

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

**Platelet Pharmacolipidomics: Auswirkung der  
chronischen Medikation auf das thrombozytäre  
Lipidom**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Frey, Moritz**

**2025**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Philipp

Tag der Disputation: 13.06.2024

**Gewidmet**

Meinen Eltern Sabine & Karl-Heinz

Meiner Schwester Heidi

Julia Boriga

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>12</b>
1.1. Chronische Medikation bei CVD-Patienten.....	12
1.2. Thrombozyten – Aufbau und Funktion.....	13
1.3. Statine – Pleiotrope Effekte .....	15
1.4. Nomenklatur der Lipide.....	17
1.5. Thrombozytäres Lipidom .....	20
1.6. Ziele der Arbeit .....	30
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.1. Patientenkollektiv.....	32
2.2. Lipidomics-Analyse der Thrombozyten.....	33
2.3. Statistische Lipidomics-Analyse.....	34
2.4. Lipid-Clusteranalyse .....	37
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1. Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs .....	39
3.2. Einflüsse der chronischen Medikation auf das Lipidom .....	39
3.3. Statin-Medikation verändert das thrombozytäre Lipidom.....	41
3.3.1. Volcano-Plot des Einflusses der Statin-Medikation .....	41
3.3.2. Volcano-Plot des Einflusses der P2Y12-Inhibitor-Medikation.....	43
3.4. Lipidomanalyse mit der online Plattform MetaboAnalyst.....	45
3.4.1. Bestimmung der geeignetsten Methode zur Datenprozessierung bei MetaboAnalyst .....	45
3.4.2. Volcano-Plot: Einfluss der Statin-Medikation mit MetaboAnalyst ....	48

3.4.3. Fold Change: Einfluss der Statin-Medikation mit MetaboAnalyst ....	49
3.4.4. Heatmap: Einfluss der Statin-Medikation mit MetaboAnalyst .....	51
3.5. Lipidomveränderungen unter steigender Statindosis .....	53
3.6. Zusammenfassung der auffälligen Lipide aller Tests .....	56
3.6.1. Runterregulierte Lipide .....	57
3.6.2. Sinnvolle Auswahl und Gruppierung der auffälligsten herabregulierten Lipide.....	57
3.6.3. Hochregulierte Lipide .....	60
3.6.4. Sinnvolle Auswahl und Gruppierung der auffälligsten hochregulierten Lipide.....	61
3.7. Unabhängigkeit der Lipidomveränderungen gegenüber Einflussfaktoren .....	64
3.7.1. Einfluss der Blutplasma-Lipide .....	64
3.7.2. Einfluss der Komedikation und Begleiterkrankungen .....	65
3.8. Clusteranalyse des Lipidoms .....	70
3.8.1. Patientencharakteristika der HighOx-Gruppe .....	75
3.9. Leukozytose assoziiert mit erhöhten oxidierten Phospholipiden.....	77
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>79</b>
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	79
4.2. Diskussion der Methoden .....	79
4.2.1. Chancen und Limitationen von MetaboAnalyst .....	79
4.3. Diskussion der Ergebnisse .....	82
4.3.1. Lipidomveränderungen durch chronische Medikation .....	82
4.3.2. Lipidomveränderungen unter Statintherapie – Lipide im Fokus .....	85
4.3.3. Statin-Lipidomveränderungen sind dosisabhängig.....	102

4.3.4. Statin-Lipidomveränderungen sind unabhängig von Einflussfaktoren wie Medikamente oder Begleiterkrankungen .....	104
4.3.5. Erhöhte Leukozyten führen zu erhöhten oxidierten Phospholipiden in den Thrombozyten .....	106
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>7. Erklärungen zum Eigenanteil .....</b>	<b>118</b>
<b>8. Veröffentlichung.....</b>	<b>119</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>120</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Übersicht thrombozytäres Lipidom .....	21
Abbildung 2: Übersicht der Oxilipine .....	25
Abbildung 3: Bildung von HETE-PL nach Thrombinaktivierung.....	28
Abbildung 4: Übersicht der Anzahl signifikanter Lipide bei jeweiliger Medikation .....	40
Abbildung 5: Volcano-Plot der Lipidomveränderungen durch Statine .....	42
Abbildung 6: Volcano-Plot der Lipidomveränderungen durch Clopidogrel .....	43
Abbildung 7: Volcano-Plot der Lipidomveränderungen durch Ticagrelor.....	44
Abbildung 8: Volcano-Plot der Lipidomveränderungen durch Statin-Medikation mit MetaboAnalyst.....	48
Abbildung 9: Streudiagramm des Fold Changes durch Statin-Medikation .....	50
Abbildung 10: Heatmap der Lipidomveränderungen durch Statin-Medikation..	52
Abbildung 11: Korrelation der Lipide mit steigender Statindosis.....	54
Abbildung 12: Zusammenfassung der auffälligen Lipide aller Tests.....	56

Abbildung 13: Boxplots der Blutplasma-Lipide in Gruppen mit unterschiedlicher Atorvastatinosis .....	65
Abbildung 14: 2-D Scores Plot der PLS-DA mit Statin therapiert vs. nicht-therapiert.....	67
Abbildung 15: Übersicht der 2-D Scores Plots der PLS-DA mit Störfaktoren auf Lipidomveränderungen durch Statin-Therapie .....	68
Abbildung 16: Zusammenfassung aller PLS-DA Kreuzvalidierungs-Performance-Parameter .....	69
Abbildung 17: Lipidzusammensetzung der 6 Cluster .....	71
Abbildung 18: Heatmap mit Dendrogramm der Patientencluster.....	72
Abbildung 19: Mosaik-Plot der mit ATII-Blocker behandelten Patienten innerhalb der 4 Cluster.....	74
Abbildung 20: Vergleich des Altersmittelwerts der 4 Cluster .....	74
Abbildung 21: Vergleich der Leukozytenzahl der Gruppen HighOx vs. Normal	76
Abbildung 22: Volcano-Plot der Lipidomveränderungen bei Patienten mit Leukozytose .....	77
Abbildung 23: Stoffwechselweg Entstehung OxPC-12S-HETE.....	88

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Nomenklatur wichtiger Fettsäuren .....	18
Tabelle 2: Abkürzungen der Lipidklassen.....	19
Tabelle 3: Grundcharakteristika des Patientenkollektivs .....	32
Tabelle 4: Übersicht JMP Cluster Analyse .....	38
Tabelle 5: Signifikant veränderte Lipide bei Statin-Behandlung .....	42
Tabelle 6: Signifikant veränderte Lipide bei Clopidogrel-Behandlung .....	44
Tabelle 7: Signifikant veränderte Lipide bei Ticagrelor-Behandlung.....	45

Tabelle 8: Übersicht Ergebnisse der Daten-Normalisierung mit MetaboAnalyst .....	46
Tabelle 9: Übersicht Ergebnisse Daten-Filterung mit MetaboAnalyst.....	47
Tabelle 10: Hochregulierte Lipide bei Statin-Behandlung mit MetaboAnalyst ..	49
Tabelle 11: Lipide mit dem höchsten Fold Change durch Statin-Behandlung ..	50
Tabelle 12: In Heatmap erhöhte Lipide unter Statin-Therapie .....	51
Tabelle 13: In Heatmap erhöhte Lipide unter keiner Statin-Therapie .....	51
Tabelle 14: Korrelation der Lipide mit steigender Statindosis.....	55
Tabelle 15: Übersicht aller auffällig runterregulierten Lipide.....	57
Tabelle 16: Übersicht aller auffällig hochregulierten Lipide .....	60
Tabelle 17: Hochregulierte Lipide bei Leukozytose .....	78
Tabelle 18: Herabregulierte Lipide mit hohem Fold Change im wissenschaftlichen Kontext .....	86
Tabelle 19: Herabregulierte Lipide der PC 16-Gruppe im wissenschaftlichen Kontext.....	87
Tabelle 20: Herabregulierte Lipide der PC 40-Gruppe im wissenschaftlichen Kontext.....	89
Tabelle 21: Hochregulierte Lipide der VLCFA-PUFA-TG-Gruppe im wissenschaftlichen Kontext .....	91
Tabelle 22: Hochregulierte Lipide der Spezifischen-TG-Gruppe im wissenschaftlichen Kontext .....	93
Tabelle 23: Hochregulierte oxidierte Phospholipide im wissenschaftlichen Kontext.....	95



# Abkürzungsverzeichnis

## A

AA..... *Arachidonsäure*  
ACEI ..... *Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren*  
ACS ..... *Akutes Koronarsyndrom*  
ADA ..... *Adrensäure*  
ADP ..... *Adenosindiphosphat*  
ALA ..... *Linolensäure*  
ANOVA ..... *one-way analysis of variance*  
ARB ..... *Angiotensin-Rezeptorblocker*  
ATII ..... *Angiotensin-II*  
azPC ..... *Azelaoyl Phosphatidylcholin*

## B

BMI ..... *Body-Mass-Index*  
BMP ..... *Bismonoacylglycerophosphat*

## C

cAMP ..... *Cyclisches Adenosinmonophosphat*  
CAR ..... *Acylcarnitin*  
CCS ..... *Chronisches Koronarsyndrom*  
CE ..... *Ceramid, Cholesterin-Ester*  
Cer-NS..... *Non-hydroxy-fatty acid sphingosine ceramid*  
cGMP ..... *Cyclisches Guanosinmonophosphat*  
CoA..... *Coenzym A*  
COX ..... *Cyclooxygenase*  
cPLA2 ..... *Zytosolische Phospholipase A2*  
C-RP ..... *C-reaktive Protein*

CVD..... *Herz-Kreislauf-Erkrankungen*  
CYP450 ..... *Cytochrom P450*

## D

DAG..... *Diacylglycerin*  
DALY ..... *disability-adjusted life years*  
DG ..... *Diglyceride*  
DGLA..... *Dihomogamma-Linolensäure*  
DHA..... *Docosahexaensäure*  
Diacyl-GPC..... *Diacylglycerophosphocholin*  
DOAK ..... *Direkte orale Antikoagulanzen*  
DPA..... *Docosapentaensäure*

## E

EAT ..... *Epikardiales Fettgewebe*  
EDP ..... *Epoxydocosapentaensäuren*  
EEQ..... *Epoxyeicosatetraensäuren*  
EET ..... *Epoxyeicosatriensäure*  
eNOS..... *Endotheliale-Nitrit-Oxid-Synthase*  
EPA ..... *Eicosapentaensäure*  
ESI ..... *Elektrospray Ionisation*  
EZ ..... *Extrazellulärraum*

## F

FC ..... *Fold Change*  
FDR..... *False Discovery Rate*  
FS ..... *Fettsäuren*

## G

GFR..... *Glomeruläre Filtrationsrate*

GPC ..... *G-Protein-Gekoppelt*  
 GPIb-IX-V ..... *Glykoprotein Ib-IX-V*  
 GPT ..... *Glutamat-Pyruvat-Transaminase*  
 GPVI ..... *Glykoprotein VI*  
 GPX ..... *Gluthationperoxidase*  
 Gq ..... *Gq-Protein-gekoppelter Rezeptor*  
 GTP ..... *Guanosintriphosphat*

## H

HAdA ..... *Hydroxyadrensäure*  
 HDHA ..... *Hydroxydocosahexaensäure*  
 HDL ..... *High Density Lipoprotein*  
 HDPA ..... *Hydroxydocosapentaensäure*  
 HEPE ..... *Hydroxyeicosapentaensäure*  
 HETE ..... *Hydroxyeicosatetraensäure*  
 HMGCR ..... *3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A Reduktase*  
 HODE ..... *Hydroxyoctadecadiensäure*  
 HpETE ..... *Hydroperoxyeicosatetraenoic acid*

## I

iAP ..... *Instabile Angina pectoris*  
 IFN $\gamma$  ..... *Interferon Gamma*  
 IL ..... *Interleukin*  
 IL-6 ..... *Interleukin-6*  
 INF $\gamma$  ..... *Interferon- $\gamma$*   
 INR ..... *International Normalized Ratio*  
 IP3 ..... *Inositoltriphosphat*  
 iPLA2 .. *Kalzium-unabhängige Phospholipase A2*  
 ITAM .. *Immunorezeptor tyrosine-based activation motif*  
 IZ ..... *Intrazellulärraum*

## K

KHK ..... *Koronare Herzerkrankung*

## L

LA ..... *Linolsäure*  
 LCFA ..... *Langkettige Fettsäuren*  
 LDH ..... *Laktatdehydrogenase*  
 LDL ..... *Low-Density-Lipoprotein*  
 LNA ..... *Linolensäure*  
 LOX ..... *Lipoxygenase*  
 LPA ..... *Lysophosphatidsäure*  
 LPC ..... *Lysophosphatidylcholin*

## M

MAPK ..... *Mitogen-aktivierte Proteinkinase*  
 MCFA ..... *Mittelkettige Fettsäuren*  
 MG ..... *Monoacylglycerol*  
 MI ..... *Myokardinfarkt, Herzinfarkt*  
 MS ..... *Massenspektrometrie*  
 MUFA ..... *Einfach ungesättigte Fettsäuren*

## N

NF- $\kappa$ B ..... *Nukleärer Faktor- $\kappa$ B*  
 NO ..... *Stickstoffmonoxid*  
 NSTEMI ..... *Nicht-ST-Hebungsinfarkt*

## O

OAK ..... *Orale Antikoagulanzen*  
 OATP2B1 ..... *organic anion transporting polypeptide 2B1*  
 OPLS ..... *Ordinary Partial Least Squares*  
 OxPL ..... *Oxidierete Phospholipide*

## P

PA.....*Palmitinsäure*  
PC.....*Phosphatidylcholin*  
PDGF.....*Platelet-derived growth factor*  
PE.....*Phosphatidylethanolamin*  
PG.....*Phosphatidylglycerol, Prostaglandin*  
PGH<sub>2</sub>.....*Prostaglandin H2*  
PI.....*Phosphatidylinositol*  
PI3Ks.....*Phosphoinositid-3-Kinase*  
PKC.....*Proteinkinase C*  
PLA<sub>2</sub>.....*Phospholipase A2*  
PLC $\beta$ .....*Phospholipase C- $\beta$*   
PLS-DA.....*Partial Least-Squares Discriminant Analysis*  
PRESS.....*Predicted Residual Sum of Squares*  
PS.....*Phosphatidylserin*  
PTT.....*Partielle Thromboplastinzeit*  
PUFA.....*Mehrfach ungesättigte Fettsäuren*

## Q

QTOF.....*Quadrupole time-of-flight*

## R

ROS.....*Reaktive Sauerstoffspezies*  
RUV.....*Removal of Unwanted Variation*

## S

SA.....*Stearinsäure*

sAP.....*Stabile Angina Pectoris*  
SCFA.....*Kurzkettige Fettsäuren*  
sEH.....*Lösliche epoxide hydrolase*  
SERRF.....*Systematic Error Removal Using Random Forrest*  
SFKs.....*Src Familie Kinasen*  
SGoF.....*Sequential-Goodness-of-Fit-Methode, sequential goodness of fit*  
SM.....*Sphingomyelin*  
sn.....*Stereospecific Numbering System*  
sPLA<sub>2</sub>.....*Sekretorische Phospholipase A2*  
STEMI.....*ST-Hebungsinfarkt*

## T

TG.....*Triglyceride*  
TNF- $\alpha$ .....*Tumornekrosefaktor- $\alpha$*   
TPR.....*TXA<sub>2</sub>-Prostaglandin-Rezeptor*  
tSNE.....*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*  
TXA<sub>2</sub>.....*Thromboxan A2*

## U

UHPLC.....*Ultra High Performance Liquid Chromatography*

## V

VEGF.....*Vascular endothelial growth factor*  
VLCFA.....*Sehr langkettige Fettsäuren*  
vWF.....*von-Willebrand-Faktor*

# 1. Einleitung

## 1.1. Chronische Medikation bei CVD-Patienten

Die Koronare Herzerkrankung (KHK) zählt neben dem Herzinfarkt (MI), dem Schlaganfall und weiteren, das Herz und die Blutgefäße betreffenden Erkrankungen, zu der Gruppe der Herz-Kreislauf-Erkrankungen (CVD) (Sanchis-Gomar et al., 2016). Weltweit ist die KHK bereits seit 1990 bei den über 50-Jährigen die führende Ursache für Tod oder frühzeitige Behinderung, gemessen an den verlorenen gesunden Lebensjahren (DALY). Es folgt an zweiter Stelle der Schlaganfall (Collaborators, 2020). Ursächlich für eine CVD ist die Atherosklerose. Dieser mehrstufige Prozess namens „Atherogenese“ gleicht einem Entzündungsgeschehen, bei welchem Leukozyten und Endothelzellen zusammen mit Thrombozyten interagieren, woraus die Bildung von lipidhaltigen Plaques resultiert (Aukrust et al., 2010). In einem fortgeschrittenen Stadium können die Ablagerungen das Lumen des Gefäßes verengen und zu einer Minderperfusion des zu versorgenden Endorgans führen. Falls der Plaque instabil wird und es letztendlich zu einem Abriss des Plaques kommt, kann dies schnell zu einem kompletten Verschluss des Gefäßes mit akuter Symptomatik führen.

Damit es nicht zu einer Atherosklerose mit konsekutiver CVD kommt ist eine Minimierung der Risikofaktoren essenziell. Zu den wichtigsten Maßnahmen zählen neben Lebensstil-Veränderungen wie eine Reduktion des Rauchens und des Übergewichts, vor allem eine konsequente Pharmakotherapie mit dem Ziel der Senkung des Blutdrucks, des Cholesterin-Levels und der Blutgerinnungsneigung (Piepoli et al., 2016). Zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten bei CVD zählen somit (Arnett et al., 2019):

- Blutdrucksenker:  $\beta$ -Blocker, Diuretika, Calciumkanalblocker, Aldosteronantagonisten, Angiotensin-Rezeptorblocker (ARB), Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren (ACEI)
- Blutgerinnungshemmer: Aspirin, P2Y<sub>12</sub>-Inhibitoren, Orale Antikoagulanzen (OAK), direkte orale Antikoagulanzen (DOAK)
- Lipidsenker: Statine

Während die indikationsbezogene Hauptwirkung der einzelnen Medikamente bereits gut erforscht ist, gibt es kaum Daten zu deren Wirkung auf das thrombozytäre Lipidom. Diese Arbeit leistet wichtige erste Erkenntnisse zur Behebung dieser Wissenslücke.

## 1.2. Thrombozyten – Aufbau und Funktion

Thrombozyten sind die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutplasmas und besitzen die Hauptfunktion der Hämostase nach Gefäßverletzung. Außerdem sind sie bei inflammatorischen Prozessen beteiligt und interagieren mit Leukozyten und Endothelien. Dadurch haben sie eine zentrale Rolle bei thrombo-inflammatorischen Prozessen wie der Atherosklerose (Gawaz et al., 2005).

Thrombozyten sind wie die Erythrozyten kernlos und entstehen durch Abschnürung von Megakaryozyten im Knochenmark. Ihre anschließende Lebensdauer im Blut beträgt 10 bis 12 Tage (Horn, 2009). Dank kleiner Mengen mRNA können Thrombozyten, trotz fehlendem Zellkern, Proteine wie Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor (vWF) und Glykoproteine selbst synthetisieren (Maguire and Fitzgerald, 2003). Das Zellinnere der Thrombozyten besteht aus einem Zytoskelett, dem dichten tubulären System (Kalzium-Speicher), Mitochondrien (Energiegewinnung, Apoptose), Glykogen, Peroxisomen und verschiedenen Granula:  $\alpha$ -Granula,  $\delta$ -Granula und  $\lambda$ -Granula (Rivera et al., 2009).

Die  **$\delta$ -Granula**, auch dichte Granula genannt, sind die ersten Vesikel, die nach Aktivierung ausgeschüttet werden. Sie enthalten Substanzen wie ADP (Adenosindiphosphat), Kalzium, Histamin und Serotonin, welche wichtig für die Aktivierung weiterer Thrombozyten sind.

Die  **$\alpha$ -Granula** sind die häufigsten und größten Granula und enthalten eine Vielzahl an Substanzen, die vor allem wichtig für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten sind (Horn, 2009). Dazu zählen unter anderem: Adhäsionsproteine (z.B. Fibrinogen, Fibronectin, P-Selektin, ...), Adhäsionsrezeptoren (z.B. vWF), Koagulation- und Fibrinolyse-Faktoren (z.B. Plasminogen), Zytokine, Wachstums-Faktoren (z.B. PDGF (Platelet-derived

growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor)) und Gerinnungsfaktoren (z.B. V, XI and XIII) (Rivera et al., 2009, Golebiewska and Poole, 2015, Li et al., 2010).

Die  **$\lambda$ -Granula** sind lysosomale Granula und enthalten proteolytische Enzyme wie z.B. Hydrolasen (Li et al., 2010).

Für die multiplen Zell-Interaktionen und die verschieden regulierten Aktivierungs-, Adhäsions- und Signalfunktionen besitzt die Zellmembran der Thrombozyten eine Vielzahl an integrierten Proteinen und Rezeptoren. Einen Überblick über die verschiedenen Rezeptoren mit ihren jeweiligen Aktivatoren und intrathrombozytären Pathways soll nachfolgend gegeben werden.

**Adhäsions-Rezeptoren: vWF & Kollagen** welche am **GP1b-IX-V**- (Glykoprotein Ib-IX-V) bzw. **GPVI**- (Glykoprotein VI) **Rezeptor** binden sind der erste und zentrale Schritt bei der Initiierung der Aktivierung und Adhäsion der Thrombozyten nach Endothelverletzung (Rivera et al., 2009). Während der GPVI-Rezeptor vor allem für die Kollagen-vermittelte Aktivierung verantwortlich ist, ist der **Integrin  $\alpha_2\beta_1$** -Rezeptor, ein weiterer Adhäsions-Rezeptor, für die Adhäsion an Kollagen verantwortlich. Trotz großer Unterschiede in der Funktion und Signaltransduktion dieser drei Adhäsions-Rezeptoren haben sie viele gemeinsame Pathway-Mechanismen und Enzyme. Zum Beispiel die Src-Familie-Kinasen (SFKs), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3Ks), Immunorezeptor tyrosine-based activation motif (ITAM) und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK). Letztere, die MAPK, führt schließlich auch zur Thromboxan-A<sub>2</sub>- (TXA<sub>2</sub>) Synthese und G-Protein-Gekoppelt (GPC) zur Granula-Sekretion (Rivera et al., 2009). Zur MAPK-Aktivierung trägt auch die Endotheliale-Nitrit-Oxid-Synthase (eNOS) über Stickstoffmonoxid (NO) und cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) bei. Wobei hohe NO/cGMP Spiegel inhibierend wirken und niedrige Konzentrationen stimulierend (Li et al., 2003).

**Substrat-Rezeptoren:** Verschiedene agonistische und antagonistische Substrate entfalten ihre Wirkung über **G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)** (Rivera et al., 2009).

**ADP → P2Y1- und P2Y12-Rezeptor:** ADP wirkt auf zwei Wege aktivierend: Erstens über den P2Y1-Rezeptor mittels Gq-Protein und zweitens über den P2Y12-Rezeptor mittels Inhibierung der cAMP vermittelten Inhibierung (Hollopeter et al., 2001).

**Thrombin → PAR1- und PAR4-Rezeptor:** Thrombin, als der wahrscheinlich wirksamste Plättchen-Aktivator, wirkt über die Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) aktivierend auf das Gq-Protein mit der Folge von multiplen, weiter unten zusammengefassten, Prozessen (Coughlin, 1999).

**TXA<sub>2</sub> → TXA<sub>2</sub>-Prostaglandin-Rezeptor (TPR):** TXA<sub>2</sub> wirkt über den TPR aktivierend auf Gq und G13. Letzteres führt über eine Rho-Kinase zur Formänderung des Thrombozyten und Granula-Sekretion (Klages et al., 1999).

Die meisten Substrate entfalten ihre Wirkung über das Gq-Protein. Die darauffolgende weitere Signalkaskade verläuft über eine Aktivierung der Phospholipase C-β (PLCβ), welche schließlich über Diacylglycerin (DAG) zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und über Inositoltriphosphat (IP3) zum intrazellulären Kalzium-Anstieg führt. Dieser intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Anstieg ist ein zentraler Aktivator für eine Reihe an Prozessen wie der thrombozytären Formänderung, Integrin-Aktivierung, NOS-Aktivierung, PLA<sub>2</sub>-Aktivierung mit TXA<sub>2</sub>-Synthese und Granula-Sekretion (Rivera et al., 2009, Li et al., 2010).

### **1.3. Statine – Pleiotrope Effekte**

Statine (HMG-CoA Reduktase Inhibitoren) sind seit 30 Jahren im Einsatz zur Prävention von CVD (Oesterle et al., 2017). Sie haben seitdem erfolgreich die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen wie Apoplex, Myokardinfarkt oder den kardiovaskulären Tod gesenkt (Gallone et al., 2018). Die primäre Indikation zur Therapie mit Statinen ist die Behandlung der Hypercholesterinämie und die generelle Verbesserung des Lipidprofils in CVD-Patienten (Ahluwalia et al., 2022). Dies wird erreicht über die Hemmung des Enzyms 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A Reduktase (HMGCR), wodurch ein zentraler Schritt bei der endogenen Cholesterinsynthese blockiert wird (Nenna et al., 2021). Die Hepatozyten sind der zentrale Ort der Serumcholesterinsynthese, weshalb eine

HMGCR-Hemmung dort zur Hochregulierung der hepatischen Low-Density-Lipoprotein (LDL-Rezeptoren und konsekutiven Erhöhung der LDL-Cholesterin-Clearance schließlich zur Senkung des Serumcholesterins führt (Oesterle et al., 2017).

Zunehmend im Interesse der Forschung sind die, über die lipidsenkende Wirkung hinausgehenden, zusätzlichen Effekte der Statine, die sogenannten pleiotropen Effekte. Dazu zählen unter anderem eine Modulation der Thrombozyten-Reaktivität, der eNOS, Reduktion des oxidativen Stresses, Einfluss auf kardiale Hypertrophie & Fibrose, antiinflammatorische Effekte wie eine Reduktion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ) und Inhibition von inflammatorischen T-Helfer-Zell-Signalen (Zhao et al., 2016, Nenna et al., 2021, Ahluwalia et al., 2022). Zu beachten ist jedoch, dass verschiedene Statine zu unterschiedlichen pleiotropen Effekten führen, was eventuell an deren unterschiedlicher Lipophilie liegen könnte (Atorva- und Simvastatin: Lipophil; Pravastatin: Hydrophil) (Moscardó et al., 2013).

Hintergrund vieler pleiotroper Effekte soll eine mit der HMGCR-Inhibierung einhergehenden Reduktion der Synthese von Isoprenoiden sein, sowie eine posttranslationale Prenylierung von kleinen Guanosintriphosphat (GTP) bindenden Proteinen wie Rho und Rac und die nachgeschalteten Effektoren Rho Kinase und NADPH-Oxidase (Oesterle et al., 2017).

Wie diese mannigfaltigen pleiotropen Effekte speziell auf die Thrombozyten wirken wurde von Nenna et al. übersichtlich zusammengefasst (Nenna et al., 2021). Für den Lipidmetabolismus am relevantesten scheinen folgende Interaktionen zu sein:

- **Organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1):**  
Ein Anionen-Transporter in der Thrombozyten-Membran wahrscheinlich verantwortlich für die (Atorva-) Statin Aufnahme in Thrombozyten (Niessen et al., 2009).
- **Reduktion des PAR-1 Rezeptors:**  
Verminderung der Thrombozytenaggregation und Koagulationskaskade (Serebruany et al., 2006).



- **Reduktion der (zytosolischen) Phospholipase A2 (cPLA2), TXA<sub>2</sub> und MAPK:**  
Verminderte intrathrombozytäre Kalzium-Level, verminderte Cyclooxygenase-1 (COX-1) /TXA<sub>2</sub>-Synthase Aktivität und dadurch weniger Prostaglandine (Moscardó et al., 2013, Violi et al., 2013).
- **Reduktion von CD36, Lipoxygenase-1 (LOX-1):**  
Reduktion dieser beiden ox-LDL Rezeptoren (Puccetti et al., 2005).
- **Aktivierung von PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$ :**  
Führt unter anderem zu vermindertem intrazellulärem Kalzium, MAPK und PKC $\alpha$ . Erhöhtes inhibitorisch wirkendes cAMP. Auch auslösbar mit Fibraten (Ali et al., 2009, Du et al., 2014).
- **Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit:**  
Erhöhte Bioverfügbarkeit von NO und verringert Kalzium-Level mit konsekutiv verminderter Plättchen-Aktivität (Laufs et al., 2000).

Zusammenfassend besteht mehrheitlich Konsens darüber, dass Statine aufgrund der oben aufgelisteten Effekte zu einer verminderten Plättchen-Reaktivität führen. Diese Dissertation über das thrombozytäre Lipidom bei Statintherapie kann ein fehlendes Puzzleteil mehr in den weiterhin überwiegend unklaren molekularen Mechanismen hinter diesen pleiotropen Effekten der Statine sein.

#### 1.4. Nomenklatur der Lipide

Eingeteilt und unterschieden werden können die Lipide zum einen anhand ihrer funktionellen Gruppe (Phospholipide, Sphingosine, Sterine, ...) oder kleineren strukturellen Unterschiede wie Kettenlänge und Anzahl der ungesättigten Doppelbindungen. Bei der Kettenlänge bestehen je nach Quelle kleine Abweichungen (Kyselová et al., 2022). Für diese Arbeit wurde folgendes definiert:

- Kurzkettige Fettsäuren (SCFA): 2 bis 6 Kohlenstoffatome
- Mittelkettige Fettsäuren (MCFA): 7 bis 12 Kohlenstoffatome
- Langkettige Fettsäuren (LCFA): 13 bis 21 Kohlenstoffatome
- Sehr langkettige Fettsäuren (VLCFA):  $\geq 22$  Kohlenstoffatome

Lipide ohne Doppelbindungen werden als gesättigt bezeichnet. Fettsäuren mit einer Doppelbindung als einfach ungesättigt (MUFA) und mit zwei oder mehr Doppelbindungen als mehrfach ungesättigt (PUFA).

Die für diese Arbeit relevantesten Lipidnamen bezüglich Kettenlänge und Sättigung sollen in nachfolgender Tabelle aufgelistet werden.

**Tabelle 1: Nomenklatur wichtiger Fettsäuren**

Aufgelistet sind die in dieser Arbeit wichtigsten Fettsäuren sortiert nach Kettenlänge (Anzahl der C-Atome) und Sättigung (Anzahl der Doppel-Bindungen). Die n-Zahl steht für die Position der ersten Doppelbindung. Omega-3-Fettsäuren (n-3) und Omega-6-Fettsäuren (n-6) sind essenziell (grün) und können somit vom Körper nicht selbst synthetisiert werden (Chemie.de).

C-Atome : Doppel-B.	Abkürzung	Trivialname	Chemische-Bezeichnung
16:0	PA	Palmitinsäure	Hexadecansäure
16:1		Palmitoleinsäure	Hexadecaensäure
18:0	SA	Stearinsäure	Octadecansäure
18:1		Ölsäure	Octadecaensäure
18:2 (n-6)	LA	Linolsäure	Octadecadiensäure
18:3 (n-3)	ALA, LNA	Linolensäure	Octadecatriensäure
20:0		Arachinsäure	Eicosansäure
20:1		Icosensäure	Eicosaensäure
20:3 (n-6)	DGLA	Dihomogamma-Linolensäure	Eicosatriensäure
20:4 (n-6)	AA	Arachidonsäure	Eicosatetraensäure
20:5 (n-3)	EPA	Timnodonsäure	Eicosapentaensäure
22:5 (n-6)	DPA	Clupanodonsäure	Docosapentaensäure
22:4 (n-6)	ADA	Adrensäure	Docosadiensäure
22:6 (n-3)	DHA	Cervonsäure	Docosahexaensäure
24:0		Lignocerinsäure	Tetracosansäure
24:1		Nervensäure	Tetracosaensäure

Für die einheitliche Nomenklatur auch komplexerer Lipide mit funktionellen Gruppen gibt es genaue Vorgaben. Liebisch et al. erstellte einen, auf der Lipid-Maps-Datenbank basierenden, Vorschlag zur einheitlichen Nomenklatur und Abkürzung der Lipide, an welcher sich auch diese Arbeit orientiert (Liebisch et al., 2020, Liebisch et al., 2013).

Die Lipidklassen werden wie folgt abgekürzt:

**Tabelle 2: Abkürzungen der Lipidklassen**

Auflistung aller in dieser Arbeit relevanten Lipidklassen mit ihren Abkürzungen gemäß Liebisch et al. (Liebisch et al., 2013).

(Glycero-)Phosphatidylserin	PS
(Glycero-)Phosphatidylinositol	PI
(Glycero-)Phosphatidylethanolamin	PE
(Glycero-)Phosphatidylcholin	PC
Lysophosphatidsäure	LPA
Bismonoacylglycerophosphat	BMP
Phosphatidylglycerol	PG
Oxidierete (Glycero-)Phospholipide	OxPL
Triglyceride	TG
Diglyceride	DG
Monoacylglycerol	MG
Sphingomyelin	SM
Ceramid	CE
Fettsäuren	FS
Fettsäure-Ester (Acylcarnitin)	CAR
Cholesterin-Ester	CE

Ein den Glycerophospholipiden vorausgehendes „L“ (Lyso) bedeutet, dass nahe der polaren Kopfgruppe eine freie Hydroxygruppe ist und dass das Lipid damit eine Acylgruppe weniger als das Nicht-Lyso-Lipid besitzt. Sie entstehen, wenn beispielsweise aus dem membrangebundenen Phospholipid **PC 16:0-20:4** die Arachidonsäure (20:4) durch Phospholipasen abgespalten wird und somit **LPC 16:0/0:0** zurückbleibt (Aoki, 2004).

Anhand des Beispiels **PC 16:0-20:4** soll erklärt werden, was diese Schreibweise bedeutet. Die Abkürzung steht für die Lipidklasse, meist definiert anhand der polaren Kopfgruppe oder dem besonderen strukturellen Motiv (Liebisch et al., 2013). Die Zahl vor dem Doppelpunkt (**16** bzw. **20**) steht für die Kettenlänge, sprich Anzahl an C-Atomen. Die Zahl nach dem Doppelpunkt (**0** bzw. **4**) steht für die Sättigung, also die Anzahl an Doppelbindungen. Das erste Zahlenpaar steht für die Acyl-Kette an der sn-1- (stereospecific numbering system) Position, das zweite für die sn-2-Position und das dritte (im Fall von Triglyceriden) für die sn-3-Position. Die sn-Position bezieht sich auf die Reihenfolge der C-Atome in der

Fischer-Projektion (mit der Hydroxylgruppe an C-2 nach links gerichtet) von oben nach unten. Dementsprechend ist sn-1 die randständige Position oben, sn-2 die mittlere Position und sn-3 die randständige Position unten (Berry, 2009). Gibt es eine polare Kopfgruppe ist diese standardmäßig an der sn-3 Position (Liebisch et al., 2013).

Außerdem verändert sich die Schreibweise je nachdem, wie viele Informationen über das Lipid vorhanden sind. Wenn nur die Lipidklasse bekannt ist, wird es **PC (367)** geschrieben. Ist der Bindungstyp bekannt, wird es **PC 36:4** geschrieben. Sind zusätzlich Informationen über die genauen Acyl-Seitenketten, jedoch nicht deren sn-Position, bekannt wird es **PC 16:0-20:4** oder **PC 16:0\_20:4** geschrieben. Die höchste Stufe berücksichtigt auch die stereospezifischen Informationen mit der Reihenfolge der sn-Position in der Schreibweise **PC 16:0/20:4**. Eine Alkyl-Ether-Bindung wird über den Buchstaben „O“ vor den Zahlen abgekürzt, zum Beispiel **PC O-16:0-20:4**. Ein „P“ vor den Zahlen bedeutet Plasmalogen, wie bei **OxPE(P-16:0/14-HAdA)** (Liebisch et al., 2013).

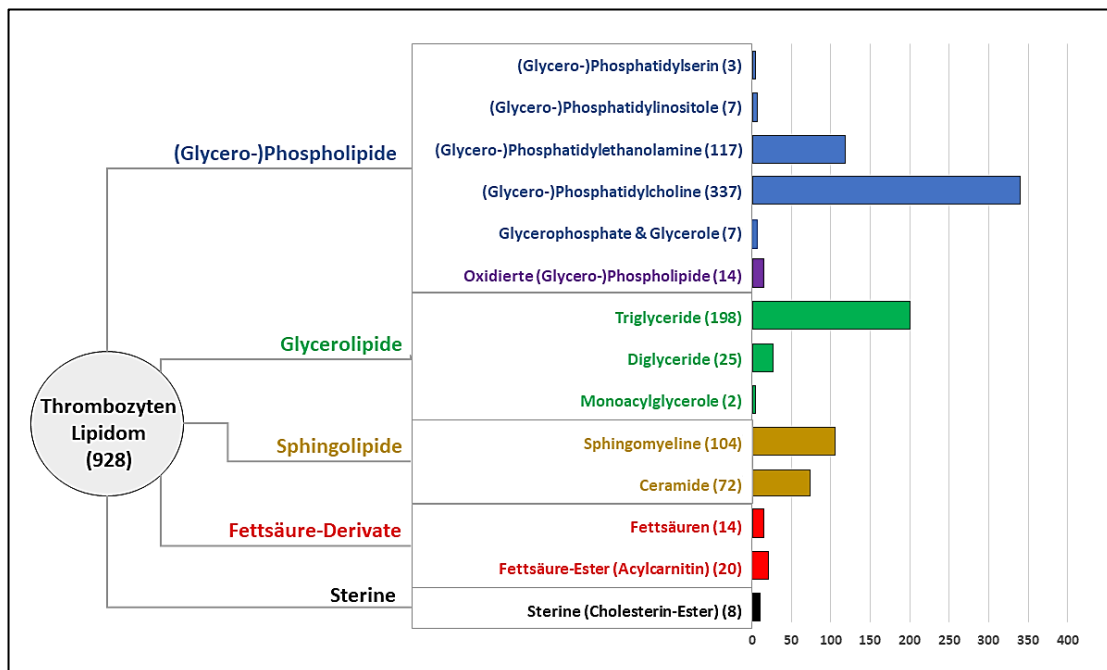
## 1.5. Thrombozytäres Lipidom

Gene kodieren für Proteine, welche wiederum zu Metaboliten führen und so den Aufbau und die Funktion unserer Zellen bestimmen. Auf diesen drei Ebenen können Analysen stattfinden und heißen dann: Genomics (DNA, RNA), Proteomics (Proteine) und Metabolomics (Lipide, Zucker, Toxine, ...) (Wenk, 2005). Metabolomics ist die quantitative Analyse der dynamischen Stoffwechselfvorgänge und ist damit die Brücke zwischen Genotyp und Phänotyp (Nicholson et al., 1999). Lipidomics, die quantitative Analyse der Lipide, ist ein mit dem technischen Fortschritt der Analysemethoden zunehmend wachsendes Feld der Wissenschaft. Ungefähr seit dem Jahr 2000 wird, meist mittels targeted oder non-targeted Kombinationsassays aus Massenspektrometrie und Liquid-Chromatographie, die exakte Lipidzusammensetzung verschiedener Kompartments untersucht (Yang and Han, 2016, O'Donnell et al., 2014). Kompartments von besonderem Interesse in der Kardiologie und Angiologie sind

beispielsweise Lipoproteine, Makrophagen, atherosklerotische Plaques oder Thrombozyten.

Die Lipide in den Thrombozyten erfüllen, wie in anderen Kompartments auch, hauptsächlich drei Aufgaben: Bestandteil von Zellstrukturen, Energiespeicher und Signalstoff. Dafür wird ihr Metabolismus engmaschig von Enzymen wie Phospholipasen, Lipid-Synthetasen, Ligasen oder Oxidasen/ Reduktasen reguliert (O'Donnell et al., 2014).

Aus vorherigen Arbeiten am gleichen Patientenkollektiv wurde die genaue Lipidzusammensetzung der Thrombozyten bereits charakterisiert (Harm et al., 2022). Nachfolgende Abbildung 1 soll dies nochmal übersichtlich veranschaulichen.



**Abbildung 1: Übersicht thrombozytäres Lipidom**

Dargestellt sind alle mittels UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS detektierten und mit der Lipid-Maps-Datenbank klassifizierten Lipide der Thrombozyten. Insgesamt wurden so 928 verschiedene Lipide klassifiziert, welche sich den fünf Lipid-Hauptklassen der (Glycero-)Phospholipide, Glycerolipide, Sphingolipide, Fettsäure-Derivate und Sterine zuordnen lassen. Die Balken repräsentieren die Anzahl der verschiedenen Lipide. Modifiziert aus (Harm et al., 2022).

Die Lipidklassen sind kein statisches Konstrukt. Sie sind über verschiedene Reaktionen und Enzyme ineinander umwandelbar. Kopfgruppen können

ausgetauscht (PC ↔ PE ↔ PS) oder übertragen werden (PC verestert mit Ceramid ⇒ SM), Acyl-Seitenketten können hydrolysiert werden (PC ⇒ LPC; PS ⇒ LPS) oder es können enzymatische Hydrolysen zusammen mit einem Fettsäure-Transfer stattfinden (FA von PC verestert mit Cholesterol ⇒ CE) (Padro et al., 2015).

### **Phospholipide**

In den Thrombozyten, sowie in anderen Körperzellen, besteht der größte Anteil der Phospholipide aus PC (40%) und PE (28%) (Hamid et al., 1980). Phospholipide sind vor allem an dem Membranaufbau beteiligt und weisen dabei eine asymmetrische Verteilung auf. PC und SM finden sich vorwiegend an der dem Blut zugewandten Seite. PE und PS sind eher auf der Innenseite, dem Zytosol anliegend. Bei einer Plättchen-Aktivierung wird ein Teil der PE und PS externalisiert und sorgt damit für eine negativ geladene, prokoagulatorische Thrombozytenoberfläche. Außerdem sind die Phospholipide ein Reservoir für Enzyme der Signaltransduktion. Beispielhaft sind hier Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) oder Bisphosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) zu nennen. Letzteres ist zentraler Initiator der Aktivierung der PKC und der Freisetzung des intrazellulären Kalziums (O'Donnell et al., 2014).

### **Fettsäuren**

Eine der Schlüssel-Reaktionen auf Thrombozyten-Aktivierung ist die Aktivierung von Phospholipasen, wie der cPLA<sub>2</sub>, welche vor allem Fettsäuren an der sn-2 Position von Phospholipiden der Plättchen-Membran freisetzt (Derksen and Cohen, 1975). Diese Fettsäuren sind hauptsächlich Arachidonsäure (AA), Linolsäure (LA), Palmitinsäure (PA) und Stearinsäure (SA), jedes mit seinen individuellen Eigenschaften, Enzymen und nachfolgenden Signal- und Stoffwechselwegen (O'Donnell et al., 2014).

### **Glycerolipide und Sterine**

Glycerolipide, wie Triglyceride (TG), Diglyceride (DG), Monoacylglycerole (MG) und Sterine wie Cholesterin-Ester (CE) sind neutrale Lipide und nur in sehr geringen Mengen in Thrombozyten vorhanden. Cholesterin ist mit über 90% das meist vorhandene neutrale Lipid, wohingegen TG, DG, MG und CE zusammen gerade einmal 2% der neutralen Lipide ausmachen (Marcus et al., 1969). Während

freies Cholesterin essenziell für die Lipid-Raft-Funktion ist, sind Glycerolipide auch ein Pool für Signalstoffe, wie zum Beispiel der PKC assoziierte second messenger Diacylglycerin (DAG) (O'Donnell et al., 2014).

### Sphingolipide

Sphingolipide bestehen aus einem Sphingosin-Rückgrat, welches im einfachsten Fall, beim CE, über eine Amidbindung mit einer FS verbunden ist. Ist am CE zusätzlich zum Sphingosin-Rückgrat mit einer FS noch ein PC oder PE gebunden, erhält man SM (Futerman and Hannun, 2004). Sie sind neben PCs hauptsächlich am Aufbau der (extrazellulären) Zellmembran beteiligt. Dabei sind sie wichtig für die Fluidität und außerdem Bestandteil von Lipidrafts (Shrimpton et al., 2002). Sphingosine können auch von der Sphingosin-Kinase phosphoryliert werden und dann als Sphingosin-1-phosphat eine second messenger Funktion bei Gefäßentwicklung, Karzinogenese, Chemotaxis, Inflammation, Proliferation und Apoptose übernehmen (Mallela et al., 2022).

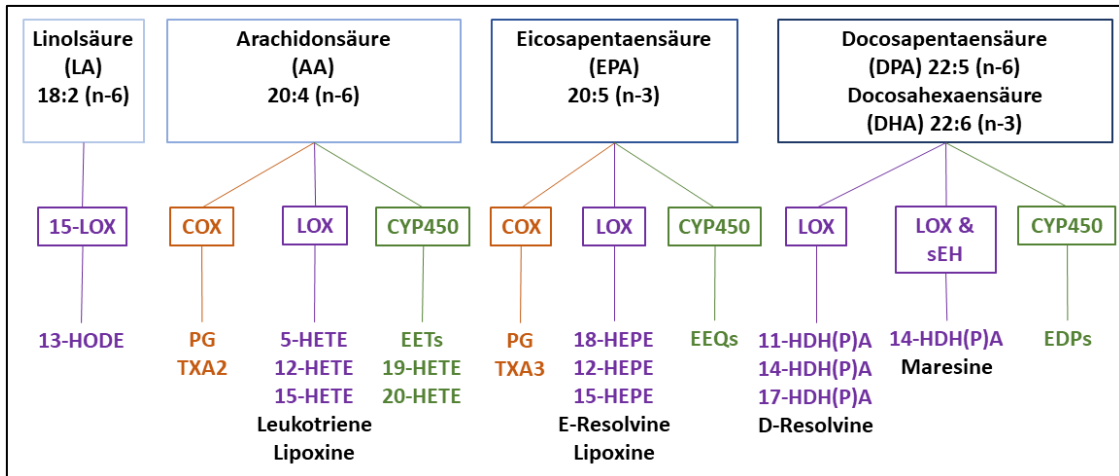
### Oxilipine – Oxidierte Phospholipide (OxPL)

Wenn PUFAS oxidiert werden, nennt man die Oxidationsprodukte sowie die davon abgeleiteten Substanzen auch Oxilipine. Aufgrund ihrer Komplexität und besonderen Relevanz in dieser Arbeit, sowie in vielen aktuellen wissenschaftlichen Arbeiten, sollen die Oxilipine in einem eigenen, ausführlichen Abschnitt erklärt werden. Zunächst folgt eine Übersicht der wichtigsten Oxilipine und ihren Vorläufer-Lipiden (**Abbildung 2**). Anschließend wird beispielhaft die Bildung von 12S-Hydroxyeicosatetraensäure-Phospholipiden (12S-HETE-PL) nach Thrombinaktivierung erläutert (**Abbildung 3**). Abschließend wird nochmal auf das zentrale Enzym der OxPL-Synthese in Thrombozyten, die 12-LOX, eingegangen.

Die Freisetzung von PUFAS für die Synthese von Oxilipinen erfolgt meist mittels Phospholipasen aus der Thrombozytenmembran. Die häufigsten Oxilipin-Vorläufer sind die PUFAS LA, AA, Eicosapentaensäure (EPA), DPA (Docosapentaensäure) und DHA (Docosahexaensäure) (**Abbildung 2**). Die Kalzium-abhängige cPLA2 setzt eher Omega-6 AA frei, wohingegen die Kalzium-unabhängige Phospholipase A2 (iPLA2) EPA, DHA und DPA freisetzt (Ahluwalia

et al., 2022). Die PUFAS werden dann von den Enzymen LOX, COX und Cytochrom P450 (CYP450) zu unterschiedlichen Oxilipinen mit verschiedenen bioaktiven Wirkungen oxidiert. Sie unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihrer pro- oder antiinflammatorischen Wirkung, welche sie über Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren entfalten (Yeung et al., 2017). Pro-inflammatorische Oxilipine führen damit zu Leukozyten-Rekrutierung, Bildung von ROS und Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine (Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ )), fibrotischer Wundheilung und erhöhte Nukleärer Faktor-kB (NF-kB)-Aktivierung. Auf der anderen Seite führen anti-inflammatorische Oxilipine zu einem Rückgang der Entzündung durch Leukozyten-Apoptose, anti-inflammatorische Zytokine (IL-10), Zelldebris-Phagozytose durch Makrophagen und zu einer verminderten NF-kB-Aktivierung (Fullerton and Gilroy, 2016). Zu den pro-inflammatorischen Mediatoren zählen einige Substanzen der AA, wie COX-Assoziierten Prostaglandine und Thromboxane. Aber auch die Oxilipine der LOX wie 5-HETE und Leukotriene. Der 12-HETE, der 15-HETE, den Lipoxinen und den restlichen Substanzen des EPA-, DHA- und DPA-Metabolismus wird eine anti-inflammatorische Wirkung nachgesagt (Ahluwalia et al., 2022). Wie 12-HETE jedoch auch zur Hämostase nach Thrombinaktivierung beitragen kann, soll im nachfolgenden Abschnitt mit **Abbildung 3** erläutert werden.





**Abbildung 2: Übersicht der Oxilipine**

Übersicht der Bildung einiger Oxilipine mit ihren jeweiligen Enzymen und Ausgangs-Lipiden. COX: Cyclooxygenase, LOX: Lipoxygenase, CYP450: Cytochrom P450, HODE: Hydroxyoctadecadiensäure, PG: Prostaglandine, TXA: Thromboxan, HETE: Hydroxyeicosatetraensäure, EETs: Epoxyeicosatriensäure, HEPE: Hydroxyeicosapentaensäure, EEQs: Epoxyeicosatetraensäuren, HDH(P)A: Hydroxydocosapentaensäure (HDP) und Hydroxydocosahexaensäure (HDHA), sEH: soluble epoxide hydrolase, EDPs: Epoxydocosapentaensäuren. Modifiziert von: (Ahluwalia et al., 2022, Yeung et al., 2017)

## Bildung von Oxilipinen (z.B. 12S-HETE-PL) nach Thrombinaktivierung

### 1. Thrombin vermittelte Aktivierung führt zur Kalzium-Ausschüttung:

Thrombinaktivierung findet vor allem über die PAR1 und PAR4 (Protease-activated receptor) statt. PAR4 soll besonders relevant für die Bildung von 12-HETE sein (Thomas et al., 2010). Andere Quellen bestätigen die zusätzliche Rolle von PAR4 bei Inflammation (Rwibasira Rudinga et al., 2018). Anschließend folgt die Gq-Protein vermittelte Aktivierung der PLC- $\beta$ , welche über die Freisetzung von Inositol Triphosphate (IP3) und DAG zu einer intrazellulären Kalziumausschüttung aus dem dichten tubulären System (Teil des glatten Endoplasmatischen Retikulums) führt (Jardin et al., 2008). Der intrazelluläre Kalziumanstieg aktiviert wiederum eine Vielzahl an thrombozytären Schlüsselreaktionen, wie die Aktivierung von Integrin, sowie die Freisetzung von Granula und der PLA<sub>2</sub>.

### 2. Freisetzung von PUFA aus der Membran für die Oxilipin-Synthese:

Phospholipasen sind an der Freisetzung von PUFAS aus der Zellmembran beteiligt. Bekannt sind sechs verschiedenen Phospholipasen. Die cPLA<sub>2</sub> $\alpha$

befindet sich im Zytosol und transloziert Kalzium-abhängig an die intrazelluläre Membran, um dort selektiv für PL mit AA an der sn-2 Position (wie PC 10:0-20:4 oder PC 16:0-20:4) AA freizusetzen. In Verbindung mit 12-HETE, in der Literatur ebenfalls häufig genannt, ist die sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), welche neben AA auch für die Freisetzung von EPA und DHA zuständig ist. Neben dieser regulierten Freisetzung der PUFAs, wird die intrazelluläre PUFA-Konzentration streng durch Konjugation mit Coenzym A (CoA) und Veresterung zu PL oder anderen Stoffwechselwege, wie der  $\beta$ -Oxidation reguliert (Hajeyah et al., 2020).

### **3. Aus PUFA (AA) werden biologisch aktive Substrate:**

Freie AA wird nun von hauptsächlich drei verschiedenen Enzymen an jeweils spezifischen Stellen oxidiert und dadurch zu unterschiedlichen bioaktiven Substanzen umgewandelt: COX, CYP450 und LOX (Thomas et al., 2010). In geringeren Mengen als COX oder LOX können auch CYP-Enzyme PUFAS (AA, EPA, DHA, DPA, Sterole, ...) zu biologisch aktiven Metaboliten, hauptsächlich EETs (Epoxy-Eicosatienoic acids), epoxidieren. Eine gute Übersicht dazu liefert (Hajeyah et al., 2020). EETs können zum Beispiel eine Rolle bei der Blutdruckregulation und Entzündung spielen (Spector and Kim, 2015).

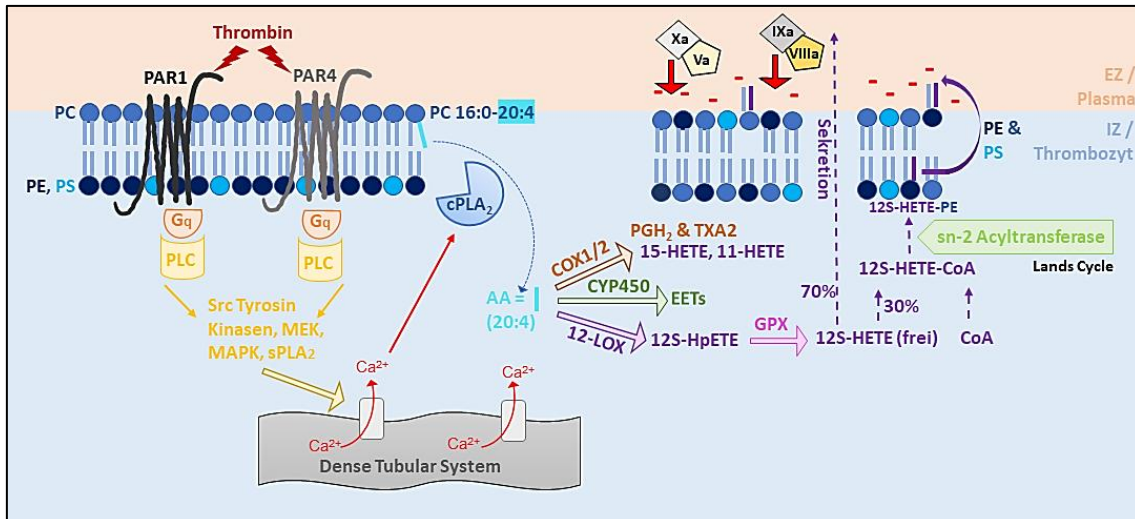
Zum einen kann COX1 aus AA mit ihrer Dioxygenase-Aktivität an C11 und C15 oxidierte Hydroperoxide generieren. Diese können dann zu 11R-HETE, 15R-HETE oder 15S-HETE reduziert werden (Hajeyah et al., 2020). Zum anderen wird AA über COX1 mit ihrer Peroxygenase-Aktivität zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) umgewandelt. PGH<sub>2</sub> ist die Vorstufe von anderen Prostaglandinen (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan. Auch die COX2 kann, sogar noch besser als COX1, neben der bevorzugten AA auch Eicosadiensäure, Adrensäure (AdA), DPA and DHA oxidieren. Mit diesen Substraten spielen die COX-Enzyme eine wichtige Rolle bei Entzündung, Blutfluss und Thrombusbildung (Hajeyah et al., 2020).

Außerdem kann AA (sowie EPA, DHA, Dihomogamma-Linolensäure (DGLA)) von der Lipoxigenase 12S-LOX zu 12S-HpETE oxidiert werden. 12S-HpETE wird dann wiederum zügig von Gluthationperoxidasen zu 12S-HETE reduziert. Freie

12S-HETE wird zu 70-80% sekretiert. 12S-HETE kann jedoch auch zu 30% an die PL in der Membran verestert werden (O'Donnell et al., 2014).

#### **4. Bildung von membrangebundenem 12S-HETE-PL**

Zunächst wird das Oxilipin (z.B. 12-HETE) mit CoA acetyliert und anschließend von sn-2 Acyltransferasen innerhalb Minuten mit einem PL an den Membran-PL-Pool zu einem OxPL verestert (Lands Cycle). Hervorzuheben ist dabei, dass sich 12S-HETE-PL vorwiegend über Veresterung von neu gebildetem 12S-HETE bildet, anstatt über direkte Oxidation von membrangebundenem PL, wie es bei 15-LOX1 der Fall ist (Hajeyah et al., 2020). Diese Bildung von 12-HETE und Veresterung zu HETE-PLs ist bei Plättchen-Aktivierung eng miteinander gekoppelt. Dies führt dazu, dass exogen zugeführtes 12-HETE, anstelle von endogen produziertem 12-HETE, kaum an PL verestert wird (Thomas et al., 2010). Ebenfalls bei Aktivierung externalisieren Thrombozyten unter Beteiligung von Flippasen, Floppasen und Scramblasen PS, PE, 12S-HETE-PE und auch 12S-HETE-PC, was zu einer prokoagulatorischen, negativ geladenen Thrombozyten-Zell-Oberfläche führt. Daran können der Prothrombinase-Komplex (FXa/FVa) und Tenase-Komplex (FIXa/FVIIIa) besser binden und die Thrombusbildung einleiten (Thomas et al., 2010).



**Abbildung 3: Bildung von HETE-PL nach Thrombinaktivierung**

Beispielhafte Signalkaskade & vereinfachter Stoffwechselweg von HETE-PL nach Thrombinaktivierung. PAR: Protease-aktivierter Rezeptor, Gq: Gq-Protein, PLC: Phospholipase C, cPLA<sub>2</sub>: zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub>, MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, sPLA<sub>2</sub>: sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub>, AA: Arachidonsäure, PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PS: Phosphatidylserin, COX1: Cyclooxygenase-1, CYP450: Cytochrom P450, 12-LOX: 12-Lipoxygenase, PGH<sub>2</sub>: Prostaglandin H<sub>2</sub>, TxA<sub>2</sub>: Thromboxan, HpETE: Hydroperoxyeicosatetraensäure, HETE: Hydroxyeicosatetraensäure, EETs: Epoxyeicosatriensäure, GPX: Glutathionperoxidase, CoA: Coenzym A, EZ: Extrazellulärraum, IZ: Intrazellulärraum. (Yeung and Holinstat, 2011, Yeung et al., 2013, Thomas et al., 2010, Hajeyah et al., 2020, Jardin et al., 2008, Theofilis et al., 2022, Crescente et al., 2019, Protty et al., 2022, O'Donnell et al., 2014).

### Schlüssel-Enzym von 12-HETE: 12-LOX und dessen Inhibierung

Im Menschen befinden sich sechs verschiedene LOX-Gene in unterschiedlichen Geweben. In Plättchen befindet sich die vom ALOX12-Gen kodierte 12S-LOX. Diese befindet sich außerdem noch in glatten Muskelzellen der Gefäße und der Epidermis (Hajeyah et al., 2020). Als Substrate bevorzugt sie folgende Reihenfolge: DHA > EPA > AA (Kutzner et al., 2017). Alle LOX sind mit Membranen in einer Kalzium-abhängigen Weise assoziiert. Regulierung der 12-LOX könnte über eine Dimerisierung oder Substrat-(Suizid-)Inaktivierung erfolgen (Hajeyah et al., 2020).

Wichtige Informationen über die Funktion und physiologische Relevanz von 12-LOX sowie dessen Metabolite wie 12-HETE, liefern Untersuchungen mit einer Inhibierung dieses Enzyms. 12-LOX-Inhibierung durch zum Beispiel Esculetin (Cumarin-Derivat) oder Baicalein bewirkt eine Verminderung der Plättchen-Aggregation bei Aktivierung mit sowohl Thromboxan, Kollagen, Thrombin, als

auch „protease-activated receptors“ (PARs) (Yeung and Holinstat, 2011). Vor allem PAR4 scheint in enger Verbindung mit 12-LOX zu stehen. Deshalb kommt es bei 12-LOX-Inhibierung zu einer verminderten PAR4-abhängigen Thrombozytenaggregation, reduzierten Integrin-Aktivierung und geringeren Sekretion von Delta-Granula (Yeung et al., 2013). Delta-Granula enthalten ADP, ATP, Serotonin und Calcium. 12-LOX spielt eine zentrale Rolle bei dessen Sekretion, da bei 12-LOX-Inhibierung weder Thrombin, Kollagen, noch ADP zu einer Delta-Granula-Ausschüttung führt. Diese Inhibierung der Granula-Ausschüttung bei 12-LOX-Inhibierung gilt jedoch nur für Delta-Granula und nicht für  $\alpha$ -Granula (Yeung et al., 2013, Ambrosio and Di Pietro, 2017). 12-HETE allein führt zu keiner Agonist-vermittelten Delta-Granula-Sekretion, aber in Verbindung mit 12-LOX kann es diese erhöhen (Yeung et al., 2013). Dies konnte auch im Tiermodell bei 12-LOX<sup>-/-</sup> Mäusen mit einer Verlängerung der Blutungszeit bestätigt werden. Diese pathologische Blutungsneigung konnte mit einer Gabe von 12-HETE-PL Liposomen wieder normalisiert werden (Lauder et al., 2017). Ähnliches Phänomen konnte auch für das in Eosinophilen befindliche ALOX15-Gen und dessen 12/15-LOX Enzym mit dem Produkt von 15-HETE-PL nachgewiesen werden (Uderhardt et al., 2017). Die HETE-Lipoxine sind somit ein wichtiger Modulator der Hämostase und Plättchenfunktion mit zentraler Funktion der LOX-Enzyme.

12-LOX spielt noch bei weiteren Signalwegen eine zentrale Rolle. Es steht über 12-HETE in Verbindung mit der NADPH-Oxidase und ist damit beteiligt an der Bildung von ROS, was bis zur GPIIIa49–66 antikörperinduzierten Thrombozyten-Zellfragmentierung führen kann (Nardi et al., 2004). Außerdem wird vermutet, dass 12S-LOX über einen transzellulären Stoffwechselweg an Interaktionen zwischen zwei Zelltypen (z.B. Plättchen mit Endothelzellen oder Immunzellen) beteiligt ist (Hajeyah et al., 2020, Crescente et al., 2019). So können von 12-LOX hergestellte Epoxy-Resolvine in neutrophile Granulozyten transferiert werden, wo sie zu Maresinen umgewandelt werden und damit eine wichtige Rolle bei der Terminierung von akuten Entzündungsreaktionen haben (Abdulnour et al., 2014). Diese Übertragung von 12-LOX-Produkten kann jedoch auch negative Auswirkungen haben, wie im Zusammenhang mit Colon-Adenokarzinomen und der Belieferung dieser mit 12-HETE deutlich wird (Contursi et al., 2021).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass LOX-Enzyme eine zentrale Rolle bei der Generierung von Lipoxiden wie 12-HETE haben und damit bei wichtigen Prozessen wie Thrombose, Inflammation, Apoptose und Karzinogenese beteiligt sind.

## **1.6. Ziele der Arbeit**

Nachdem Harm et al. in seiner Studie zum Lipidom von ACS- vs. CCS-Patienten Hinweise auf einen Einfluss von Statinen auf das Lipidom entdeckte, soll dies mit dieser Arbeit genauer analysiert werden (Harm et al., 2022). Da es bisher weder Studien zur Auswirkung der Statine auf das thrombozytäre Lipidom, noch zu den meisten anderen Medikamenten gab, sollen zunächst die Lipidom-Auswirkungen der gesamten chronischen Medikation des KHK-Patienten-Kollektivs untersucht werden.

Anschließend soll anhand des Medikaments mit den signifikantesten Ergebnissen, den Statinen, eine Analyse verschiedener statistischer Tests und Methoden erfolgen, welche sowohl Offline-Programme wie JMP als auch online Plattformen wie MetaboAnalyst beinhalten. Ziel davon ist es, die verschiedenen Verfahren miteinander zu vergleichen und Empfehlungen für zukünftige Studien zu geben.

Ziel ist es außerdem, die auffälligsten Lipide aller Tests zusammenfassend zu betrachten und in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext einzuordnen. Diese Erkenntnisse sollen zum einen Erklärungsansätze mancher pleiotroper Effekte der Statine liefern und zum anderen helfen, den komplexen Lipid-Stoffwechsel in den Thrombozyten besser zu verstehen. Dies kann als Grundlage für weitere Studien zu diesem Thema mit dem Ziel einer risikoarmen Therapie der Atherosklerose, Entzündungshemmung und Plättchenhemmung dienen.

Des Weiteren soll die Clusteranalyse als nützliches Tool in der Metabolomics-Forschung angewendet werden und gezeigt werden, wie es sinnvoll in weitere Lipidom-Analysen integriert werden kann.

Daraus leiten sich konkret folgende Fragestellungen ab, welche in dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

- Wie funktioniert die Lipidomanalyse mit der Onlineplattform MetaboAnalyst im Vergleich zu herkömmlichen Statistikprogrammen (JMP)?
- Hat die chronische Medikation von KHK-Patienten Auswirkungen auf deren thrombozytäres Lipidom?
- Welche Ergebnisse liefern verschiedene statistische Tests bei der Analyse der Lipidomveränderungen durch Statin-Therapie?
- Ist die Lipidomveränderung durch Statin-Therapie dosisabhängig?
- Kann das Lipidom oder die Patienten anhand ihres statistischen Lipid-Verhaltens mittels Clusteranalyse sinnvoll gruppiert werden?
- Gibt es Patientencharakteristika mit besonders großem Einfluss auf die Clustereinteilung der Lipide?
- Gibt es auffällige Unterschiede oder Gemeinsamkeiten der Patienten mit besonders erhöhten oxidierten Phospholipiden?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patientenkollektiv

**Tabelle 3: Grundcharakteristika des Patientenkollektivs**

Statistische Auswertung der Daten der 105 Patienten aufgeteilt in die zwei Gruppen mit und ohne Statin-Behandlung. Signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$  sind in fetter Schrift hervorgehoben. MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, NSTEMI: Nicht-ST-Hebungsinfarkt, STEMI: ST-Hebungsinfarkt, CABG: Koronararterielle Bypass-Operation, GFR: Glomeruläre Filtrationsrate, ACE-Hemmer: Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer. Modifiziert aus (Harm et al., 2023).

	Alle (n=105)	Statin (n=70, 66.7%)	Kein Statin (n=35, 33.3%)	p-Value
Männlich, n (%)	77 (73,3)	53 (75,7)	24 (68,6)	0,435
Alter, Jahre (MW $\pm$ SD)	71,1 ( $\pm$ 10,7)	71,9 ( $\pm$ 10,5)	69,5 ( $\pm$ 10,9)	0,292
Body mass index (MW $\pm$ SD)	27,0 ( $\pm$ 4,4)	27,2 ( $\pm$ 4,2)	26,8 ( $\pm$ 4,7)	0,692
<b>Krankheit</b>				
Stabile Angina Pectoris, n (%)	60 (57,1)	42 (60)	18 (51,4)	0,403
Unstabile Angina Pectoris, n (%)	19 (18,1)	16 (22,9)	3 (8,6)	0,106
NSTEMI, n (%)	22 (21)	12 (17,1)	10 (28,6)	0,175
STEMI (%)	4 (3,8)	0 (0)	4 (11,4)	<b>0,011</b>
<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren</b>				
Arterielle Hypertonie, n (%)	85 (81)	58 (82,9)	27 (77,1)	0,482
Hyperlipidämie, n (%)	49 (46,7)	38 (54,3)	11 (31,4)	<b>0,027</b>
Diabetes mellitus, n (%)	29 (27,6)	24 (34,3)	5 (14,3)	<b>0,038</b>
Aktiver Raucherstatus, n (%)	19 (18,1)	13 (18,6)	6 (17,1)	1
Adipositas, n (%)	53 (50,5)	38 (54,3)	15 (42,9)	0,27
Vorhofflimmern, n (%)	24 (22,9)	16 (22,9)	8 (22,9)	1
Zustand nach CABG, n (%)	11 (10,5)	10 (14,3)	1 (2,9)	0,095
Zustand nach Herzinfarkt, n (%)	21 (20)	19 (27,1)	2 (5,7)	<b>0,01</b>
Nierenfunktion (GFR) (MW $\pm$ SD)	72,4 ( $\pm$ 29,3)	71,2 ( $\pm$ 23,9)	74,7 ( $\pm$ 37,7)	0,51
<b>Medikation bei Aufnahme</b>				
Acetylsalicylsäure, n (%)	53 (50,5)	42 (60)	11 (31,4)	<b>0,006</b>
P2Y12-Inhibitor insgesamt	27 (25,7)	24 (34,3)	3 (8,6)	<b>0,004</b>
Clopidogrel, n (%)	12 (11,4)	11 (15,7)	1 (2,9)	0,058
Ticagrelor, n (%)	12 (11,4)	10 (14,3)	2 (5,7)	0,329
Prasugrel, n (%)	3 (2,9)	3 (4,3)	0 (0)	0,549
Orale Antikoagulation, n (%)	27 (25,7)	22 (31,4)	5 (14,3)	0,063
ACE-Hemmer, n (%)	55 (52,4)	40 (57,1)	15 (42,9)	0,167
Calciumkanalblocker, n (%)	30 (28,6)	23 (32,9)	7 (20)	0,252
$\beta$ -Blocker, n (%)	72 (68,6)	53 (75,7)	19 (54,3)	<b>0,026</b>
Diuretika	41 (39)	35 (50)	6 (17,1)	<b>0,001</b>
Statin insgesamt, n (%)	70 (66,7)	70 (100)	0 (0)	-
Atorvastatin, n (%)	49 (46,7)	49 (70)	0 (0)	-
Simvastatin, n (%)	19 (18,1)	19 (27,1)	0 (0)	-
<b>Lipidprofil-Parameter</b>				
LDL-Cholesterin (MG/dL) (MW $\pm$ SD)	96,5 ( $\pm$ 34,5)	89,0 ( $\pm$ 31,3)	113,6 ( $\pm$ 35,3)	<b>0,002</b>
HDL-Cholesterin (mg/dL) (MW $\pm$ SD)	48,6 ( $\pm$ 17,5)	46,5 ( $\pm$ 16,5)	53,5 ( $\pm$ 18,7)	0,078
Triglyceride (mg/dL) (MW $\pm$ SD)	145,2 ( $\pm$ 84,6)	147,2 ( $\pm$ 77)	140,6 ( $\pm$ 99,5)	0,197
Cholesterin insg. (mg/mL) (MW $\pm$ SD)	161,3 ( $\pm$ 45,6)	150,2 ( $\pm$ 43,1)	186,8 ( $\pm$ 40,6)	<b>0,001</b>
<b>Thrombozyten</b>				
Thrombozytenanzahl ( $10^6/l$ ) (MW $\pm$ SD)	235,8 ( $\pm$ 75,5)	227,4 ( $\pm$ 70,9)	252,7 ( $\pm$ 81,3)	0,338



Das Kollektiv dieser Studie besteht aus 105 Patienten, welche im Zeitraum von Februar bis Mai 2017 aufgrund einer symptomatischen KHK im Universitätsklinikum Tübingen in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie aufgenommen wurden. Alle Patienten wurden durch den diensthabenden Arzt über die Studie aufgeklärt und deren Einverständniserklärung im Sinne des Informed Consent eingeholt. Das Studienprotokoll wurde durch die Tübinger Ethikkommission genehmigt (270/2011B01) und erfüllte die Bestimmungen der Erklärung von Helsinki. Alle Patienten unterliefen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Klinikaufnahme angiografischen Untersuchungen im Herzkatheterlabor. Die Entnahme arteriellen Vollblutes erfolgte im Herzkatheterlabor vor der Gabe des Heparin-Loadings und vor Stent-Implantierung. Außerdem wurden die weiteren oben aufgeführten klinischen Parameter erfasst. Neben den biographischen Parametern wurden die kardiovaskulären Risikofaktoren, die Medikation, wichtige kardiovaskuläre Laborparameter und ein Lipid-Profil erhoben.

Die statistische Auswertung der Daten der 105 Patienten erfolgte mit IBM® SPSS® Statistics für Windows, Version 26 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). Für die weitere Analyse wurde das Kollektiv in eine Gruppe mit Statin-Behandlung (n=70) und eine Gruppe ohne Statin-Behandlung (n=35) eingeteilt (**Tabelle 3**). Kontinuierliche und normalverteilte Daten wurden mit dem Student's t-Test analysiert. Die Mittelwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Kontinuierliche und nicht-normalverteilte Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Nominale und normalverteilte Daten mit einer Patientenzahl (n) über zehn wurden mit dem Chi-Quadrat-Test und Daten mit n unter zehn mit dem exakten Test von Fisher verglichen. Signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$  sind in fetter Schrift hervorgehoben.

## **2.2. Lipidomics-Analyse der Thrombozyten**

Zunächst wurden die Thrombozyten aus dem arteriellen Vollblut isoliert. Bevor die Lipidextraktion nach standardisiertem Protokoll mit 2-propanol/Wasser 90:10,

(v/v) durchgeführt wurde, wurden zwei interne Standardproben hinzugegeben (100 ng/mg Arachidonsäure-d8, sowie 300 ng/mL C18 Cermaide-d7(d18:1-18:0)). Danach wurden die extrahierten Lipide in drei verschiedenen Batches mittels non-targeted Kombinationsassay aus Massenspektrometrie und Liquid-Chromatographie (UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS) analysiert. Eine datenunabhängige Erfassung mit schrittweiser Fenstererfassung der MS/MS-Spektren (SWATH) wurde im Positiven- als auch im Negativen-Ionen-Modus durchgeführt. Die dadurch erhaltenen Peaks einzelner Lipide wurden anschließend durch Multiquant, einer MS-Dial-Software, aufbereitet (Peak-Auswahl und Ausrichtung) und unter Abgleich mit der LipidBlast-Datenbank identifiziert und verifiziert. Um die drei verschiedenen Batches in einer Datenbank zu vereinen, wurden basierend auf den Referenz-Peak-Tabellen von jedem MS-DIAL-Batch individuelle Peak-Tabellen erstellt. Abschließend wurden die beiden Normalisierungen „systematic error removal using random forrest“ (SERRF) und „removal of unwanted variation“ (RUVrandom) in RStudio (RStudio Inc., Boston, MA, USA) durchgeführt. Für die Klassifizierung der Lipide wurden Lipid-Maps verwendet und die grafische Kategorisierung erfolgte mit OmniGraffle 7.12 (The Omni Group, Seattle, WA, USA). Nach diesem oben beschriebenen Aufbereitungs-Prozess der thrombozytären Lipide und Reinigungsprozess nichtverifizierbarer Signale, verblieben 928 Lipide und 105 Patienten, mit welchen die weiterführenden Analysen durchgeführt worden sind.

### **2.3. Statistische Lipidomics-Analyse**

Die statistische Auswertung der Lipidomics-Daten erfolgte zum einen mittels der Software JMP® Version 15.2.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) und zum anderen mit MetaboAnalyst 5.0. Mit ihren täglich rund 2000 Nutzern, ist dies eine der am meisten benutzten, online frei zugänglichen Plattformen in der Metabolomics-Forschung (Pang et al., 2022). Die mit dem Statistikprogramm "R" arbeitende Plattform bietet eine Reihe von Tools für die Metabolomic-Datenanalyse (Pang et al., 2021). Die Datentabelle der 105 Patienten aufgeteilt in die zwei Gruppen mit und ohne Statin-Behandlung und den dazugehörigen Peak-Intensitäten der 928 Lipide wurde zunächst in eine „.txt“ Datei

umgewandelt. Anschließend wurde sie zusammen mit den Einstellungen „Peak intensities“ und „Sample in rows (unpaired)“ auf Metabo-Analyst (<https://www.metaboanalyst.ca>; aufgerufen am 29.03.2021) hochgeladen. Anschließend erfolgte die Datenprozessierung mit Filterung und Normalisierung. Die hierfür optimalen Einstellungen wurden im Rahmen dieser Arbeit analysiert und war wie folgt: Normalisierung nach Median, Auto-Skalierung und keine Filterung. Dies sind auch die Einstellungen, welche für den Beispieldatensatz in Nature Protocols (Pang et al., 2022) empfohlen wurden. Danach folgte die Auswertung mit folgenden Tools auf der MetaboAnalyst-Plattform: Fold Change, t-Test, Volcano-Plot, PatternHunter, Heatmap und PLS-DA.

**Normalisierung & Filterung:** Datenprozessierung ist der erste Schritt auf MetaboAnalyst. Um die für diese Arbeit geeignetste Einstellung zu bestimmen, wurden Volcano-Plots vom Statin-Kollektiv mit den verschiedenen Normalisierungs- und Filterungs-Einstellungen erstellt und die Anzahl der signifikanten Ergebnisse miteinander verglichen. Der Fold Change wurde auf 1,5 und 2 gesetzt. Der t-Test fand mit und ohne FDR-Korrektur statt und hatte den Grenzwert  $p < 0,05$ . Die Volcano-Plots wurden nach weiter unten beschriebener Vorgehensweise erstellt und hatten die Einstellungen  $p < 0,05$  und Fold Change 1,5.

**Volcano-Plots & Fold Change:** Um signifikant veränderte Lipide zwischen den behandelten und unbehandelten Gruppen zu finden, wurden Volcano-Plots erstellt. Zum einen wurde ein Volcano-Plot mit JMP® erstellt und zum anderen, für eine Bestätigung und Vergleich der verschiedenen Analysemethoden, mit MetaboAnalyst.

JMP®: Die Quotienten der durchschnittlichen Peak-Intensitäten (Fold Change) der beiden Gruppen wurden gegen die mit SGoF korrigierten p-values einer *one-way analysis of variance* (ANOVA) aufgetragen und signifikante Lipide beschriftet. Die FDR-Korrektur wurde durchgeführt, um bei großen Datensätzen mit multiplem Testen die falsch-positiven Fehler (Alpha-Fehler) so gering wie möglich zu halten. Verwendet wurde dafür die *Sequential-Goodness-of-Fit-Methode* (SGoF) des Programmes Myriads (Myriads – Free Software Foundation Inc., Boston, MA, USA) und der Testgrenze für Alpha < 5% ( $p < 0,05$ ). Diese

Methode der Korrektur für multiples Testen eignet sich besonders gut für mehrdimensionale, biologische, große Datensätze und hat im Vergleich zu anderen FDR-Korrekturen eine steigende Power mit steigender Anzahl an Tests (Carvajal-Rodríguez et al., 2009).

**MetaboAnalyst:** Der Datensatz wurde wie oben beschrieben hochgeladen. Die Einstellungen des Volcano-Plots waren *Fold Change* 1,5, *direction of comparison* 1/0 (behandelt vs. unbehandelt), *non-parametric test* wurde nicht ausgewählt, der *p-value threshold* wurde auf 0,05 mit *FDR*-Korrektur gewählt und die *group variance* war *equal*. Die *FDR*-Korrektur auf MetaboAnalyst ist die Methode nach Benjamini-Hochberg (Andrade, 2019). Der *Fold Change* wurde äquivalent dazu mit der entsprechenden Funktion und den gleichen Einstellungen durchgeführt. Lediglich der *Fold-Change-Grenzwert* wurde auf 2 angehoben.

**PatternHunter:** Die *PatternHunter* oder *PatternSearch*-Funktion von MetaboAnalyst kann dafür benutzt werden Lipide zu identifizieren, welche sich nach einem bestimmten Muster verhalten. Dieses Muster kann ebenfalls ein bestimmtes Lipid sein oder ein vorgegebenes Zahlenmuster (z.B. 1-2-3-4). In dieser Analyse wurde das aufsteigende Zahlenmuster verwendet, um Lipide zu identifizieren, welche mit steigender Statindosis ebenfalls ansteigen. Pearson  $r$  wurde als Analyseverfahren gewählt.

**Heatmap:** Die Heatmap eignet sich sehr gut zum Zusammenfassen von Unterscheidungsmustern und dem visuellen Darstellen von Unterschieden in den Features, in diesem Fall Lipide. Auf der MetaboAnalyst-Plattform wurde dafür die „hclust“ Funktion im „stat“ Paket von R verwendet. Die hierarchische Clusteranalyse wurde mit zwei Methoden berechnet. Zum einen, dem Maß der Gleichheit, der euklidische Abstand und zum anderen der Cluster-Algorithmus nach der Ward-Methode, welche versucht die Summe der Quadrate zwischen zwei Cluster zu minimieren (Murtagh and Legendre, 2014). Es wurden die, wie oben beschriebenen, normalisierten Daten mit Autoskalierung verwendet. Außerdem wurde ausgewählt die Proben nicht zu clustern, um die Aufteilung der Daten-Tabelle in Statin behandelt und unbehandelt beizubehalten. Die top 25 Ergebnisse wurden mittels t-Test beziehungsweise ANOVA bestimmt.

**PLS-DA:** Die „partial least squares-discriminant analysis“ (PLS-DA) gehört zur multivariaten Datenanalyse und ist eine Form der Dimensionsreduktion, welche zum Erstellen von Modellen der Vorhersage und des Beschreibens benutzt wird (Ruiz-Perez et al., 2020). In dieser Arbeit wurde die PLS-DA mit MetaboAnalyst 5.0 durchgeführt. Für die PLS-Regression wurde dort die „pls“-Funktion von dem R Paket „pls“ verwendet (Mevik, 2007). Die Klassifikation und Kreuzvalidierung wurden unter Verwendung der entsprechenden „wrapper“-Funktion des „caret“ Paketes von R ausgeführt (Williams, 2008). Um die Performance der Separierungsfähigkeit der Modelle zu bestimmen, wurde ein Permutations-Test durchgeführt. Bei jeder Permutation wurde ein PLS-DA-Modell zwischen den Daten und der optimalen Anzahl von Komponenten erstellt und in folgenden Parametern gemessen (Gabrielle Nepomuceno, 2021):

- **Klassifikations-Genauigkeit:** Basierend auf Vorhersage-Genauigkeit
- **R<sup>2</sup>:** „Goodness of fit“ (= erklärte Abweichung), berechnet mit dem Verhältnis zwischen der „between group sum of squares“ (= Summe der Quadrate zwischen den Gruppen) und der „within group sum of squares“ (= Summe der Quadrate innerhalb der Gruppen).
- **Q<sup>2</sup>:** „Goodness of prediction“ (= vorausgesagte Abweichung), berechnet durch Kreuzvalidierung, indem in jeder Runde die vorausgesagten Daten mit den Originaldaten verglichen werden und dann die Summe der Standardabweichungen von allen Proben berechnet wird (= PRESS; Predicted Residual Sum of Squares). Desto höher Q<sup>2</sup>, desto bessere Vorhersagekraft hat das Modell (Werte über Q<sup>2</sup> > 0,45 haben eine gute Vorhersagekraft für biologische Proben). Negative Werte bedeuten keine Vorhersagekraft.

## 2.4. Lipid-Clusteranalyse

Mit dem Ziel Lipide, welche sich ähnlich verhalten, zu identifizieren und gemeinsame Gruppen zu bilden, wurde die Clusteranalyse von JMP verwendet. Dabei wurden zwei verschiedene Clusteranalyse-Methoden verwendet: Das „Variable Clustering“ und das „Hierarchical Clustering“. Je nachdem, wie man die

Daten in der Tabelle anordnet, kann man mit den zwei Analysemethoden entweder die Patienten oder die Lipide anhand ihres Verhaltens analysieren und in Cluster einteilen lassen. Die zwei Anordnungen der Daten in der Tabelle sind wie folgt:

1. Die Lipide in den Reihen von oben nach unten und die Patienten in den Spalten von links nach rechts
2. Die Patienten in den Reihen von oben nach unten und die Lipide in den Spalten von links nach rechts.

Die nachfolgende **Tabelle 4** fasst die zwei verwendeten Möglichkeiten des Clusters mit JMP zusammen und gibt einen Ausblick über die damit möglichen Ergebnisse.

**Tabelle 4: Übersicht JMP Cluster Analyse**

Anordnung der Daten in der Tabelle	Variable Clustering	Hierarchical Clustering
<b>Lipide in Reihen (von oben nach unten)</b>	Alle 105 Patienten eingeteilt in 23 Cluster	Alle 928 Lipide in gewünschte Anzahl an Cluster mit Dendrogramm, Constellation Plot, ... → Abbildung 17
<b>Patienten in Reihen (von oben nach unten)</b>	Alle 928 Lipide in 124 Cluster → Tabelle 15 & Tabelle 16	Alle 105 Patienten in gewünschte Anzahl an Cluster mit Dendrogramm, Constellation Plot, ... → Abbildung 18

Aufgrund der Möglichkeit, eine gewünschte Anzahl an Cluster zu bilden, ist das „Hierarchical Clustering“ besonders interessant. Dieses wurde mit der Varianzanalyse-Methode nach Ward durchgeführt. Die gebildeten Lipidcluster wurden anhand ihrer Lipidzusammensetzung untersucht. Die Patientencluster wurden auf Gemeinsamkeiten hinsichtlich Patienten-Charakteristika, wichtige Laborparameter, Medikation und CAD-Diagnose untersucht. Bei nominalen Daten wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet und das Ergebnis mit Mosaik-Plots visualisiert. Bei metrischen Daten wurde eine ANOVA durchgeführt. Um die Ergebnisse der ANOVA zu validieren, wurden sie mit einem Quantil-Quantil-Diagramm in JMP auf Normalverteilung geprüft.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs

Aus der deskriptiven Statistik der Grundcharakteristika des Patientenkollektivs (**Tabelle 3**) lassen sich folgende Beobachtungen bezüglich der signifikanten Unterschiede der Patienten mit Statin-Medikation im Vergleich zu den Patienten ohne Statin-Medikation aufstellen:

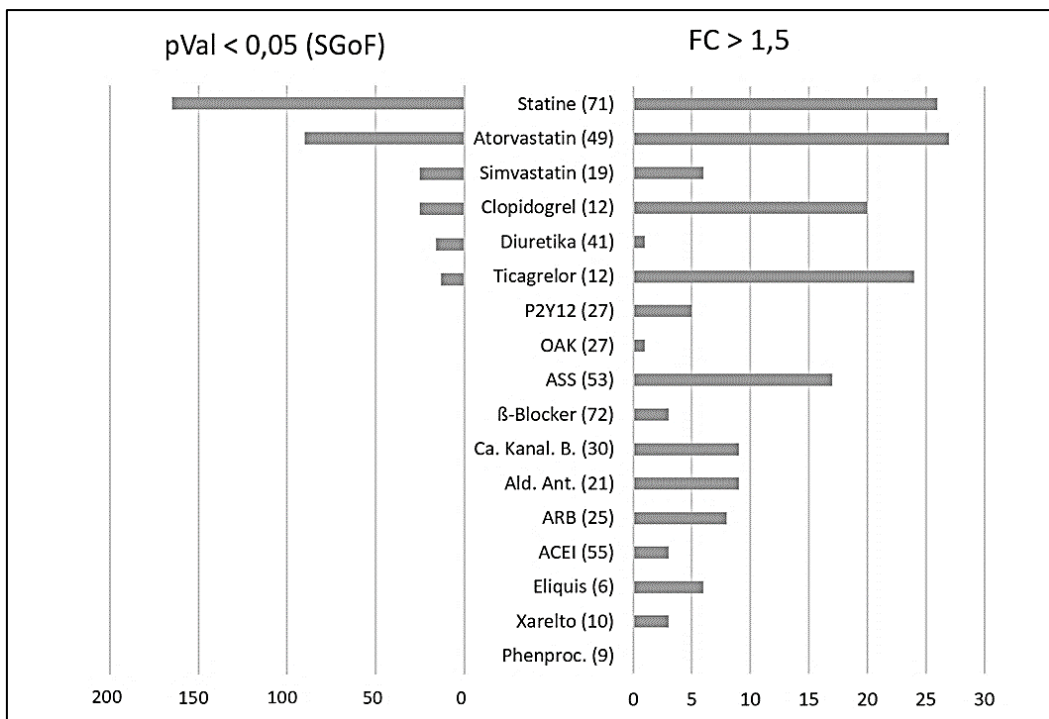
- Alle 4 Patienten, die einen **STEMI** hatten, hatten keine Statintherapie
- Patienten mit Statinen haben eher **Hyperlipidämie & Diabetes**
- Patienten, welche bereits einen **Myokardinfarkt (MI)** hatten, haben eher eine Statintherapie
- Häufige Komedikation mit Statinen ist **ASS, P2Y12-Inhibitoren,  $\beta$ -Blocker** und **Diuretika**
- **LDL** und **Cholesterol** ist höher in der Gruppe ohne Statin-Medikation

#### 3.2. Einflüsse der chronischen Medikation auf das Lipidom

Um die Frage zu beantworten, ob die chronische Medikation einen Einfluss auf das thrombozytäre Lipidom hat, wurden Volcano-Plots zu jedem Medikament erstellt. Aufgrund zu geringer Patientenzahl ( $n < 5$ ) wurden Ezetimib, Prasugrel und Pradaxa nicht betrachtet.

Volcano-Plots sind eine gängige Methode in der Omics-Forschung, um schnell Veränderungen in großen Datensätzen zu identifizieren. Denn dargestellt wird nicht nur die Signifikanz (mit one-way ANOVA) auf der y-Achse, sondern auch die Größe der Unterschiede auf der x-Achse (mit Fold Change). Die Ergebnisse der mit JMP erstellten Volcano-Plots wurden in **Abbildung 4** vergleichend zusammengefasst. Die Zahlen in Klammern hinter den Medikamenten stehen für die Anzahl der behandelten Personen des Gesamtkollektivs. Eindeutig zu erkennen ist, dass sich die Statintherapie und dessen Untergruppe Atorvastatin von den anderen Medikamenten abhebt. Vor allem in Betrachtung der Anzahl der signifikanten Unterschiede, aber auch in Anbetracht der Stärke des Unterschiedes, sprich dem Fold-Change. Außerdem

hervorzuheben sind die Ergebnisse bei den P2Y12-Inhibitoren Clopidogrel und Ticagrelor. Diese haben weniger signifikante Ergebnisse, aber eine gute Stärke. Jedoch, aufgrund den weniger signifikanten Ergebnisse im Vergleich zu den Statinen, wurden im Folgenden für weitere Analysen das Statin-Kollektiv untersucht. Für zukünftige Studien wäre es interessant zu betrachten, ob eindeutigere Ergebnisse der P2Y12-Inhibitoren bei einem größeren Patientenkollektiven erreicht werden können.



**Abbildung 4: Übersicht der Anzahl signifikanter Lipide bei jeweiliger Medikation**

Dargestellt ist die Zusammenfassung der Anzahl an signifikanten Ergebnissen der mit JMP erstellten Volcano-Plots bei jeweiliger Betrachtung der Medikation (behandelt/ unbehandelt). Balken nach links repräsentieren die Signifikanz, also die Anzahl der Lipide über dem Schwellenwert von  $y > 1,3$  ( $p < 0,05$ ) des Ergebnisses der ANOVA und nach SGoF-Multiplem-Testen-Korrektur. Die Balken nach rechts stehen für den Fold Change, also die Stärke der Unterschiede beider Gruppen, mit der Anzahl an Lipiden über dem Schwellenwert von  $x > 1,5$ . Die y-Achse zeigt die verschiedenen Medikamente mit der Anzahl der behandelten Patienten in Klammern. OAK: Orale Antikoagulantien, ASS: Acetylsalicylsäure, Ca. Kanal. B.: Calciumkanalblocker, Ald. Ant.: Aldosteronantagonisten, ARB: Angiotensin-II-Rezeptorblocker, ACEI: Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren, Phenproc.: Phenprocoumon



### 3.3. Statin-Medikation verändert das thrombozytäre Lipidom

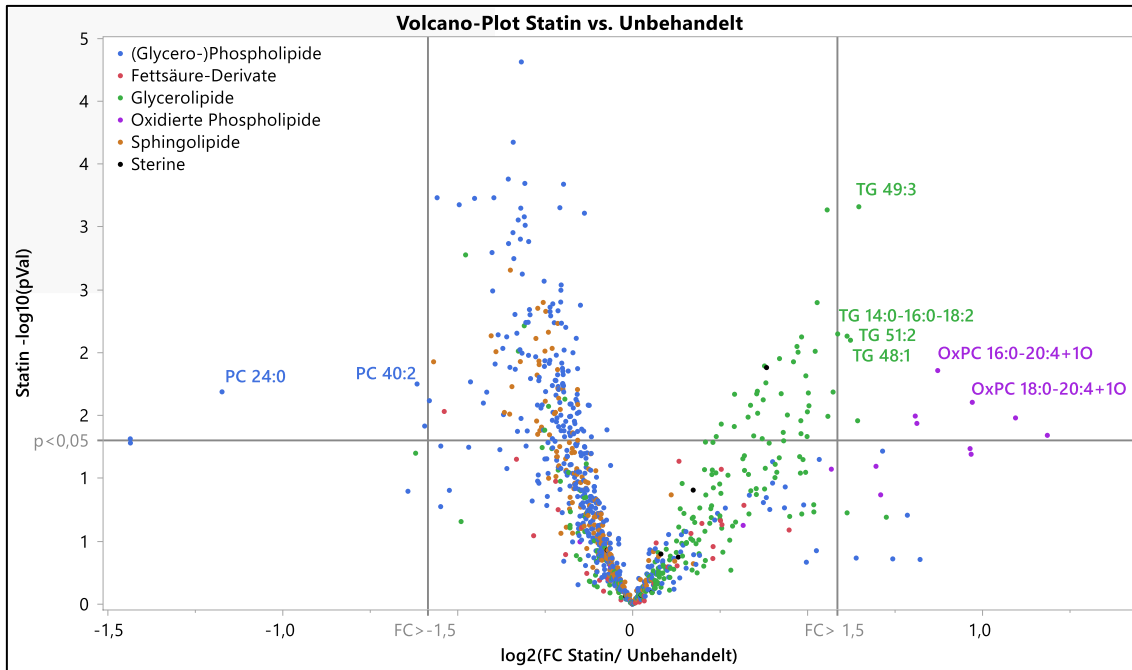
#### 3.3.1. Volcano-Plot des Einflusses der Statin-Medikation

In dem Volcano-Plot (**Abbildung 5**), welches veränderte Lipide bei den 70 Patienten mit Statintherapie im Vergleich zu den 35 Patienten ohne Statintherapie darstellt, wurden 165 Lipide nach SGoF Multiples-Testen-Korrektur als signifikant herausgefiltert. 136 davon waren im mit Statinen behandeltem Kollektiv herunterreguliert und 29 hochreguliert.

Die herabregulierten Lipide gehörten zum Großteil den langkettigen, gesättigten PC, PE und Ceramiden an.

Unter den heraufregulierten Lipiden hingegen lassen sich vorwiegend sehr langkettige PUFA TG und langkettige, gesättigte oxPC finden.

Von diesen 165 signifikanten Lipiden hatten 8 Lipide einen Fold Change von über 1,5. Im Volcano-Plot wurden diese signifikanten Lipide ( $p < 0,05$ ) nach SGoF-FDR-Korrektur und mit einem Fold Change von über 1,5 beschriftet. Genauere Informationen zu den Namen, den Fold Changes und p-values der sechs hochregulierten und zwei runterregulierten Lipide sind **Tabelle 5** zu entnehmen. Im Volcano-Plot werden die hochregulierten Lipide rechts der y-Achse dargestellt (positiver Fold Change) und die herunterregulierten Lipide links (negativer Fold Change). Ein x-Wert von 1 bedeutet, dass die durchschnittliche Peak-Intensität des Lipides in der mit Statinen behandelten Gruppe doppelt so hoch ist, als in der unbehandelten Gruppe.



**Abbildung 5: Volcano-Plot der Lipidomveränderungen durch Statine**

Die x-Achse gibt den Logarithmus zur Basis 2 des Fold Changes (FC) der Lipid-Peak-Intensitäten (statinbehandelt/ unbehandelt) an. Positive FC-Werte (rechts) bedeuten eine Hochregulierung und negative FC-Werte (links) eine Runterregulierung. Die y-Achse zeigt den negativen Logarithmus zur Basis 10 der p-values der one-way ANOVA. Der Grenzwert für signifikante Lipide ist 1,3 ( $p < 0,05$ ). Der Grenzwert des Fold Changes ist 1,5 ( $\text{Log}_2(1,5) = 0,585$ ). Beschriftet sind signifikante Lipide nach SGoF-FDR-Filterung (Carvajal-Rodriguez et al., 2009);  $p < 0,05$ , FDR <5%.

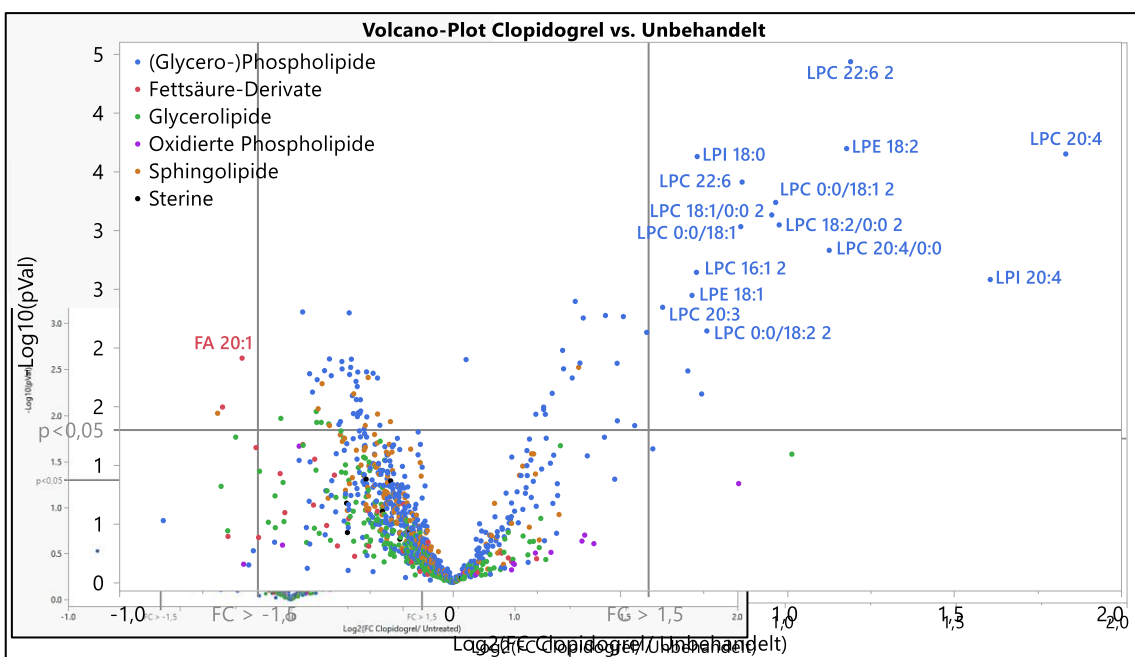
**Tabelle 5: Signifikant veränderte Lipide bei Statin-Behandlung**

Die am meisten hoch-/ runterregulierten und nach SGoF-FDR-Korrektur signifikanten ( $p < 0,05$ ) Lipide mit Fold Change (FC) über 1,5. Sortiert absteigend nach FC. Die Färbung des FC bezieht sich auf die Hoch- (rot) bzw. Runterregulierung (blau).

Log2(FC)	P-Value	N°	Hauptgruppe	Klasse	Lipidname
0.971	0.025	900	Oxidierte Phospholipide	OxPC	OxPC 18:0-20:4+10 = OxPC(18:0/12-HETE)
0.872	0.014	863	Oxidierte Phospholipide	OxPC	OxPC 16:0-20:4+10 = OxPC(16:0/12-HETE)
0.647	0.001	421	Glycerolipide	TG	TG 49:3
0.623	0.008	395	Glycerolipide	TG	TG 48:1
0.613	0.007	491	Glycerolipide	TG	TG 51:2
0.586	0.007	390	Glycerolipide	TG	TG 14:0-16:0-18:2
-0.616	0.018	922	(Glycero-)Phospholipide	PC	PC 40:2
-1.173	0.020	90	(Glycero-)Phospholipide	PC	PC 24:0

### 3.3.2. Volcano-Plot des Einflusses der P2Y12-Inhibitor-Medikation

Analog zu dem Volcano-Plot der Statine wurden ebenfalls Volcano-Plots zu den P2Y12-Inhibitoren Clopidogrel und Ticagrelor erstellt. Unter den 105 Patienten nahmen jeweils 12 Patienten Clopidogrel und 12 Patienten Ticagrelor. Clopidogrel-Medikation hatte nach SGoF-FDR-Filterung 25 signifikante Lipide und 16 davon mit einem Fold Change (FC) von über 1,5. Diese sind vorwiegend LCFA, PUFA LPC. Ticagrelor hatte nach SGoF-FDR-Filterung 13 signifikante Lipide und 5 davon mit einem Fold Change von über 1,5. Jedoch waren dies, anders als bei Clopidogrel, vor allem VLCFA und LCFA, PUFA TG.



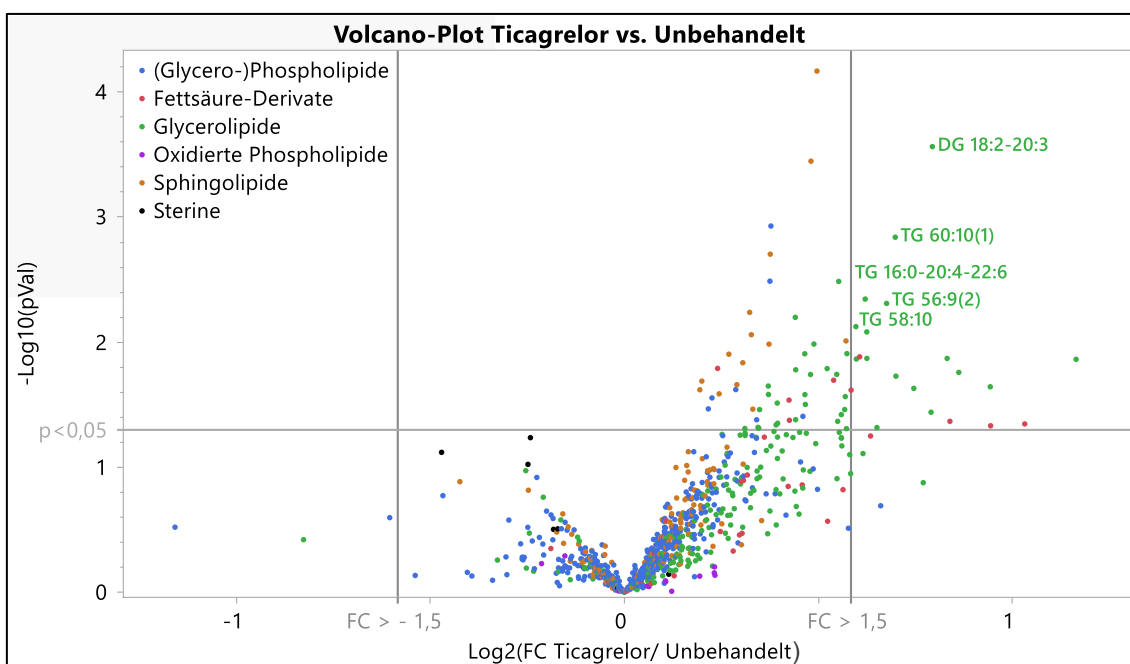
**Abbildung 6: Volcano-Plot der Lipidomveränderungen durch Clopidogrel**

Die x-Achse gibt den Logarithmus zur Basis 2 des Fold Changes (FC) der Lipid-Peak-Intensitäten (clopidogrelbehandelt/ unbehandelt) an. Die y-Achse zeigt den negativen Logarithmus zur Basis 10 der p-values der one-way ANOVA. 12 Patienten waren mit und 93 Patienten ohne Clopidogrel-Medikation. Der Grenzwert für signifikante Lipide ist 1,3 ( $p < 0,05$ ). Der Grenzwert des FC ist 1,5. Beschriftet sind signifikante Lipide nach SGoF-FDR-Filterung;  $p < 0,05$ ,  $FDR < 5\%$ .

**Tabelle 6: Signifikant veränderte Lipide bei Clopidogrel-Behandlung**

Die am meisten hoch-/ runterregulierten und nach SGoF-FDR-Korrektur signifikanten ( $p < 0,05$ ) Lipide mit Fold Change (FC) über 1,5. Sortiert absteigend nach FC. Die Färbung des FC bezieht sich auf die Hoch- (rot) bzw. Runterregulierung (blau).

Log2(FC)	P-Value	N°	Hauptgruppe	Klasse	Lipidname
1.833	0.000	696	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 20:4
1.607	0.003	707	(Glycero-)Phospholipide	LPI	LPI 20:4
1.189	0.000	704	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 22:6
1.177	0.000	674	(Glycero-)Phospholipide	LPE	LPE 18:2
1.125	0.001	52	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 20:4/0:0
0.975	0.001	689	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 18:2/0:0
0.964	0.001	690	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 0:0/18:1
0.953	0.001	691	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 18:1/0:0
0.864	0.000	64	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 22:6
0.860	0.001	37	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 0:0/18:1
0.758	0.007	688	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 0:0/18:2
0.729	0.000	702	(Glycero-)Phospholipide	LPI	LPI 18:0
0.727	0.002	683	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 16:1
0.714	0.004	675	(Glycero-)Phospholipide	LPE	LPE 18:1
0.626	0.005	697	(Glycero-)Phospholipide	LPC	LPC 20:3
-0.633	0.012	668	Fettsäure-Derivate	FA	FA 20:1



**Abbildung 7: Volcano-Plot der Lipidomveränderungen durch Ticagrelor**

Die x-Achse gibt den Logarithmus zur Basis 2 des Fold Changes (FC) der Lipid-Peak-Intensitäten (ticagrelorbehandelt/ unbehandelt) an. Die y-Achse zeigt den negativen Logarithmus zur Basis 10 der p-values der one-way ANOVA. 12 Patienten waren mit und 93 Patienten ohne Ticagrelor-Medikation. Der Grenzwert für signifikante Lipide ist 1,3 ( $p < 0,05$ ). Der Grenzwert des Fold Changes ist 1,5. Beschriftet sind signifikante Lipide nach SGoF-FDR-Filterung;  $p < 0,05$ ,  $FDR < 5\%$ .

### **Tabelle 7: Signifikant veränderte Lipide bei Ticagrelor-Behandlung**

Die am meisten hoch-/ runterregulierten und nach SGoF-FDR-Korrektur signifikanten ( $p < 0,05$ ) Lipide mit Fold Change (FC) über 1,5. Sortiert absteigend nach FC. Die Färbung des FC bezieht sich auf die Hochregulierung (rot).

Log2(FC)	P-Value	N°	Hauptgruppe	Klasse	Lipidname
0.793	0.000	118	Glycerolipide	DG	DG 18:2-20:3
0.698	0.001	645	Glycerolipide	TG	TG 60:10(1)
0.675	0.005	576	Glycerolipide	TG	TG 56:9(2)
0.620	0.005	615	Glycerolipide	TG	TG 16:0-20:4-22:6
0.596	0.008	616	Glycerolipide	TG	TG 58:10

### **3.4. Lipidomanalyse mit der online Plattform MetaboAnalyst**

Weitere Analysen erfolgten mit MetaboAnalyst 5.0. Die Verwendung der Plattform im Rahmen dieser Arbeit erfolgte unter anderem, um die Ergebnisse der obigen Volcano-Plots, welche mit JMP erstellt wurden, zu verifizieren und außerdem, um diese in der Metabolomics-Forschung gängigen Plattform vergleichend zu den herkömmlichen Statistikprogrammen wie JMP kennenzulernen.

#### **3.4.1. Bestimmung der geeignetsten Methode zur Datenprozessierung bei MetaboAnalyst**

Die Datenprozessierung auf MetaboAnalyst besteht aus Daten-Normalisierung und aus Daten-Filterung. Um die für diese Arbeit geeignetste Einstellung zu bestimmen, wurden Volcano-Plots vom Statin-Kollektiv mit den jeweiligen Einstellungen erstellt und die Anzahl der signifikanten Ergebnisse miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 8** und **Tabelle 9** dargestellt

#### **Daten-Normalisierung**

Für die Analyse der besten Normalisierung wurde keine Daten-Filterung verwendet. Die Normalisierung wird nochmal unterteilt in Normalisierung, Transformation und Skalierung. Das beste Resultat wurde erreicht bei einer Normalisierung „nach Median“, keiner Transformation und mit „Auto-Skalierung“. Zwar hatte das Skalieren auf die Anzahl der signifikanten Ergebnisse keinen Einfluss, aber bei der visuellen Darstellung mit Box-Plots eine

eindeutige Verbesserung. Das Ergebnis dieser Einstellungen ist vor allem bei den signifikanten Lipiden im t-Test nach FDR-Korrektur bemerkenswert. Hier wurde eine Steigerung von einem (1) signifikanten Lipid ohne Prozessierung auf 37 signifikante Lipide ( $p < 0,5$ ) erreicht. Aufgrund der Minderung von Extremwerten gab es dadurch erwartungsgemäß jedoch auch geringe Einbußen beim Fold Change mit einem Rückgang von 34 Lipiden ohne Normalisierung auf 32 Lipide mit Normalisierung (bei einem Schwellenwert von 1,5).

**Tabelle 8: Übersicht Ergebnisse der Daten-Normalisierung mit MetaboAnalyst**

Dargestellt ist die Art der Normalisierung und die Anzahl der signifikanten Lipide bei den jeweiligen Tests. Schwellenwerte beim Fold Change waren 1,5 und 2. FDR: Mit Benjamini-Hochberg Korrektur der Falscherkennungsrate (FDR). Eine Verbesserung zum Ergebnis ohne Normalisierung: Grüner Farbverlauf; eine Verschlechterung: Rötlicher Farbverlauf

Methode	Fold Change		t-Test ( $p < 0,05$ )		Volcano-Plot ( $p < 0,05$ & $FC > 1,5$ )	
	1,5	2	OHNE	FDR	OHNE	FDR
<b>KEINE Normalisierung</b>	34	8	203	1	19	0
<b>Normalisierung</b>						
...nach Summe	29	5	207	32	14	5
...nach Median	32	6	204	37	16	5
...nach Quantilen	18	2	183	10	11	2
<b>Transformierung</b>						
...Logarithmisch	34	8	131	0	12	0
...Kubikwurzel	34	8	182	1	14	0
<b>Skalierung</b>						
...Durchschnitt-Zentriert	34	8	203	1	19	0
...Auto-Skaliert	34	8	203	1	19	0
...Pareto-Skaliert	34	8	203	1	19	0
...Bereich-Skaliert	34	8	203	1	19	0

## Daten-Filterung

Die Filterung der Daten wurde jeweils mit der besten Einstellung der Normalisierung (nach Median & Autoskaliert) durchgeführt, um sichtbare Unterschiede vor allem in der t-Test-Signifikanz nach FDR-Korrektur zu erhalten. Die Unterschiede der verschiedenen Arten des Filterns waren schwächer als bei der Normalisierung. Es gab kleine Verbesserungen bei den Ergebnissen der t-Tests mit FDR-Korrektur von 37 signifikanten Lipiden ohne Filterung auf 42 Lipiden mit Filterung. Erneut sind diese Verbesserungen wieder mit Einbußen beim Fold Change einhergehend. Beim entscheidenden Volcano-Plot gab es mit Filterung nur Verschlechterung oder Stagnation, weshalb die weiteren Analysen **ohne Filterung** durchgeführt wurden.

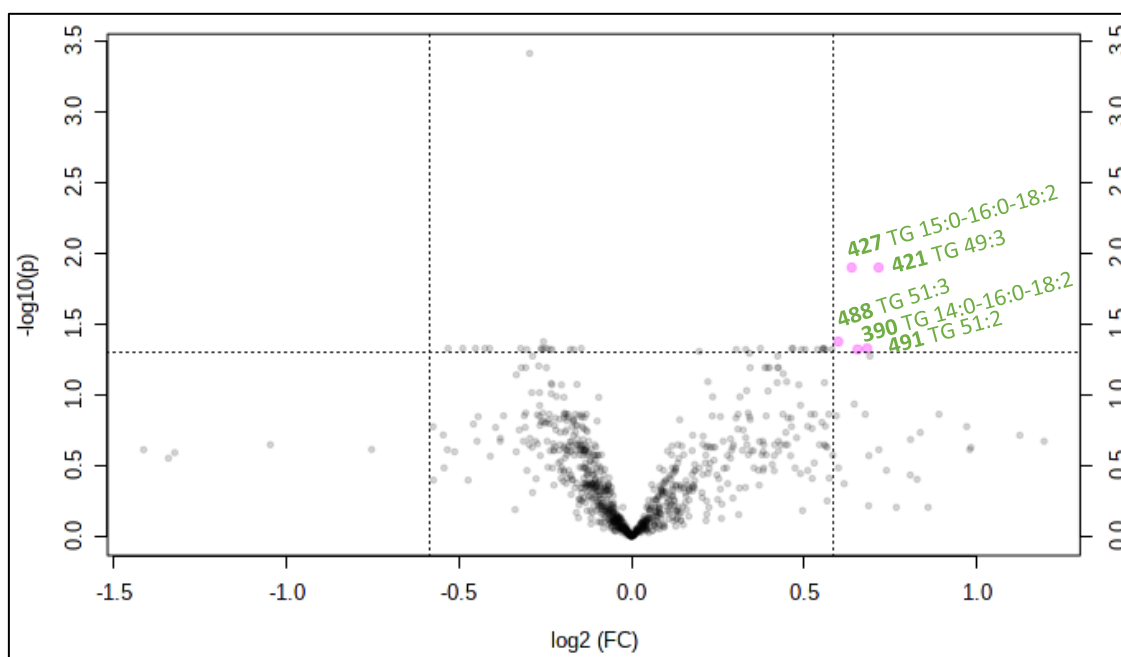
### **Table 9: Übersicht Ergebnisse Daten-Filterung mit MetaboAnalyst**

Dargestellt ist die Art der Filterung und die Anzahl der signifikanten Lipide bei den jeweiligen Tests. Schwellenwerte beim Fold Change waren 1,5 und 2. Beim t-Test war es  $p < 0,05$  mit FDR-Korrektur und ohne. Eine Verbesserung der Anzahl an signifikanten Lipiden im Vergleich zu der Anzahl ohne Filterung (aber mit bester Normalisierung) wurde in grünen Farbstufen markiert. Eine Verschlechterung in rot und keine Veränderung in grau.

Methode	Fold Change		t-Test ( $p < 0,05$ )		Volcano-Plot ( $p < 0,05$ ; $FC > 1,5$ )	
	1.5	2	OHNE	FDR	OHNE	FDR
KEINE (ohne Normalisierung)	34	8	203	1	19	0
<b>KEINE (mit Normalisierung)</b>	<b>32</b>	<b>6</b>	<b>204</b>	<b>37</b>	<b>16</b>	<b>5</b>
Interquantil range	29	6	183	42	13	5
Standardabweichung	29	6	183	42	13	5
Mittlere absolute Abweichung vom Median	27	6	176	38	13	5
Relative Standardabweichung	24	6	184	42	13	5
Nicht-Parametrische relative Standardabweichung	28	6	177	38	13	5
Durchschnittlicher Intensitätswert	31	6	169	17	15	3
Median des Intensitätswertes	8	0	131	2	6	2

### 3.4.2. Volcano-Plot: Einfluss der Statin-Medikation mit MetaboAnalyst

Mit den oben herausgefundenen optimalen Einstellungen auf MetaboAnalyst 5.0 wurde ein Volcano-Plot zu dem Kollektiv Statin-therapiert gegen Statin-naiv erstellt (**Abbildung 8**). Genauere Informationen zu den Lipiden sind der nachfolgenden **Tabelle 10** zu entnehmen. Verglichen mit dem Volcano-Plot von **Abbildung 5**, welches mit JMP und SGoF-Korrektur erstellt wurde, sind in MetaboAnalyst die gleichen signifikanten Lipide, jedoch beachtlich weniger davon übriggeblieben. Im Volcano-Plot mit JMP waren es nämlich 165 Lipiden im Vergleich zu fünf hochregulierten Triglyceriden bei MetaboAnalyst. Jedoch decken sich diese fünf Triglyceride mit den signifikantesten Lipiden der JMP-Analyse. Grund für diese Abweichung ist vor allem die unterschiedliche Korrektur gegen multiples Testen. Die SGoF-Methode ist etwas „weicher“ als die bei MetaboAnalyst verwendete FDR-Methode von Benjamini-Hochberg. Dadurch sind die Ergebnisse zwar robuster und valider, jedoch können auch Lipide mit kleineren, aber tatsächlich vorhandenen Veränderungen verloren gegangen sein.



**Abbildung 8: Volcano-Plot der Lipidomveränderungen durch Statin-Medikation mit MetaboAnalyst**

Die x-Achse gibt den Zweierlogarithmus des Fold Changes (FC) an. Die y-Achse zeigt den Zehnerlogarithmus der p-values der one-way ANOVA nach FDR-Korrektur (Benjamini-Hochberg;  $FDR < 5\%$ ). Der Grenzwert für signifikante Lipide ist 1,3 ( $p < 0,05$ ) und für den Fold Change 1,5.



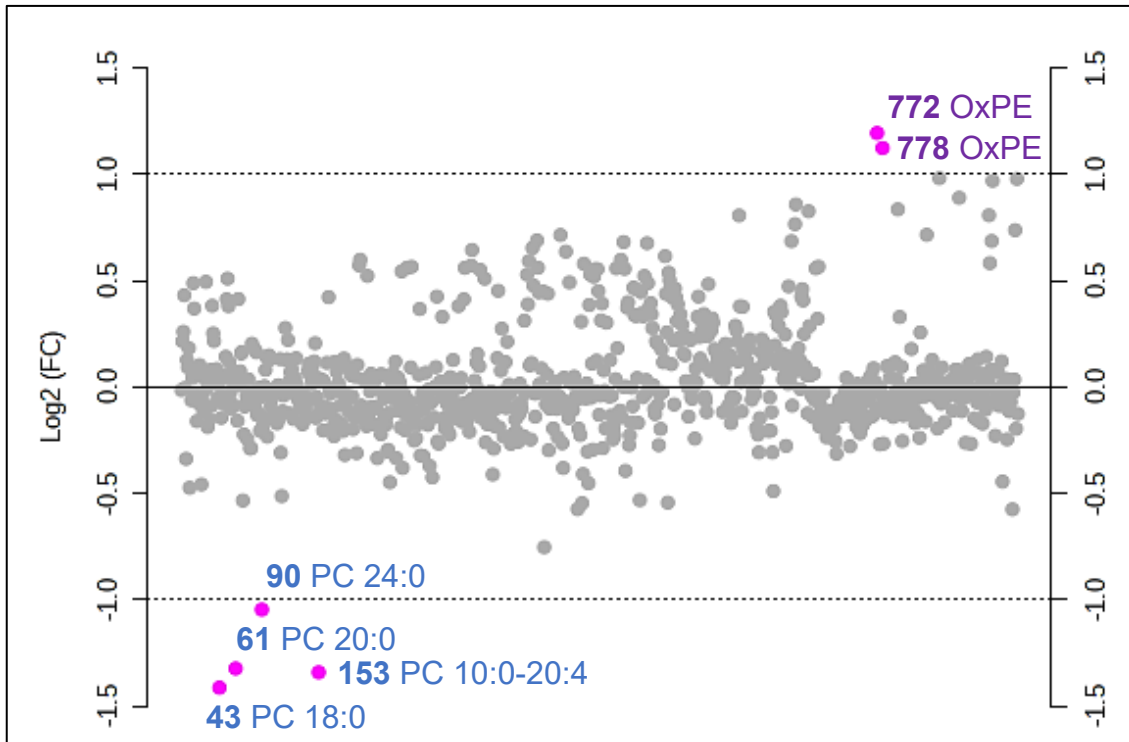
### **Tabelle 10: Hochregulierte Lipide bei Statin-Behandlung mit MetaboAnalyst**

Alle der aus dem Volcano-Plot von MetaboAnalyst gefundenen Lipide sortiert absteigend nach Fold Change (FC). Die fünf Triglyzeride sind alle im Statin-Kollektiv hochreguliert und auch noch nach FDR-Korrektur (Benjamini-Hochberg) signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Färbung des FC bezieht sich auf die Hochregulierung (rot).

FC	P-Value (FDR)	N°	Hauptgruppe	Klasse	Lipidname
1.642	0.013	421	Glycerolipide	TG	TG 49:3
1.556	0.013	427	Glycerolipide	TG	TG 15:0-16:0-18:2
1.515	0.042	488	Glycerolipide	TG	TG 51:3
1.605	0.047	491	Glycerolipide	TG	TG 51:2
1.574	0.048	390	Glycerolipide	TG	TG 14:0-16:0-18:2

### **3.4.3. Fold Change: Einfluss der Statin-Medikation mit MetaboAnalyst**

Zur weiteren Analyse und zum Entdecken solcher oben angesprochenen untergegangenen, jedoch veränderten Lipide wurden weitere statistische Tests auf MetaboAnalyst 5.0 durchgeführt. Die Daten wurden weiterhin normalisiert (Median) und skaliert (automatisch). Zunächst wurde unabhängig von der Signifikanz nur der Fold Change betrachtet (**Abbildung 9**). Es zeigten sich sechs Lipide mit besonders starker Hoch- beziehungsweise Runterregulierung unter Statin-Behandlung. Ihr Fold Change war über 2, was bedeutet, dass sie im Durchschnitt im therapierten Kollektiv mehr als doppelt so häufig vorhanden waren, als im nicht-therapierten Kollektiv. Die vier runterregulierten Lipide sind alles Phosphatidylcholine. Die zwei hochregulierten Lipide sind oxidierte Phospholipide. Genauere Informationen zu den Lipiden sind **Tabelle 11** zu entnehmen.



**Abbildung 9: Streudiagramm des Fold Changes durch Statin-Medikation**

Dargestellt sind die Peak-Intensitäten der 928 Lipide und deren Fold Change (statintherapiert/ untherapiert) mit dem Grenzwert von 2 (= 1 nach Zweierlogarythmus). Lipide über diesem Wert sind farblich hervorgehoben und beschriftet. Die y-Achse ist Log2-Skaliert, um hoch- (positive Werte) beziehungsweise runterregulierte (negative Werte) Lipide symmetrisch darzustellen. Erstellt mit MetaboAnalyst.

**Tabelle 11: Lipide mit dem höchsten Fold Change durch Statin-Behandlung**

Lipide mit dem höchsten Fold Change (FC) analysiert mit MetaboAnalyst. Sortiert aufsteigend nach FC. Die Färbung des FC bezieht sich auf die Hoch- (rot) bzw. Runterregulierung (blau).

log2(FC)	FC	N°	Hauptgruppe	Klasse	Lipidname
-1.415	0.375	43	(Glycero-)Phospholipide	PC	PC 18:0
-1.343	0.394	153	(Glycero-)Phospholipide	PC	PC 10:0-20:4
-1.324	0.399	61	(Glycero-)Phospholipide	PC	PC 20:0
-1.047	0.484	90	(Glycero-)Phospholipide	PC	PC 24:0
1.125	2.181	778	Oxidierte Phospholipide	OxPE	OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3)
1.195	2.290	772	Oxidierte Phospholipide	OxPE	OxPE(P-16:0/14-HAdA)

### 3.4.4. Heatmap: Einfluss der Statin-Medikation mit MetaboAnalyst

Ein zusätzlicher in der Metabolomics-Forschung typischer statistischer Test zur weiteren Analyse der Statin-Veränderungen im Lipidom ist die Heatmap. Sie ist ein optimales Tool für das schnelle Erkennen und Visualisieren von Veränderungen zwischen dem mit Statinen behandelten im Vergleich zum unbehandelten Kollektiv. Die Heatmap (**Abbildung 10**) wurde mit MetaboAnalyst 5.0 nach vorheriger Normalisierung (Median) und Skalierung (Automatisch) erstellt. Dargestellt sind die 25 am signifikantesten alterierten Lipide nach t-test bzw. ANOVA. In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen waren alle hochregulierten Lipide in dem Statin behandelten Kollektiv Triglyceride und fast alle im Statin unbehandelten Kollektiv erhöhten Lipide waren Glycerophospholipide. Genauere Informationen zu den Lipiden sind in Tabellen **Tabelle 12** und **Tabelle 13** aufgeführt.

**Tabelle 12: In Heatmap erhöhte Lipide unter Statin-Therapie**

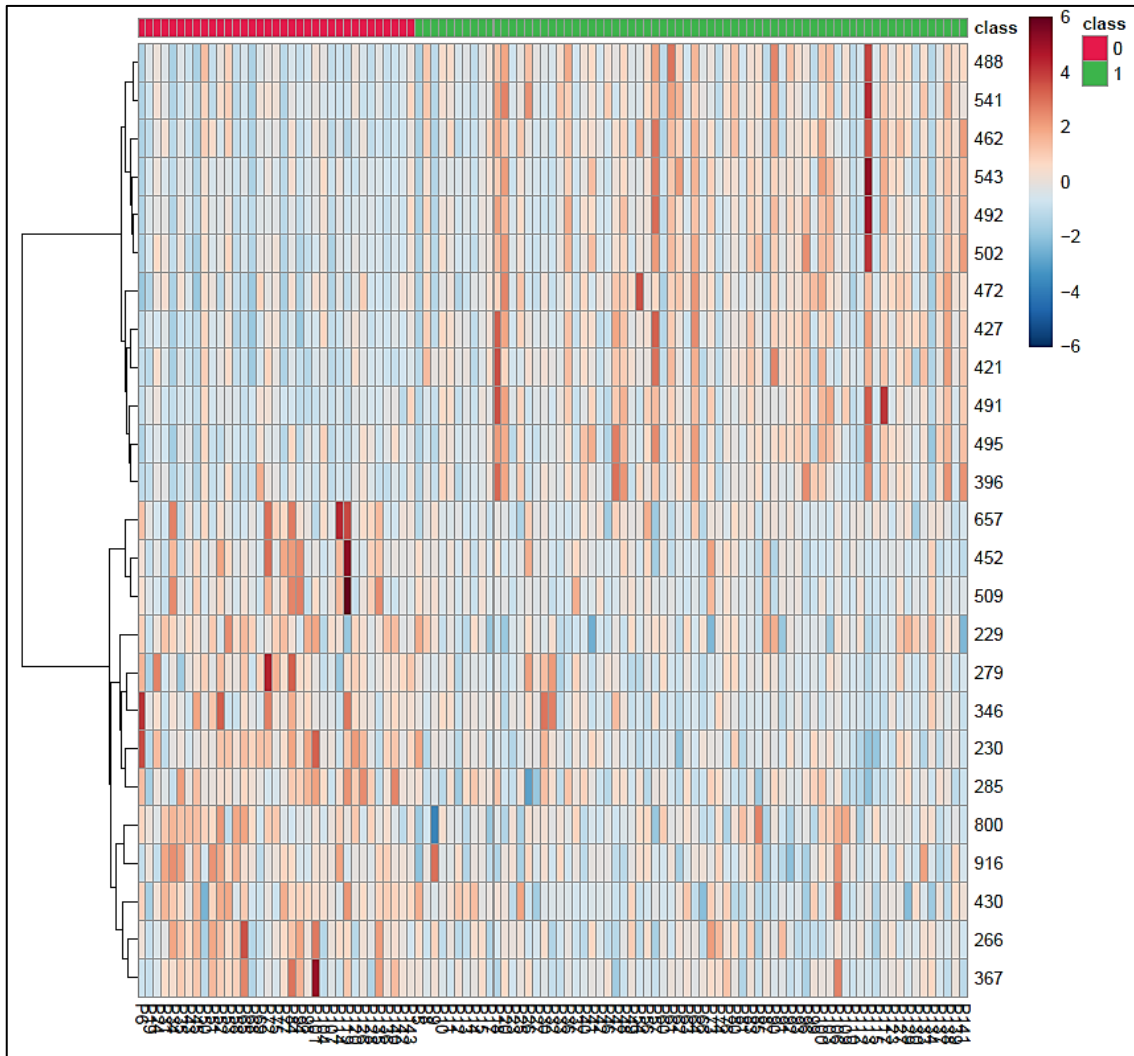
Sortiert nach Rheinfoolge in der Heatmap (**Abbildung 10**).

N°	Klasse	Lipidname
488	TG	TG 51:3
541	TG	TG 53:3(1)
462	TG	TG 50:2
543	TG	TG 53:2
491	TG	TG 51:2
502	TG	TG 15:0-18:1-18:1
472	TG	TG 50:2
427	TG	TG 15:0-16:0-18:2
421	TG	TG 49:3
491	TG	TG 51:2
495	TG	TG 51:1
396	TG	TG 14:0-16:0-18:1

**Tabelle 13: In Heatmap erhöhte Lipide ohne Statin-Therapie**

Sortiert nach Rheinfoolge in der Heatmap (**Abbildung 10**).

N°	Klasse	Lipidname
657	TG	TG 60:1
452	PC	PC 40:1
509	PC	PC 21:1-21:1
229	PC	PC 16:1-18:2
279	PC	PC 18:2-18:3
346	PC	PC 38:7
230	PC	PC 16:0-18:3(1)
285	PC	PC 16:0-20:4(1)
800	PS	PS 18:1-18:1
916	PI	PI 18:1-20:4
430	PC	PC 40:5
266	PE	PE 20:0-18:1
367	PC	PC 20:1-18:2



**Abbildung 10: Heatmap der Lipidomveränderungen durch Statin-Medikation**

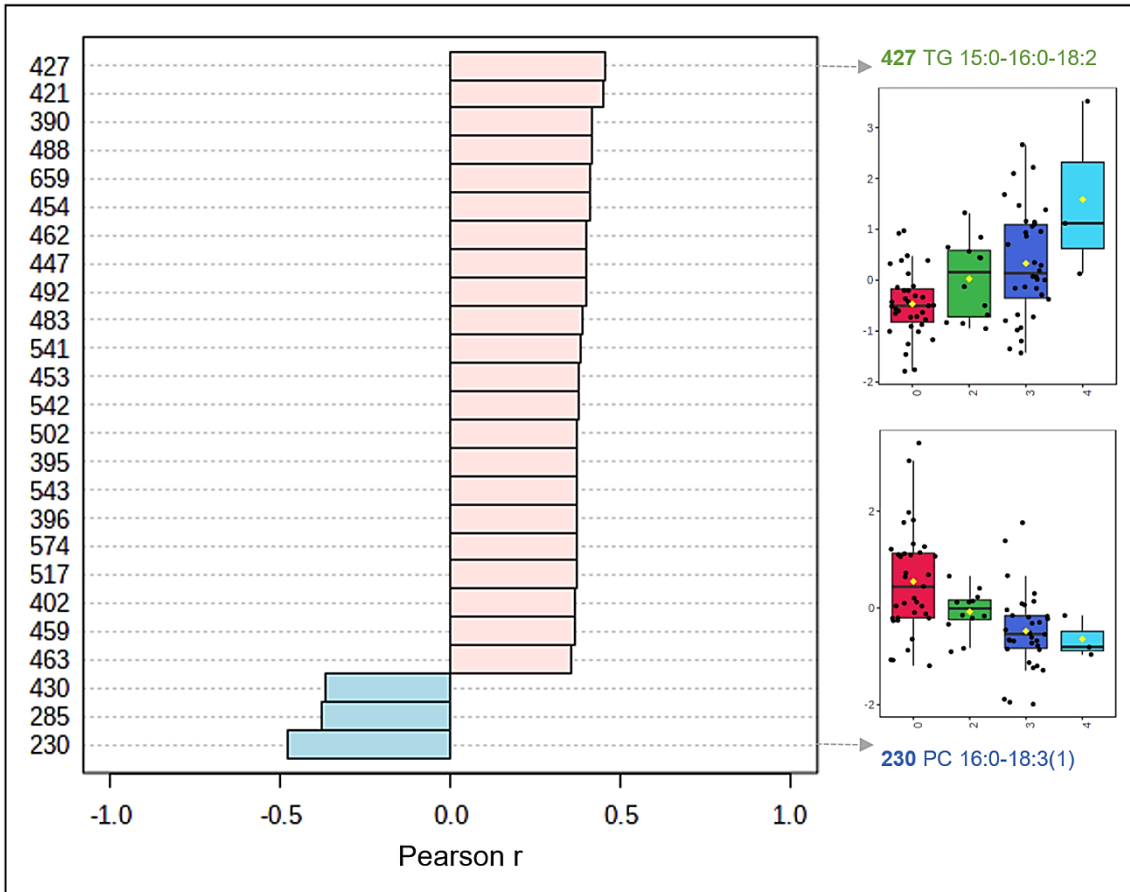
Abgebildet ist das Ergebnis des Clusterings dargestellt in einer Heatmap mit den 25 signifikantesten Lipiden nach *t*-Test/ANOVA. Für die Erstellung auf MetaboAnalyst wurde der euklidische Abstand und als Cluster-Algorithmus wurde das Ward-Verfahren benutzt. Am linken Rand ist das Ergebnis des Clusters als Dendrogramm dargestellt. Die Patienten wurden nach Statin behandelt (1; grün; rechts in der Heatmap) und Statin unbehandelt (0; rot; links in der Heatmap) aufgeteilt, indem das automatische Clustern nach Proben ausgeschaltet wurde. Die Farbskala beschreibt die Veränderung der Lipide von rot (hochreguliert) bis blau (runterreguliert).

### 3.5. Lipidomveränderungen unter steigender Statindosis

In den bisherigen Analysen wurde mehrfach ein Einfluss der Statin-Medikation auf das thrombozytäre Lipidom festgestellt. Um nun nicht nur einen Einfluss, sondern einen tatsächlichen Zusammenhang festzustellen, wurde mit dem „Pattern-Hunter-Tool“ von MetaboAnalyst 5.0 untersucht, ob die gefundenen Lipide auch mit steigender Statindosis zunehmen. Um vergleichbare Effekte der Dosis zu erhalten, wurden für diese Analyse lediglich Patienten mit Atorvastatin betrachtet (n = 49). Anschließend wurden vier Gruppen gebildet:

- Kein Statin (n = 35)
- 10 & 20 mg Atorvastatin (n = 12)
- 40 mg Atorvastatin (n = 34)
- 80 mg Atorvastatin (n = 3)

Die Korrelation der Lipide mit diesen Gruppen unter dem Schema 1-2-3-4 ist in **Abbildung 11** dargestellt. Abgebildet sind die Lipide mit den 25 stärksten Korrelationen berechnet mit Pearson r und nach FDR-Korrektur (Benjamini-Hochberg). Davon wurden 22 Lipide mit positiver Korrelation entdeckt, was heißt, dass sie mit steigender Statindosis ebenfalls zunehmen. Bis auf eine Fettsäure, gehören alle diese Lipide, wie zu erwarten war, zu den Triglyceriden. Zum Großteil die gleichen Triglyceride, welche in den vorherigen Analysen auch schon erkannt wurden. Drei Lipide zeigten einen negativen Korrelationswert, was bedeutet, dass sie mit steigender Statindosis abnehmen. Diese runterregulierten Lipide sind alles Phosphatidylcholine und ebenfalls bereits bekannt aus obigen Analysen. Die Stärke der Korrelation ist moderat und weist im positiven, als auch im negativen Bereich Werte von 0,35 bis 0,45 auf. Genauere Informationen zu den einzelnen Lipiden sind **Tabelle 14** zu entnehmen.



**Abbildung 11: Korrelation der Lipide mit steigender Statindosis**

Abgebildet sind die 25 stärksten Korrelationen mit steigender Statindosis nach FDR-Korrektur (Benjamini-Hochberg) analysiert mit der PatternHunter-Funktion von MetaboAnalyst. Der Korrelationskoeffizient wurde mit Pearson  $r$  berechnet und ist auf der x-Achse abgebildet. Die Lipide sind nach Korrelationskoeffizient absteigend sortiert und farblich hervorgehoben (rot = positiv, blau = negativ). Rechts sind beispielhaft die Boxplots von dem Lipid mit der stärksten positiven und der stärksten negativen Korrelation dargestellt. Die vier Boxplots stehen jeweils für die mittleren Peak-Intensitäten der Lipide in den einzelnen Statindosis-Gruppen (Keines (rot); 10 mg & 20 mg (grün); 40 mg (dunkel blau) und 80 mg Atorvastatin (hellblau)). Die genauen Werte der einzelnen Lipide sind in **Tabelle 14** aufgelistet.

**Tabelle 14: Korrelation der Lipide mit steigender Statindosis**

Lipide in gleicher Reihenfolge wie in **Abbildung 11**, sortiert nach Korrelationskoeffizient Pearson r. P-values nach FDR-Korrektur (Benjamin-Hochberg). Die Färbung der Zellen des Pearson r stehen für eine positive Korrelation (rot) und negative Korrelation (blau).

N°	Pearson r	P-Value (FDR)	Hauptgruppe	Klasse	Lipidname
427	0.453	0.005	Glycerolipide	TG	TG 15:0-16:0-18:2
421	0.450	0.005	Glycerolipide	TG	TG 49:3
390	0.416	0.015	Glycerolipide	TG	TG 14:0-16:0-18:2
488	0.415	0.015	Glycerolipide	TG	TG 51:3
659	0.410	0.015	Fettsäure-Derivate	FA	FA 16:0
454	0.408	0.015	Glycerolipide	TG	TG 14:0-16:0-20:4
462	0.402	0.016	Glycerolipide	TG	TG 50:2
447	0.399	0.016	Glycerolipide	TG	TG 50:5
492	0.399	0.016	Glycerolipide	TG	TG 15:0-18:1-18:1
483	0.387	0.023	Glycerolipide	TG	TG 51:4
541	0.386	0.023	Glycerolipide	TG	TG 53:3(1)
453	0.380	0.023	Glycerolipide	TG	TG 50:4
542	0.380	0.023	Glycerolipide	TG	TG 53:3(2)
502	0.375	0.024	Glycerolipide	TG	TG 15:0-18:1-18:1
395	0.372	0.024	Glycerolipide	TG	TG 48:1
543	0.372	0.024	Glycerolipide	TG	TG 53:2
396	0.371	0.024	Glycerolipide	TG	TG 14:0-16:0-18:1
574	0.371	0.024	Glycerolipide	TG	TG 55:3(1)
517	0.369	0.024	Glycerolipide	TG	TG 52:3(1)
402	0.364	0.026	Glycerolipide	TG	TG 14:0-16:0-18:2
459	0.364	0.026	Glycerolipide	TG	TG 50:3(2)
463	0.357	0.032	Glycerolipide	TG	TG 14:0-16:0-20:4
430	-0.369	0.024	(Glycero-)Phospholipide	PC	PC 40:5
285	-0.381	0.023	(Glycero-)Phospholipide	PC	PC 16:0-20:4(1)
230	-0.479	0.004	(Glycero-)Phospholipide	PC	PC 16:0-18:3(1)

### 3.6. Zusammenfassung der auffälligen Lipide aller Tests

Für eine vergleichende Beurteilung aller oben durchgeführten statistischen Tests bezüglich der Auswirkungen der Statintherapie auf das Lipidom, soll nun eine Zusammenfassung aller Ergebnisse erfolgen.

Zu erkennen ist, dass der Volcano-Plot und die FC-Analyse logischerweise teils ähnliche Ergebnisse liefern, die FC-Analyse aber auch einige Lipide ergänzt. Die Heatmap und die Pattern-Hunter-Analyse überschneiden sich auch teilweise, ergänzen jedoch einige Lipide zu dem Volcano-Plot und FC.

Runterreguliert		Hochreguliert	
	PC 16:0-18:3(1)	TG 49:3	
	PC 16:0-20:4(1)	TG 14:0-16:0-18:2	
	PC 40:5	TG 51:2	
	PC 24:0	TG 15:0-16:0-18:2	
	PC 40:2	TG 51:3	
	PC 18:0	TG 48:1	
	PC 20:0	TG 14:0-16:0-18:1	
	PC 10:0-20:4	TG 50:2	
	PC 40:1	TG 15:0-18:1-18:1	
	PE 20:0-18:1	TG 53:3(1)	
	PC 18:2-18:3	TG 53:2	
	PC 38:7	<b>OxPC(16:0/12-HETE)</b>	
	PC 20:1-18:2	<b>OxPC(18:0/12-HETE)</b>	
	PC 16:1-18:2	<b>OxPE(P-16:1/14-HAdA)</b>	
	PC 21:1-21:1	<b>OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3)</b>	
	TG 60:1	TG 50:2	
	PS 18:1-18:1	TG 51:1	
	PI 18:1-20:4	TG 14:0-16:0-18:2	
		TG 50:5	
		TG 50:4	
		TG 14:0-16:0-20:4	
		TG 50:3(2)	
		TG 14:0-16:0-20:4	
		TG 51:4	
		TG 15:0-18:1-18:1	
		TG 52:3(1)	
		TG 53:3(2)	
		TG 55:3(1)	
		FA 16:0	

<span style="color: yellow;">■</span>	Volcano JMP
<span style="color: brown;">■</span>	Volcano Metabo A.
<span style="color: cyan;">■</span>	FC Metabo Analyst
<span style="color: red;">■</span>	Heatmap
<span style="color: gray;">■</span>	Pattern Hunter

**Abbildung 12: Zusammenfassung der auffälligen Lipide aller Tests**

Abgebildet sind alle auffälligen Lipide der oben beschriebenen Tests, aufgeteilt in runterreguliert (links) und hochreguliert (rechts). Die farbigen Kästchen zeigen, dass dieses Lipid in dem jeweiligen Test auffällig war. Fett hervorgehobene Lipide werden nachfolgend gruppiert und im Diskussionsteil diskutiert.



### 3.6.1. Runterregulierte Lipide

**Tabelle 15: Übersicht aller auffällig runterregulierten Lipide**

Aufgelistet sind alle in den vorherigen Tests auffälligen runterregulierten Lipide bei Statintherapie. Das Cluster bezieht sich auf die Nummer des zugeordneten Clusters in der Variable Cluster Analyse von JMP. In gelbem Farbverlauf markiert sind Lipide mit signifikanten Ergebnissen in mehreren Tests. Fett und mit roter Lipidnummer sind Lipide, welche anschließend gruppiert und später in der Diskussion in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet werden.

N°	Klasse	Cluster	Lipidname	Volcano JMP	FC MetaboA	Heatmap	Pattern Hunter
922	PC	30	PC 40:2	1			
<b>90</b>	PC	26	<b>PC 24:0</b>	1	1		
43	PC	26	PC 18:0		1		
61	PC	26	PC 20:0		1		
153	PC	26	PC 10:0-20:4		1		
229	PC	46	PC 16:1-18:2			1	
266	PE	70	PE 20:0-18:1			1	
279	PC	114	PC 18:2-18:3			1	
346	PC	69	PC 38:7			1	
367	PC	40	PC 20:1-18:2			1	
452	PC	103	PC 40:1			1	
509	PC	30	PC 21:1-21:1			1	
657	TG	33	TG 60:1			1	
800	PS	107	PS 18:1-18:1			1	
916	PI	3	PI 18:1-20:4			1	
<b>230</b>	PC	78	<b>PC 16:0-18:3(1)</b>			1	1
<b>285</b>	PC	20	<b>PC 16:0-20:4(1)</b>			1	1
<b>430</b>	PC	18	<b>PC 40:5</b>			1	1

### 3.6.2. Sinnvolle Auswahl und Gruppierung der auffälligsten herabregulierten Lipide

Zusammenfassend zu den herabregulierten Lipiden lässt sich feststellen, dass sie fast alle zu der Familie der Glycero-Phospholipide und dabei vorwiegend zu den PC gehören (**Tabelle 15**). Mit einer Länge von 16, 18, 20, 24 und 40 C-Atomen gehören sie zu den LCFA und VLCFA. Zum Großteil sind sie gesättigt oder MUFAs. PUFAs befinden sich vor allem bei den LCFA (13 - 21 C-Atome).

In den statistischen Tests wiesen die unter Statintherapie auffälligen runterregulierten Lipide ein hohes Maß an Veränderung auf. Dies war vor allem in einem hoch negativen Fold Change deutlich zu erkennen. Das heißt, die Konzentration dieser Phosphatidylcholine war im mit Statinen behandelten

Kollektiv meist weniger als halb so groß als im Statin-naiven Kollektiv (**Abbildung 9**).

Unter den herabregulierten Lipiden sind vor allem drei auffällige Gruppen hervorzuheben:

1. **Hoher Fold Change:** PC 18:0, PC 20:0, PC 10:0-20:4 und PC 24:0
2. **PC 16-Gruppe:** PC 16:0-18:3(1) und PC 16:0-20:4(1)
3. **PC 40-Gruppe:** PC 40:5, PC 40:2 und PC 40:1

### **GRUPPE 1: Hoher Fold Change**

MITGLIEDER: PC 18:0, PC 20:0, PC 10:0-20:4 und PC 24:0

Die erste Gruppe mit besonders hohem Fold Change wurde auch in der JMP Variable Cluster Analyse mit insgesamt 124 verschiedenen Clustern zu einem gemeinsamen Cluster, dem Cluster 26, gruppiert. Dem Cluster 26 gehören insgesamt fünf Lipide an, die oben genannten vier und PC 13:0-13:0. Diese fünf Lipide, waren alle im Volcano-Plot ohne SGoF-Korrektur signifikant und stark erniedrigt. Mit SGoF-Multiples-Testen-Korrektur war nur noch PC 24:0 signifikant (**Abbildung 5**). In der Heatmap sowie im PatternHunter sind sie nicht aufgefallen. Aufgrund der gemeinsamen Gruppierung und ähnlichen Ausprägung im Fold Change, verhalten sich diese Lipide sehr ähnlich und könnten einem gemeinsamen Stoffwechselweg oder übergeordnetem Mechanismus unterliegen. Die nachfolgende Tabelle enthält nähere Informationen zu den Lipiden aus Gruppe 1 wie deren Name, Funktion und die dazugehörige Quelle in der Literatur.

### **GRUPPE 2: PC 16-Gruppe**

MITGLIEDER: PC 16:0-18:3(1) und PC 16:0-20:4(1)

Die zweite Gruppe enthält zwei der drei Lipide, welche sowohl in der Heatmap, als auch im PatternHunter auffällig waren (**Tabelle 15**). In den Volcano-Plots waren sie nicht über den Cut-Off-Werten. Die zwei Lipide sind beides gesättigte LCFA-PC mit 16-C-Atomen und mit einer weiteren PUFA-LCFA. Diese sind die Linolensäure (LNA) und die AA. Beide Lipide sind aus unterschiedlichen Clustern

in der JMP Variable Cluster Analyse.

PC 16:0-18:3(1) ist aus Cluster 78, welches drei weitere PCs mit LCFA-MUFAs und angehängten LCFA-PUFAs enthält (PC 16:1-20:5(1); PC 16:1-20:5(2); PC 35:1e).

Das zweite Lipid ist PC 16:0-20:4(1), welches dem Cluster 20 zugeordnet wurde. In diesem Cluster befinden sich zum Großteil MUFA- und PUFA-VLCFA Sphingomyeline mit 35 bis 43 C-Atomen Kettenlänge (zum Beispiel: SM d38:2(2); SM d40:1(1); SM d41:1(1); SM d42:2(1); ...)

### **GRUPPE 3: PC 40-Gruppe**

MITGLIEDER: PC 40:5, PC 40:2 und PC 40:1

Die dritte Gruppe, die genauer betrachtet werden soll, enthält drei VLCFA-, MUFA- sowie PUFA-PCs mit 40 C-Atomen Kettenlänge. PC 40:5 war, neben den Lipiden aus der vorherigen betrachteten GRUPPE 2, die einzigen Lipide, welche in der Heatmap, sowie im PatternHunter auffällig runterreguliert waren (**Tabelle 15**). PC 40:5 wurde von der JMP Variable Cluster Analyse dem Cluster 18 zugeordnet, welches insgesamt 12 LCFA- und VLCFA-PUFAs aus den Lipid-Klassen der PE und PC mit 18, 20 und 40 C-Atome enthält (z.B.: PC 18:1-22:4; PC 20:2-20:5; PE 20:4-22:5; PC 40:4; ...).

Das andere PUFA-PC 40:2 aus der GRUPPE 3 war das zweite von zwei signifikant runterregulierten Lipiden im JMP Volcano-Plot. In den anderen Tests war es nicht auffällig. Das dazugehörige Cluster ist Cluster 30, welches vorwiegend MUFA- und PUFA-PCs mit zwei Seitenketten von meist 16 bis 22 C-Atomen enthält (z.B.: PC 22:1-18:2; PC 18:1-22:1; PC 16:0-24:1; PC 21:2-21:2; ...).

Das dritte Lipid aus GRUPPE 3 ist das MUFA-PC 40:1. Es war lediglich in der Heatmap erniedrigt. Das dazugehörige Cluster 103 ist ähnlich aufgebaut wie die Cluster zuvor: LCFA- und VLCFA-MUFA und PUFA-PCs mit Kettenlängen von 18 bis 20 oder 40 und 41 C-Atome (z.B.: PC 20:0-18:1; PC 18:1-22:5; PC 40:1; PC 41:2).

### 3.6.3. Hochregulierte Lipide

**Tabelle 16: Übersicht aller auffällig hochregulierten Lipide**

Aufgelistet sind alle in den vorherigen Tests auffälligen hochregulierten Lipide bei Statintherapie. Das Cluster bezieht sich auf die Nummer des zugeordneten Clusters in der Variable Cluster Analyse von JMP. In gelbem Farbverlauf markiert sind Lipide mit signifikanten Ergebnissen in mehreren Tests. Fett und mit roter Lipidnummer sind Lipide, welche anschließend gruppiert und später in der Diskussion in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet werden.

N°	Klasse	Cluster	Lipidname	Volcano JMP	Volcano MetaboA	FC MetaboA	Heatmap	Pattern Hunter
421	TG	2	TG 49:3	1	1		1	1
390	TG	9	TG 14:0-16:0-18:2	1	1			1
491	TG	49	TG 51:2	1	1		1	
395	TG	9	TG 48:1	1				1
863	OxPC	13	OxPC(16:0/12-HETE)	1				
900	OxPC	13	OxPC(18:0/12-HETE)	1				
427	TG	49	TG 15:0-16:0-18:2		1		1	1
488	TG	2	TG 51:3		1		1	1
772	OxPE	13	OxPE(P-16:1/14-HAdA)			1		
778	OxPE	13	OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3)			1		
396	TG	52	TG 14:0-16:0-18:1				1	1
462	TG	2	TG 50:2				1	1
502	TG	2	TG 15:0-18:1-18:1				1	1
541	TG	73	TG 53:3(1)				1	1
543	TG	2	TG 53:2				1	1
472	TG	87	TG 50:2				1	
495	TG	49	TG 51:1				1	
402	TG	9	TG 14:0-16:0-18:2					1
447	TG	47	TG 50:5					1
453	TG	47	TG 50:4					1
454	TG	73	TG 14:0-16:0-20:4					1
459	TG	2	TG 50:3(2)					1
463	TG	73	TG 14:0-16:0-20:4					1
483	TG	73	TG 51:4					1
492	TG	2	TG 15:0-18:1-18:1					1
517	TG	73	TG 52:3(1)					1
542	TG	2	TG 53:3(2)					1
574	TG	2	TG 55:3(1)					1
659	FA	68	FA 16:0					1

### 3.6.4. Sinnvolle Auswahl und Gruppierung der auffälligsten hochregulierten Lipide

Insgesamt lässt sich zu den hochregulierten Lipiden feststellen, dass sie fast alle zu den Glycerolipiden, genauer den TGs, und oxPL gehören (**Tabelle 16**).

Die auffälligen TGs bestehen vorwiegend aus MUFA- und PUFA-VLCFA mit sehr langer Kettenlänge von um die 50 C-Atomen. Außerdem enthalten sie TGs mit den drei genauer bestimmten Acylgruppen. Diese besitzen meist zwei gesättigte Fettsäuren und eine MUFA oder PUFA: Ölsäure (18:1), LA (18:2), LNA (18:3) oder AA (20:4). Sie besitzen somit in Summe insgesamt ebenfalls um die 50 C-Atome.

Die oxPL sind zwei oxPC und zwei oxPE mit Kettenlängen von 16-24 C-Atomen.

Die auffälligsten hochregulierten Lipide können wie folgt gruppiert und zusammengefasst werden:

1. VLCFA-PUFA-TG: TG 49:3; TG 51:3; TG 51:2
2. Spezifische Triglyceride: TG 14:0-16:0-18:2; TG 15:0-16:0-18:2
3. OxPL: OxPE(P-16:0/14-HAdA); OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3); OxPC(16:0/12-HETE); OxPC(18:0/12-HETE)

#### GRUPPE 1: VLCFA-PUFA-TG

MITGLEIDER: TG 49:3; TG 51:3; TG 51:2

Diese Gruppe beinhaltet die mit Abstand prädominanteste Lipid-Gruppe unter den bei Statintherapie hochregulierten Lipiden. Es sind alles VLCFA mit 48-55 C-Atomen und ein- bis mehrfach ungesättigten Doppelbindungen. Das auffälligste und in den meisten Tests signifikanteste Lipid war TG 49:3. Es war sowohl im Volcano-Plot von JMP, dem Volcano-Plot von MetaboAnalyst als auch in der Heatmap und dem PatternHunter signifikant. Sehr ähnlich oft signifikant und lediglich nicht im Volcano-Plot von JMP auffällig, war TG 51:3 (**Tabelle 16**). Beide Lipide lassen sich auch dem gemeinsamen Cluster 2 bei der JMP Variable Clustering Analyse zuordnen. Dieses Cluster 2 besteht aus insgesamt 15 Triglyceriden, von welchen 9 in den Tests signifikant hochreguliert waren. Alles sind VLCFA-PUFA-TGs mit um die 50 C-Atomen Kettenlänge. Ebenfalls dabei

sind zwei TG mit genaueren Informationen zu ihren drei Lipid-Seitenketten an der sn-1, sn-2 und sn-3 Position: TG 15:0-18:1-18:1 (= TG 51:2) und TG 16:0-16:0-20:2 (= TG 52:2). Ersteres TG 51:2 ist als solches ebenfalls in den Volcano-Plots und der Heatmap signifikant gewesen, wurde jedoch dem Cluster 49 zugeordnet. Dieses Cluster ist dennoch sehr ähnlich zu Cluster 2. Es enthält auch ausschließlich VLCFA-TGs mit 49 bis 53 C-Atomen Kettenlänge, jedoch mehrheitlich MUFAS anstatt PUFAS.

## **GRUPPE 2: Spezifische Triglyceride**

MITGLEIDER: TG 14:0-16:0-18:2; TG 15:0-16:0-18:2

Mit der Gruppe der spezifischen TGs sollen zwei Lipide besonders hervorgehoben werden, welche in besonders vielen Tests auffällig waren: TG 14:0-16:0-18:2 und TG 15:0-16:0-18:2. Ersteres war in beiden Volcano-Plots und dem PatternHunter auffällig und zweiteres war zwar nur im Volcano-Plot von MetaboAnalyst signifikant, dafür aber auch in der Heatmap und ebenfalls dem PatternHunter auffällig.

TG 15:0-16:0-18:2 (= TG 49:2) wurde dem aus GRUPPE 1 bereits bekannten Cluster 49 zugeordnet.

TG 14:0-16:0-18:2 (= TG 48:2) gehört dem Cluster 9 an. Alle 14 Lipide dieses Clusters sind Triglyceride mit vorwiegend PUFA-VLCFA mit einer Kettenlänge von 44 bis 50 C-Atomen. Neben dem oben aufgeführten TG enthält dieses Cluster ebenfalls das TG 12:0-18:1-18:2 (= TG 48:3). Sowohl TG 48:2, als auch TG 48:3 ist in Cluster 9 enthalten. Dies bestätigt die enge Gemeinsamkeit dieser TGs und bestätigt im Umkehrschluss ebenfalls die Güte der Clusteranalyse, welche aufgrund reinen statistischen Verhaltens der Peak-Intensitäten diese ähnlichen Lipide zusammen gruppiert hat.

### GRUPPE 3: Oxidierte Phospholipide

MITGLIEDER: OxPE(P-16:0/14-HAdA); OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3); OxPC(16:0/12-HETE); OxPC(18:0/12-HETE)

In dieser Studie wurden 14 verschiedene oxPL detektiert. Die meisten davon sind oxPCs (6), gefolgt von den oxidierten Phosphatidylethanolaminen (oxPE) (4) und oxidierte Phosphatidylinositole (oxPI)(2). Die Kettenlänge der Lipide an der sn-1 Position ist typischerweise auch hier eine gesättigte oder MUFA-Palmitin- (C16) oder Stearinsäure (C18).

In dem Volcano-Plot von JMP (**Abbildung 5**) ist auffällig, dass 8 der 14 oxPL gruppiert und hochreguliert sind, jedoch aufgrund geringeren p-values nur zwei oxPL nach der SGoF-Korrektur weiterhin signifikant ( $p < 0,05$ ) blieben: OxPC(16:0/12-HETE); OxPC(18:0/12-HETE).

Aufgrund der hohen Peak-Intensitäts-Unterschiede der oxPL im Statin-Kollektiv verglichen mit den unbehandelten Patienten, waren die zwei oxPEs OxPE(P-16:0/14-HAdA); OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3) die einzigen hochregulierten Lipide in der FC Analyse von MetaboAnalyst über dem Cut-off-Wert von zwei (**Abbildung 9**). Die oxPL verhalten sich alle sehr ähnlich, weshalb 12 der 14 Lipide in der JMP Hierarchical Cluster Analyse dem Cluster 13 zugeordnet wurden. Ein gemeinsamer Syntheseweg mit ähnlichen Enzymen und gemeinsamen Regulierungsmechanismen kann somit vermutet werden. Dieses Cluster 13 besteht fast ausschließlich (12 von 14) aus oxidierten Phospholipiden. Die zwei „Außenseiter“ sind PC 16:0-18:3(2) und PC 36:6e.

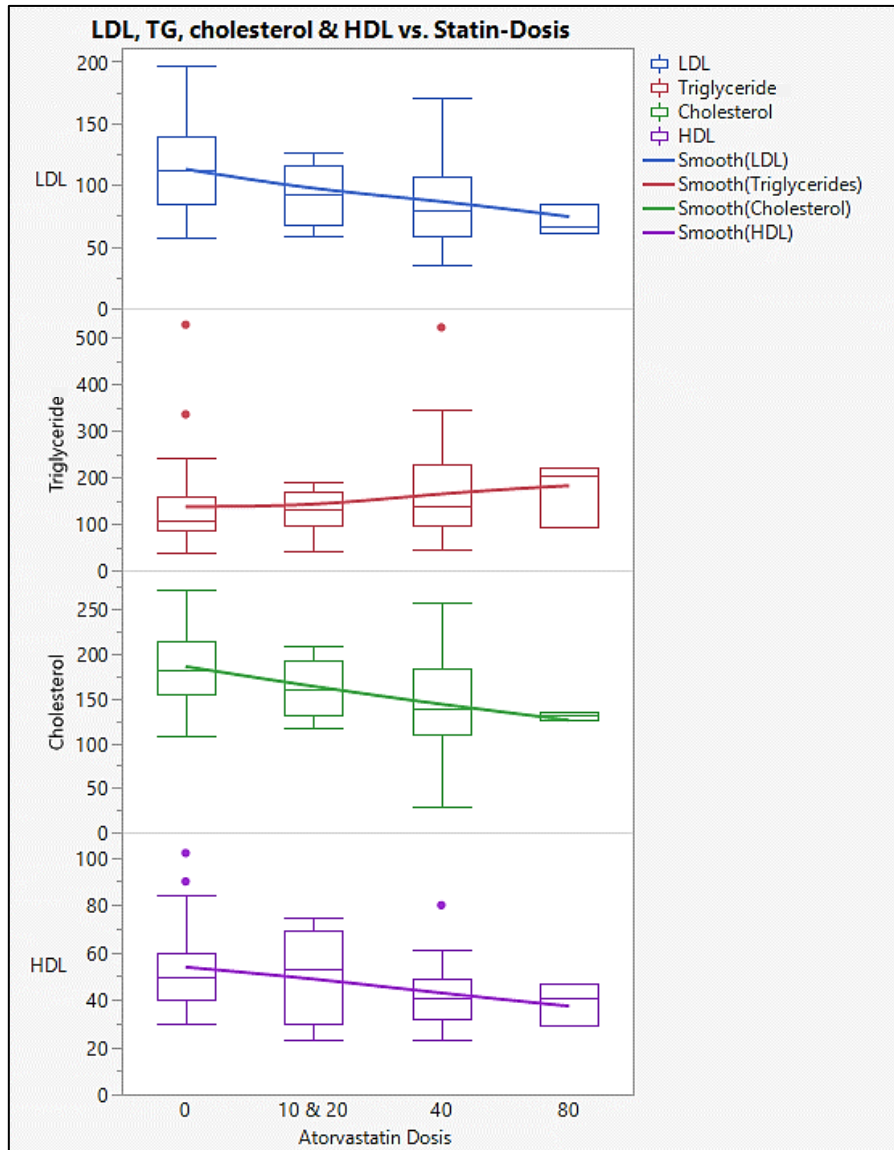
## **3.7. Unabhängigkeit der Lipidomveränderungen gegenüber Einflussfaktoren**

### **3.7.1. Einfluss der Blutplasma-Lipide**

In verschiedenen statistischen Tests wurden weiter oben die Auswirkungen einer Statin-Einnahme auf das thrombozytäre Lipidom beschrieben. Unklar ist jedoch noch, ob diese Lipid-Veränderungen tatsächlich singulär auf die Statin-Medikation zurückzuführen sind, oder unbekannte Kofaktoren diese Veränderungen beeinflussen. Diese Frage soll im Folgenden geklärt werden.

In vorheriger Analyse wurde ein Zusammenhang zwischen der steigenden Statindosis und steigenden beziehungsweise sinkenden Lipide festgestellt. Nun wurden die Blutfette im Blutplasma (NICHT im Zellplasma der Thrombozyten) in den gleichen vier Statindosis-Gruppen (Keines; 10 mg & 20 mg; 40 mg und 80 mg Atorvastatin) untersucht, um einen Einfluss auf die Lipide in den Thrombozyten zu überprüfen. Dafür wurden Boxplots jeweils zu den Laborwerten der Blutplasmakonzentrationen von LDL, Triglyceride, Cholesterol und HDL erstellt (**Abbildung 13**). Die Werte für LDL, Cholesterol und HDL scheinen mit steigender Statindosis leicht abzunehmen. Die Werte für die Triglyceride haben eine leicht steigende Tendenz. Ein Einfluss der Plasma-Lipide auf das thrombozytäre Lipidom kann somit nicht ausgeschlossen werden. Jedoch ist es verständlich, dass Patienten mit höherer Statindosis niedrigere LDL und Cholesterin-Werte haben.





**Abbildung 13: Boxplots der Blutplasma-Lipide in Gruppen mit unterschiedlicher Atorvastatindosis**

Boxplots mit einer Kurve. Gruppen verschiedener Atorvastatindosis: Kein Statin ( $n = 35$ ), 10 mg & 20 mg Atorvastatin ( $n = 12$ ), 40 mg Atorvastatin ( $n = 34$ ) und 80 mg Atorvastatin ( $n = 3$ ). Erstellt mit JMP 15.2.0

### 3.7.2. Einfluss der Komedikation und Begleiterkrankungen

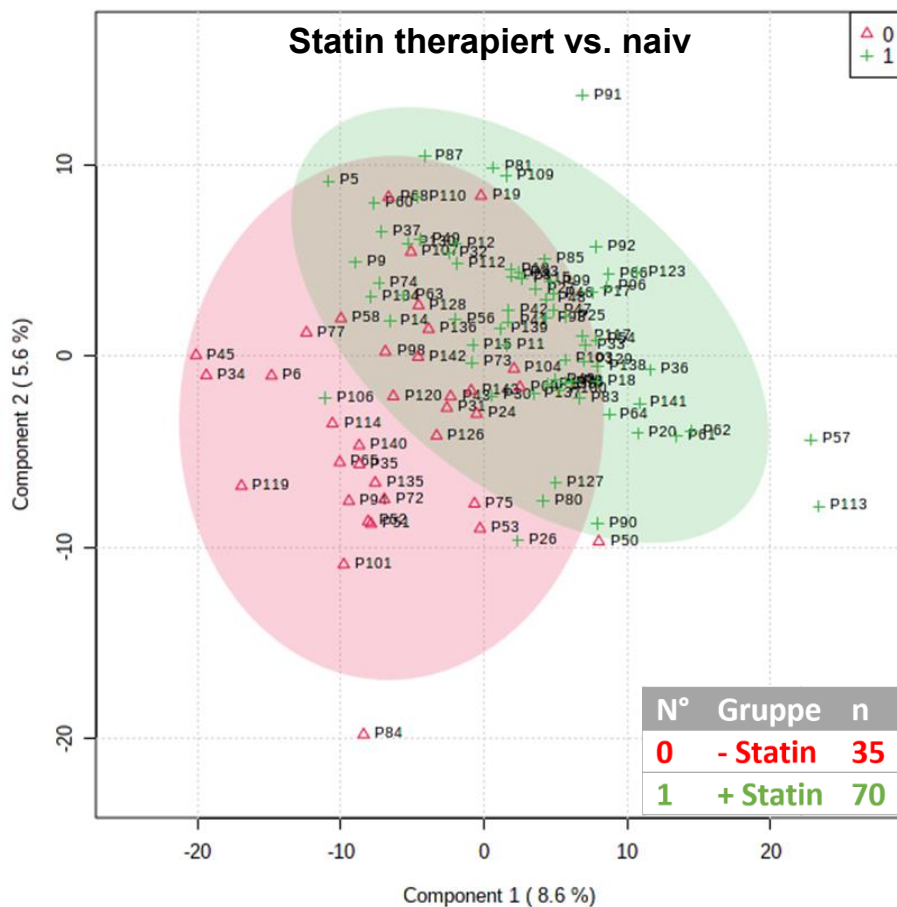
Weitere mögliche Störfaktoren könnten Krankheiten wie Diabetes, Dyslipidämie oder die zeitgleiche Behandlung mit Medikamenten wie ASS, Diuretika,  $\beta$ -Blocker oder P2Y12-Antagonisten sein. Diese sechs möglichen Störfaktoren erwiesen sich in ihrem Vorkommen als signifikant unterschiedlich zwischen dem mit Statin behandelten und unbehandelten Kollektiv (siehe **Tabelle 3**).

Untersucht wurde nun mithilfe Multivariater-Daten-Analyse auf MetaboAnalyst 5.0, ob diese möglichen Störfaktoren auch einen Einfluss auf die Statin-Unterschiede im Lipidom haben.

Verwendet wurde dafür der „partial least squares-discriminant analysis“ (PLS-DA) Algorithmus, welcher für die prädiktive und deskriptive Modellierung in hochdimensionalen Datensätzen verwendet werden kann. Betrachtet man zunächst lediglich das Statin-Modell, lässt sich eine leichte Trennung zwischen beiden Gruppen feststellen (**Abbildung 14**). Die dazugehörigen Parameter der Kreuzvalidierung sind 0,7 Genauigkeit; 0,35  $R^2$  und 0,15  $Q^2$  (**Abbildung 16**). Nun wurden PLS-DA-Untersuchungen für jeden der oben genannten möglichen Störfaktoren zusammen mit den Statin-Gruppen erstellt und in einer Übersicht veranschaulicht (**Abbildung 15**). Die Untergruppen wurden stets nach folgendem Schema gebildet:

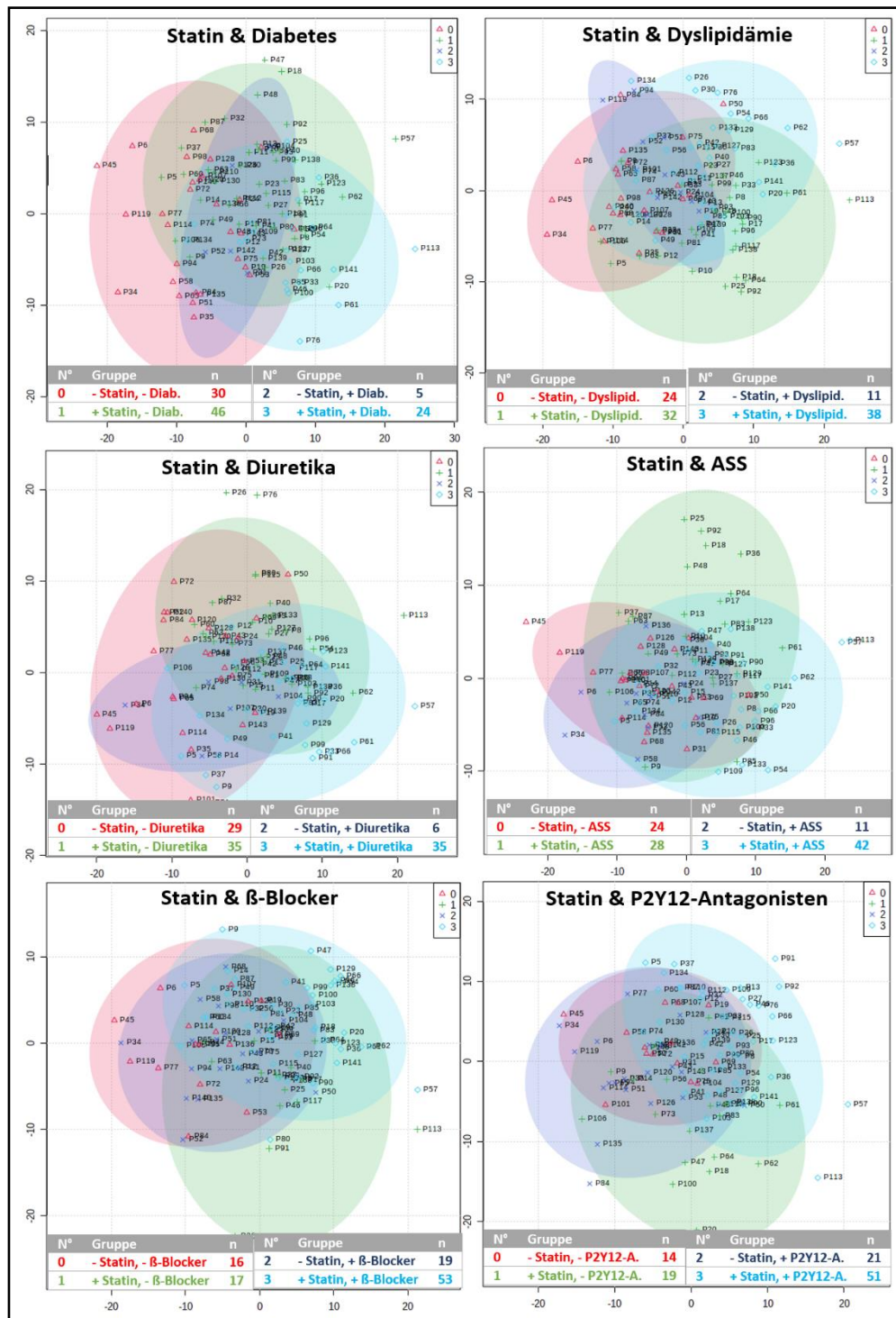
- 0: Kein Statin, kein Störfaktor
- 1: Mit Statin, kein Störfaktor
- 2: Kein Statin, mit Störfaktor
- 3: Mit Statin, mit Störfaktor

Bei einem tatsächlichen Einfluss des Störfaktors auf die Lipidom-Unterschiede durch Statin-Therapie wäre zu erwarten, dass sich die entsprechenden Untergruppen noch stärker voneinander trennen lassen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Alle Gruppen liegen annähernd homogen übereinander. Die niedrigeren Kreuzvalidierungs-Performance-Parameter in **Abbildung 16** bestätigen dies, da kein Modell eine bessere Genauigkeit oder  $Q^2$ -Werte hat als das Statin-Modell allein. Daraus lässt sich annehmen, dass die oben genannten möglichen Störfaktoren keinen relevanten Einfluss auf die gefundenen Lipidom-Unterschiede unter Statin-Behandlung haben.



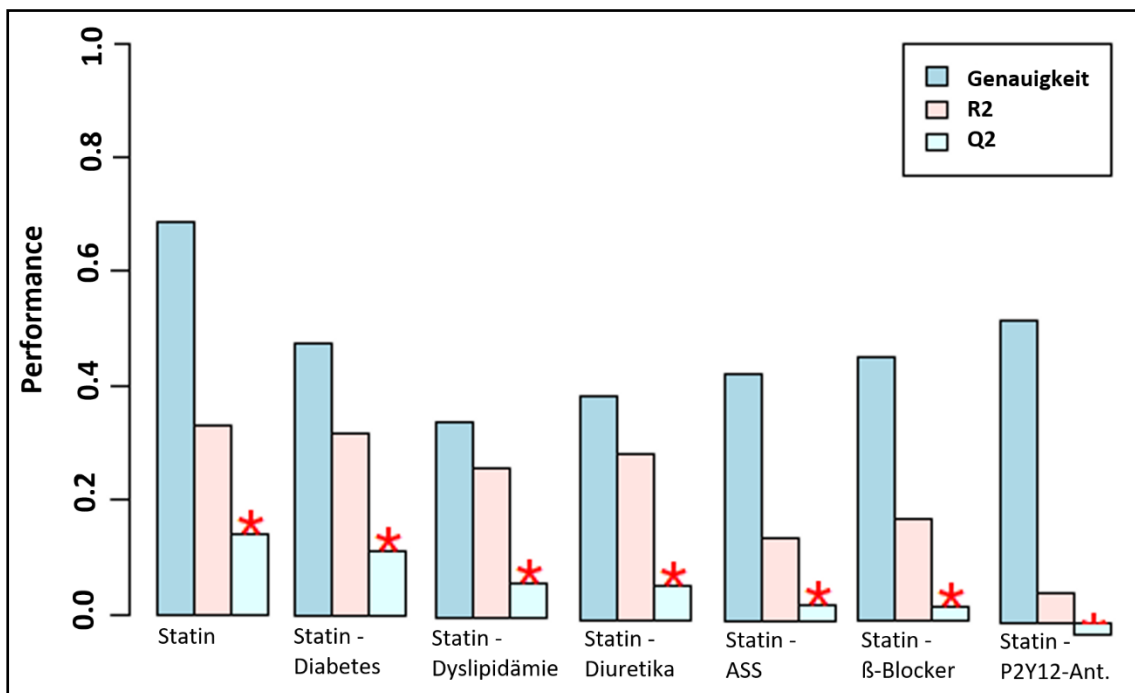
**Abbildung 14: 2-D Scores Plot der PLS-DA mit Statin therapiert vs. nicht-therapiert**

Analysiert wurden die Peak-Intensitäten der mit Statinen therapierten Gruppe (1; grün; n = 70) und die nicht-therapierte Gruppe (0; rot; n = 35). Jeder Punkt steht für einen Patient. Auf den Achsen sind die zwei Hauptkomponenten mit der höchsten für die Trennung verantwortlichen Varianz aufgetragen. Die Prozentzahl der genauen erklärten Varianz steht in Klammern hinter den Hauptkomponenten. Erstellt mit MetaboAnalyst.



**Abbildung 15: Übersicht der 2-D Scores Plots der PLS-DA mit Störfaktoren auf Lipidomveränderungen durch Statin-Therapie**

Dargestellt sind die 2-D Scores Plots der Faktoren Diabetes, Dyslipidämie, ASS, Diuretika, β-Blocker und P2Y12-Antagonisten erstellt mit der PLS-DA-Funktion von MetaboAnalyst. Kleine Tabellen am unteren Rand der Abbildungen zeigen die Untergruppen mit den jeweiligen Patientenanzahlen. Verwendet wurden jeweils die zwei Hauptkomponenten (x-Achse Komponente 1, y-Achse Komponente 2) mit der höchsten für die Trennung verantwortlichen Varianz. Die Prozentzahl der genauen erklärten Varianz steht in Klammern hinter den Hauptkomponenten.



**Abbildung 16: Zusammenfassung aller PLS-DA Kreuzvalidierungs-Performance-Parameter**

Dargestellt sind die PLS-DA-Parameter Genauigkeit,  $R^2$  und  $Q^2$  jedes möglichen Störfaktors. Das Modell Statin behandelt vs. naïv wurde als Vergleich ganz links abgebildet. Um die Vorhersagekraft eines Modells zu prüfen kann  $Q^2$  benutzt werden (roter Stern). Desto höher  $Q^2$ , desto besser das Modell. Negative  $Q^2$ -Werte bedeuten überhaupt keine Vorhersagekraft. Das Statin-Modell allein hat somit die höchste Vorhersagekraft.

### 3.8. Clusteranalyse des Lipidoms

Mithilfe der Clusteranalyse von JMP lassen sich zum einen Lipide mit ähnlichem Verhalten entdecken und somit in Gruppen einordnen. Zum anderen lassen sich auch die Patienten mit ähnlichem Verhalten der Lipide darstellen. Diese Informationen können zum Beispiel dafür benutzt werden, um Rückschlüsse auf eventuelle gemeinsame Stoffwechselwege oder Enzyme zu schließen. Auch könnte es zur Daten-Reduktion benutzt werden, indem Lipidgruppen unter einem „Hauptlipid“ jeder Gruppe zusammengefasst werden. Oder bei Patienten mit ähnlichem Lipidverhalten kann so im Rückschluss ein möglicher Einfluss von BMI, Geschlecht, Alter, Laborwerte, Medikation, ... auf das Lipidom gefunden werden.

Um einen Kompromiss zwischen Übersicht und Trennschäfte zu wählen, wurden die Lipide zunächst in sechs Cluster gruppiert. Die Lipidzusammensetzungen der sechs Cluster sind in dem Balkendiagramm in **Abbildung 17** zusammenfassend dargestellt.

Die Cluster setzten sich hauptsächlich aus folgenden Lipiden zusammen:  
**1. Cluster:** Alle 176 **Sphingolipide** und mit 366 den Großteil der **(Glycero-)Phospholipide**.

**2. Cluster:** Das inhomogenste Cluster bestehend aus 101 **(Glycero-)Phospholipide**, 82 **Glycerolipide**, 21 **Fettsäure-Derivate** und allen **Sterinen** (7).

**3. Cluster:** Ist das kleinste Cluster und besteht lediglich aus zwei **Glycerolipide** (**TG 16:0-18:0-18:0** und **TG 57:2**)

**4. Cluster:** Besteht aus allen **oxidierten Phospholipiden** (10) und **PC 36:6e**

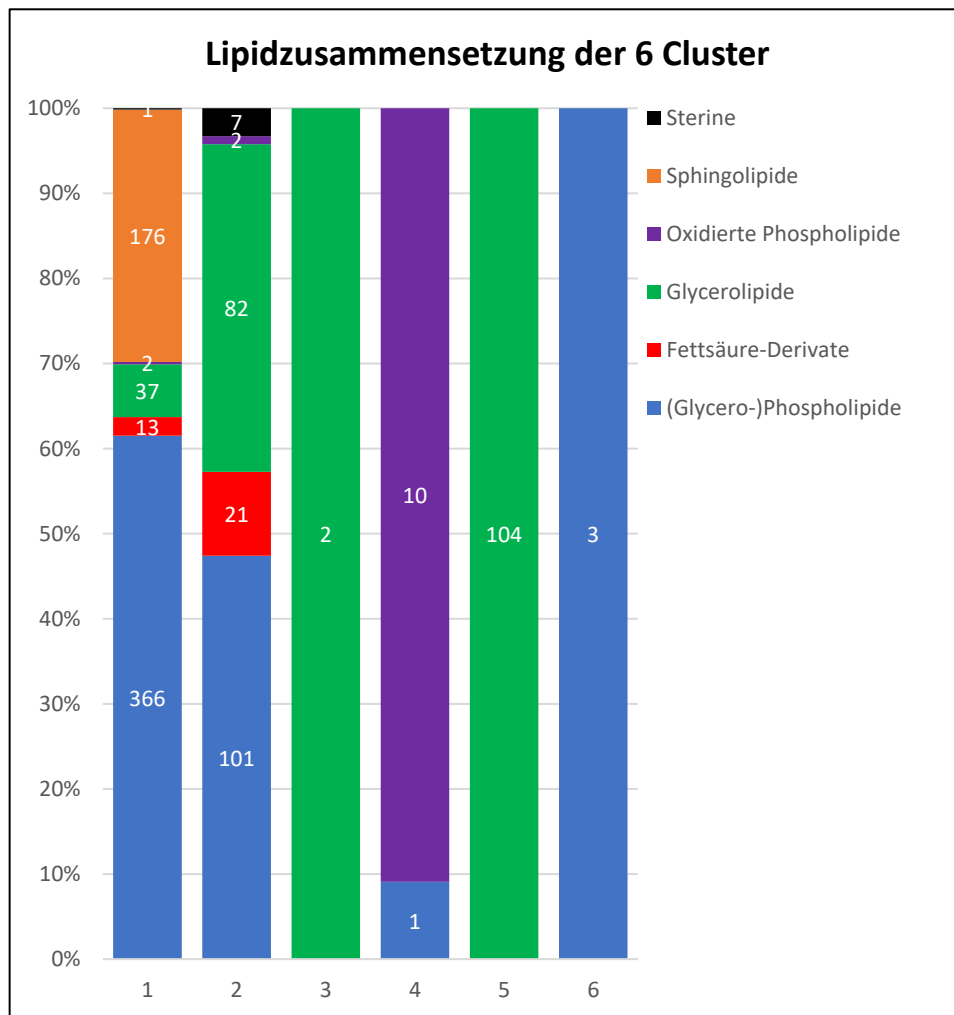
**5. Cluster:** Beinhaltet ausschließlich 104 **Glycerolipide**

**6. Cluster:** Mit lediglich 3 **(Glycero-)Phospholipide** ein weiteres kleines Cluster (**PC 18:0**, **PC 20:0** und **PC 10:0-20:4**).

Die zwei Triglyceride von Cluster 3 sind in keinem Test signifikant aufgefallen, müssen sich aber sehr ähnlich und spezifisch im Gegensatz zu den anderen Lipiden verhalten, damit sie zusammen gruppiert werden.

Cluster 6 enthält die drei am meisten hochregulierten Lipide im ACS vs. CCS-Kollektiv und am stärksten runterregulierten Lipide bei Statintherapie: **PC 18:0**,

PC 20:0 und PC 10:0-20:4 (**Abbildung 9**). Da die Clusteranalyse unabhängig von CAD-Diagnose oder Medikation lediglich Anhand des Verhaltens der Peak-Intensitäten die Lipide gruppiert, sind diese drei Lipide metabolisch besonders eng miteinander Verbunden und besitzen eine ganz distinkte Dynamik. Cluster 4 enthält alle Oxylipine und PC 36:6e. Auch hier liegt die Vermutung eines gemeinsamen Pathways mit gemeinsamen Enzymen nahe.



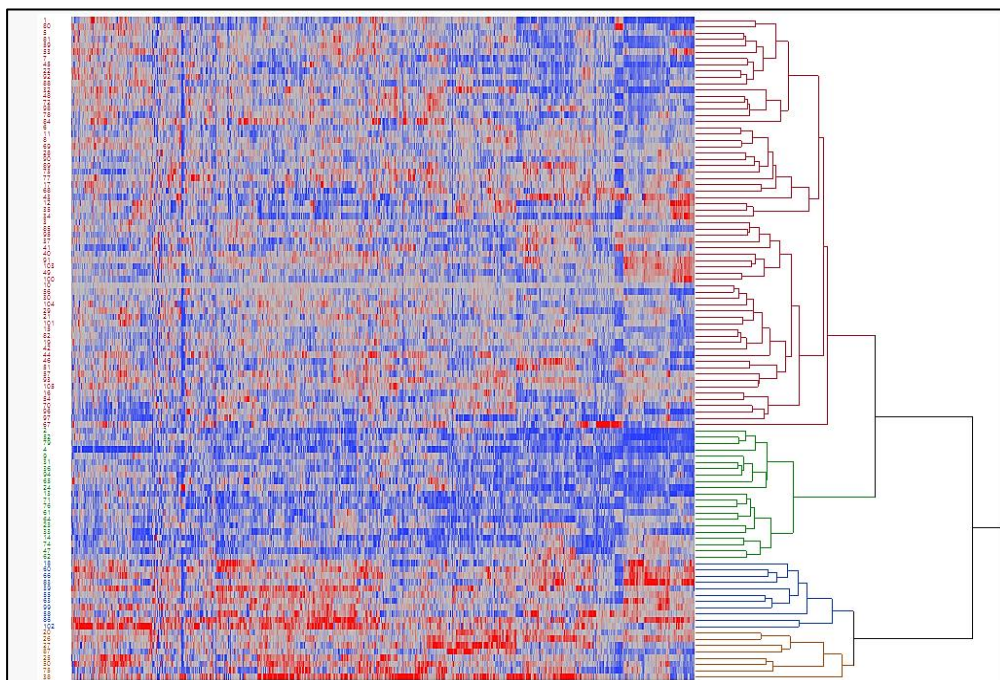
**Abbildung 17: Lipidzusammensetzung der 6 Cluster**

Dargestellt sind die mit JMP Hierarchical Clustering entstandenen 6 Cluster auf der x-Achse. Die gestapelten Balken mit ihren verschiedenen Anteilen stehen für die prozentuale Lipidaufteilung des einzelnen Clusters. Diese Aufteilung in die sechs Lipid-Hauptgruppen wurde farblich entsprechend der Legende hervorgehoben. Die Zahlen in den Balken ist die absolute Anzahl der Lipide. Benutzte Clustermethode war Ward.



Um der Frage nachzugehen, ob es Gemeinsamkeiten unter den anhand ihres Lipidom-Verhaltens statistisch gruppierten Patienten gibt, wurde eine weitumfassende statistische Analyse durchgeführt. Zunächst wurden analog zu der oben beschriebenen Gruppierung der Lipide, die Patienten in vier Cluster eingeteilt. Diese Anzahl wurde gewählt, da es nur 105 Patienten sind und die Clustergröße sonst zu klein wird, um signifikante Unterschiede festzustellen. Außerdem konnte in der Heatmap der Cluster (Abbildung 18) ein visueller Unterschied im Verhalten dieser 4 Cluster wahrgenommen werden, was eine gute Voraussetzung für wahrhaftige Unterschiede zwischen den Clustern ist. Die Patienten wurden in die folgenden Cluster gruppiert:

1. **Cluster:** 65 Patienten
2. **Cluster:** 21 Patienten
3. **Cluster:** 11 Patienten
4. **Cluster:** 8 Patienten



**Abbildung 18: Heatmap mit Dendrogramm der Patientencluster**

Die Heatmap zeigt das Ergebnis der Clusteranalyse der Patienten mit JMP im Rot-Blau-Farbverlauf. Rot steht für erhöhte Peak-Intensitäten und blau für niedrige Werte. Das Dendrogramm rechts visualisiert das Ergebnis der Cluster-Berechnung nach Ward. Die vier Cluster sind farblich hervorgehoben und lassen sich auch visuell in der Heatmap plausibel voneinander abgrenzen.



Vor der Analyse wurden Patienten mit unvollständigen Daten in den Parametern herausgefiltert. Anschließend wurden die Patienten in den Clustern auf gemeinsame Charakteristika anhand der folgenden Parametern untersucht:

- **Biometrische Daten:** Geschlecht, Alter, BMI
- **Wichtige Laborparameter:** Cholesterol, LDL, HDL, Triglyceride, C-RP, Thrombozyten, Leukozyten, Kreatinin, GFR-MDRD, INR, PTT, GPT, LDH
- **Medikation:** ACEI, ATII-Blocker, Aldosteronantagonist, Diuretika, Calciumkanalblocker, Statine, Statintyp, Statindosis, ASS, Loading-Dosen, Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor
- **CAD-Diagnose:** sAP, iAP, STEMI, NSTEMI, ACS vs. CCS

Unter all den untersuchten Parametern waren bis auf vier Ausnahmen kaum auffällige Unterschiede zwischen den Clustern festzustellen. Lediglich das Alter, der C-RP-Wert und die Medikamenteneinnahme von ATII-Blocker und Aldosteron-Antagonisten, welche beide von keinem der sechs Patienten in Cluster 4 eingenommen wurden, waren auffällig.

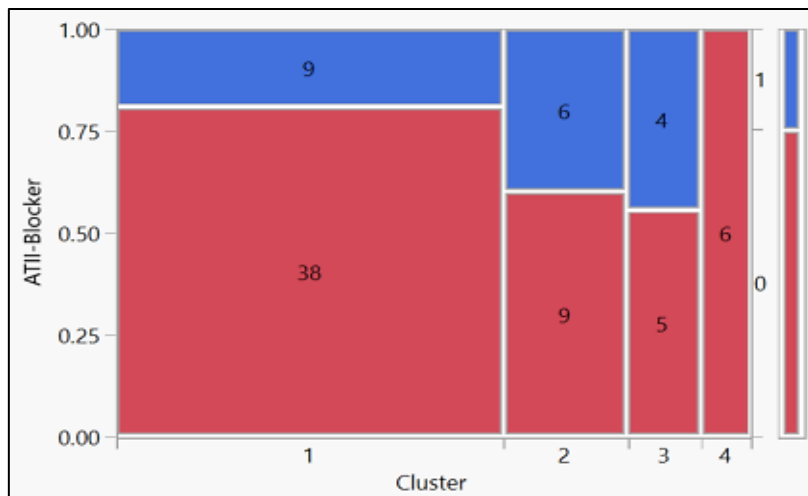
**Alter** (p-value 0,015): Die Ergebnisse der ANOVA des Alters ist in **Abbildung 19** abgebildet. Außerdem hat das Alter, anders als der C-RP-Wert eine Normalverteilung der Residuen und besteht damit die Prüfung der Abweichung des durch das mathematische Modell vorhergesagten Wertes vom tatsächlich beobachteten Wert. Dies ist somit der statistisch signifikanteste Unterschied.

**C-RP** (p-value 0,0002): Signifikantes Ergebnis in der ANOVA, jedoch keine Normalverteilung der Residuen.

**Aldosteron-Antagonisten** (p-value 0,486): Erreicht im Chi-Quadrat-Tests nach Pearson nicht das Signifikanzniveau von 0,05 und ist damit nicht signifikant. Jedoch können diese Werte des Chi-Quadrat-Testes nur eingeschränkt betrachtet werden, da die Voraussetzung von mindestens fünf Fällen pro Zelle bei den Aldosteron-Antagonisten in drei Zellen nicht gegeben ist.

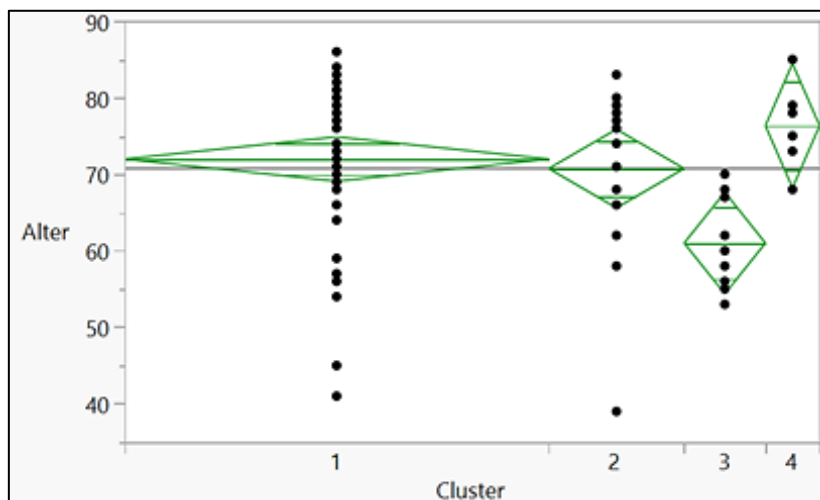
**ATII-Blocker** (p-value 0,089): Ebenfalls nicht signifikant im Chi-Quadrat-Test, jedoch unter all den Chi-Quadrat-Tests das Ergebnis mit dem kleinsten p-value, weshalb es zur Veranschaulichung in **Abbildung 20** dargestellt wurde. Dennoch können auch hier die Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests nur eingeschränkt in Betracht gezogen werden, da die Mindestanzahl der Fälle von fünf Fällen pro

Zelle in zwei Zellen nicht gegeben ist. Hierfür wäre ein größeres Patientenkollektiv notwendig.



**Abbildung 19: Mosaik-Plot der mit ATII-Blocker behandelten Patienten innerhalb der 4 Cluster**

Die mit JMP erstellte Abbildung zeigt die Patienten aufgeteilt in 4 Cluster und deren Anzahl an mit ATII-Blockern behandelten Patienten. Rot (0) heißt unbehandelt und blau (1) steht für ATII-Blocker-Einnahme. Cluster 1  $n=47$ , Cluster 2  $n=15$ , Cluster 3  $n=9$ , Cluster 4  $n=6$ . Der  $p$ -value des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson ist mit 0,089 nicht unterhalb der Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$ .



**Abbildung 20: Vergleich des Altersmittelwerts der 4 Cluster**

Die Abbildung erstellt mit JMP zeigt die Patienten aufgeteilt in 4 Cluster und deren Mittelwerte des Alters (in Jahren) in dem jeweiligen Cluster. Cluster 1  $n=47$ , Cluster 2  $n=15$ , Cluster 3  $n=9$ , Cluster 4  $n=6$ . Der  $p$ -value der ANOVA ist 0,015 und die Residuen sind normalverteilt.

### 3.8.1. Patientencharakteristika der HighOx-Gruppe

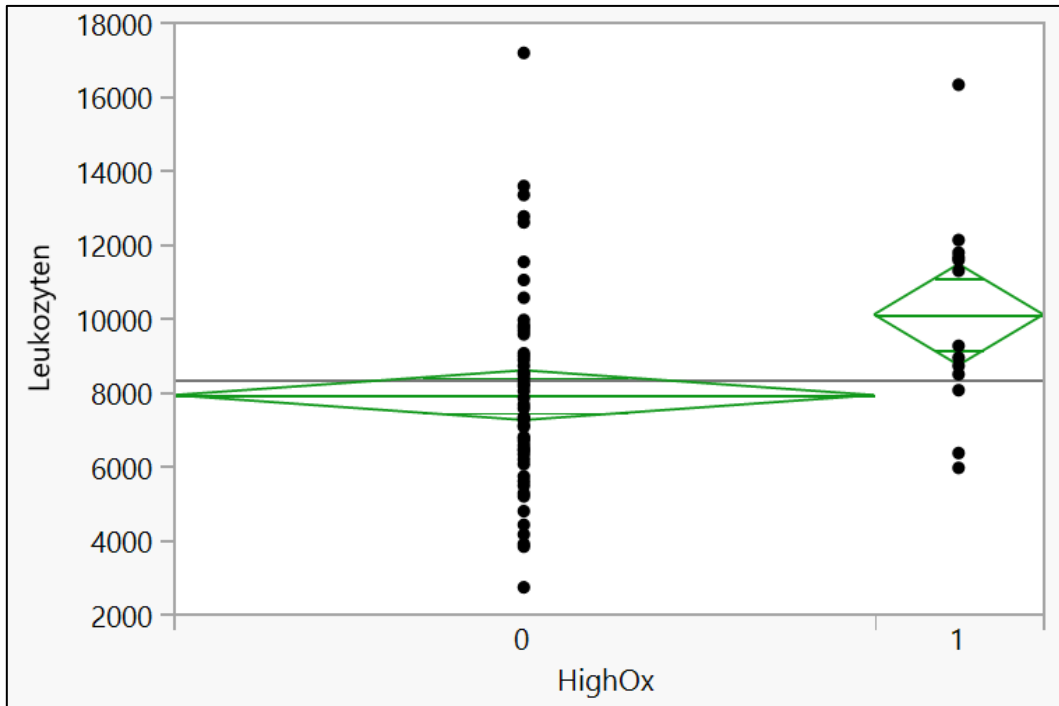
Aus den bisherigen Analysen, wie zum Beispiel dem Statin-Volcano-Plot, dem Fold Change oder der Cluster-Analyse waren die oxPL als auffällige Gruppe erkennbar. Daraufhin wurden die top 15 Patienten mit den in Summe höchsten Peak-Intensitäten bei allen oxPL im Vergleich zu den anderen Patienten genauer untersucht. Das Ziel war, auffällige Unterschiede bei den Patientencharakteristika zwischen diesen „High-Ox“-Patienten und den anderen Patienten zu finden, und damit auf eine eventuelle Auswirkung dieser Charakteristika auf das Lipidom zu schließen.

Die oxPL setzten sich wie folgt zusammen:

- **6 x OxPC:** OxPC(16:0/12-HETE); OxPC(16:0/14-HDPA-n3); OxPC(18:1/12-HETE); OxPC(16:0/14-HAdA); OxPC(18:0/12-HETE)
- **4 x OxPE:** OxPE(P-16:0/14-HAdA); OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3); OxPE(16:0/14-HDPA-n3)
- **2 x OxPI:** OxPI(18:1/12-HETE); OxPI(18:0/12-HETE)
- **1 x OxPG:** OxPG 18:0-18:0+10(1Cyc)
- **1 x OxPS:** OxPS (826)

Ähnlich der vorangegangenen Analyse der Gemeinsamkeiten der Patienten in den Clustern, wurden hier nochmals die gleichen Patientencharakteristika untersucht (Alter, Geschlecht, BMI, Laborparameter, Medikation, CAD-Diagnose). Patienten mit unvollständigen Daten in diesen Parametern wurden von der Analyse ausgeschlossen.

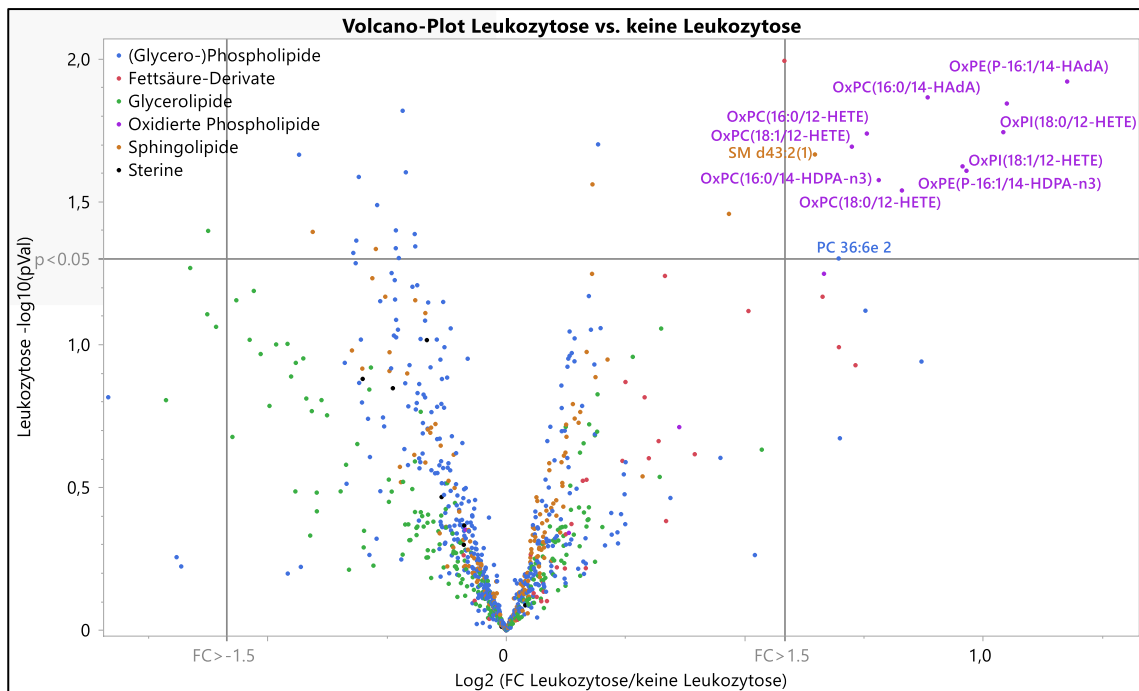
Unter all den untersuchten Parametern war lediglich ein Ergebnis auffällig und signifikant: Die Leukozytenanzahl. Sie war in der Gruppe mit erhöhten oxidierten Phospholipiden erhöht. Mit einem signifikanten p-value der ANOVA von 0,0056 und einer Normalverteilung der Residuen in der Validierung der Ergebnisse, ist dieses Ergebnis eindeutig als auffällig zu bewerten. Die Mittelwerte der Leukozyten in den zwei Gruppen normale oxPL-Konzentration und erhöhte OxPL-Konzentration (HighOx) sind in **Abbildung 21** dargestellt.



**Abbildung 21: Vergleich der Leukozytenzahl der Gruppen HighOx vs. Normal**  
 Die mit JMP erstellte Abbildung zeigt die Patienten aufgeteilt in zwei Gruppen und deren Mittelwerte der Leukozytenzahl (pro Mikroliter) in der jeweiligen Gruppe. Gruppe 0 mit normaler oxPL-Konzentration  $n=77$  (Normal), Gruppe 1 mit erhöhter OxPL-Konzentration  $n=15$  (HighOx). Der  $p$ -value der ANOVA ist 0,0056 und die Residuen sind Normalverteilt.

### 3.9. Leukozytose assoziiert mit erhöhten oxidierten Phospholipiden

In der vorherigen Analyse der HighOx-Gruppe wurde festgestellt, dass Patienten mit erhöhten oxidierten Phospholipiden ebenfalls erhöhte Leukozyten haben. Nun soll im Umkehrschluss untersucht werden, ob Patienten mit Leukozytose auch erhöhte oxidierte Phospholipide haben. Dafür wurde ein Volcano-Plot ähnlich zu dem Volcano-Plot Statin vs. Unbehandelt aus **Abbildung 5** erstellt. In dem Volcano-Plot wurden alle Patienten mit bekannten Leukozyten-Laborwerten (n = 103) aufgeteilt in Patienten mit Leukozytose (>10.000 Leukozyten; n = 21) und Patienten ohne Leukozytose (<10.000 Leukozyten; n = 82). Dabei waren 31 Lipide signifikant ( $p < 0,05$ ). Jedoch bestand kein Lipid die SGoF-FDR-Korrektur. Dennoch hatten von diesen 31 Lipiden 12 einen positiven Fold Change von über 1,5. Das heißt, 12 Lipide sind bei Patienten mit Leukozytose auffällig erhöht. Diese Lipide mit  $p < 0,05$  und Fold Change größer als 1,5 sind in **Tabelle 17** genauer aufgelistet und wurden im Volcano-Plot beschriftet. Wie zu erwarten war, gehören 10 der 12 Lipide zu den oxidierten Phospholipiden.



**Abbildung 22: Volcano-Plot der Lipidomveränderungen bei Patienten mit Leukozytose**

Die x-Achse gibt den Logarithmus zur Basis 2 des Fold Changes (FC) der Lipid-Peak-Intensitäten (Leukozytose/keine Leukozytose) an. Positive FC-Werte bedeuten eine Hochregulierung und negative FC-Werte eine Herunterregulierung. Die y-Achse zeigt den negativen Logarithmus zur Basis 10 der p-values der one-way ANOVA. Der Grenzwert für signifikante Lipide ist 1,3 ( $p < 0,05$ ). Der Grenzwert des Fold Changes ist 1,5.

**Tabelle 17: Hochregulierte Lipide bei Leukozytose**

Alle Lipide mit  $p < 0,05$  und FC über 1,5 ohne SGoF-FDR-Korrektur aus der one-way ANOVA von Patienten mit Leukozytose vs. ohne. Sortiert absteigend nach Fold Change und rot gefärbt für die Hochregulierung. Angegebenes Cluster ist aus der JMP Variable Cluster Analyse (Tabelle 4).

FC	P-Value	N°	Cluster	Hauptgruppe	Klasse	Lipidname
2.260	0.012	772	13	Oxidierte Phospholipide	OxPE	OxPE(P-16:0/14-HAdA)
2.070	0.014	841	13	Oxidierte Phospholipide	OxPS	OxPS (826)
2.059	0.018	927	13	Oxidierte Phospholipide	OxPI	OxPI(18:0/12-HETE)
1.952	0.025	778	13	Oxidierte Phospholipide	OxPE	OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3)
1.941	0.024	925	13	Oxidierte Phospholipide	OxPI	OxPI(18:1/12-HETE)
1.845	0.014	899	13	Oxidierte Phospholipide	OxPC	OxPC(16:0/14-HAdA)
1.777	0.029	900	13	Oxidierte Phospholipide	OxPC	OxPC(18:0/12-HETE)
1.718	0.027	896	13	Oxidierte Phospholipide	OxPC	OxPC(16:0/14-HDPA-n3)
1.689	0.018	863	13	Oxidierte Phospholipide	OxPC	OxPC(16:0/12-HETE)
1.652	0.020	897	13	Oxidierte Phospholipide	OxPC	OxPC(18:1/12-HETE)
1.621	0.050	827	13	(Glycero-)Phospholipide	PC	PC 36:6e
1.566	0.022	406	54	Sphingolipide	SM	SM d43:2(1)

## **4. Diskussion**

### **4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die Hauptergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. MetaboAnalyst als frei zugängliche online-Plattform ist eine einfache und schnelle Alternative zu herkömmlichen Statistikprogrammen in der Metabolomics Forschung
2. In Anbetracht der gesamten chronischen Medikation haben die Statine den stärksten und signifikantesten Einfluss auf das Lipidom
3. Herabregulierte Lipide sind vorwiegend aus der Klasse der PC
4. Hochregulierte Lipide sind vorwiegend aus der Klasse der TG und oxPL
5. Statin-Lipidomveränderungen sind dosisabhängig
6. Statin-Lipidomveränderungen sind unabhängig gegenüber Einflussfaktoren wie Medikamente oder Begleiterkrankungen
7. Erhöhte Leukozyten führen zu erhöhten oxPL in den Thrombozyten

### **4.2. Diskussion der Methoden**

#### **4.2.1. Chancen und Limitationen von MetaboAnalyst**

Diese Studie untersuchte erstmalig genauer die Auswirkungen der Statin-Medikation auf das Lipidom der Thrombozyten. Nach der Aufbereitung und Isolation der Thrombozyten aus 105 symptomatischen KHK-Patienten erfolgte die Analyse der Lipide in den Thrombozyten mittels etablierter non-targeted Massenspektrometrie und Liquid-Chromatographie UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS (O'Donnell et al., 2014).

Anschließend wurden die Peak-Intensitäten der einzelnen gefundenen Lipide explorativ mittels verschiedener statistischer Tests und Statistikprogrammen zwischen der mit Statinen behandelten und der mit Statinen unbehandelten Gruppe untersucht. Verwendet wurde zum einen die online frei zugängliche Plattform MetaboAnalyst 5.0 und das offline Statistikprogramm JMP® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Im Folgenden sollen die Erfahrungen, Vor- und Nachteile der Arbeit mit MetaboAnalyst im Rahmen dieser Studie diskutiert

werden.

Die online Plattform ist mit mehreren tausend täglichen Nutzern ein etabliertes Verfahren in der Metabolomics-Forschung (Pang et al., 2022). Die Website ist intuitiv aufgebaut, schnell zu verstehen und Analyseschritte lassen sich untersucherunabhängig leicht nachvollziehen und reproduzieren. Die Plattform kann gratis, ohne Anmeldung und ohne vorherigen Download jederzeit online verwendet werden, was ein großer Vorteil gegenüber herkömmlichen kostenpflichtigen offline Programmen wie JMP® oder SPSS ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass MetaboAnalyst spezifisch auf die Metabolomics-Forschung ausgelegt ist. So können verschiedenen Daten-Formate wie Peakintensitäts-Listen, MS-Rohspektren, Spektral-Bin-Listen oder Compound-Concentration-Listen hochgeladen werden. Die vorhandenen Analysemethoden sind ebenfalls die geläufigsten in der Metabolomics-Forschung und reichen von der Verarbeitung von MS-Rohspektren, einer Vielzahl an Datenverarbeitungs- und Normalisierungsverfahren, über statistische Analysen, funktionelle Analysen, Meta-Analysen bis hin zu integrativen Analysen mit anderen Omics-Daten. In dieser Arbeit wurden die Schritte von den Rohdaten der Kombinationsassays bis zu den finalen Peak-Intensitäten mit mehreren Programmen wie der MS-Dial-Software Multiquant, der LipidBlast-Datenbank und zur grafischen Kategorisierung mit OmniGraffle durchgeführt. Vieles davon hätte man auch allein mit MetaboAnalyst durchführen können. Ein Vergleich oder eine Validierung von Studienergebnissen mit den verschiedenen Analyse-Methoden ist für zukünftige Arbeiten sicherlich interessant. Ein solcher Vergleich wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der einfaktoriellen Statistikanalyse durchgeführt. Die Vergleiche der Ergebnisse der Volcano-Plots mit MetaboAnalyst und JMP sind weiter unten aufgeführt.

Limitationen bei der Arbeit mit MetaboAnalyst waren zunächst die umständliche Umwandlung von Excel-Tabellen in Text-Dateien (.txt). Anschließend folgten die Datenfilterung und Normalisierung. Dabei wurden die Ergebnisse des Filterns, zum Beispiel wie viele und welche Daten gefiltert wurden, leider nicht angezeigt. Bei den Analysen des p-values, des Fold Changes und der Volcano-Plots gibt es einerseits nicht viele komplexe Einstellungen zu tätigen und eine anschauliche Visualisierung der Daten gelingt in wenigen Schritten. Andererseits ist es somit



auch nicht möglich mit MetaboAnalyst spezifische Einstellungen zu tätigen, wie ein Farben-Label der verschiedenen Lipid-Hauptgruppen oder individuelle Beschriftungen. Dafür sind Programme wie der Graph Builder von JMP besser geeignet.

Außerdem lässt sich auf MetaboAnalyst die Art der Korrektur des multiplen Testens (FDR) nicht einstellen. Es gibt lediglich die Benjamini-Hochberg-Methode, welche eine Weiterentwicklung der sehr konservativen Bonferroni-Korrektur ist und mehr Power als diese hat. Im Vergleich dazu hat die SGoF-Methode jedoch eine steigende Power mit der Anzahl an Tests (Carvajal-Rodríguez et al., 2009) und ist somit noch „gütiger“ als die „strengere“ FDR-Methode nach Benjamini-Hochberg. Es bleiben somit mehr signifikante Ergebnisse übrig. Konservative/ strengere Tests haben andererseits den Vorteil, dass die Fehler vom Typ I (falsch-positive Ergebnisse) sehr gering gehalten werden. Jedoch können dabei auch interessante Lipidveränderungen übersehen werden, wie die unterschiedlichen Ergebnisse der Volcano-Plots von **Abbildung 5** und **Abbildung 8** zeigen. Denn ohne vorherige Daten-Normalisierung auf MetaboAnalyst, hätte die FDR-Methode nach Benjamini-Hochberg nur ein signifikantes Lipid bei  $p < 0,05$  und  $FC > 1,5$  übriggelassen, wohingegen bei der SGoF-Methode acht Lipide signifikant blieben. In der Metabolomics-Forschung gibt es häufig mehrere tausend Metabolite und meist nur geringe, aber trotzdem wichtige Unterschiede. Genau für solche hochdimensionalen, biologischen Daten wurde die SGoF-Methode entwickelt und kann hiermit auch für zukünftige Analysen empfohlen werden.

Zusammenfassend lässt sich somit folgendes für MetaboAnalyst im Vergleich zu JMP festhalten: Es können viele verschiedene aufwendige Analysen schneller, einfacher, übersichtlicher und ohne kostenpflichtige Software durchgeführt werden. Nach kurzer Einarbeitung können innerhalb weniger Klicks aussagekräftige Schaubilder erstellt werden. Es liefert außerdem hilfreiche Inspirationen über weitere mögliche Tests. Allerdings hat es kaum Vorteile für erfahrene JMP oder R Experten, die schon genau wissen, was sie wie analysieren wollen. Ebenfalls kommt man bei speziellen Anforderungen an die Analysen und Schaubilder schließlich an die Grenzen von MetaboAnalyst.

### **4.3. Diskussion der Ergebnisse**

#### **4.3.1. Lipidomveränderungen durch chronische Medikation**

Die betrachteten Patienten in dieser Arbeit hatten alle eine symptomatische KHK und erhielten deswegen eine Herzkatheteruntersuchung, bei welcher die Blutproben zur Analyse des Lipidoms entnommen wurden. Die Blutentnahme erfolgte vor der Gabe des Heparinloadings. Zur Analyse der Auswirkungen der Medikation auf das Lipidom wurde sich auf die chronische Medikation, im Abgleich mit dem Medikamentenplan der Patienten, beschränkt. Die Akutmedikation des Notarztes auf dem Weg zum Krankenhaus wurde somit aus Gründen der Ungewissheit der Beeinflussungsgeschwindigkeit des Lipidoms nicht berücksichtigt. Bei Studien mit einer Blutentnahme NACH dem Loading oder PCI sollten diese Parameter als mögliche Einflussfaktoren auf das Lipidom berücksichtigt werden. Denn es wurde schon gezeigt, dass eine Myokard-Reperfusion innerhalb der ersten 24 Stunden nach Intervention signifikante Veränderungen in dem Blutplasma-Lipidom hervorrufen kann (Surendran et al., 2022).

Mit in die Analyse aufgenommen wurden insgesamt 15 verschiedene Medikamente. Deren Einfluss auf das thrombozytäre Lipidom wurde mit Volcano-Plots oder dessen zwei Komponenten, dem Fold Change (Stärke der Ausprägung) und dem p-value (Signifikanz), untersucht. Nach der SGoF-Multiples-Testen-Korrektur hatten lediglich noch drei Medikamente signifikante Lipidom-Unterschiede: Diuretika, P2Y12-Inhibitoren und Statine (**Tabelle 3**).

##### **Diuretika**

Die Anzahl der auffälligen Lipide der Diuretika war mit 16 signifikanten Lipiden nach SGoF-FDR-Korrektur und nur einem Lipid mit Fold Change über 1,5 sehr gering (**Abbildung 4**). In Anbetracht der häufigen Komedikation mit Statinen wird diese Auffälligkeit vorwiegend mittels Störfaktoren erklärt.

##### **P2Y12-Inhibitoren**

Die P2Y12-Inhibitoren wurden ebenfalls signifikant häufiger zusammen mit Statinen gegeben. So erhielten 34% der Patienten mit Statintherapie ebenfalls P2Y12-Inhibitoren und lediglich 9% der Patienten ohne Statintherapie erhielten P2Y12-Inhibitoren. Betrachtet man die Anzahl der signifikanten Lipide nach

SGoF-Korrektur fällt auf, dass bei den P2Y12-Inhibitoren gesamt kein Lipid signifikant war (**Abbildung 4**). Nur bei der Betrachtung von Ticagrelor und Clopidogrel einzeln waren es 13 signifikante Lipide bei Ticagrelor und 25 Lipide bei Clopidogrel. Im Fold Change hatten beide eine mit den Statinen vergleichbare große Anzahl an Lipiden über dem Wert von 1,5. Eine Erklärung für die ausbleibende Signifikanz bei gemeinsamer Betrachtung von Clopidogrel und Ticagrelor könnten die jeweils sehr unterschiedlichen Lipidveränderungen sein. Denn während bei Clopidogrel hauptsächlich Lysophosphatidylcholin (LPC) (**LPC 20:4; LPI 20:4; LPC 22:6; LPE 18:2; LPC 20:4/0:0; ...** siehe **Tabelle 6**) hochreguliert sind, sind die hochregulierten Lipide bei Ticagrelor hauptsächlich TG und ein DG (**DG 18:2-20:3; TG 60:10(1); TG 56:9(2); TG 16:0-20:4-22:6; TG 58:10** siehe **Tabelle 7**). Bei Ticagrelor ebenfalls sehr signifikant hochreguliert, jedoch knapp nicht über dem Fold Change von 1,5 und deswegen nicht in der **Tabelle 7** aufgeführt sind die Sphingolipide (**Cer-NS d18:2/16:0; Cer-NS d16:1/16:0**). Verglichen mit der Literatur wurden bei der Arbeit von Tobias Harm (Harm, 2022) die P2Y12-Inhibitoren lediglich gesamt betrachtet. Dabei wurden neben den hier beschriebenen LPC vorwiegend hochregulierte PC entdeckt. Jedoch hatte keines der signifikanten Lipide ebenfalls einen Fold Change von über 1,5. Erklärt wurde diese bis dato neue Erkenntnis mit einer ADP-Rezeptor vermittelten Inhibierung der Plättchenaktivierung und eine daraus resultierende Veränderung der thrombozytären Plasmamembran (Harm, 2022). Die erste und bisher einzige Studie zu diesem Thema beschreibt die in vitro Auswirkungen von Ticagrelor auf die thrombozytäre Plasmamembran (Lagoutte-Renosi et al., 2021). Ticagrelor soll mit einer Erhöhung von Cholesterol und PC-Ethern mit kurzen gesättigten Ketten (16:0/16:0) und einer Erniedrigung von PC zu einer insgesamt Membranversteifung führen. Zusätzlich soll Ticagrelor die Mikrolipidumgebung der plasmamembrangebundenen Rezeptoren beeinflussen. Von einem langanhaltenden Einfluss auf die Lipidzusammensetzung der Thrombozyten-Membran und deren Funktion wird somit ausgegangen. Diese Lipid-Veränderungen lassen sich jedoch in den hier erhobenen Daten nicht wiederfinden. Hier waren bei Ticagrelor vor allem VLCFA und LCFA PUFA TG hochreguliert (**Abbildung 7**). Jedoch kann man diese Studien schwer vergleichen, da für diese Dissertation, anders als die Studie von Lagoutte-Renosi

et al., nicht nur die Lipide der Membran der Thrombozyten analysiert wurden, sondern die gesamten Thrombozyten.

Außerdem befinden sich in diesem Kollektiv von 105 Patienten jeweils nur 12 Patienten, welche mit Clopidogrel beziehungsweise Ticagrelor behandelt wurden. Daher empfiehlt es sich die Auswirkungen dieser Medikamente an einem größeren Kollektiv genauer zu untersuchen und dies bestenfalls mit einem speziell dafür konzipiertem Studiendesign. Dabei wäre es vorteilhaft auch die Plasmamembran gesondert von dem Rest der Thrombozyten zu analysieren.

### **Statine**

Die eindeutigsten Ergebnisse bei der Frage nach Auswirkungen der Medikation auf das Lipidom lieferten die Statine. Im Gegensatz zu den P2Y12-Inhibitoren basieren die Analysen der Statin-Medikation auf einem größeren Patientenkollektiv mit insgesamt 70 Patienten mit und 35 Patienten ohne Statintherapie. Die Statine gesamt haben mit 165 signifikanten Lipiden nach SGoF-FDR-Korrektur die meisten signifikant veränderten Lipide in Bezug auf die Medikation. Danach folgt Atorvastatin einzeln mit 90 Lipiden und Simvastatin mit 25 Lipiden. Erst danach folgt Clopidogrel. Außerdem haben die Statine, vor allem Atorvastatin, die meisten Lipide mit einem Fold Change über 1,5 (**Abbildung 4**). Nimmt man die beiden Grenzwerte  $p < 0,05$  nach SGoF und Fold Change  $> 1,5$  zusammen, bleiben bei den Statinen gesamt immerhin 8 Lipide übrig. Des Weiteren ist im Vergleich zu den P2Y12-Inhibitoren hervorzuheben, dass die auffällig veränderten Lipide bei den 19 Patienten mit Simvastatin sehr ähnlich zu den auffälligen Lipiden bei den 49 Atorvastatin Patienten sind. Deswegen lassen sich die meisten Analysen auch mit dem großen Statin-Kollektiv (Simvastatin + Atorvastatin) durchführen. Aus diesen oben aufgeführten Gründen wurde sich in dieser Arbeit auf die genauere Analyse und den Einfluss der Statine auf das thrombozytäre Lipidom konzentriert.

#### **4.3.2. Lipidomveränderungen unter Statintherapie – Lipide im Fokus**

Unter Hinzunahme aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen soll eine zusammenfassende Beurteilung der thrombozytären Lipidomveränderungen bei Statintherapie erfolgen. Die auffälligsten Lipide sollen hervorgehoben und in einen wissenschaftlichen Kontext mit Erklärungen der Ursache, Zusammenhänge und deren medizinische Bedeutung eingeordnet werden. Zunächst sollen die insgesamt auffälligsten herabregulierten Lipide betrachtet werden und anschließend die auffälligsten hochregulierten Lipide. Diese nachfolgenden Betrachtungen wurden nach folgendem Schema aufgebaut:

1. Zunächst folgt jeweils eine Tabelle der im Ergebnisteil unter Punkt 3.6 sinnvoll gruppierten Lipide. Darin sind die Lipide aufgelistet und das jeweilige Vorkommen in der Literatur mit der Quelle und den wichtigsten Stichpunkten aufgeführt.
2. Anschließend wird jede Gruppe mit ihren zugehörigen Lipiden in dem den Tabellen folgenden Fließtext mit der jeweiligen (pathologischen) Bedeutung/Funktion laut Literaturrecherche dargestellt und genauer diskutiert.

### 4.3.2.1. Herabregulierte Lipide

Unter den herabregulierten Lipiden sind vor allem drei auffällige Gruppen hervorzuheben:

1. **Hoher Fold Change:** PC 18:0, PC 20:0, PC 10:0-20:4 und PC 24:0
2. **PC 16-Gruppe:** PC 16:0-18:3(1) und PC 16:0-20:4(1)
3. **PC 40-Gruppe:** PC 40:5, PC 40:2 und PC 40:1

#### GRUPPE 1: Hoher Fold Change

MITGLIEDER: PC 18:0, PC 20:0, PC 10:0-20:4 und PC 24:0

#### ***Tabelle 18: Herabregulierte Lipide mit hohem Fold Change im wissenschaftlichen Kontext***

*Aufgelistet sind die Lipide mit besonders hohem Fold Change. Außerdem sind die wichtigsten Ergebnisse der Literaturrecherche mit dem jeweiligen Fazit der Quelle in Bezug zum Thema dieser Dissertation aufgeführt. ACS: Akutes Koronarsyndrom.*

Lipid	Fazit aus der Literatur	Literatur
PC 18:0 Stearinsäure	Stärkste Erhöhung im ACS-Kollektiv (um Faktor 6,2); erhöht Thrombusbildung und Plättchenaggregation in vitro	(Harm et al., 2022)
PC 20:0 Arachinsäure	Zweitstärkste Erhöhung im ACS-Kollektiv (um Faktor 4,6)	(Harm et al., 2022)
PC 24:0 Lignocerinsäure	Drittstärkste Erhöhung im ACS-Kollektiv (um Faktor 4,3)	(Harm et al., 2022)
PC 10:0-20:4 Caprinsäure & Arachidonsäure	Erhöht im ACS-Kollektiv (Faktor unbekannt)	(Harm et al., 2022)

Sehr bemerkenswert ist, dass diese vier unter Statin-Medikation herabregulierten Lipide, die im ACS-Kollektiv am meisten hochregulierten Lipide waren. Ebenfalls wurde bei Untersuchungen im Vergleich mit Probanden ohne KHK festgestellt, dass diese Lipide nur in geringen Mengen nachgewiesen werden konnten (Harm et al., 2022). Ein positiver Einfluss der Statine auf das thrombozytäre Lipidom von Patienten mit KHK in Richtung dem Lipidom von gesunden Patienten kann somit vermutet werden. Jedoch sei an dieser Stelle auch zu erwähnen, dass diese

Beobachtung auch damit zusammenhängen könnte, dass das ACS-Kollektiv mit 41% Statin-Therapierten signifikant weniger Statine eingenommen hat als das CCS-Kollektiv mit 76% Statin-Therapierten Patienten (Harm et al., 2022). Jedoch wurde in Analysen wie der „t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding“-Analyse (tSNE) oder einer Heatmap eine Einflussnahme der Statine auf die ACS-Lipidom-Alterationen widerlegt (Harm, 2022). In der Folgestudie zeigte eine OPLS-Analyse von Statin vs. kein Statin eine stärkere Trennung der Lipid-Unterschiede im ACS-Kollektiv als im CCS-Kollektiv (Harm et al., 2023). Dies könnte wiederum ein Beweis dafür sein, dass Statine die thrombogenen Lipide des ACS-Kollektivs reduziert. Zur genaueren Klärung dieses Zusammenhangs wären Folgestudien mit einem auf die Lipid-Auswirkungen der Statine maßgeschneidertes Studiendesign hilfreich, welches gezielt mögliche Einflussfaktoren wie ACS/CCS oder Komedikation kontrolliert.

## GRUPPE 2: PC 16-Gruppe

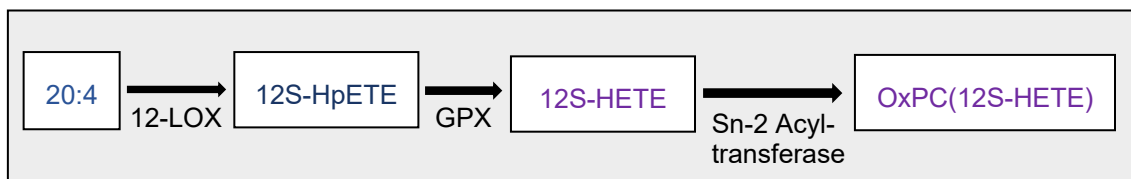
MITGLIEDER: [PC 16:0-18:3\(1\)](#) und [PC 16:0-20:4\(1\)](#)

### ***Tabelle 19: Herabregulierte Lipide der PC 16-Gruppe im wissenschaftlichen Kontext***

*Aufgelistet sind die Lipide der PC 16-Gruppe. Außerdem sind die wichtigsten Ergebnisse der Literaturrecherche mit dem jeweiligen Fazit der Quelle in Bezug zum Thema dieser Dissertation aufgeführt.*

Lipid	Fazit aus der Literatur	Literatur
<a href="#">PC 16:0-18:3(1)</a> Palmitinsäure mit Linolensäure	Plasmamembran (extrazellulär); Metabolismus & Signalwege.	<a href="https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0007974">https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0007974</a>
<a href="#">PC 16:0-20:4(1)</a> Palmitinsäure mit Arachidonsäure	Plasmamembran (extrazellulär); Metabolismus & Signalwege	<a href="https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0007974">https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0007974</a>
	Stimuliert Thrombin-Bildung (in vitro). Kann oxidiert werden zum hier hochregulierten PC (16:0/12-HETE)	(Thomas et al., 2010) (Aoyagi et al., 2017)

Diese zwei Phospholipide sind in der für Phospholipide typischen Form aufgebaut. Denn meist befindet sich der polare Kopf an der sn-3 Position, die gesättigte oder einfach-ungesättigte Fettsäure (PA (16:0), SA (18:0), ...) an der sn-1 Position und eine PUFA (LNA (18:3), AA (20:4), ...) an der sn-2 Position (Aoyagi et al., 2017). Diese PUFA-Seitenketten können dann von der in Plättchen prädominanten 12-Lipoxygenase (12-LOX) zu OxPCs oxidiert werden. Einige dieser OxPC sind biologisch aktiv und es wird angenommen, dass sie im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten wie Arteriosklerose, Diabetes und Krebs stehen (Aoyagi et al., 2017). Jedoch ist der biochemische Zusammenhang und Metabolismus davon Stand aktueller Forschung und noch nicht ausreichend geklärt. Dennoch lässt sich in der in dieser Arbeit gefundenen Beobachtung des herunterregulierten PC 16:0-20:4(1) und des gleichzeitig hochregulierten OxPC 16:0-20:4+1O (bzw. genauer: PC(16:0/12-HETE) ein Zusammenhang vermuten. Der dazugehörige vereinfachte Synthese-Pathway ist der folgende:



**Abbildung 23: Stoffwechselweg Entstehung OxPC-12S-HETE**

*Beispielhafter und vereinfachter Stoffwechselweg der Bildung von OxPC(12(S)-HETE) aus Arachidonsäure (AA = 20:4). Freie AA wird zunächst von 12-LOX (platelet type 12-Lipoxygenase) zu 12(S)HpETE metabolisiert und anschließend zügig von Peroxidasen, vor allem der Glutathionperoxidase (GPX), zu 12(S)HETE reduziert. (Hamberg and Samuelsson, 1974). Abschließend wird 12S-HETE mit der sn-2 Acyltransferase an ein Phospholipid (PL) verestert (Hajeyah et al., 2020, O'Donnell et al., 2014). Eine genauere Abbildung des 12S-HETE PL Synthesewegs liefert **Abbildung 3**.*

*OxPC: oxidiertes Phosphatidylcholin HETE: Hydroxyeicosatetraensäure; HpETE: Hydroperoxytetraensäure*



### GRUPPE 3: PC 40-Grupp

MITGLIEDER: PC 40:5, PC 40:2 und PC 40:1

#### **Tabelle 20: Herabregulierte Lipide der PC 40-Gruppe im wissenschaftlichen Kontext**

*Aufgelistet sind die Lipide der PC 40-Gruppe. Außerdem sind die wichtigsten Ergebnisse der Literaturrecherche mit dem jeweiligen Fazit der Quelle in Bezug zum Thema dieser Dissertation aufgeführt.*

Lipid	Fazit aus der Literatur	Literatur
PC 40:5	Korreliert positiv mit Cholesterol (Mäuse-Plasma)	(Eisinger et al., 2014)
	= 24 verschiedene Lipide z.B.: PC(18:0/22:5); PC(20:1/20:4); ...	(Sud et al., 2006)
PC 40:2	Korreliert positiv mit Cholesterol (Mäuse-Plasma)	(Eisinger et al., 2014)
	Erniedrigt bei Prä-Alzheimer-Patienten (Serum)	(Xiang et al., 2015)
	= 18 verschiedene Lipide z.B.: PC(20:1/20:1); PC(18:1/22:1); ...	(Sud et al., 2006)
PC 40:1	Erniedrigt bei Prä-Alzheimer-Patienten (Serum)	(Xiang et al., 2015)
	= 24 verschiedene Lipide z.B.: PC(16:0/24:1); PC(20:0/20:1); ...	(Sud et al., 2006)

Bei allen drei Lipiden handelt es sich um Diacylglycerophosphocholine (Diacyl-GPC), bei welchen die Acylgruppen am C-1 und C-2 Atom zusammen insgesamt 40 C-Atome enthalten und dazu noch eine (40:1), zwei (40:2) oder fünf (40:5) ungesättigte Doppelbindungen. Diese zwei kürzeren Acylgruppen bestehen somit meist aus ungefähr 20 C-Atomen, damit die Summe der zwei 40 ergibt. Die zwei kürzeren und das 40 C-Atom Lipid stehen wahrscheinlich in engem metabolischem Zusammenhang und verhalten sich ähnlich. Dies ist an den gemeinsamen Clustern der JMP Variable Cluster Analyse zu sehen. Denn neben den MUFA- und PUFA-VLCFA mit 40 C-Atomen befanden sich viele MUFA- und PUFA-LCFA mit um die 20 C-Atomen Kettenlänge in den Clustern. Laut Human Metabolome Database 5.0 befinden sich alle drei PCs an der extrazellulären Plasmamembran (Wishart et al., 2022). Bezüglich der

vorteilhaften Wirkung der PUFAS auf die Plasmamembran und deren generellen vorteilhaften Effekte auf kardiovaskuläre Krankheiten gibt es bereits einige Studien (Baum et al., 2012). Denn auf zellulärer Ebene führen PUFA-PLs zu einer Erhöhung der Flexibilität und Intaktheit der Plasmamembran (Lagoutte-Renosi et al., 2021). Die darin zentrale Rolle der Ernährung auf die Plasmalipide und dessen Einflussnahme wiederum auf die Lipidzusammensetzung der Thrombozyten wurde ebenfalls bereits in frühen Studien festgestellt (Barre and Holub, 1992).

Die Datenlage zur Funktion und pathologischen Relevanz speziell dieser oben aufgelisteten signifikanten PCs ist jedoch sehr dünn. Es gibt eine Studie, welche zwar keine von den hier signifikanten, jedoch ähnlichen PCs (ePC 38:5, PC 40:3 and PC 42:4) als Prostatakrebs-Serum-Diagnosemarker entdeckte und zeigte, dass ein Zusammenhang mit 15-LOX-1 bestehen könnte (Patel et al., 2014). Andere Studien fanden einen Zusammenhang mit Prä-Alzheimer-Patienten, jedoch dann in Kombination mit weiteren erniedrigten Lipiden wie PC 36:6, PC 40:6, PC 38:0, PC 38:6, PC40:6e, LPC 18:2, PC 38:4e und nicht in den Thrombozyten, sondern im Blutplasma (Xiang et al., 2015). Der für diese Arbeit wahrscheinlich relevanteste Zusammenhang ist in der gewichtsunabhängigen Korrelation von PC 40:5 und PC 40:2 (zusätzlich PC 26:0 und LPC 22:4) mit dem Blut-Cholesterin-Level in Mäusen (Eisinger et al., 2014). Denn die in dieser Dissertation gefundenen erniedrigten Lipide, wie PC 40:5 waren vor allem im PatternHunter auffällig. Das heißt, ihre Konzentration nahm mit steigender Statindosis signifikant ab **Abbildung 11**. Gleichzeitig nahm mit steigender Statindosis ebenfalls das Cholesterin-Level und LDL-Level ab **Abbildung 13**. Eine ähnliche positive Korrelation dieser Lipide mit Cholesterin bzw. LDL wie bei Xiang et al., jedoch hier mit humanen Thrombozyten, könnte somit vermutet werden. Eine genauere Diskussion dieses Zusammenhangs und der **Abbildung 11** befindet sich weiter unten bei Punkt 4.3.3. *Statin-Lipidomveränderungen sind dosisabhängig.*

Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich der runterregulierten Lipide festhalten, dass sie vorwiegend zu der Klasse der PC gehören, welche Hauptbestandteil der (extrazellulären) Thrombozytenmembran sind und als Pool für Signal-Lipide

dienen. Der Grund ihrer Herabregulierung unter Statintherapie könnte entweder an dem generellen verringerten Vorkommen im Blut aufgrund ihrer Korrelation mit dem Blut-Cholesteroll-Level und VLDL liegen, welche durch Statine verringert werden. Oder der Grund liegt an der Synthese der hochregulierten Oxilipine, welche den Pool an PUFA-PC konsekutiv schrumpfen lässt. Die Auswirkungen einer Verringerung dieser Lipide sind als positiv und anikoagulativ zu werten, da sie im ACS-Kollektiv die am stärksten hochregulierten und thrombogen wirkenden Lipide sind und mit einer vermehrten Thrombin-Synthese in Verbindung stehen.

#### 4.3.2.2. Hochregulierte Lipide

4. VLCFA-PUFA-TG: TG 49:3; TG 51:3; TG 51:2
5. Spezifische Triglyceride: TG 14:0-16:0-18:2; TG 15:0-16:0-18:2
6. OxPL: OxPE(P-16:0/14-HAdA); OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3); OxPC(16:0/12-HETE); OxPC(18:0/12-HETE)

#### GRUPPE 1: VLCFA-PUFA-TG

MITGLEIDER: TG 49:3; TG 51:3; TG 51:2

#### ***Tabelle 21: Hochregulierte Lipide der VLCFA-PUFA-TG-Gruppe im wissenschaftlichen Kontext***

*Aufgelistet sind die Lipide der VLCFA-PUFA-TG-Gruppe. Außerdem sind die wichtigsten Ergebnisse der Literaturrecherche mit dem jeweiligen Fazit der Quelle in Bezug zum Thema dieser Dissertation aufgeführt.*

Lipid	Fazit aus der Literatur	Literatur
TG 49:3	Dickere & beweglichere Linksventrikuläre Wand bei Herzinsuffizienz (Serum).	(Sysi-Aho et al., 2011)
	= 39 verschiedene Lipide z.B.: TG(14:0/20:3/15:0); TG(16:0/16:1/17:2); ...	(Sud et al., 2006)
TG 51:3	= 51 verschiedene Lipide z.B. TG(17:1/17:1/17:1); TG(16:1/17:2/18:0); ...	(Sud et al., 2006)
TG 51:2	= 48 verschiedene Lipide z.B. TG(17:0/17:1/17:1); TG (13:0/19:1/19:1); ...	(Sud et al., 2006)

Während es bereits einige Daten zu dem Metabolismus und der Funktion von TGs im Blutplasma gibt, ist die Datenlage bezüglich des Kompartimentes der Thrombozyten sehr spärlich. TGs gehören zu den Glyceriden, welche neben CE und freiem Cholesterol zu den ungeladenen Lipiden gehören. In Thrombozyten sind sie nur in kleinen Mengen vorhanden, wobei freies Cholesterol mit über 90% die große Mehrheit ausmacht und Triglyceride demgegenüber mit 2% nur eine Minderheit sind (O'Donnell et al., 2014). Ihre intrazelluläre Funktion ist neben der Energiequelle vor allem ein Pool für die Bildung bioaktiver Lipidmoleküle wie DAG oder bestimmte PUFA-PL (Harm et al., 2023). Aufgrund der großen Variabilität der Seitenketten der Triglyceride ist es schwierig einzelnen spezifischen Triglyceriden eine pathologische Bedeutung zuzuordnen. Stattdessen sinnvoller ist die ganzheitliche Betrachtung der Funktion von Triglyceriden in Plättchen und die Unterschiede hinsichtlich deren Sättigung.

Zu Letzterem, der Sättigung, wurde wie oben bereits erwähnt mehrfach ein positiver Effekt der PUFAS auf kardiovaskuläre Krankheiten bewiesen (Baum et al., 2012). In Bezug auf andere metabolische Krankheiten, wie dem Diabetes Mellitus Typ 2 wurde ebenfalls ein vorteilhafter Effekt der PUFAS im Gegensatz zu den MUFAS oder gesättigten Lipiden entdeckt. Es wurde festgestellt, dass die VLCFA-TGs im Blutplasma mit vielen ungesättigten Doppelbindungen (z.B. TG 56:9; TG 58:10; ...) ein geringeres Typ 2 Diabetes-Risiko vorhersagen können, wohingegen TGs mit gesättigten oder einfachungesättigten Bindungen (z.B. TG 48:0; TG 48:1, TG 50:0; TG 52:1; ...) mit einem erhöhten Diabetes-Risiko in Verbindung stehen (Rhee et al., 2011). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der Lipid-Interaktion mit der Insulinaktivität und Insulinsensitivität liegen (Rhee et al., 2011). Die Statintherapie, welche vor allem MUFA- und PUFA-TGs in Thrombozyten erhöht, könnte somit ebenfalls einen positiven Effekt auf die Insulinaktivität besitzen.

Stand intensiver Forschung der letzten Jahre ist vor allem die vorteilhafte Wirkung insbesondere der  $\omega$ -3 und  $\omega$ -6 PUFA-PL. In Bezug auf die Thrombozyten wurde zu Letzterem ein inhibitorischer Effekt auf die Thrombozytenaggregation *in vivo* und *in vitro* festgestellt (Adili et al., 2018). Ursächlich daran sollen die bioaktiven Lipid-Produkte der 12-LOX abhängigen Oxidation von  $\omega$ -6 PUFA-DGLA [(20:3 ( $\omega$ -6))] wie 12(S)-HETrE sein. Ob die oben

aufgeführten, hochregulierten PUFA-TGs als Pool für diese vorteilhaften PUFA-PLs dienen und durch die Statine somit positiv beeinflusst werden, lässt sich auf dem Stand der aktuellen Forschung ohne genauere Kenntnis der Stoffwechselwege in den Thrombozyten nicht genau sagen.

## GRUPPE 2: Spezifische Triglyceride

MITGLEIDER: TG 14:0-16:0-18:2; TG 15:0-16:0-18:2

### **Tabelle 22: Hochregulierte Lipide der Spezifischen-TG-Gruppe im wissenschaftlichen Kontext**

*Aufgelistet sind die Lipide der Spezifischen-TG-Gruppe. Außerdem sind die wichtigsten Ergebnisse der Literaturrecherche mit dem jeweiligen Fazit der Quelle in Bezug zum Thema dieser Dissertation aufgeführt. CAD: Koronare Herzkrankheit; HDL: High Density Lipoprotein; VLDL: Very Low Density Lipoprotein.*

Lipid	Fazit aus der Literatur	Literatur
TG 14:0-16:0-18:2	Erniedrigt in atherosklerotischen Mäusen nach Feinstaub PM <sub>2.5</sub> -Exposition.	(Zhang et al., 2020)
	Unterscheidung stabile vs. instabile CAD (Serum)	(Meikle et al., 2011)
	Diabetes-Typ-2-Risikomodell	(Wong et al., 2013)
	= TG 48:2	(Sud et al., 2006)
TG 15:0-16:0-18:2	Erhöht im epikardialen Fettgewebe (EAT) von CAD-Patienten & negative Korrelation EAT vs. HDL & VLDL	(Barchuk et al., 2020)
	= TG 49:2	(Sud et al., 2006)

Die pathologische Relevanz dieser zwei Triglyceride mit genauer Kenntnis der Seitenketten zu finden war zielführender als bei GRUPPE 1, da die genauen Acyl-Seitenketten nun bekannt sind und eine genauere Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext möglich ist. Daraus lässt sich die Empfehlung für zukünftige Studien ableiten, soweit möglich und bekannt, die genauen Acyl-Reste zu benennen, anstatt die zusammenfassende Bezeichnung TG 51:2 mit 48 verschiedenen möglichen Seitenketten-Kombinationen.

Hervorzuheben an der Studie mit PM<sub>2.5</sub>-Feinstaub-Exposition ist, dass die

prothrombotisch und proinflammatorisch beschriebenen Veränderungen des Blutplasma-Lipidoms nach zweimonatiger Feinstaub-Exposition annähernd entgegengesetzt zu den hier beschriebenen Statin-Veränderungen waren. Denn während Statine vor allem TGs erhöhen und PCs erniedrigen, wurden unter PM<sub>2.5</sub>-Belastung (neben CEs & PEs) die PCs erhöht und TGs (neben LPEs, LPCs & DGs) erniedrigt (Zhang et al., 2020). Dies deutet auf einen positiven, der atherosklerotischen Feinstaubbelastung entgegenwirkenden Effekt der Statine hin.

TG 14:0-16:0-18:2 war ein Lipid im Risikomodell zur Vorhersage von Diabetes Typ 2 (Wong et al., 2013), oder diente einem Modell zur Unterscheidung von SAP vs. IAP (Meikle et al., 2011). Dies könnte bedeuten, dass dieses Lipid sehr variabel ist und an vielen Stoffwechselwegen beteiligt ist.

Bei letzterer Studie von Meikle et al., wurde ebenfalls diskutiert, ob Statine, welche auch in dieser Studie signifikant mehr vom SAP-Kollektiv eingenommen wurden als vom IAP-Kollektiv, ein Störfaktor sind. Dafür wurde von Meikle et al. eine Blutplasma-Lipidomics-Analyse von sAP-Patienten ohne vs. mit Statinen durchgeführt, wobei 11 Lipide signifikant ( $p < 0,01$ ) unterschiedlich waren. Nur drei Lipide davon waren ebenfalls auffällig im sAP vs. gesunden Kollektiv und zwei Lipide von diesen 11 waren ebenfalls in dem Vergleich sAP vs. iAP auffällig. Diese 11 Lipide waren alle unter Statintherapie runterreguliert und ähnlich zu den Lipiden in dieser Studie vorwiegend VLCFA-PC, PI, LPC oder CE mit variabler Sättigung von keiner bis zu fünf ungesättigten Doppelbindungen. Genau identisch war jedoch lediglich das Lipid PC 36:4a (hier PC 16:0-20:4(1)) (Meikle et al., 2011).

Das Lipid TG 15:0-16:0-18:2 wurde als erhöht im epikardialen Fettgewebe (EAT) von Patienten mit CAD im Vergleich zu Nicht-CAD-Patienten nachgewiesen (Barchuk et al., 2020). Es hatte in dieser Studie außerdem eine negative Korrelation mit dessen Vorkommen in den Blutplasma-Lipiden HDL und VLDL im Vergleich zum EAT. Das heißt, dieses Lipid war vermehrt im EAT bei Patienten mit CAD nachweisbar, hatte jedoch bei steigender Konzentration im EAT, sinkende Werte in HDL und VLDL. In dieser Arbeit war es erhöht unter Statintherapie in dem Kompartiment der Thrombozyten. Inwiefern ein Zusammenhang von EAT, Lipoproteine und Thrombozyten besteht, ist noch nicht

geklärt. Dafür wäre es notwendig gewesen, dass man die Lipidomanalyse parallel zu den Thrombozyten ebenfalls in HDL und VLDL durchführt. Damit hätte man sicherlich erkenntnisreiche Einblicke in die Interaktion von thrombozytären Lipiden und Blutplasmalipiden.

Insgesamt lässt sich zu diesen VLCFA-PUFA-TGs festhalten, dass sie eine Rolle bei kardiovaskulären Krankheiten und Atherosklerose spielen und in Verbindung mit CAD, IAP und Diabetes stehen können. Jedoch gab es keine Studie zu deren Vorkommen und Funktion im thrombozytären Lipidom. Ebenfalls unklar ist deren Zusammenhang mit Statinen.

### GRUPPE 3: Oxidierte Phospholipide

MITGLIEDER: OxPE(P-16:0/14-HAdA); OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3); OxPC(16:0/12-HETE); OxPC(18:0/12-HETE)

#### **Tabelle 23: Hochregulierte oxidierte Phospholipide im wissenschaftlichen Kontext**

*Aufgelistet sind die hochregulierten oxidierten Phospholipide. Außerdem sind die wichtigsten Ergebnisse der Literaturrecherche mit dem jeweiligen Fazit der Quelle in Bezug zum Thema dieser Dissertation aufgeführt. FII/X/...: Faktor II/X/...; APS: Antiphospholipid-Syndrom; AA: Arachidonsäure; TxA2/B2: Thromboxan A2/B2; PPARα: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α; LOX: Lipoxygenase*

Lipid	Fazit aus der Literatur	Literatur
OxPC(16:0/12-HETE)	Stärkster & schneller (ab 5 Minuten) Anstieg nach Thrombin-Aktivierung in Thrombozyten. Stimuliert Thrombin-Bildung (im Blutplasma) und das mehr als das nicht oxidierte PC.	(Thomas et al., 2010)
= OxPC 16:0-20:4+10 [HETE = Hydroxy-Eicosatetraenoic acid]	12-HETE-PCs (& PEs) verbessern calciumabhängig die Koagulation mit dem extrinsischen Tenase-, intrinsischen Tenase- und Prothrombinase- Komplex und binden an FII und FX.	(Slatter et al., 2018)
	Erhöht beim APS. Wirkt in Thrombozyten-Zellmembran ähnlich wie die polare Kopfgruppe von PS → prokoagulatorische Oberfläche.	(Lauder et al., 2017)

<p>OxPC(18:0/12-HETE)</p> <p>= OxPC 18:0-20:4+10</p> <p>[HETE = Hydroxy-Eicosatetraenoic acid]</p>	<p>Deutlicher &amp; schneller (ab 5 Minuten) Anstieg nach Thrombin-Aktivierung in Thrombozyten.</p>	<p>(Thomas et al., 2010)</p>
	<p>12-HETE-PCs (&amp; PEs) verbessern Calcium abhängig die Koagulation mit dem extrinsischen Tenase-, intrinsischen Tenase- und Prothrombinase-Komplex und Binden an FII und FX.</p>	<p>(Slatter et al., 2018)</p>
	<p>Erhöht beim APS. Wirkt in Thrombozyten-Zellmembran ähnlich wie die polare Kopfgruppe von PS → prokoagulatorische Oberfläche.</p>	<p>(Lauder et al., 2017)</p>
<p>OxPE(P-16:0/14-HAdA)</p> <p>[HAdA = Hydroxy-Adrenic acid = 22:4(n-6)+10]</p>	<p>OxPE(P-16:0/14-HDOHE) (2 ungesättigte Bindungen mehr) wird Calciumabhängig innerhalb 2-180 min nach Thrombinaktivierung gebildet.</p>	<p>(Morgan et al., 2010)</p>
	<p>AdA ist Substrat für Tx-B2 und unterdrückt Tx-A2-abhängige Synthese von AA. HAdA wird von Lipoxygenase gebildet. Gleichzeitige Bildung von 12-HETE und 14-HAdA nach Freisetzung von AA und AdA aus PL.</p>	<p>(VanRollins et al., 1985)</p>
	<p>LOX-Abhängige zwei- und dreifach oxidierte PE(18:0/HpAdA) und PE(18:0/HpETE) (bei GPX4-Insuffizienz) sind Ferroptose-Signale.</p>	<p>(Kagan et al., 2017)</p>
<p>OxPE(P-16:1/14-HDPA-n3)</p> <p>[HDPA = Hydroxy-Docosapentaenoic acid = 22:5(ω-3)+10]</p>	<p>14-HDPA-n6 inhibiert Thrombozytenaktivierung über PPARα.</p>	<p>(Yeung et al., 2020)</p>
	<p>DPA-n3 inhibiert Kollagen vermittelte Plättchen-Aktivierung über verminderte TxA2-Bildung und erhöht Bildung von 12-HETE.</p>	<p>(Akiba et al., 2000)</p>
	<p>DHA-n3 (eine ungesättigte Bindung mehr) wird in niedrigen Dosen eher an PE-Plasmalogene (Zellmembran) gebunden und wirkt antioxidativ. Hohe Dosen: Eher an PC gebunden und wirkt prooxidativ + erhöht 12-HETE.</p>	<p>(Véricel et al., 2003)</p>



Früher wurde oxidierten Lipiden ein rein pathologischer Wert zugewiesen. Dies trifft auch teils immer noch zu, jedoch vor allem für unkontrollierte nicht-enzymatische Oxidierung von Lipiden (Hajeyah et al., 2020). Die enzymatische Oxidierung mittels LOX, COX oder CYP P450 sind aktuell Stand intensiver Forschung und die Literatur diesbezüglich erkennt zunehmend deren zentrale Rolle in physiologischen Prozessen. Die hier detektierten oxidierten Lipide sind alle enzymatisch entstanden. In der Einleitung wurde ein Überblick über die komplexen Zusammenhänge der oxidierten Lipide und deren mögliche Funktionen in Thrombozyten gegeben. Nun soll hier eine zusammenfassende Einordnung und mögliche Bedeutung dieser Ergebnisse folgen. Die erkannte signifikante Hochregulierung der oxidierten Lipide unter Statintherapie war in diesem Ausmaß bei keinem anderen Medikament erkennbar. Eine leichte Hochregulierung war dennoch bei den P2Y12-Inhibitoren und ASS erkennbar. Diese sind jedoch auch häufige Komedikation bei Statintherapie (**Tabelle 3**). Diuretika und  $\beta$ -Blocker sind jedoch auch eine häufige Komedikation und weisen diese erhöhten oxidierten Lipide nicht auf. Einen Effekt der P2Y12-Inhibitoren und ASS auf die Bildung oxidierter Lipide kann somit trotz statistischer Tests (**Abbildung 15**) nicht ausgeschlossen werden und sollte in speziellen Statin-Interventions-Studien überprüft werden.

Ähnliches gilt für die Akuität der Krankheit. Harm et al. konnte im PLS-DA Modell eine stärkere Separierung der ACS-Lipidomveränderungen mit dem Faktor Statintherapie vs. unbehandelt nachweisen (Harm et al., 2023). Tatsächlich sind bei genauerer Betrachtung seiner Volcano-Plots die oxidierten Phospholipide im ACS-Kollektiv im Vergleich zu Patienten mit CCS ebenfalls erniedrigt (Harm et al., 2022). Diese Veränderungen waren nicht signifikant genug, weshalb sie in der Arbeit von Harm nicht explizit erwähnt wurden, aber in alleiniger Betrachtung des Fold Changes in seinem Volcano-Plot sind sie dennoch sehr auffällig. Eine mögliche Erklärung der Oxilipin-Runterregulierung im ACS-Kollektiv könnte sein, dass Patienten mit ACS signifikant weniger Statine einnehmen und man deshalb eine Umkehr der signifikanten Statin-Lipide im ACS-Kollektiv findet. Dafürsprechen würde auch, dass die beim ACS am stärksten hochregulierten Lipide die am stärksten runterregulierten Lipide bei Statin-Therapie sind. Als tatsächlichen Zusammenhang möchte und könnte man auch vermuten, dass die

Statine die prokoagulatorischen ACS-Lipidomveränderungen umkehrt. Falls dies der Fall ist, sind die hochregulierten Oxilipine unter Statin-Therapie als positive Veränderung zu werten.

Im Vergleich mit der Literatur lässt sich ein positiver Effekt der Oxilipine in dieser Form nicht wiederfinden. Denn die genaue Funktion von 12S-HETE in Plättchen ist noch nicht hinreichend geklärt und die Literatur dazu sehr widersprüchlich. Ein Review zu 12-LOX hat demnach die Funktion von 12S-HETE als sowohl anti- wie auch prothrombotisch zusammengefasst (Yeung and Holinostat, 2011). Ebenfalls zeigt die Literatur in der obigen Tabelle über die auffälligen oxPL für jedes Lipid die unterschiedlichsten Wirkungen, teils pro- teils antithrombotisch. Dies ist unter anderem abhängig von den für 12-LOX verfügbaren Substraten und deren Konzentration. So hat zum Beispiel eine DHA-Supplementierung in niedrigen Dosen (150 mg DHA and 30 mg EPA) inhibierende Effekte auf die Thrombozyten und bei hohen Dosen (2 g EPA and 1,3 g DHA) prothrombotische Effekte (Yeung and Holinostat, 2011). Eine ähnliche dosisabhängige, gegensätzliche Funktion wurde oben bereits bei den anti- beziehungsweise prooxidativen Effekten von DHA-n3 beschrieben und mit der unterschiedlichen Bindung an PE bzw. PC in Verbindung gebracht (Véricel et al., 2003).

Die Kontroverse der Literatur über die Wirkung von 12(S)-HETE könnte somit auch an den verschiedenen Bindungspartnern von HETE liegen, welche jedoch erst mit genaueren Analysemethoden zu identifizieren sind. So könnte OxPC(18:0/12-HETE) eine andere Wirkung haben als OxPE(16:0/12-HETE) oder nur 12-HETE alleine. Dass veresterte Lipide andere Wirkungen haben können als die einzelnen Lipide, zeigt auch, dass Prostaglandin E-Glycerol zu einer Calcium-Freisetzung führt, wohingegen freies Prostaglandin E2 dies nicht bewirkt (Nirodi et al., 2004). In den meisten Studien zu 12(S)-HETE wird jedoch kein Bindungspartner genannt und es ist nur von 12(S)-HETE die Rede. Jedoch wird im thrombozytären Zytosol freies 12(S)-HETE zu 80% sekretiert und wirkt anders als an PL verestertes, membrangebundenes 12(S)-HETE (Thomas et al., 2010).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Wirkung wäre es äußerst aufschlussreich eine genauere Aufteilung der thrombozytären Lipidomanalyse in zytoplasmatische Lipide und membrangebundene Lipide zu unternehmen. Denn Studien hierzu

gibt es nur wenige, obwohl diese Daten wichtige Informationen über Metabolismus, Signalübertragung und Funktion der Thrombozyten liefern würden (Lagoutte-Renosi et al., 2021).

### **Zusammenfassende Kernpunkte der oxidierten Phospholipide in Thrombozyten:**

- Nicht-enzymatische oxidierte Lipide sind eher pathologisch. Enzymatisch entstandene Lipide sind eher physiologisch.
- Starker und schneller Konzentrationsanstieg nach Thrombozyten-Aktivierung.
- Wichtig für extrinsische sowie intrinsische Hämostase.
- Membranständige oxPL führen zu einer prokoagulatorische Oberfläche.
- Die Wirkung kann dosisabhängig unterschiedlich sein.
- Die nichtreduzierten Hydroperoxide (HpETE, HpAdA, ...) sind instabiler, aber in ihrer Wirkung meist potenter als die reduzierten Lipide (HETE, HAdA).
- GPX reduziert die Hydroperoxide zügig. Bei GPX-Insuffizienz häufen sich die Anzahl der Oxidierungen an und lösen Ferroptose aus.
- Freie oxidierte Lipide werden meist sekretiert und an PL veresterte Lipide bleiben Membrangebunden.
- An PC gebundene Oxilipine befinden sich eher an der äußeren Zellmembran, wohingegen an PE gebundene Lipide sich zunächst auf der Innenseite befinden und bei Aktivierung jedoch nach außen geflippt werden können.
- 12S-HETE-PL bildet sich vorwiegend über Veresterung von neu gebildetem 12S-HETE anstatt über direkte Oxidation von membrangebundenen PUFA-PL.
- 12-LOX ist nicht nur essenziell für die Entstehung der Oxilipine, sondern auch deren Funktion.
- Entstehung und Funktion der Oxilipine ist Ca<sup>2+</sup>-abhängig.
- Assoziierte Rezeptoren: Vor allem PAR4 (zusätzlich: PAR1, PPAR $\alpha$  &  $\gamma$ )
- Assoziierte Enzyme: sPLA2, cPLA2, 12-LOX (zusätzlich: Platelet-activating factor-acetylhydrolase, Src-Tyrosin-Kinase und Proteinkinase C)

Unter Hinzunahme des Wirkmechanismus der Statine, lassen sich einige Hypothesen bezüglich der Ursache der Statin-Medikation für die gefundenen Lipidomveränderungen aufstellen:

### **Statine und Oxilipine wirken auf den PPAR-Rezeptor**

In mehreren Studien wurde ein Effekt von oxidierten Phospholipiden (13-HODE, 15-HETE, Azelaoyl Phosphatidylcholin (azPC), 14-HDPA-n6) in verschiedenen Zellen (oxLDL, Keratinozyten, Prostata-Karzinom-Zellen) auf den endogenen Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  nachgewiesen (Konger et al., 2008, Hsi et al., 2002, Davies et al., 2001, Yeung and Holinstat, 2011). Da auch für Statine eine aktivierende Wirkung auf den PPAR $\gamma$  festgestellt wurde, könnten die Lipoxine ein fehlendes Bindeglied in dem noch nicht gänzlich verstandenen molekularen Pathway der Statin-Wirkung auf den PPAR $\gamma$  sein (Du et al., 2014). Dafürsprechen würde auch, dass in beiden Studien über die ähnlichen Mechanismen via MAPK, Akt-Phosphorylierung, Ca<sup>2+</sup> und cAMP berichtet wird.

### **Statine erhöhen die Synthese mancher Eicosanoide**

Statine führen zu einem genetischen Enrichment von Pathways der Eicosanoid-Synthese und PLC-Pathways, was auch an einer Erhöhung des Arachidonate 5-lipoxygenase-activating Proteins (ALOX5AP) messbar ist (Laaksonen et al., 2008). Dies konnte zumindest in Muskelzellen nachgewiesen werden, lässt jedoch vielversprechend vermuten, dass es einen ähnlichen Effekt auf das thrombozytäre Genom und folglich auch Lipidom hat.

### **LOX und HMGCR haben eine gemeinsame Hemmung**

15-LOX in Makrophagen spielt eine wichtige Rolle beim intrazellulären Cholesterinhaushalt. Eine Inhibierung von 15-LOX führt zu signifikant weniger Genexpression von 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase (HMGCR), was letztendlich zu niedrigeren intrazellulären Cholesterin-Leveln führt (Snodgrass et al., 2018, Hajeyah et al., 2020). Eine Verbindung von 15-LOX mit dem Cholesterin-Haushalt wird somit angenommen und eventuell besteht eine ähnliche Verbindung mit der 12-LOX in Plättchen.

### **Einige Oxilipine wie auch Statine wirken antiinflammatorisch**

Antiinflammatorische Lipide wie 12-HETE und 14-HDPA, welche auch bei Statintherapie erhöht waren, führen wie in der Einleitung schon genauer beschreiben unter anderem zur Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen (IL-10), Apoptose von Neutrophilen und erhöhter Zelldedritus-Entfernung durch Makrophagen-Phagozytose (Ahluwalia et al., 2022). Diese Effekte könnten sich nicht nur positiv auf atherosklerotische Läsionen auswirken, sondern auch am geschädigten Myokard nach einem Infarkt, wobei Statine neben ACE-Inhibitoren ebenfalls positive Auswirkungen bewiesen haben. Der Wirkmechanismus dieses positiven Effektes der Statine auf das myokardiale Remodeling ist weiterhin nicht ganz geklärt (Landmesser et al., 2009). Die antiinflammatorischen Oxilipine könnten hier ein mögliches fehlendes Puzzleteil sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es einige Gemeinsamkeiten zwischen der Wirkung der Statine wie auch der Wirkung der Oxilipine auf die Thrombozyten gibt. Angefangen von den gemeinsamen assoziierten Rezeptoren PAR und PPAR, über die gemeinsamen intrazellulären Signalkaskaden (PLA<sub>2</sub>, PKC, Kalzium, MAPK, ...), wie auch gemeinsame Wirkungen z.B. antiinflammatorisch oder antifibrotisch. Gegensätzlich scheint jedoch die eher antikoagulatorische Wirkung der Statine und die eher prokoagulatorische Wirkung einiger Lipoxine zu sein. Es gibt Studien, welche Zusammenhänge der Statine mit LOX oder erhöhter Eicosanoid-Synthese beschrieben haben, jedoch war keine davon mit Thrombozyten. Ein allgemeiner Zusammenhang der Statine und Oxilipine kann somit stark vermutet werden. Es fehlen jedoch weitere, eigens dafür konzipierte Studien, um Aussagen über den genauen Mechanismus zu treffen.

### 4.3.3. Statin-Lipidomveränderungen sind dosisabhängig

Nachdem im Volcano Plot (**Abbildung 5**) signifikante thrombozytäre Lipidom-Unterschiede bei Patienten mit vs. ohne Statintherapie entdeckt wurden, sollte im Pattern-Hunter Tool von MetaboAnalyst 5.0 (**Abbildung 11**) geprüft werden, ob diese Unterschiede auch dosisabhängig sind.

Tatsächlich zeigten unter den 25 signifikantesten Lipiden 22 Lipide (hauptsächlich TGs) eine mit steigender Atorvastatindosis positive Korrelation. Drei der 25 Lipide (PCs) hatten eine negative Korrelation. 15 dieser Lipide waren schon bekannt aus vorherigen Analysen (Volcano-Plots & Heatmap). Vergleichbare Studien mit der Auswirkung einer Statin-Medikation auf das thrombozytäre Lipidom gibt es nach aktuellem Stand nicht. Selbst Lipidomics-Studien über die Auswirkungen auf das genaue Lipidprofil des Blutplasmas sind selten. Berghenau et al. konnte in einer prospektiven Statin-Interventionsstudie mit steigender Statindosis nachweisen, dass mit steigender Atorvastatindosis, die Konzentration der PCs im Blutplasma abnahm, wohingegen sie bei Rosuvastatin stieg. Beide Statine senkten die Konzentration der Sphingomyeline (Berghenau et al., 2008). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den hier gefundenen Erkenntnissen über das thrombozytäre Lipidom. Außerdem zeigt der Vergleich der unterschiedlichen Lipid-Auswirkungen von Rosuvastatin und Atorvastatin, dass die Statine sehr unterschiedliche Auswirkungen auf das genaue Lipidprofil haben können. Deshalb sollten in zukünftigen Analysen über die Auswirkung der Statine auf eine separate Betrachtung der einzelnen Statin-Typen geachtet werden.

In dieser Studie wurden zwar nicht die Lipidomprofile der Lipoproteine bestimmt, aber dennoch die Plasma-Konzentrationen von Cholesterin, Triglyceriden, LDL und HDL (**Abbildung 13**). Um einen eventuellen Zusammenhang mit den Atorvastatin-Dosen festzustellen, wurden sie gleich der Gruppierung des PatternHunters separiert. Weiter oben unterhalb **Tabelle 20** wurde bereits geschildert, dass **PC 40:2** eine positive, gewichtsunabhängige Korrelation mit dem Blut-Cholesterin-Level in Mäusen aufweist (Eisinger et al., 2014). Eine ähnliche positive Korrelation dieser Lipide mit Cholesterin bzw. LDL in humanen Thrombozyten könnte somit vermutet werden. Falls dem so ist, könnten die

niedrigeren Plasma LDL-Spiegel bei Statintherapie (dosisabhängig) eine Erklärung für die erniedrigten PCs in Thrombozyten sein. Denn LDL enthalten in absoluten Konzentrationen eine große Menge an PC (Godzien et al., 2016, Wiesner et al., 2009). Wenn LDL erniedrigt ist, könnte somit im Blut insgesamt weniger PC vorhanden sein. Eine Studie, welche den Effekt einer Statintherapie auf die Lipoproteine untersuchte, konnte eine Reduktion fast aller Lipidklassen (um 21% bis 41%) in LDL feststellen. Jedoch wurde bei dieser Publikation keine besonders starke Reduktion von PC im Vergleich zu TG beschrieben, was in Anbetracht der hier festgestellten thrombozytären Statin-Lipidomveränderungen zu erwarten gewesen wäre (Chapman et al., 2020).

An dieser Stelle sei jedoch kritisch angemerkt, dass bei zukünftigen Studien zu Lipidomveränderungen bei Statin-Medikation darauf geachtet werden sollte, dass das Studiendesign so aufgebaut ist, dass Statindosis-Steigerungen am gleichen Patienten gemessen werden, wie es zum Beispiel bei Berghenau et al. der Fall war. Auch Chapman et al. hatte ein Prä-Post-Studiendesign der Statinwirkung an den gleichen Patienten (Chapman et al., 2020). Anders war es in dieser Dissertation. Hier wurden die steigenden Statin-Dosen NICHT bei dem gleichen Patienten gemessen, sondern eine höhere Dosis bedeutete immer auch ein ANDERER Patient, welcher aufgrund seines individuellen Lipidprofiles auch eine höhere Dosis benötigte. Zwar können dadurch dennoch Rückschlüsse auf die Auswirkung der Statine bei höherer Dosis geschlossen werden, eine tatsächliche Dosis-Wirkungs-Beziehung lässt sich jedoch nur bei einer Dosis-Steigerung am gleichen Patienten beweisen.

Dennoch lässt sich zusammenfassend festhalten, dass Statine das Lipidprofil des Blutplasmas Dosis- und Statin-Typ-spezifisch verändern. Ob diese Veränderungen der Lipoprotein-Zusammensetzung auch für die Veränderungen des thrombozytären Lipidoms verantwortlich sind, oder ob die Ursache eher in den Thrombozyten selbst mittels genetisch bedingten Pathway-Enrichments liegt, kann zum jetzigen Wissensstand nicht beantwortet werden.

#### **4.3.4. Statin-Lipidomveränderungen sind unabhängig von Einflussfaktoren wie Medikamente oder Begleiterkrankungen**

Um zu bestätigen, dass die Lipidomveränderungen hauptsächlich auf der Wirkung der Statin-Medikation beruhen und nicht von anderen Störfaktoren beeinflusst werden, wurden multivariate PLS-DA Analysen mit MetaboAnalyst 5.0 durchgeführt. Keine der aus **Tabelle 3** signifikanten und möglichen Störfaktoren zwischen dem mit Statin behandelten vs. unbehandelten Kollektiv hatte eine bessere Separierung als das Statin-Modell allein.

Harm et al. hat am gleichen Kollektiv zusätzlich noch den Einfluss der Erkrankungsschwere (ACS vs. CCS) mit PLS-DA analysiert (Harm et al., 2023). Dabei stellte er eine stärkere Separierung vor allem im ACS-Kollektiv fest. Dies lässt sich damit erklären, dass die Lipidomveränderungen ACS vs. CCS fast genau entgegengesetzt den Veränderungen Statin vs. unbehandelt sind. Die am stärksten hochregulierten Lipide des ACS-Kollektivs sind die am stärksten runterregulierten Lipide bei Statintherapie. Der Zusammenhang hinter diesen Erkenntnissen könnte sein, dass Patienten mit CCS eher mit Statinen therapiert werden als Patienten mit ACS.

Die Datenlage bezüglich der Auswirkungen der Störfaktoren auf die Lipide ist dünn. Es wurden jedoch erhöhte 12(S)-HETE-Konzentrationen bei Patienten mit essentieller Hypertonie (González-Núñez et al., 2001) festgestellt. Jedoch geht aus der Studie nicht hervor, ob es ebenfalls eine Begleitmedikation mit beispielsweise Statinen gab. Denn falls erhöhter Blutdruck allein 12(S)-HETE im Plasma ansteigen lässt, könnte dies auch eine Störvariable sein, da Patienten mit Hypertonie ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko haben und somit auch eher mit Statinen therapiert werden.

Wenn Hypertonie das Lipidom beeinflussen kann, wird davon ausgegangen, dass das Alter ebenfalls einen Einfluss auf zum Beispiel die 12-LOX Aktivität und 12-HETE-Konzentration hat (Yeung and Holinstat, 2011). Dazu gibt es jedoch noch keine Studien. In der hier durchgeführten Clusteranalyse war jedoch bei der Untersuchung der Unterschiede der Patienten zwischen den Lipid-Clustern das Alter der signifikanteste Parameter (**Abbildung 20**). Das würde für einen Einfluss des Alters auf die insgesamt Varianz des thrombozytären Lipidoms sprechen,



sollte jedoch in weiteren Analysen überprüft werden.

Bei so vielen und sensiblen Einflussfaktoren wird deutlich, wie engmaschig und kontrolliert Lipidomics-Studien konzipiert werden müssen, um Aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Die statistischen Tests, wie die PLS-DA, sind in Ordnung für den Ausschluss von groben Einflussfaktoren, können einen Einfluss jedoch nicht gänzlich ausschließen. Dafür sollte das Studiendesign so konzipiert werden, dass zwischen den beiden zu vergleichenden Gruppen minimale Änderungen vorgenommen werden und alle anderen Variablen (ACS/CCS, Nahrungsaufnahme, Komedikation, Alter, ...) möglichst konstant gehalten werden.

#### 4.3.5. Erhöhte Leukozyten führen zu erhöhten oxidierten Phospholipiden in den Thrombozyten

Mithilfe der JMP Clusteranalyse wurden alle 928 Lipide in 124 Cluster beim *Variable Clustering* (Daten nicht abgebildet) gruppiert und in 6 Cluster bei der *Hierarchical Cluster Analyse* (**Abbildung 17**). Die ungefähre homogene Einteilung der Lipid-Klassen ist auch ein Beweis für die Qualität der Daten. Die mehrfach auffälligen Oxylipine wurden auch in der Clusteranalyse gemeinsam gruppiert. Der Verdacht eines gemeinsamen Pathways oder gleiche Enzyme liegt somit nahe. Um mehr über die Ursachen von erhöhten Oxylipinen herauszufinden, wurden 15 Patienten mit besonders erhöhten Oxylipinen gegenüber den anderen Patienten verglichen. Dabei betrachtet wurden Alter, Geschlecht, BMI, Laborparameter, Medikation und die CAD-Diagnose. Interessanterweise war nur die Leukozytenzahl signifikant auffällig (**Abbildung 21**). Sie war bei den Patienten mit erhöhten oxidierten Phospholipiden im Mittelwert um ca. 25% höher. Bei Patienten mit besonders niedrigen Oxilipinen konnte dieser Zusammenhang nicht gezeigt werden (Daten nicht abgebildet). Umgekehrt wurde im Volcano-Plot jedoch gezeigt, dass Patienten mit Leukozytose (<10.000 Leukozyten; n = 21) signifikant erhöhte Oxilipide hatten. Im Vergleich mit der Literatur findet man für Oxilipide mehrfach eine wichtige Rolle bei der Thromboinflammation. (Chatterjee, 2020). Bei einer anderen Studie über die diagnostische Funktion von Arachidonsäure-Metaboliten (unter anderem 11-HETE, PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>) bei Patienten mit Sepsis, konnte gezeigt werden, dass besonders schlimm verlaufene Sepsis-Patienten eine Reduktion dieser Lipide im Blutplasma um 80-90% hatten (Bruegel et al., 2012). Dies wurde erklärt mit einer verminderten Genexpression und Funktion der COX-2. Tatsächlich werden oben genannte Arachidonsäure-Metabolite von der COX-2 synthetisiert. Eine Verminderung der COX-2 könnte eventuell zu einer Erhöhung der 12-LOX und damit vermehrten Bildung von Lipoxiden führen, ähnlich wie es beim Analgetikaasthma der Fall ist (Narayanankutty et al., 2013). Ob dieser Zusammenhang in den Thrombozyten besteht oder wie erhöhte Leukozyten im Blutplasma in Verbindung mit erhöhten Lipoxiden in Thrombozyten stehen, ist wissenschaftlich noch nicht geklärt.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde untersucht, ob die chronische Medikation von KHK-Patienten einen Einfluss auf das thrombozytäre Lipidom hat. Dabei zeigte sich, dass eine Medikation mit Statinen zu den meisten und stärksten Lipidomveränderungen führte. Außerdem waren die P2Y12-Inhibitoren auffällig, wobei die Lipidomveränderungen für Clopidogrel sehr unterschiedlich zu den von Ticagrelor waren.

Die Lipidomveränderungen der Statin-Medikation wurden zum einen mittels Statistikprogrammen wie JMP und zum anderen mit der Onlineplattform MetaboAnalyst 5.0 untersucht. Es wurde auch erstmalig gezeigt, dass einige der signifikanten Lipide eine positive Korrelation mit steigender Atorvastatindosis aufweisen. Ebenfalls wurde deren Unabhängigkeit von eventuellen Störfaktoren wie Begleiterkrankungen oder Komedikation belegt.

Unter Statintherapie vorwiegend herabreguliert waren fast ausschließlich LCFA- und VLCFA-PCs. In dieser Arbeit wurden zwei Erklärungsmodelle dieser Herabregulierung aufgrund Statintherapie aufgestellt. Eines besteht in der positiven Korrelation der PCs mit Plasma-Cholesterol und VLDL, welches beides unter Statintherapie sinkt. Das andere steht im Zusammenhang mit den hochregulierten Oxilipinen, welche die PCs als Ausgangssubstrate besitzen und dies somit für eine Statin-induzierte gesteigerte Oxilipin-Synthese sprechen könnte. Insgesamt sind die Veränderungen der herabregulierten Lipide als positiv und antikoagulativ zu werten, da die im ACS-Kollektiv am stärksten hochregulierten und thrombogen wirkenden Lipide unter Statintherapie verringert sind.

Die signifikant hochregulierten Lipide unter Statintherapie waren vorwiegend VLCFA-PUFA-TG und Oxilipine. Die TGs stehen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheiten, Atherosklerose und einer Assoziation mit CAD, IAP und Diabetes. Den Oxilipinen wird eine zentrale Funktion bei Inflammation, Hämostase und Apoptose (Ferroptose) nachgesagt. In vergleichender Betrachtung der Oxilipinen und Statinen in Thrombozyten wurden Gemeinsamkeiten bei den Rezeptoren und Signalwegen gefunden, welche eine Erklärung mancher pleiotroper Wirkungen der Statine sein könnten.

Als zusätzliche Analyse des Lipidoms und der Patienten mit besonders hohen Oxilipinen wurde eine Clusteranalyse gekoppelt mit den Patienten-Charakteristika durchgeführt. Damit konnte erstmalig eine Korrelation von Leukozytose mit erhöhten intrathrombozytären Oxilipinen aufgezeigt werden. Dies ist ein weiterer Beweis der zentralen Rolle der Oxilipine bei thromboinflammatorischen Prozessen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Human Metabolome Database: Showing metabocard for PC(18:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)) (HMDB0008055)* [Online]. Hmdb.ca. Available: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0008055> [Accessed 29.04.2023].
- Human Metabolome Database: Showing metabocard for PC(18:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)) (HMDB0008055)* [Online]. Available: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0008055> [Accessed].
- Methodenberatung Clusteranalyse* [Online]. Available: [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/interdependenz/gruppierung/cluster.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/interdependenz/gruppierung/cluster.html) [Accessed 02.01.2023].
- ABDULNOUR, R. E., DALLI, J., COLBY, J. K., KRISHNAMOORTHY, N., TIMMONS, J. Y., TAN, S. H., COLAS, R. A., PETASIS, N. A., SERHAN, C. N. & LEVY, B. D. 2014. Maresin 1 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 16526-31.
- ADILI, R., HAWLEY, M. & HOLINSTAT, M. 2018. Regulation of platelet function and thrombosis by omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 139, 10-18.
- AHLUWALIA, K., EBRIGHT, B., CHOW, K., DAVE, P., MEAD, A., POBLETE, R., LOUIE, S. & ASANTE, I. 2022. Lipidomics in Understanding Pathophysiology and Pharmacologic Effects in Inflammatory Diseases: Considerations for Drug Development. *Metabolites*, 12, 333.
- AKIBA, S., MURATA, T., KITATANI, K. & SATO, T. 2000. Involvement of lipoxygenase pathway in docosapentaenoic acid-induced inhibition of platelet aggregation. *Biol Pharm Bull*, 23, 1293-7.
- ALI, F. Y., ARMSTRONG, P. C., DHANJI, A. R., TUCKER, A. T., PAUL-CLARK, M. J., MITCHELL, J. A. & WARNER, T. D. 2009. Antiplatelet actions of statins and fibrates are mediated by PPARs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 706-11.
- AMBROSIO, A. L. & DI PIETRO, S. M. 2017. Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis. *Platelets*, 28, 138-146.
- ANDRADE, C. 2019. Multiple Testing and Protection Against a Type 1 (False Positive) Error Using the Bonferroni and Hochberg Corrections. *Indian J Psychol Med*, 41, 99-100.
- AOKI, J. 2004. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15, 477-489.
- AOYAGI, R., IKEDA, K., ISOBE, Y. & ARITA, M. 2017. Comprehensive analyses of oxidized phospholipids using a measured MS/MS spectra library. *J Lipid Res*, 58, 2229-2237.
- ARNETT, D. K., BLUMENTHAL, R. S., ALBERT, M. A., BUROKER, A. B., GOLDBERGER, Z. D., HAHN, E. J., HIMMELFARB, C. D., KHERA, A., LLOYD-JONES, D., MCEVOY, J. W., MICHOS, E. D., MIEDEMA, M. D., MUÑOZ, D., SMITH, S. C., JR., VIRANI, S. S., WILLIAMS, K. A., SR., YEBOAH, J. & ZIAEIAN, B. 2019. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 140, e596-e646.
- AUKRUST, P., HALVORSEN, B., UELAND, T., MICHELSEN, A. E., SKJELLAND, M., GULLESTAD, L., YNDESTAD, A. & OTTERDAL, K. 2010. Activated platelets and atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 8, 1297-307.

- BARCHUK, M., DUTOUR, A., ANCEL, P., SVILAR, L., MIKSZTOWICZ, V., LOPEZ, G., RUBIO, M., SCHREIER, L., NOGUEIRA, J. P., VALÉRO, R., BÉLIARD, S., MARTIN, J. C., BERG, G. & GABORIT, B. 2020. Untargeted Lipidomics Reveals a Specific Enrichment in Plasmalogens in Epicardial Adipose Tissue and a Specific Signature in Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 40, 986-1000.
- BARRE, D. E. & HOLUB, B. J. 1992. The effect of borage oil consumption on the composition of individual phospholipids in human platelets. *Lipids*, 27, 315-20.
- BAUM, S. J., KRIS-ETHERTON, P. M., WILLETT, W. C., LICHTENSTEIN, A. H., RUDEL, L. L., MAKI, K. C., WHELAN, J., RAMSDEN, C. E. & BLOCK, R. C. 2012. Fatty acids in cardiovascular health and disease: a comprehensive update. *J Clin Lipidol*, 6, 216-34.
- BERGHEANU, S. C., REIJMERS, T., ZWINDERMAN, A. H., BOBELDIJK, I., RAMAKER, R., LIEM, A.-H., GREEF, J. V. D., HANKEMEIER, T. & WOUTER JUKEMA, J. 2008. Lipidomic approach to evaluate rosuvastatin and atorvastatin at various dosages: investigating differential effects among statins. *Current Medical Research and Opinion*, 24, 2477-2487.
- BERRY, S. 2009. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: An overview and implications for cardiovascular disease. *Nutrition research reviews*, 22, 3-17.
- BRUEGEL, M., LUDWIG, U., KLEINHEMPEL, A., PETROS, S., KORTZ, L., CEGLAREK, U., HOLDT, L. M., THIERY, J. & FIEDLER, G. M. 2012. Sepsis-associated changes of the arachidonic acid metabolism and their diagnostic potential in septic patients. *Crit Care Med*, 40, 1478-86.
- CARVAJAL-RODRÍGUEZ, A., DE UÑA, J. & ROLÁN-ALVAREZ, E. 2009. Carvajal-Rodriguez A, de Una-Alvarez J, Rolan-Alvarez E. A new multitest correction (SGoF) that increases its statistical power when increasing the number of tests. *BMC Bioinformatics* 10: 209. *BMC bioinformatics*, 10, 209.
- CHAPMAN, M. J., ORSONI, A., TAN, R., MELLETT, N. A., NGUYEN, A., ROBILLARD, P., GIRAL, P., THÉRON, P. & MEIKLE, P. J. 2020. LDL subclass lipidomics in atherogenic dyslipidemia: effect of statin therapy on bioactive lipids and dense LDL. *J Lipid Res*, 61, 911-932.
- CHATTERJEE, M. 2020. Platelet lipidome: Dismantling the "Trojan horse" in the bloodstream. *J Thromb Haemost*, 18, 543-557.
- CHEMIE.DE Fettsäuren.
- COLLABORATORS, G. D. A. I. 2020. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 396, 1204-1222.
- CONTURSI, A., SCHIAVONE, S., DOVIZIO, M., HINZ, C., FULLONE, R., TACCONELLI, S., TYRRELL, V. J., GRANDE, R., LANUTI, P., MARCHISIO, M., ZUCHELLI, M., BALLERINI, P., LANAS, A., O'DONNELL, V. B. & PATRIGNANI, P. 2021. Platelets induce free and phospholipid-esterified 12-hydroxyeicosatetraenoic acid generation in colon cancer cells by delivering 12-lipoxygenase. *J Lipid Res*, 62, 100109.
- COUGHLIN, S. R. 1999. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11023-7.
- CRESCENTE, M., MENKE, L., CHAN, M. V., ARMSTRONG, P. C. & WARNER, T. D. 2019. Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond). *Br J Pharmacol*, 176, 988-999.

- DAVIES, S. S., PONTSLEER, A. V., MARATHE, G. K., HARRISON, K. A., MURPHY, R. C., HINSHAW, J. C., PRESTWICH, G. D., HILAIRE, A. S., PRESCOTT, S. M., ZIMMERMAN, G. A. & MCINTYRE, T. M. 2001. Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J Biol Chem*, 276, 16015-23.
- DERKSEN, A. & COHEN, P. 1975. Patterns of fatty acid release from endogenous substrates by human platelet homogenates and membranes. *J Biol Chem*, 250, 9342-7.
- DU, H., HU, H., ZHENG, H., HAO, J., YANG, J. & CUI, W. 2014. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in simvastatin antiplatelet activity: influences on cAMP and mitogen-activated protein kinases. *Thromb Res*, 134, 111-20.
- EISINGER, K., LIEBISCH, G., SCHMITZ, G., ASLANIDIS, C., KRAUTBAUER, S. & BUECHLER, C. 2014. Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *Int J Mol Sci*, 15, 2991-3002.
- FULLERTON, J. N. & GILROY, D. W. 2016. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15, 551-567.
- FUTERMAN, A. H. & HANNUN, Y. A. 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep*, 5, 777-82.
- GABRIELLE NEPOMUCENO, C. V. C. J., MARCELA SORELLI CARNEIRO-RAMOS, AND HERCULANO DA SILVA MARTINHO 2021. Tyrosine and Tryptophan vibrational bands as markers of kidney injury: a renocardiac syndrome induced by renal ischemia and reperfusion stud. *Sci Rep*, 11.
- GALLONE, G., BALDETTI, L., PAGNESI, M., LATIB, A., COLOMBO, A., LIBBY, P. & GIANNINI, F. 2018. Medical Therapy for Long-Term Prevention of Atherothrombosis Following an Acute Coronary Syndrome: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*, 72, 2886-2903.
- GAWAZ, M., LANGER, H. & MAY, A. E. 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, 115, 3378-84.
- GODZIEN, J., CIBOROWSKI, M., ARMITAGE, E. G., JORGE, I., CAMAFEITA, E., BURILLO, E., MARTÍN-VENTURA, J. L., RUPÉREZ, F. J., VÁZQUEZ, J. & BARBAS, C. 2016. A Single In-Vial Dual Extraction Strategy for the Simultaneous Lipidomics and Proteomics Analysis of HDL and LDL Fractions. *Journal of Proteome Research*, 15, 1762-1775.
- GOLEBIEWSKA, E. M. & POOLE, A. W. 2015. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*, 29, 153-62.
- GONZÁLEZ-NÚÑEZ, D., CLARIA, J., RIVERA, F. & POCH, E. 2001. Increased levels of 12(S)-HETE in patients with essential hypertension. *Hypertension*, 37, 334-8.
- HAJEYAH, A. A., GRIFFITHS, W. J., WANG, Y., FINCH, A. J. & O'DONNELL, V. B. 2020. The Biosynthesis of Enzymatically Oxidized Lipids. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 591819.
- HAMBERG, M. & SAMUELSSON, B. 1974. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 3400-4.
- HAMID, M. A., KUNICKI, T. J. & ASTER, R. H. 1980. Lipid composition of freshly prepared and stored platelet concentrates. *Blood*, 55, 124-30.
- HARM, T. 2022. Assoziation des akuten Koronarsyndroms mit kritischen Veränderungen des thrombozytären Lipidoms. *Medizinische Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen*.

- 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. 2022. Acute coronary syndrome is associated with a substantial change in the platelet lipidome. *Cardiovasc Res*, 118, 1904-1916.
- HARM, T., FREY, M., DITTRICH, K., GOLDSCHMIED, A., ROHLFING, A. K., FU, X., BRUN, A., CASTOR, T., RATH, D., MÜLLER, K., LAMMERHOFER, M. & GAWAZ, M. 2023. Statin Treatment Is Associated with Alterations in the Platelet Lipidome. *Thromb Haemost*.
- HOLLOPETER, G., JANTZEN, H. M., VINCENT, D., LI, G., ENGLAND, L., RAMAKRISHNAN, V., YANG, R. B., NURDEN, P., NURDEN, A., JULIUS, D. & CONLEY, P. B. 2001. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 409, 202-7.
- HORN, F. 2009. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*, Stuttgart, Thieme.
- HSI, L. C., WILSON, L. C. & ELING, T. E. 2002. Opposing effects of 15-lipoxygenase-1 and -2 metabolites on MAPK signaling in prostate. Alteration in peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, 277, 40549-56.
- JARDIN, I., LÓPEZ, J. J., PARIENTE, J. A., SALIDO, G. M. & ROSADO, J. A. 2008. Intracellular calcium release from human platelets: different messengers for multiple stores. *Trends in cardiovascular medicine*, 18 2, 57-61.
- KAGAN, V. E., MAO, G., QU, F., ANGELI, J. P., DOLL, S., CROIX, C. S., DAR, H. H., LIU, B., TYURIN, V. A., RITOV, V. B., KAPRALOV, A. A., AMOSCATO, A. A., JIANG, J., ANTHONYMUTHU, T., MOHAMMADYANI, D., YANG, Q., PRONETH, B., KLEIN-SEETHARAMAN, J., WATKINS, S., BAHAR, I., GREENBERGER, J., MALLAMPALLI, R. K., STOCKWELL, B. R., TYURINA, Y. Y., CONRAD, M. & BAYIR, H. 2017. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol*, 13, 81-90.
- KLAGES, B., BRANDT, U., SIMON, M. I., SCHULTZ, G. & OFFERMANN, S. 1999. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol*, 144, 745-54.
- KONGER, R. L., MARATHE, G. K., YAO, Y., ZHANG, Q. & TRAVERS, J. B. 2008. Oxidized glycerophosphocholines as biologically active mediators for ultraviolet radiation-mediated effects. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 87, 1-8.
- KUTZNER, L., GOLOSHCHAPOVA, K., HEYDECK, D., STEHLING, S., KUHN, H. & SCHEBB, N. H. 2017. Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1862, 666-675.
- KYSELOVÁ, L., VÍTOVÁ, M. & ŘEZANKA, T. 2022. Very long chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 87, 101180.
- LAAKSONEN, R., JÄNIS, M. T. & ORESIC, M. 2008. Lipidomics-based safety biomarkers for lipid-lowering treatments. *Angiology*, 59, 65s-8s.
- LAGOUTTE-RENOSI, J., ALLEMAND, F., RAMSEYER, C., RABANI, V. & DAVANI, S. 2021. Influence of Antiplatelet Agents on the Lipid Composition of Platelet Plasma Membrane: A Lipidomics Approach with Ticagrelor and Its Active Metabolite. *Int J Mol Sci*, 22.
- LANDMESSER, U., WOLLERT, K. C. & DREXLER, H. 2009. Potential novel pharmacological therapies for myocardial remodelling. *Cardiovascular Research*, 81, 519-527.
- LAUDER, S. N., ALLEN-REDPATH, K., SLATTER, D. A., ALDROVANDI, M., O'CONNOR, A., FAREWELL, D., PERCY, C. L., MOLHOEK, J. E., RANNIKKO, S., TYRRELL, V. J., FERLA, S., MILNE, G. L.,



- POOLE, A. W., THOMAS, C. P., OBAJI, S., TAYLOR, P. R., JONES, S. A., DE GROOT, P. G., URBANUS, R. T., HÖRKKÖ, S., UDERHARDT, S., ACKERMANN, J., VINCE JENKINS, P., BRANCALE, A., KRÖNKE, G., COLLINS, P. W. & O'DONNELL, V. B. 2017. Networks of enzymatically oxidized membrane lipids support calcium-dependent coagulation factor binding to maintain hemostasis. *Sci Signal*, 10.
- LAUFS, U., GERTZ, K., HUANG, P., NICKENIG, G., BÖHM, M., DIRNAGL, U. & ENDRES, M. 2000. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke*, 31, 2442-9.
- LI, Z., DELANEY, M. K., O'BRIEN, K. A. & DU, X. 2010. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 2341-9.
- LI, Z., XI, X., GU, M., FEIL, R., YE, R. D., EIGENTHALER, M., HOFMANN, F. & DU, X. 2003. A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Cell*, 112, 77-86.
- LIEBISCH, G., FAHY, E., AOKI, J., DENNIS, E. A., DURAND, T., EJSING, C. S., FEDOROVA, M., FEUSSNER, I., GRIFFITHS, W. J., KÖFELER, H., MERRILL, A. H., JR., MURPHY, R. C., O'DONNELL, V. B., OSKOLKOVA, O., SUBRAMANIAM, S., WAKELAM, M. J. O. & SPENER, F. 2020. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J Lipid Res*, 61, 1539-1555.
- LIEBISCH, G., VIZCAÍNO, J. A., KÖFELER, H., TRÖTZMÜLLER, M., GRIFFITHS, W. J., SCHMITZ, G., SPENER, F. & WAKELAM, M. J. O. 2013. Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 54, 1523-1530.
- MAGUIRE, P. B. & FITZGERALD, D. J. 2003. Platelet proteomics. *J Thromb Haemost*, 1, 1593-601.
- MALLELA, S. K., MERSCHER, S. & FORNONI, A. 2022. Implications of Sphingolipid Metabolites in Kidney Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 4244.
- MARCUS, A. J., ULLMAN, H. L. & SAFIER, L. B. 1969. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J Lipid Res*, 10, 108-14.
- MEIKLE, P. J., WONG, G., TSOROTES, D., BARLOW, C. K., WEIR, J. M., CHRISTOPHER, M. J., MACINTOSH, G. L., GOUDEY, B., STERN, L., KOWALCZYK, A., HAVIV, I., WHITE, A. J., DART, A. M., DUFFY, S. J., JENNINGS, G. L. & KINGWELL, B. A. 2011. Plasma lipidomic analysis of stable and unstable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 2723-32.
- MEVIK, R. W. A. B.-H. 2007. pls: Partial Least Squares Regression (PLSR) and Principal Component Regression (PCR). *R package version 2.1-0*.
- MORGAN, L. T., THOMAS, C. P., KÜHN, H. & O'DONNELL, V. B. 2010. Thrombin-activated human platelets acutely generate oxidized docosahexaenoic-acid-containing phospholipids via 12-lipoxygenase. *Biochem J*, 431, 141-8.
- MOSCARDÓ, A., VALLÉS, J., LATORRE, A., MADRID, I. & SANTOS, M. T. 2013. Reduction of platelet cytosolic phospholipase A2 activity by atorvastatin and simvastatin: biochemical regulatory mechanisms. *Thromb Res*, 131, e154-9.
- MURTAGH, F. & LEGENDRE, P. 2014. Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification*, 31, 274-295.

- NARAYANANKUTTY, A., RESÉNDIZ-HERNÁNDEZ, J. M., FALFÁN-VALENCIA, R. & TERAN, L. M. 2013. Biochemical pathogenesis of aspirin exacerbated respiratory disease (AERD). *Clin Biochem*, 46, 566-78.
- NARDI, M., FEINMARK, S. J., HU, L., LI, Z. & KARPATKIN, S. 2004. Complement-independent Ab-induced peroxide lysis of platelets requires 12-lipoxygenase and a platelet NADPH oxidase pathway. *J Clin Invest*, 113, 973-80.
- NENNA, A., NAPPI, F., LUSINI, M., SATRIANO, U. M., SCHILIRÒ, D., SPADACCIO, C. & CHELLO, M. 2021. Effect of Statins on Platelet Activation and Function: From Molecular Pathways to Clinical Effects. *BioMed Research International*, 2021, 6661847.
- NICHOLSON, J. K., LINDON, J. C. & HOLMES, E. 1999. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29, 1181-1189.
- NIESSEN, J., JEDLITSCHKY, G., GRUBE, M., BIEN, S., SCHWERTZ, H., OHTSUKI, S., KAWAKAMI, H., KAMIIE, J., OSWALD, S., STARKE, K., STROBEL, U., SIEGMUND, W., ROSSKOPF, D., GREINACHER, A., TERASAKI, T. & KROEMER, H. K. 2009. Human platelets express organic anion-transporting peptide 2B1, an uptake transporter for atorvastatin. *Drug Metab Dispos*, 37, 1129-37.
- NIRODI, C. S., CREWS, B. C., KOZAK, K. R., MORROW, J. D. & MARNETT, L. J. 2004. The glyceryl ester of prostaglandin E2 mobilizes calcium and activates signal transduction in RAW264.7 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1840-5.
- 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.
- OESTERLE, A., LAUFS, U. & LIAO, J. K. 2017. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res*, 120, 229-243.
- PADRO, T., VILAHUR, G., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, J., HERNÁNDEZ, M., ANTONIJOAN, R. M., PEREZ, A. & BADIMON, L. 2015. Lipidomic changes of LDL in overweight and moderately hypercholesterolemic subjects taking phytosterol- and omega-3-supplemented milk. *Journal of Lipid Research*, 56, 1043-1056.
- PANG, Z., CHONG, J., ZHOU, G., DE LIMA MORAIS, D. A., CHANG, L., BARRETTE, M., GAUTHIER, C., JACQUES, P.-É., LI, S. & XIA, J. 2021. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, 49, W388-W396.
- PANG, Z., ZHOU, G., EWALD, J., CHANG, L., HACARIZ, O., BASU, N. & XIA, J. 2022. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC-HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nature Protocols*, 17, 1735-1761.
- PATEL, N., VOGEL, R., CHANDRA-KUNTAL, K., GLASGOW, W. & KELAVKAR, U. 2014. A novel three serum phospholipid panel differentiates normal individuals from those with prostate cancer. *PLoS One*, 9, e88841.
- PIEPOLI, M. F., HOES, A. W., AGEWALL, S., ALBUS, C., BROTONS, C., CATAPANO, A. L., COONEY, M.-T., CORRÀ, U., COSYNS, B., DEATON, C., GRAHAM, I., HALL, M. S., HOBBS, F. D. R., LØCHEN, M.-L., LÖLLGEN, H., MARQUES-VIDAL, P., PERK, J., PRESCOTT, E., REDON, J., RICHTER, D. J., SATTAR, N., SMULDERS, Y., TIBERI, M., VAN DER WORP, H. B., VAN DIS, I., VERSCHUREN, W. M. M., BINNO, S. & GROUP, E. S. D. 2016. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by

- invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *European Heart Journal*, 37, 2315-2381.
- PROTTY, M. B., JENKINS, P. V., COLLINS, P. W. & O'DONNELL, V. B. 2022. The role of procoagulant phospholipids on the surface of circulating blood cells in thrombosis and haemostasis. *Open Biol*, 12, 210318.
- PUC CETTI, L., SAWAMURA, T., PASQUI, A. L., PASTORELLI, M., AUTERI, A. & BRUNI, F. 2005. Atorvastatin reduces platelet-oxidized-LDL receptor expression in hypercholesterolaemic patients. *Eur J Clin Invest*, 35, 47-51.
- RHEE, E. P., CHENG, S., LARSON, M. G., WALFORD, G. A., LEWIS, G. D., MCCABE, E., YANG, E., FARRELL, L., FOX, C. S., O'DONNELL, C. J., CARR, S. A., VASAN, R. S., FLOREZ, J. C., CLISH, C. B., WANG, T. J. & GERSZTEN, R. E. 2011. Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans. *J Clin Invest*, 121, 1402-11.
- RIVERA, J., LOZANO, M. L., NAVARRO-NÚÑEZ, L. & VICENTE, V. 2009. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*, 94, 700-11.
- RUIZ-PEREZ, D., GUAN, H., MADHIVANAN, P., MATHEE, K. & NARASIMHAN, G. 2020. So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*, 21, 2.
- RWIBASIRA RUDINGA, G., KHAN, G. J. & KONG, Y. 2018. Protease-Activated Receptor 4 (PAR4): A Promising Target for Antiplatelet Therapy. *Int J Mol Sci*, 19.
- SANCHIS-GOMAR, F., PEREZ-QUILIS, C., LEISCHIK, R. & LUCIA, A. 2016. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med*, 4, 256.
- SEREBRUANY, V. L., MILLER, M., POKOV, A. N., MALININ, A. I., LOWRY, D. R., TANGUAY, J. F. & HENNEKENS, C. H. 2006. Effect of statins on platelet PAR-1 thrombin receptor in patients with the metabolic syndrome (from the PAR-1 inhibition by statins [PARIS] study). *Am J Cardiol*, 97, 1332-6.
- SHRIMPTON, C. N., BORTHAKUR, G., LARRUCEA, S., CRUZ, M. A., DONG, J. F. & LÓPEZ, J. A. 2002. Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation. *J Exp Med*, 196, 1057-66.
- SLATTER, D. A., PERCY, C. L., ALLEN-REDPATH, K., GAJSIEWICZ, J. M., BROOKS, N. J., CLAYTON, A., TYRRELL, V. J., ROSAS, M., LAUDER, S. N., WATSON, A., DUL, M., GARCIA-DIAZ, Y., ALDROVANDI, M., HEURICH, M., HALL, J., MORRISSEY, J. H., LACROIX-DESMAZES, S., DELIGNAT, S., JENKINS, P. V., COLLINS, P. W. & O'DONNELL, V. B. 2018. Enzymatically oxidized phospholipids restore thrombin generation in coagulation factor deficiencies. *JCI Insight*, 3.
- SNODGRASS, R. G., ZE ZINA, E., NAMGALADZE, D., GUPTA, S., ANGI ONI, C., GEIS SLINGER, G., LÜTJOHANN, D. & BRÜNE, B. 2018. A Novel Function for 15-Lipoxygenases in Cholesterol Homeostasis and CCL17 Production in Human Macrophages. *Front Immunol*, 9, 1906.
- SPECTOR, A. A. & KIM, H. Y. 2015. Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1851, 356-65.
- SUD, M., FAHY, E., COTTER, D., BROWN, A., DENNIS, E. A., GLASS, C. K., MERRILL, A. H., JR, MURPHY, R. C., RAETZ, C. R. H., RUSSELL, D. W. & SUBRAMANIAM, S. 2006. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*, 35, D527-D532.

- SURENDRAN, A., ATEFI, N., ISMAIL, U., SHAH, A. & RAVANDI, A. 2022. Impact of myocardial reperfusion on human plasma lipidome. *iScience*, 25, 103828.
- SYSI-AHO, M., KOIKKALAINEN, J., SEPPÄNEN-LAAKSO, T., KAARTINEN, M., KUUSISTO, J., PEUHKURINEN, K., KÄRKKÄINEN, S., ANTILA, M., LAUERMA, K., REISELL, E., JURKKO, R., LÖTJÖNEN, J., HELIÖ, T. & OREŠIČ, M. 2011. Serum lipidomics meets cardiac magnetic resonance imaging: profiling of subjects at risk of dilated cardiomyopathy. *PLoS One*, 6, e15744.
- THEOFILIS, P., SAGRIS, M., OIKONOMOU, E., ANTONOPOULOS, A. S., TSIOUFIS, K. & TOUSOULIS, D. 2022. Factors Associated with Platelet Activation-Recent Pharmaceutical Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 3301.
- THOMAS, C. P., MORGAN, L. T., MASKREY, B. H., MURPHY, R. C., KÜHN, H., HAZEN, S. L., GOODALL, A. H., HAMALI, H. A., COLLINS, P. W. & O'DONNELL, V. B. 2010. Phospholipid-esterified eicosanoids are generated in agonist-activated human platelets and enhance tissue factor-dependent thrombin generation. *J Biol Chem*, 285, 6891-903.
- UDERHARDT, S., ACKERMANN, J. A., FILLEP, T., HAMMOND, V. J., WILLEIT, J., SANTER, P., MAYR, M., BIBURGER, M., MILLER, M., ZELLNER, K. R., STARK, K., ZARBOCK, A., ROSSAINT, J., SCHUBERT, I., MIELENZ, D., DIETEL, B., RAAZ-SCHRAUDER, D., AY, C., GREMMEL, T., THALER, J., HEIM, C., HERRMANN, M., COLLINS, P. W., SCHABBAUER, G., MACKMAN, N., VOEHRINGER, D., NADLER, J. L., LEE, J. J., MASSBERG, S., RAUH, M., KIECHL, S., SCHETT, G., O'DONNELL, V. B. & KRÖNKE, G. 2017. Enzymatic lipid oxidation by eosinophils propagates coagulation, hemostasis, and thrombotic disease. *J Exp Med*, 214, 2121-2138.
- VANROLLINS, M., HORROCKS, L. & SPRECHER, H. 1985. Metabolism of 7,10,13,16-docosatetraenoic acid to dihomothromboxane, 14-hydroxy-7,10,12-nonadecatrienoic acid and hydroxy fatty acids by human platelets. *Biochim Biophys Acta*, 833, 272-80.
- VÉRICEL, E., POLETTE, A., BACOT, S., CALZADA, C. & LAGARDE, M. 2003. Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1, 566-572.
- VIOLI, F., CALVIERI, C., FERRO, D. & PIGNATELLI, P. 2013. Statins as antithrombotic drugs. *Circulation*, 127, 251-7.
- WENK, M. R. 2005. The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 594-610.
- WIESNER, P., LEIDL, K., BOETTCHER, A., SCHMITZ, G. & LIEBISCH, G. 2009. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res*, 50, 574-585.
- WILLIAMS, M. K. C. F. J. W. A. S. W. A. A. 2008. caret: Classification and Regression Training. *R package version 3.45*.
- WISHART, D. S., GUO, A., OLER, E., WANG, F., ANJUM, A., PETERS, H., DIZON, R., SAYEEDA, Z., TIAN, S., LEE, B. L., BERJANSKII, M., MAH, R., YAMAMOTO, M., JOVEL, J., TORRES-CALZADA, C., HIEBERT-GIESBRECHT, M., LUI, V. W., VARSHAVI, D., VARSHAVI, D., ALLEN, D., ARNDT, D., KHETARPAL, N., SIVAKUMARAN, A., HARFORD, K., SANFORD, S., YEE, K., CAO, X., BUDINSKI, Z., LIIGAND, J., ZHANG, L., ZHENG, J., MANDAL, R., KARU, N., DAMBROVA, M., SCHIÖTH, H. B., GREINER, R. & GAUTAM, V. 2022. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res*, 50, D622-d631.

- WONG, G., BARLOW, C. K., WEIR, J. M., JOWETT, J. B., MAGLIANO, D. J., ZIMMET, P., SHAW, J. & MEIKLE, P. J. 2013. Inclusion of plasma lipid species improves classification of individuals at risk of type 2 diabetes. *PLoS One*, 8, e76577.
- XIANG, Y., LAM, S. M. & SHUI, G. 2015. What can lipidomics tell us about the pathogenesis of Alzheimer disease? *Biological Chemistry*, 396, 1281-1291.
- YANG, K. & HAN, X. 2016. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem Sci*, 41, 954-969.
- YEUNG, J., ADILI, R., YAMAGUCHI, A., FREEDMAN, C. J., CHEN, A., SHAMI, R., DAS, A., HOLMAN, T. R. & HOLINSTAT, M. 2020. Omega-6 DPA and its 12-lipoxygenase-oxidized lipids regulate platelet reactivity in a nongenomic PPAR $\alpha$ -dependent manner. *Blood Adv*, 4, 4522-4537.
- YEUNG, J., APOPA, P. L., VESCI, J., STOLLA, M., RAI, G., SIMEONOV, A., JADHAV, A., FERNANDEZ-PEREZ, P., MALONEY, D. J., BOUTAUD, O., HOLMAN, T. R. & HOLINSTAT, M. 2013. 12-lipoxygenase activity plays an important role in PAR4 and GPVI-mediated platelet reactivity. *Thromb Haemost*, 110, 569-81.
- YEUNG, J., HAWLEY, M. & HOLINSTAT, M. 2017. The expansive role of oxylipins on platelet biology. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 95.
- YEUNG, J. & HOLINSTAT, M. 2011. 12-lipoxygenase: a potential target for novel anti-platelet therapeutics. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 9, 154-64.
- ZHANG, J., LIANG, S., NING, R., JIANG, J., ZHANG, J., SHEN, H., CHEN, R., DUAN, J. & SUN, Z. 2020. PM2.5-induced inflammation and lipidome alteration associated with the development of atherosclerosis based on a targeted lipidomic analysis. *Environment International*, 136, 105444.
- ZHAO, Q., LI, M., CHEN, M., ZHOU, L., ZHAO, L., HU, R., YAN, R. & DAI, K. 2016. Lovastatin induces platelet apoptosis. *Environ Toxicol Pharmacol*, 42, 69-75.

## 7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin III – Kardiologie und Angiologie – Deutsches Herzkompentenz Zentrum Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz<sup>1</sup> durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz und Prof. Dr. rer. nat. Michael Lämmerhofer<sup>2</sup>.

Die für diese Dissertation verwendeten Blutproben und klinischen Daten wurden durch Dr. med. Andreas Goldschmied und Dr. med. Tobias Harm<sup>1</sup> erarbeitet. Diese Patientenkohorte wurde in einer früheren, nachfolgend genannten, Studie auf thrombozytäre Lipidom-Unterschiede des ACS vs. CCS untersucht (Harm, 2022). Die dafür durchgeführten Untersuchungen und Ergebnisse stehen in keinem relevanten Zusammenhang zu den in der vorliegenden Dissertation erbrachten Eigenleistungen.

Die UHPLC-ESI-QTOF-Massenspektrometrie der Proben, Normalisierung der Peak Intensitäten und die Ableitung der Konzentrationen erfolgte durch Kristina Dittrich<sup>2</sup>.

Für die Arbeitsgruppe habe ich zudem mit weiteren Blutabnahmen (ca. 150), klinischen Daten (ca. 250 Patienten) und Follow-up-Daten (ca. 500 Patienten) zu einem großen Kollektiv für zukünftige Forschungsprojekte beigetragen.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Dr. You-Shan Feng des Instituts für Biometrie bestätigte die Richtigkeit des Vorgehens und unterstützte zu Beginn mit Tipps.

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

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

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

## 8. Veröffentlichung

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgender Publikation mit genannter Zweitautorenschaft veröffentlicht:

### Statin Treatment Is Associated with Alterations in the Platelet Lipidome

Tobias Harm <sup>1</sup>, Moritz Frey <sup>1</sup>, Kristina Dittrich <sup>2</sup>, Andreas Goldschmied <sup>1</sup>, Anne-Katrin Rohlfing <sup>1</sup>, Xiaoqing Fu <sup>2</sup>, Adrian Brun <sup>2</sup>, Tatsiana Castor <sup>1</sup>, Dominik Rath <sup>1</sup>, Karin Müller <sup>1</sup>, Michael Lammerhofer <sup>2</sup>, Meinrad Gawaz <sup>1</sup>

Affiliations + expand

PMID: 36898406 DOI: 10.1055/s-0043-1764353

#### Abstract

**Background:** Platelets are key players in the pathophysiology of coronary artery disease (CAD) and platelet hyperreactivity leads to increased risk of developing adverse cardiovascular events. Further, significant changes in the platelet lipidome occur in patients with acute coronary syndrome (ACS) and critically regulated lipids lead to platelet hyperresponsiveness. Statin treatment is crucial in the treatment and prevention of patients with CAD by remodeling lipid metabolism.

**Objective:** In this study, we investigate the platelet lipidome of CAD patients by untargeted lipidomics, highlighting significant changes between statin-treated and naïve patients.

**Methods:** We characterized the platelet lipidome in a CAD cohort ( $n = 105$ ) by an untargeted lipidomics approach using liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

**Results:** Among the annotated lipids, 41 lipids were significantly upregulated in statin-treated patients, whereas 6 lipids were downregulated compared to naïve patients. The most prominent upregulated lipids in statin-treated patients belong to the class of triglycerides, cholesteryl esters, palmitic acid, and oxidized phospholipids, whereas mainly glycerophospholipids were downregulated compared to untreated patients. A more pronounced effect of statin treatment on the platelet lipidome was observed in ACS patients. We further highlight a dose-dependent influence on the platelet lipidome.

**Conclusion:** Our results reveal that the platelet lipidome is altered in CAD patients with statin treatment and upregulated lipids embody mainly characteristic triglycerides, whereas downregulated lipids mostly compromise glycerophospholipids, which may play a role in the pathophysiology of CAD. Results of this study may contribute to the understanding of statin treatment softening the lipid phenotype.

Thieme. All rights reserved.

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

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

## 9. Danksagung

Zunächst bedanke ich mich außerordentlich bei Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz für die Ermöglichung der Durchführung dieser Dissertation als sein Doktorand und für die Bereitstellung dieses spannenden Themas. Außerdem möchte ich mich herzlichst für das entgegengebrachte Vertrauen und die stetige Unterstützung bedanken.

Des Weiteren gebührt ein großer Dank Herrn Prof. Lämmerhofer für die Zusammenarbeit und ganz besonders für die hilfreiche Unterstützung bei dem theoretischen Hintergrundwissen.

Ebenfalls sehr bedanken möchte ich mich bei Frau Kristina Dittrich für die Auswertung und Bereitstellung der Lipidomics-Daten sowie den erkenntnisreichen Austausch und theoretischen Input.

Vielen Dank an Herrn Adrian Brun für die genauere Auswertung der Oxilipinen und den theoretischen Hintergrund dazu.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Dr. med. Tobias Harm, der mich von Beginn an großartig in die Arbeit eingeführt hat, ein hilfreicher Ansprechpartner für mich war und die Publikation vorgebracht und vollendet hat.

Den Kollegen der Arbeitsgruppe Gawaz danke ich für die Unterstützung beim praktisch-klinischen Teil. Danke an Herr Dr. med. Álvaro Petersen Uribe für die Einführung in die Daten-Tabelle und danke an Frau Dr. Tatsiana Castor für die ausgezeichnete Koordination.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei Julia Boriga bedanken für die unglaubliche Unterstützung und ganz besondere Motivation. Und bei meiner Schwester Heidi und ganz besonders bei meinen Eltern Sabine und Karl-Heinz Frey für den bedingungslosen Rückhalt und die Motivation. Danke, dass ihr mir mein Studium ermöglicht habt!

**Nur dank ihnen und euch allen ist diese Arbeit gelungen!**