospholipide bilden den größten Anteil des thrombozytären Lipidoms in KHK-Patienten

Die Säulen bilden die prozentuale Verteilung der fünf Lipidkategorien des in Plättchen detektierten Lipidoms ab. Die Subgliederung der Graphen zeigt die Prozente der zugehörigen Hauptklassen an. Mit 485 verschiedenen Substanzen bildeten Glycerophospholipide die hauptsächliche Kategorie des Lipidoms (52,3%) und wurden daher das Ziel weiterer *ex vivo* Analysen. Die weiteren Lipide ließen sich als Glycerolipide (24,2%), Sphingolipide (19,0%), Fettsäurederivate (3,7%) Sterole (0,9%) subsumieren (n=139 Probanden, n=105 Blutproben waren geeignet für weitere Lipidom-Analysen). *Modifiziert aus (Harm et al., 2021).*

Car=Acylcarnitin, FS=Fettsäure/Fatty Acyl, MG=Monoglycerid, DG=Diglycerid, TG=Triglycerid, Cer=Ceramid, SM=Sphingomyelin, PC=Phosphatidylcholin, PE=Phosphatidylethanolamin, Ox=Oxidierete Glycerophospholipide, PI=Phosphatidylinositol, PG=Phosphatidylglycerol, BMP=Bis(monoacylglycero)phosphat, PS=Phosphatidylserin, LPA= Lysophosphatidsäure.

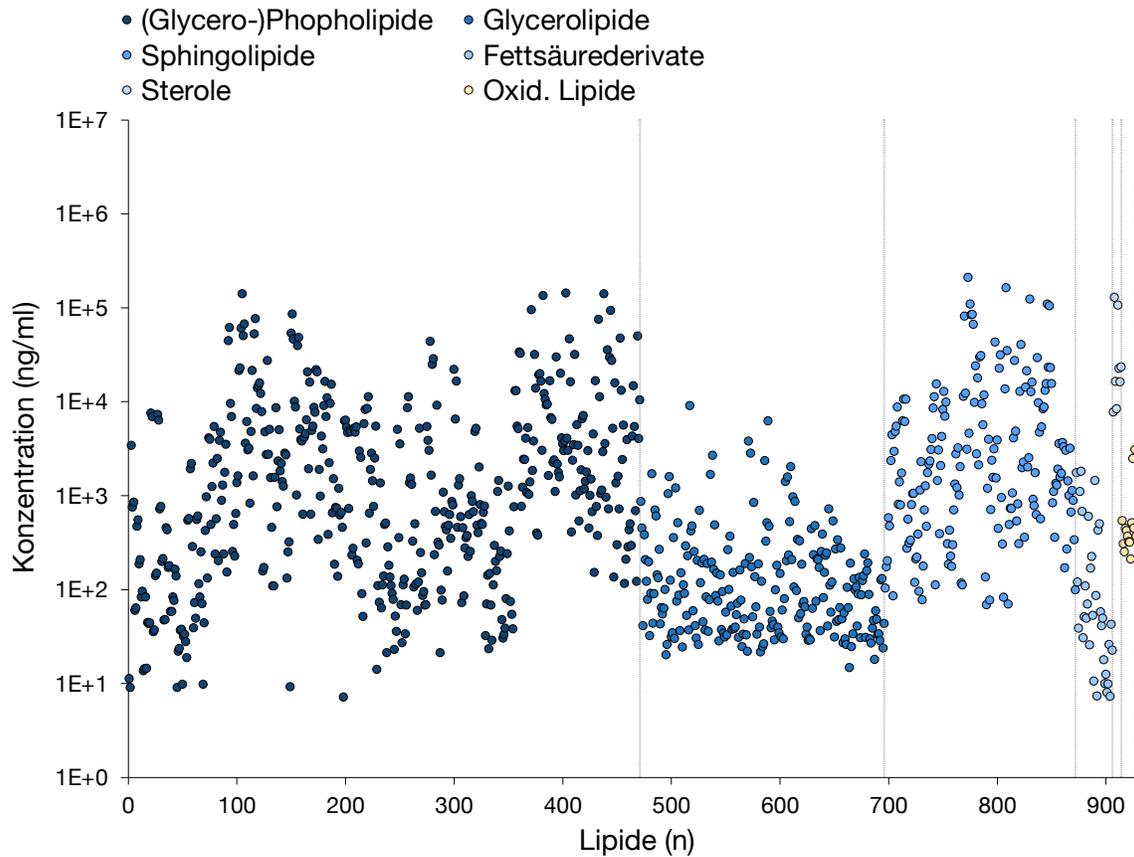


Abbildung 8 Glycerophospholipide weisen die höchsten Konzentrationen und ein hohes Maß an Variabilität in Patienten mit koronarer Herzerkrankung auf

Die X-Achse gibt die verschiedenen Lipide der KHK-Korte wieder ($n=928$ Lipide, $n=139$ Probanden). Auf der Y-Achse sind die Log₁₀-skalierten, gemittelten Konzentrationen (ng/ml) der extrahierten Lipide abgebildet. Diese wurden anhand der detektierten Peakintensitäten mittels Klassen-spezifischer interner Standards abgeleitet. Die Konzentrationen beziehen sich auf je 100 μ L Lipid-Extrakt, gewonnen aus 3×10^8 Plättchen. Glycerophospholipide bildeten den Hauptbestandteil des thrombozytären Lipidoms. Daher trugen diese ebenfalls am dominantesten zur Gesamtkonzentration der Lipide bei. Es zeigte sich jedoch sowohl eine interindividuelle als auch intraindividuelle Heterogenität der Lipidkategorien in den einzelnen KHK-Probanden. Modifiziert aus (Harm et al., 2021).

3.1.1. Thrombozytäre Glycerophospholipide als Risikomarker des ACS

Für die Beurteilung des Einflusses der zugrundeliegenden Erkrankungen auf die genannten Darstellungen des thrombozytären Lipidoms erfolgte der weitere Vergleich zwischen akutem und chronischem Koronarsyndrom. Hierbei wurden die normalisierten Peakintensitäten der ACS- und CCS-Kohorte verglichen. Unter den 928 individuellen Lipiden zeigten sieben Lipide signifikant erhöhte thrombozytäre Intensitäten in ACS-Probanden ($p < 0,05$, $FDR < 5\%$), wohingegen fünfundzwanzig Lipide herabregulierte Werte zeigten im Vergleich zum CCS ($p < 0,05$, $FDR < 5\%$).

Hochregulierte Anteile des thrombozytären Lipoms in ACS-Probanden setzten sich ausschließlich aus Lipiden der Kategorie der Glycerophospholipide zusammen (Phosphatidylcholine (PC, $n=6$; PC 18:1e-16:0, PC 32:1e, PC 24:0 (PC16:0-8:0), PC 10:0-20:4, PC 20:0 (PC 10:0-10:0), PC 18:0 (PC 10:0-8:0)); Phosphatidylethanolamine (PE, $n=1$; PE 16:0-18:0)) (Abbildung 9)). Herabregulierte Lipide der ACS-Probanden beinhalteten Vertreter verschiedener Kategorien. Diese setzten sich zusammen aus Glycerophospholipiden ($n=20$, Phosphatidylcholine (PC, $n=14$; PC 14:0-22:6, PC 15:0-20:4, PC 16:0-22:6, PC 17:0-20:4(2), PC 17:0-20:4(1), PC 17:0-22:6, PC 18:0-20:4, PC 18:0-22:6, PC 20:0-22:6, PC 20:4-22:6, PC 22:5-22:5, PC 36:5e(3), PC 42:6e(1), PC 42:6e(2)); Lyso-Phospholipide (LPL, $n=4$; LPC 0:0/18:0, LPC 18:0/0:0, LPE 16:0, LPE 18:0); Phosphatidylethanolamine (PE, $n=2$; PE 18:1e/22:6, PE 20:4-22:6)), Glycerolipiden ($n=4$, Diglyceride (DG, $n=1$; DG 18:0-22:4); Triglyceride (TG, $n=3$; TG 16:0-18:0-22:6, TG 16:0-20:0-22:6, TG 18:0-20:4-22:6)), Sphingolipiden ($n=1$, Sphingomyeline (SM, $n=1$; SM d40:1(2)) (Abbildung 9)).

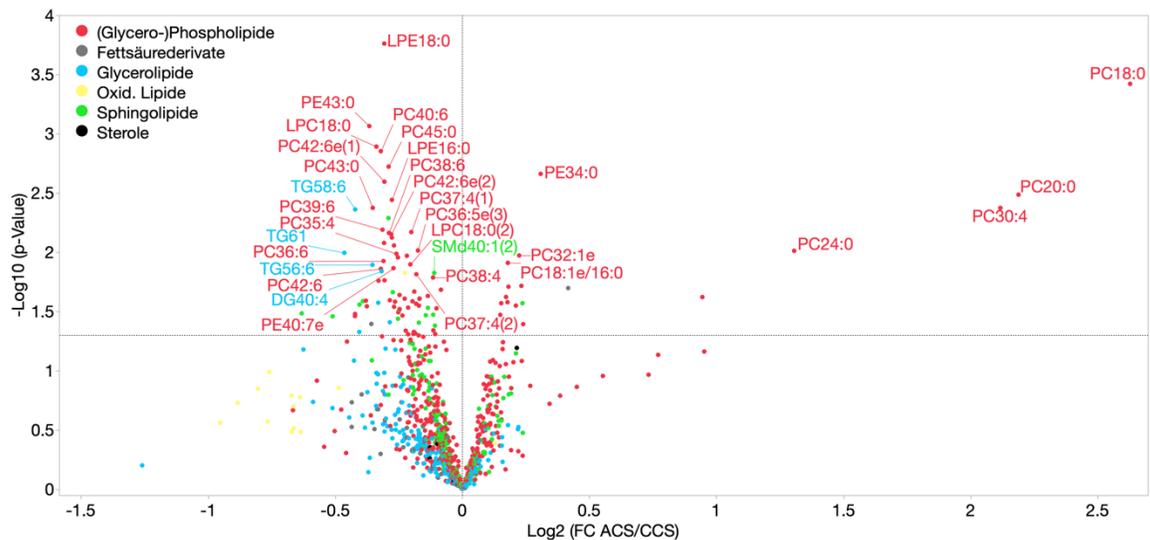


Abbildung 9 Thrombozytäre Glycerophospholipide zeigen eine kritische Heraufregulierung in Patienten mit akutem Koronarsyndrom

Die X-Achse (fold change, FC) gibt den Logarithmus zur Basis 2 aller gemittelter Ratios (ACS/CCS; ACS n=26, CCS n=79) der Peakintensitäten jedes Lipids wieder. Werte >1 indizieren eine Heraufregulierung der Substanz im ACS; <1 eine Herabregulierung des Lipids. Auf der Y-Achse wurde der negative, Log10-transformierte p-Wert der ANOVA (ACS versus CCS) aufgetragen; Die Schwelle der Signifikanz betrug 1,3 ($p < 0,05$). Die Ergebnisse der Falsch-Positiv-Testung (SGoF $p < 0,05$, $FDR < 0,05$) sind beschriftet und in Abbildung 11 gelistet (n=32). Hierbei zeigte sich insbesondere eine Heraufregulierung sieben spezifischer Glycerophospholipide des thrombozytären Lipidom in Patienten mit ACS. *Modifiziert aus (Harm et al., 2021).*

Bei der Betrachtung der signifikant hinaufregulierten thrombozytären Lipide in ACS-Probanden (Abbildung 10) stellten sich mehrere Gemeinsamkeiten dieser heraus. Dabei zeigten die sieben individuellen Glycerophospholipide zumindest eines der folgenden Charakteristika: i) kurz-kettige, gesättigte Fettsäureseitenketten, ii) hohes Maß an gesättigten Bindungen ihrer Seitenketten, iii) ethylenische Alkenylgruppe oder Alkyletheralkenyl als Substituenten der Glycerophospholipide anstelle der Acylgruppe.

In Kontrast zu diesen Beobachtungen wiesen signifikant herunterregulierte Lipide der ACS-Kohorte antithetische Gemeinsamkeiten auf: i) hohe Expression an ungesättigten Doppelbindungen ii) Deacetylierung der Lipid-Kopfgruppen (Lyso-PC, Lyso-PE).

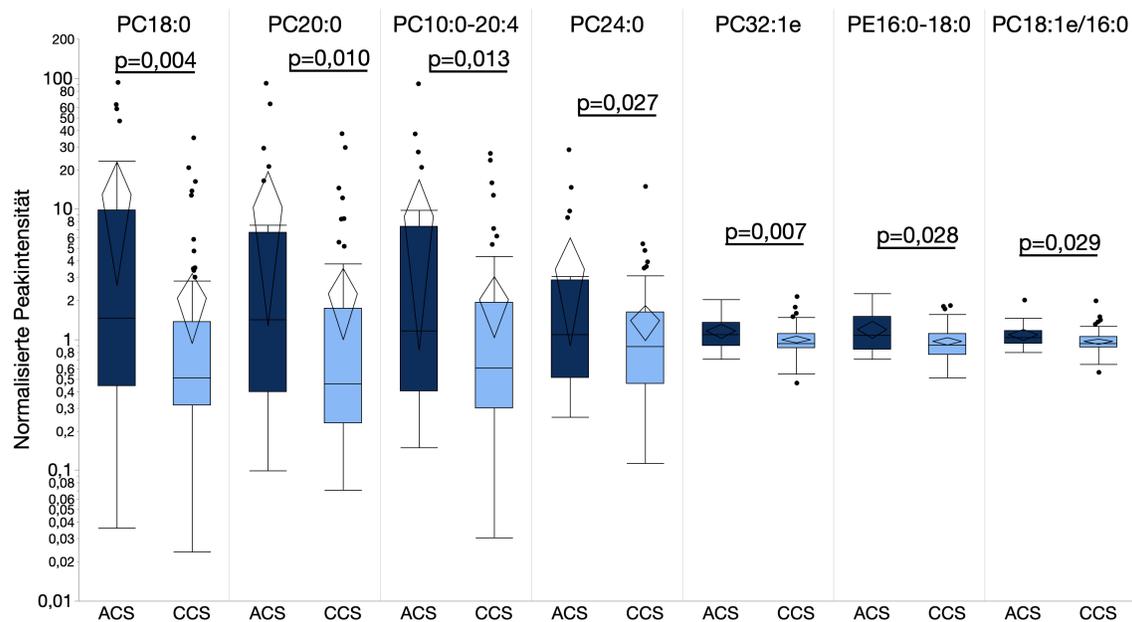


Abbildung 10 Heraufregulierte thrombozytäre Glycerophospholipide teilen spezifische Charakteristika in Patienten mit ACS

Die Boxgraphen bilden die normalisierten Peakintensitäten aller analysierten Probanden auf der y-Achse ab. Die X-Achse gibt die Unterschiede jener signifikant ($ANOVA p < 0,05$, $SGoF p < 0,05$, $FDR < 0,05$) heraufregulierter Glycerophospholipide der Subkollektive des ACS ($n=26$) im Vergleich zum CCS ($n=79$) wieder: (PC18:0 (PC10:0-8:0), $p=0,004$; PC20:0 (PC10:0/10:0), $p=0,010$; PC10:0-20:4, $p=0,0127$; PC24:0 (PC16:0-8:0), $p=0,0267$; PC32:1e, $p=0,0075$; PE16:0-18:0, $p=0,0277$; PC18:1e-16:0; $p=0,0286$). Diese Glycerophospholipide zeigten hierbei zumindest eine der folgenden Gemeinsamkeiten auf: i) kurzkettenige, gesättigte Fettsäureseitenketten, ii) hohes Maß an gesättigten Bindungen ihrer Seitenketten, iii) ethylenische Alkenylgruppe oder Alkyletheralkenyl als Substituenten der Glycerophospholipide anstelle der Acylgruppe.

Bei der semiquantitativen Betrachtung der signifikant veränderten Lipide ergab sich eine große Spannweite zwischen den Kohorten-spezifischen Peakintensitäts-Mittelwerten. Signifikante Unterschiede beider Gruppen zeigten eine maximale Hochregulierung des Phospholipids PC 18:0 in ACS-Probanden um den Faktor 6,2 in Kontrast zum CCS. Weitere stark erhöhte Lipidintensitäten zeigten die Phospholipide PC 20:0 (Faktor 4,6) und PC 24:0 (Faktor 4,3). Hingegen zeigte das

Triglycerid TG 18:0-20:4-22:6 eine signifikante, maximale Reduktion der gemittelten Peak-Intensitäten im Vergleich zum CCS (Faktor 0,7) (Abbildung 11).

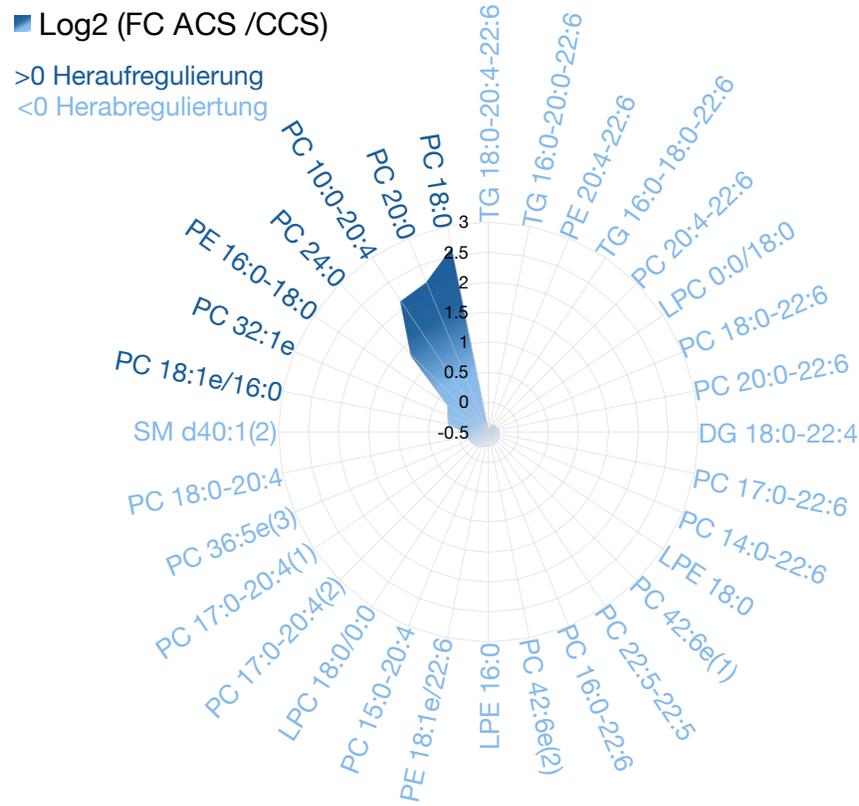


Abbildung 11 PC:18:0 zeigt die größte Heraufregulierung innerhalb des thrombozytären Lipoms der Patienten mit ACS

Das Netzdiagramm bildet die semiquantitative Regulierung (y-Achse Log2 fold change (FC) ACS/CCS) der signifikant veränderten Lipide in KHK-Probanden ab. Hierbei waren sieben Lipide signifikant im ACS heraufreguliert, welche ausschließlich den Glycerophospholipiden zuzuordnen waren (dunkelrot, ANOVA/SGoF $p < 0,05$, FDR $< 0,05$). PC18:0 (PC10:0-8:0) zeigte hierbei die größte Zunahme (6-fach) der Peak-Intensitäten in Probanden mit akutem (ACS, $n=26$), im Vergleich zu einem chronischen Koronarsyndrom (CCS, $n=79$). Im Gegensatz dazu erfuhren 25 Lipide eine Herabregulierung im ACS verglichen zum CCS (hellrot, ANOVA/SGoF $p < 0,05$, FDR $< 0,05$). Die geklammerten Ziffern indizieren die jeweiligen Regioisomere (sn-Position unklar, bei bekannter Fettsäure-Seitenkette) bzw. Konstitutionsisomere (unbekannte Seitenkette). *Modifiziert aus (Harm et al., 2021).*

Um die Relevanz der detektierten Lipide als KHK-spezifische Marker weiter zu untersuchen, erfolgte der Konzentrationsvergleich der signifikant veränderten Lipide des ACS mit gesunden, nicht therapierten Donoren (n=11). Diese präsentierten sich frei von jeglichen schweren Allgemeinerkrankungen, insbesondere wurde eine symptomatische KHK ausgeschlossen. Ebenfalls lag zum Zeitpunkt der Analyse keine dauerhafte pharmakologische Therapie vor. Bei der Gegenüberstellung zeigte sich, dass die Plättchen-adjustierten Konzentrationen der ACS-Probanden, identisch den Peakintensitäten, Veränderungen im Vergleich zum CCS zeigten.

Auffällig zeigte sich indes jedoch, dass die im ACS signifikant veränderten Lipide, mit Ausnahme des DG 18:0-22:4, in den gesunden Spendern lediglich in geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Insbesondere die im ACS, verglichen mit dem CCS, signifikant heraufregulierten Glycerophospholipide PC 18:0, PC 10:0-20:4, PC 24:0 sowie das herabregulierte PC 20:0-22:6 konnten in gesunden Probanden nicht nachgewiesen werden (Abbildung 12.A).

Ein Vergleich der im ACS heraufregulierten Lipide (PC 18:0, PC 10:0-20:4, PC 24:0) ergab für alle Zwischengruppenvergleiche (ACS / CCS / Gesunde Spender (HD)) signifikant abweichende Konzentrationen: i) PC 10:0-20:4 ACS/CCS $p=1,27E-02$; ACS/HD $p=1,07E-03$; CCS/HD $p=6,06E-03$ ii) PC18:0 ACS/CCS $p=4,24E-03$; ACS/HD $p=1,26E-02$; CCS/HD $p=1,59E-03$ iii) PC 20:0 ACS/CCS $p=1,03E-02$; ACS/HD $p=3,3E-04$; CCS/HD $p=6,1E-03$ iv) 24:0 ACS/CCS $p=2,67E-02$; ACS/HD $p=5,18E-15$; CCS/HD $p=1,18E-15$.

Diese Beobachtungen implizieren, dass diese spezifischen Glycerophospholipide unterschiedliche Intensitäten, und damit Regulierungen, innerhalb der KHK (ACS/CCS) aufweisen, jedoch in gesunden Probanden nicht in signifikantem Maße vorhanden sind (Abbildung 12.B).

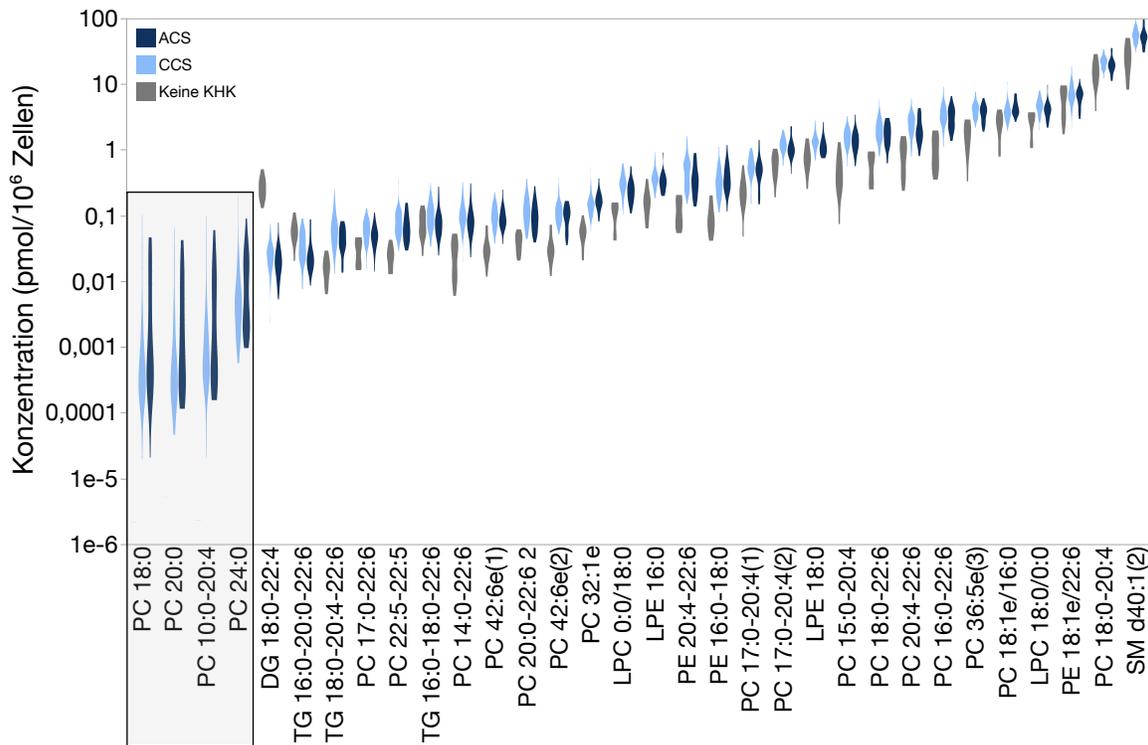
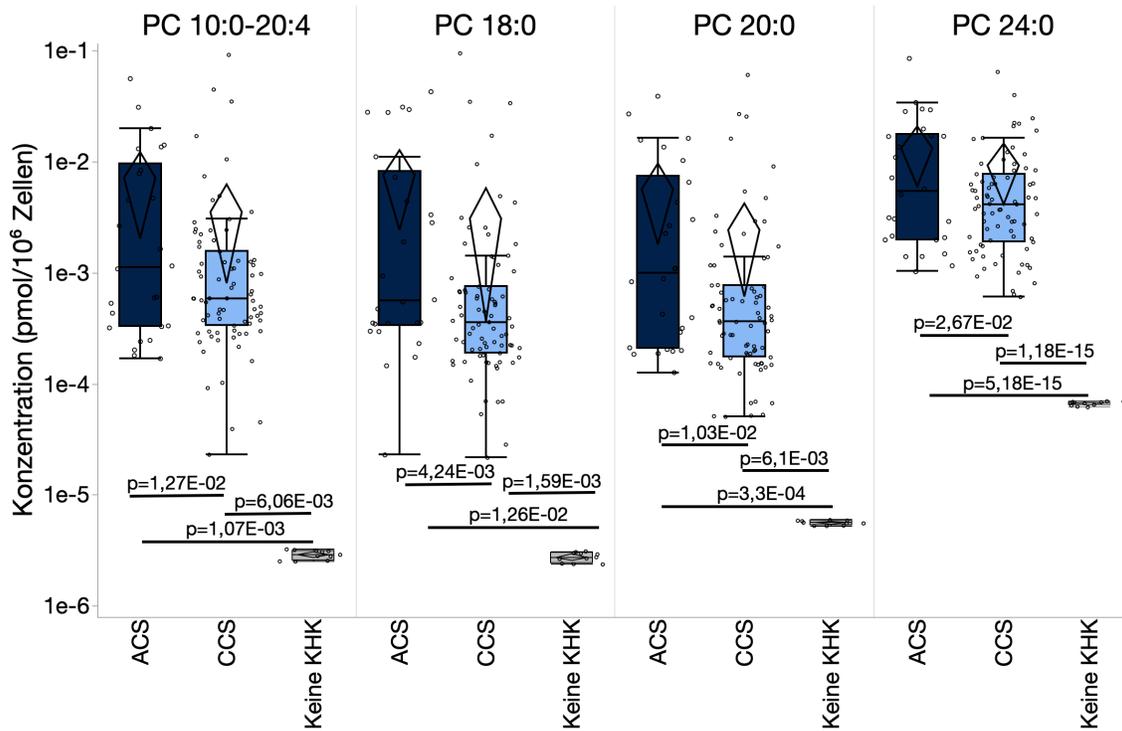


Abbildung 12 Kurz-kettige Glycerophospholipide zeigen erniedrigte Konzentrationen in gesunden Probanden und agieren als KHK-spezifische Marker

A Violinen-Plot

Die Y-Achse zeigt die 32 im ACS, verglichen mit CCS-Probanden, signifikant veränderten Lipide aufsteigend nach ihren medianen Konzentrationen. Auf der X-Achse sind die auf 10⁶ Plättchen normierten, Log₁₀-skalierten Konzentrationen aufgetragen. Bei der Gegenüberstellung der Lipide zeigten sich erniedrigte, bzw. nicht nachweisbare Konzentrationen der Substanzen in Probanden ohne KHK. Eine Ausnahme bildete das DG 18:0-22:4. In **B** betrachtete Lipide wurden durch das graue Areal gekennzeichnet.



B Box-Plots der Glycerophospholipide PC 10:0-20:4, PC 18:0, PC 20:0 und PC 24:0 im Vergleich zwischen ACS-, CCS-, und gesunden Probanden ohne zugrundeliegende KHK (n=11). Diese Lipide zeigten signifikante (SGoF $p < 0,05$, FDR $< 0,05$) Unterschiede der Konzentrationen (Y-Achse) zwischen den jeweiligen Subkohorten. Die Konzentrationen wurden wie beschrieben mittels interner Standards abgeleitet. Da diese Lipide nicht in gesunden Spendern nachgewiesen werden konnten ($< \text{LOD}$ (LOD: $S/N=3$)), wurden die Werte mittels „Gap-Filling“ (Peak-Maximum des „Precursor“-Ions (m/z) innerhalb des erwarteten „Retention-Time“-Fensters) komplettiert. Diese Glycerophospholipide implizieren somit eine KHK-spezifische Nachweisbarkeit.

3.1.2. Einfluss einer Statintherapie auf das thrombozytäre Lipidom

In der Auswertung der klinischen Parameter dieser Studie ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den ACS- und CCS-Kollektiven. Unter anderem wurden ACS-Probanden signifikant ($p=0,01$) weniger häufig mit HMG-CoA-Reduktasehemmern (Statinen) therapiert ($n=16,41\%$) im Vergleich zum CCS ($n=76,76\%$). Um die Wechselwirkung dieser Medikation mit dem thrombozytären Lipidom näher zu beleuchten und „Confounding“-Effekte bezüglich der Lipidalteration im ACS zu verringern, erfolgten weiterfolgende Analysen.

Normalisierte Peakintensitäten der Probanden mit Statineinnahme ($n=92, 66,2\%$) wurden unter Verwendung der univariaten Varianzanalyse mit denen der Probanden ohne Therapie ($n=47, 33,8\%$) verglichen. In dieser Auswertung zeigten siebenundfünfzig (57) Substanzen der 928 detektierten Lipide signifikante Unterschiede (SGoF $p<0,05$, FDR $<0,05$) zwischen den Subkollektiven. Dabei zeigten acht Lipide (7 Glycerophospholipide, 1 Sphingolipid) herabregulierte Werte unter Patienten mit einer Statin-Therapie. Hingegen fanden sich im Statin-therapierten Kollektiv 49 Lipide erhöhter Peakintensitäten im Vergleich zu Objekten ohne Therapie (43 Glycerolipide, 4 Sterole, ein Glycerophospholipid und ein Sphingolipid) (Abbildung 13).

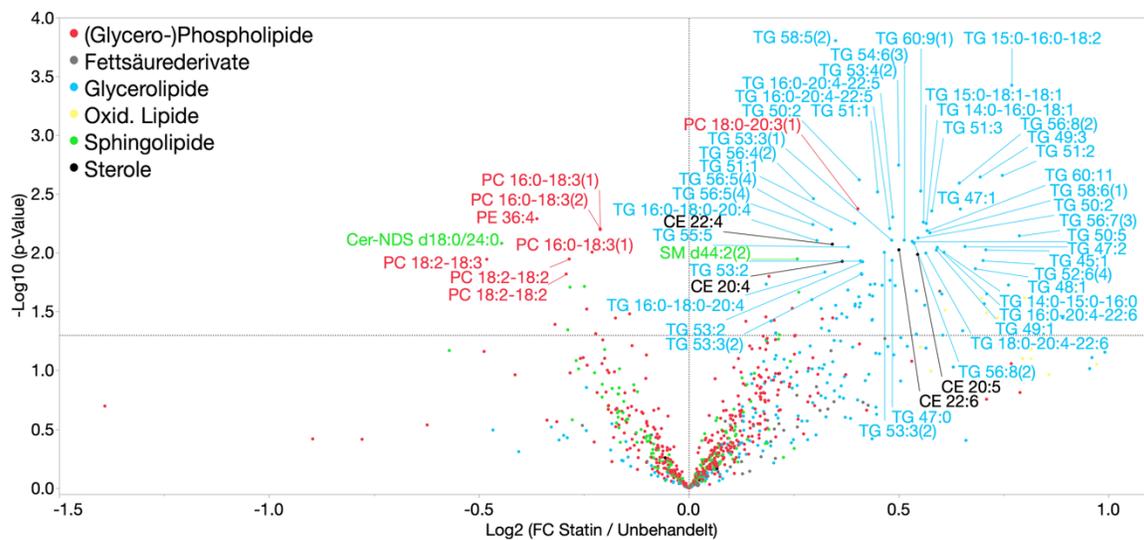


Abbildung 13 Triglyceride sind in entscheidendem Ausmaß heraufreguliert in Patienten mit einer Statintherapie

Die X-Achse (fold change, FC) gibt die Log₂-skalierten, mittleren Ratios (Statintherapie n=92 /Unbehandelt n=47) der Peakintensitäten der individuellen Lipide wieder. Werte >1 indizieren eine Heraufregulierung des Lipids unter Statintherapie (n=49); <1 eine Herabregulierung des Lipids (n=8). Auf der Y-Achse wurde der negative Log₁₀-transformierte p-Wert der ANOVA aufgetragen; Der Grenzwert für signifikante Lipide betrug 1.3 (p<0,05). Die Ergebnisse der Falsch-Positiv-Testung (SGoF p<0,05, FDR<0,05) wurden beschriftet (n=57).

3.1.3. P2Y₁₂-Inhibitor-assoziierte Variabilität des thrombozytären Lipidoms

Weiterhin zeigte die Studienpopulation Unterschiede (p=0,01) hinsichtlich der Therapie mit dem P2Y₁₂-Inhibitor Clopidogrel auf. Unter den ACS-Probanden lag die Behandlungsrate bei 5,1% (n=2) wohingegen 34% (n=34) der CCS-Probanden therapiert wurden. Analog wurden die Peakintensitäten zwischen einer Einnahme der P2Y₁₂-Inhibitoren Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor und Cangrolier (n=36, 25,9%) gegenüber denen des Subkollektivs ohne Therapie (n=103, 74,1%) verglichen. Unter Verwendung der Varianzanalyse zeigten 30 Lipide signifikante Unterschiede (p<0,05, FDR<0,05) zwischen den Therapiegruppen auf. Im P2Y₁₂-Inhibitoren-Subkollektiv zeigte lediglich das Acylcarnitin bzw. Fettsäurederivat CAR 26:1 erniedrigte Werte auf. Divergierend zeigten 29 Glycerophospholipide und 1

Glycerolipid erhöhte Peakintensitäten in Probanden mit P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie, in Kontrast zu Probanden ohne Therapie (Abbildung 14).

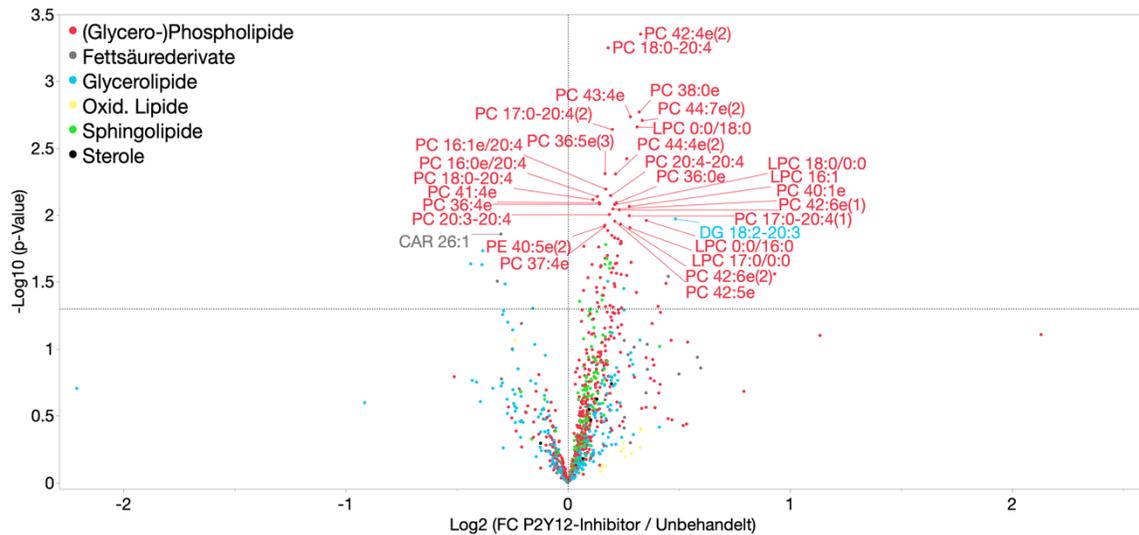


Abbildung 14 Patienten mit P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie weisen Heraufregulierungen spezifischer Glycerophospholipide des thrombozytären Lipidoms auf

Die X-Achse (fold change, FC) gibt die Log₂-skalierten, mittleren Ratios (P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie n=36 /Unbehandelt n=103) der Peakintensitäten der individuellen Lipide wieder. Werte >1 indizieren eine Heraufregulierung des Lipids unter P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie (n=29); <1 eine Herabregulierung des Lipids (n=1). Auf der Y-Achse wurde der negative Log₁₀-transformierte p-Wert der ANOVA aufgetragen (Referenz p=0,05); Die Ergebnisse der Falsch-Positiv-Testung (SGoF p<0,05, FDR<0,05) sind beschriftet. Hierbei zeigten insbesondere Glycerophospholipide eine Heraufregulierung unter einer P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie.

Unter Berücksichtigung der 32 Lipide, welche im ACS-Kollektiv signifikant divergent reguliert waren, erfolgten spezifische tSNE-Analysen der genannten medikamentösen Interferenzfaktoren. Hier konnte gezeigt werden, dass große Teile des ACS-Kollektivs durch die 32 alternierenden Lipide gruppiert werden können. Analysierte man unter Beibehaltung dieser 32 Parameter jedoch die Subkollektive der Statin- oder P2Y₁₂-therapierten Probanden, präsentierten sich die jeweiligen Gruppen homogener in der Gesamtbetrachtung (Abbildung 15). Dies indiziert, dass die signifikant regulierten Lipide der ACS-Kohorte geeignete Parameter abbilden,

um diese gegenüber dem CCS-Kollektiv abzugrenzen. Hingegen lassen sich geringere Unterschiede bei Betrachtung der Medikation dieser Probanden feststellen. Daher scheint der Einfluss dieser Faktoren auf die ACS-spezifisch veränderten Lipide gering.

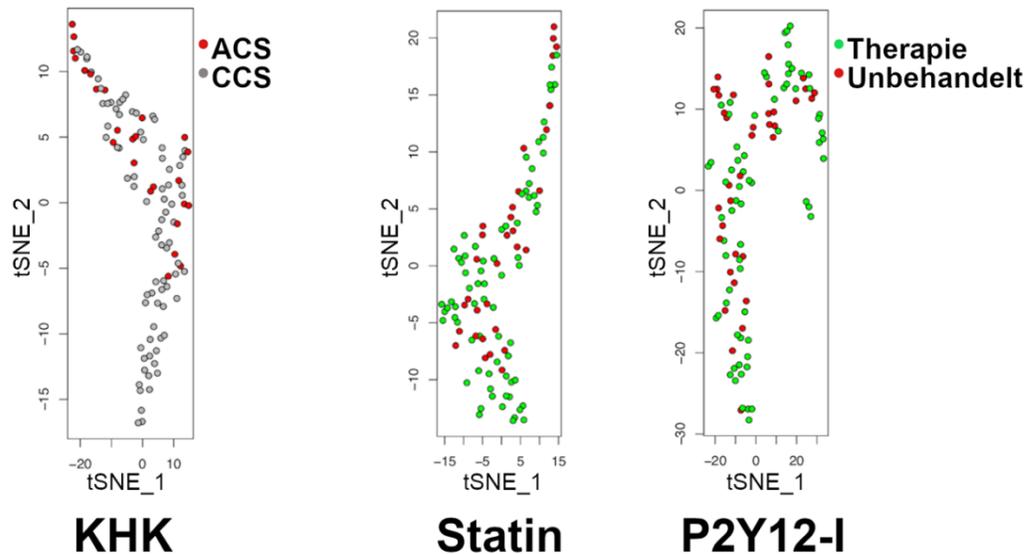


Abbildung 15 Veränderte Lipide in Patienten mit KHK können unabhängig einer medikamentösen Therapie ACS-Patienten gegenüber dem CCS abgrenzen

In der „t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding“-Analyse wurden die 32 signifikant veränderten Lipide des ACS, im Vergleich zum CCS, als Faktoren graphisch in die Zweidimensionalität reduziert (tSNE_1 / tSNE_2). Dabei repräsentieren die Punkte einzelne Probanden der jeweiligen Subkohorten (n=105). Werden diese hinsichtlich der Kollektive farblich gruppiert (ACS rot, CCS grau; Statin- bzw. P2Y12-Inhibitor (I)-Therapie grün, nicht therapiert rot), können gemeinsame Eigenschaften als „Cluster“ dargestellt werden. Hier zeigte sich, dass bei der Analyse dieser Lipide die ACS- und CCS-Kollektive in Teilen gruppiert werden können. Hingegen stellten sich die Kollektive der pharmakologischen Therapien homogener dar.

Dies impliziert, dass die gewählten Lipide in der Lage sind, unabhängig den Einflüssen einer pharmakologischen Therapie, ACS und CCS voneinander zu separieren.

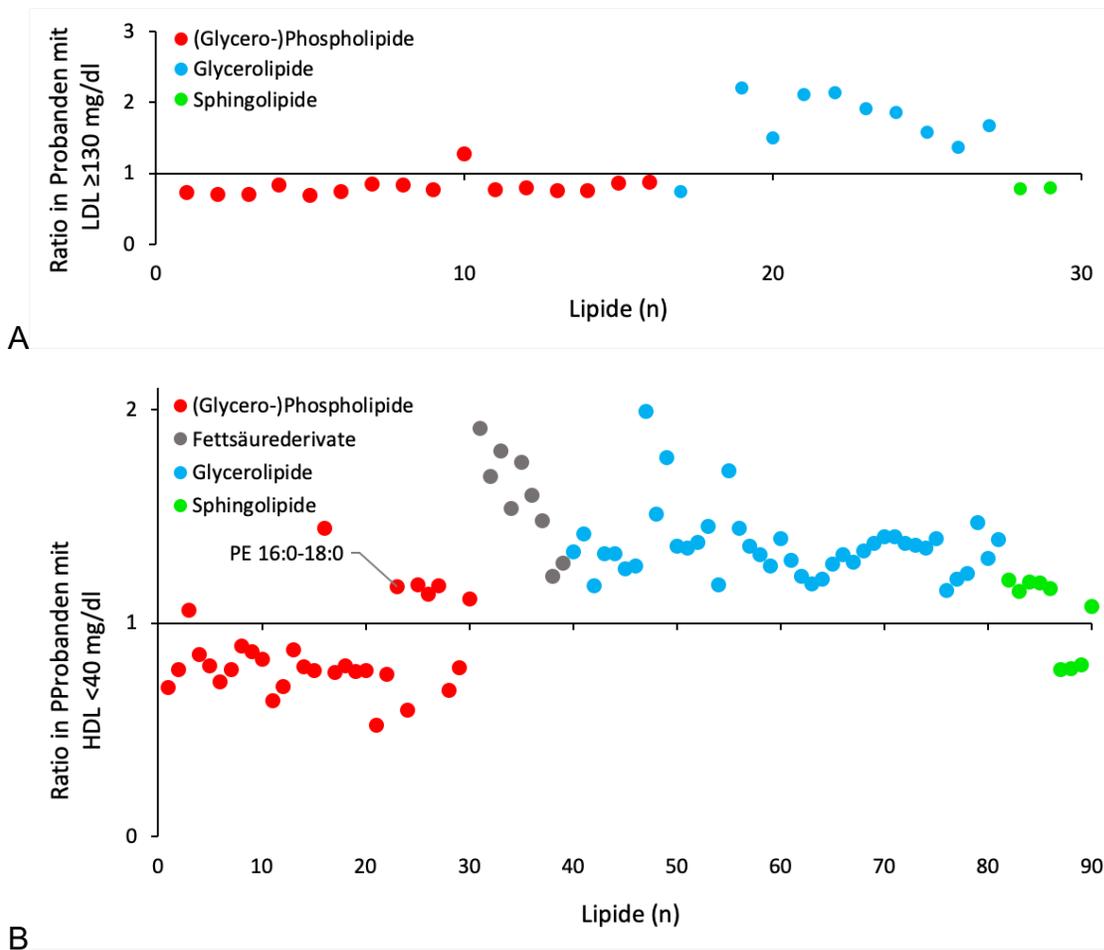
3.1.4. Dyslipidämie-assoziierte Alterationen des thrombozytären Lipidoms

Im ACS-Kollektiv fand sich darüber hinaus, verglichen mit den CCS-Probanden, signifikant ($p=0,024$) weniger häufig eine prädiagnostizierte Hyperlipidämie (ACS $n=12$, 30,8%; CCS $n=64$, 46%). Um dies weiter zu beleuchten, erfolgte der Vergleich des thrombozytären Lipidoms (928 individuelle Lipide) der Studienteilnehmer mit den etablierten Diagnostika einer Fettstoffwechselstörung. Dabei wurden die Probanden hinsichtlich der Grenzwerte für LDL-, HDL- und Triglycerid-Plasmaspiegel gruppiert. Grundlage hierfür waren die Risikostratifizierungen grenzwertig-hoch bei nicht-vorliegender Herzerkrankung bzw. hoch bei vorliegender Herzerkrankung.

In der Betrachtung der decisiven LDL-Plasmawerte zeigten 99 Probanden Werte unter 130 mg/dl. Hingegen wiesen 18 Teilnehmer Plasmaproben mit einem Spiegel ≥ 130 mg/dl auf. Der Zwischengruppenvergleich mittels univariater Varianzanalyse ($p<0,05$) in Kombination mit der SGoF-Auswertung ($p<0,05$, $FDR<0,05$) zeigte 29 auffällig regulierte thrombozytäre Lipide bei Probanden mit hohen LDL-Spiegeln. Diese gliederten sich bei hohem LDL-Wert in hochregulierte Lipide (10 Glycerolipide, 1 Glycerophospholipide) sowie herunterregulierte Lipide (15 Glycerophospholipide, 2 Sphingolipide, 1 Glycerolipide) (Abbildung 16.A). Überschneidungen zu den veränderten Lipiden des ACS-Subkollektivs konnten nicht dargestellt werden.

Beim Vergleich der HDL-Werte wurden 39 Probanden mit Spiegeln unter 40 mg/dl gruppiert und gegenüber den 74 Teilnehmern mit Plasma-HDL-Spiegeln ≥ 40 mg/dl verglichen. In der Varianzanalyse ($p<0,05$, $FDR<0,05$) wiesen 90 Thrombozyten-Lipide signifikant höhere bzw. niedrigere Intensitäten in Probanden mit niedrigen HDL-Spiegeln auf (Abbildung 16.B). Hierunter befanden sich 42 Glycerolipide, 9 Fettsäurederivate, 7 Glycerophospholipide sowie 6 Sphingolipide die jeweils erhöht waren in Probanden mit niedrigen HDL-Spiegeln. Herunterregulierte Lipide beinhalteten 23 Glycerophospholipide sowie 3 Sphingolipide. Das Glycerophospholipid PE 16:0-18:0 zeigte hierbei sowohl erhöhte Intensitäten im ACS als auch in Probanden mit niedrigen HDL-Spiegeln.

In der Analyse der Varianzen hoher Triglyceridspiegel ≥ 150 mg/dl ($n=47$) gegenüber geringeren Werten <150 mg/dl ($n=72$) zeigten 180 Lipide signifikant variierende Peakintensitäten zwischen den Subkohorten (Abbildung 16.C). Alle Lipide zeigten eine Hochregulierung bei Plasmatriglyceriden ≥ 150 mg/dl. Diese ließen sich ordnen in 128 Glycerolipide, 27 Glycerophospholipide, 14 Fettsäurederivate, 8 Sphingolipide und 1 oxidiertes Lipid. Neun dieser Lipide fanden ebenfalls alternierende Peakintensitäten im ACS-Kollektiv.



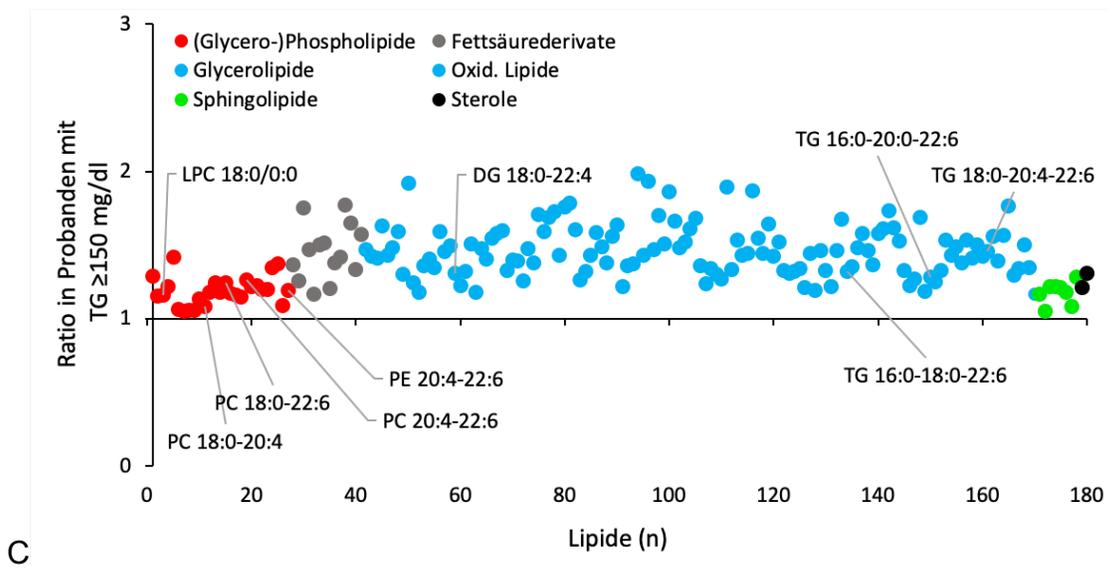


Abbildung 16 Patienten mit erhöhtem Lipoprotein-Risikoprofil zeigen charakteristische Veränderungen der Konstitution des thrombozytären Lipidoms auf

Streudiagramme der Lipidomalteration im Vergleich zu etablierten Lipoproteinrisikomarkern. Auf die X-Achse wurde die Anzahl der signifikant veränderten Lipide bei vorliegender Dyslipidämie aufgetragen (SGoF $p < 0,05$, FDR $< 0,05$). Die Y-Achse gibt den Quotienten der mittleren Peakintensitäten einzelner Plättchenlipide im Vergleich zwischen Lipoprotein-Hochrisikoprofil zum korrespondierenden Niedrigrisiko an. Werte > 1 indizieren heraufregulierte Plättchenlipide bei Lipoprotein-Hochrisiko, < 1 erniedrigte Peakintensitäten. Auffällig zeigte sich hierbei insbesondere eine überwiegende Herabregulierung der Glycerophospholipide in Patienten mit erhöhten LDL- sowie erniedrigten HDL-Werten. Hingegen waren Glycerophospholipide in Patienten mit erhöhtem Plasmatriglyceridspiegel heraufreguliert.

A Assoziation hoher LDL-Spiegel mit thrombozytären Lipidom-Veränderungen. 29 thrombozytäre Lipide zeigten signifikant veränderte Intensitäten bei Probanden mit LDL-Werten ≥ 130 mg/dl ($n=18$), verglichen mit Probanden < 130 mg/dl ($n=99$). $N=11$ heraufregulierte und $n=18$ herabregulierte Lipide zeigten sich in Teilnehmern mit hohen LDL-Werten.

B Assoziation niedriger HDL-Werte und Regulierungen des thrombozytären Lipidoms Bei Probanden mit HDL-Spiegeln < 40 mg/dl ($n=39$) zeigten 90 Lipide signifikant regulierte Intensitäten ($n=64$ heraufreguliert, $n=26$ herabreguliert) im Vergleich zu Werten ≥ 40 mg/dl ($n=74$).

C Assoziation zwischen thrombozytären Lipidom-Veränderungen und vorliegender Hypertriglyceridämie

180 Lipide waren signifikant heraufreguliert in Probanden mit Hypertriglyceridämie ($TG \geq 150$ mg/dl, $n=47$) im Vergleich zu Probanden mit geringen Spiegel ($TG < 150$ mg/dl, $n=72$).

3.1.5. Abhängigkeiten der in ACS-Patienten erhöhten Glycerophospholipid-Risikomarker

Definitiv zeigten 13 der 32 veränderten Lipide des ACS-Kollektivs eine ebenfalls signifikante Regulation unter initial beschriebenen Einflussfaktoren. Dabei zeigte PE 16:0-18:0 erhöhte Werte im ACS und bei Probanden mit HDL-Werten <40mg/dl. Unter den erniedrigten Plättchenlipiden im ACS fanden sich konträr signifikant erhöhte Werte bei Patienten mit Plasmatriglyceriden >150 mg/dl für DG 18:0-22:4, LPC 18/0:0, PC18:0-20:4, PC 20:4-22:6, PE 20:4-22:6, TG 16:0-18:0-22:6, TG 16:0-20:0-22:6, TG 18:0-20:4-22:6.

Erniedrigte Lipide des ACS-Kollektivs fanden erhöhte Werte unter P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie für LPC 0:0/18:0, LPC 0:0/18:0, PC 17:0-20:4(1), PC 17:0-20:4(2), PC 42:6e(1) und PC 42:6e(2). Bei Studienobjekten mit Statineinnahme zeigte TG 18:0-20:4-22:6 signifikant erhöhte Werte, im ACS erniedrigte (Abbildung 17).

Bei der Beleuchtung der Einflussnahme der Dyslipidämie, Statin- oder P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie auf die im ACS heraufregulierten Lipide fanden sich hierbei keine signifikanten Unterschiede. Die Lipide PC 18:0, PC 20:0 PC 10:0-20:4, PC 24:0, PE 16:0-18:0 und PC 18:1e/16:0 zeigten somit lediglich signifikant erhöhte Intensitäten im akuten Koronarsyndrom, jedoch keine Veränderungen in den Subkohorten mit vorliegender Dyslipidämie bzw. pharmakologischer Therapie (Abbildung 18). Eine relevante Interferenz dieser Faktoren auf die beschriebenen, signifikant erhöhten, thrombozytären Lipid-Biomarker des ACS konnte somit als nicht evident dargestellt werden.

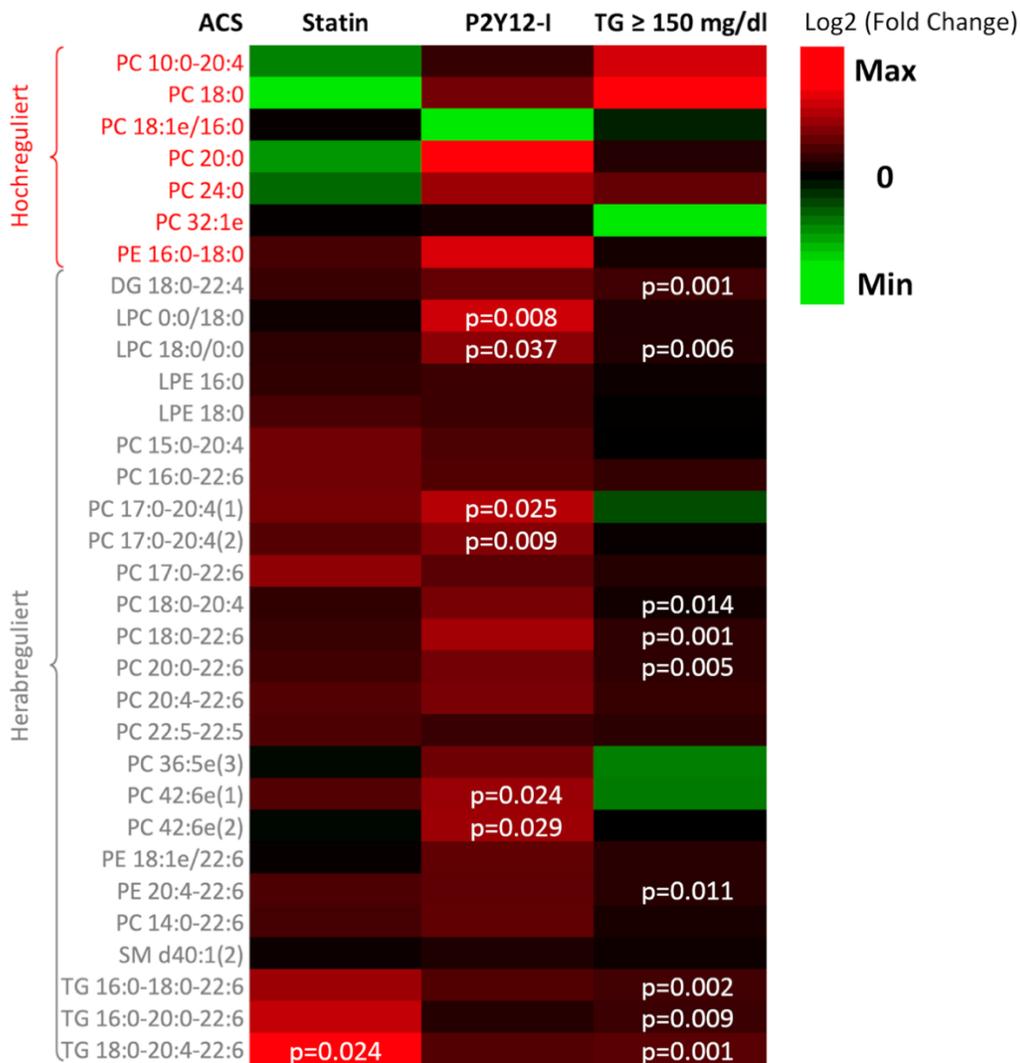


Abbildung 17 Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung zeigen Herabregulierungen des thrombozytären Lipidoms mit Überschneidungen zu Regulationen der Lipide durch eine Pharmakotherapie oder Dyslipidämie

In der linken Spalte wurden die in ACS-Probanden (verglichen mit CCS) signifikant veränderten Lipide aufgetragen (rot = hochreguliert in ACS-Patienten, grau = Herabregulierung). Eine Regulierung dieser Lipide unter Statin- bzw. P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie (im Vergleich zu jeweiligen nicht therapierten Probanden) sowie bei vorliegender Hyperlipidämie (verglichen mit Probanden ohne Hyperlipidämie) wurde mittels Farbkodierung dargestellt. Vergleichend mit Untherapierten bzw. ohne Triglyceridämie ergab sich eine Feldermatrix entsprechend der Legende. Rot (Maximum) impliziert eine Hinaufregulierung, grün (Minimum) herabregulierte Intensitäten unter den genannten Einflüssen. Signifikante Veränderungen (SGoF $p < 0,05$, FDR $< 0,05$) wurden mittels korrespondierendem p-Wert gekennzeichnet. Hierbei zeigten sich lediglich Interferenzen der Lipidregulation bei Lipiden, welche eine Herabregulierung in ACS-Probanden aufwiesen.

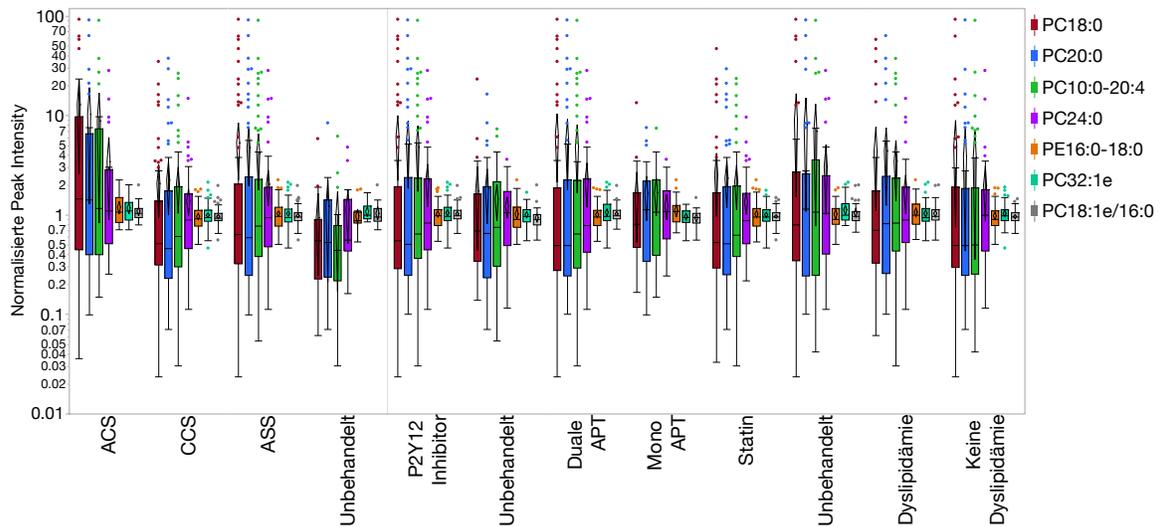


Abbildung 18 Heraufregulierte Lipide in Patienten mit ACS sind robuste Erkrankungsspezifische Marker und bleiben unbeeinflusst durch klinische Faktoren

Aufgetragen wurden die sieben, im Vergleich zum CCS, signifikant erhöhten Glycerophospholipide des ACS (SGoF $p < 0,05$, FDR $< 0,05$). Nebenstehend erfolgten die Vergleiche dieser Lipide bei Probanden mit vorbestehender ASS, P2Y12-Inhibitor-, bzw. dualer antithrombozytärer und Statin-Therapie sowie bei vorliegender Dyslipidämie. Hier ergaben sich keine Signifikanzen (SGoF $p < 0,05$, FDR $< 0,05$). Dies impliziert, dass diese im ACS erhöhten Lipide lediglich als Marker in ACS-Probanden verändert waren, eine Regulation oder Interferenz bei weiteren klinischen Parametern jedoch nicht zu beobachten war.

3.1.6. Korrelation des veränderten thrombozytären Lipidoms in Patienten mit ACS und dem Grad myokardialer Schädigung

In der Analyse der signifikant heraufregulierten Thrombozytenlipide der Patienten mit ACS zeigten sich ebenfalls signifikante Produkt-Moment-Korrelationen in der linearen Auswertung der jeweiligen normalisierten Peakintensitäten mit der Konzentration des kardialen Troponin I. Dabei fanden sich insbesondere positive, signifikante Pearson-Korrelationen für die Glycerophospholipide PC 18:0 ($p=0,007$, $r=0,265$), PC 20:0 ($p=0,001$, $r=0,330$), PC 10:0-20:4 ($p=0,020$, $r=0,229$) sowie für PE 16:0-18:0 ($p=0,045$, $r=0,198$). Dabei gingen erhöhte normalisierte Peakintensitäten dieser Lipide mit ebenfalls gesteigerten Konzentrationen des wichtigen Markers der myokardialen Schädigung, Troponin I (hs-cTn I; ng/L), einher (Abbildung 19).

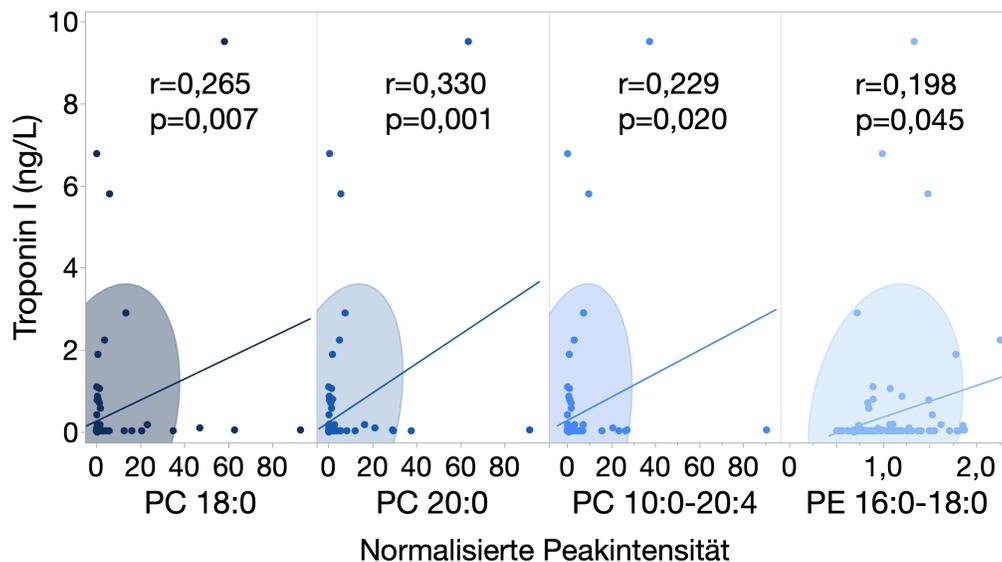


Abbildung 19 Heraufregulierte Glycerophospholipide in Patienten mit ACS, wie das PC18:0, korrelieren signifikant mit dem Ausmaß der myokardialen Schädigung.

Aufgetragen sind die signifikanten Korrelationen ($p<0,05$) der Peakintensitäten der im ACS erhöhten Glycerophospholipide PC 18:0, PC 20:0, PC 10:0-20:4, sowie PC 16:0-18:0 und dem Ausmaß der myokardialen Schädigung anhand des kardialen Troponin I (hs-cTn I ng/L). Dabei zeigten sich positive Korrelationen dieser Glycerophospholipide mit dem wichtigsten Marker des Myokardinfarkts.

Um die Ergebnisse der Korrelation dieser thrombozytären Glycerophospholipide mit der myokardialen Schädigung zu stützen, erfolgten weiterführende multiple Regressionsanalysen (Tabelle 4). Dabei konnte die Dimension der myokardialen Schädigung, anhand des hs-cTN I, signifikant ($p < 0,0001$) mittels zweier Lipidom-Modelle vorhergesagt werden. Die im ACS erhöhten Lipide PC 18:0, PC 20:0 und PE 16:0-18:0 trugen dabei, in Kombination mit den etablierten Risikomarkern Cholesterol und HbA1, signifikant zum Modell 1) bei. Die ebenfalls im ACS erhöhten Lipide PC 20:0, PC 10:0-20:4 und PC 24:0 konnten eigenständig, signifikant das Ausmaß der Troponin-Erhöhung vorhersagen (Modell 2).

Tabelle 3 Heraufregulierte thrombozytäre Glycerophospholipide in Patienten mit ACS sind im Stande, als „Liquid-Biopsy“, den Grad des Myokardschadens zu prognostizieren.

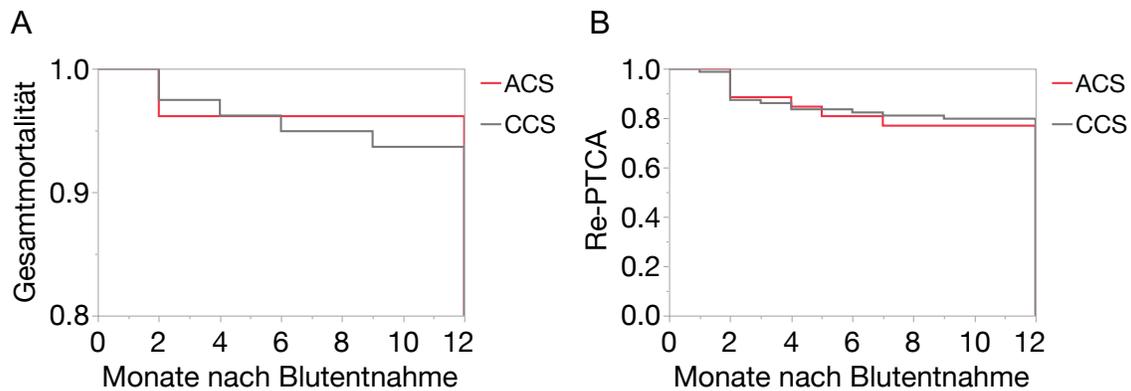
Multiple lineare Regressionsanalyse der quantitativen myokardialen Schädigung anhand des hoch-sensitiven cardialen Troponin I (hs-cTn I).

	Modell 1)	F	Modell 2)	F
Vorhersage myokardialer Schädigung	PC 18:0* PC 20:0* PE 16:0-18:0* Cholesterol HbA1c	$p < 0,0001$	PC 20:0* PC 10:0-20:4* PC 24:0*	$p < 0,0001$
hs-cTn I (ng/L)	F(5,56)=14,941, $R^2=0.572$		F(3,99)=16.505, $R^2=0.331$	

*signifikante Regressionsvariable ($p < 0,05$)

3.1.7. Signifikante Alteration der Glycerophospholipide im Follow-Up

Im klinischen zwölfmonatigen Follow-Up (Tabelle 4) der Studienpopulation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den ACS- bzw. CCS-Subkohorten hinsichtlich der definierten Endpunkte Gesamtmortalität (Abbildung 20.A), Reinterventions-Rate (Abbildung 20.B), Schlaganfall oder Myokardinfarkt. Sechs Probanden des CCS-Kollektivs verstarben (6%), hingegen verstarb ein Studienteilnehmer der ACS-Kohorte (2,6%). Binnen 12 Monate nach Hospitalisierung traten die Endpunkte Myokardinfarkt oder Schlaganfall nicht ein.



C	Gesamt	CCS	ACS	OR	p-
	(n=139)	Troponin - (n=100, 71,9%)	Troponin + (n=39, 28,1%)	(95% KI)	Wert
Verstorben, n (%)	7 (5)	6 (6)	1 (2,6)	2,43 (0,28-20,83)	0,405
Re-PTCA, n (%)	26 (18,7)	20 (20)	6 (15,4)	1,07 (0,41-2,80)	0,886
Myokardinfarkt, n (%)	0	0	0	-	-
Schlaganfall, n (%)	0	0	0	-	-

Abbildung 20 ACS-Patienten wiesen, verglichen mit dem CCS, keine erhöhte Rate klinischer Endpunkte im Zwölf-Monats-Follow-Up auf

A In der Kaplan-Meier-Kurve des zwölfmonatigen Follow-Ups zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Gesamtsterblichkeit zwischen ACS- (n=1, 2,6%) und CCS-Probanden (n=6, 6%).

B Bei Betrachtung der Reinterventionsrate (Re-PTCA) ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der ACS- (n=6, 15,4%) und CCS-Subkollektive (n=20, 20%).

C Tabelle 4 Zwölfmonatige Follow-Up Untersuchung der Gesamtkohorte

Ein Jahr nach Hospitalisierung wurden die Endpunkte Tod, Reintervention, Myokardinfarkt und Schlaganfall in den ACS- und CCS-Subkohorten untersucht.

n=Anzahl, OR=Odds Ratio, KI=95% Konfidenzintervall, PTCA=perkutane transluminale Koronarangioplastie.

Bei der Betrachtung der sieben im Follow-Up-Zeitraum verstorbenen Probanden zeigten sich hingegen signifikante Unterschiede (SGoF $p < 0,05$, FDR $< 0,05$) des thrombozytären Lipidoms. Dabei wiesen LPC 0:0/20:0, LPC 18:1/0:0, LPC 20:4, LPC 20:4/0:0, LPE 18:1, LPI 18:1, LPI 20:4, OxPC 38:4+10, sowie PC 18:2-22:4 signifikant erhöhte normalisierte Peakintensitäten bei den verstorbenen Probanden auf. Auffällig hierbei war wiederum, dass alle dieser heraufregulierten Marker den Glycerophospholipiden zugeordnet werden konnten.

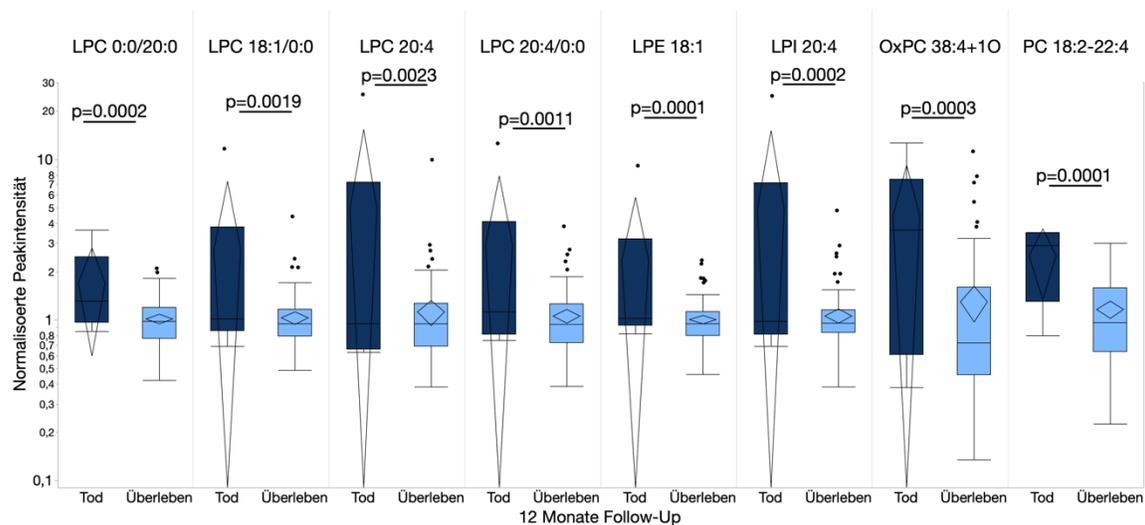


Abbildung 21 Glycerophospholipide sind kritisch heraufreguliert in verstorbenen Patienten der Follow-Up-Untersuchung

Abgebildet wurden signifikant heraufregulierte Glycerophospholipide der Verstorbenen (Tod) im Vergleich zu nicht verstorbenen Probanden (Überleben) (SGoF $p < 0,05$, FDR $< 0,05$). Auf der y-Achse wurden die Log₁₀-skalierten Peakintensitäten der Lipide LPC 0:0/20:0, LPC 18:1/0:0, LPC 20:4, LPC 20:4/0:0, LPE 18:1, LPI 18:1, LPI 20:4, OxPC 38:4+10, sowie PC 18:2-22:4 aufgetragen. Boxplots wurden mit den korrespondierenden p-Werten gekennzeichnet. Die signifikant heraufregulierten Lipide ließen sich exklusive der Kategorie der Glycerophospholipide zuordnen. Überdies zeigte sich eine Dominanz der deacetylierten Lipide (Lyso-PC, Lyso-PE, Lyso-PI). *Modifiziert aus (Harm et al., 2021).*

3.2 Einfluss des signifikant veränderten thrombozytären Lipidoms in Patienten mit ACS auf die Plättchenfunktion

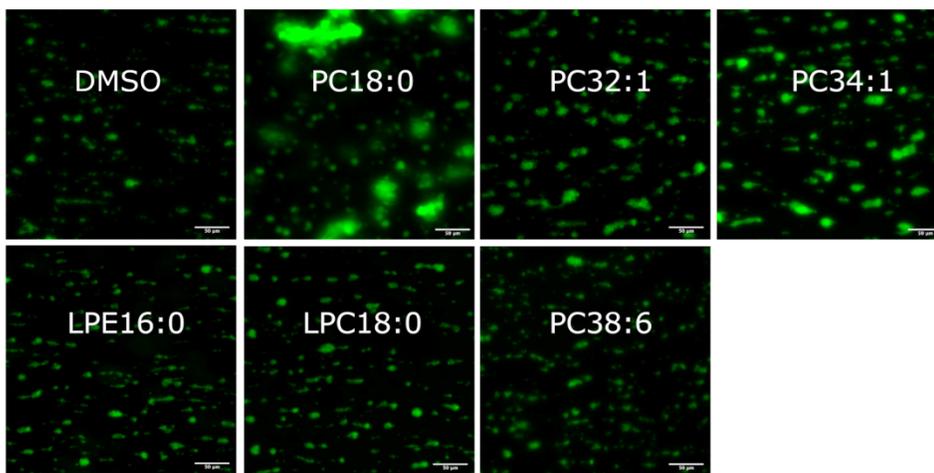
Vorbeschrieben wurde die Assoziation einer erhöhten Plättchenaktivität mit der koronaren Herzerkrankung sowie ein Einfluss des thrombozytären Lipidoms auf deren Funktion. Folglich wurden in dieser Studie Veränderungen des Lipidoms in Patienten mit ACS gegenüber dem CCS dargestellt. Um den Einfluss und die Modulation des thrombozytären Lipidoms hinsichtlich einer alternierenden Thrombozytenfunktion zu testen, wurden *in vitro* Assays durchgeführt. Hierfür wurden repräsentativ drei Glycerophospholipide getestet, welche signifikant erhöhte Werte im ACS-Kollektiv, verglichen mit dem CCS, zeigten (Tabelle 2). Dabei wurden PC 18:0 (9:0/9:0) (äquivalent zu PC 10:0-8:0); PC 32:1e als non-Plasmalogen-Äquivalent und sn1/sn2-Isomer PC 32:1 (18:1-14:0); PC 18:1e-16:0 als non-Plasmalogen-Äquivalent PC 34:1 (18:1-16:0) getestet. Diese wurden jeweils mit drei weiteren Glycerophospholipiden (PC 16:0/22:6, LPC 18:0, LPE 16:0) verglichen, welche eine Herunterregulierung im ACS aufwiesen (Tabelle 2).

3.2.1. Signifikant veränderte Thrombusformierung durch Glycerophospholipid-Einwirkung.

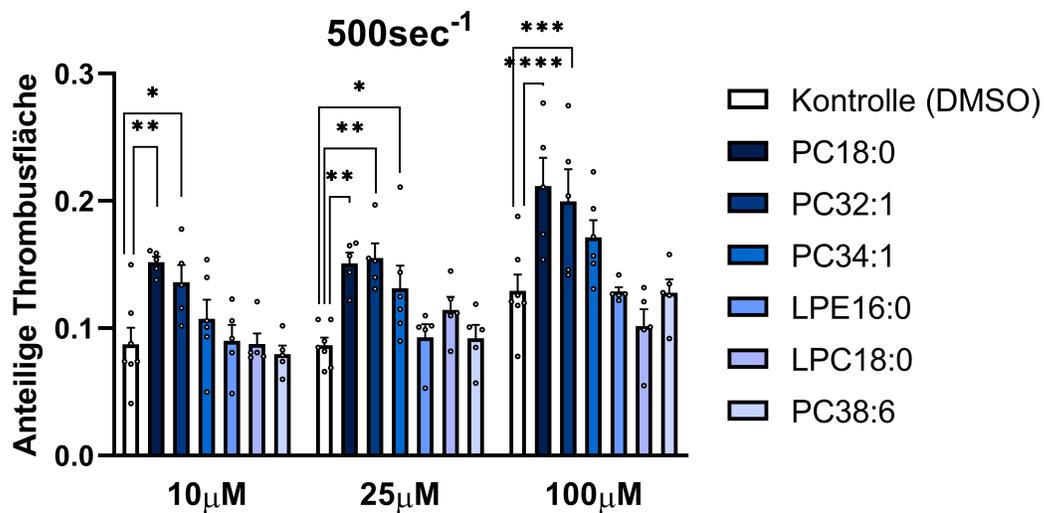
CPDA-Citratblut wurde mit den jeweiligen Glycerophospholipiden präinkubiert und unter Verwendung der Flusskammer bezüglich der Kollagen-mediierten Thrombusbildung bewertet. Bei geringer Flussgeschwindigkeit (500sec^{-1}), in Konzentrationen gemäß Angaben, zeigten die mit PC18:0 ($100\mu\text{M}$ $p<0,0001$; $25\mu\text{M}$ $p<0,01$; $10\mu\text{M}$ $p<0,01$) und PC32:1 ($100\mu\text{M}$ $p<0,001$; $25\mu\text{M}$ $p<0,01$; $10\mu\text{M}$ $p<0,05$) inkubierten Ansätze eine signifikant erhöhte Thrombusentstehung. Beide Glycerophospholipide erhöhten die Thrombusformierung in allen untersuchten Konzentrationen. Eine signifikant vermehrte Thrombusgenerierung konnte konzentrationsabhängig unter Einwirkung des PC 34:1 ($25\mu\text{M}$ $p<0,05$) beobachtet werden. Bei hoher Schergeschwindigkeit (1700sec^{-1}) zeigten ebenfalls die im akuten Koronarsyndrom erhöhten PC 18:0 und PC 32:1 in hoher Konzentration ($100\mu\text{M}$)

eine signifikant vermehrte Thrombusgenerierung ($p < 0,05$). In der Fotodokumentation, insbesondere unter Einwirkung der niedrigen Schergeschwindigkeit, zeigte PC 18:0 die visuell-prominentesten prothrombotischen Effekte (Abbildung 22.A). PC 38:6, LPE 16:0 sowie LPC 18:0, welche herabreguliert Werte im ACS aufwiesen, zeigten in der Flusskammerperfusion keine signifikante Veränderung der Thrombusbildung.

A



B



C

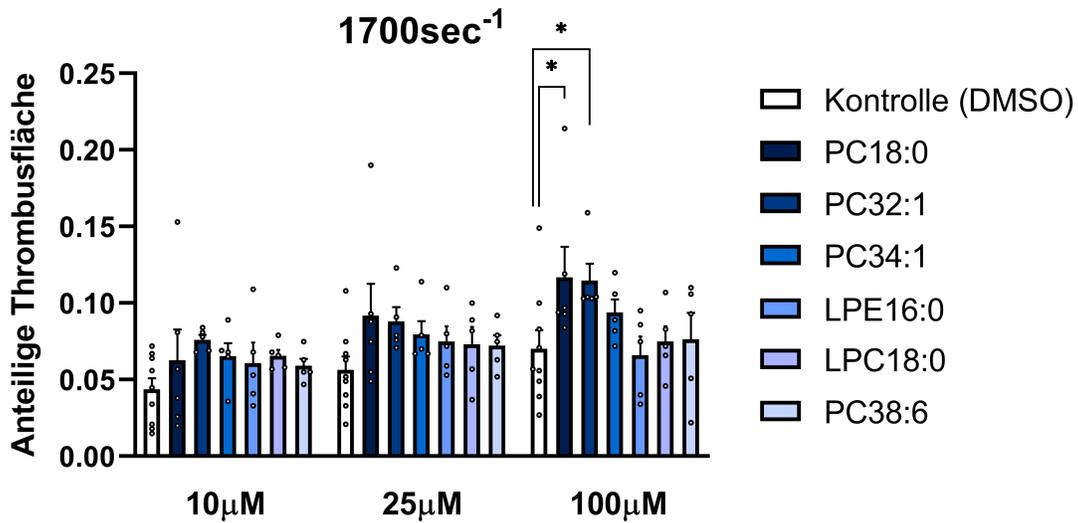


Abbildung 22 PC18:0 erhöht maßgeblich die *ex vivo* Thrombusfomierung

A Repräsentative Bilder für n=5 unabhängige Flusskammerexperimente unter Anwendung der geringen Schergeschwindigkeit (500 sec⁻¹). Maßstabsleiste = 50 μm. PC 18:0 zeigte die visuell-prominenteste Thrombusgenerierung. **B** *In vitro* Thrombozyten-abhängige Flusskammerperfusion bei geringer Schergeschwindigkeit (500sec⁻¹) unter Einwirkung der ACS-assoziierten Glycerophospholipide (10 μM, 25 μM, 100 μM) oder DMSO (Kontrolle); die Quantifizierung der Thrombogenität erfolgte unter standardisierter Berechnung der Thrombusfläche (Area Fraction). Hierbei zeigte PC 18:0 unter allen Konzentrationen das größte prothrombogene Potential der getesteten Äquivalente. Die PC 32:1-abhängige Thrombusbildung war ebenfalls unter allen Konzentrationen signifikant erhöht. PC 34:1 erhöhte die Thrombusbildung ebenfalls bei Einwirkung der mittleren Konzentration. Abgebildet: n=5, Mittelwert ± SEM; Statistik: two-way ANOVA; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001, **** = p<0,0001. **C** Hohe Schergeschwindigkeit (1700sec⁻¹); PC 18:0 und PC 32:1 in höchster Konzentration zeigten eine signifikante vermehrte Thrombusgenerierung im Vergleich zur Kontrolle; Abgebildet: n=5; Mittelwert ± SEM; Statistik: two-way ANOVA; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001, **** = p<0,0001. *Modifiziert aus (Harm et al., 2021).*

3.2.2. Signifikant erhöhte Glycerophospholipid-induzierte Thrombozytenaggregation

Entsprechend der Flusskammerperfusion wurde Glycerophospholipid-inkubiertes Hirudin-Vollblut mittels Impedanzaggregometrie (Multiplate) untersucht. Diesbezüglich zeigte PC 18:0 sowohl eine Augmentation der Arachidonsäure- ($p < 0,01$) als auch Kollagen-induzierten ($p < 0,05$) Plättchenaggregation. Bei der Arachidonsäure-vermittelten Impedanzaggregometrie fand sich weiterhin ein erhöhtes Kurvenintegral für die Glycerophospholipide PC 32:1 ($p < 0,05$) und PC 34:1 ($p < 0,05$). In Kontrast zu diesen Beobachtungen zeigten diejenigen Lipide, welche im ACS, verglichen mit CCS-Probanden, herunterreguliert waren, keine signifikante Erhöhung der Plättchenaggregation im Vergleich zur Kontrolle (DMSO).

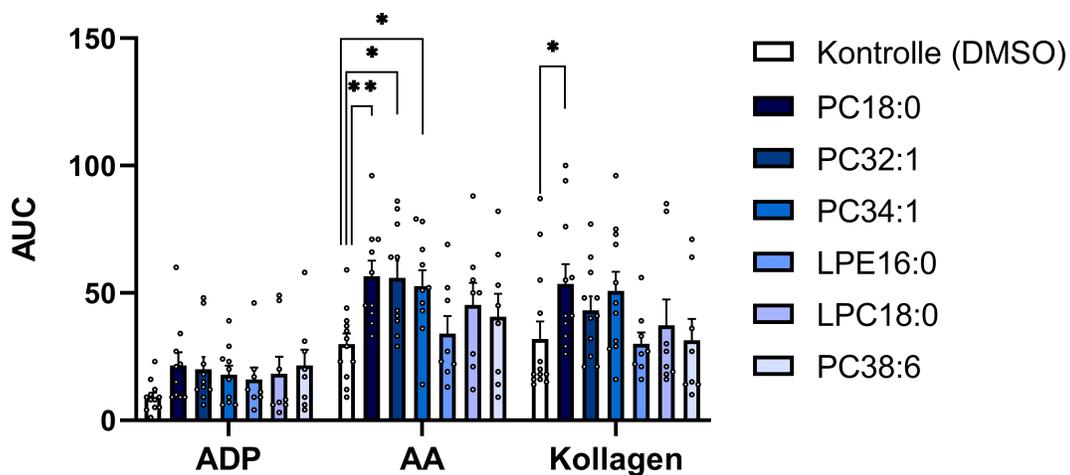


Abbildung 23 Kurzkettige Glycerophospholipide, mit PC18:0 als Leitsubstanz, steigern die Plättchenaggregation

In der Gegenwart der Glycerophospholipide bzw. DMSO (100 μ M, Inkubation 30min), erfolgte die Messung der Plättchenaggregation in Hirudin-Vollblut gesunder Spender. Dieses wurde jeweils mittels Agonisten (ADP 6,5 μ M, Arachidonsäure (AA) 484 μ M oder Kollagen 3,2 μ g/ml) stimuliert. PC18:0 zeigte hierbei eine signifikant verstärkte AA- und Kollagen-induzierte Plättchenaggregation; PC32:1 und PC34:1 hingegen erhöhten die AA-stimulierte Plättchenaggregation signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Abgebildet: n=8; Mittelwert \pm SEM; Statistik: two-way ANOVA; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Modifiziert aus (Harm et al., 2021).

3.2.3. PC 18:0-medierte Verstärkung der CD62P-Plättchenaktivierung

Unter Verwendung der Durchflusszytometrie erfolgte die Detektion der Thrombozytenaktivierung mittels P-Selectin / CD62P. Dabei wurden Thrombozyten aus mit Glycerophospholipiden präinkubiertem CPDA-Citratblut sowohl im Ausgangszustand als auch unter CRP-Stimulierung auf das CD62P-Fluoreszenzniveau untersucht. Hier zeigte sich eine signifikant hohe Aktivierung bei CRP-stimulierten Ansätzen unter Einwirkung des PC 18:0 ($p < 0,05$). Eine signifikante Veränderung der mittleren Fluoreszenz im Ausgangszustand konnte nicht gezeigt werden. Andere Glycerophospholipide präsentierten sich ebenso mit keiner signifikanten Änderung des Aktivierungsmaßes.

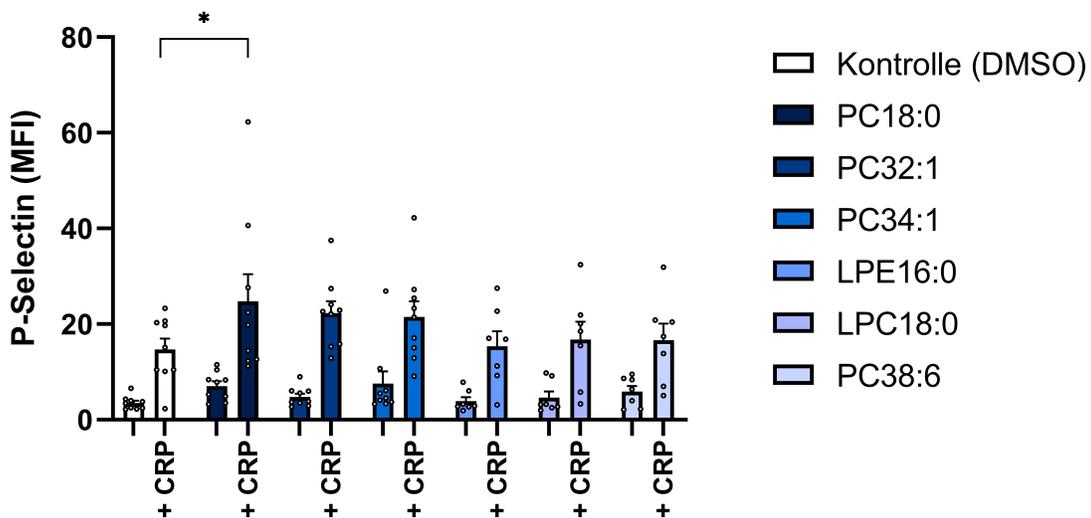


Abbildung 24 PC18:0-vermittelte signifikante CD62P-induzierte Plättchenaktivierung

Bei der Quantifizierung der thrombozytären Aktivierung mittels gemittelter Intensität (MFI) des P-Selectins / CD62P zeigte sich eine signifikante Steigerung dieser unter Zugabe von PC 18:0 (100µM) im Vergleich zur Kontrolle (DMSO). Diese vermehrte Aktivierung zeigte sich unter Zugabe des collagen related peptide (CRP), nicht jedoch im Ruhezustand. Die weiteren getesteten Glycerophospholipide zeigten in Kontrast keine gesteigerte Plättchenaktivierung.

Abgebildet: $n \geq 6$; Mittelwert \pm SEM; Statistik: two-way ANOVA; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Modifiziert aus (Harm et al., 2021).

3.2.3. Veränderungen der plasmatischen Gerinnung durch Glycerophospholipide

Unter Einsatz des TEG-Hämostase-Analysegeräts und des TEG-„Platelet-Mapping“-Systems wurde der Einfluss in ACS-Probanden erhöhter Glycerophospholipide auf Veränderungen der Gerinnungsparameter untersucht. Hierfür wurde Heparin-Vollblut mit den jeweiligen Glycerophospholipiden (100µM) präinkubiert und standardisiert ausgewertet. Dabei zeigte sich eine signifikante ($p < 0,05$) Verstärkung der enzymatischen Gerinnung (R-Wert), eine gesteigerte plasmatische Gerinnung (INR / aPTT) und daher eine Neigung zu Hyperkoagulabilität (Abbildung 18). Signifikante Veränderungen der Geschwindigkeit (K , α) und Stabilität (MA) der Thrombusbildung konnten nicht dargestellt werden. Aufgrund fehlender LY30-Werte unter Glycerophospholipid-Einwirkung erfolgte keine Interpretation der Thrombolyse (LY30).

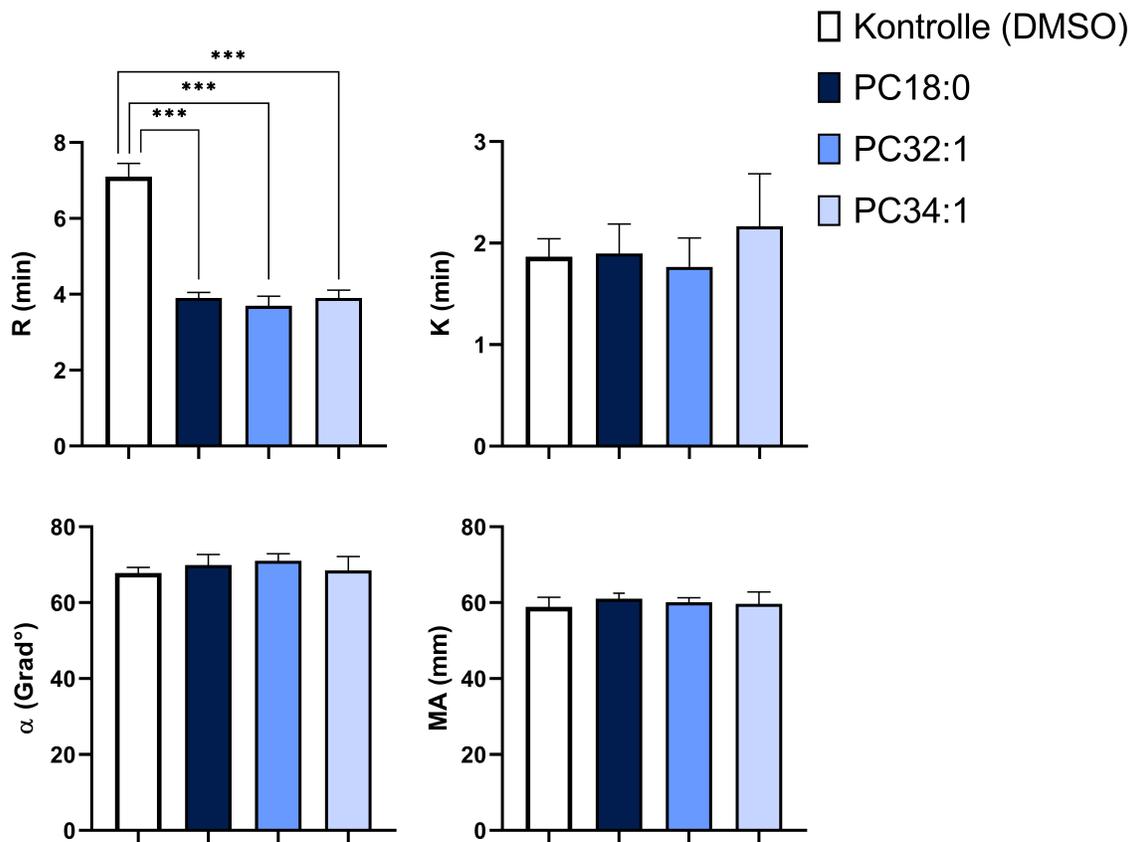


Abbildung 25 Signifikant erhöhte Lipide in Thrombozyten der ACS-Patienten führen in einen Zustand gesteigerter plasmatischer Gerinnung

Mittels thrombelastographischer Analyse der Gerinnungsfunktionen zeigte sich eine verkürzte Dauer der Gerinnselbildung (R) unter Einwirkung der Glycerophospholipide PC 18:0, PC 32:1 und PC 34:1 und damit einhergehend eine Verstärkung des plasmatischen Schenkels der Gerinnung. Eine Verstärkung der Plättchen-abhängigen Thrombusbildung (K, α) oder Thrombusstabilität (MA) konnte nicht gezeigt werden. Abgebildet: n=3; Mittelwert \pm SEM; Statistik: two-way ANOVA; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Hauptergebnisse dieser Studie sind:

- i) signifikante Alterationen des thrombozytären Lipidoms treten auf in Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom;
- ii) hinaufregulierte Lipide lassen sich exklusiv der Kategorie der Glycerophospholipide zuordnen;
- iii) unter den im ACS hochregulierten Glycerophospholipiden zeigt insbesondere PC 18:0 in *in vitro* Untersuchungen ein erhebliches prothrombotisches Potenzial. Diese Beobachtungen indizieren, dass die Hochregulierung der kurzkettigen Glycerophospholipide in Thrombozyten zur Pathophysiologie des ACS beitragen, indem sie die Plättchen-abhängige Thrombusbildung verstärken
- iv) diese Lipide korrelieren signifikant mit dem Niveau des Troponin-I-Spiegels und tragen signifikant zur Vorhersage dessen bei;
- v) Veränderungen des Lipidoms lassen sich ebenfalls darstellen bei Probanden unter Einwirkung einer Statin- bzw. P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie sowie bei vorhandener Dyslipidämie und Verstorbenen des Follow-Ups. Diese Faktoren nehmen keinen Einfluss auf die beobachteten thrombozytären Alteration in Patienten mit ACS.

4.2. Diskussion der Methoden

4.2.1. KHK-Kollektiv und thrombozytäre Lipidom-Analyse

Diese Studie untersuchte erstmals Unterschiede des thrombozytären Lipidoms in Probanden mit ACS, verglichen mit einem CCS. Dabei wurden in einem großen Kollektiv isolierte Thrombozyten mittels UHPLC-ESI-QTOF-Massenspektrometrie untersucht. Dieses stellte ein bereits etabliertes Verfahren der KHK-assoziierten Lipidomik dar (Chatterjee et al., 2017, Peng et al., 2018).

Einhundertneununddreißig Probanden mit koronarer Herzerkrankung wurden dabei hinsichtlich möglicher Unterschiede der detektierten und normalisierten Peakintensitäten thrombozytärer Lipide verglichen. Aufgrund LC-MS-basierter technischer „Outlier“ wurden 105 von 139 Proben für weitere Lipidom-Auswertungen verwendet. Gemäß einer „Intention-to-treat“-Analyse wurden alle weiteren klinischen Daten des Gesamtkollektivs für deren Interpretation verwendet, um Verzerrungseffekte zu mindern. Für die Darstellung des signifikant veränderten Lipidoms in ACS-Probanden wurde eine univariate Varianzanalyse ($p < 0,05$) verwendet und mit dem „Sequential-Goodness-of-Fit“-Algorithmus ($p < 0,05$, $FDR < 0,05$) kombiniert. Somit konnte der Alpha-Fehler reduziert und 32 Lipide als signifikant verändert in ACS-Probanden dargestellt werden, hingegen wurden 65 Lipide mit einem P-Wert $< 0,05$ herausgefiltert (Harm et al., 2021). Ziele weiterer Untersuchungen sind die Überprüfung dieser aktuellen, neuen Ergebnisse in einem Kollektiv mit erhöhter Probandenanzahl. Vergleiche zu gesunden, nicht-therapierten Kontroll-Objekten sollten ebenfalls in einem größeren, „gematchten“ Kollektiv gezogen werden, um Rückschlüsse der präsentierten Ergebnisse auf die zugrundeliegende Erkrankung zu ermöglichen und Einflussfaktoren weiter zu reduzieren.

4.2.2. Experimentell untersuchte Glycerophospholipide

Mittels beschriebener Detektion der Divergenz des thrombozytären Lipidoms im ACS und prothrombotischer Eigenschaften dieser Lipide *in vitro* konnte zum ersten Mal eine methodische Verbindung dieser Beobachtungen geschaffen werden.

Hierfür wurden repräsentativ 6 Glycerophospholipide der 32 im ACS veränderten Lipide analysiert. Diese wurden wie vorbeschrieben in den zu untersuchenden Vollblutproben gelöst (Chatterjee et al., 2017, Peng et al., 2018). Somit konnten Rückschlüsse auf die Wirkung individueller Glycerophospholipide hinsichtlich der Plättchenfunktion getroffen werden. Für die Glycerophospholipide PC 18:0, PC 32:1e, PC 18:1e-16:0 wurden kommerziell erhältliche Strukturäquivalente

verwendet. Diese teilten allerdings alle gemeinsamen Merkmale mit den im ACS detektierten Lipiden. Daher bleiben Aussagen und Interpretationen des Einflusses ihrer Charakteristika auf Thrombozytenfunktionen unverändert. Weiterhin bleibt der konkrete Mechanismus der beschriebenen Beeinträchtigung der Plättcheneigenschaften unklar. Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften kann ein Einbau der untersuchten Glycerophospholipide nach dreißigminütiger Inkubation in das thrombozytäre Lipidom angenommen werden (Harm et al., 2021). Dennoch bleibt der Anteil der Wirkung extrazellulärer Glycerophospholipide offen. In folgenden Studien sollten genaue Analysen der Lipidseitenketten erfolgen, um deren spezifischen Einfluss auf die *in vitro*-Wirkung zu erhalten. Darüber hinaus müssen Methoden etabliert werden, um den Einbau und die Fluidität thrombozytärer Glycerophospholipide in Plasmamembranen näher zu verstehen.

4.2.3. Experimentelle Methodik

Für die weitere Diagnostik des in ACS-Patienten veränderten Lipidoms fanden in der Thrombozytenforschung etablierte und validierte Methoden Anwendung. Darüber hinaus sind die „Assays“ in der Lage, pathophysiologische Grundlagen der Atherosklerose und KHK zu modellieren (Chatterjee et al., 2017, Gawaz, 2006, Gawaz, 2016, Gawaz et al., 2005, Harrison et al., 2005, Peng et al., 2018). Weiterhin konnten aufgrund einer abnormen Plättchenaktivität *in vitro*-Vorhersagen hinsichtlich folgender kardiovaskulärer Ereignisse, respektive Myokardschädigungen, getroffen werden (Frossard et al., 2004, Fuchs et al., 2006). In dieser Studie wurde die Plättchenfunktion experimentell mittels Flusskammer, Durchflusszytometrie sowie Impedanzaggregometrie untersucht. Als klinisch etabliertes, schnell verfügbares Diagnostikum, erfolgte das „Monitoring“ der Hämostase unter Glycerophospholipideinfluss mittels Thrombelastographie (Bowbrick et al., 2003b). Aufgrund der bestätigten Vorhersagekraft und Stärken der *ex vivo*-Untersuchungen sollten Auffälligkeiten der Plättchenfunktion und Thrombogenität in der nächsten Stufe mittels *in vivo*-Modellen beleuchtet werden.

So könnten direkte Rückschlüsse der Wirkung des veränderten Lipidoms auf den Organismus getroffen werden (Gresele et al., 2019, Peng et al., 2018).

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Charakterisierung des thrombozytären Lipidoms in Patienten mit ACS

Eine Aktivierung zirkulierender Thrombozyten ist essenziell involviert in die Entstehung des akuten Koronarsyndroms. Erst vor kurzem wurde das thrombozytäre Lipidom umfassend charakterisiert (O'Donnell et al., 2014, Chatterjee et al., 2017, Peng et al., 2018). Während dieser Thrombozytenaktivierung sind, neben weiteren, insbesondere oxidierte Lipide signifikant heraufreguliert. Dies erfolgt zu Teilen über einen Aspirin-sensitive-Cyclooxygenase-1 (COX-1)-„Pathway“ (Slatter et al., 2016, Chatterjee, 2020, O'Donnell et al., 2014).

In dieser Studie konnte überdies erstmals gezeigt werden, dass Änderungen des thrombozytären Lipidoms in ACS-Patienten mit einem prothrombotischen Status assoziiert sind. Dies impliziert eine pathophysiologische Rolle der thrombozytären Lipide in der Entstehung des ACS (Harm et al., 2021).

Unter den 928 identifizierten Lipiden isolierter Thrombozyten befanden sich Glycerophospholipide, Glycerolipide, Sphingolipide, Fettsäurederivate und Sterole. Hierbei zeigten sich bei der Gegenüberstellung von Probanden mit einem diagnostizierten ACS, verglichen mit dem CCS, 7 heraufregulierte Glycerophospholipide, sowie 25 herabregulierte Lipide. Erstgenannte zeigten ein hohes Maß an gesättigten Bindungen, kurze Seitenketten oder Ether-Verbindungen. Glycerophospholipide sind vorbeschriebener Hauptbestandteil zellulärer Lipiddoppelmembranen und entscheidend für die Zusammensetzung und Integration der Proteine in Zellmembranen (Koseoglu et al., 2015, Xiao et al., 2001, Koseoglu et al., 2014, Joist et al., 1977, Hu et al., 2016). Des Weiteren determinieren Glycerophospholipide den Grad der Aktivierung thrombozytärer Lipidmembranen und der Thrombin-Generierung (Hishikawa et al., 2014, Hu et al., 2016). Folglich ist

die Zusammensetzung thrombozytärer Membranen, hinsichtlich enthaltener Glycerophospholipide, hochgradig mit Änderungen der Plättchenfunktion assoziiert. Somit sind Glycerophospholipide ebenfalls in die Plättchen-abhängigen Thrombusbildung involviert. Um diese Hypothese zu testen, wurden in dieser Studie *in vitro* Untersuchungen mit isolierten Glycerophospholipiden durchgeführt. PC 18:0 zeigte indes die stärkste Heraufregulierung in Thrombozyten der Patienten mit ACS (Harm et al., 2021). Einen zugrundeliegenden, hypothetischen Erklärungsansatz bietet die gestörte Fettsäureoxidation der Fettsäurespeicher im akuten Koronarsyndrom (Iqbal et al., 2002, Kattoor et al., 2017, Solati and Ravandi, 2019). Thrombozytäres oxLDL, als Ausdruck einer gesteigerten Lipid-Oxidation, konnte bereits in vermehrtem Ausmaße in Patienten mit koronarer Herzerkrankung und akutem Koronarsyndrom detektiert werden (Chatterjee et al., 2017). Ein erhöhtes Niveau an oxidativem Stress in Patienten mit akutem Koronarsyndrom führt somit möglicherweise über enzymatische Zwischenstufen zu einer Überproduktion der kurzkettigen Glycerophospholipide, wie PC 18:0. Andererseits konnte ebenfalls eine Inkorporation von extern zugeführtem PC 18:0 durch Thrombozyten unter *ex vivo* Bedingungen dargelegt werden (Harm et al., 2021).

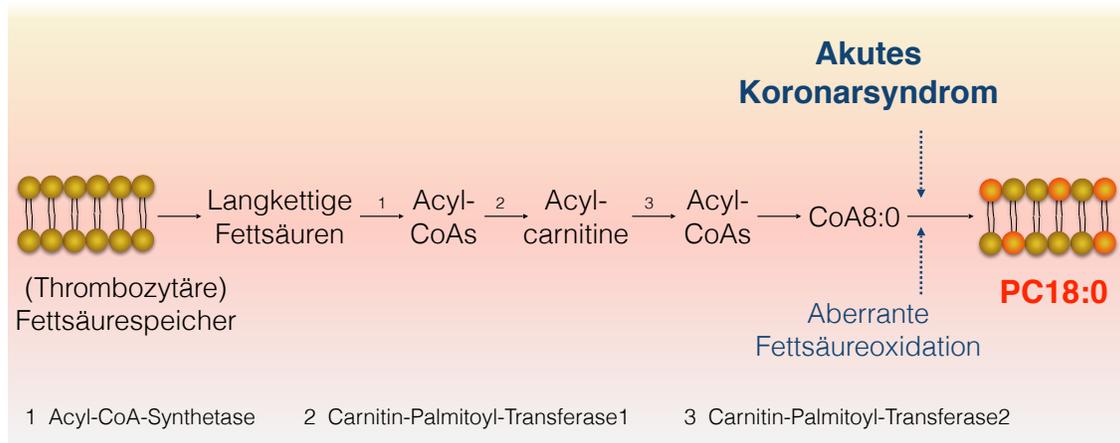


Abbildung 26 Ein aberranter Lipidstoffwechsel in Patienten mit ACS in eine Überexpression des thrombozytären PC18:0

Eine hypothetische Darstellung des gestörten thrombozytären Lipidmetabolismus in Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigt die veränderte, in Teilen enzymatische, Synthese der Glycerophospholipide. Als mögliche Konsequenz resultiert von links nach rechts eine Heraufregulierung der kurzkettigen thrombozytären Glycerophospholipide wie PC 18:0. *Modifiziert aus (Harm et al., 2021).*

4.3.2. Beeinflussung des thrombozytären Lipidoms durch Dyslipidämien

Gemäß des „Adult Treatment Panels III“ erfolgte die Einteilung des Kollektivs in Probanden mit grenzwertigem LDL-Cholesterin, milder Hypertriglyceridämie bzw. niedrigem HDL-Cholesterin (Lauer, 2001). Die Thrombozyten der Probanden mit LDL-Werten ≥ 130 mg/dl zeigten dabei 11 hochregulierte Lipide (10 Glycerolipide, 1 Glycerophospholipide) sowie 18 herunterregulierte Lipide (15 Glycerophospholipide, 2 Sphingolipide, 1 Glycerolipide).

Erniedrigte HDL-Level (< 40 mg/dl) implizierten eine Heraufregulierung 64 thrombozytärer Lipide (42 Glycerolipide, 9 Fettsäurederivate, 7 Glycerophospholipide, 6 Sphingolipide). Herunterregulierte Lipide gliederten sich in 23 Glycerophospholipide sowie 3 Sphingolipide.

Eine milde Hypertriglyceridämie (≥ 150 mg/dl) war mit der Hochregulierung von 128 Glycerolipiden, 27 Glycerophospholipiden, 14 Fettsäurederivaten, 8 Sphingolipiden und einem oxidierten Lipid assoziiert.

Veränderungen des Lipidoms bei vorliegender Dyslipidämie konnten bis dato lediglich für das Blutplasma beschrieben werden (Rämö et al., 2019). Insgesamt zeigten hierbei 9 signifikant veränderte Lipide Überschneidungen zur Analyse des thrombozytären Lipidoms in Patienten mit ACS.

Ein Zusammenhang der Veränderung der Lipoproteine und des thrombozytären Lipidoms kann zum jetzigen Zeitpunkt weder erklärt noch bewiesen werden.

Dennoch scheint die Charakterisierung der Thrombozytenlipide ein ergänzender Schritt in der Evaluation des kardiovaskulären Risikos.

4.3.3. Modifikation des thrombozytären Lipidoms mittels P2Y₁₂- / HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren

CAR 26:1 zeigte signifikant erniedrigte Peakintensitäten bei vorliegender P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie im Vergleich zu Untherapierten auf, hingegen zeigten 30 Glycerophospholipide und 1 Glycerolipid erhöhte Werte in diesen Probanden. Dies waren die ersten Beobachtungen eines alternierenden thrombozytären Lipidoms unter Einfluss einer P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie. Sechs Glycerophospholipide, die erniedrigte Werte in ACS-Probanden aufwiesen, zeigten eine Heraufregulierung unter P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie. Ein Erklärungsmodell bietet die über den ADP-Rezeptor vermittelte Inhibierung der Plättchenaktivierung und damit einhergehende Veränderung der Membranstruktur. Vorausgehende Arbeiten vermuteten einen antiatherogenen sowie LDL-reduzierenden Effekt durch Clopidogrel (Hadi et al., 2013, Li et al., 2007). Eine direkte Wirkung der Therapie auf das thrombozytäre Lipidom konnte jedoch nicht bewiesen werden und so bleibt der Zusammenhang dieser Beobachtungen offen.

In dieser Studie konnten erstmals Veränderungen der thrombozytären Lipide unter Einwirkung der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Atorvastatin, Simvastatin, Rosuvastatin, Fluvastatin und Pravastatin dargelegt werden.

In der Betrachtung der Veränderungen des thrombozytären Lipidoms bei Statintherapierten Probanden zeigten siebenundfünfzig (57) Lipide signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Unter Einfluss einer Statintherapie waren hierbei acht Lipide (7 Glycerophospholipide, 1 Sphingolipid) herunterreguliert, 49 Lipide zeigten eine Heraufregulierung (43 Glycerolipide, 4 Sterole, 1 Glycerophospholipid, 1 Sphingolipid). Statine stellen einen zentralen Baustein der Therapie der koronaren Herzerkrankung und des ACS dar und entfalten ihre pharmakodynamische Wirkung durch Inhibierung des Schlüsselenzyms der Cholesterin- und Lipidsynthese. Diese Beobachtungen implizieren, dass jener therapeutische Effekt Einfluss nimmt auf die Komposition des thrombozytären Lipidoms. Dies deckt sich mit bisherigen Erkenntnissen, dass Simvastatin Veränderungen der Lipidzusammensetzung in Plasma-Lipoproteinen bewirken kann (Ozerova et al., 2001, Simon et al., 2006).

Die im ACS erhöhten Glycerophospholipide dieser Arbeit fanden indes erniedrigte Werte bei Statintherapierten Probanden, diese waren jedoch nicht signifikant. Eine Erniedrigung der Konzentration verschiedener Phosphatidylcholine und Phosphatidylethanolamine in LDL durch Simvastatin konnte dennoch bereits gezeigt werden (Kaddurah-Daouk et al., 2010). Veränderungen des Lipidoms wurden hierbei im Wesentlichen auf sekundäre Effekte der Statine zurückgeführt. Nichtsdestotrotz könnten thrombozytäre Glycerophospholipide zum „Monitoring“ einer Statinbehandlung beitragen und Ansatzpunkt gezielterer Therapien werden.

4.3.4. Das signifikant veränderte Lipidom in Patienten mit ACS bleibt unbeeinflusst von kardiovaskulären Risikofaktoren und pharmakologischen Therapien

In dieser Studie konnte dargelegt werden, dass thrombozytäre Lipide in Patienten mit ACS signifikant verändert sind, verglichen mit dem CCS. Sieben

Glycerophospholipide waren hierbei heraufreguliert, fünfundzwanzig Lipide zeigten erniedrigte Intensitäten in Patienten mit ACS. Bei der Betrachtung der Kohortenspezifischen Grundcharakteristika dieser Studie ergaben sich Unterschiede hinsichtlich etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren und medikamentöser Therapien. Insbesondere präsentierten sich Patienten mit ACS in signifikant geringem Ausmaß mit einer diagnostizierten Dyslipidämie oder Adipositas und wurden seltener mit dem P2Y₁₂-Inhibitor Clopidogrel oder Statinen therapiert. In Folge wurden Einflüsse dieser Faktoren auf das thrombozytäre Lipidom im Vorgegangen dieser Arbeit beschrieben.

Um die Unabhängigkeit der Ergebnisse des veränderten Lipidoms in ACS-Patienten von beschriebenen Risikofaktoren bzw. Therapeutika zu beleuchten, erfolgten multivariate Darstellungen der jeweiligen Subgruppen (P2Y₁₂-Inhibitor- bzw. Statintherapie versus unbehandelt). Hier zeigte sich eine homogene Verteilung der Subgruppen bei Betrachtung der 32 signifikant veränderten Lipide in ACS-Patienten, was einen geringen Einfluss der Statin- und P2Y₁₂-Inhibitor-Therapie auf das veränderte Lipidom der Patienten mit ACS impliziert. Analog zeigten sich bei der Gegenüberstellung der sieben heraufregulierten Glycerophospholipide in Patienten mit ACS keine signifikanten Veränderungen in Patienten mit Dyslipidämie, antithrombozytärer, sowie Statintherapie gegenüber solchen Patienten ohne Risikofaktor oder Therapie.

Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass genannte Faktoren wie die Adipositas, Dyslipidämie, P2Y₁₂-Inhibitor- oder Statintherapie einen geringeren Einfluss auf das gesamte Lipidom (928 Lipide) des Kollektivs ausüben, im Gegensatz zu der Schwere der Erkrankung, respektive dem ACS (Harm et al., 2021).

Nichtsdestotrotz sollte in einem folgenden Ansatz der Einfluss der Therapien und Risikofaktoren auf Erkrankungs-spezifische Veränderungen des Lipidoms bedacht werden. Additive Schritte sind hierbei eine Vergrößerung der Probandenanzahl bzw. ein „gematchtes“ Studiendesign, um Einflüsse bzw. Störvariablen auf das mutable thrombozytäre Lipidom noch besser kontrollieren zu können.

4.3.5. Prädiktion des Myokardschadens mittels ACS-assoziiertes Glycerophospholipide

Im Verlauf dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass Glycerophospholipide, welche erhöhte Intensitäten im akuten Koronarsyndrom aufzeigten, signifikant mit dem Grad der Myokarschädigung korrelieren. Die Lipide PC 18:0, PC 20:0, PC 10:0-20:4 sowie PE 16:0-18:0 zeigten hierbei jeweils einen positiven Zusammenhang mit dem kardialen Troponin I. Diese Beobachtung stützt die These, dass diese Glycerophospholipide als Marker eines akuten Koronarsyndroms fungieren, da es insbesondere im ACS zu einem Untergang der Kardiomyozyten und damit zu Liberation des hs-cTn I kommt (Januzzi et al., 2019, Collet et al., 2020, Ibanez et al., 2017, Van de Werf et al., 2003). Überdies korrelieren die Spiegel des Troponin I mit der Größe des Infarktreales und besitzen somit prognostischen Wert (Hallén et al., 2009, Frobert et al., 2015). Somit könnten die im ACS erhöhten Glycerophospholipide, wie PC 18:0, Verwendung finden, um das Ausmaß des Myokardschadens näher zu quantifizieren. Dennoch sollte der Zusammenhang der Ausdehnung des kardiomyozytären Untergangs, bzw. der Schwere des Infarkts und der Bestimmung der Glycerophospholipide in einer weiteren Untersuchung mittels Bildgebung oder *in vivo*-Ansätzen bestätigt werden.

Ergänzend zu diesen Beobachtungen zeigte die prädiktive Regressionsanalyse dieser Studie eine signifikante ($p < 0,0001$) Vorhersage des Myokardschadens mittels zweier Lipidom-Modelle. Die im ACS erhöhten Glycerophospholipide PC 18:0, PC 20:0 und PE 16:0-18:0 leisteten hierbei, zusammen mit Cholesterol- und HbA1c-Spiegeln, einen signifikanten Beitrag. Die ebenfalls im ACS vermehrt exprimierten Lipide PC 20:0, PC 10:0-20:4 und PC 24:0 prognostizierten eigenständig und signifikant das Niveau des Troponin I. Dieses beobachtete Novum impliziert, dass die Bestimmung der genannten Glycerophospholipide eine myokardiale Schädigung quantitativ prognostizieren kann und somit das kardiale Risiko, als gering invasive „Liquid Biopsy“ abzuschätzen vermag. Gleichwohl kann zum

Zeitpunkt der Arbeit nicht bewertet werden, ob die Expression der Glycerophospholipide des ACS in kausalem Zusammenhang mit der Ausprägung des Infarkts steht.

4.3.6. Konspekt der Follow-Up-Ergebnisse

Diese Studie zeigte keine Unterschiede der Endpunkte Sterblichkeit, Re-Interventionsrate, Schlaganfall oder Myokardinfarkt zwischen den ACS- und CCS-Subkollektiven. Die „In-House“-Mortalität der ACS-Population lag bei 0% und damit deutlich unter dem deutschen Bundesdurchschnitt von 6,3% (Neumann et al., 2020). Bisher konnte gezeigt werden, dass Patienten mit hohem „Baseline“-LDL ein erhöhtes Risiko der kardiovaskulären Mortalität innehalten (Navarese et al., 2018). In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass das thrombozytäre Lipidom signifikante Unterschiede bei Verstorbenen aufweist. Analog der signifikant regulierten thrombozytären Lipid-Marker in Patienten mit ACS fanden sich bei verstorbenen Probanden ausschließlich heraufregulierte Glycerophospholipide (LPC 0:0/20:0, LPC 18:1/0:0, LPC 20:4, LPC 20:4/0:0, LPE 18:1, LPI 18:1, LPI 20:4, OxPC 38:4+10, PC 18:2-22:4) (Harm et al., 2021). Diese Beobachtung im sensiblen zwölfmonatigen Follow-Up-Zeitraum könnte einen wichtigen Faktor in der Verlaufskontrolle der post-interventionellen KHK darstellen. So könnten erwähnte thrombozytäre Glycerophospholipide einen gewichtigen Faktor der kardiovaskulären Erkrankungen darstellen, um als Biomarker klinische Risiken vorherzusagen (McFadyen and Peter, 2018). Nichtsdestotrotz kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgesagt werden, ob Veränderungen des thrombozytären Lipidoms kausal für diesbezügliche Endpunkte verantwortlich sind oder lediglich eine Assoziation darstellen. Hier bedarf es einer weitläufigen, prospektiven Lipidomik-Studie, um Veränderungen des Lipidoms und der zugrundeliegenden kardiovaskulären Erkrankungen detailliert darzustellen.

4.3.7. Unterschiede der Glycerophospholipid-medierten Thrombusbildung

In der *ex vivo* Flusskammerperfusion konnte eine signifikant erhöhte ($p < 0,05$) Plättchenabhängige Thrombusentstehung durch Einwirkung der Glycerophospholipide PC 18:0, PC 32:1 und PC 34:1 gezeigt werden. Unter den Bedingungen der langsamen Schergeschwindigkeit zeigten jene Substrate eine Konzentrations-abhängige Vermehrung der Thrombusfläche. Unter den Bedingungen der hohen Schergeschwindigkeit konnte lediglich eine Erhöhung der Thrombogenität durch PC 18:0 und PC 32:1 dargestellt werden. Eine Modifikation der Thrombusformierung konnte bereits durch LDL, oxLDL sowie Lysosphingomyelin beschrieben werden (Chatterjee et al., 2017, Peng et al., 2018). Eine vermehrte Thrombusbildung unter Einwirkung der im ACS erhöhten PC 18:0, PC 32:1 und PC 34:1 indiziert, dass die Hochregulierung dieser Glycerophospholipide (und analoger Lipide wie PC 20:0 und PC 24:0) in Patienten die potenzielle Plättchenhyperreaktivität im ACS erhöht (Harm et al., 2021). Eine vermehrte Thrombogenität im ACS trägt indes zur progredienten Limitierung der Koronarperfusion bei und somit implizieren die Beobachtungen dieser Glycerophospholipide eine fakultative Beteiligung an der Pathogenese des ACS. Mechanismen, die zu diesen Beobachtungen beitragen, sind zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht verstanden. Es scheint notwendig, weitere Untersuchungen anzustellen, um Unterschiede zwischen den Flussgeschwindigkeiten zu verstehen und Ergebnisse auf *in vivo*-Bedingungen zu übertragen.

4.3.8. Erhöhte Arachidonsäure- und Kollagen-abhängige Thrombozyten-Aggregation durch PC 18:0

Unter Verwendung der in Thrombozyten der ACS-Patienten erhöhten Glycerophospholipide PC 18:0, PC 32:1 und PC 34:1 konnte jeweils eine erhöhte Plättchenaggregation demonstriert werden. Mittels Impedanzaggregometrie wurden hierbei ebenfalls erhöhte Werte für Arachidonsäure- und Kollagen-stimulierte

Thrombozyten detektiert (Harm et al., 2021). Eine Veränderung der Kollagen-abhängigen Aggregation deckt sich somit mit den Erkenntnissen der Fluss-abhängigen Thrombusbildung über Kollagen. Proaggregatorische Prozesse des ACS könnten aufgrund des Einflusses der Glycerophospholipe somit begünstigt werden. Des weiteren scheint die Beteiligung der Arachidonsäure an der Plättchenaggregation ein wichtiger komplementärer Faktor des thrombozytären Lipidoms. Als Mediator, Substrat und Bestandteil des Lipidmetabolismus wurde die Wichtigkeit der Arachidonsäure als Teil des thrombozytären Lipidoms beschrieben (Peng et al., 2018, Slatter et al., 2016). Darüber hinaus bietet die Möglichkeit der Modulation des Arachidonsäure-Metabolismus über den COX-1-Pathway eine Perspektive der pharmakologischen Regulierung des thrombozytären Lipidoms (Slatter et al., 2016).

4.3.9. PC 18:0-induzierte P-Selectin-abhängige Plättchenaktivierung

Additiv erwähnter *in vitro*-Veränderungen der Plättchenfunktion zeigte PC 18:0 eine signifikante Verstärkung der P-Selectin-Aktivierung prästimulierter Thrombozyten (Harm et al., 2021). Dies konnte bereits für oxLDL beschrieben werden (Chatterjee et al., 2017). Eine zugrundeliegende Vermehrung der thrombozytäre Aktivierung bedingt somit konsekutiv eine verstärkte Aggregation und Thrombusformierung der Plättchen. Ferner unterstreicht diese Beobachtung, dass das am stärksten im ACS heraufregulierte Lipid (PC 18:0) den größten Einfluss auf einen prothrombotischen Zustand innehält. Da ein verstärktes Aktivierungsmaß nur unter CRP-Stimulierung analysiert wurde, liegt es nahe, dass weitere Faktoren an dieser Pathophysiologie beteiligt sind. Dies deckt sich mit der bisherigen Erkenntnis, dass das Protein TMEM16F eine Schlüsselrolle in der Thrombozytenaktivierung einnimmt (Suzuki et al., 2010). Diese Phospholipid-Scramblase schleust Agonisten-abhängig Glycerophospholipide auf die Oberfläche der Plättchenmembran und führt in Folge zu deren Aktivierung (Bricogne et al., 2019, Deguchi et al., 2017, Suzuki et al., 2010).

4.3.10. Thrombelastographische Interpretation des prokoagulatorischen Zustandes in Anwesenheit der Glycerophospholipide

Unter Einsatz des TEG-Assays konnten signifikante Einflüsse auf die enzymatische Gerinnung, respektive der Werte aPTT / INR dargestellt werden. Die Präinkubation mittels PC 18:0, PC 32:1 und PC 34:1 zeigte dabei eine verstärkte Wirkung plasmatischer Gerinnungsfaktoren. Hierbei wird eine direkte Wirkung der Substrate aus der Familie der Glycerophospholipide auf den Faktor- V/Xa-Pathway angenommen (Beveris et al., 1985). Dies konnte bereits für plasmatisches Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin in der Pathogenese der tiefen Venenthrombose beschrieben werden (Deguchi et al., 2017). Dies impliziert eine mögliche Beteiligung der veränderten Glycerophospholipide des thrombozytären Lipidoms in ACS-Patienten an der Pathogenese weiterer kardiovaskulärer Erkrankungen. Da in der Thrombelastographie keine signifikanten Abweichungen thrombozytärer Parameter analysiert wurden, gilt es weitere Methoden für die klinische Routine zu etablieren, um die Ergebnisse der thrombozytären Veränderung auf eine gesteigerte plasmatische Hyperkoagulabilität zu übertragen. Somit könnten Veränderungen des Lipidoms und deren Auswirkungen auf die Thrombusbildung frühzeitig diagnostiziert werden.

4.4. Translatorische Perspektive

Das Gebiet der Metabolomik, inklusive thrombozytärer Lipidom-Analysen wurde jüngst zur neuen Perspektive der Erforschung verschiedenster Erkrankungen. Diese Studie ist bis zum aktuellen Zeitpunkt eine der patientenreichsten Lipidom-Analysen und konnte als erste ihrer Art eine Veränderung der Thrombozytenlipide in Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom zeigen. Es konnten weiterhin prothrombotische Effekte, insbesondere durch die in ACS-Patienten erhöhten Glycerophospholipide, dargelegt werden. In dieser Studie

konnte aufgezeigt werden, dass PC 18:0 (1,2-nonanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) die Plättchenaggregation, die CD62P-abhängige Aktivierung und Fluss-mediierte Thrombusbildung signifikant erhöht. Dies indiziert, dass die Hochregulierung dieses Glycerophospholipids (und analoger Lipide wie PC 20:0 und PC 24:0) in Patienten die potenzielle Plättchenhyperreaktivität im ACS erhöht. Ferner korreliert die Intensität dieses Lipids signifikant mit dem Grad der myokardialen Schädigung und trägt indes signifikant zur Prädiktion des Troponin-Spiegels bei. Obwohl keine konkreten Beweise geliefert werden können, liegt die Spekulation nahe, dass Veränderungen des thrombozytären Lipidoms, respektive Glycerophospholipide, Einfluss nehmen auf die Thrombozytenaktivierung. Damit einhergehend könnten prothrombotische Prozesse zur Pathogenese des ACS beitragen. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit kann nicht vorhergesagt werden, ob die Hochregulierung der thrombozytären Glycerophospholipide eine unmittelbare Konsequenz der Akuität der KHK und des ACS ist, oder ob diese nur temporär verstärkt ist. Nichtsdestotrotz scheint die Beurteilung thrombozytärer Glycerophospholipide ein wertvoller und hilfreicher Biomarker der Risikostratifizierung im ACS zu sein. So könnten diese frühzeitig Hochrisikopatienten kennzeichnen und thromboischämische Ereignisse alsbald verhindern. Darüber hinaus könnte das bessere Verständnis der alternierenden Glycerophospholipide indes einen tieferen Einblick in die Pathophysiologie des ACS gewähren. Somit könnte die in dieser Studie gezeigte Plättchenaktivierung Ziel einer pharmakologischen Therapie werden und die Thrombusformierung *in vivo* reduziert werden.

5. Zusammenfassung

Thrombozyten nehmen eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung ein und Patienten mit erhöhter Plättchenaktivität haben ein gesteigertes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse inne. Jenseits etablierter Marker, wie die Dyslipoproteinämien, treten Lipidveränderungen auch in Thrombozyten der KHK-Patienten auf.

In dieser Studie wurde das thrombozytäre Lipidom einer großangelegten KHK-Population (n=139) mittels ungezielter Massenspektrometrie charakterisiert und Unterschiede zwischen ACS- und CCS-Probanden näher beleuchtet. Zusätzlich wurden weitere Einflüsse wie Medikation und kardiovaskuläre Risikofaktoren auf das Lipidom untersucht. Es erfolgten weiterhin Lipidom-Analysen bezüglich des Zusammenhangs des klinischen Follow-Ups und der myokardialen Schädigung.

Darüber hinaus analysierte diese Studie den Einfluss der signifikant veränderten Lipide auf die Plättchenaktivierung, Aggregation, Thrombusformierung und plasmatische Gerinnung.

In dieser Analyse konnte dargestellt werden, dass sieben Glycerophospholipide in ACS-Probanden heraufreguliert und fünfundzwanzig Lipide herabreguliert waren. Unterschiede des Lipidoms zeigten sich ebenfalls unter P2Y₁₂-Inhibitor, Statin-Therapie bzw. vorliegender Dyslipidämie, diese beeinflussten jedoch nicht die Ergebnisse der in Patienten mit ACS veränderten Lipide. Für diese Lipidmarker des ACS konnte weiterführend gezeigt werden, dass die heraufregulierten Lipide mit dem Ausmaß der myokardialen Schädigung korrelieren und diese anhand des Troponins vorhersagen können. In Addition zeigte sich unter Einwirkung der heraufregulierten Lipide, insbesondere durch PC 18:0, eine signifikant gesteigerte Plättchenaktivierung, Aggregation und Thrombusbildung sowie eine verstärkte plasmatische Gerinnung.

Die Studienergebnisse zeigten, dass das thrombozytäre Lipidom im akuten Koronarsyndrom kritisch verändert ist und ACS-Patienten sowie Verstorbene ausschließlich heraufregulierte Glycerophospholipide innerhalb des Lipidoms

aufwiesen. Dies impliziert deren Beteiligung an der Akuität der zugrundeliegenden Erkrankung. Hinaufregulierte kurzkettige Lipide, insbesondere PC 18:0, induzierten eine vermehrte Plättchenaktivierung und könnten damit die thrombozytäre Hyperreagibilität im ACS begünstigen.

Als neue Perspektive könnte die Metabolomik, inklusive ihrer Lipidom-Analysen, eine weitere Säule in der Diagnostik der KHK einnehmen. Aufgrund der in dieser Studie demonstrierten, Glycerophospholipid-induzierten, prothrombotischen Effekte, könnte die Bestimmung dieser Lipide hilfreich werden, um Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko zu bestimmen.

6. Literaturverzeichnis

- ANDERSON, J. L. & MORROW, D. A. 2017. Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, 376, 2053-2064.
- ARROYO, L. H. & LEE, R. T. 1999. Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. *Cardiovascular Research*, 41, 369-375.
- BENTZON, J. F., OTSUKA, F., VIRMANI, R. & FALK, E. 2014. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*, 114, 1852-66.
- BEVERS, E. M., ROSING, J. & ZWAAL, R. F. 1985. Development of procoagulant binding sites on the platelet surface. *Adv Exp Med Biol*, 192, 359-71.
- BOWBRICK, V. A., MIKHAILIDIS, D. P. & STANSBY, G. 2003a. Influence of platelet count and activity on thromboelastography parameters. *Platelets*, 14, 219-224.
- BOWBRICK, V. A., MIKHAILIDIS, D. P. & STANSBY, G. 2003b. Value of Thromboelastography in the Assessment of Platelet Function. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 9, 137-142.
- BRICOGNE, C., FINE, M., PEREIRA, P. M., SUNG, J., TIJANI, M., WANG, Y., HENRIQUES, R., COLLINS, M. K. & HILGEMANN, D. W. 2019. TMEM16F activation by Ca²⁺ triggers plasma membrane expansion and directs PD-1 trafficking. *Scientific Reports*, 9, 619.
- BUNDESÄRZTEKAMMER (BÄK), K. R. B. K., ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN (AWMF). 2019. Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK – Langfassung, 5. Auflage. Version 1.
- CABEZA, N., LI, Z., SCHULZ, C., KREMMER, E., MASSBERG, S., BULTMANN, A. & GAWAZ, M. 2004. Surface expression of collagen receptor Fc receptor-gamma/glycoprotein VI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of CD40 ligand and activation of endothelial cells. *Diabetes*, 53, 2117-21.
- CHATTERJEE, M. 2020. Platelet lipidome: Dismantling the “Trojan horse” in the bloodstream. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 18, 543-557.
- CHATTERJEE, M., RATH, D., SCHLOTTERBECK, J., RHEINLAENDER, J., WALKER-ALLGAIER, B., ALNAGGAR, N., ZDANYTE, M., MÜLLER, I., BORST, O., GEISLER, T., SCHÄFFER, T. E., LÄMMERHOFER, M. & GAWAZ, M. 2017. Regulation of oxidized platelet lipidome: implications for coronary artery disease. *European Heart Journal*, 38, 1993-2005.
- COLLET, J.-P., THIELE, H., BARBATO, E., BARTHÉLÉMY, O., BAUERSACHS, J., BHATT, D. L., DENDALE, P., DOROBANTU, M., EDVARDSEN, T., FOLLIGUET, T., GALE, C. P., GILARD, M., JOBS, A., JÜNI, P., LAMBRINOU, E., LEWIS, B. S., MEHILLI, J., MELIGA, E., MERKELY, B., MUELLER, C., ROFFI, M., RUTTEN, F. H., SIBBING, D., SIONTIS, G. C. M. & GROUP, E. S. D. 2020. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-

- segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*.
- CONTREPOIS, K., MAHMOUDI, S., UBHI, B. K., PAPSDORF, K., HORNBURG, D., BRUNET, A. & SNYDER, M. 2018. Cross-Platform Comparison of Untargeted and Targeted Lipidomics Approaches on Aging Mouse Plasma. *Scientific Reports*, 8, 17747.
- DEGUCHI, H., ELIAS, D. J. & GRIFFIN, J. H. 2017. Minor plasma lipids modulate clotting factor activities and may affect thrombosis risk. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 1, 93-102.
- DESTATIS, S. B. 2015. Krankheitskosten 2015 nach Krankheiten, Krankheitskostenrechnung.
- DESTATIS, S. B. 2020. Todesursachenstatistik 2018 nach Jahre, Todesursachen, Geschlecht.
- DIAS, J. D., HANEY, E. I., MATHEW, B. A., LOPEZ-ESPINA, C. G., ORR, A. W. & POPOVSKY, M. A. 2017. New-Generation Thromboelastography: Comprehensive Evaluation of Citrated and Heparinized Blood Sample Storage Effect on Clot-Forming Variables. *Arch Pathol Lab Med*, 141, 569-577.
- DROPPA, M., TSCHERNOW, D., MÜLLER, K. A. L., TAVLAKI, E., KARATHANOS, A., STIMPFLE, F., SCHAEFFELER, E., SCHWAB, M., TOLIOS, A., SILLER-MATULA, J. M., GAWAZ, M. & GEISLER, T. 2015. Evaluation of Clinical Risk Factors to Predict High On-Treatment Platelet Reactivity and Outcome in Patients with Stable Coronary Artery Disease (PREDICT-STABLE). *PLOS ONE*, 10, e0121620.
- EUROPARAT, V. D. S. A. R. U. A. R., ÄRZTLICHE ZENTRALSTELLE QUALITÄTSSICHERUNG (ÄZQ), ET AL. ENTWICKLUNG EINER METHODIK FÜR DIE AUSARBEITUNG VON LEITLINIEN FÜR OPTIMALE MEDIZINISCHE PRAXIS. EMPFEHLUNG REC (2001)13 DES EUROPARATES AM 10. OKTOBER 2001 UND ERLÄUTERNDEN MEMORANDUM. DEUTSCHSPRACHIGE AUSGABE. Z ARZTL. FORTBILD. QUALITÄTSSICH. 2002; 96(SUPPL III):3-60. 2001.
- FROBERT, A., VALENTIN, J., MAGNIN, J.-L., RIEDO, E., COOK, S. & GIRAUD, M.-N. 2015. Prognostic Value of Troponin I for Infarct Size to Improve Preclinical Myocardial Infarction Small Animal Models. *Frontiers in Physiology*, 6.
- FROSSARD, M., FUCHS, I., LEITNER, J. M., HSIEH, K., VLCEK, M., LOSERT, H., DOMANOVITS, H., SCHREIBER, W., LAGGNER, A. N. & JILMA, B. 2004. Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 110, 1392-7.
- FUCHS, I., FROSSARD, M., SPIEL, A., RIEDMULLER, E., LAGGNER, A. N. & JILMA, B. 2006. Platelet function in patients with acute coronary syndrome (ACS) predicts recurrent ACS. *J Thromb Haemost*, 4, 2547-52.
- GAWAZ, M. 2004. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular Research*, 61, 498-511.

- GAWAZ, M. 2006. Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Dis*, 36, 206-10.
- GAWAZ, M. 2016. Does Uncontrolled Platelet Activation Promote Coronary Artery Disease? *JACC Cardiovasc Imaging*, 9, 855-857.
- GAWAZ, M., LANGER, H. & MAY, A. E. 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, 115, 3378-84.
- GEISLER, T., ZÜRN, C., SIMONENKO, R., RAPIN, M., KRAIBOOJ, H., KILIAS, A., BIGALKE, B., STELLOS, K., SCHWAB, M., MAY, A. E., HERDEG, C. & GAWAZ, M. 2009. Early but not late stent thrombosis is influenced by residual platelet aggregation in patients undergoing coronary interventions. *European Heart Journal*, 31, 59-66.
- GRESELE, P., BURY, L., MEZZASOMA, A. M. & FALCINELLI, E. 2019. Platelet function assays in diagnosis: an update. *Expert Review of Hematology*, 12, 29-46.
- HADI, N. R., MOHAMMAD, B. I., AJEENA, I. M. & SAHIB, H. H. 2013. Antiatherosclerotic potential of clopidogrel: antioxidant and anti-inflammatory approaches. *Biomed Res Int*, 2013, 790263.
- HALLÉN, J., BUSER, P., SCHWITTER, J., PETZELBAUER, P., GEUDELIN, B., FAGERLAND, M. W., JAFFE, A. S. & ATAR, D. 2009. Relation of cardiac troponin I measurements at 24 and 48 hours to magnetic resonance-determined infarct size in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 104, 1472-7.
- HARM, T., BILD, A., DITTRICH, K., GOLDSCHMIED, A., NESTELE, J., CHATTERJEE, M., FU, X., KOLB, K., CASTOR, T., BORST, O., GEISLER, T., RATH, D., LÄMMERHOFER, M. & GAWAZ, M. 2021. Acute coronary syndrome is associated with a substantial change in the platelet lipidome. *Cardiovasc Res*.
- HARRISON, P., MACKIE, I., MATHUR, A., ROBINSON, M. S., HONG, Y., ERUSALIMSKY, J. D., MACHIN, S. J. & MARTIN, J. F. 2005. Platelet hyper-function in acute coronary syndromes. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 16, 557-62.
- HISHIKAWA, D., HASHIDATE, T., SHIMIZU, T. & SHINDOU, H. 2014. Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J Lipid Res*, 55, 799-807.
- HU, Q., WANG, M., CHO, M. S., WANG, C., NICK, A. M., THIAGARAJAN, P., AUNG, F. M., HAN, X., SOOD, A. K. & AFSHAR-KHARGHAN, V. 2016. Lipid profile of platelets and platelet-derived microparticles in ovarian cancer. *BBA Clin*, 6, 76-81.
- IBANEZ, B., JAMES, S., AGEWALL, S., ANTUNES, M. J., BUCCIARELLI-DUCCI, C., BUENO, H., CAFORIO, A. L. P., CREA, F., GOUDEVENOS, J. A., HALVORSEN, S., HINDRICKS, G., KASTRATI, A., LENZEN, M. J., PRESCOTT, E., ROFFI, M., VALGIMIGLI, M., VARENHORST, C., VRANCKX, P., WIDIMSKÝ, P. & GROUP, E. S. D. 2017. 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). *European Heart Journal*, 39, 119-177.
- IQBAL, K., RAUOOF, M. A., MIR, M. M., TRAMBOO, N. A., MALIK, J. A., NAIKOO, B. A., DAR, M. A., MASOODI, S. R. & KHAN, A. R. 2002. Lipid peroxidation during acute coronary syndromes and its intensification at the time of myocardial ischemia reperfusion. *Am J Cardiol*, 89, 334-7.
- JANUZZI, J. L., MAHLER, S. A., CHRISTENSON, R. H., RYMER, J., NEWBY, L. K., BODY, R., MORROW, D. A. & JAFFE, A. S. 2019. Recommendations for Institutions Transitioning to High-Sensitivity Troponin Testing: JACC Scientific Expert Panel. *Journal of the American College of Cardiology*, 73, 1059-1077.
- JOIST, J. H., DOLEZEL, G., CUCUIANU, M. P., NISHIZAWA, E. E. & MUSTARD, J. F. 1977. Inhibition and potentiation of platelet function by lysolecithin. *Blood*, 49, 101-12.
- KADDURAH-DAOUK, R., BAILLIE, R. A., ZHU, H., ZENG, Z. B., WIEST, M. M., NGUYEN, U. T., WATKINS, S. M. & KRAUSS, R. M. 2010. Lipidomic analysis of variation in response to simvastatin in the Cholesterol and Pharmacogenetics Study. *Metabolomics*, 6, 191-201.
- KATTOOR, A. J., POTHINENI, N. V. K., PALAGIRI, D. & MEHTA, J. L. 2017. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 19, 42.
- KNUUTI, J., WIJNS, W., SARASTE, A., CAPODANNO, D., BARBATO, E., FUNCK-BRENTANO, C., PRESCOTT, E., STOREY, R. F., DEATON, C., CUISSET, T., AGEWALL, S., DICKSTEIN, K., EDVARDSEN, T., ESCANED, J., GERSH, B. J., SVITIL, P., GILARD, M., HASDAI, D., HATALA, R., MAHFOUD, F., MASIP, J., MUNERETTO, C., VALGIMIGLI, M., ACHENBACH, S., BAX, J. J. & GROUP, E. S. D. 2019. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: The Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 41, 407-477.
- KONG, R., TRIMMINGS, A., HUTCHINSON, N., GILL, R., AGARWAL, S., DAVIDSON, S. & ARCARI, M. 2015. Consensus recommendations for using the Multiplate® for platelet function monitoring before cardiac surgery. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37, 143-147.
- KOSEOGLU, S., MEYER, A., KIM, D., MEYER, B., WANG, Y., DALLUGE, J. & HAYNES, C. 2014. Analytical Characterization of the Role of Phospholipids in Platelet Adhesion and Secretion. *Analytical chemistry*, 87.
- KOSEOGLU, S., MEYER, A. F., KIM, D., MEYER, B. M., WANG, Y., DALLUGE, J. J. & HAYNES, C. L. 2015. Analytical characterization of the role of phospholipids in platelet adhesion and secretion. *Anal Chem*, 87, 413-21.
- LAUER, M. S. F., P.B.; 2001. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*, 285, 2486-97.

- LEWIS, J. P., BACKMAN, J. D., RENY, J. L., BERGMEIJER, T. O., MITCHELL, B. D., RITCHIE, M. D., DERY, J. P., PAKYZ, R. E., GONG, L., RYAN, K., KIM, E. Y., ARADI, D., FERNANDEZ-CADENAS, I., LEE, M. T. M., WHALEY, R. M., MONTANER, J., GENSINI, G. F., CLEATOR, J. H., CHANG, K., HOLMVANG, L., HOCHHOLZER, W., RODEN, D. M., WINTER, S., ALTMAN, R., ALEXOPOULOS, D., KIM, H. S., GAWAZ, M., BLIDEN, K., VALGIMIGLI, M., MARCUCCI, R., CAMPO, G., SCHAEFFELER, E., DRIDI, N. P., WEN, M. S., SHIN, J. G., FONTANA, P., GIUSTI, B., GEISLER, T., KUBO, M., TRENK, D., SILLER-MATULA, J. M., TEN BERG, J. M., GURBEL, P. A., SCHWAB, M., KLEIN, T. E. & SHULDINER, A. R. 2019. Pharmacogenomic Polygenic Response Score Predicts Ischemic Events and Cardiovascular Mortality in Clopidogrel-Treated Patients. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*.
- LI, M., ZHANG, Y., REN, H., ZHANG, Y. & ZHU, X. 2007. Effect of clopidogrel on the inflammatory progression of early atherosclerosis in rabbits model. *Atherosclerosis*, 194, 348-56.
- LIBBY, P. 2013. Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. *New England Journal of Medicine*, 368, 2004-2013.
- MALEHMIR, M., PFISTER, D., GALLAGE, S., SZYDLOWSKA, M., INVERSO, D., KOTSILITI, E., LEONE, V., PEISELER, M., SUREWAARD, B. G. J., RATH, D., ALI, A., WOLF, M. J., DRESCHER, H., HEALY, M. E., DAUCH, D., KROY, D., KRENKEL, O., KOHLHEPP, M., ENGLEITNER, T., OLKUS, A., SIJMONSMA, T., VOLZ, J., DEPPERMAN, C., STEGNER, D., HELBLING, P., NOMBELA-ARRIETA, C., RAFIEI, A., HINTERLEITNER, M., RALL, M., BAKU, F., BORST, O., WILSON, C. L., LESLIE, J., O'CONNOR, T., WESTON, C. J., ADAMS, D. H., SHERIFF, L., TEIJEIRO, A., PRINZ, M., BOGESKA, R., ANSTEE, N., BONGERS, M. N., NOTOHAMIPRODJO, M., GEISLER, T., WITHERS, D. J., WARE, J., MANN, D. A., AUGUSTIN, H. G., VEGIOPOULOS, A., MILSOM, M. D., ROSE, A. J., LALOR, P. F., LLOVET, J. M., PINYOL, R., TACKE, F., RAD, R., MATTER, M., DJOUDER, N., KUBES, P., KNOLLE, P. A., UNGER, K., ZENDER, L., NIESWANDT, B., GAWAZ, M., WEBER, A. & HEIKENWALDER, M. 2019. Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nat Med*, 25, 641-655.
- MAY, A. E., GEISLER, T. & GAWAZ, M. 2008. Individualized antithrombotic therapy in high risk patients after coronary stenting. A double-edged sword between thrombosis and bleeding. *Thromb Haemost*, 99, 487-93.
- MCFADYEN, J. D. & PETER, K. 2018. Platelet lipidomics and function: joining the dots. *Blood*, 132, 465-466.
- NABEL, E. G. & BRAUNWALD, E. 2012. A Tale of Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, 366, 54-63.
- NAGHAVI, M., LIBBY, P., FALK, E., CASSCELLS, S. W., LITOVSKY, S., RUMBERGER, J., BADIMON, J. J., STEFANADIS, C., MORENO, P., PASTERKAMP, G., FAYAD, Z., STONE, P. H., WAXMAN, S., RAGGI, P., MADJID, M., ZARRABI, A., BURKE, A., YUAN, C., FITZGERALD, P. J.,

- SISCOVICK, D. S., DE KORTE, C. L., AIKAWA, M., AIRAKSINEN, K. E., ASSMANN, G., BECKER, C. R., CHESEBRO, J. H., FARB, A., GALIS, Z. S., JACKSON, C., JANG, I. K., KOENIG, W., LODDER, R. A., MARCH, K., DEMIROVIC, J., NAVAB, M., PRIORI, S. G., REKHTER, M. D., BAHR, R., GRUNDY, S. M., MEHRAN, R., COLOMBO, A., BOERWINKLE, E., BALLANTYNE, C., INSULL, W., JR., SCHWARTZ, R. S., VOGEL, R., SERRUYS, P. W., HANSSON, G. K., FAXON, D. P., KAUL, S., DREXLER, H., GREENLAND, P., MULLER, J. E., VIRMANI, R., RIDKER, P. M., ZIPES, D. P., SHAH, P. K. & WILLERSON, J. T. 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*, 108, 1772-8.
- NAVARESE, E. P., ROBINSON, J. G., KOWALEWSKI, M., KOŁODZIEJCZAK, M., ANDREOTTI, F., BLIDEN, K., TANTRY, U., KUBICA, J., RAGGI, P. & GURBEL, P. A. 2018. Association Between Baseline LDL-C Level and Total and Cardiovascular Mortality After LDL-C Lowering: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*, 319, 1566-1579.
- NEUMANN, J. T., GOSSLIN, A., SÖRENSEN, N. A., BLANKENBERG, S., MAGNUSSEN, C. & WESTERMANN, D. 2020. Temporal trends in incidence and outcome of acute coronary syndrome. *Clinical Research in Cardiology*, 109, 1186-1192.
- O'DONNELL, V. B., MURPHY, R. C. & WATSON, S. P. 2014. Platelet lipidomics: modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets. *Circ Res*, 114, 1185-203.
- OZEROVA, I. N., PARAMONOVA, I. V., OLFER'EV, A. M., AKHMEDZHANOV, N. M., ALEKSANDROVA, M. A. & PEROVA, N. V. 2001. Effects of Simvastatin on the Phospholipid Composition of High-Density Lipoproteins in Patients with Hypercholesterolemia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 132, 763-765.
- PENG, B., GEUE, S., COMAN, C., MÜNZER, P., KOPCZYNSKI, D., HAS, C., HOFFMANN, N., MANKE, M. C., LANG, F., SICKMANN, A., GAWAZ, M., BORST, O. & AHRENDTS, R. 2018. Identification of key lipids critical for platelet activation by comprehensive analysis of the platelet lipidome. *Blood*, 132, e1-e12.
- RÄMÖ, J. T., RIPATTI, P., TABASSUM, R., SÖDERLUND, S., MATIKAINEN, N., GERL, M. J., KLOSE, C., SURMA, M. A., STITZIEL, N. O., HAVULINNA, A. S., PIRINEN, M., SALOMAA, V., FREIMER, N. B., JAUHAINEN, M., PALOTIE, A., TASKINEN, M. R., SIMONS, K. & RIPATTI, S. 2019. Coronary Artery Disease Risk and Lipidomic Profiles Are Similar in Hyperlipidemias With Family History and Population-Ascertained Hyperlipidemias. *J Am Heart Assoc*, 8, e012415.
- RENY, J. L., FONTANA, P., HOCHHOLZER, W., NEUMANN, F. J., TEN BERG, J., JANSSEN, P. W., GEISLER, T., GAWAZ, M., MARCUCCI, R., GORI, A. M., CUISSET, T., ALESSI, M. C., BERDAGUE, P., GURBEL, P. A., YONG, G., ANGIOLILLO, D. J., ARADI, D., BEIGEL, R., CAMPO, G. & COMBESCURE, C. 2016. Vascular risk levels affect the predictive value of

- platelet reactivity for the occurrence of MACE in patients on clopidogrel. Systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Thromb Haemost*, 115, 844-55.
- ROBERT KOCH-INSTITUT, A. F. E. U. G. 2015. Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). Scientific Use File 1. Version. .
- RODRIGUEZ, F. & HARRINGTON, R. A. 2021. Management of Antithrombotic Therapy after Acute Coronary Syndromes. *New England Journal of Medicine*, 384, 452-460.
- RUGGERI, Z. M. 2002. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*, 8, 1227-34.
- SALOOJA, N. & PERRY, D. J. 2001. Thrombelastography. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 12, 327-337.
- SANCHIS-GOMAR, F., PEREZ-QUILIS, C., LEISCHIK, R. & LUCIA, A. 2016. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Annals of translational medicine*, 4, 256-256.
- SIMON, J. A., LIN, F., HULLEY, S. B., BLANCHE, P. J., WATERS, D., SHIBOSKI, S., ROTTER, J. I., NICKERSON, D. A., YANG, H., SAAD, M. & KRAUSS, R. M. 2006. Phenotypic predictors of response to simvastatin therapy among African-Americans and Caucasians: the Cholesterol and Pharmacogenetics (CAP) Study. *Am J Cardiol*, 97, 843-50.
- SLATTER, D. A., ALDROVANDI, M., O'CONNOR, A., ALLEN, S. M., BRASHER, C. J., MURPHY, R. C., MECKLEMANN, S., RAVI, S., DARLEY-USMAR, V. & O'DONNELL, V. B. 2016. Mapping the Human Platelet Lipidome Reveals Cytosolic Phospholipase A2 as a Regulator of Mitochondrial Bioenergetics during Activation. *Cell Metab*, 23, 930-44.
- SOLATI, Z. & RAVANDI, A. 2019. Lipidomics of Bioactive Lipids in Acute Coronary Syndromes. *International journal of molecular sciences*, 20, 1051.
- STELLOS, K., SAUTER, R., FAHRLEITNER, M., GRIMM, J., STAKOS, D., EMSCHERMANN, F., PANAGIOTA, V., GNERLICH, S., PERK, A., SCHONBERGER, T., BIGALKE, B., LANGER, H. F. & GAWAZ, M. 2012. Binding of oxidized low-density lipoprotein on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and induces platelet adhesion to vascular wall in vivo--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 2017-20.
- STEWART, J., MANMATHAN, G. & WILKINSON, P. 2017. Primary prevention of cardiovascular disease: A review of contemporary guidance and literature. *JRSM cardiovascular disease*, 6, 2048004016687211-2048004016687211.
- SUZUKI, J., UMEDA, M., SIMS, P. J. & NAGATA, S. 2010. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, 468, 834-8.
- VAN DE WERF, F., ARDISSINO, D., BETRIU, A., COKKINOS, D. V., FALK, E., FOX, K. A. A., JULIAN, D., LENGYEL, M., NEUMANN, F.-J., RUZYLLLO, W., THYGESEN, C., UNDERWOOD, S. R., VAHANIAN, A., VERHEUGT, F. W. A., WIJNS, W. & CARDIOLOGY, T. T. F. O. T. M. O. A. M. I. O. T. E. S. O. 2003. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal*, 24, 28-66.

- VINIK, A. I., ERBAS, T., PARK, T. S., NOLAN, R. & PITTENGER, G. L. 2001. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 24, 1476-85.
- XIAO, H., SIDDIQUI, R. A., AL-HASSANI, M. H., SLIVA, D. & KOVACS, R. J. 2001. Phospholipids released from activated platelets improve platelet aggregation and endothelial cell migration. *Platelets*, 12, 163-170.

7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Department des Universitätsklinikum Tübingen Innere Medizin III - Kardiologie und Angiologie – Deutsches Herzkompetenz Zentrum Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz¹ durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz und Prof. Dr. rer. nat. Michael Lämmerhofer².

Blutproben und klinische Daten wurden in Teilen durch Andreas Goldschmied¹ gewonnen, die UHPLC-ESI-QTOF-Massenspektrometrie der Proben, Normalisierung der Peakintensitäten und die Deduktion der Konzentrationen erfolgte durch Kristina Dittrich².

Sämtliche experimentellen Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Kyra Kolb und Marcel Kremser¹ von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 01.10.2021



¹ Universitätsklinikum Tübingen Innere Medizin III - Kardiologie und Angiologie – Deutsches Herzkompetenz Zentrum, Otfried-Müller-Straße 10, 72076 Tübingen

² Eberhard Karls Universität Tübingen, Institute of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical (Bio-)Analysis, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tübingen,

8. Veröffentlichung

Auszüge dieser Arbeit wurden in folgendem Werk mit genannter Erstautorenschaft publiziert: **Tobias Harm**¹, Alexander Bild¹, Kristina Dittrich², Andreas Goldschmied¹, Jeremy Nestele¹, Madhumita Chatterjee¹, Xiaoqing Fu², Kyra Kolb¹, Tatsiana Castor¹, Oliver Borst¹, Tobias Geisler¹, Dominik Rath¹, Michael Lämmerhofer², Meinrad Gawaz¹:

“Acute coronary syndrome is associated with a substantial change in the platelet lipidome”, Cardiovascular Research, 2021/07/30, DOI 10.1093/cvr/cvab238.

¹ Universitätsklinikum Tübingen Innere Medizin III - Kardiologie und Angiologie – Deutsches Herzkompentenz Zentrum, Otfried-Müller-Straße 10, 72076 Tübingen

² Eberhard Karls Universität Tübingen, Institute of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical (Bio-)Analysis, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tübingen,

9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz sehr für die Bereitstellung des interessanten Themas. Ich danke für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit in der AG Gawaz. Des Weiteren möchte ich mich ausdrücklich für die kontinuierliche Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Lämmerhofer danke ich für die Kooperation, die Erfahrungen und Hilfestellungen im Bereich der Lipidomik.

Herrn PD Dr. Dominik Rath möchte ich meinen großen Dank für die persönliche Betreuung, Erfahrungswerte, sowie die Vermittlung und Revision dieser Arbeit aussprechen.

Frau Kristina Dittrich möchte ich mein herzliches Dankeschön für die Bereitstellung der Lipidomik-Daten, die Einführung in die Metabolomik, sowie die gewinnbringenden Austausche entgegenbringen.

Bei Frau Kyra Kolb und Herrn Marcel Kremser möchte ich mich für die ausführliche Einführung in die *ex vivo* Experimente bedanken.

Herrn Andreas Goldschmied gilt mein Dank für die Akquisition der Blutproben. Bei Frau Lydia Lapdev möchte ich mich sehr für die Hilfe der Aufbereitung dieser Blutproben bedanken.

Überdies möchte ich mich bei Larissa Hetterich und meiner Familie, sowie allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Gawaz, für deren Hilfsbereitschaft und den großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit bedanken.