

**Einfluss von Statinen auf die cholinerg vermittelte Inhibition
der ATP-abhängigen Interleukin-1 β -Sekretion von primären
peripheren mononukleären Blutzellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Leon Benedict Brandenburg
aus Köln

Gießen 2022

**Aus dem Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**
Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie
Sektion Experimentelle Chirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Veronika Grau

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Schäffler

Tag der Disputation: 08.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
Interleukin-1 β	1
Monozyten	2
P2X7-Rezeptor.....	3
NLRP3-Inflammasom.....	5
Cholinerge Kontrollmechanismen der Interleukin-1 β -Freisetzung.....	7
Cholesterol	10
<i>Lipid rafts</i>	12
Statine	13
Acetylsalicylsäure	15
Atherosklerose	17
<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>	19
Fragestellung der Dissertation	20
Material und Methoden.....	22
Studienprotokoll.....	22
Reagenzien	23
Verbrauchsmaterialien.....	24
Geräte.....	26
Software	26
Anreicherung der Monozyten	27
Zellkultorexperimente mit angereicherten Monozyten	27
ELISA.....	28
Abschätzung des Zelltods	29
Bestimmung der Gesamtcholesterol-, LDL-C-, HDL-C- und Triglycerid-Konzentrationen.....	29
Statistische Datenauswertung.....	30
Ergebnisse	31
Patientenkollektiv.....	31
Ergebnisse der Blutserumanalysen	33
Gesamtcholesterol	33
<i>Low-density lipoprotein-associated cholesterol</i>	34
<i>High density lipoprotein-associated cholesterol</i>	35
Triglyceride.....	35
Effekte nikotinerger Agonisten auf die BzATP-abhängige IL-1 β -Ausschüttung angereicherter Monozyten	36

Effekt von BzATP auf die IL-1 β -Ausschüttung angereicherter Monozyten	36
Effekt der medikamentösen Therapie auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Ausschüttung angereicherter Monozyten	38
Effekte der nikotinerger Agonisten auf die IL-1 β -Ausschüttung vor Beginn der medikamentösen Therapie	39
Effekte der nikotinerger Agonisten auf die IL-1 β -Ausschüttung nach vierwöchiger Statineinnahme	42
Effekte der nikotinerger Agonisten auf die IL-1 β -Ausschüttung nach vierwöchiger Statin- gefolgt von vierwöchiger Statin- und ASS-Einnahme	44
Effekte der medikamentösen Therapie auf die Inhibition der BzATP-abhängigen IL-1 β - Ausschüttung durch nikotinerger Agonisten	46
Acetylcholin	46
Phosphocholin	48
C-reaktives Protein	50
Nikotin	52
Glycerophosphocholin.....	54
Dipalmitoylphosphatidylcholin	56
Diskussion.....	58
Methodendiskussion	58
Anreicherung von Monozyten aus dem Vollblut der Patienten.....	58
LDH	58
Statine	61
Wirkung von Atorvastatin auf die Konzentration von Gesamtcholesterol, LDL-C, HDL-C und Triglyceriden im Blut	61
Freisetzung von IL-1 β nach Einnahme von Atorvastatin.....	63
Wirkung nikotinerger Agonisten nach Statineinnahme	66
ASS.....	69
Klinische Bedeutung	72
Zusammenfassung.....	74
Abbildungsverzeichnis.....	77
Tabellenverzeichnis	78
Abkürzungsverzeichnis.....	79
Literaturverzeichnis.....	81
Publikationsverzeichnis	98
Ehrenwörtliche Erklärung.....	99
Danksagung	100

Einleitung

Interleukin-1 β

Interleukin-1 β (IL-1 β) gehört gemeinsam mit Interleukin-1 α (IL-1 α) der IL-1-Familie an, die insgesamt aus elf Mitgliedern besteht (Dinarello 2009). IL-1 β entsteht aus einer inaktiven Proform, bekannt als pro-IL-1 β , welches ein Molekulargewicht von 31 kDa aufweist (March et al. 1985; Dinarello 1988b). Das proteolytische Enzym Caspase-1 spaltet von pro-IL-1 β einige Aminosäuren ab (Black et al. 1989; Kostura et al. 1989; Dinarello 2009). Das entstehende aktive IL-1 β besteht aus 153 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 18 kDa auf (March et al. 1985; Kilian et al. 1986).

IL-1 β ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Entzündungsprozessen (Dinarello 1994). Wird IL-1 β freigesetzt, sind zahlreiche Wirkungen zu beobachten. So führt die Freisetzung von IL-1 β zu der Ausschüttung weiterer Zytokine wie IL-6 und IL-2 (Dinarello 1988a). Außerdem erfolgt eine Induktion der Genexpression und Synthese der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der induzierbaren Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase, gefolgt von einer vermehrten Freisetzung von Prostaglandin-E₂ und NO (Busse und Mülsch 1990; Dinarello und Wolff 1993). Prostaglandin-E₂ erhöht den Sollwert der Körperkerntemperatur im Gehirn und bedingt somit eine Fieberreaktion, außerdem wird die Schmerzwahrnehmung gesenkt (Dinarello 2009). Die verstärkte NO-Freisetzung führt zu Vasodilatation und Hypotonus (Busse und Mülsch 1990). Des Weiteren stimuliert IL-1 β das Knochenmark, dies führt zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in das Blut (Dinarello 2009).

IL-1 β spielt bei zahlreichen systemischen Erkrankungen eine Rolle. So ist dieses Zytokin an der Pathogenese rheumatischer Erkrankungen (Dinarello und Wolff 1993), Gicht, (Dinarello et al. 2012), Sepsis (Dinarello und Wolff 1993), *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) (Chaudhry et al. 2013) oder chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt (Dinarello und Wolff 1993; Ozaki et al. 2015). Die Tatsache, dass IL-1 β einerseits einige für den Organismus lebenswichtige Aufgaben im Rahmen der Infektabwehr erfüllt und andererseits zu gravierenden körperlichen Schäden führen kann, lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Freisetzung dieses Zytokins streng reguliert werden muss. Ist die Freisetzung von IL-1 β nicht kontrolliert und lokal begrenzt, können das lebensbedrohliche SIRS oder eine Sepsis auftreten. Der Organismus benötigt folglich Mechanismen, die eine strikte Kontrolle der Freisetzung von IL-1 β ermöglichen. Auf einige dieser Mechanismen wird an anderer Stelle genauer eingegangen (s. S. 7, Kapitel „Cholinerge Kontrollmechanismen der Interleukin-1 β -

Freisetzung“). IL-1 β erreicht die Wirkung über die Bindung an einen IL-1-Rezeptor, den Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 (IL-1R1). Die IL-1-Rezeptorfamilie umfasst zehn Rezeptortypen, wovon allerdings nur IL-1R1 und IL-1R2 IL-1 β direkt binden und der IL-1R2 keine Signaltransduktion auslöst (Boraschi et al. 2018). IL-1R3, auch bekannt als *Interleukin-1 receptor accessory protein* (IL-1RAcP), ist als zusätzlicher Rezeptoranteil notwendig, damit die Signalfunktion des Rezeptors ablaufen kann (Boraschi et al. 2018).

Mit dem humanen monoklonalen IL-1 β -Antikörper Canakinumab ist ein Medikament auf dem Markt, welches durch Bindung an IL-1 β dessen Bindung an den IL-1-Rezeptor verhindert (Rondeau et al. 2015). Ein weiteres Medikament ist Anakinra, welches als IL-1-Rezeptorantagonist den IL-1R1 blockiert (Dinarello 2018). Anakinra insbesondere bei der Behandlung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises oder Gicht eingesetzt (Dinarello 2018).

Hauptproduzenten von IL-1 β sind Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (Dinarello 2009). Daneben gibt es verschiedene weitere Zellen, beispielsweise Mikroglia und Fibroblasten, die IL-1 β produzieren (Dinarello 1988b). Im Folgenden wird auf Monozyten, die einen großen Anteil des IL-1 β freisetzen, näher eingegangen.

Monozyten

Monozyten bilden gemeinsam mit Lymphozyten, Plasmazellen sowie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten die Gruppe der Leukozyten im menschlichen Blut. Leukozyten übernehmen in ihrer Gesamtheit eine Vielzahl von Funktionen, die insbesondere im Rahmen der zellulären Immunabwehr von großer Bedeutung sind (Carrick und Begg 2008). Monozyten entstehen aus Vorläuferzellen, den sogenannten Promonozyten, im Knochenmark (van Furth und Cohn 1968). Physiologischerweise machen Monozyten einen Anteil von unter 10% an der gesamten Leukozytenanzahl aus. Im Rahmen akuter oder chronischer Entzündungen, Stress, Autoimmunerkrankungen oder maligner Knochenmarkserkrankungen kann es zu einer Monozytose kommen, sodass die relative oder absolute Monozytenanzahl steigt (Carrick und Begg 2008). Morphologisch stellen sich Monozyten recht heterogen dar, da der prominente Zellkern vielgestaltig ist (Ziegler-Heitbrock 2000). Mit einer Größe von bis zu 20 μm sind Monozyten die größten Zellen im menschlichen Blut (van Furth und Cohn 1968). Die Verwechslungsgefahr mit anderen Blutzellen ist bei der mikroskopischen Zellzählung aufgrund der Größe insbesondere nach Anfärbung der Monozyten vergleichsweise gering.

Für durchschnittlich etwa 32 Stunden zirkulieren die Zellen im menschlichen Blut, bevor sie in andere Gewebe migrieren (van Furth und Cohn 1968). Monozyten übernehmen

wichtige Funktionen im Rahmen der Immunabwehr, und zwar, entgegen der ehemals gängigen Meinung, auch ohne sich zuvor zu Gewebsmakrophagen zu differenzieren. So ist beschrieben, dass Monozyten proinflammatorische und antigenpräsentierende Eigenschaften aufweisen (Guilliams et al. 2018; Canè et al. 2019). Von besonderer Relevanz ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass aktivierte Monozyten zu der Produktion und Ausschüttung von IL-1 β befähigt sind (Oppenheim et al. 1986; Rubartelli et al. 1990). Zwar wird IL-1 β wie zuvor beschrieben noch von zahlreichen anderen Zelltypen freigesetzt, aber Monozyten sind für den größten Anteil der IL-1 β -Ausschüttung verantwortlich (Dinarello 2009). Es ist somit naheliegend, dass Monozyten im Rahmen einer Sepsis oder eines SIRS - hier erfolgt jeweils eine überschießende Freisetzung proinflammatorischer Zytokine - eine wichtige Rolle spielen (Haveman et al. 1999).

Lange Zeit war eine Einteilung dieser Zellen hinsichtlich der Ausprägung von CD16 und CD14 in „klassische“ (CD14⁺⁺, CD16⁻), „intermediäre“ (CD14⁺⁺, CD16⁺) und „nicht-klassische“ (CD14⁺, CD16⁺⁺) Monozyten anerkannt (Auffray et al. 2009; Ziegler-Heitbrock et al. 2010). In der Literatur gibt es allerdings wachsende Evidenz dafür, dass weniger verschiedene Monozyten-Subtypen existieren, sondern die Ausprägung der CD-Moleküle veränderbar ist und CD14⁺⁺, CD16⁻-Monozyten sich zu CD14⁺, CD16⁺⁺-Monozyten differenzieren können. Dies wird auch als „Monozyten-Kontinuum“ beschrieben (Cignarella et al. 2018; Canè et al. 2019).

Monozyten spielen bei zahlreichen pathologischen Prozessen eine Rolle. So sind diese Zellen in die Entstehung der Atherosklerose involviert, auf die an anderer Stelle genauer eingegangen wird (s. S.17, Kapitel „Atherosklerose“). Daneben gibt es zahlreiche Autoimmunerkrankungen, an deren Pathogenese Monozyten und Makrophagen beteiligt sind. Dazu gehören beispielsweise chronisch entzündliche Darmerkrankungen, systemische Sklerose, Typ-I-Diabetes, rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose (Ma et al. 2019). Im Rahmen der Pathogenese der Multiplen Sklerose sind P2X7-Rezeptoren auf aktivierten Monozyten und Mikroglia überexprimiert und führen vermutlich über eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und einer konsekutiven Aktivierung der COX-2 zu einer vermehrten Neuroinflammation und -degeneration (Yiangou et al. 2006). Da der P2X7-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von IL-1 β spielen kann, wird auf diesen Rezeptor im folgenden Kapitel näher eingegangen.

P2X7-Rezeptor

Der P2X7-Rezeptor ist ein ATP-gesteuerter, trimere Ionenkanal (Costa-Junior et al. 2011; Karasawa et al. 2017), der von fast allen Zellen des menschlichen Organismus

exprimiert wird (Di Virgilio et al. 2017). Immunzellen wie B- oder T-Lymphozyten und Monozyten weisen eine besonders starke Expression dieses Rezeptors auf (Adinolfi et al. 2018). Insgesamt sind zehn verschiedene Spleißvarianten des Rezeptors bekannt (Di Virgilio et al. 2017). Der Rezeptor gehört der P2-Rezeptorfamilie an, welche die P2Y- und P2X-Rezeptoren umfasst (Adinolfi et al. 2018). Im Vergleich zu anderen P2X-Rezeptoren weist der P2X7-Rezeptor eine geringere Affinität zu ATP auf (Adinolfi et al. 2018). Als spezifischer P2X7-Rezeptoragonist kommt bei experimentellen Arbeiten oft das ATP-Derivat 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) zum Einsatz. Zu BzATP weist der P2X7-Rezeptor eine wesentlich höhere Affinität auf (Adinolfi et al. 2018). Die geringe Affinität des Rezeptors zu ATP führt dazu, dass dieser hauptsächlich in stark entzündetem Gewebe aktiviert wird. In diesem Milieu ist ATP extrazellulär in hohen Konzentrationen zu erwarten (Cekic und Linden 2016). Im Gegensatz zu anderen P2X-Rezeptoren wirken nach heutiger Erkenntnis andere Nukleotide am P2X7-Rezeptor nicht als Agonist (Di Virgilio et al. 2017).

Der P2X7-Rezeptor ist insbesondere in der Zellmembran zu finden. Innerhalb der Zellmembran ist der P2X7-Rezeptor auch in cholesterolreichen Membranabschnitten, sogenannten *lipid rafts*, lokalisiert (Robinson et al. 2014). Die Rolle des Rezeptors innerhalb der *lipid rafts* ist unklar, allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivierung des Rezeptors in *lipid rafts* Lipidsignalwege anspricht und beispielsweise die Phospholipase-A2 (PLA2) aktiviert (Garcia-Marcos et al. 2006). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass der P2X7-Rezeptor durch Cholesterol reguliert werden kann. Dies gilt insbesondere für Rezeptoren, die in *lipid rafts* lokalisiert sind (Sluyter 2017). Dabei scheint das Cholesterol als negativer Regulator für die vom P2X7-Rezeptor induzierte Porenbildung zu agieren (Robinson et al. 2014).

Alle bekannten Vertreter der P2X-Rezeptorfamilie verfügen über zwei Transmembrandomänen, eine extrazelluläre Schleife und intrazellulär einen N- sowie C-Terminus. Der P2X7-Rezeptor unterscheidet sich im Aufbau von anderen P2X-Rezeptoren. Der C-Terminus ist bei diesem Rezeptor 200 Aminosäuren länger als bei anderen P2X-Rezeptoren (Costa-Junior et al. 2011).

Die Aktivierung des Rezeptors durch Bindung von ATP führt zu einem Einstrom von Na⁺- und Ca²⁺-Ionen sowie einem Ausstrom von K⁺-Ionen (Cekic und Linden 2016). Hohe Konzentrationen von ATP führen zur Bildung von Poren, die den Durchtritt hydrophiler Substanzen bis 900 Da ermöglichen (Adinolfi et al. 2018), beispielsweise Cholin (Sluyter 2017) und ATP (Cekic und Linden 2016).

Es gibt zahlreiche Pathomechanismen, bei denen der P2X7-Rezeptor eine wichtige Rolle spielt. So scheint, wie bereits zuvor beschrieben, die Aktivität des Rezeptors in Mikrogliazellen bei der Pathogenese von Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Amyotrophe Lateralsklerose und Morbus Alzheimer beteiligt zu sein (Adinolfi et al. 2018). Auch im Rahmen der Erkrankungen Leberfibrose, Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis und bei zahlreichen weiteren chronisch entzündlichen Erkrankungen wird die Beteiligung des Rezeptors diskutiert (Adinolfi et al. 2018).

Der P2X7-Rezeptor gilt als stärkster Aktivator des *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*-Inflammasoms (NLRP3-Inflammasom) (Di Virgilio et al. 2017). Das NLRP3-Inflammasom gehört zu einer Gruppe von Inflammasomen, die als zytosolische Multiproteinkomplexe eine wichtige Rolle in der Immunabwehr einnehmen. Durch die Rekrutierung von Procaspase-1 und ihrer Aktivierung zur Caspase-1 wird pro-IL-1 β zu IL-1 β gespalten und freigesetzt (Adinolfi et al. 2018). Neben der Freisetzung von IL-1 β wird auch die Ausschüttung weiterer Interleukine wie IL-6, IL-10, IL-18 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) induziert (Di Virgilio et al. 2017). Darüber hinaus werden weitere proinflammatorische Mechanismen angeregt, beispielsweise die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), der T-Zellproliferation und der COX-2 (Adinolfi et al. 2018). Dies unterstreicht die Bedeutung des Rezeptors für den Prozess der Inflammation. Da die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms für die Produktion und Freisetzung von IL-1 β von herausragender Bedeutung ist, soll diese im Folgenden weiter thematisiert werden.

NLRP3-Inflammasom

Das NLRP3-Inflammasom ist ein zytoplasmatischer Multiproteinkomplex, welcher im Rahmen der IL-1 β -Produktion eine wichtige Rolle spielt (Yang et al. 2019). Dieses Inflammasom besteht aus mindestens drei verschiedenen Proteinspezies (Martinon et al. 2002). Das namensgebende NLRP3 weist drei Domänen auf, wobei insbesondere die Pyrin-Domäne für die Assemblierung des Inflammasoms wichtig ist (Vajjhala et al. 2012). Das *apoptosis-associated speck like protein* (ASC) funktioniert als Ankermolekül und dient der Rekrutierung der Procaspase-1, dem Vorläufermolekül der Cysteinprotease Caspase-1 (Srinivasula et al. 2002).

Die inaktive Procaspase-1 wird durch das NLRP3-Inflammasom in die aktive Form gespalten (Mariathasan et al. 2006; Lamkanfi und Dixit 2014). Caspase-1 spaltet pro-IL-1 β und pro-IL-18 in die jeweils aktive Form. Des Weiteren aktiviert Caspase-1 Gasdermin-D, dies ist im Rahmen der Induktion der Pyroptose, einer inflammatorischen Form des programmierten Zelltods, bedeutsam (Shi et al. 2015). Das N-terminale

Fragment von Gasdermin-D bewirkt die Bildung großer Poren in der Zellmembran im Rahmen der Pyroptose (Sborgi et al. 2016). Neben dem NLRP3 gibt es mit NLRP1b, NLRP6, NLRP12, *NLR family CARD domain-containing protein 4* (NLRC4), *absent in melanoma 2* Protein (AIM2) und Pyrin noch weitere Proteine, die sich gemeinsam mit ASC und Procaspase-1 als Inflammasom organisieren (Vanaja et al. 2015).

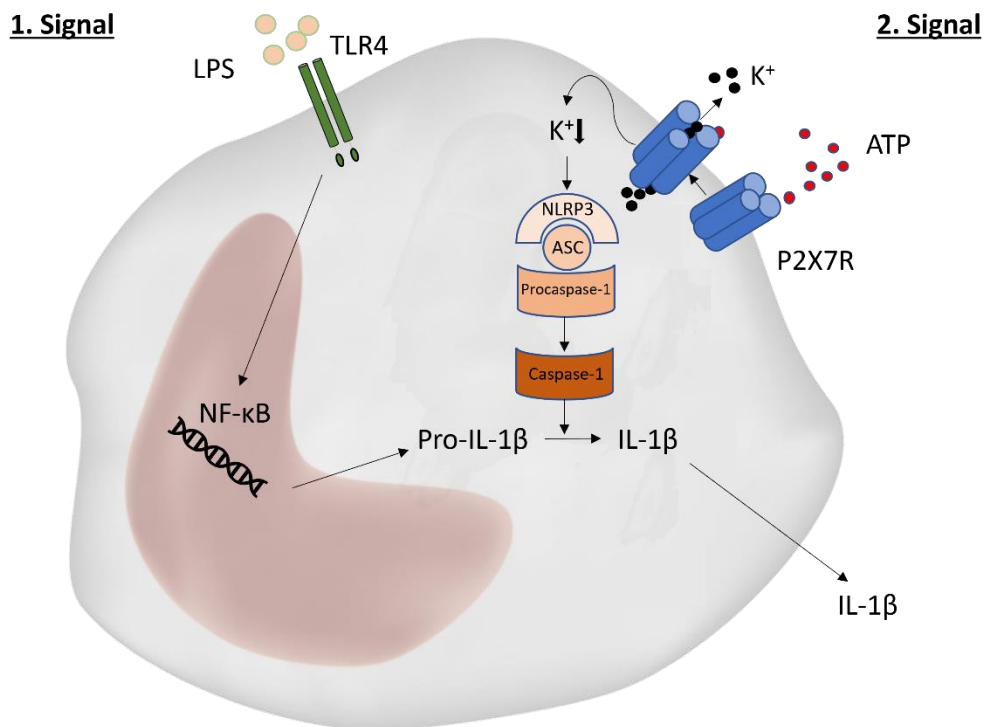


Abbildung 1. Mechanismus der Adenosintriphosphat (ATP)-vermittelten Interleukin-1β (IL-1β)-Ausschüttung.

Die Aktivierung des *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3* (NLRP3)-Inflammasoms benötigt zwei Signale. Zunächst erkennt der *toll-like-receptor 4* (TLR4) *pathogen-associated molecular patterns* wie Lipopolysaccharid (LPS). Dieses Signal führt zum sogenannten *priming*. Dabei wird über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) die Expression der Untereinheiten des NLRP3-Inflammasoms sowie des inaktiven Pro-IL-1β gesteigert. Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors (P2X7-R) durch das *damage-associated molecular pattern* ATP führt über einen Einstrom von Na⁺- und Ca²⁺-Ionen (nicht dargestellt) sowie einem Ausstrom von K⁺-Ionen mit konsekutivem Abfall der intrazellulären K⁺-Konzentration zur Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms und einer Aktivierung der Caspase-1, welche Pro-IL-1β in die aktive Form IL-1β spaltet. Es folgt die Freisetzung von IL-1β.

ASC, *apoptosis-associated speck like protein*.

Von all diesen Inflammasomen ist das NLRP3- Inflammasom am besten untersucht und spielt insbesondere in der Pathogen- und Trauma-assoziierten IL-1 β -Freisetzung eine zentrale Rolle (Vanaja et al. 2015).

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms benötigt in der Regel zwei Signale. Zunächst findet das sogenannte *priming* statt. Über den *Toll-like-receptor 4* (TLR4) wird ein inflammatorischer Stimulus wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) registriert und führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Auf diesem Wege wird die Expression von NLRP3 sowie pro-IL-1 β und pro-IL18 gesteigert. Für das zweite Signal werden *weitere damage-associated molecular patterns* (DAMPs) oder *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) über entsprechende Rezeptoren wie den P2X7-Rezeptor erkannt. Es kommt konsekutiv zu einem K⁺-Ausstrom. Der Abfall der intrazellulären K⁺-Konzentration führt zur Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms, zur Aktivierung der Caspase-1 und im Anschluss zur Aktivierung von IL-1 β und IL-18 aus pro-IL-1 β und pro-IL-18. Anschließend werden IL-1 β und IL-18 freigesetzt (s. Abbildung 1)(Dinarello 2009). Zu diesen PAMPs und DAMPs zählen beispielsweise Cathepsin-B (Hornung et al. 2008), mitochondriale DNA (Shimada et al. 2012), bakterielle RNA (Kanneganti et al. 2006), reaktive Sauerstoffspezies (Pétrilli et al. 2007) oder ATP.

Dysfunktionen des NLRP3-Inflammasoms spielen bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle. So ist die Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms in der Pathophysiologie von Erkrankungen wie Atherosklerose (Düwell et al. 2010), abdominalen Aortenaneurysmata (Usui et al. 2015), akutes Nierenversagen (Komada et al. 2015) und metabolisches Syndroms beschrieben (Karasawa und Takahashi 2017). Im Rahmen der Atherosklerose lagern sich Cholesterolkristalle in den Gefäßwänden ab (Düwell et al. 2010). Makrophagen können diese Kristalle durch Phagozytose aufnehmen, eine weitere Verdauung ist allerdings nicht möglich. Durch die folgende lysosomale Destabilisation durch die Cholesterolkristalle gelangt Cathepsin-B in das Zytoplasma (Rajamäki et al. 2010). Cathepsin-B wirkt als Aktivator für das NLRP3-Inflammasom, was in der Folge zu einer vermehrten und dauerhaften IL-1 β -Ausschüttung führt (Düwell et al. 2010). Um die dauerhafte Ausschüttung von IL-1 β und die damit verbundene unkontrollierte Entzündungsreaktion bestmöglich zu verhindern, gibt es Kontrollmechanismen der IL-1 β -Freisetzung. Im nächsten Kapitel wird ein Mechanismus beschrieben, der die ATP-induzierte IL-1 β -Ausschüttung kontrolliert.

Cholinerge Kontrollmechanismen der Interleukin-1 β -Freisetzung

Wie zuvor beschrieben ist die strikte Kontrolle der Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β außerordentlich wichtig, um systemische Entzündungen und andere

schwerwiegende Erkrankungen möglichst zu vermeiden. In der Literatur sind verschiedene Mechanismen beschrieben, welche im Sinne einer Feedback-Hemmung die Freisetzung von IL-1 β inhibieren und somit zur kontrollierten Freisetzung des Zytokins beitragen (Cassatella et al. 1993; Weber et al. 2010; Gross et al. 2011; Ipseiz et al. 2020). So scheinen murine peritoneale Makrophagen auf einen Stimulus mit LPS, solange kein zweites Signal wie beispielsweise ATP zugegen ist, Prostaglandin-I₂ zu produzieren und freizusetzen. Die Bindung von Prostaglandin-I₂ an einen entsprechenden Rezeptor der Zellmembran des Makrophagen führt zu einer Freisetzung von IL-10. IL-10 inhibiert nach Bindung an einen IL-10-Rezeptor die Prozessierung von IL-1 β , sodass trotz Stimulus durch LPS in Abwesenheit eines zweiten Stimulus zwar eine verstärkte Produktion von Pro-IL-1 β , jedoch keine verstärkte Freisetzung von IL-1 β erfolgt (Ipseiz et al. 2020). Die Tatsache, dass zwei Stimuli für die Freisetzung von IL- β notwendig sind, zeigt die außerordentliche Bedeutung dieser strikten Kontrolle für den Organismus.

In diesem Zusammenhang spielen zudem cholinerge Agonisten eine wichtige Rolle. In den letzten Jahren wurde beobachtet, dass die cholinergen Agonisten Acetylcholin (ACh), Phosphocholin (PC), C-reaktives Protein (CRP), Nikotin, Glycerophosphocholin (GPC) oder Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) über die Bindung an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR) eine Hemmung der ATP-vermittelten Freisetzung von IL-1 β erwirken (Hecker et al. 2015; Richter et al. 2016; Backhaus et al. 2017) (s. Abbildung 2). Dieser nAChR ist ein Pentamer, bestehend aus den Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 9$ sowie $\alpha 10$ und unterscheidet sich von klassischen nAChR, beispielsweise im zentralen Nervensystem vorkommend, bei denen zusätzlich weitere Untereinheiten wie $\alpha 1-6$, $\alpha 8$ und $\beta 2-4$ in unterschiedlichen Anordnungen zu finden sind (Hecker et al. 2015; Zoli et al. 2018). Im Gegensatz zu den neuronalen nAChR, bei denen die Bindung von ACh einen Ionenstrom und somit eine Depolarisation der Zellmembran auslöst, wird eine ionotrope Funktion bei den zuvor beschriebenen nicht-neuronalen nAChR nicht beobachtet (Hecker et al. 2015; Zakrzewicz et al. 2017; Richter et al. 2018). Zudem lösen nikotinerge Agonisten wie PC bei klassischen nAChR im Gegensatz zu ACh keine ionotrope Funktion aus, sodass an dieser Stelle eine selektive Wirkung auf die nAChR zu bestehen scheint, die in die Inhibition der ATP-abhängigen Freisetzung von IL-1 β involviert sind (Richter et al. 2016).

Über einen bisher nicht endgültig geklärten Mechanismus führt die Bindung einer der zuvor genannten nikotinergen Agonisten an den nAChR zu einer Inhibition des P2X7-Rezeptors, der normalerweise über einen nichtselektiven Kationeneinstrom und eine nachgeschaltete Signalkaskade das NLRP3-Inflammasom aktiviert und somit die

Ausschüttung von IL-1 β erwirkt (Hecker et al. 2015; Richter et al. 2016; Di et al. 2018) (s. Abbildung 2).

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass CRP als nikotinerger Agonist die Freisetzung von IL-1 β inhibieren kann (Richter et al. 2018). CRP ist ein laborchemisch wichtiger Entzündungsparameter, der vornehmlich in Hepatozyten produziert wird. Als Akute-Phase-Protein wird CRP in Entzündungssituationen vermehrt ausgeschüttet, sodass die Konzentration des Proteins bis auf das Tausendfache gesteigert werden kann (Sproston und Ashworth 2018). Seine Ausschüttung wird durch IL-1 β und IL-6 initiiert, wobei die IL-6-Freisetzung ihrerseits maßgeblich IL-1 β -abhängig erfolgt (Moshage et al. 1988; Pepys und Hirschfield 2003).

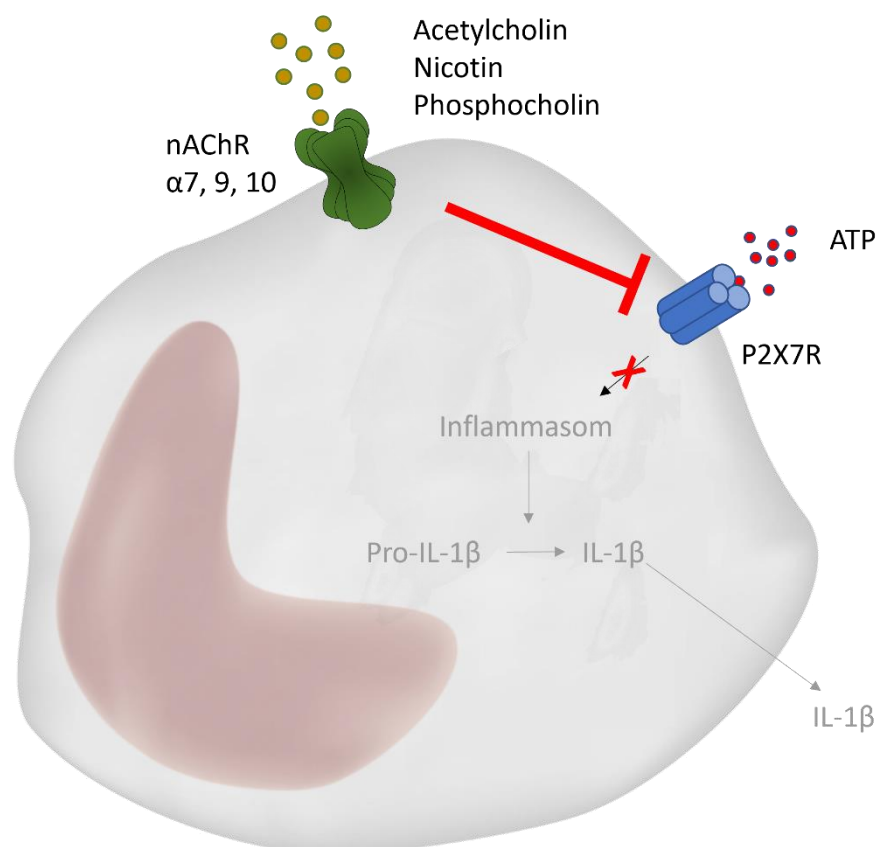


Abbildung 2. Cholinerge Inhibition der Adenosintriphosphat (ATP)-vermittelten Interleukin-1 β (IL-1 β)-Ausschüttung.

Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP führt nach vorherigem *priming* (nicht dargestellt, s. Abbildung 1) über eine Aktivierung des *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3* (NLRP3)-Inflammasoms zu einer Ausschüttung von IL-1 β . Die Aktivierung eines nikotinergeren Acetylcholinrezeptors durch nikotinerge Agonisten wie Acetylcholin, Nikotin oder Phosphocholin führt zu einer Inhibition des P2X7-Rezeptors und folglich einer verringerten Ausschüttung von IL-1 β . Der exakte Mechanismus dieser Inhibition ist bisher nicht bekannt.

An dieser Stelle greift somit ein negativer Feedback-Mechanismus, der eine überschießende Ausschüttung von IL-1 β verhindern soll. Entgegen früheren Ansichten geht die Funktion von CRP über die eines Biomarkers für Entzündungsreaktionen hinaus. So beeinflussen verschiedene aktivierte Formen von CRP beispielsweise die Vorgänge der Phagozytose und Apoptose, die NO-Produktion, die Aktivierung des Komplementsystems und die Ausschüttung verschiedener Zytokine (Sproston und Ashworth 2018).

Makrophagen und die Monozyten-getriggerte IL-1 β -Ausschüttung spielen bei der Entstehung von Atherosklerose eine wichtige Rolle. In Kombination mit erhöhten Cholesterolspiegeln kommt es zu Plaquebildung in arteriellen Gefäßwänden, weshalb die Gesamtcholesterolkonzentration ein relevanter therapeutischer Angriffspunkt zur Prophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse ist. Die bekanntesten Medikamente sind diesbezüglich Statine, die in den Cholesterolfstoffwechsel eingreifen und auch im Studienprotokoll dieser Arbeit verwendet wurden. Daher wird der Cholesterolfstoffwechsel im Folgenden näher erläutert.

Cholesterolf

Cholesterolf ist ein polyzyklischer Alkohol, der zur Gruppe der Lipide gezählt wird (s. Abbildung 3b). Im menschlichen Organismus erfüllt Cholesterolf zahlreiche Aufgaben. So ist Cholesterolf essentieller Bestandteil der Zellmembranen (Perego et al. 2019). Des Weiteren dient Cholesterolf als Ausgangssubstanz für die Synthese zahlreicher biochemischer Verbindungen. Cholesterolf ist an der Bildung von Gallensäuren, Vitamin-D und verschiedenen Steroidhormonen wie Cortison, Aldosteron, Testosteron oder Progesteron beteiligt (Schade et al. 2020). Die Synthese von Cholesterolf findet in jeder kernhaltigen Körperzelle statt. Der Hauptproduktionsort für Cholesterolf ist die Leber. Ein großer Teil des benötigten Cholesterols wird im Organismus synthetisiert, der über den Gastrointestinaltrakt absorbierte Anteil unterscheidet sich individuell und scheint stark von genetischen Faktoren abhängig zu sein (Dawson und Rudel 1999; Wang 2007).

Substrat der Biosynthese des Cholesterols ist Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA). Über zahlreiche Schritte entsteht unter anderem über 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA), Mevalonsäure, Farnesylphosphat, Geranylphosphat, Squalen und Lanosterol schließlich Cholesterolf (s. Abbildung 3a) (Bloch 1965). Das Schlüsselenzym der Cholesterolfbiosynthese ist die HMG-CoA-Reduktase, welches die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat katalysiert. Dieses Enzym kann durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren wie Statine kompetitiv gehemmt werden (Istvan und Deisenhofer 2001).

Aufgrund seiner hohen Lipophilie muss Cholesterol an wasserlösliche Lipoproteine gebunden transportiert werden. Diese Lipoproteine werden anhand ihrer Dichte in *Chylomikronen*, *very low density lipoprotein* (VLDL), *intermediate density lipoprotein* (IDL), Lipoprotein (a) (LP(a)), *low density lipoprotein* (LDL) und *high density lipoprotein* (HDL) unterschieden (Mahley et al. 1984). Insbesondere die Konzentration des LDL-assoziierten Cholesterols (LDL-C) im Blut hat diagnostische und prognostische Bedeutung. So wird eine erhöhte Konzentration von LDL-C als Risikofaktor für die Entwicklung oder das Fortschreiten einer Atherosklerose angesehen (FERENCE et al. 2017). Laut aktuellen Leitlinien der *European Society of Cardiology* (ESC) ist daher bei manifester Atherosklerose ein LDL-C-Zielwert von 70 mg/dL anzustreben (Mach et al. 2019). Die Erniedrigung der LDL-C-Konzentration senkt das Risiko des Auftretens eines kardiovaskulären Ereignisses proportional zur Reduktion der LDL-C-Konzentration (Mach et al. 2019).

Der oft beschriebene protektive Effekt von *high density lipoprotein-associated cholesterol* (HDL-C) hinsichtlich der Entstehung von Atherosklerose rückt den aktuellen

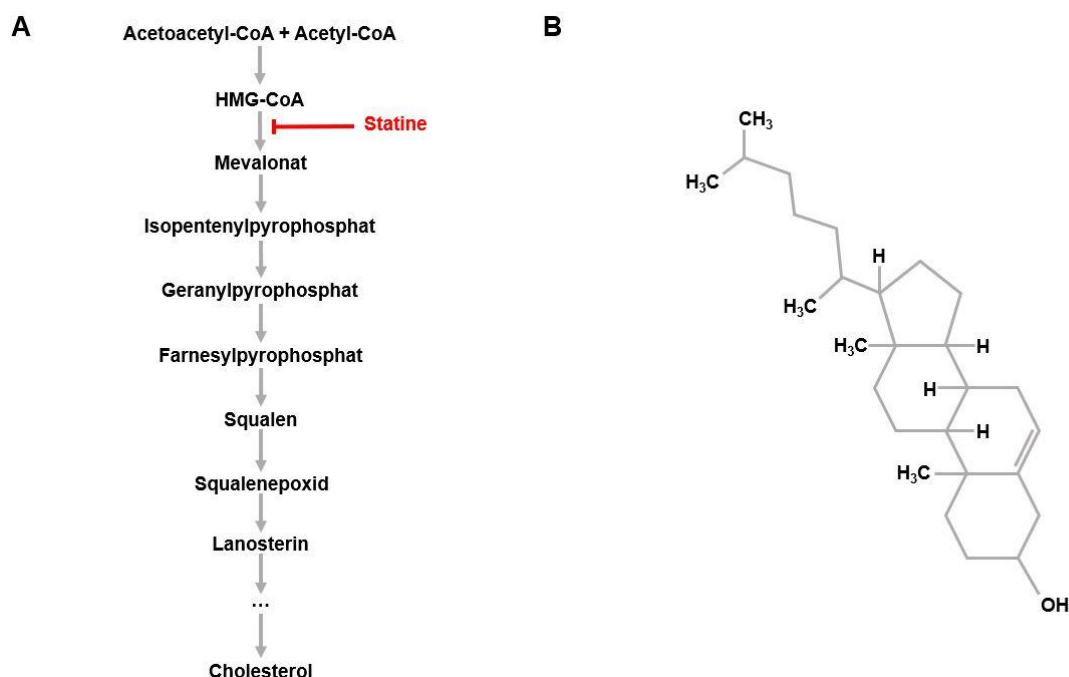


Abbildung 3. Cholesterolbiosynthese und Strukturformel von Cholesterol.

a. Dargestellt ist ein Schema der Cholesterolbiosynthese. Die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA)-Reduktase katalysiert die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat. Dieses Enzym wird durch Statine wie Atorvastatin gehemmt. b. zeigt die Strukturformel von Cholesterol (vereinfacht).

Acetyl-CoA, Acetyl-Coenzym-A.

ESC-Leitlinien zufolge in den Hintergrund. Eine vermindertes Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen wie Schlaganfall oder Myokardinfarkt durch eine Erhöhung der HDL-C-Konzentration konnte nicht nachgewiesen werden (Mach et al. 2019).

Die Senkung der Cholesterolkonzentration sollte laut Leitlinien der ESC in erster Linie über *lifestyle*-Änderungen wie Ernährungsumstellung, Gewichtsverlust, Nikotinverzicht, intensiviertere körperliche Aktivität und Verminderung der Alkoholaufnahme erfolgen (Mach et al. 2019). Sollten diese Änderungen keine ausreichende Senkung der Cholesterolkonzentration erwirken, kann zusätzlich eine medikamentöse Therapie, vorzugsweise mit Statinen (s. S. 13, Kapitel „Statine“), begonnen werden. Bei Patienten¹ mit einem hohen kardiovaskulärem Risiko ist hingegen die sofortige medikamentöse Statintherapie in Kombination mit *lifestyle*-Änderungen indiziert (Mach et al. 2019).

Bei Unverträglichkeit oder nicht ausreichender Wirkung der Statine stehen alternative Medikamente wie Proproteinkonvertase Subtilisin Kexin Typ 9 (PCSK9)-Inhibitoren zur Verfügung (Stroes et al. 2014; Mach et al. 2019). PCSK9-Inhibitoren inhibieren die Serinprotease PCSK9, die LDL-Rezeptoren auf Hepatozyten bindet und deren Abbau in Lysosomen bewirkt. Wird dieses Enzym durch die monoklonalen Antikörper inhibiert, kommt es zu einem Recycling der LDL-Rezeptoren, sodass mehr LDL aus dem Blut in die Hepatozyten aufgenommen wird und die Konzentration des LDL-C im Serum sinkt (Artenstein und Opal 2011; Giugliano und Sabatine 2015). Die Therapie mit PCSK9-Inhibitoren ist äußerst effektiv, sodass in Kombination mit einem Statin eine Senkung der LDL-C-Konzentration von bis zu 60% erreicht werden kann (Pasta et al. 2020).

Die Menge von Cholesterol in der Membran beeinflusst deren physikalische Eigenschaften, beispielsweise die Fluidität. Durch diese Eigenschaften wird auch die Funktion einiger Membranproteine wie Ionenkanäle, Transporter oder Rezeptoren beeinflusst, so auch insbesondere der P2X7-Rezeptor sowie nAChR (Perego et al. 2019). Es gibt, wie bereits zuvor erwähnt, cholesterolreiche Membranbestandteile, die als *lipid rafts* bezeichnet werden. Diese spielen insbesondere im Rahmen von Signaltransduktionswegen eine wichtige Rolle und werden im nächsten Abschnitt charakterisiert.

Lipid rafts

Lipid rafts sind Bestandteile von Zellmembranen, die durch einen hohen Gehalt von Cholesterol und Sphingolipiden sowie einen hohen Grad der Organisation

¹ Aufgrund der besseren Lesbarkeit wird im Text das generische Maskulinum verwendet. Gemeint sind jedoch immer alle Geschlechter.

gekennzeichnet sind (Sezgin et al. 2017). *Lipid rafts* bilden entweder Caveolae oder liegen planar vor (Head et al. 2014). Caveolae-bildende *lipid rafts* enthalten das cholesterolbindende Protein Caveolin, welches als integrales Membranprotein für die Bildung der Caveolae maßgeblich ist und deren Grundgerüst bildet (Rothberg et al. 1992; Head et al. 2014). Bisher sind drei Isoformen des Caveolins bekannt (Scherer et al. 1996; Tang et al. 1996). Des Weiteren ist das periphere Membranprotein Cavin an der Organisation der Caveolae beteiligt (Liu und Pilch 2008). Die planare Form der *lipid rafts* zeichnet sich durch einen hohen Anteil von Glycosylphosphatidylinositol-Ankerproteinen und Flotillin aus (Head et al. 2014).

Flotilline sind integrale Membranproteine, welche in *lipid rafts* zu finden sind. Es sind zwei verschiedene Flotillinproteine bekannt (Bickel et al. 1997). Die Funktion der Flotillinproteine ist aktuell nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Proteine in die Organisation des Zytoskeletts und die Signaltransduktion involviert sind (Langhorst et al. 2005). Außerdem sind Flotilline, wie auch Caveoline, bei der Rekrutierung von Proteinen in *lipid rafts* beteiligt (Allen et al. 2007).

Zahlreiche Rezeptoren sind in *lipid rafts* lokalisiert. So werden beispielsweise auch P2X7-Rezeptoren in *lipid rafts* beschrieben (Allen et al. 2007). *Lipid rafts* spielen eine wichtige Rolle bei verschiedensten zellulären Signaltransduktionswegen, Apoptose, Zellmigration, Zelladhäsion, Organisation des Zytoskeletts und der Sortierung von Proteinen für die Zellmembran (Munro 2003). *Lipid rafts* dienen zudem unterschiedlichen Pathogenen wie *Candida albicans* als Eintrittspforte in Monozyten.

Die Zusammensetzung der *lipid rafts* kann durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren verändert werden. Diese Medikamentengruppe greift in den Cholesterolfstoffwechsel ein und vermindert die Konzentration von Cholesterolf im Serum der Patienten. Da Cholesterolf ein wesentlicher Bestandteil der *lipid rafts* ist, kann eine Verringerung des Cholesterolfspiegels möglicherweise auch zu einer Beeinflussung der verschiedenen zellulären Signalwege führen, die in Verbindung mit *lipid rafts* stehen (van der Most et al. 2009). Die in diesem Zusammenhang bedeutende Medikamentengruppe wird im folgenden Kapitel näher betrachtet.

Statine

Statine werden, wie bereits beschrieben, zur Behandlung der Hypercholesterolfämie eingesetzt, sobald *lifestyle*-Änderungen keine ausreichende Wirkung zeigen. Diese Medikamente hemmen kompetitiv das Schlüsselenzym der Cholesterolfbiosynthese, die HMG-CoA-Reduktase (s. Abbildung 3a) (Greenwood et al. 2006). Diese Wirkung erklärt den Abfall des LDL-C und somit die kardioprotektiven Effekte der Statine (Greenwood et

al. 2006). Adhyaru und Jacobson beschreiben, dass die Reduktion des LDL-C um 39 mg/dL kardiovaskuläre Ereignisse um 22% in fünf Jahren reduziert (Adhyaru und Jacobson 2018). Meta-Analysen haben ergeben, dass etwa 170 Patienten mit Statinen behandelt werden müssen, um ein kardiovaskuläres Ereignis pro Jahr zu verhindern (Preiss et al. 2011; Goldfine 2012).

Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind, unter anderem, ein leicht erhöhtes Risiko an Diabetes mellitus Typ II zu erkranken (Goldfine 2012), Statin-induzierte Muskelprobleme oder eine Erhöhung der Leberenzyme im Blut beschrieben (Adhyaru und Jacobson 2018). Statin-induzierte Muskelprobleme sind die häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen und umfassen Muskelschwäche, Myalgien, und Krämpfe bis hin zur Rhabdomyolyse (1:10.000). In vielen Fällen sistieren diese Beschwerden innerhalb von 2 Monaten (Adhyaru und Jacobson 2018).

Das erhöhte Risiko an Diabetes mellitus Typ II zu erkranken lässt sich darauf zurückführen, dass es bei Statingabe zu einer Akkumulation von Cholesterin in pankreatischen β -Zellen kommt. Als Folge der verminderten Cholesterinproduktion in der Zelle wird der LDL-Rezeptor auf der Zelloberfläche vermehrt exprimiert. Die daraus resultierende intrazelluläre Akkumulation von Cholesterin führt über eine geänderte Zusammensetzung der *lipid rafts* und die veränderte Fluidität der Membran zu einer geringeren Anzahl von Glucose-Rezeptoren in der Zellmembran (Perego et al. 2019). Außerdem wird die räumliche Struktur der Ca^{2+} -Kanäle und ATP-sensitiven K^{+} -Kanäle in der Zellmembran der pankreatischen β -Zelle verändert. Diese Faktoren führen zu einer verminderten Freisetzung von Insulin, was im Kombination mit vorhandenen Risikofaktoren die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ II begünstigen kann (Perego et al. 2019). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass der Einsatz von Statinen eine erhöhte Aktivität des NLRP3-Inflammasoms zur Folge hat. Dies wird ebenfalls mit der Entstehung einer Insulinresistenz in Verbindung gebracht (Henriksbo et al. 2014).

Neben der verringerten Produktion von Cholesterin hat die Gabe von Statinen noch weitere Auswirkungen auf den Organismus. Im Rahmen der Cholesterinbiosynthese entstehen als Nebenprodukte nicht-sterol Isoprenoide, welche unter anderem für verschiedene Signalfunktionen der Zellen benötigt werden (van der Most et al. 2009). So wird als Zwischenprodukt Farnesylpyrophosphat (FPP) gebildet, welches entweder über die Bildung von Squalen zu Cholesterin umgewandelt wird oder als Substrat für die Bildung von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) dient (s. Abbildung 3a). FPP und GGPP sind in die Modifikation verschiedener Proteine involviert. So wirken Statine über die Prenylierung zahlreicher Proteine wie etwa der GTPasen Rho und Ras auf vielfältige

Weise antiinflammatorisch (Goldstein und Brown 1990; Ortego et al. 1999; Liberale et al. 2019).

In atherosklerotischen Plaques sollen Statine eine antientzündliche und plaquestabilisierende Wirkung aufweisen (Tawakol et al. 2013), dies begründet den häufigen Einsatz dieser Medikamente in der Primär- und Sekundärprophylaxe bei chronischem Koronarsyndrom (CCS; ersetzt seit 2019 den Begriff „koronare Herzkrankheit [KHK]“), Myokardinfarkt, peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) oder Schlaganfall (Adhyaru und Jacobson 2018). Dabei werden HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle mit niedrigdosierter Acetylsalicylsäure (ASS) kombiniert, da die Kombination dieser beiden Wirkstoffe die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen vermutlich verhindert (Chapman 2007; Murphy et al. 2021).

Acetylsalicylsäure

ASS ist der Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) zugehörig. Den Vertretern dieser Gruppe, zu denen neben ASS Ibuprofen, Diclofenac, Indometacin und Naproxen zählen, ist eine unselektive Hemmung der COX gemein (s. Abbildung 4). Eine Untergruppe der NSAR bilden die selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib, Etoricoxib und Parecoxib.

Seit ASS im Jahre 1897 als erste dieser Substanzen synthetisiert worden ist, zählt das Pharmakon zu den am meisten verordneten Medikamenten (Vane und Botting 2003). Im Arzneimittelreport der Barmer GEK aus dem Jahre 2021 ist ASS auf Platz 18 der am häufigsten eingesetzten Arzneimittelwirkstoffe in Deutschland gelistet (Grandt et al. 2021). Dabei sind laut Arzneiverordnungsreport 2021 vermutlich die tatsächlich eingenommenen Mengen des Medikaments deutlich höher, da viele Patienten ASS rezeptfrei beziehen und selbst bezahlen (Ludwig et al. 2021).

ASS wirkt über die unselektive Hemmung der COX analgetisch, antipyretisch, antiphlogistisch und hat eine hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation (Smith und Willis 1971; Vane 1971; Roth und Majerus 1975; Crofford 2001; Vane und Botting 2003). Im Gegensatz zu anderen Vertretern der NSAR ist die Hemmung der COX durch ASS irreversibel und wird durch die Acetylierung eines Serinrests im katalytischen Zentrum des Enzyms erreicht (Roth und Majerus 1975; Vane und Botting 2003).

In geringen Dosierungen (z.B. 100 mg/Tag) wirkt ASS selektiv auf die COX-1 (Patrignani und Patrono 2015). In dieser Dosierung steht die Inhibition der Thrombozytenaggregation durch ASS im Vordergrund, da Thrombozyten als Zellfragmente ohne die notwendigen Zellorganellen die COX-1 nicht nachproduzieren

können (Catella-Lawson und Crofford 2001; Vane und Botting 2003; Perneby et al. 2006). Dies führt zu einer verminderten Produktion von Thromboxan-A₂, welches für die Thrombozytenaggregation von großer Bedeutung ist (Hamberg et al. 1975; Vane und Botting 2003). Der Effekt bleibt für die Lebensdauer der Thrombozyten erhalten. Insbesondere die COX-2 produziert in Endothelzellen Zwischenprodukte für die Synthese von Prostaglandin-I₂, welches vasodilatierende und aggregationshemmende Effekte aufweist (Roth und Majerus 1975; Weksler et al. 1977; Catella-Lawson und Crofford 2001; Crofford 2001). Der COX-2-hemmende Effekt von ASS kommt an dieser Stelle bei der niedrigen Dosierung nicht zum Tragen, da kernhaltige Endothelzellen das Enzym rasch nachproduzieren können und zudem die COX-2 wohl erst von höheren Dosen ASS inhibiert wird. Somit überwiegen die aggregationshemmenden die -fördernden Effekte in diesem unter physiologischen Bedingungen ausgeglichenen System (Catella-Lawson und Crofford 2001; Perneby et al. 2006).

Die analgetische, antiphlogistische und antipyretische Komponente von ASS kommt ab Dosierungen von ca. 300 mg/Tag zum Tragen. Zu erklären ist dies durch die verminderte Synthese von Prostaglandin-G₂ als Ausgangsprodukt für alle anderen Prostaglandine durch die Inhibierung der COX-1 und -2 (s. Abbildung 4) (Vane 1971). Prostaglandine sind in verschiedene physiologische Vorgänge involviert, darunter die Regulation der Körpertemperatur und die Erhöhung der Schmerzempfindlichkeit (Feldberg und Saxena 1971; Vane 1971; Bernheim et al. 1979; Crofford 2001; Kawabata 2011). Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von ASS betreffen insbesondere den oberen Gastrointestinaltrakt. So beklagen Patienten bei täglicher Einnahme von 100 mg ASS häufig gastroösophagealen Reflux, Magenschmerzen und Magen- oder Duodenalulcera (Li et al. 2020). Zudem ist eine erhöhte gastrointestinale Blutungs- und Perforationsgefahr zu nennen, die Prostaglandin-vermittelt auftritt (Thorat und Cuzick

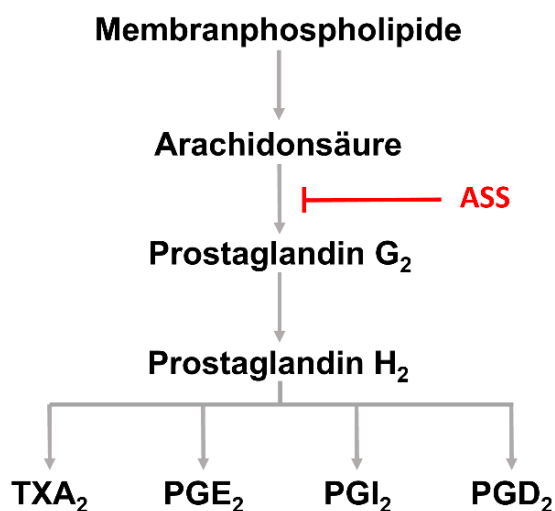


Abbildung 4. Prostaglandinsynthese.

Die verschiedenen Prostaglandine werden aus den Vorstufen Prostaglandin-H₂ und -G₂ produziert. Prostaglandin-G₂ wird durch die Cyclooxygenasen-1 und -2 (COX) aus der Arachidonsäure synthetisiert. Die Arachidonsäure entsteht zuvor aus Membranphospholipiden, die aus Zellmembranen gelöst werden. Acetylsalicylsäure (ASS) inhibiert die COX-1 und -2 und verhindert somit die Synthese von Prostaglandin-G₂ aus der Arachidonsäure.

PGD₂, Prostaglandin D₂; PGE₂, Prostaglandin-E₂; PGI₂, Prostaglandin-I₂; TXA₂, Thromboxan-A₂

2015; Li et al. 2020; Murphy et al. 2021). Durch die Hemmung der COX-1 wird weniger Prostaglandin-E₂ produziert, das einen protektiven Effekt auf die Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes hat (Takeuchi 2014; Patrignani und Patrono 2015). Zudem erhöht die Einnahme von ASS auch das Risiko für intrakranielle Blutungen (Thorat und Cuzick 2015) .

ASS kann bei leichten bis mittelschweren Schmerzen zur Analgesie eingesetzt werden (> 300 mg/Tag), wobei mittlerweile zahlreiche Alternativen mit einem günstigeren Wirk- und Nebenwirkungsprofil zur Verfügung stehen (Seifert 2021). Insbesondere bei akuten Migräneattacken wird es allerdings aufgrund der ausgeprägten und gut untersuchten schmerzreduzierenden Wirkung in den entsprechenden Leitlinien ausdrücklich empfohlen (1000 - 3000 mg/Tag) (Diener et al. 2018).

Hauptindikationen für die Einnahme von ASS ist jedoch insbesondere die Thrombozytenaggregationshemmung bei CCS, Karotisstenose und pAVK, beim akuten Koronarsyndrom sowie als Sekundärprophylaxe nach Myokardinfarkt, Hirninfarkt und transitorisch ischämischer Attacke (100 mg/Tag) (Aboyans et al. 2018; Knuuti et al. 2020; Kleindorfer et al. 2021). Diesen kardiovaskulären Erkrankungen ist als Risikofaktor die Atherosklerose gemein, deren Progress auch durch die Einnahme von ASS vermindert werden soll. Auf die Hintergründe der Atherosklerose wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

Atherosklerose

Atherosklerose ist ein chronisch entzündlicher Vorgang der Wand von Arterien, welcher in der Pathogenese von Myokardinfarkt, pAVK und Schlaganfall eine bedeutende Rolle spielt und somit zur Entstehung der häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen in besonderem Maße beiträgt (Tedgui und Mallat 2006). Auch in Entwicklungsländern steigt die Anzahl von Menschen, die an Atherosklerose und insbesondere den Konsequenzen dieser Erkrankung leiden (Libby 2021).

Als Risikofaktor für die Entstehung sowie die beschleunigte Entwicklung von Atherosklerose ist insbesondere die Erhöhung des LDL-C und des LP(a) zu werten (Thompson et al. 2010; Libby 2021). Rauchen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, physische Inaktivität und eine positive Familienanamnese hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen sind weitere Risikofaktoren für das Auftreten einer Atherosklerose (Libby 2021).

Die Pathogenese der Atherosklerose ist bis heute nicht vollständig verstanden. Die viel zitierte Theorie, dass oxidiertes LDL in der Intima von Gefäßen abgelagert und dort von Makrophagen phagozytiert wird, scheint nach heutiger Evidenz eher eine

untergeordnete Rolle zu spielen. Nicht-oxidiertes LDL scheint aber als entscheidender Faktor an der Pathogenese beteiligt zu sein (Libby 2021).

Endothelzellen werden durch proinflammatorische Zytokine aktiviert und exprimieren Adhäsionsmoleküle, welche die Migration von Monozyten durch das Endothel ermöglichen. So gelangen Monozyten, die sich anschließend zu Makrophagen differenzieren, in die Intima der Gefäßwand (Galkina und Ley 2007; Libby 2021). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass in atherosklerotischen Plaques bereits vorhandene Makrophagen proliferieren können (Robbins et al. 2013). Nach Phagozytose von Lipiden werden Makrophagen zu sogenannten Schaumzellen, wobei laut aktueller Literatur wohl auch glatte Muskelzellen zu Schaumzellen differenzieren können (Owsiany et al. 2019). Schaumzellen und Makrophagen schütten Mediatoren aus, welche die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen in die Intima sowie die Produktion von Extrazellulärmatrix fördern. Dies führt zu einem Wachstum der unter physiologischen Bedingungen sehr dünnen Intima. (Libby 2021). Untergehende Makrophagen und Schaumzellen formen den nekrotischen Kern der sich bildenden atherosklerotischen Plaque (Yurdagul et al. 2018). Veränderte glatte Muskelzellen produzieren Kollagenfasern, die eine fibröse Kappe bilden. Durch Entzündungsmediatoren wie IL-1 β werden Kollagenasen aktiviert, die diese Kappe mit der Zeit ausdünnen. Dadurch wird das Rupturrisiko der Plaque dramatisch erhöht (Libby 2013).

Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β scheinen in der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle zu spielen und den Prozess voranzutreiben. So können im Serum von Patienten, die an stabiler Angina pectoris leiden, höhere Konzentrationen von IL-1 β gemessen werden, als dies bei Gesunden der Fall ist (Ikonomidis et al. 1999). In der viel zitierten *Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study* (CANTOS) konnte zudem gezeigt werden, dass der Einsatz von Canakinumab, einem IL-1 β -Antikörper, die Reinfarktrate sowie die Gesamtmortalität bei Patienten nach Myokardinfarkt senkt (Ridker et al. 2017). Es ist somit naheliegend, dass proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 β künftig als neues Ziel in der Therapie der Atherosklerose genutzt werden könnten.

Die Behandlung dieser Erkrankung zielt insbesondere auf die Verhinderung von Folgeerkrankungen wie Myokardinfarkt, pAVK oder Schlaganfall ab. Dabei werden einerseits Lebensstilveränderungen der Patienten angestrebt, die das kardiovaskuläre Risikoprofil verbessern und den Progress der Atherosklerose verlangsamen sollen. Diese umfassen insbesondere Nikotinverzicht, Erreichen eines BMI zwischen 20 und 25

kg/m², regelmäßige körperliche Aktivität, Etablierung einer gesunden Ernährung sowie die Reduktion von Stress im Alltag (Knuuti et al. 2020).

Andererseits kann bei ausbleibendem Erfolg durch die alleinige Lebensstilveränderung auf eine medikamentöse Therapie zurückgegriffen werden, wobei die bereits beschriebene Einnahme von Statinen zwecks Cholesterolsenkung und Plaquestabilisierung eine zentrale Rolle einnimmt. Zusätzlich sollten weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren reduziert werden. So können eine konsequente antihypertensive Therapie sowie eine optimale Einstellung des Blutzuckers bei Diabetes mellitus zusätzlich angeraten sein (Mach et al. 2019). Wird ein CCS diagnostiziert, sollte eine medikamentöse Kombinationstherapie eines Statins und ASS zwecks Verhinderung kardiovaskulärer Ereignisse angestrebt werden (Knuuti et al. 2020).

Neben der Atherosklerose gibt es zahlreiche weitere Krankheitsbilder, bei denen IL-1 β ursächlich beteiligt ist. Ein Beispiel ist das SIRS, das nun genauer in einem eigenen Kapitel behandelt wird.

Systemic inflammatory response syndrome

Das SIRS ist ein Krankheitsbild, bei dem eine Entzündungsreaktion den gesamten Organismus betrifft. Dieser Symptomkomplex ähnelt dem Bild einer Sepsis, hat jedoch im Unterschied dazu keine Infektion als Grundlage. Auslöser können beispielsweise schwere Traumata, ausgedehnte Operationen, großflächige Verbrennungen oder nekrotisierende Pankreatitiden sein (Chakraborty und Burns 2022).

Bis vor wenigen Jahren galten die SIRS-Kriterien (Leukozytose oder Leukopenie, Herzfrequenz > 90/min, Atemfrequenz > 20/min, Hypo- oder Hyperthermie) auch als Diagnosekriterien für die Sepsis. Diese wurden mittlerweile weitgehend von den (q)SOFA-Kriterien abgelöst (Vincent et al. 2013; Finkelsztejn et al. 2017).

Pathophysiologisch spielen das proinflammatorische Zytokin IL-1 β sowie TNF- α eine wichtige Rolle. Dabei kommt das SIRS vermutlich zustande, wenn im Rahmen einer zunächst lokalen Entzündungsreaktion proinflammatorische Mediatoren deutlich überwiegen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Freisetzung proinflammatorischer Entzündungsmediatoren stark reguliert, sodass pro- und antiinflammatorische Mediatoren ausgeglichen sind und ein Überschießen der Entzündungsreaktion verhindert wird (Chakraborty und Burns 2022).

Das SIRS kann, ähnlich wie die Sepsis, mit lebensbedrohlichen Organkomplikationen einhergehen. So besteht beispielsweise die Gefahr einer akuten Enzephalopathie, eines akuten Atemnotsyndroms, einer Thrombozytopenie, einer arteriellen Hypotension und

Hypoxämie, einer renalen Dysfunktion sowie einer metabolischen Azidose (Chakraborty und Burns 2022). Da heutzutage trotz intensivmedizinischer Maximaltherapie die Letalität des SIRS noch immer hoch ist, gilt es Risikofaktoren für die Entstehung eines SIRS zu identifizieren und zu minimieren (Comstedt et al. 2009). Insbesondere bei elektiven thorax- oder herzchirurgischen Operationen sollten Risikofaktoren eliminiert werden, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines SIRS in dieser planbaren Situation so gering wie möglich zu halten. Bekannte Risikofaktoren für die Entstehung eines SIRS sind beispielsweise Immunsuppression, Diabetes mellitus, Tumorleiden, Leberzirrhose oder ein hohes Lebensalter (Chakraborty und Burns 2022). Auch ein niedriger Cholesterolspiegel vor herzchirurgischen Eingriffen ist in der Literatur als Risikofaktor für die Entwicklung eines SIRS beschrieben (Lagrost et al. 2014).

Fragestellung der Dissertation

Statine führen über eine Hemmung des Schlüsselenzyms der Cholesterolsynthese zu einer Verringerung des Gesamtcholesterolspiegels. Zudem ist bekannt, dass die Einnahme von Statinen zu einer Strukturänderung von *lipid rafts* führen kann. Diese cholesterolreichen Abschnitte der Zellmembran dienen als Signalplattform und nehmen als Standort zahlreicher Rezeptoren vermutlich eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Freisetzung von IL-1 β ein. In verschiedenen Publikationen konnten Mitarbeiter der Arbeitsgruppe der hiesigen Sektion für Experimentelle Chirurgie zeigen, dass die cholinergen Agonisten ACh, PC, CRP, Nikotin, GPC oder DPPC die Freisetzung von IL-1 β über nAChR inhibieren. Dieser Mechanismus ist für die streng kontrollierte Freisetzung von IL-1 β von wichtiger Bedeutung.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Statine den inhibitorischen Effekt cholinergischer Agonisten auf die Freisetzung von IL-1 β beeinflussen. Eine solche Fragestellung kann vor dem Hintergrund, dass eine überschießende Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zu einem SIRS führen kann, eine wichtige Bedeutung haben. Das postoperative SIRS ist noch immer eine der schwerwiegenden Komplikationen im Bereich der Herz- und Thoraxchirurgie. Sollte es Hinweise auf einen solchen Effekt geben, könnte als klinische Konsequenz die Überlegung angestoßen werden, Statine beispielsweise vor größeren operativen Eingriffen abzusetzen. Dies steht entgegen der aktuellen Verfahrensweise im klinischen Alltag und könnte insbesondere vor dem Hintergrund relevant sein, dass niedrige Gesamtcholesterolspiegel wohl einen Risikofaktor für die Entwicklung eines SIRS darstellen.

Es gibt darüber hinaus Hinweise darauf, dass Statine die absolute Freisetzung von IL-1 β *in vivo* reduzieren. Wie zuvor beschrieben, scheint IL-1 β eine bedeutende Rolle in

der Entwicklung der Atherosklerose zu spielen. Somit ist davon auszugehen, dass der Progress der Atherosklerose durch die Einnahme von Statinen zumindest verlangsamt wird und an dieser Stelle den Statinen ein protektiver Effekt zugeschrieben werden kann. Interessant ist zusätzlich zur Hauptfragestellung dieser Arbeit somit die Frage, ob die Behandlung mit Statinen zu einer Änderung der absoluten Freisetzung von IL-1 β führt, insbesondere da in der Literatur diesbezüglich bisher unterschiedliche Ergebnisse zu finden sind.

Material und Methoden

Studienprotokoll

In diese Studie wurden Patienten eingeschlossen, die zu einer geplanten Koronarangiographie zum Ausschluss eines CCS in das Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen, kamen. Einschlusskriterien waren entsprechend der Genehmigung der Ethik-Kommission vom 08. April 2019 des Fachbereichs Medizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen (AZ 35/19) die Diagnose eines geringgradigen CCS, das Alter über 18 Jahren der Patienten sowie deren unterschriebene Einverständniserklärung. Des Weiteren wurden die Patienten vor Durchführung der Experimente auf eingenommene Medikamente befragt. Die Einnahme von Statinen, Thrombozytenaggregationshemmern, oralen Antikoagulantien, Antibiotika oder Immunsuppressiva führte zum Ausschluss der Patienten. Auch eine positive Anamnese hinsichtlich eines akuten Koronarsyndroms, einer akuten Extremitätenischämie, infektiöser Erkrankungen, einer chronischen Niereninsuffizienz oder einer bestehenden Schwangerschaft führten zu einem Ausschluss der Patienten. Vor der geplanten Koronarangiographie erfolgte eine Blutentnahme unter prüfärztlicher Aufsicht aus der *V. mediana cubiti*. Nach der Koronarangiographie begann die Statintherapie mittels Atorvastatin (Sortis® 40 mg, einmal täglich) über einen Zeitraum von vier Wochen, dem sich eine erneute Blutentnahme anschloss (s. Abbildung 5). Für weitere vier Wochen erfolgte eine Therapie mit Atorvastatin (Sortis® 40 mg, einmal täglich) und ASS (Aspirin® 100 mg, einmal täglich). Die dritte Blutentnahme erfolgte acht Wochen nach der

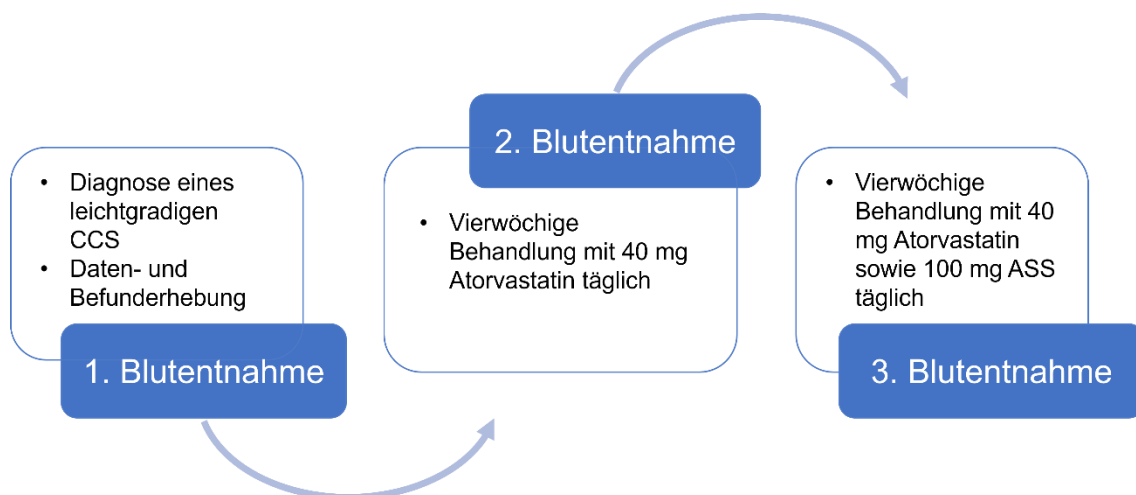


Abbildung 5. Studienprotokoll.

Insgesamt wurden pro Patient drei Blutentnahmen durchgeführt. Die erste Blutentnahme erfolgte vor der Koronarangiographie, die zweite nach einer vierwöchigen Therapie mit Atorvastatin (40 mg täglich). Der zweiten Blutentnahme schloss sich eine vierwöchige Kombinationstherapie mit Atorvastatin (40 mg täglich) und Acetylsalicylsäure (100 mg täglich) an. Anschließend erfolgte die dritte Blutentnahme. Den Blutentnahmen folgten jeweils eine Anreicherung von Monozyten sowie Zellkulturexperimente.

durchgeführten Koronarangiographie. Es erfolgte die Anreicherung der Monozyten mittels negativer Selektion (s. S. 27, Kapitel „Anreicherung der Monozyten“).

Wie in dem Kapitel „Zellkulturexperimente mit angereicherten Monozyten“ beschrieben, wurde den Monozyten nach dreistündiger Stimulation mit LPS in unterschiedlichen Ansätzen jeweils entweder ACh, PC, CRP, Nikotin, GPC oder DPPC zugegeben (s. S. 27, Kapitel „Zellkulturexperimente mit angereicherten Monozyten“). Anschließend wurde den Ansätzen BzATP zugegeben. Die Erfassung der Menge des ausgeschütteten IL-1 β im Zellkulturüberstand erfolgte durch einen *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

Reagenzien

Acetylcholinchlorid (ACh), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; #A2661

2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP), Jena BioScience GmbH, Jena, Deutschland; #NU-1620-5

C-reaktives Protein (CRP, human) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; #AG723

CytoTox96[®] non-radioactive cytotoxicity assay, Promega, Madison, WI, USA; #G1780

Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Sigma-Aldrich; #P0763

Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), Sigma-Aldrich; #D8537

EDTA-Lösung 0,5 M, pH 8.0, endotoxinfrei; Bioworld, Dublin, Ohio, USA; #40120777-1

ELISA kit: human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA; #DY201

Fetal bovine serum, Cellconcepts GmbH, Umkirch, Deutschland; #S-EUR30-I

Glycerophosphocholin (GPC), Sigma-Aldrich; #G5291

Heparin-Natrium, 25000 I.E./5 mL, Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland

Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®, 25000 I.E./5 mL, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

Human IL-1 beta Standard, R&D Systems; #840170

Lipopolysaccharid von E. coli (LPS) O26:B6, Sigma-Aldrich; #L2654-1MG

Lymphoprep™ Stemcell Technologies, Vancouver, Canada; #07851

Lysepuffer, Promega; #G182A

Nikotin-Hydrogentartrat (Nikotin), Sigma-Aldrich; #SML1236

Phosphocholinchlorid-Calciumsalz (PC), Sigma-Aldrich; #P0378

Reagent diluent, R&D Systems; #841380

RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail, Stemcell Technologies; #15068

RPMI-1640-Medium (RPMI), Sigma-Aldrich; #R8758

Türkische Lösung (= Acetic acid gentian violet solution), Merck KGaA; #1.092770100

Verbrauchsmaterialien

96-well-Platte, Clear Polystyrene Microplates, 96 well, R&D Systems; #DY990

96-well-Suspensionsplatte, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland; #833924500

Blutentnahmesystem: Safety-Multifly®-Kanüle, 21 G, 200 mm, Sarstedt AG & Co. KG; #85.1638.235

Einmalspritze: Injekt® 10 mL Luer-Ansatz, 2-teilige Einmalspritze, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland; #4606108V

Filterspitze PP (steril), 0,1-10 µl, Nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland; #07-613-8300

Filterspitze PP (steril), 0-100 µl, Nerbe plus GmbH; #07-642-8300

Filterspitze PP (steril), 100-1.250 µl, Nerbe plus GmbH; #07-695-8300

Mehrkanalpipette Eppendorf Reference® 2, 8-Kanal, 10-100 µL, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; #4926000050

Mehrkanalpipette Eppendorf Reference® 2, 8-Kanal, 30-300 µL, Eppendorf AG; #4926000034

Pipette 10 mL, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich; #607180

Pipette 25 mL, Greiner Bio-One International GmbH; #760180

Pipette 5 mL, Greiner Bio-One International GmbH; #606107

Pipetten Eppendorf Reference® 2, 0,5-10 µL, Eppendorf AG; #4924000010

Pipetten Eppendorf Reference® 2, 100-1000 µL, Eppendorf AG; #4924000088

Pipetten Eppendorf Reference® 2, 10-100 µL, Eppendorf AG; #4924000053

Pipettenspitze (nicht steril) 100-1000 µL, Greiner Bio-One International GmbH; #686290

Pipettenspitze (nicht steril) 200 µL, Sarstedt AG & Co. KG; #70.760.012

Pipettenspitze, epT.I.P.S.® Standard, 30-300 µL, Eppendorf AG; #0030000897

Polypropylen Röhrchen, Cellstar®, 12 mL, Greiner Bio-One International GmbH; #164161

Polypropylen Röhren, Cellstar[®], 50 mL, Greiner Bio-One International GmbH; #227261

Reagiergefäß 1,5 mL, Sarstedt AG & Co. KG; #72.690.001

Geräte

Photometer: Fluostar Optima[®], BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland

Pipetus[®] 0,1-200 mL, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland; #9907200

Inkubator, Heracell 240i CO2-Inkubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Mikroskop Labovert, Leica Mikrosystem GmbH, Wetzlar, Deutschland

Mikroskop Laborlux D, Leica Mikrosystem GmbH, Wetzlar, Deutschland

Ultraschallbad Sonorex Super RK102H, Bandelin, Berlin, Deutschland

Vortex Mixer REAX 2000, Heidolph, Schwabach, Deutschland

Wasserbad, Köttermann, Uetze, Deutschland

Sterilbank class 2 EN A2, Nuaire, Plymouth, USA

Zählkammer Neubauer, Tiefe 0,1 mm 0,0025 mm², Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland

Zentrifuge Rotina 420R, Hettich Lab Technik, Tutlingen, Deutschland

Software

Microsoft Word & Excel, Microsoft, Redmond, WA, USA

SPSS[®] Statistics Version 25, IBM, München, Deutschland

Anreicherung der Monozyten

Vor der Entnahme der benötigten Menge Blut unter prüfärztlicher Aufsicht aus der *V. mediana cubiti* wurde eine 10 mL-Spritze mit Heparin-Natrium versetzt (18,75 IE/mL Blut), um die Gerinnung des Blutes zu unterbinden.

Mit dem Ziel, die Monozyten aus dem Spenderblut anzureichern, wurde der *RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail* verwendet. Dieser Cocktail, bestehend aus Antikörpern gegen CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, CD66b, CD123 und Glycophorin-A, wurde dem Blut zugegeben. Während einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Bindung zwischen den Leukozyten und den passenden Antikörpern. Anschließend erfolgte die Auftrennung im diskontinuierlichen Dichtegradienten mittels *Lymphoprep™*, bei der sich das in Abbildung 6 dargestellte Bild ergab (s. Abbildung 6). Bei der Zentrifugation wurden folgende Einstellungen vorgenommen: 20°C, 1200 g, keine Bremse, 20 Minuten.

Der bei der Dichtegradientenzentrifugation entstandene Ring, in dem vorrangig angereicherte Monozyten zu erwarten waren, wurde mit einer 1 mL Pipette abgesaugt und in ein Auffanggefäß gegeben. Nach einem Waschvorgang mit *Dulbecco's phosphate buffered saline* (PBS; versetzt mit 2% *fetal bovine serum* und 1 mM EDTA) folgte eine erneute Zentrifugation (19°C, 400 g, 8 Minuten) und ein weiterer Waschvorgang. Nach einer letzten Zentrifugation (19°C, 400 g, 8 Minuten) wurde das entstandene Zellpellet in 1 mL RPMI-1640-Medium (RPMI) resuspendiert.

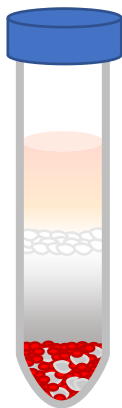


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Phasen nach Dichtezentrifugation.

Nach der Dichtezentrifugation mittels *Lymphoprep™* bildeten sich mehrere Phasen. Oben bildete sich eine Plasmaphase (orange), darunter ein weißer Ring (weiß) bestehend aus angereicherten Monozyten. Zwischen dieser und der unten befindlichen Phase bestehend aus Erythrozyten und anderen Leukozyten (rot) befindet sich eine Phase bestehend aus *Lymphoprep™* (grau).

Zellkulturexperimente mit angereicherten Monozyten

Vor der Zellzählung wurden 10 µL des Monozytengemisches mit 90 µL Türkscher Lösung verdünnt und zwecks Lyse vorhandener Erythrozyten für drei Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Für die Zählung wurden 10 µL des verdünnten Ansatzes in die Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop konnten bei einer hundertfachen Vergrößerung die gefärbten Monozyten

gezählt werden. Anschließend wurde durch Zugabe von RPMI eine Zellkonzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/mL erreicht. Es folgte die Aussaat von 1×10^5 Zellen in einem Volumen von 200 μL RPMI in die *wells* einer 96-*well*-Platte. Einige der Ansätze wurden mit 5 ng/mL LPS von *E. coli* stimuliert. Nach dreistündiger Inkubation im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt wurden entweder ACh (Endkonzentration: 100 μM), PC (200 μM), CRP (5 $\mu\text{g/mL}$), Nikotin (100 μM), GPC (100 μM) oder DPPC (100 μM) in die *wells* der verwendeten 96-*well*-Suspensionsplatte hinzugefügt. Im Anschluss wurde BzATP (100 μM) zugegeben. Nach Zugabe der Substanzen wurden zur besseren Vermischung der Komponenten weitere 50 μL RPMI in die *wells* pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt. Anschließend wurde der Inhalt der *wells* in Reagiergefäße überführt und die Ansätze für acht Minuten bei 4°C und 500 g zentrifugiert. Von den Überständen wurden 200 μL in 1,5 mL Reagiergefäße pipettiert und bis zur Durchführung des ELISA und der Messung der Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) bei -20°C aufbewahrt.

Exemplarisch sei eine Versuchsreihe aufgezeigt:

- 1×10^5 Zellen in 250 μL RPMI (Kontrollansatz)
- 1×10^5 Zellen in 250 μL RPMI + LPS (5 ng/mL)
- 1×10^5 Zellen in 250 μL RPMI + LPS (5 ng/mL) + BzATP (100 μM)
- 1×10^5 Zellen in 250 μL RPMI + LPS (5 ng/mL) + BzATP (100 μM) + ACh (100 μM)
- 1×10^5 Zellen in 250 μL RPMI + LPS (5 ng/mL) + BzATP (100 μM) + PC (200 μM)
- 1×10^5 Zellen in 250 μL RPMI + LPS (5 ng/mL) + BzATP (100 μM) + CRP (5 $\mu\text{g/mL}$)
- 1×10^5 Zellen in 250 μL RPMI + LPS (5 ng/mL) + BzATP (100 μM) + Nikotin (100 μM)
- 1×10^5 Zellen in 250 μL RPMI + LPS (5 ng/mL) + BzATP (100 μM) + GPC (100 μM)
- 1×10^5 Zellen in 250 μL RPMI + LPS (5 ng/mL) + BzATP (100 μM) + DPPC (100 μM)

ELISA

Zur Quantifizierung der Konzentration von IL-1 β im Zellkulturüberstand wurde ein ELISA durchgeführt. In dieser Studie wurde das ELISA Test Kit DuoSet Human IL-1 β /IL-1F2 nach Herstellerangaben verwendet. Die zu erwartende Konzentration von IL-1 β im Zellkulturüberstand variierte je nach Versuchsansatz. Versuchsansätze, denen nur LPS oder keine Substanz zugegeben wurde, wurden 1/10 verdünnt. Ansätze, denen zusätzlich BzATP zugegeben wurde, wurden 1/50 verdünnt. Die Verdünnung der Zellkulturüberstände erfolgte mit *reagent diluent*. Probenmaterial, welches nicht benötigt wurde, wurde wieder bei -20°C eingefroren. Als Referenzwert für die Messung wurde mittels rekombinatem humanen IL-1 β („*Human IL-1 beta Standard*“) nach

Herstellerprotokoll eine Standardreihe angefertigt. Das rekombinante humane IL-1 β wurde mit *reagent diluent* verdünnt. Die Standardreihe umfasste die Konzentrationen 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,25 pg/mL, 15,625 pg/mL, 7,8125 pg/mL, und 3,9 pg/mL. Die Menge des Farbstoffs, welcher im Rahmen des ELISA entstand, wurde über ein Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Lag ein Wert oberhalb der vom Hersteller beschriebenen Standardreihe, wurde der Zellkulturüberstand erneut aufgetaut, eine geeignete Verdünnung gewählt und die Messung erneut durchgeführt.

Abschätzung des Zelltods

Die Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand dient als Maß für den Zelltod, der in einem Ansatz im Rahmen des Experimentes aufgetreten ist. So wurde durch die Lyse aller Zellen in einer Probe eine LDH-Aktivität von 100% gemessen, welche als Referenzwert für den Zelltod in den einzelnen Ansätzen herangezogen werden kann. Parallel zum Versuch wurden 1×10^5 Zellen mitgeführt. Nach Anreicherung der Monozyten wurden 1×10^5 Zellen in 250 μ L RPMI in ein *well* der 96-*well*-Suspensionsplatte ausgesät. Es erfolgte keine Stimulation der Zellen mit LPS. Die Zellen wurden gemeinsam mit anderen Ansätzen der Versuchsreihe inkubiert. Es wurden keine weiteren Substanzen hinzugefügt. Ansonsten war die Behandlung des Ansatzes den zuvor beschrieben identisch.

Die Lyse der Zellen samt Zellkulturüberstand erfolgte durch die Zugabe von Lysepuffer, welcher Bestandteil des verwendeten *kits* war. Die Quantifizierung der LDH-Aktivität in den einzelnen Zellkulturüberständen der Ansätze wurde mittels *CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* erreicht. Die Durchführung dieser Technik erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Bestimmung der Gesamtcholesterol-, LDL-C-, HDL-C- und Triglycerid-Konzentrationen

Die photometrische Bestimmung der Konzentrationen des Gesamtcholesterols, LDL-C, HDL-C und der Triglyceride im Serum der Patienten wurde im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Gießen sowie im Bioscientia MVZ Labor Mittelhessen durchgeführt. Die Referenzbereiche der erhobenen Parameter sind in Tabelle 1 aufgeführt (s. Tabelle 1). Die Bestimmung der Parameter zu den unterschiedlichen Blutentnahmezeitpunkten wurde für die einzelnen Patienten zwecks besserer Vergleichbarkeit jeweils im selben Labor durchgeführt.

Parameter	Referenzwerte [mg/dL]
Gesamtcholesterol	120 – 220
HDL-C	50 – 80
LDL-C	65 – 150
Triglyceride	55 – 245

Tabelle 1. Referenzwerte der in dieser Studie erhobenen Parameter. Die Angaben stammen aus dem Leistungsverzeichnis des Zentrallabores des Universitätsklinikum Gießen (https://www.ukgm.de/ugm_2/deu/ugi_kch/PDF/LVZ-02-2022.pdf; Abruf am 10.08.2022).

HDL-C, high density lipoprotein-associated cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein-associated cholesterol.

Statistische Datenauswertung

Für die statistische Datenauswertung wurde das Statistikprogramm SPSS der Firma IBM genutzt. Bei den getesteten Stichproben handelte es sich um abhängige Stichproben. Wurden Stichproben multipel getestet, wurde in einem ersten Schritt zunächst mit Hilfe des Friedman-Test überprüft, ob eventuelle Unterschiede zwischen den Stichproben zufällig zustande gekommen sein könnten. Ab einem p-Wert $\leq 0,05$ wurde davon ausgegangen, dass dies nicht der Fall ist. In diesem Fall wurde in einem zweiten Schritt mit Hilfe des nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test paarweise überprüft, ob eventuelle Unterschiede statistisch signifikant sind. Ab einem p-Wert $\leq 0,05$ wurde davon ausgegangen, dass eine statistische Signifikanz besteht. Ergab der Friedman-Test einen p-Wert $> 0,05$, wurde nicht weiter getestet.

Ergebnisse

Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 142 Patienten gescreent, von denen 21 Patienten in die Studie eingeschlossen wurden. Zwölf Patienten wurden aufgrund einer vorbestehenden Medikation mit den Wirkstoffen Atorvastatin, Simvastatin oder Rosuvastatin von der Studie ausgeschlossen. 42 Patienten nahmen Thrombozytenaggregationshemmer wie ASS oder orale Antikoagulantien wie Phenprocoumon, Rivaroxaban oder Apixaban ein. 46 Patienten nahmen ein Statinpräparat und zusätzlich ASS ein. Drei Patienten wurden aufgrund einer bestehenden Therapie mit Prednisolon von der Studie ausgeschlossen. Ein Patient konnte aufgrund einer ASS-Unverträglichkeit nicht eingeschlossen werden. Bei drei Patienten bestand nach der Intervention keine Indikation für eine Statintherapie, da kein CCS feststellbar war. Neun Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen, da während der Koronarangiographie eine Stentimplantation erfolgte. Bei fünf Patienten bestand nach der Durchführung der Herzkatheteruntersuchung die Indikation für eine chirurgische Intervention, dies führte ebenfalls zum Ausschluss von der Studie. Drei Patienten stoppten während des Studienverlaufs die Medikamenteneinnahme, sodass das Studienprotokoll nicht erfüllt wurde. Drei Patienten brachen im Verlauf die Teilnahme an der Studie ab. Zwei Patienten erschienen nach der zweiten Blutentnahme nicht zur

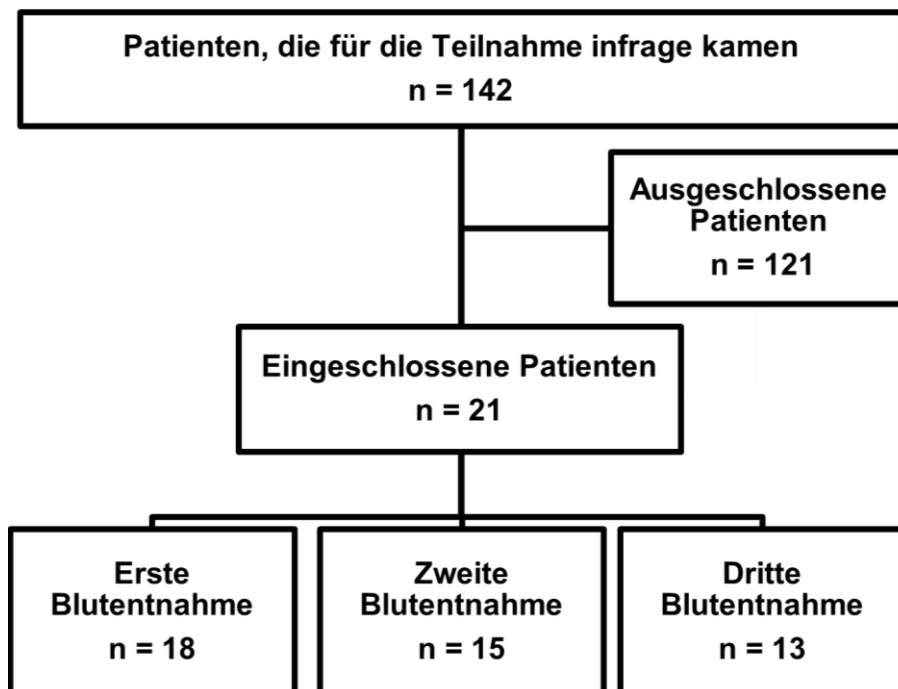


Abbildung 7. Screening der Patienten.

Insgesamt erhielten 145 Patienten eine Koronarangiographie und wurden hinsichtlich der Einschlusskriterien gescreent. 21 Patienten erfüllten die Einschlusskriterien. Bei 13 Patienten konnte das vollständige Studienprotokoll durchgeführt werden.

dritten Blutentnahme. Insgesamt konnte das Studienprotokoll bei 13 Patienten vollständig durchgeführt werden (s. Abbildung 7).

Die eingeschlossenen Patienten waren mehrheitlich männlich, Nichtraucher und zwischen 42 und 77 Jahre alt. Neben dem neudiagnostizierten CCS wiesen die Patienten teilweise Komorbiditäten auf. Diese umfassten insbesondere arterielle Hypertonie und Hypothyreose, außerdem Diabetes mellitus Typ II, Fibromyalgie und Hyperurikämie (s. Tabelle 2).

Patientenanzahl	21
Geschlecht	
männlich	12 (57%)
weiblich	9 (43%)
Alter (Median, Interquartilsabstand, [Jahre])	
	60 (55 – 65)
BMI (Median, Interquartilsabstand, [kg/m ²])	
	29 (24,5 – 32,6)
Rauchverhalten	
Raucher	6 (29%)
Nichtraucher	15 (71%)
Leukozyten (Median, Interquartilsabstand, [10 ³ /μL])	
	6.7 (5,7 – 8,5)
Cholesterol im Serum (Median, Interquartilsabstand, [mg/dL])	
	221 (204 – 247)
LDL-C im Serum (Median, Interquartilsabstand, [mg/dL])	
	139 (126 – 152)
HDL-C im Serum (Median, Interquartilsabstand, [mg/dL])	
	54 (42 – 70)
Triglyceride im Serum (Median, Interquartilsabstand, [mg/dL])	
	138 (111 – 211)
Komorbiditäten	
Arterielle Hypertonie	7 (33%)
COPD	1 (5%)
Diabetes Typ II	1 (5%)
Fibromyalgie	1 (5%)
Hyperurikämie	1 (5%)
Hypothyreose	6 (29%)

Tabelle 2. Patientencharakteristika der eingeschlossenen Patienten.

Die eingeschlossenen Patienten waren überwiegend männlich, Nichtraucher und zwischen 55 und 65 Jahre alt. Neben dem neudiagnostizierten chronischen Koronarsyndroms (CCS) litten die Patienten an weiteren Komorbiditäten, insbesondere an arterieller Hypertonie und Hypothyreose. Zudem sind die Mediane der Blutfettwerte der ersten Blutentnahme dargestellt. Alle Daten beziehen sich auf den Zeitpunkt der ersten Blutentnahme vor der Koronarangiographie. BMI, Body-Mass-Index; Cholesterol, Gesamtcholesterol; COPD, chronisch obstruktive Lungenerkrankung; HDL-C, *high-density lipoprotein-associated cholesterol*; LDL-C, *low-density lipoprotein-associated cholesterol*.

Ergebnisse der Blutserumanalysen

Während der Blutentnahmen für die Experimente wurde den Patienten zusätzlich Blut entnommen, um die Gesamtcholesterol-, LDL-C-, HDL-C- und Triglyceridkonzentrationen im Serum zu bestimmen. Aus technischen Gründen konnten diese Bestimmungen bei zwei Patienten nur vor Beginn der medikamentösen Therapie vorgenommen werden.

Gesamtcholesterol

Die gemessenen Gesamtcholesterolkonzentrationen im Blutserum lagen zu Beginn der Studie zwischen 169 und 299 mg/dL, der Median lag bei 247 mg/dL (n = 13). Bei der Patientenkohorte führte die Einnahme von 40 mg Atorvastatin pro Tag über einen Zeitraum von vier Wochen zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtcholesterolkonzentration im Blutserum (p = 0,01; n = 13; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Bei der zweiten Blutentnahme, also nach vierwöchiger Therapie mit Atorvastatin, lag die gemessene Gesamtcholesterolkonzentration zwischen 113 und 196 mg/dL, der Median lag bei 175 mg/dL (n = 13). Die weitergeführte Behandlung der Patienten mit 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg ASS pro Tag über einen Zeitraum von vier Wochen führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtcholesterolkonzentrationen im Blutplasma (p = 0,05; n = 11; Friedman-Test

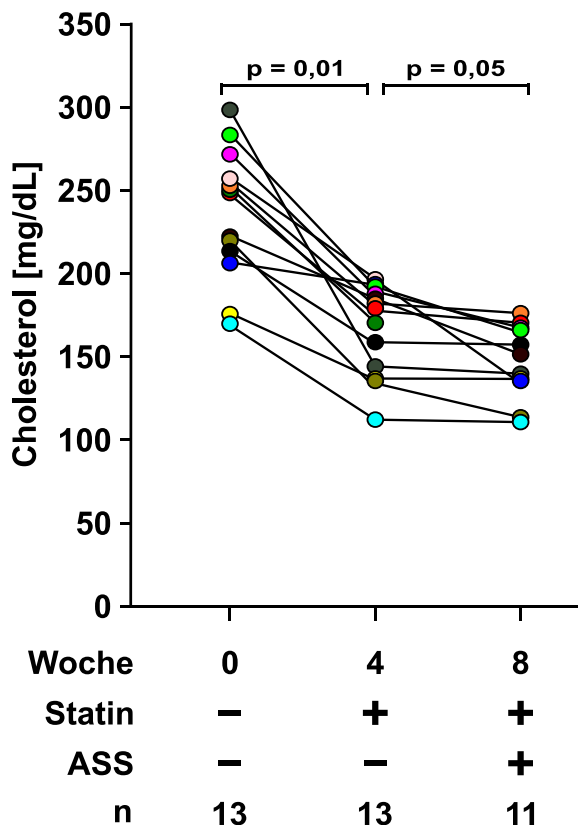


Abbildung 8. Konzentration von Gesamtcholesterol im Blutserum der Patienten im Verlauf der medikamentösen Therapie.

Die Einnahme von 40 mg Atorvastatin (Statin) pro Tag über einen Zeitraum von vier Wochen führt zu einer signifikanten Reduktion der gemessenen Konzentration von Gesamtcholesterol im Blutserum von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde. Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen führt zu einer zusätzlichen, weniger ausgeprägten jedoch ebenfalls signifikanten Reduktion des gemessenen Gesamtcholesterolspiegels im Blutserum der Patienten. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Die Einzelwerte sind als gefärbte Punkte dargestellt. Jedem Patienten wurde eine Farbe zugeordnet. Die abhängigen Werte wurden zur besseren Übersicht mit einem schwarzen Strich verbunden.

gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Diese Reduktion war im Vergleich zum ersten Zeitraum weniger stark ausgeprägt. Die gemessenen Gesamtcholesterolkonzentrationen lagen am Ende der Studie zwischen 111 und 176 mg/dL, der Median lag bei 150 mg/dL (n = 11) (s. Abbildung 8).

Low-density lipoprotein-associated cholesterol

Die gemessenen Blutplasmakonzentrationen von LDL-C der Patienten lagen zu Beginn der Studie zwischen 98 und 206 mg/dL, der Median lag bei 143 mg/dL (n = 13). Bei allen Patienten führte die Einnahme von 40 mg Atorvastatin pro Tag über einen Zeitraum von vier Wochen zu einer signifikanten Reduktion der LDL-C-Konzentration im Blutserum (p = 0,01; n = 13; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Bei der zweiten Blutentnahme, also nach vierwöchiger Therapie mit Atorvastatin, lag die gemessene Konzentration von LDL-C zwischen 43 und 129 mg/dL, der Median lag bei 90 mg/dL (n = 13). Die weitergehende Behandlung der Patienten mit 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg ASS pro Tag über einen Zeitraum von zusätzlichen vier Wochen führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Konzentration von LDL-C (p ≤ 0,01; n = 11; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Diese Reduktion war, analog zu den Ergebnissen des Gesamtcholesterol, im Vergleich zum ersten Zeitraum weniger stark ausgeprägt. Die gemessenen LDL-C-Konzentrationen

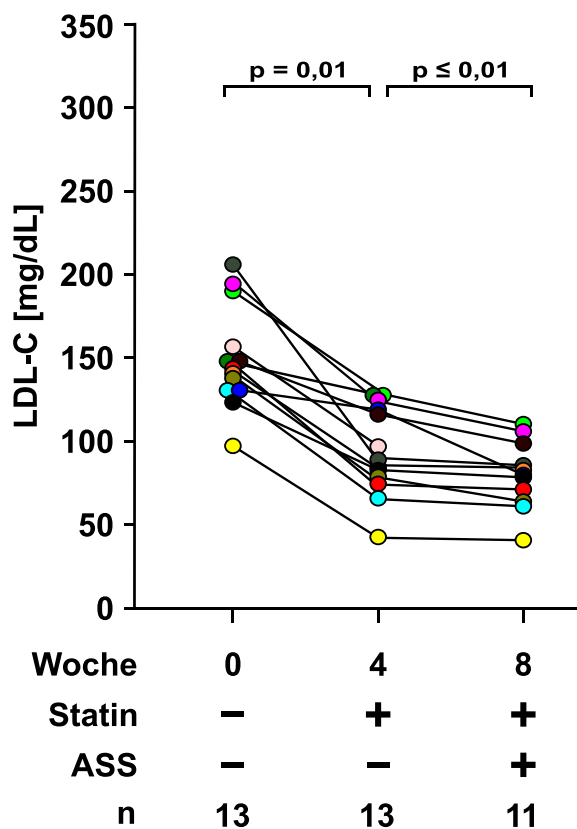


Abbildung 9. Konzentration von low density lipoprotein-associated cholesterol (LDL-C) im Blutserum der Patienten im Verlauf der medikamentösen Therapie.

Die Einnahme von 40 mg Atorvastatin (Statin) pro Tag über einen Zeitraum von vier Wochen führt zu einer signifikanten Reduktion der gemessenen Konzentration von LDL-C im Blutserum von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde. Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen führt zu einer zusätzlichen, weniger ausgeprägten, jedoch ebenfalls signifikanten Reduktion der gemessenen LDL-C-Konzentration im Blutserum der Patienten. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Die Einzelwerte sind als gefärbte Punkte dargestellt. Jedem Patienten wurde eine Farbe zugeordnet. Die abhängigen Werte wurden zur besseren Übersicht mit einem schwarzen Strich verbunden.

lagen am Ende der Studie zwischen 41 und 111 mg/dL, der Median lag bei 82 mg/dL (n = 11) (s. Abbildung 9).

High density lipoprotein-associated cholesterol

Die gemessene Konzentration von HDL-C im Blutserum der Patienten lag zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zwischen 30 und 85 mg/dL, der Median lag bei 45 mg/dL (n = 12). Die Einnahme von 40 mg Atorvastatin pro Tag führte zu keiner signifikanten Veränderung der HDL-C Konzentration (n = 12; Friedman-Test).

Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme lagen die gemessenen Werte zwischen 31 und 85 mg/dL, der Median lag bei 37 mg/dL (n = 13). Die anschließende vierwöchige tägliche Behandlung mit 40 mg Atorvastatin und 100 mg ASS pro Tag führte ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung der HDL-C-Konzentration im Blutserum der Patienten (n = 11; Friedman-Test). Zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme lagen die gemessenen HDL-C-Konzentrationen im Bereich von 32 bis 84 mg/dL, der Median lag bei 36,50 mg/dL (n = 11; s. Abbildung 10).

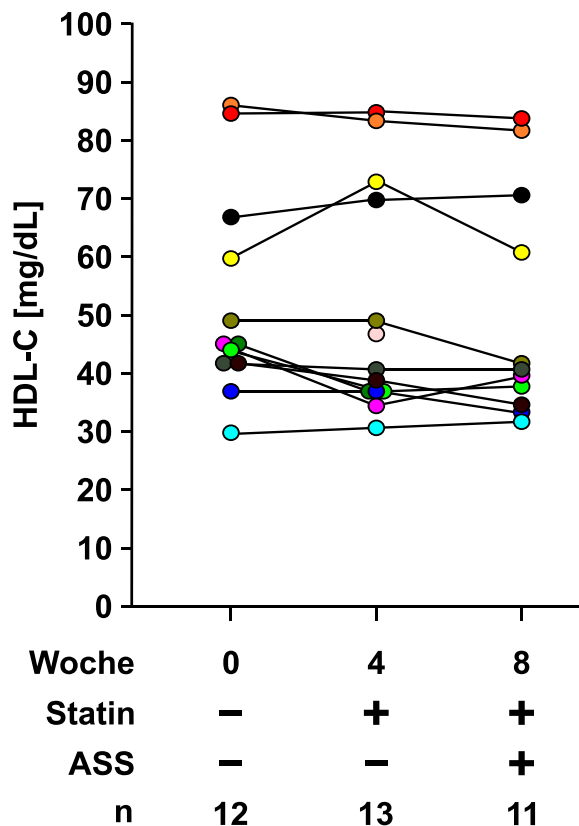


Abbildung 10. Konzentration von high density lipoprotein-associated cholesterol (HDL-C) im Blutserum der Patienten im Verlauf der medikamentösen Therapie.

Die Einnahme von 40 mg Atorvastatin (Statin) pro Tag über einen Zeitraum von vier Wochen führt zu keiner signifikanten Änderung der gemessenen Konzentration von HDL-C im Blutserum von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde. Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen führt ebenfalls nicht zu einer signifikanten Änderung der gemessenen HDL-C Konzentration im Blutserum der Patienten. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test. Die Einzelwerte sind als gefärbte Punkte dargestellt. Jedem Patienten wurde eine Farbe zugeordnet. Die abhängigen Werte wurden zur besseren Übersicht mit einem schwarzen Strich verbunden.

Triglyceride

Die gemessenen Konzentrationen von Triglyceriden im Blutserum der Patienten lagen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zwischen 75 und 337 mg/dL, der Median lag bei

172 mg/dL (n = 13). Die Einnahme von 40 mg Atorvastatin pro Tag führte zu keiner signifikanten Veränderung der Triglycerid-Konzentration (n = 13; Friedman-Test).

Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme lagen die gemessenen Werte zwischen 70 und 424 mg/dL, der Median lag bei 136 mg/dL (n = 13). Die anschließende vierwöchige Behandlung mit 40 mg Atorvastatin und 100 mg ASS pro Tag führte ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung der Triglycerid-Konzentration im Blutserum der Patienten (n = 11; Friedman-Test). Zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme lagen die gemessenen Triglycerid-Konzentrationen im Bereich von 72 bis 297 mg/dL, der Median lag bei 126 (n = 11; s. Abbildung 11).

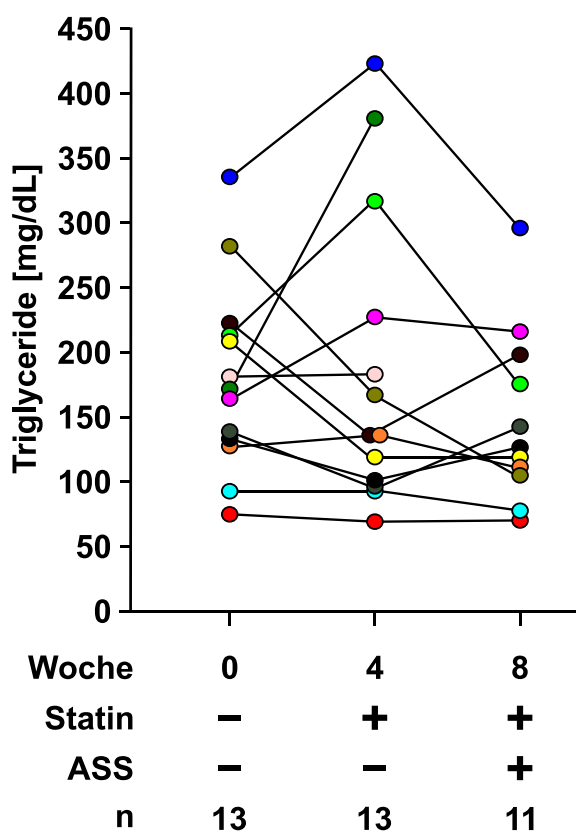


Abbildung 11. Konzentration von Triglyceriden im Blutserum der Patienten im Verlauf der medikamentösen Therapie.

Die Einnahme von 40 mg Atorvastatin (Statin) pro Tag über einen Zeitraum von vier Wochen führt zu keiner signifikanten Änderung der gemessenen Konzentration von Triglyceriden im Blutserum von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde. Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen führt ebenfalls nicht zu einer signifikanten Änderung der gemessenen Konzentration von Triglyceriden im Blutserum der Patienten. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test. Die Einzelwerte sind als gefärbte Punkte dargestellt. Jedem Patienten wurde eine Farbe zugeordnet. Die abhängigen Werte wurden zur besseren Übersicht mit einem schwarzen Strich verbunden.

Effekte nikotinerger Agonisten auf die BzATP-abhängige IL-1 β -Ausschüttung angereicherter Monozyten

Effekt von BzATP auf die IL-1 β -Ausschüttung angereicherter Monozyten

Im Zellkulturüberstand der unstimulierten Monozyten wurde eine Ausschüttung von IL-1 β gemessen, die zwischen 0 und 73 pg/mL lag (n = 46). Der Median lag bei 4 pg/mL. Die Stimulation der Zellen mittels 5 ng/mL LPS über einen Zeitraum von drei Stunden führte zu einer signifikant erhöhten Konzentration von IL-1 β im Zellkulturüberstand ($p \leq 0,01$; n = 46; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Die Ausschüttung von IL-1 β lag zwischen 65 pg/mL und 2,14 ng/mL (n = 46). Der Median lag bei 0,77 ng/mL. Die Zugabe von 100 μ M BzATP zu den mit LPS stimulierten Zellen führte wiederum zu einer signifikanten Erhöhung der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand (p \leq 0,01; n = 46; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Der Median lag bei 8,37 ng/mL. Die gemessene Konzentration von IL-1 β im

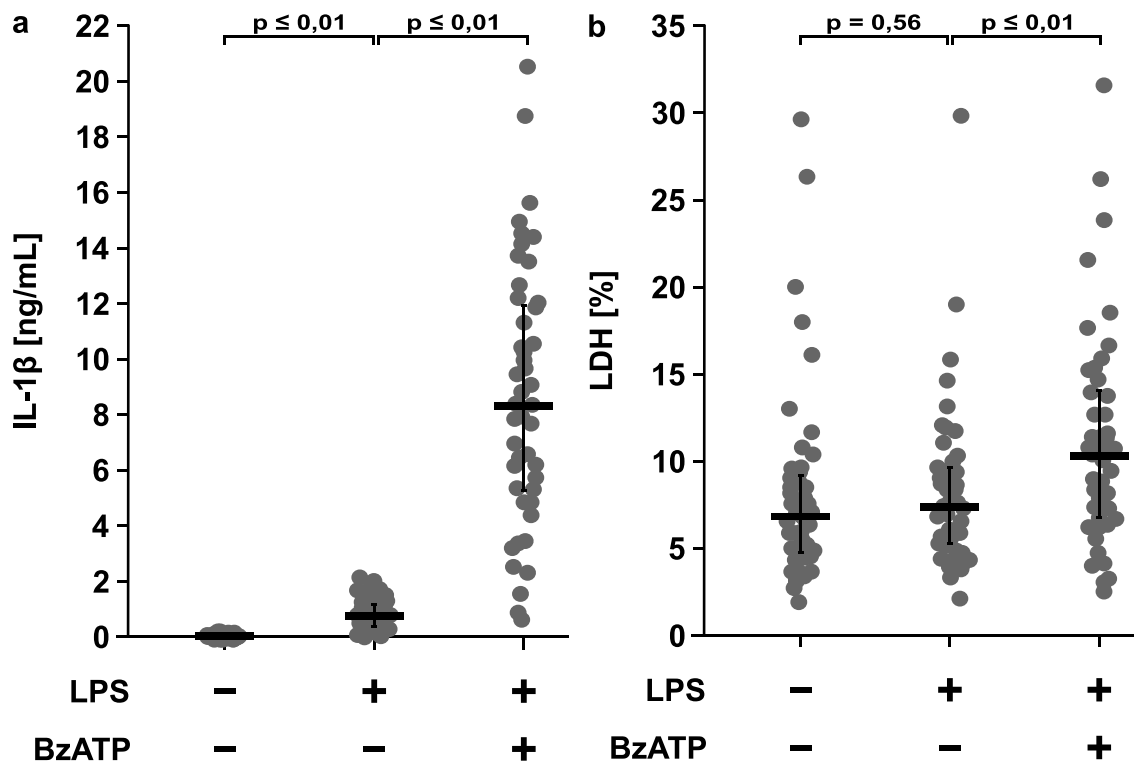


Abbildung 12. Wirkung von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) auf die Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (a) und die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität aus ebendiesen Zellen (b).

Dargestellt sind die Ergebnisse der Experimente aller durchgeführten Blutentnahmen von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde (n = 46). Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Die Einzelwerte sind als graue Punkte dargestellt. Die Mediane sind als schwarze Balken gekennzeichnet, die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75. Die Daten dieser Ergebnisse stammen aus den Experimenten aller Blutentnahmezeitpunkte (erste Blutentnahme vor Beginn der Therapie mit Atorvastatin, n = 18; zweite Blutentnahme nach vierwöchiger täglicher Einnahme von 40 mg Atorvastatin n = 15; dritte Blutentnahme nach sich anschließender vierwöchiger täglicher Einnahme von 40 mg Atorvastatin und 100 mg Acetylsalicylsäure n = 13) und werden bei den entsprechenden Abbildungen wiederholt gezeigt.

- Die Stimulation der angereicherten Monozyten mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) führt zu einer signifikanten Erhöhung der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand. Die Zugabe von BzATP (100 μ M, 30 Minuten) induziert nach Stimulation der Monozyten mit LPS wiederum eine signifikant erhöhte Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand.
- Dargestellt sind die Ergebnisse der Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand der angereicherten Monozyten. Die Ergebnisse wurden in das Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität lysierter Monozyten gesetzt. Die Stimulation der Zellen mit LPS allein führt zu keiner signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität. Bei Zugabe von BzATP zu den mit LPS stimulierten Monozyten kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand.

Zellkulturüberstand der Monozyten lag zwischen 0,66 und 20,61 ng/mL (n = 46; s. Abbildung 12a).

Die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand der Monozyten wurde auf die maximale LDH-Aktivität lysierter Monozyten normalisiert (100%). Der höchste ermittelte Anteil der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand lag bei 31,60%. Für die unbehandelten Monozyten wurde eine LDH-Aktivität zwischen 2,04% und 29,74% berechnet, der Median lag bei 6,87% (n = 46). Die Stimulation der Monozyten mit 5 ng/mL LPS führte zu keiner signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand, der Median lag bei 7,33%. Die zusätzliche Behandlung der Monozyten mit 100 µM BzATP führte zu einer signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. Der Median für diese Stichprobe lag bei 10,24% ($p \leq 0,01$; n = 46; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) (s. Abbildung 12b).

Effekt der medikamentösen Therapie auf die BzATP-vermittelte IL-1 β -Ausschüttung angereicherter Monozyten

Die vierwöchige medikamentöse Therapie mit 40 mg Atorvastatin pro Tag führte zu keiner signifikanten Änderung der Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand der unstimulierten Monozyten ($p = 0,17$; n = 15; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die weitergeführte vierwöchige Behandlung der Patienten mit 40 mg Atorvastatin und 100 mg ASS pro Tag führte ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand dieser Zellen ($p = 0,91$; n = 13; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Die vierwöchige Therapie mit Atorvastatin führte zu keiner signifikanten Veränderung der Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand der Monozyten, die über einen Zeitraum von drei Stunden mit 5 ng/mL LPS vorstimuliert ($p = 0,98$; n = 15; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) oder zusätzlich über 30 Minuten mit 100 µM BzATP behandelt wurden ($p = 0,68$; n = 15; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die sich anschließende vierwöchige Kombinationstherapie mit 40 mg Atorvastatin und 100 mg ASS führte ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung der Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand dieser Monozyten ($p = 0,13$; n = 13; $p = 0,46$, n = 15; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; s. Abbildung 13).

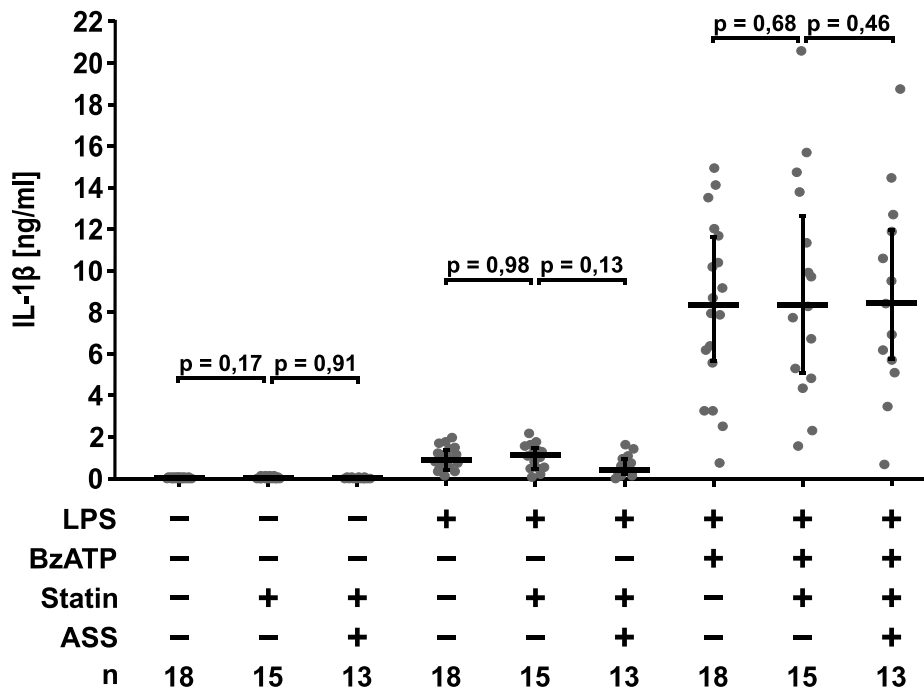


Abbildung 13. Wirkung der medikamentösen Therapie auf die 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP)-vermittelte Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten zu verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Experimente aller durchgeführten Blutentnahmen von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde, zu den unterschiedlichen Blutentnahmezeitpunkten (erste Blutentnahme vor Beginn der Therapie mit Atorvastatin (Statin), n = 18; zweite Blutentnahme nach vierwöchiger täglicher Einnahme von 40 mg Atorvastatin n = 15; dritte Blutentnahme nach sich anschließender vierwöchiger täglicher Einnahme von 40 mg Atorvastatin und 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS), n = 13). Die medikamentöse Therapie mit Atorvastatin allein oder in Kombination mit ASS führt zu keiner signifikanten Änderung der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand angereicherter unstimulierter Monozyten. Auch für die mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) in An- oder Abwesenheit von BzATP (100 μ M, 30 Minuten) stimulierten Monozyten führt diese medikamentöse Therapie zu keiner signifikanten Änderung der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Die Mediane sind als schwarze Balken gekennzeichnet, die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75.

Effekte der nikotinerger Agonisten auf die IL-1 β -Ausschüttung vor Beginn der medikamentösen Therapie

Die zeitgleiche Gabe von 100 μ M ACh und 100 μ M BzATP zu den mit LPS vorstimulierten Monozyten führte zu einer geringeren IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand, verglichen zu den mit LPS und BzATP stimulierten Zellen welche hier als Referenzwert (100%) betrachtet werden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant, der Median lag bei 59,17% ($p \leq 0,01$; n = 18; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relativen Werte lagen zwischen 9,37% und 92,41%. Dieser signifikante Effekt war in unterschiedlicher Ausprägung ebenso nach Zugabe der übrigen nikotinerger Agonisten PC, CRP, Nikotin, GPC und DPPC zu beobachten. Nach Zugabe von 200 μ M PC lag der Median bei 40,17%, dies entspricht

dem stärksten beobachteten Hemmeffekt aller eingesetzten nikotinerger Agonisten ($p \leq 0,01$; $n = 18$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relative IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand lag zwischen 17,29% und 93,11% der Referenzwerte. Für die Zugabe von 5 $\mu\text{g/mL}$ CRP betrug der Median 69,93%, die relativen Einzelwerte lagen zwischen 18,92% und 121,54% ($p \leq 0,01$; $n = 18$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Nach zeitgleicher Zugabe von 100 μM Nikotin und BzATP zu den mit LPS stimulierten Monozyten wurde eine IL-1 β -Ausschüttung zwischen 5,96% und 100,54% beobachtet. Der Median lag bei 57,88% ($p \leq 0,01$; $n = 18$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Nach Zugabe von 100 μM GPC lag der Median bei 48,74%. Die relative Konzentration von IL-1 β lag zwischen 11,65% und 101,89%. Die geringste Hemmung der IL-1 β -Ausschüttung wurde nach Zugabe von 100 μM DPPC beobachtet.

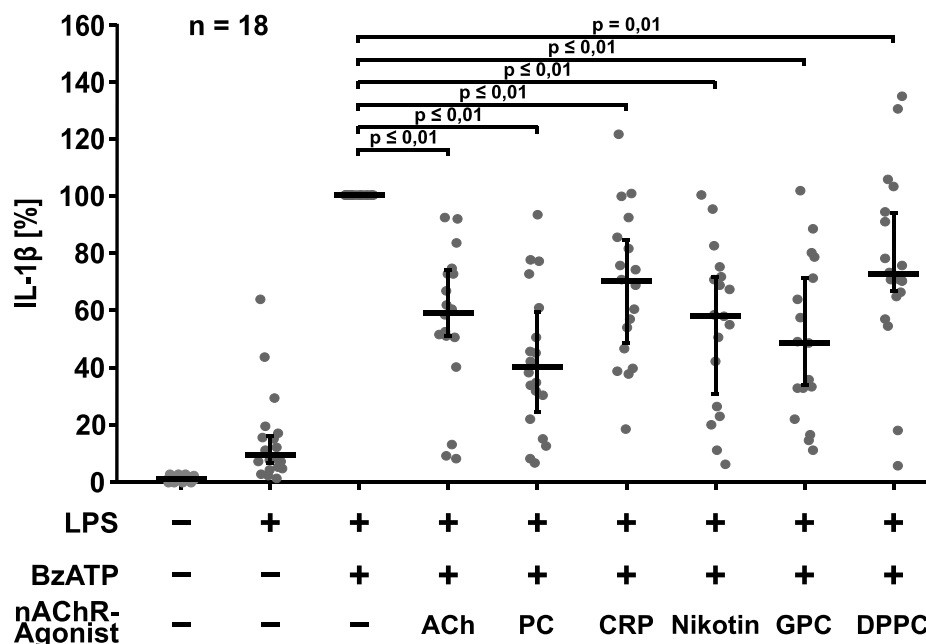


Abbildung 14. Effekt verschiedener nikotinerger Agonisten auf die 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP)-vermittelte Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 1).

Dargestellt sind die Ergebnisse der Experimente der ersten Blutentnahme von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde, zum Zeitpunkt vor Beginn der Statintherapie. BzATP (100 μM , 30 Minuten) induziert nach Stimulation der angereicherten Monozyten mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL , 3 Stunden) eine erhöhte Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand. Die Zugabe der nikotinerger Agonisten Acetylcholin (ACh, 100 μM), Phosphocholin (PC, 200 μM), C-reaktives Protein (CRP, 5 $\mu\text{g/mL}$), Nikotin (100 μM), Glycerophosphocholin (GPC, 100 μM) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, 100 μM) führt zu einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. $n = 18$. Die Konzentration von IL-1 β im Zellkulturüberstand der Zellen, die ausschließlich mit LPS und BzATP behandelt wurden, wurden als Referenzwerte mit 100% dargestellt. Die restlichen Ansätze wurden auf diese Werte bezogen. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt. Die Mediane sind als schwarze Balken gekennzeichnet, die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75.

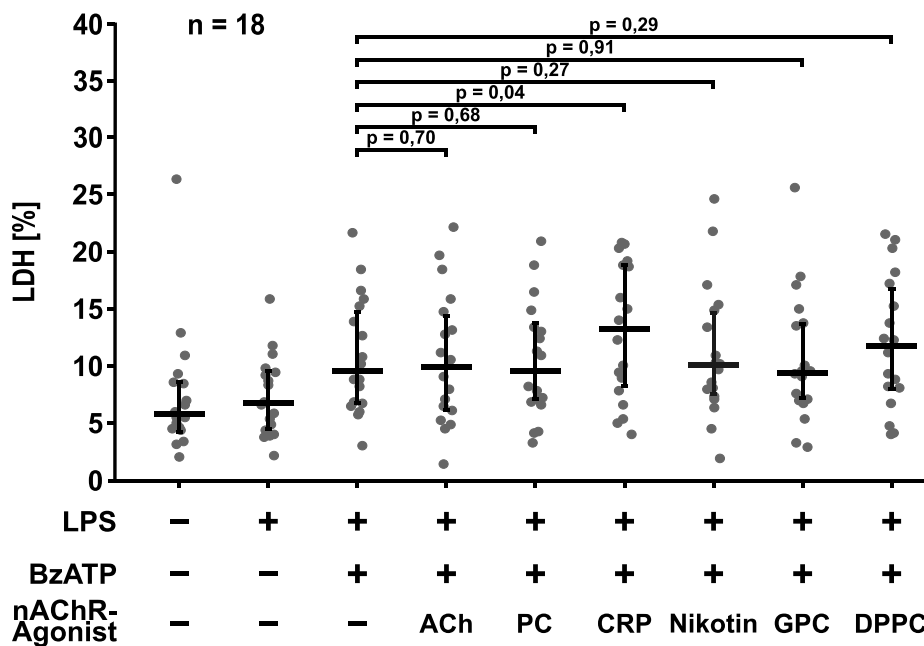


Abbildung 15. Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 1).

Dargestellt sind die Ergebnisse der Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde. Die Monozyten wurden mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) vorstimuliert und anschließend mit 100 µM 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 30 Minuten) in An- oder Abwesenheit der nikotinergeren Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Agonisten Acetylcholin (ACh, 100 µM), Phosphocholin (PC, 200 µM), C-reaktives Protein (CRP 5 µg/mL), Nikotin (100 µM), Glycerophosphocholin (GPC, 100 µM) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, 100 µM) behandelt. Die Ergebnisse wurden in das Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität lysierter Monozyten gesetzt. Es kommt ausschließlich bei den mit CRP behandelten Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. n = 18. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt. Die Mediane sind als schwarze Balken gekennzeichnet, die Antennen stellen die Perzentilen 25 und 75 dar.

Der Median lag bei 72,45%, die relativen Einzelwerte zwischen 19,02% und 129,85% (p = 0,01; n = 18; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) (s. Abbildung 14).

Die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand der Monozyten wurde auf die maximale LDH-Aktivität lysierter Monozyten normalisiert (100%). Der höchste ermittelte Anteil der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand lag bei 26,46%. Insgesamt zeigten sich mit Ausnahme der mit CRP behandelten Monozyten keine signifikanten Unterschiede zwischen den eingesetzten nikotinergeren Agonisten. Die Mediane variierten zwischen 9,83% und 11,71%. Für die mit CRP behandelten Monozyten lag der Median bei 12,45%, die LDH-Aktivität lag zwischen 4,04% und 21,84%. Im Vergleich zu den mit LPS und BzATP behandelten Monozyten zeigte sich eine signifikant leicht erhöhte LDH-Aktivität (p =

0,04; n = 18; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) (s. Abbildung 15).

Effekte der nikotinerger Agonisten auf die IL-1 β -Ausschüttung nach vierwöchiger Statineinnahme

Die zeitgleiche Gabe von 100 μ M ACh und 100 μ M BzATP zu den mit LPS vorstimulierten Monozyten führte zu einer geringeren IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand, verglichen zu den mit LPS und BzATP stimulierten Zellen, welche hier als Referenzwert (100%) betrachtet werden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant, der Median lag bei 55,17% ($p \leq 0,01$; n = 15; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relativen Werte lagen im Bereich von 19,42% bis

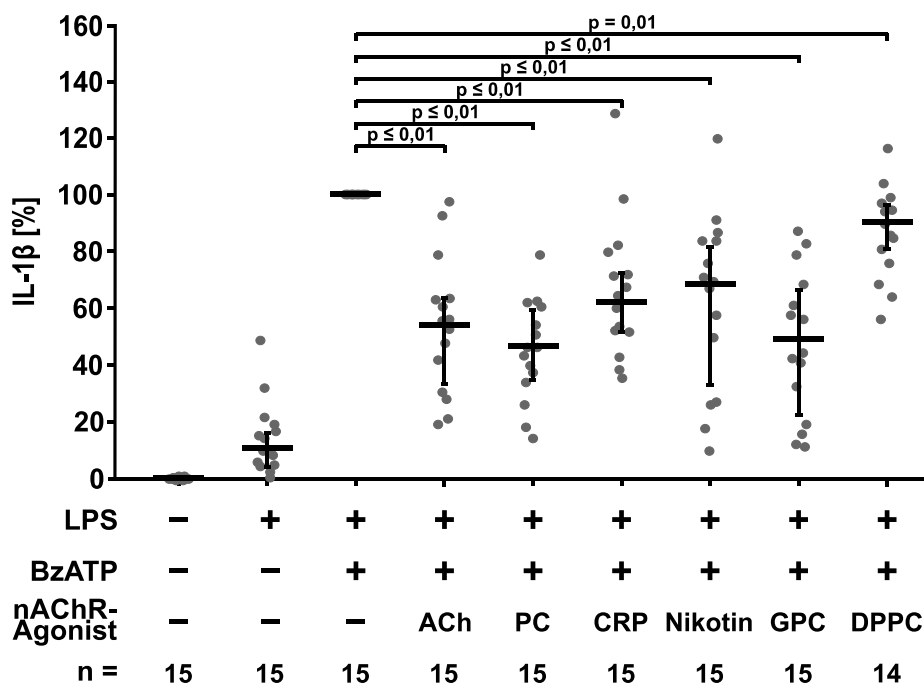


Abbildung 16. Effekt verschiedener nikotinerger Agonisten auf die 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP)-vermittelte Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 2).

Dargestellt sind die Ergebnisse der Experimente der zweiten Blutentnahme von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde, zum Zeitpunkt nach vierwöchiger täglicher Statintherapie (40 mg). BzATP (100 μ M, 30 Minuten) induziert nach Stimulation angereicherter Monozyten mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) eine erhöhte Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand. Die Zugabe der nikotinerger Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Agonisten Acetylcholin (ACh, 100 μ M, n = 15), Phosphocholin (PC, 200 μ M, n = 15), C-reaktives Protein (CRP 5 μ g/mL, n = 15), Nikotin (100 μ M, n = 15), Glycerophosphocholin (GPC, 100 μ M, n = 15) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, 100 μ M, n = 14) führt zu einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Die Konzentration von IL-1 β im Zellkulturüberstand der Zellen, die ausschließlich mit LPS und BzATP behandelt wurden, wurden als Referenzwerte mit 100% dargestellt. Die restlichen Ansätze wurden auf diese Werte bezogen. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt. Die Mediane sind als schwarze Balken gekennzeichnet, die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75.

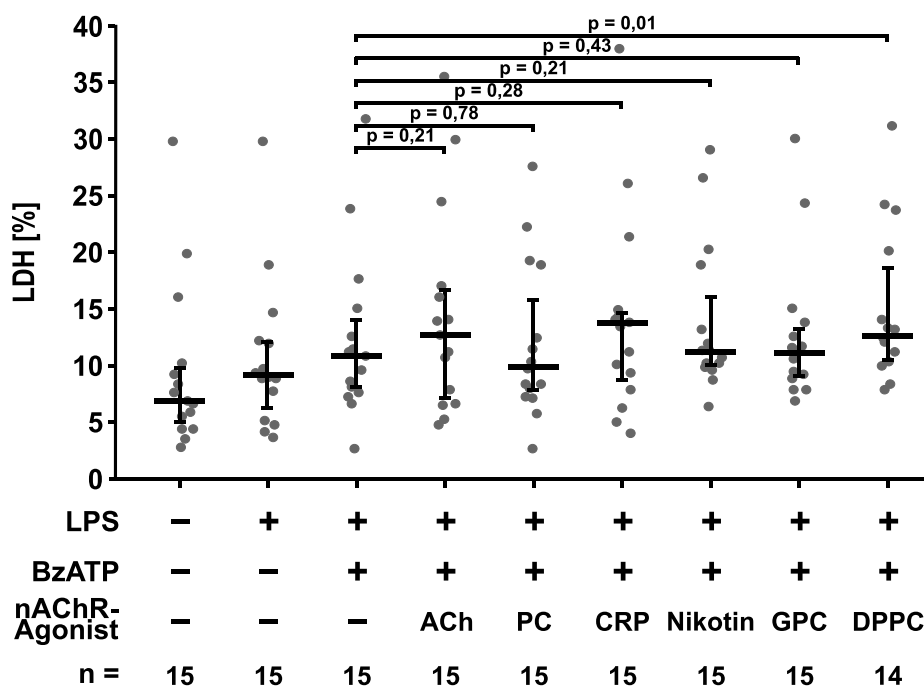


Abbildung 17. Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 2).

Dargestellt sind die Ergebnisse der Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde. Die Monozyten wurden mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) vorstimuliert und anschließend mit 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 µM, 30 Minuten) in An- oder Abwesenheit der nikotinergeren Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Agonisten Acetylcholin (ACh, 100 µM, n = 15), Phosphocholin (PC, 200 µM, n = 15), C-reaktives Protein (CRP 5 µg/mL, n = 15), Nikotin (100 µM, n = 15), Glycerophosphocholin (GPC, 100 µM, n = 15) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, 100 µM n = 14) behandelt. Die Ergebnisse wurden in das Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität lysierter Monozyten gesetzt. Es kommt ausschließlich bei den mit DPPC behandelten Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität. Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt. Die Mediane sind als schwarze Balken gekennzeichnet, die Antennen stellen die Perzentilen 25 und 75 dar.

97,49%. Dieser signifikante Effekt war in unterschiedlicher Ausprägung ebenso nach Zugabe der übrigen nikotinergeren Agonisten PC, CRP, Nikotin, GPC und DPPC zu beobachten. Nach Zugabe von 200 µM PC lag der Median bei 46,67%, dies entspricht dem stärksten beobachteten Hemmeffekt der eingesetzten nikotinergeren Agonisten ($p \leq 0,01$; n = 15; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relative IL-1β-Konzentration im Zellkulturüberstand lag zwischen 14,09% und 78,81% der Referenzwerte.

Für die Zugabe von 5 µg/mL CRP lag der Median bei 63,92% ($p \leq 0,01$; n = 15; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relativen Einzelwerte lagen zwischen 35,55% und 131,63%. Nach zeitgleicher Zugabe von 100 µM Nikotin und BzATP zu den mit LPS stimulierten Monozyten wurde eine IL-1β-Ausschüttung zwischen

9,92% und 119,13% berechnet. Der Median lag bei 69,32% ($p \leq 0,01$; $n = 15$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Nach der Zugabe von 100 μM GPC lag der Median bei 43,99% ($p \leq 0,01$; $n = 15$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relative Ausschüttung von IL-1 β lag zwischen 11,35% und 87,19% des Referenzwertes. Die niedrigste Hemmung der IL-1 β -Ausschüttung wurde nach Zugabe von 100 μM DPPC beobachtet. Der Median lag bei 88,06%. Die relativen Einzelwerte befanden sich im Bereich zwischen 55,84% und 116,40% ($p = 0,01$; $n = 14$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) (s. Abbildung 16).

Der prozentuale Anteil der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand der Monozyten wurde auf die maximale Ausschüttung der LDH-Aktivität lysierter Monozyten normalisiert (100%). Die maximale LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand lag bei 38,01%. Insgesamt zeigten sich mit Ausnahme der mit DPPC behandelten Monozyten keine signifikanten Unterschiede der LDH-Aktivität zwischen den eingesetzten nikotineren Agonisten. Die Mediane variierten zwischen 9,94% und 13,73%. Für die mit DPPC behandelten Monozyten lag der Median bei 12,73%, die ermittelte LDH-Aktivität lag zwischen 7,91% und 31,23%. Im Vergleich zu den mit LPS und BzATP behandelten Monozyten zeigte sich eine signifikant leicht erhöhte LDH-Aktivität ($p = 0,01$; $n = 14$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) (s. Abbildung 17).

Effekte der nikotineren Agonisten auf die IL-1 β -Ausschüttung nach vierwöchiger Statin- gefolgt von vierwöchiger Statin- und ASS-Einnahme

Die zeitgleiche Gabe von 100 μM ACh und 100 μM BzATP zu den mit LPS vorstimulierten Monozyten führte zu einer geringeren IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand, verglichen mit den mit LPS und BzATP stimulierten Zellen, welche hier als Referenzwert (100%) betrachtet werden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant, der Median lag bei 41,15% der Referenzausschüttung ($p \leq 0,01$; $n = 13$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relativen Werte lagen im Bereich von 8,28% bis 90,51%. Dieser signifikante Effekt war in unterschiedlicher Ausprägung ebenso bei Zugabe der übrigen nikotineren Agonisten PC, CRP, Nikotin, GPC und DPPC zu beobachten. Nach Zugabe von 200 μM PC lag der Median bei 35,14%, dies entspricht dem stärksten beobachteten Hemmeffekt der eingesetzten nikotineren Agonisten ($p \leq 0,01$; $n = 13$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relative IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand lag zwischen 5,29% und 86,38% der Referenzwerte. Für die Zugabe von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CRP lag der Median bei 80,64% ($p \leq 0,01$; $n = 13$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relativen Einzelwerte lagen zwischen 27,23% und 121,54%.

Nach zeitgleicher Zugabe von 100 μM Nikotin und BzATP zu den mit LPS stimulierten Monozyten wurde eine IL-1 β -Ausschüttung zwischen 5,96% und 92,84% der Referenzausschüttung beobachtet. Der Median lag bei 70,14% ($p \leq 0,01$; $n = 13$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Nach der Zugabe von 100 μM GPC lag der Median bei 40,94% ($p \leq 0,01$; $n = 13$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relative Ausschüttung von IL-1 β lag zwischen 11,65% und 95,84% des Referenzwertes. Die niedrigste Hemmung der IL-1 β -Ausschüttung wurde wie bei den Ergebnissen der vorherigen Blutentnahmen nach Zugabe von 100 μM DPPC beobachtet. Der Median lag bei 86,07% ($p = 0,01$; $n = 13$; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Die relativen Einzelwerte lagen im Bereich zwischen 56,59% und 118,88% (s. Abbildung 18).

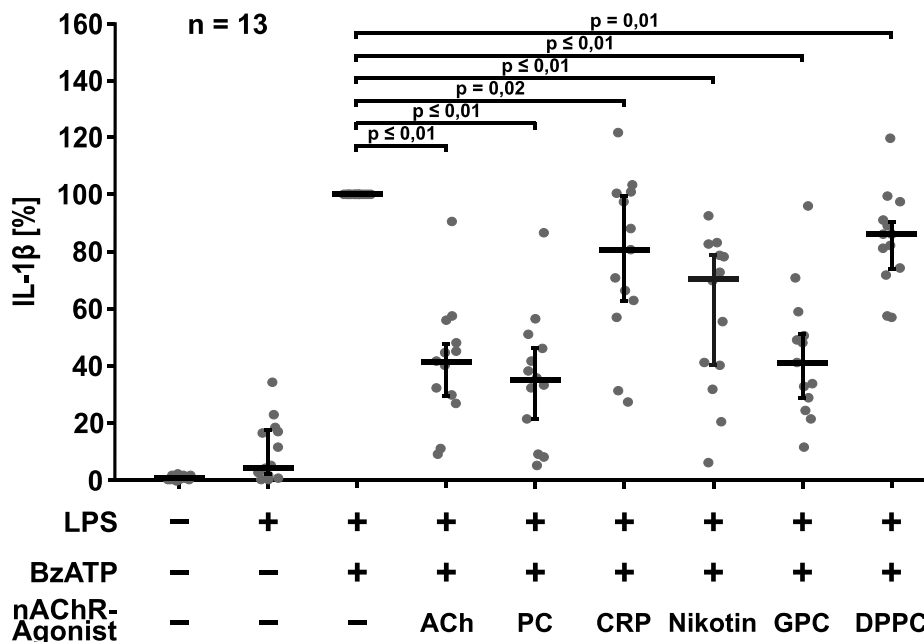


Abbildung 18. Effekt verschiedener nikotinerger Agonisten auf die 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP)-vermittelte Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 3).

Dargestellt sind die Ergebnisse der Experimente der dritten Blutentnahme von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde, zum Zeitpunkt nach vierwöchiger täglicher Statineinnahme (40 mg) gefolgt von vierwöchiger täglicher Statin- und Acetylsalicylsäure-Einnahme (40 mg, 100 mg). BzATP (100 μM , 30 Minuten) induziert nach Stimulation der Monozyten mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) eine erhöhte Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand. Die Zugabe der nikotinerger Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Agonisten Acetylcholin (ACh, 100 μM), Phosphocholin (PC, 200 μM), C-reaktives Protein (CRP, 5 $\mu\text{g/mL}$), Nikotin (100 μM), Glycerophosphocholin (GPC, 100 μM) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, 100 μM) führt zu einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. $n = 13$. Die Konzentration von IL-1 β im Zellkulturüberstand der Zellen, die ausschließlich mit LPS und BzATP behandelt wurden, wurden als Referenzwerte mit 100% dargestellt. Die restlichen Ansätze wurden auf diese Werte bezogen. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt. Die Mediane sind als schwarze Balken gekennzeichnet, die Antennen entsprechen den Perzentilen 25 und 75.

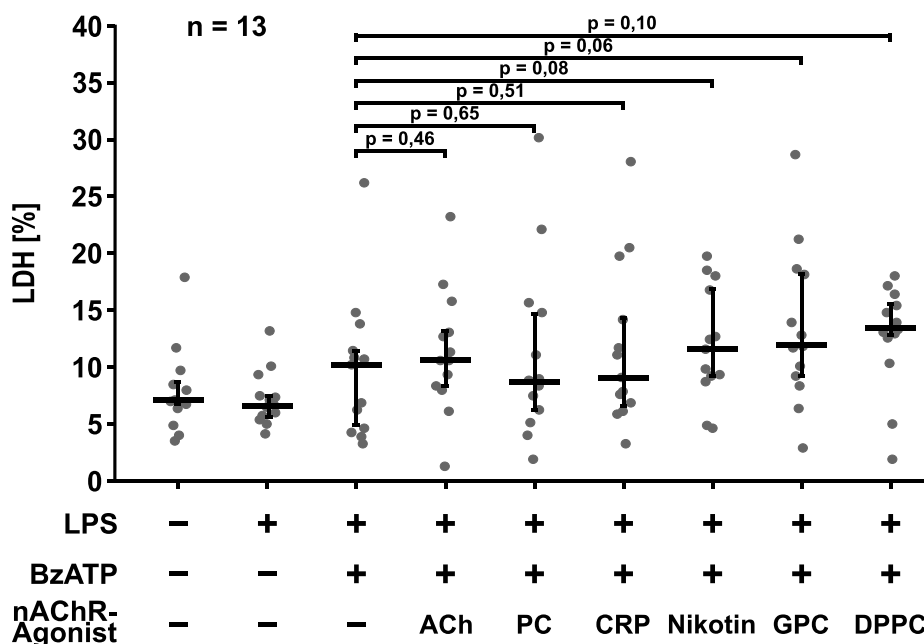


Abbildung 19. Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 3).

Dargestellt sind die Ergebnisse der Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde. Die Monozyten wurden mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) vorstimuliert und anschließend mit 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 µM, 30 Minuten) in An- oder Abwesenheit der nikotinergeren Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Agonisten Acetylcholin (ACh, 100 µM), Phosphocholin (PC, 200 µM), C-reaktives Protein (CRP 5 µg/mL), Nikotin (100 µM), Glycerophosphocholin (GPC, 100 µM) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, 100 µM) behandelt. Die Ergebnisse wurden in das Verhältnis zur maximalen LDH-Aktivität lysierter Monozyten gesetzt. Es kommt zu keiner signifikanten Änderung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. n = 13. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt. Die Mediane sind als schwarze Balken gekennzeichnet, die Antennen stellen die Perzentilen 25 und 75 dar.

Der prozentuale Anteil der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand der Monozyten wurde auf die maximale LDH-Aktivität lysierter Monozyten normalisiert (100%). Die maximale LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand lag bei 30,45%. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der LDH-Aktivität zwischen den eingesetzten nikotinergeren Agonisten. Die Mediane variierten zwischen 8,76% und 13,43% (s. Abbildung 19).

Effekte der medikamentösen Therapie auf die Inhibition der BzATP-abhängigen IL-1β-Ausschüttung durch nikotinergeren Agonisten

Acetylcholin

Im Zellkulturüberstand der mit 5 ng/mL LPS stimulierten und mit 100 µM BzATP und 100 µM ACh behandelten Monozyten wurde die Ausschüttung von IL-1β gemessen und auf die IL-1β-Ausschüttung der mit LPS und BzATP stimulierten Zellen normalisiert, welche hier als Referenzwert (100%) betrachtet werden. Die relativen Konzentrationen von IL-

IL-1 β im Zellkulturüberstand der Monozyten lagen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zwischen 7,99% und 92,41%, der Median lag bei 63,21% (n = 14). Die Zugabe von ACh führte in jedem der Experimente zu einer Inhibition der Ausschüttung von IL-1 β . Die

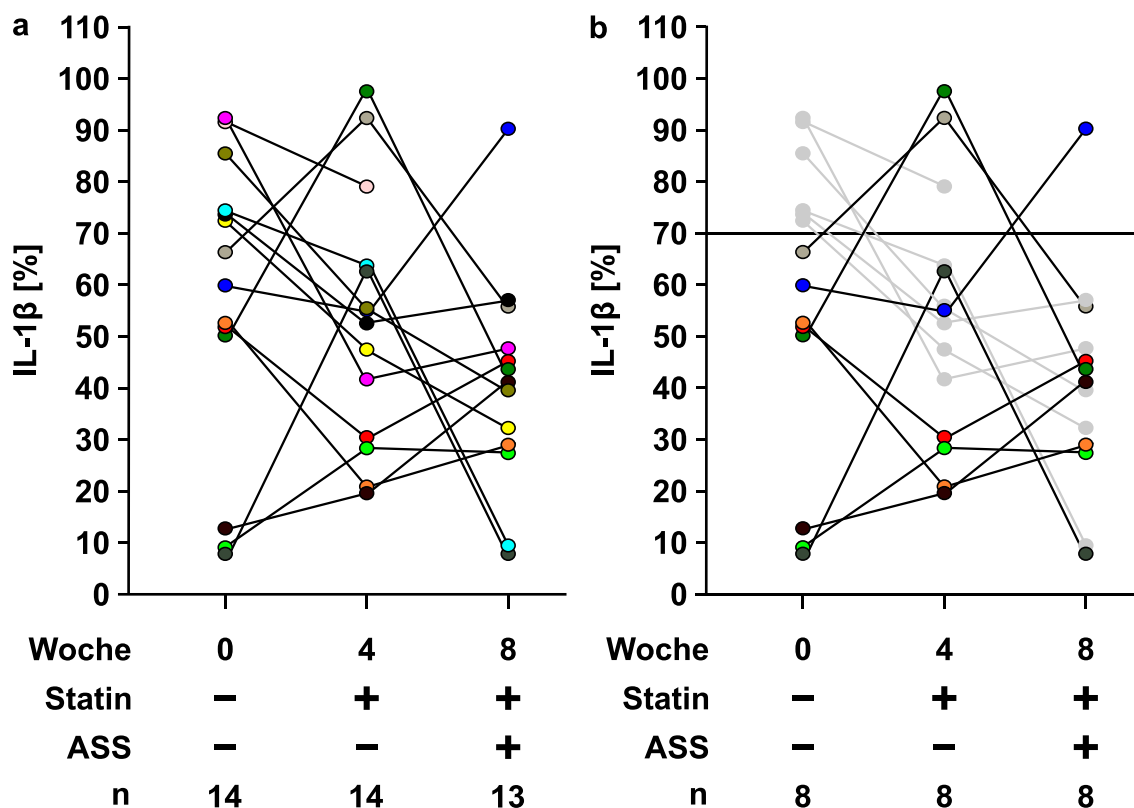


Abbildung 20. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch den nikotineren Agonisten Acetylcholin (ACh) im Verlauf der medikamentösen Therapie.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde, nach Zugabe des nikotineren Agonisten ACh im Verlauf der medikamentösen Therapie. Die angereicherten Monozyten wurden zunächst mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) stimuliert, bevor durch die Zugabe von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M, 30 Minuten) in An- oder Abwesenheit des nikotineren Agonisten ACh (100 μ M) die Ausschüttung von IL-1 β angeregt wurde. Die Ergebnisse der Experimente in Anwesenheit von ACh wurden auf die Referenzausschüttung von IL-1 β in Abwesenheit von ACh bezogen. Die Einzelwerte sind als gefärbte Punkte dargestellt. Jedem Patienten wurde eine Farbe zugeordnet. Die abhängigen Werte wurden zur besseren Übersicht mit einem schwarzen Strich verbunden. Statistische Datenauswertung mittels Friedman-Test.

- Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin (Statin) über einen Zeitraum von vier Wochen führt zu keiner signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von ACh auf die Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (n = 14). Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen führt ebenfalls nicht zu einer signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von ACh auf die Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand (n = 13).
- Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition zeigen (Ausschüttung von IL-1 β \geq 70% der Referenzausschüttung), ist ebenfalls keine signifikante Änderung des inhibitorischen Effekts von ACh zu beobachten (n = 8). Die ausgeschlossenen Datenpunkte sind grau eingefärbt.

tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin führte zu keiner signifikanten Veränderung der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand der angereicherten Monozyten in Anwesenheit von ACh (n = 14; Friedman-Test ergab einen p-Wert > 0,5, somit wurde der sich anschließende Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur paarweisen Überprüfung der Stichproben nicht durchgeführt). Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme lagen die relativen Werte zwischen 19,42% und 97,49%, der Median lag bei 54,12% (n = 14). Die anschließende vierwöchige Behandlung mit 40 mg Atorvastatin und 100 mg ASS pro Tag führte ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung der Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand der Monozyten in Anwesenheit von ACh (n = 13; Friedman-Test). Zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme lagen die Konzentrationen von IL-1 β im Bereich von 8,28% bis 90,51% der Referenzausschüttung, der Median lag bei 41,15% (n = 13; s. Abbildung 20a).

Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch die Zugabe von ACh zeigten (IL-1 β -Ausschüttung \geq 70% der Referenzwerte), war ebenfalls keine signifikante Veränderung der Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand der Monozyten durch ACh zu beobachten (n = 8; Friedman-Test). Vor Beginn der Therapie lag der Median bei 51,11%, nach vierwöchiger Statintherapie bei 42,77% und nach achtwöchiger medikamentöser Therapie bei 42,44% der Referenzausschüttung (s. Abbildung 20b).

Phosphocholin

Im Zellkulturüberstand der über einen Zeitraum von drei Stunden mit 5 ng/mL LPS stimulierten und anschließend zeitgleich mit 100 μ M BzATP und 200 μ M PC behandelten Monozyten wurde die Ausschüttung von IL-1 β gemessen und auf die IL-1 β -Ausschüttung der mit LPS und BzATP stimulierten Zellen normalisiert, welche hier als Referenzwert (100%) betrachtet werden. Die relativen Konzentrationen von IL-1 β im Zellkulturüberstand der Monozyten in Anwesenheit von PC lagen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zwischen 7,29% und 93,11%, der Median lag bei 41,43% (n = 14). In jedem Experiment führte die Anwesenheit von PC zu einer Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand. Die medikamentöse Therapie führte analog zu den Ergebnissen in Anwesenheit von ACh zu keiner signifikanten Veränderung der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand der angereicherten Monozyten in Anwesenheit von PC (n = 14 bzw. n = 13; Friedman-Test ergab einen p-Wert > 0,5, somit wurde der sich anschließende Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur paarweisen Überprüfung der Stichproben nicht durchgeführt). Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme lagen die relativen Werte zwischen 14,09% und 78,81% der Referenzausschüttung, der Median lag bei 46,75% (n = 14). Zum Zeitpunkt der dritten

Blutentnahme lagen die relativen IL-1 β -Konzentrationen im Bereich von 5,29% bis 86,38% der Referenzausschüttung. Der Median lag bei 35,14% (n = 13; s. Abb 21a).

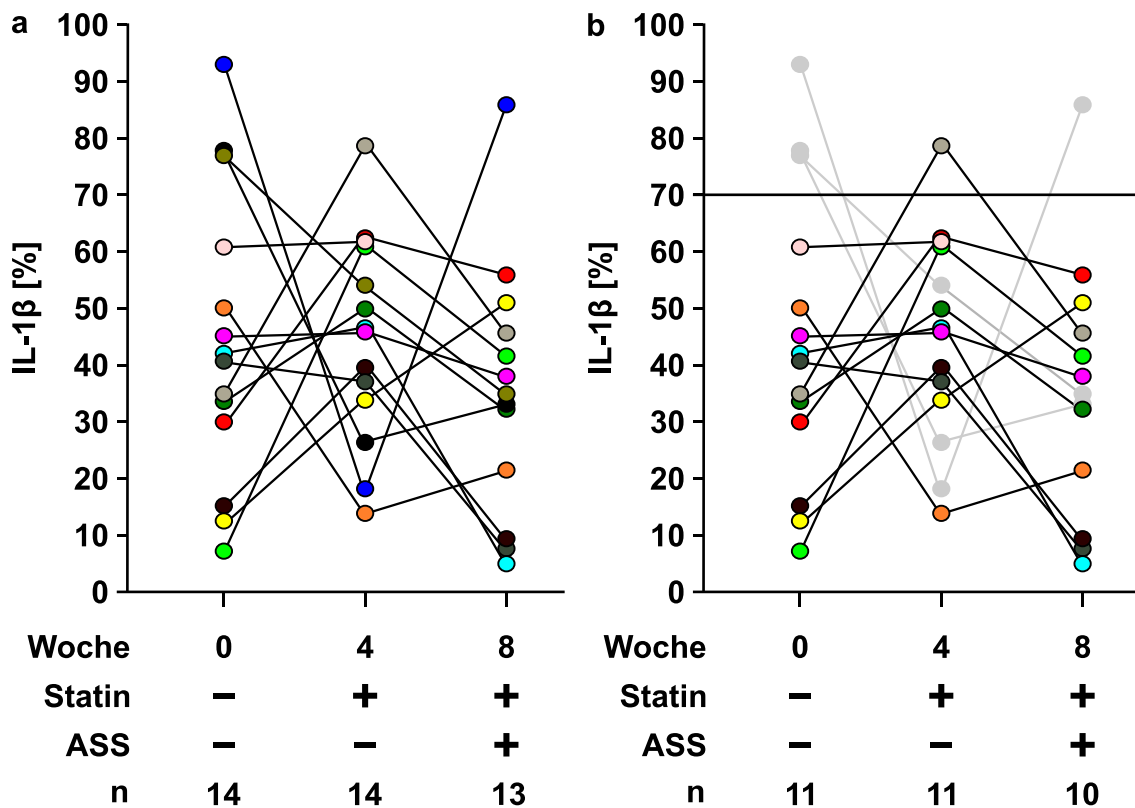


Abbildung 21. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch den nikotineren Agonisten Phosphocholin (PC) im Verlauf der medikamentösen Therapie.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde, nach Zugabe des nikotineren Agonisten PC im Verlauf der medikamentösen Therapie. Die angereicherten Monozyten wurden zunächst mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) stimuliert, bevor durch die Zugabe von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M, 30 Minuten) in An- oder Abwesenheit des nikotineren Agonisten PC (200 μ M) die Ausschüttung von IL-1 β angeregt wurde. Die Ergebnisse der Experimente in Anwesenheit von PC wurden auf die Referenzausschüttung von IL-1 β in Abwesenheit von PC bezogen. Die Einzelwerte sind als gefärbte Punkte dargestellt. Jedem Patienten wurde eine Farbe zugeordnet. Die abhängigen Werte wurden zur besseren Übersicht mit einem schwarzen Strich verbunden. Statistische Datenauswertung mittels Friedman-Test.

- Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin (Statin) über einen Zeitraum von vier Wochen führt zu keiner signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von PC auf die Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (n = 14). Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen führt ebenfalls nicht zu einer signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von PC auf die Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand (n = 13).
- Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition zeigen (Ausschüttung von IL-1 β \geq 70% der Referenzausschüttung), zeigt sich keine signifikante Änderung des inhibitorischen Effekts durch die Anwesenheit von PC (n = 10). Die ausgeschlossenen Datenpunkte sind grau eingefärbt.

Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch die Zugabe von PC zeigten (IL-1 β -Ausschüttung \geq 70% der Referenzwerte), zeigte sich keine signifikante Veränderung der Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand der Monozyten durch PC (n = 10; Friedman-Test). Vor Beginn der Therapie lag der Median bei 34,87%, nach vierwöchiger Statintherapie bei 46,83% und nach achtwöchiger medikamentöser Therapie bei 35,43% der Referenzausschüttung (s. Abbildung 21b).

C-reaktives Protein

Im Zellkulturüberstand der über einen Zeitraum von drei Stunden mit 5 ng/mL LPS stimulierten und anschließend zeitgleich mit 100 μ M BzATP und 5 μ g/mL CRP behandelten Monozyten wurde die Ausschüttung von IL-1 β gemessen und auf die IL-1 β -Ausschüttung der mit LPS und BzATP stimulierten Zellen normalisiert, welche an dieser Stelle als Referenzwert (100%) betrachtet werden. Die relativen Konzentrationen von IL-1 β im Zellkulturüberstand der angereicherten Monozyten lagen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zwischen 18,92% und 99,86%, der Median lag bei 57,32% (n = 14). Die Anwesenheit von CRP führte in jedem Experiment zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Inhibition der Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand. Die medikamentöse Therapie führte zu keiner signifikanten Veränderung der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand der angereicherten Monozyten in Anwesenheit von CRP (n = 14 bzw. n = 13; Friedman-Test ergab einen p-Wert $>$ 0,5, somit wurde der sich anschließende Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur paarweisen Überprüfung der Stichproben nicht durchgeführt). Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme lagen die relativen Werte zwischen 35,55% und 131,63%, der Median lag bei 62,16% (n = 14). Zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme lagen die relativen IL-1 β -Konzentrationen im Bereich von 27,23% bis 121,54% der Referenzausschüttung, der Median lag bei 80,64% (n = 13; s. Abbildung 22a).

Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung nach der Zugabe von CRP zeigten (IL-1 β -Ausschüttung \geq 70% der Referenzwerte), zeigte sich keine signifikante Veränderung der Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand der Monozyten durch CRP nach vierwöchiger Statintherapie (p = 0,31; n = 9; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Nach fortgeführter kombinierter Therapie mit Atorvastatin und ASS über einen Zeitraum von vier Wochen zeigte sich eine signifikante Verringerung des inhibitorischen Effekts durch CRP (p = 0,04; n = 9; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Vor Beginn der Therapie lag der Median bei 46,41%,

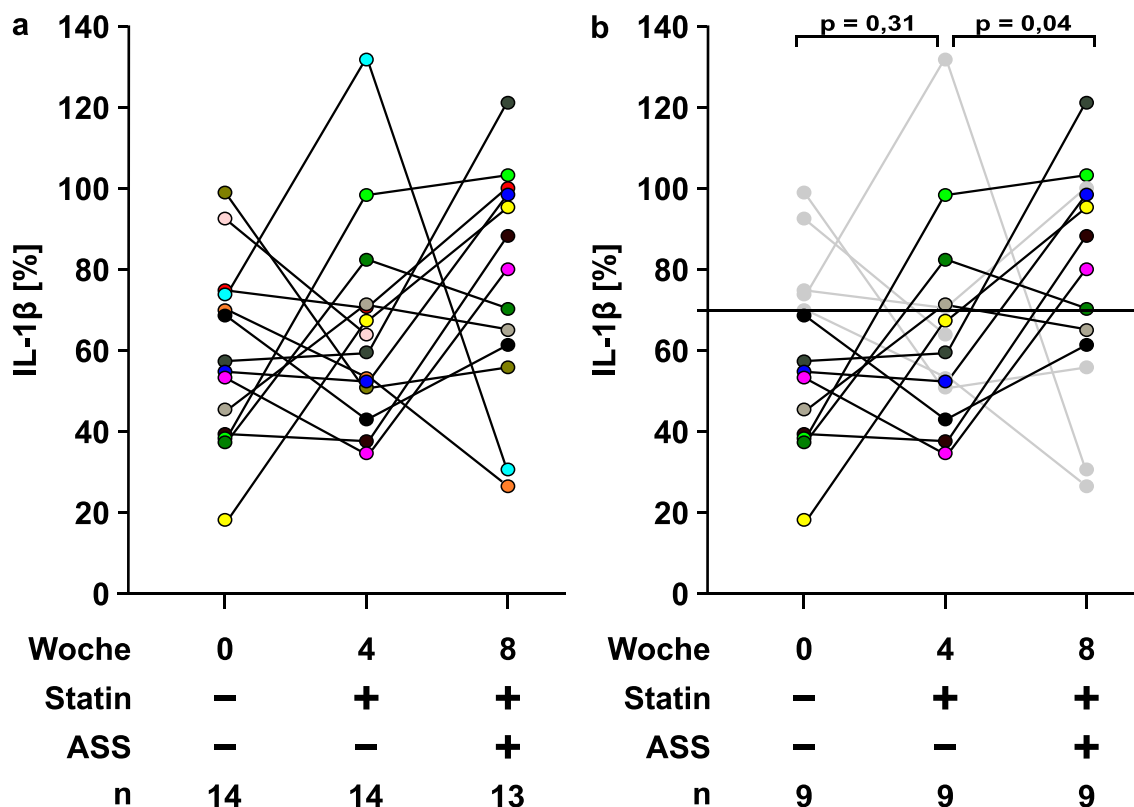


Abbildung 22. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1β (IL-1β) durch den nikotineren Agonisten C-reaktives Protein (CRP) im Verlauf der medikamentösen Therapie.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Ausschüttung von IL-1β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde, nach Zugabe des nikotineren Agonisten CRP im Verlauf der medikamentösen Therapie. Die angereicherten Monozyten wurden zunächst mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) stimuliert, bevor durch die Zugabe von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μM, 30 Minuten) in An- oder Abwesenheit des nikotineren Agonisten CRP (5 μg/mL) die Ausschüttung von IL-1β angeregt wurde. Die Ergebnisse der Experimente in Anwesenheit von CRP wurden auf die Referenzausschüttung von IL-1β in Abwesenheit von CRP bezogen. Die Einzelwerte sind als gefärbte Punkte dargestellt. Jedem Patienten wurde eine Farbe zugeordnet. Die abhängigen Werte wurden zur besseren Übersicht mit einem schwarzen Strich verbunden.

- Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin (Statin) über einen Zeitraum von vier Wochen führt zu keiner signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von CRP auf die Ausschüttung von IL-1β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (n = 14). Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen führt ebenfalls nicht zu einer signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von CRP auf die Ausschüttung von IL-1β in den Zellkulturüberstand (n = 13). Statistische Datenauswertung mittels Friedman-Test.
- Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition zeigen (Ausschüttung von IL-1β ≥ 70% der Referenzausschüttung), zeigt sich keine signifikante Änderung der inhibitorischen Wirkung durch CRP nach vierwöchiger täglicher Therapie mit Atorvastatin (n = 9). Nach der sich anschließenden vierwöchigen täglichen Einnahme von ASS und Atorvastatin zeigt sich eine signifikante Verringerung des inhibitorischen Effekts von CRP auf die IL-1β-Ausschüttung im Vergleich zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme (n = 9). Die ausgeschlossenen Datenpunkte sind grau eingefärbt. Statistische Datenauswertung mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

nach vierwöchiger Statintherapie bei 60,40% und nach achtwöchiger medikamentöser Therapie bei 88,31% der Referenzausschüttung (s. Abbildung 22b).

Nikotin

Im Zellkulturüberstand der über einen Zeitraum von drei Stunden mit 5 ng/mL LPS stimulierten und zeitgleich mit 100 μ M BzATP und 100 μ M Nikotin behandelten Monozyten wurde die Ausschüttung von IL-1 β gemessen und auf die IL-1 β -Ausschüttung der mit LPS und BzATP stimulierten Zellen bezogen, welche hier als Referenzwert (100%) betrachtet werden. Die relativen Konzentrationen von IL-1 β im Zellkulturüberstand der Monozyten lagen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zwischen 10,02% und 100,54%, der Median lag bei 62,50% (n = 14).

Die Anwesenheit von Nikotin führt mit der Ausnahme eines Experiments stets zu einer Inhibition der Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand. Die medikamentöse Therapie führte analog zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen zu keiner signifikanten Veränderung der Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand durch Nikotin (n = 14 bzw. n = 13; Friedman-Test ergab einen p-Wert > 0,5, somit wurde der sich anschließende Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur paarweisen Überprüfung der Stichproben nicht durchgeführt).

Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme lagen die relativen IL-1 β -Werte zwischen 9,92% und 91,06%, der Median lag bei 68,40%. Zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme lagen die relativen IL-1 β -Konzentrationen im Bereich von 5,96% bis 92,51% der Referenzausschüttung, der Median lag bei 70,14% (n = 13; s. Abbildung 23a).

Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch die Zugabe von Nikotin zeigten (IL-1 β -Ausschüttung \geq 70% der Referenzwerte), war ebenfalls keine signifikante Veränderung der Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand der Monozyten durch Nikotin zu beobachten (n = 8; Friedman-Test). Vor Beginn der Therapie lag der Median bei 34,28%, nach vierwöchiger Statintherapie bei 58,79% und nach achtwöchiger medikamentöser Therapie bei 63,47% der Referenzausschüttung (s. Abbildung 23b).

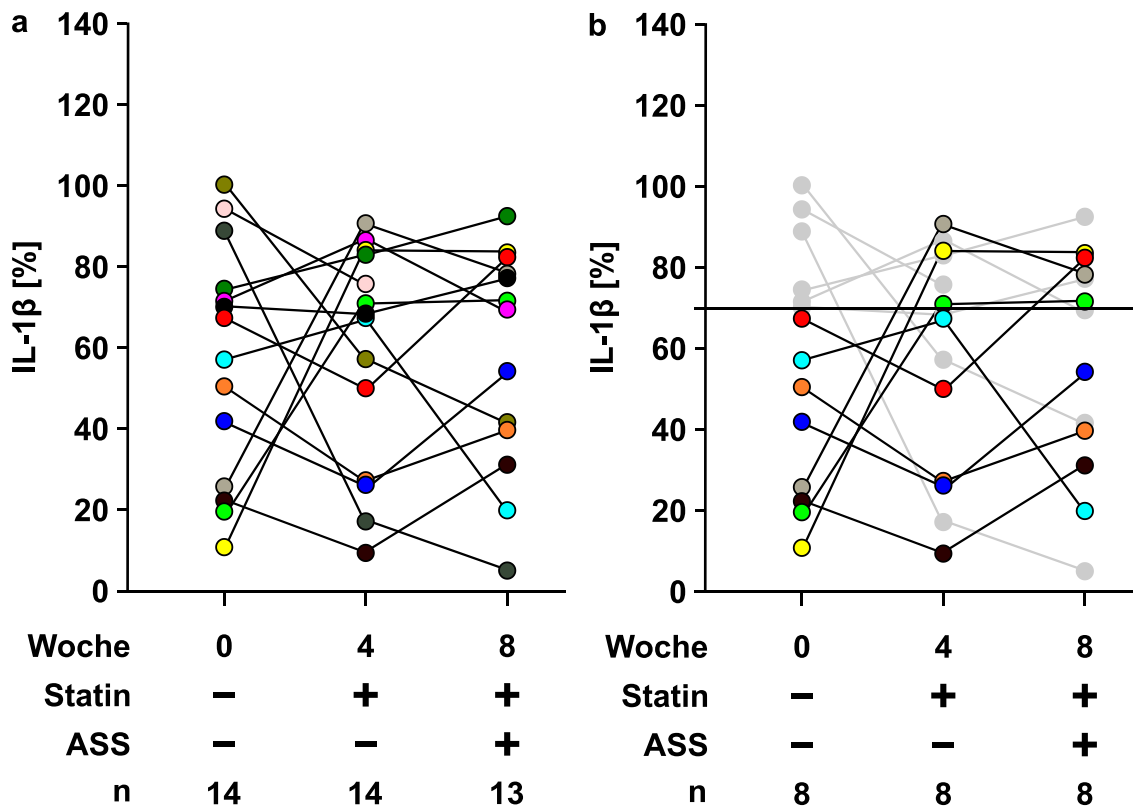


Abbildung 23. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch den nikotineren Agonisten Nikotin im Verlauf der medikamentösen Therapie.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde, nach Zugabe des nikotineren Agonisten Nikotin im Verlauf der medikamentösen Therapie. Die angereicherten Monozyten wurden zunächst mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) stimuliert, bevor durch die Zugabe von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M, 30 Minuten) in An- oder Abwesenheit des nikotineren Agonisten Nikotin (100 μ M) die Ausschüttung von IL-1 β angeregt wurde. Die Ergebnisse der Experimente in Anwesenheit von Nikotin wurden auf die Referenzausschüttung von IL-1 β in Abwesenheit von Nikotin bezogen. Die Einzelwerte sind als gefärbte Punkte dargestellt. Jedem Patienten wurde eine Farbe zugeordnet. Die abhängigen Werte wurden zur besseren Übersicht mit einem schwarzen Strich verbunden. Statistische Datenauswertung mittels Friedman-Test.

- Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin (Statin) über einen Zeitraum von vier Wochen führt zu keiner signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von Nikotin auf die Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten ($n = 14$). Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen führt ebenfalls nicht zu einer signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von Nikotin auf die Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand ($n = 13$).
- Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition zeigen (Ausschüttung von IL-1 $\beta \geq 70\%$ der Referenzausschüttung), ist ebenfalls keine signifikante Änderung des inhibitorischen Effekts von Nikotin zu beobachten ($n = 8$). Die ausgeschlossenen Datenpunkte sind grau eingefärbt.

Glycerophosphocholin

Im Zellkulturüberstand der über einen Zeitraum von drei Stunden mit 5 ng/mL LPS stimulierten und anschließend zeitgleich mit 100 μ M BzATP sowie 100 μ M GPC behandelten Monozyten wurde die Ausschüttung von IL-1 β gemessen und auf die IL-1 β -Ausschüttung der mit LPS und BzATP stimulierten Zellen bezogen, welche hier als Referenzwert (100%) betrachtet werden. Die relativen Konzentrationen von IL-1 β im Zellkulturüberstand der Monozyten lagen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zwischen 14,28% und 101,89%, der Median lag bei 43,02% (n = 14). Die Anwesenheit von GPC führte mit Ausnahme eines Experiments stets zu einer Inhibition der BzATP-abhängigen IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten.

Die medikamentöse Therapie führte zu keiner signifikanten Veränderung des inhibitorischen Effekts von GPC auf die IL-1 β -Ausschüttung (n = 14 bzw. n = 13; Friedman-Test ergab einen p-Wert > 0,5, somit wurde der sich anschließende Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur paarweisen Überprüfung der Stichproben nicht durchgeführt).

Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme lagen die relativen Werte zwischen 11,35% und 87,19%, der Median lag bei 49,16%. Zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme lagen die relativen IL-1 β -Konzentrationen im Bereich von 11,65% bis 95,84% der Referenzausschüttung, der Median lag bei 40,94% (n = 13; s. Abbildung 24a).

Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung durch die Zugabe von GPC zeigten (IL-1 β -Ausschüttung \geq 70% der Referenzwerte), war ebenfalls keine signifikante Veränderung der Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand der Monozyten durch GPC zu beobachten (n = 9; Friedman-Test). Vor Beginn der Therapie lag der Median bei 33,53%, nach vierwöchiger Statintherapie bei 41,35% und nach achtwöchiger medikamentöser Therapie bei 32,68% der Referenzausschüttung (s. Abbildung 24b).

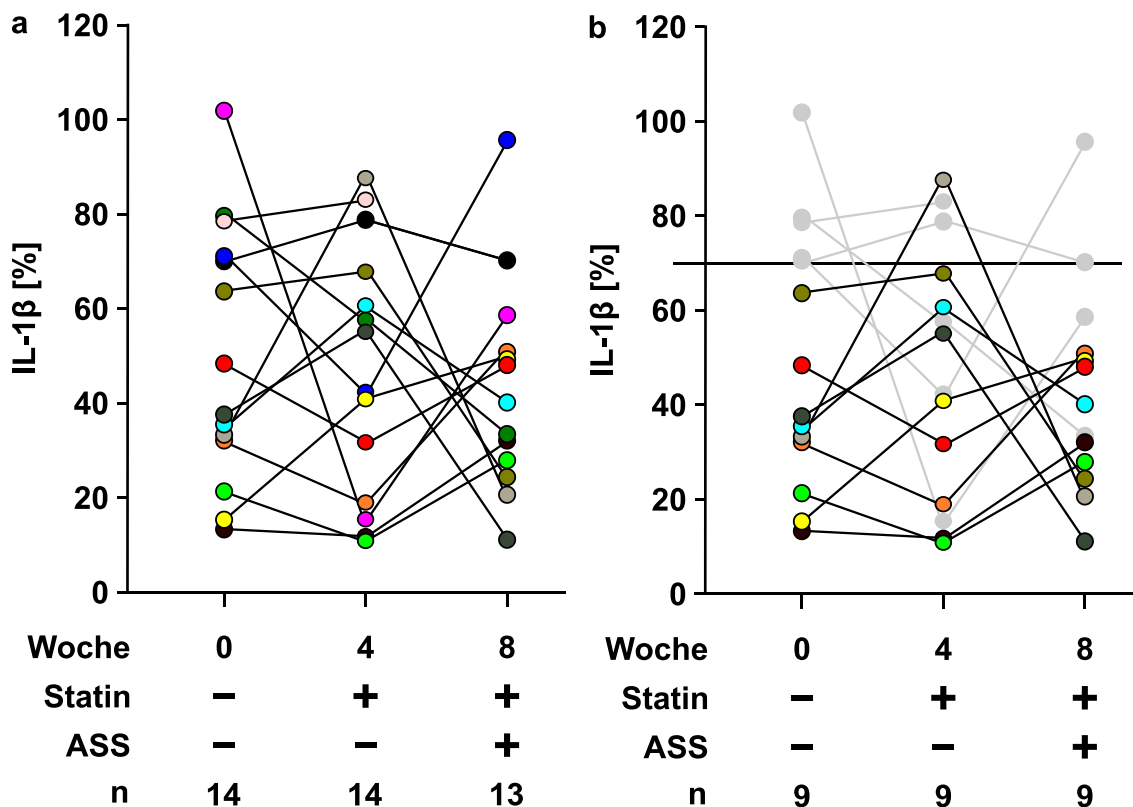


Abbildung 24. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch den nikotinergen Agonisten Glycerophosphocholin (GPC) im Verlauf der medikamentösen Therapie.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde, nach Zugabe des nikotinergen Agonisten GPC im Verlauf der medikamentösen Therapie. Die angereicherten Monozyten wurden zunächst mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) stimuliert, bevor durch die Zugabe von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μ M, 30 Minuten) in An- oder Abwesenheit des nikotinergen Agonisten GPC (100 μ M) die Ausschüttung von IL-1 β angeregt wurde. Die Ergebnisse der Experimente in Anwesenheit von GPC wurden auf die Referenzausschüttung von IL-1 β in Abwesenheit von GPC bezogen. Die Einzelwerte sind als gefärbte Punkte dargestellt. Jedem Patienten wurde eine Farbe zugeordnet. Die abhängigen Werte wurden zur besseren Übersicht mit einem schwarzen Strich verbunden. Statistische Datenauswertung mittels Friedman-Test.

- Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin (Statin) über einen Zeitraum von vier Wochen führt zu keiner signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von GPC auf die Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (n = 14). Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen führt ebenfalls nicht zu einer signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von GPC auf die Ausschüttung von IL-1 β in den Zellkulturüberstand (n = 13).
- Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition zeigen (Ausschüttung von IL-1 β \geq 70% der Referenzausschüttung), ist ebenfalls keine signifikante Änderung des inhibitorischen Effekts von GPC zu beobachten (n = 9). Die ausgeschlossenen Datenpunkte sind grau eingefärbt.

Dipalmitoylphosphatidylcholin

Im Zellkulturüberstand der mit 5 ng/mL LPS vorstimulierten und anschließend zeitgleich mit 100 μ M BzATP und 100 μ M DPPC behandelten Monozyten wurde die Ausschüttung von IL-1 β gemessen und auf die IL-1 β -Ausschüttung der mit LPS und BzATP stimulierten Zellen bezogen, welche hier als Referenzwert (100%) betrachtet werden. Die relativen Konzentrationen von IL-1 β im Zellkulturüberstand der Monozyten lagen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zwischen 7,31% und 134,42%, der Median lag bei 84,62% (n = 14). Die Anwesenheit von DPPC führte in 32 der 40 hier dargestellten Experimente zu einer Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand.

Die medikamentöse Therapie führte zu keiner signifikanten Veränderung des inhibitorischen Effekts von DPPC auf die IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (n = 13 bzw. n = 14; Friedman-Test ergab einen p-Wert > 0,5, somit wurde der sich anschließende Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur paarweisen Überprüfung der Stichproben nicht durchgeführt). Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme lagen die relativen Werte zwischen 55,84% und 116,4%, der Median lag bei 90,40%. Zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme lagen die relativen IL-1 β -Konzentrationen im Bereich von 56,59% bis 118,88% der Referenzausschüttung, der Median lag bei 86,07% (n = 13; s. Abbildung 25a.).

Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung nach Zugabe von DPPC zeigten (IL-1 β -Ausschüttung \geq 70% der Referenzwerte), wurden ausgeschlossen. Bei den verbleibenden Patienten zeigte sich nach vierwöchiger Statintherapie eine signifikante Tendenz für eine verringerte Inhibition der IL-1 β -Ausschüttung in den Zellkulturüberstand der Monozyten durch DPPC-Zugabe (p = 0,07; n = 4; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Nach der anschließenden kombinierten Therapie mit Atorvastatin und ASS über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen zeigte sich keine signifikante Veränderung des zuvor beobachteten inhibitorischen Effekts durch DPPC (p = 0,72; n = 4; Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Vor Beginn der Therapie lag der Median bei 56,97%, nach vierwöchiger Statintherapie bei 89,78% und nach achtwöchiger medikamentöser Therapie bei 86,07% der Referenzausschüttung (s. Abbildung 25b).

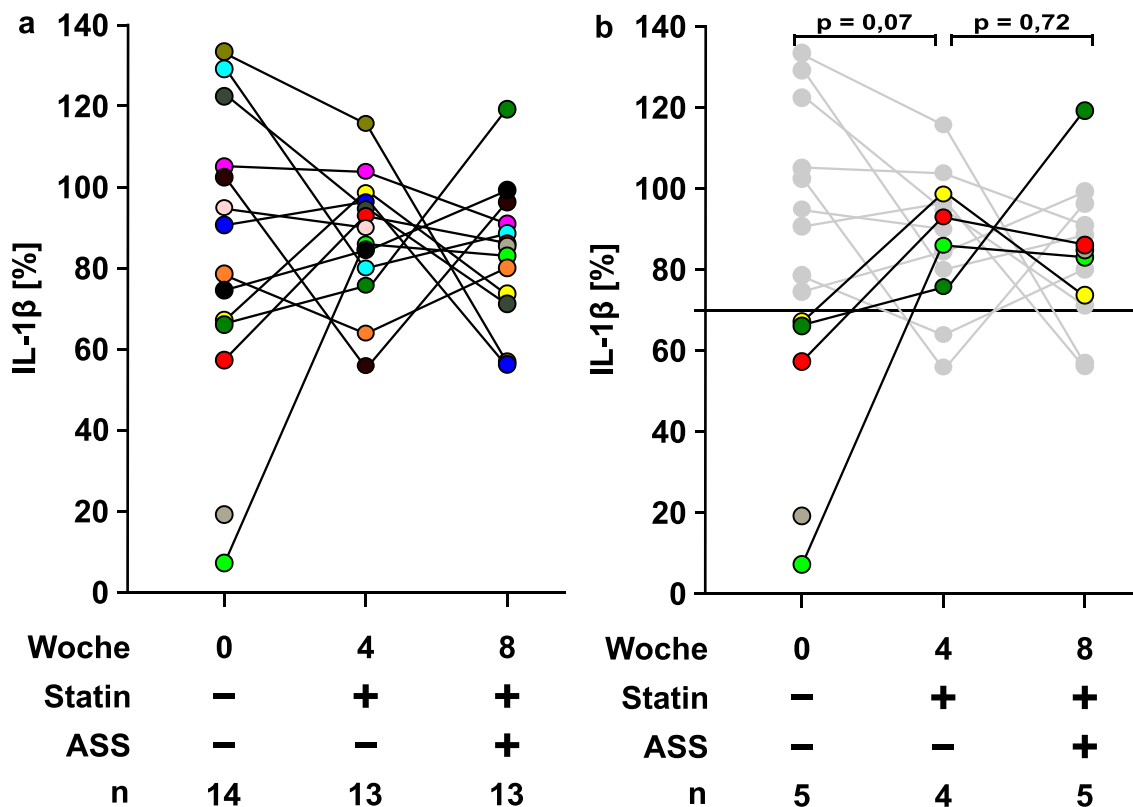


Abbildung 25. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1β (IL-1β) durch den nikotineren Agonisten Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) im Verlauf der medikamentösen Therapie.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Ausschüttung von IL-1β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten von Patienten, bei denen kürzlich ein chronisches Koronarsyndrom diagnostiziert wurde, nach Zugabe des nikotineren Agonisten DPPC im Verlauf der medikamentösen Therapie. Die angereicherten Monozyten wurden zunächst mit Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/mL, 3 Stunden) stimuliert, bevor durch die Zugabe von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP, 100 μM, 30 Minuten) in An- oder Abwesenheit des nikotineren Agonisten DPPC (100 μM) die Ausschüttung von IL-1β angeregt wurde. Die Ergebnisse der Experimente in Anwesenheit von DPPC wurden auf die Referenzausschüttung von IL-1β in Abwesenheit von DPPC bezogen. Die Einzelwerte sind als gefärbte Punkte dargestellt. Jedem Patienten wurde eine Farbe zugeordnet. Die abhängigen Werte wurden zur besseren Übersicht mit einem schwarzen Strich verbunden.

- Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin (Statin) über einen Zeitraum von vier Wochen führt zu keiner signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von DPPC auf die Ausschüttung von IL-1β in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (n = 13). Die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin in Kombination mit 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen führt ebenfalls nicht zu einer signifikanten Änderung des inhibitorischen Effekts von DPPC auf die Ausschüttung von IL-1β in den Zellkulturüberstand (n = 13). Statistische Datenauswertung mittels Friedman-Test.
- Nach Ausschluss der Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme eine geringe Inhibition zeigen (Ausschüttung von IL-1β ≥ 70% der Referenzausschüttung), zeigt sich eine signifikante Tendenz für eine Verringerung des inhibitorischen Effekts durch DPPC nach vierwöchiger täglicher Therapie mit Atorvastatin. (n = 4). Nach der sich anschließenden vierwöchigen täglichen Einnahme von Atorvastatin und ASS zeigt sich keine signifikante Veränderung des inhibitorischen Effekts von DPPC auf die IL-1β-Ausschüttung im Vergleich zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme (n = 4). Die ausgeschlossenen Datenpunkte sind grau eingefärbt. Statistische Datenauswertung mittels Friedman-Test gefolgt vom Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Diskussion

Methodendiskussion

Anreicherung von Monozyten aus dem Vollblut der Patienten

In dieser Arbeit wurde zur Anreicherung der Monozyten der *RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail* genutzt. In der Literatur taucht dieser erstmals im Jahre 2001 auf (Mueller et al. 2001). Dieses Verfahren führt über den Mechanismus der negativen Selektion dazu, dass nach dem Prozess der Zellanreicherung aus dem Vollblut CD14⁺-Monozyten laut Herstellerangaben mit 72% bis 85% den größten Anteil des Zellgemischs bilden, welches anschließend für die Zellkulturexperimente genutzt wird. In humanem Vollblut bilden Monozyten etwa einen Anteil von 2% bis 10% an der gesamten Leukozytenzahl (Zucker-Franklin 1974). Die Herstellerangabe bezüglich der Anreicherung CD14⁺-Monozyten lässt sich durch Studien verifizieren. So konnten Mueller et al. mit Nutzung des *RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail* durchflusszytometrisch gemessen einen Anteil der CD14⁺-Monozyten von über 85% erreichen (Mueller et al. 2001).

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Hemmung der Ausschüttung von IL-1 β durch nikotinerge Agonisten auch funktioniert, wenn die Monozyten durch Nutzung des *RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail* per Negativselektion angereichert werden (s. Abbildung 14). Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Mechanismus bei Zellkulturexperimenten mit U937-Zellen, bei angereicherten peripheren mononukleären Zellen und bei positiv selektionierten CD14⁺-Monozyten funktioniert (Hecker et al. 2015).

LDH

Die Messung der Aktivität der LDH ist ein etabliertes und vielgenutztes Verfahren, um den Zelltod in einem Zellkulturexperiment zu bestimmen. Das zytoplasmatische Enzym katalysiert die reversible Reduktion von Pyruvat zu Laktat. Es spielt somit eine bedeutende Rolle im Rahmen des Glucosestoffwechsels und ist in allen eukaryotischen Zellen zu finden (Markert 1984; Legrand et al. 1992). Bis heute sind fünf unterschiedliche Isoformen des Enzyms bekannt, die gewebespezifisch die beschriebene Reaktion katalysieren (Emery 1967; Kumar et al. 2018). Die LDH ist ein Tetramer bestehend aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten. Aus diesen Untereinheiten lassen sich fünf verschiedenen Isoenzyme kombinieren (Cahn et al. 1962; Emery 1967). Die Untereinheiten weisen jeweils eine Molekülmasse von etwa 35 kDa auf, sodass sich für das gesamte Enzym eine Molekülmasse von etwa 144 kDa ergibt (Markert 1984). Schon in den 1960er Jahren wurde die Erhöhung der LDH-Aktivität im Rahmen unterschiedlicher Erkrankungen beobachtet und diagnostisch genutzt (Hsieh und

Blumenthal 1956). Legrand et al. konnten 1992 zeigen, dass die LDH-Aktivität einen verlässlichen Marker für den Zelltod in einem Zellkultorexperiment darstellt und zuvor genutzten Methoden überlegen ist (Legrand et al. 1992).

Auch in dieser Arbeit wurde die Messung der LDH-Aktivität genutzt, um die Zellvitalität zu verifizieren. Die Information über die Zellvitalität in den Zellkultorexperimenten ist relevant, da aus sterbenden Monozyten neben der LDH auch zytosolisches Pro-IL-1 β in den Zellkulturüberstand gelangen und somit zu falsch hohen Messwerten führen kann. Zu diesem Zweck wurde die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand der unterschiedlichen Versuchsansätze gemessen und ins Verhältnis der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand lysierter Monozyten gleicher Anzahl gesetzt, sodass auf einen prozentualen Anteil vitaler Zellen geschlossen werden konnte.

Im Vergleich zu ähnlichen Experimenten mit der monozytären Zelllinie U937 waren in den Experimenten dieser Arbeit höhere LDH-Aktivitätswerte in den Zellkulturüberständen messbar. So beschrieben Backhaus et al. 2017 in Zellkultorexperimenten an monozytären U937-Zellen Mediane der LDH-Aktivitätswerte zwischen 2% und 4% (Backhaus et al. 2017). In den hier vorliegenden Experimenten an angereicherten Monozyten lagen die Mediane der LDH-Aktivität im Bereich von 6,87% bis 13,73% (s. Abbildung 15, 17 und 19). Diese Unterschiede könnten auf die notwendige Anreicherung der Monozyten aus den Blutproben zurückzuführen sein. Die Zugabe des Antikörpercocktails sowie zahlreiche Zentrifugationsschritte sind potenziell zellschädigende Prozesse, die im Rahmen der Experimente mit der U937-Zelllinie nicht notwendig sind. Experimente, die an PBMCs durchgeführt werden, zeigen Werte der LDH-Aktivität in einem ähnlichen Bereich (Backhaus et al. 2017). Dies stützt die Überlegung, dass notwendige Anreicherungsschritte im Rahmen der Experimente höhere Werte der LDH-Aktivität nach sich ziehen können.

Die Zugabe von LPS zu unstimulierten, angereicherten Monozyten führte zu keiner signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die Zugabe von BzATP führte zu einem signifikanten, aber moderaten Anstieg der gemessenen LDH-Aktivität (s. Abbildung 12b). Dies ist in der veröffentlichten Literatur zumindest für einige Zelllinien beschrieben. So beobachteten beispielsweise Kawano et al. für die Makrophagenzelllinie RAW264.7, dass die Anwesenheit von BzATP in einer Konzentration zwischen 100 und 300 μ M dosisabhängig die LDH-Freisetzung induziert (Kawano et al. 2012). Humphreys und Dubyak konnten ebendies bereits 1996 für die monozytäre Zelllinie THP-1 beschreiben (Humphreys und Dubyak 1996).

BzATP bindet an den P2X7-Rezeptor, einen ATP-abhängigen Ionenkanal, der insbesondere auf der Zelloberfläche von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird (Cekic und Linden 2016; Adinolfi et al. 2018). Die Interaktion zwischen drei BzATP-Molekülen und dem P2X7-Rezeptor führt durch die Öffnung des Ionenkanals zu einem nichtselektiven Einstrom von Kationen in die und einen Kaliumausstrom aus der Zelle. Das konsekutiv veränderte Membranpotential bedingt eventuell auch über den TWIK2-Kanal, einen ATP-abhängigen Kaliumkanal, einen Kaliumausstrom und somit einen weiteren intrazellulären Konzentrationsabfall von Kaliumionen (Di et al. 2018). Dies führt über eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zur Ausschüttung von IL-1 β (Katsnelson et al. 2015; Cekic und Linden 2016; Adinolfi et al. 2018).

In der Literatur ist beschrieben, dass der P2X7-Rezeptor in Anwesenheit von ATP zusätzlich zur Bildung von Makroporen befähigt ist, die den Durchtritt von hydrophilen Substanzen bis zu einer Größe von 900 Da ermöglichen (Cekic und Linden 2016; Adinolfi et al. 2018). Wie zuvor beschrieben haben LDH-Moleküle etwa eine Molekülmasse von 144 kDa und können somit nicht durch diese Poren in den Zellkulturüberstand gelangen. Allerdings kommt es in Anwesenheit von ATP ebenfalls P2X7-vermittelt zur Pyroptose (Le Feuvre et al. 2002; Di Virgilio et al. 2017; Pelegrin 2021). Dieser Prozess führt mitunter zur Bildung größerer Makroporen. Bei der folgenden NLRP3-Aktivierung wird Caspase-1-vermittelt neben IL-1 β zusätzlich Gasdermin-D aktiviert. Gasdermin-D induziert im Rahmen der Pyroptose die Bildung von Poren mit einer Größe von bis zu 20 nm in der Plasmamembran (Sborgi et al. 2016). Im Rahmen dieses Prozesses ist es denkbar, dass LDH-Moleküle die Zellmembran passieren. Dies könnte eine Erklärung für die moderat erhöhten LDH-Aktivitätswerte in Anwesenheit von BzATP sein.

Bis auf zwei Ausnahmen führte die Anwesenheit der verwendeten nikotinergen Agonisten zu keiner signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität im Vergleich zu den Monozyten, die mit LPS und BzATP stimuliert wurden. Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme führte die Zugabe von CRP zu einer signifikanten Erhöhung der LDH-Aktivität (s. Abbildung 15), zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme war dieser Effekt für DPPC zu beobachten (s. Abbildung 17). Für beide Substanzen war dieser Unterschied zu den anderen Blutentnahmezeitpunkten nicht zu beobachten, des Weiteren ist ein derartiger Effekt bislang nicht in der Literatur beschrieben. Auch wenn diese Befunde vermutlich zufällig entstanden sind, ist dennoch in Erwägung zu ziehen, dass CRP und DPPC die Membranstruktur der Monozyten unter bestimmten Voraussetzungen so beeinflussen, dass vermehrt LDH aus den Zellen austritt.

Die dargestellten Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die Einnahme von Atorvastatin zu keiner Veränderung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten führt. Es gibt in der Literatur einige Hinweise darauf, dass die Senkung des Gesamtcholesterols durch Statine durchaus die Membranzusammensetzung verschiedener Körperzellen verändern kann (Kirsch et al. 2003; van der Most et al. 2009). Denkbar wäre gewesen, dass eine Strukturänderung der Lipiddoppelschicht sich auch in der Widerstandsfähigkeit der Zellmembran von Monozyten niederschlägt. Dies hätte zu einem vermehrten oder verringerten Zelltod im Rahmen der Handhabung der Zellen führen können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Anwesenheit von BzATP zu einer leicht erhöhten LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand der angereicherten Monozyten führt. Ein Grund dafür könnte Pyroptose sein, die BzATP-vermittelt auftreten kann. Entgegen den dargelegten Überlegungen führt die Einnahme von Statinen zu keiner Erhöhung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand der angereicherten Monozyten. Die Anreicherung der Monozyten führt im Vergleich zu Experimenten mit Zellen verschiedener Zelllinien, bei denen keine Anreicherungsprozesse notwendig sind, zu einer Erhöhung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand.

Statine

Wirkung von Atorvastatin auf die Konzentration von Gesamtcholesterol, LDL-C, HDL-C und Triglyceriden im Blut

Erste Studien konnten bereits zu Beginn der 1980er Jahre zeigen, dass die Einnahme von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren die Konzentration von Gesamtcholesterol und LDL-C im Blutserum gesunder Probanden statistisch signifikant reduziert. Tobert et al. zeigten dies 1982 bereits für Lovastatin, welches 1989 als erstes Statin auf dem deutschen Arzneimittelmarkt zugelassen wurde. Des Weiteren wurde in der Studie gezeigt, dass die Einnahme von Lovastatin keinen signifikanten Effekt auf die Konzentration von HDL-C und Triglyceriden im Blutserum hat (Tobert et al. 1982). In anderen Studien gibt es bezüglich des Effekts von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf HDL-C und Triglyceride unterschiedliche Ergebnisse und Interpretationen (Heinonen et al. 1996; Lea und McTavish 1997).

Der Gesamtcholesterol- und LDL-C-senkende Effekt des in dieser Untersuchung eingesetzten Atorvastatin wurde erstmalig in den 1990er Jahren nachgewiesen. Die erste Studie an Patienten mit primärer Hypercholesterinämie wurde 1995 von Nawrocki et al. durchgeführt. Je nach Dosis des eingesetzten Atorvastatin (2,5 bis 80 mg) ergab sich eine LDL-C-Reduktion von 25% bis 60% (Nawrocki et al. 1995).

Die in dieser Studie gemessenen Veränderungen der Konzentration des LDL-C und Gesamtcholesterols decken sich mit den Ergebnissen aktueller Metaanalysen. So wurde hier nach achtwöchiger Therapie mit 40 mg Atorvastatin pro Tag eine Reduktion des LDL-C zwischen 32% und 59% beobachtet, der Median lag bei 45%. Für das Gesamtcholesterol ergab sich in demselben Zeitraum eine Reduktion zwischen 22% und 54%, der Median lag bei 32%. Adams et al. beschrieben in einer Metaanalyse aus dem Jahre 2015 für die medikamentöse Therapie mit 40 mg Atorvastatin pro Tag eine Reduktion des LDL-C im Blutserum von 47,4% (95%-Konfidenzintervall: 46,9%-48,0%). Für das Gesamtcholesterol ergab sich eine Reduktion von 34,1% (95%-Konfidenzintervall: 33,6%-34,6%) (Adams et al. 2015). Auch wenn die Parameter „Median“ und „95%-Konfidenzintervall“ nicht direkt zu vergleichen sind, zeigen diese Daten dennoch, dass die Wirkung von Atorvastatin auf die verschiedenen Cholesterolverte in dieser Arbeit ähnlich ist wie die von Adams et al. beschriebenen Ergebnisse.

Die Metaanalyse zeigt zudem, dass die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin keinen signifikanten Effekt auf die Konzentration des HDL-C hat, was sich ebenfalls mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt (Adams et al. 2015). Andere Studien zeigen diesbezüglich unterschiedliche, jedoch überwiegend nicht signifikante oder sehr geringe Effekte (Lea und McTavish 1997). In den ESC-Guidelines „*Management of dyslipidaemias*“ von 2019 wird Statinen insgesamt eine klinisch fraglich relevante Erhöhung der HDL-C-Konzentrationen um 1% bis 10% zugesprochen (Mach et al. 2019). Die entsprechende Metaanalyse zeigt für Atorvastatin einen inversen dosisabhängigen Effekt, die Erhöhung der HDL-C-Konzentration nahm also mit steigender Dosis von Atorvastatin ab. Für die Therapie mit 40 mg Atorvastatin wurde eine Erhöhung der HDL-C-Konzentration um 2,4% beobachtet (n = 1324) (Barter et al. 2010). Es ist gut möglich, dass ein solch geringer Effekt sich erst bei einer ausreichend großen Probandenanzahl beobachten lässt und die Stichprobe im Rahmen dieser Arbeit schlicht zu klein war, um diesen Effekt zu beobachten.

Heinonen et al. beschreiben für die Einnahme von 10 mg Atorvastatin täglich einen statistisch signifikanten hemmenden Effekt auf die Triglyceridkonzentration im Serum der Probanden. Im Gegensatz zur Wirkung auf die LDL-C- oder Gesamtcholesterolkonzentration erreicht die Wirkung nicht bereits nach vier Wochen die maximale Ausprägung, sondern erst nach 26 Wochen (Heinonen et al. 1996). Es ist somit möglich, dass bei einer langfristigeren Betrachtung der Triglyceridwerte auch bei den Patienten dieser Arbeit ein Effekt auf die Triglyceridkonzentration im Serum messbar gewesen wäre.

Auffällig ist zudem, dass die Reduktion des LDL-C unter Therapie mit Atorvastatin in zahlreichen Studien wie auch in den Ergebnissen dieser Arbeit ausgeprägter zu beobachten ist als die Reduktion des Gesamtcholesterols (Nawrocki et al. 1995; Heinonen et al. 1996; Lea und McTavish 1997; Schrott et al. 1998; Stern et al. 2000). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Wirkung von Statinen bekanntermaßen über die Reduktion der Cholesterolsynthese reaktiv auch eine Hochregulation der Anzahl der LDL-Rezeptoren auf der Zellmembran der Leberzellen zur Folge hat (Goldstein und Brown 1990; Liberale et al. 2019). Dies führt dazu, dass unter Statintherapie LDL-C vermehrt rezeptorvermittelt über den Vorgang der Endozytose in die Zellen aufgenommen wird, sodass die LDL-C-Konzentration im Blut zusätzlich abnimmt (Greenwood et al. 2006). Außerdem umfasst das Gesamtcholesterol die Summe des Cholesterols, welches in der Gesamtheit aller Lipoproteine (VLDL, IDL, LDL, HDL und LP(a)) vorhanden ist (Langlois und Nordestgaard 2018). Da die Einnahme von Atorvastatin sich auf zwar auf die Konzentration des LDL-C, jedoch nicht signifikant auf die Konzentration des HDL-C auszuwirken scheint, ist die resultierende Reduktion des Gesamtcholesterols noch einmal geringer als die des LDL-C.

In dieser Arbeit dient die Bestimmung der Lipidwerte im Serum auch der Kontrolle, ob die Medikation des Patienten mit Atorvastatin wirksam ist. Es gibt Patienten, die auf eine Therapie mit Atorvastatin nicht oder nur wenig ansprechen (Thom et al. 2006; Kirac et al. 2017). Häufiger führt zudem eine unzureichende Einnahme des Medikaments seitens der Patienten zu mangelhaften Therapieergebnissen (Trompet et al. 2015). So wurden aus dieser Studie drei Patienten ausgeschlossen, die nach eigener Angabe die verordneten Medikamente nicht einnahmen.

Freisetzung von IL-1 β nach Einnahme von Atorvastatin

In verschiedenen Veröffentlichungen wurden bei Experimenten mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte beobachtet. So führt beispielweise die Anwesenheit von Atorvastatin, Lovastatin oder Rosuvastatin zu einer Reduktion von CRP und oxidiertem LDL (Li 2001; Ridker et al. 2001; Ridker et al. 2005; Ridker et al. 2008). Statine wirken über die Hemmung der Aktivität der GTPasen Rho und Ras, die im Rahmen von Zellproliferationsprozessen bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen, kardioprotektiv (Satoh et al. 2006; Stout et al. 2014). Zudem reduziert die Anwesenheit von Statinen oxidativen Stress auf Endothelzellen, da die Synthese des „Radikalfängers“ Stickstoffmonoxid durch eine Hochregulation der endothelialen NO-Synthase verstärkt wird (van der Most et al. 2009). Des Weiteren vermindert die Einnahme von Atorvastatin, Fluvastatin oder

Cerivastatin die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder IL-8 (Ito et al. 2002; Yokota et al. 2006).

Zusätzlich ist bekannt, dass die Anwesenheit von Atorvastatin die Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B vermindert. Wie beschrieben führt die Anwesenheit des Statins zu einer Verminderung von oxidiertem LDL und reaktiven Sauerstoffspezies, welche als Aktivatoren von NF- κ B bedeutsam sind. Auch die Verminderung der Aktivität der GTPase Ras führt zu einer Reduktion der Aktivität von NF- κ B in glatten Gefäßmuskel- und U937-Zellen (Ortego et al. 1999). Über eine verminderte Rekrutierung von TLR4 in *lipid rafts* reduziert Atorvastatin auch direkt die Aktivierung von NF- κ B, da ein LPS-induzierter TLR4-Signalweg an der NF- κ B-Aktivierung beteiligt ist. Sind weniger TLR4 in *lipid rafts* vorhanden, läuft dieser Aktivierungsweg vermindert ab (Chansrichavala et al. 2010). Durch den Einfluss von Statinen wäre also eine verminderte Bildung von NF- κ B und konsekutiv auch des NLRP3-Inflammasoms sowie des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β zu erwarten.

Aus anderen Publikationen geht hingegen hervor, dass Statine die Produktion und Ausschüttung von IL-1 β , dem vielleicht wichtigsten proinflammatorischen Zytokin im menschlichen Organismus, verstärken. Dies scheint über die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zu geschehen, auch wenn die genauen Mechanismen diesbezüglich noch nicht bekannt sind (Liao et al. 2013; Liberale et al. 2019). So zeigten Liao et al., dass Lovastatin und Fluvastatin in Anwesenheit von LPS die Prozessierung und Ausschüttung von IL-1 β in THP-1-Zellen über die Aktivierung von Caspase-1 induzieren. Dieser Effekt ist bei experimenteller Gabe eines irreversiblen P2X7-Rezeptorantagonisten aufgehoben, was vermuten lässt, dass der P2X7-Rezeptor an dieser Stelle ebenfalls eine Rolle spielt. Für Fluvastatin konnte dies zudem bei Experimenten mit primären peripheren Monozyten gesunder menschlicher Spender beobachtet werden (Liao et al. 2013). In anderen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass Atorvastatin über den P2X7-Rezeptor Signalwege wie den Akt-Signalweg beeinflussen kann (Mistafa et al. 2008; Mistafa und Stenius 2009). Zudem konnten Mistafa et al. messen, dass die Anwesenheit von Atorvastatin zu einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen durch den P2X7-Rezeptor in A549-Zellen führt. Der Effekt durch 50 μ M Atorvastatin entsprach dabei in etwa dem Effekt, der durch 100 μ M ATP hervorgerufen wurde (Mistafa et al. 2008). Diese Ergebnisse stützen die These, dass Statine über den P2X7-Rezeptor biochemische Vorgänge beeinflussen können.

Die Beobachtungen dieser Arbeit bestätigen diese Ergebnisse nicht. Der Einsatz von Atorvastatin führte weder allein über einen Zeitraum von vier Wochen noch in

Kombination mit ASS über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen zu einer signifikanten Änderung der absoluten Ausschüttung von IL-1 β aus den angereicherten Monozyten (s. Abbildung 13). Allerdings gibt es einige Unterschiede zu den Versuchen von Liao et al., die durchaus die unterschiedlichen Beobachtungen erklären können.

So kam in dieser Studie Atorvastatin zum Einsatz, in den Versuchen von Liao et al. jedoch Fluvastatin. Es ist bekannt, dass verschiedene Statine durchaus unterschiedliche Effekte hervorrufen können, etwa durch unterschiedliche Lipophilie oder Polarität der Substanzen. Des Weiteren wurden in dieser Studie keine gesunden Probanden als Spender genutzt, sondern Patienten, die an einem CCS leiden. Möglicherweise unterscheidet sich die Wirkung von Statinen in einem solchen Milieu, in dem inflammatorische Prozesse ubiquitär vorhanden sind, von der Wirkung in gesunden Probanden.

Zudem wurde das Fluvastatin in den Experimenten von Liao et al. den Zellen *ex vivo* über einige Stunden zugesetzt, was einen deutlichen Unterschied zu den Experimenten dieser Studie darstellt, in denen *ex vivo* keine Statine vorhanden waren. Hier nahmen die Patienten das Atorvastatin über Wochen ein, sodass eine systemische Wirkung erreicht wurde und das Medikament mit dem individuellen Metabolismus der Patienten interagiert. Im Körper der Patientin sind unzählige Metabolite vorhanden, die mit dem Atorvastatin interagieren und die Wirkung des Medikaments beeinflussen könnten. Es ist zudem nicht auszuschließen, dass dieser Effekt möglicherweise *in vivo* zunächst ebenfalls vorhanden ist, sich jedoch nach einer bestimmten Zeit ein „Gewöhnungseffekt“ zeigt. Die Monozyten adaptieren sich also an die Anwesenheit des Statins und IL-1 β wird zum Zeitpunkt des Experiments nicht vermehrt ausgeschüttet. Des Weiteren führt in den Experimenten von Liao et al. die Anwesenheit des Statins in Kombination mit LPS ohne BzATP zur Ausschüttung von IL-1 β , wobei der P2X7-Rezeptor ebenfalls eine Rolle zu spielen scheint. Sollten BzATP und Atorvastatin über den gleichen Wirkungsmechanismus die Ausschüttung von IL-1 β induzieren und um die P2X7-Rezeptoren konkurrieren, kann die Ausschüttung von IL-1 β durch Atorvastatin gegebenenfalls nicht weiter gesteigert werden, als es durch die alleinige Anwesenheit des BzATP schon der Fall ist. Wie zuvor beschrieben, ist die vermehrte Ausschüttung von IL-1 β durch Fluvastatin bei Gabe eines irreversiblen P2X7-Rezeptor-Agonisten aufgehoben, was zumindest für eine Involvierung des Rezeptors spricht (Liao et al. 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach einer Therapie mit 40 mg Atorvastatin täglich über einen Zeitraum von vier beziehungsweise acht Wochen keine Änderung der

Ausschüttung von IL-1 β aus angereicherten Monozyten *ex vivo* zu beobachten war. Die Einnahme von Statinen verändert maßgeblich den Cholesterolfstoffwechsel und vermutlich auch die Zusammensetzung der *lipid rafts*. In diesen Membranbestandteilen sind P2X7-Rezeptoren und TLR4 lokalisiert, die an der Produktion und Ausschüttung von IL-1 β maßgeblich beteiligt sind (Chansrichavala et al. 2010; Sluyter 2017). Aufgrund dieser molekularen Vorgänge wäre eine Änderung der Ausschüttung von IL-1 β in die eine oder andere Richtung durch die Anwesenheit von Atorvastatin denkbar gewesen.

Wirkung nikotinerger Agonisten nach Statineinnahme

Hecker et al. konnten zeigen, dass die Ausschüttung von IL-1 β aus U937-Zellen und primären mononukleären Zellen nach Stimulation mit LPS und BzATP bei Zugabe verschiedener nikotinerger Agonisten gehemmt wird (Hecker et al. 2015). Als wirksame Hemmstoffe wurden in unterschiedlichen Studien insbesondere ACh, PC, Nikotin, CRP, GPC und DPPC definiert, daher wurden diese Hemmstoffe auch in den hier durchgeführten Experimenten eingesetzt (Hecker et al. 2015; Richter et al. 2016; Backhaus et al. 2017; Zakrzewicz et al. 2017; Richter et al. 2018). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass dieser Mechanismus nicht nur bei Zellen gesunder Spender funktioniert, sondern auch bei Patienten, die an einem CCS leiden. So führte die Anwesenheit jeder der genannten Substanzen in den durchgeführten Experimenten zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Ausschüttung von IL-1 β (s. Abbildung 14). Diese Hemmung war zudem sowohl nach vierwöchiger Einnahme von Atorvastatin als auch nach daran anschließender vierwöchiger Kombinationstherapie von Atorvastatin und ASS zu beobachten (s. Abbildung 16 und 18).

Die molekularen Mechanismen des inhibitorischen Effekts der nikotinerger Agonisten sind aktuell nicht gänzlich geklärt. In einigen Studien wird beschrieben, dass ein nAChR als Rezeptor für die nikotinerger Substanzen dient (Hecker et al. 2015; Richter et al. 2016; Backhaus et al. 2017; Zakrzewicz et al. 2017; Richter et al. 2018). Die Aktivierung des Rezeptors führt über einen ungeklärten Mechanismus zur Inhibition der ionotropen Funktion des P2X7-Rezeptors, die in die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms involviert ist (Ferrari et al. 2006; Di Virgilio et al. 2017). Da der P2X7-Rezeptor, wie zuvor beschrieben, zum Teil in *lipid rafts* lokalisiert ist (Allen et al. 2007; Robinson et al. 2014), wäre eine Strukturveränderung der cholesterolreichen Membranbestandteile durch Atorvastatin mit einer daraus resultierenden veränderten IL-1 β -Freisetzung denkbar gewesen.

Bei Betrachtung der einzelnen Substanzen fällt auf, dass nach der Behandlung der Patienten mit Atorvastatin keine signifikante Änderung der inhibitorischen Wirkung durch

cholinerge Agonisten auftritt (s. Abbildung 20a, 21a, 22a, 23a, 24a und 25a). Dies gilt sowohl für die vierwöchige Monotherapie mit Atorvastatin als auch die sich anschließende vierwöchige Kombinationstherapie von Atorvastatin und ASS. Auffällig ist zudem, dass es einige Patienten gibt, bei denen schon vor Therapiebeginn keine oder nur eine geringe Inhibition durch die nikotinergeren Agonisten zu beobachten war. Um herauszufinden, ob solche *non-responder* einen eventuellen Effekt durch Atorvastatin kaschieren, wurden bei der Ergebnisbetrachtung im nächsten Schritt Patienten ausgeschlossen, die bei dem Experiment vor Therapiebeginn in Anwesenheit eines nikotinergeren Agonisten eine IL-1 β -Ausschüttung von mehr als 70% im Vergleich zum Referenzwert (Ausschüttung von IL-1 β aus Monozyten in Anwesenheit von LPS und BzATP) zeigten (s. Abbildung 20b, 21b, 22b, 23b, 24b und 25b).

Ursachen für eine geringe Inhibition der Ausschüttung von IL-1 β durch nikotinergeren Agonisten könnten beispielsweise latente Infekte seitens der Patienten sein, die zu einer Voraktivierung der Monozyten führen, welche die Ausschüttung des IL-1 β und dessen Inhibition beeinflusst. Zwar wurden vor der Blutentnahme klinische Infektionszeichen anamnestisch eruiert, so schließt dies jedoch nicht aus, dass zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine symptomarme Infektion oder ein symptomfreies Intervall einer Infektion vorliegt.

Eine weitere mögliche Erklärung ist eine Teilduplikation des Gens CHRNA7, das für die $\alpha 7$ -Untereinheit nikotinergerer Acetylcholinrezeptoren ($\alpha 7nAChR$) kodiert. Die Teilduplikation dieses Gens, welche nach Fusion mit dem Gen FAM7A dann als CHRFAM7A bezeichnet wird, ist sowohl in Tumor- und neuronalen Zellen als auch in Immunzellen zu finden (Martín-Sánchez et al. 2021). Das Produkt dieses Fusionsgens ($dup\alpha 7nAChR$) hat wahrscheinlich eine negative regulatorische Wirkung auf die Funktion des nAChR (Costantini et al. 2015; Martín-Sánchez et al. 2021). Laut aktueller Literatur ist die Expression dieses Gens insbesondere in Leukozyten ausgeprägt. Es ist individuell sehr unterschiedlich, wie groß der Anteil von $dup\alpha 7nAChR$ an den $\alpha 7$ -Untereinheiten nAChR in Leukozyten ist (Costantini et al. 2015). Wird CHRFAM7A in den Monozyten eines Patienten besonders häufig exprimiert, könnte dies ebenfalls den inhibitorischen Effekt nikotinergerer Agonisten auf die IL-1 β -Freisetzung vermindern und als Erklärung für beobachtete *non-responder* dienen.

Zudem gibt es möglicherweise unbekannte individuelle Faktoren, die Unterschiede des inhibitorischen Effekts der nikotinergeren Agonisten auf die Ausschüttung von IL-1 β zwischen den Patienten erklären können. Auch aus anderen Publikationen sind *non-* oder *low-responder* bekannt. Bei Betrachtung der Ergebnisse von Experimenten mit

humanen oder murinen PBMC fällt beispielsweise auf, dass zwar ein signifikanter inhibitorischer Effekt durch nikotinerge Agonisten besteht, jedoch bei einzelnen Probanden kein oder nur ein geringer inhibitorischer Effekt zu beobachten ist (Hecker et al. 2015; Amati et al. 2017; Zakrzewicz et al. 2017; Siebers et al. 2018).

Nach Ausschluss der *non-responder* ist für die inhibitorische Funktion der Substanzen ACh, PC, Nikotin und GPC ebenfalls kein signifikanter Unterschied durch die Anwesenheit von Atorvastatin festzustellen (s. Abbildung 20b, 21b, 23b und 24b). Für CRP ist nach vierwöchiger Therapie mit Atorvastatin keine signifikante Änderung der inhibitorischen Funktion zu beobachten. Nach der sich anschließenden vierwöchigen kombinierten Therapie mit Atorvastatin und ASS kommt es zu einer signifikant reduzierten Hemmung der Ausschüttung von IL-1 β . (s. Abbildung 22b).

Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob die Anwesenheit von ASS diesen signifikanten Effekt erklären kann, oder ob dieser zwar durch Atorvastatin, allerdings erst nach einer längeren Behandlungsdauer hervorgerufen wird. Für Atorvastatin wird 90% der cholesterolsenkenden Wirkung nach etwa 14 Tagen Behandlungsdauer erreicht, der maximale Therapieeffekt wird etwa nach vier Wochen beobachtet und kann durch eine dauerhafte Therapie aufrechterhalten werden (Nawrocki et al. 1995; Heinonen et al. 1996; Lea und McTavish 1997; Schrott et al. 1998; Stern et al. 2000). Somit erscheint diese Erklärung eher unwahrscheinlich. Auch in den Ergebnissen dieser Arbeit war der Unterschied des Therapieeffekts auf die verschiedenen Cholesterolverte im Serum der Patienten durch Atorvastatin nach achtwöchiger im Vergleich zu den Ergebnissen nach vierwöchiger Therapie zwar statistisch signifikant, jedoch nur gering ausgeprägt (s. Abbildung 8 und 9). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Zufall diese Ergebnisse erklären kann.

In der Literatur ist beschrieben, dass ASS mit *lipid rafts* interagiert und die Struktur dieser cholesterolreichen Membranbestandteile stören und somit die Fluidität der Membran beeinflussen kann (Alsop et al. 2015; Alsop et al. 2018). Es ist also denkbar, dass Atorvastatin und ASS eine additive „zerstörerische“ Wirkung auf *lipid rafts* haben und die Struktur dieser Membranbestandteile gemeinsam so beeinflussen, dass die P2X7-Rezeptor-vermittelte Inhibierung der IL-1 β -Freisetzung gestört wird. Dies kann jedoch nicht erklären, aus welchem Grund dieser signifikante Effekt nur in Anwesenheit von CRP, nicht jedoch bei zahlreichen anderen nikotinerge Agonisten zu beobachten ist.

Bei Anwesenheit von DPPC ist nach vierwöchiger Therapie mit Atorvastatin eine Tendenz hinsichtlich der reduzierten inhibitorischen Funktion des nikotinerge Agonisten zu beobachten ($p = 0,07$, s. Abbildung 25b). Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen,

dass nach Ausschluss der *non-responder* noch vier Patienten für die statistische Datenauswertung verbleiben und die Mehrzahl ausgeschlossen wurde. Die Aussagekraft dieser statistischen Datenauswertung ist somit zumindest fraglich. Die weitere Therapie mit Atorvastatin und ASS führt zu keiner weiteren Veränderung des inhibitorischen Effekts von DPPC auf die IL-1 β -Freisetzung (s. Abbildung 25b), was insbesondere nicht in Einklang mit den Ergebnissen der Experimente in Anwesenheit von CRP steht (s.o.).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die tägliche Einnahme von 40 mg Atorvastatin über einen Zeitraum von vier Wochen keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Inhibierung der IL-1 β -Freisetzung durch nikotinerge Agonisten zu haben scheint. Die daran anknüpfende vierwöchige Kombinationstherapie von 40 mg Atorvastatin und 100 mg ASS pro Tag lässt für CRP eine signifikante Reduzierung der inhibitorischen Wirkung auf die IL-1 β -Freisetzung beobachten. Unklar ist, wieso dieser Effekt bei den anderen nikotinerge Agonisten nicht zu beobachten ist. Natürlich muss auch in Betracht gezogen werden, dass der beobachtete Unterschied zufällig entstanden ist.

ASS

Die Einnahme von 100 mg ASS täglich, wie auch im Studienprotokoll dieser Arbeit vorgesehen, führt insbesondere zu einer Verminderung der Cyclooxygenase-1 (COX-1)-vermittelten Produktion von Thromboxan-A₂ in Thrombozyten. Dieses Prostaglandin ist für die Thrombozytenaggregation von großer Bedeutung (Hamberg et al. 1975; Vane und Botting 2003). Im Gegensatz dazu wird bei dieser geringen Dosierung von ASS die Produktion von Prostaglandin-I₂ nicht wesentlich vermindert. Prostaglandin-I₂ weist vasodilatierende und aggregationshemmende Effekte auf (Roth und Majerus 1975; Weksler et al. 1977; Catella-Lawson und Crofford 2001; Crofford 2001). Somit überwiegen die aggregationshemmenden Effekte in diesem unter physiologischen Bedingungen ausgeglichenen System.

Prostaglandine spielen bei inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle. So werden verschiedene Prostaglandine im Rahmen der initialen Entzündungsreaktion von der COX-1 produziert (McAdam et al. 2000; Smyth et al. 2009). Im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion spielt hingegen eher die COX-2 eine wichtige Rolle (Smyth et al. 2009; Patrignani und Patrono 2015). Dabei produzieren die COX als Antwort auf proinflammatorisches IL-1 β insbesondere die Prostaglandine-E₂ und -I₂, welche zahlreiche inflammatorische Prozesse anstoßen (Smyth et al. 2009; Patrignani und Patrono 2015). Durch die Hemmung der COX durch ASS werden folglich auch die

Abläufe inflammatorischer Prozesse beeinflusst, da die Produktion der Prostaglandine inhibiert wird.

In der Entstehung sowie beim Progress der Atherosklerose spielt die Thrombozytenaggregation - maßgeblich beeinflusst durch Thromboxan-A₂ - eine zentrale Rolle. So wurde bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder mit ischämischem Schlaganfall eine erhöhte Synthese von Thromboxan-A₂ festgestellt (Fitzgerald et al. 1986; Koudstaal et al. 1993; Patrignani und Patrono 2015). Wie zuvor beschrieben, inhibiert niedrigdosiertes ASS die Produktion von Thromboxan-A₂ und senkt somit das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen.

Prostaglandin-I₂ ist im Prozess der Atherosklerose insofern von Bedeutung, als es die Thrombozytenaggregation am Endothel verhindert. Somit beugt es atherosklerotischen Prozessen vor (Kelton und Blajchman 1980). Die Einnahme von selektiven COX-2-Hemmern erhöht das kardiovaskuläre Risiko, da die Prostaglandin-I₂-Synthese (produziert von der COX-2) inhibiert wird, ohne die Synthese von Thromboxan-A₂ (produziert von der COX-1) zu beeinflussen (Bresalier et al. 2005). Die Tatsache, dass die Synthese von Prostaglandin-I₂ durch die Einnahme von 100 mg ASS nicht wesentlich beeinflusst wird, trägt somit ebenfalls zum antithrombogenen Effekt der niedrigdosierten ASS-Therapie bei.

Zudem gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass ASS eine Plaque-stabilisierende Wirkung aufweist. So inhibiert ASS die Kristallisation von Cholesterol und kann zudem Cholesterolkristalle auflösen und die Beschaffenheit dieser so verändern, dass die spitzen Kristalle abstumpfen und die vulnerable Plaquekappe weniger leicht verletzen (Fry et al. 2022). All dies sind Gründe dafür, dass die niedrigdosierte Einnahme von ASS in der Therapie des CCS Anwendung findet, wie es auch im Rahmen dieser Arbeit geschehen ist.

In der Literatur ist beschrieben, dass die Einnahme von 300 mg bzw. 100 mg ASS täglich zu einer signifikanten Reduktion der Konzentration von IL-1 β im Plasma von Patienten mit Vitiligo oder Hypercholesterinämie führt (Ferroni et al. 2003; Zailaie 2005). In anderen Publikationen konnte eine Reduktion von IL-6 und CRP festgestellt werden, nicht jedoch von IL-1 β (Ikonomidis et al. 1999). Zudem ist beschrieben, dass ASS die Hochregulierung von P2X7-Rezeptoren in peritonealen Mastzellen von Mäusen reduziert und den durch BzATP induzierten Kationeneinstrom durch P2X7-Rezeptoren vermindert (Jiang et al. 2021). Es ist somit naheliegend, dass ASS über diesen Mechanismus die Freisetzung von IL-1 β reduzieren könnte. In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden. Es ist einerseits möglich, dass

ASS und Atorvastatin sich gegenseitig beeinflussen und ein eventueller Effekt durch ASS auf die IL-1 β -Freisetzung durch die Anwesenheit von Atorvastatin kaschiert wurde. Andererseits müssen Ergebnisse aus dem Tiermodell nicht zwingend auf den Menschen übertragbar sein. Zudem wurde in den Experimenten von Jiang et al. ASS den Zellen *in vitro* zugefügt. Auch dies kann einen Unterschied im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in der ASS *in vivo* eingenommen wurde, erklären (Jiang et al. 2021).

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Konzentration von IL-1 β im Blutplasma der Patienten nicht gemessen, da dieses Zytokin im menschlichen Blut eine sehr kurze Halbwertszeit hat und somit schwer nachweisbar ist. Durch die strenge Regulation der Freisetzung von IL-1 β werden zudem auch im Rahmen akuter Entzündungen oft keine erhöhten Serumspiegel gemessen. Als Ausnahme ist diesbezüglich das Krankheitsbild der Sepsis zu nennen, bei dem hohe Serumkonzentrationen von IL-1 β nachgewiesen werden können (Dinarello 2005). Es gibt in der Literatur allerdings Hinweise darauf, dass bei Patienten in unterschiedlichen Stadien des CCS erhöhte Serumkonzentrationen von IL-1 β messbar sind (Hasdai et al. 1996). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass bei den Patienten in den Untersuchungen dieser Arbeit eventuell eine Reduktion der Serumkonzentration von IL-1 β aufgetreten ist, da IL-1 β zusätzlich über andere Signalwege als den zuvor beschriebenen ausgeschüttet werden kann. Möglicherweise beeinflusst ASS auf andere Weise die Freisetzung von IL-1 β .

Wie bereits beschrieben, kann ASS mit *lipid rafts* interagieren, die Struktur dieser cholesterolreichen Membranbestandteile verändern und somit die Fluidität der Zellmembran beeinflussen (Alsop et al. 2015; Alsop et al. 2018). Es wäre also an dieser Stelle denkbar gewesen, dass die Einnahme von ASS den inhibitorischen Effekt von cholinergen Agonisten auf die Freisetzung von IL-1 β beeinflusst, da nAChR in *lipid rafts* lokalisiert sind. Die cholesterolreichen Membranbestandteile spielen eine entscheidende Rolle bei der Clusterbildung dieser Rezeptoren, die in die Abläufe der Hemmung der Freisetzung von IL-1 β involviert sind (Brusés et al. 2001; Zhu et al. 2006). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich kein Anhalt für das Zutreffen dieser Überlegungen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Einnahme von 100 mg ASS täglich zusätzlich zur Therapie mit 40 mg Atorvastatin in den Ergebnissen dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Freisetzung von IL-1 β aus angereicherten Monozyten der Patienten hat. Auch der inhibitorische Effekt nikotinerger Agonisten auf die Freisetzung von IL-1 β scheint durch die Anwesenheit von ASS nicht beeinflusst zu werden, als Ausnahme hiervon sind die zuvor diskutierten Ergebnisse mit dem nikotinergen Agonisten CRP zu nennen.

Klinische Bedeutung

Es stellt sich die Frage, was die Ergebnisse dieser Arbeit für eine klinische Bedeutung haben. Die strenge Regulation der Freisetzung von IL-1 β ist wichtig, um eine systemische Entzündungsreaktion bestmöglich zu verhindern. Die Hemmung der Freisetzung von IL-1 β durch cholinerge Agonisten ist ein Mechanismus, der zu dieser Regulation beitragen kann. Von herausragender Bedeutung ist an dieser Stelle vermutlich der cholinerge Agonist CRP, der als Akute-Phase-Protein im Rahmen von Entzündungsreaktionen ebenfalls vermehrt produziert wird (Kushner 1982). CRP wird als Antwort auf einen Stimulus durch IL-1 β und IL-6 ausgeschüttet und kann die weitere IL-1 β -Freisetzung hemmen, bewirkt also eine Feedback-Hemmung (Moshage et al. 1988; Richter et al. 2018). Wie dramatisch es sein kann, wenn eine Entzündungsreaktion außer Kontrolle gerät, ist bei schweren Verläufen einer Sepsis oder eines SIRS zu erkennen. Es gibt Situationen, die für die Entwicklung eines SIRS prädisponieren. Darunter zählen beispielsweise schwere Traumata oder ausgedehnte chirurgische Eingriffe (Chakraborty und Burns 2022).

Wäre in den Ergebnissen dieser Arbeit ein Hinweis darauf aufgetreten, dass die Einnahme von Atorvastatin die Hemmung der Freisetzung von IL-1 β durch cholinerge Agonisten beeinflusst, hätte dies als Denkanstoß für medikamentöse Empfehlungen im Rahmen von Situationen dienen können, die die Wahrscheinlichkeit für ein SIRS erhöhen. So hätte beispielsweise das Absetzen von Atorvastatin die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines SIRS verringern können. Dies gilt insbesondere für Situationen, die im Voraus planbar sind, da das Absetzen von Atorvastatin vermutlich einige Tage vor dem Ereignis erfolgen müsste. Diese Überlegung wäre somit insbesondere für elektive Operationen erstrebenswert gewesen und hätte für schwere Traumata oder Notfalloperationen keine Konsequenz gehabt. Interessanterweise entspricht das aktuelle klinische Procedere im Rahmen von Operationen eher dem Gegenteil. Aufgrund der potenziellen antiinflammatorischen und plaquestabilisierenden Wirkung des Atorvastatin soll dieses Medikament vor operativen Eingriffen bewusst weiter eingenommen werden (Bischoff 2019; Mohebi und Rosenson 2019).

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass ein derartiger Effekt in den Ergebnissen dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Einzig in den Experimenten mit CRP ist ein Effekt auf die Hemmung der Freisetzung von IL-1 β aufgetreten. Da dieser Effekt nicht nach vierwöchiger Therapie mit Atorvastatin allein, sondern erst nach der sich anschließenden vierwöchigen Kombinationstherapie mit Atorvastatin und ASS aufgetreten ist, ist nicht sicher, ob der Effekt durch Atorvastatin hervorgerufen wurde (s. Abbildung 22). Selbst wenn eine solche Aussage möglich wäre, ist die Anzahl der

durchgeführten Experimente nicht ausreichend, um eine so weitreichende klinische Entscheidung zu begründen. Sehr wohl hätte dies aber ein Anstoß für größer angelegte Untersuchungen sein können.

Der viel publizierten antiinflammatorischen Wirkung der Statine steht auch eine Vielzahl von Veröffentlichungen gegenüber, die dieser Medikamentengruppe proinflammatorische Effekte zuschreiben. So gibt es Publikationen, die eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und eine daraus resultierende vermehrte Freisetzung von IL-1 β zeigen (Liao et al. 2013; Liberale et al. 2019). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weder eine Erhöhung noch eine Verminderung der Freisetzung von IL-1 β durch Atorvastatin. Dies spricht weder für noch gegen eine antiinflammatorische Wirkung von Atorvastatin. Vermutlich ist es also kontextabhängig, ob bei Einnahme von Atorvastatin eher pro- oder antiinflammatorische Effekte beobachtet werden.

Zusammenfassung

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das eine Vielzahl wichtiger Aufgaben im Rahmen der Immunabwehr übernimmt. So induziert IL-1 β die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark sowie die Freisetzung anderer Zytokine, beispielsweise IL-6. Da eine erhöhte IL-1 β -Konzentration in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen wie der Atherosklerose eine große Rolle spielt, ist eine strenge Kontrolle der Freisetzung von IL-1 β von großer Bedeutung.

Der Stimulus durch ein *pathogen-associated molecular pattern* wie Lipopolysaccharid (LPS) bewirkt eine vermehrte Produktion des inaktiven Pro-IL-1 β und der Proteine, die das *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3* (NLRP3)-Inflammasom bilden. Ein zweiter Stimulus, beispielsweise extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) aus geschädigten Zellen, führt über eine Aktivierung des P2X7-Rezeptors zur Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms und konsekutiv zu einer Freisetzung des reifen IL-1 β .

In den letzten Jahren wurde beschrieben, dass über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR) die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β aus Monozyten gehemmt werden kann. Die Aktivierung eines nAChR führt über einen bislang ungeklärten Mechanismus zu einer Inhibition des P2X7-Rezeptors und verhindert somit die Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms. Die Einnahme von Statinen führt zu einer Hemmung der Cholesterolsynthese. Als Folge dessen kommt es zu einer Veränderung der Struktur cholesterreicher Zellmembranabschnitte, die als *lipid rafts* bezeichnet werden. Da nAChR und P2X7-Rezeptoren in *lipid rafts* lokalisiert sind, könnte die Einnahme von Statinen den zuvor beschriebenen Mechanismus beeinflussen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich die Einnahme von Atorvastatin auf die cholinerge Kontrolle der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung auswirkt.

Zu diesem Zweck wurden Monozyten aus dem Blut von Patienten angereichert, die kurz darauf eine Therapie mit Atorvastatin beginnen sollten. Nach *priming* der Zellen mit LPS wurden die Zellen für drei Stunden inkubiert, bevor 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) in An- oder Abwesenheit unterschiedlicher cholinergischer Agonisten für einen Zeitraum von 30 Minuten hinzugefügt wurde. In den Überständen wurden die Konzentration von IL-1 β sowie die Aktivität der Laktatdehydrogenase gemessen. Nach vierwöchiger Therapie mit Atorvastatin und sich daran anschließender vierwöchiger Kombinationstherapie mit Atorvastatin und Acetylsalicylsäure (ASS) wurde dieses Experiment wiederholt.

Die Ergebnisse dieser Experimente legen nahe, dass die Einnahme von Atorvastatin keinen Effekt auf die cholinerge Kontrolle der ATP-induzierten Freisetzung von IL-1 β hat.

Einzig in den Experimenten mit dem cholinergen Agonisten C-reaktives-Protein (CRP) konnte nach Kombinationstherapie mit Atorvastatin und ASS eine statistische Tendenz für eine mögliche Abschwächung seiner inhibitorischen Wirkung auf die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β beobachtet werden. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich derzeit keine Notwendigkeit, die heute gängige Therapie mit Statinen und ASS bei Patienten mit einem hohen Risiko für die Entwicklung schwerer Entzündungssyndrome zu modifizieren.

Summary

Interleukin-1 β (IL-1 β) is a pro-inflammatory cytokine, which plays an important role in immunity. It triggers, inter alia, the recruitment of neutrophil granulocytes from the bone marrow and the release of other cytokines such as IL-6. The biosynthesis and the release of IL-1 β must be strictly controlled, as increased IL-1 β levels contribute to the pathogenesis of inflammatory diseases including atherosclerosis.

In response to a pathogen-associated molecular pattern such as lipopolysaccharide (LPS), the inactive pro-IL-1 β and proteins which form the *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3* (NLRP3) inflammasome are synthesized. A second danger signal, usually a damage-associated molecular pattern like extracellular adenosinetriphosphate (ATP) originating from damaged cells, activates the P2X7 receptor, resulting in assembly of the NLRP3 inflammasome and the consecutive release of mature IL-1 β .

Recently, a cholinergic mechanism that inhibits the ATP-mediated IL-1 β release from monocytic cells via nicotinic acetylcholinereceptors (nAChRs) has been identified. The activation of nAChRs inhibits the ionotropic function of the P2X7 receptor and impairs the inflammasome assembly. Statins reduce the cellular cholesterol production, which changes the structure of cholesterol-enriched parts of the cell membrane, called lipid rafts. As nAChR and ATP receptors are typically found in lipid rafts, the use of statins may affect this mechanism. Therefore, the present work investigates whether the statin Atorvastatin affects the cholinergic control of the ATP-induced IL1- β release.

Primary monocytes were enriched from blood samples of statin-naive patients with a recently diagnosed coronary heart disease. Cells were enriched, primed with LPS and incubated for three hours. Thereafter, 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate (BzATP) was applied for 30 min in the presence or the absence of nAChR agonists. Supernatants were harvested for subsequent analyses of IL-1 β via enzyme-linked immunosorbent assay and lactate dehydrogenase activity. The experiment was

repeated after 4 weeks of daily treatment with Atorvastatin and again after 4 more weeks of daily treatment with Atorvastatin and acetylsalicylic acid (ASA).

The results of the experiments indicate that treatment with Atorvastatin does not affect the cholinergic control of the ATP-induced IL-1 β release. Only for the cholinergic agonist C-reactive-protein a statistical tendency for a possible attenuation of its inhibitory effect on the ATP-induced release of IL-1 β was seen. At present, these results do not justify a modification of the current therapy with statins and ASA in patients with a high probability to develop severe inflammatory syndromes.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Mechanismus der Adenosintriphosphat (ATP)-vermittelten Interleukin-1 β (IL-1 β)-Ausschüttung.	6
Abbildung 2. Cholinerge Inhibition der Adenosintriphosphat (ATP)-vermittelten Interleukin-1 β (IL-1 β)-Ausschüttung.	9
Abbildung 3. Cholesterolsynthese und Strukturformel von Cholesterol.	11
Abbildung 4. Prostaglandinsynthese.	16
Abbildung 5. Studienprotokoll.	22
Abbildung 6. Schematische Darstellung der Phasen nach Dichtezentrifugation.	27
Abbildung 7. Screening der Patienten.	31
Abbildung 8. Konzentration von Gesamt-cholesterol im Blutserum der Patienten im Verlauf der medikamentösen Therapie.	31
Abbildung 7. Screening der Patienten.	31
Abbildung 8. Konzentration von Gesamt-cholesterol im Blutserum der Patienten im Verlauf der medikamentösen Therapie.	33
Abbildung 9. Konzentration von <i>low density lipoprotein-associated cholesterol</i> (LDL-C) im Blutserum der Patienten im Verlauf der medikamentösen Therapie.	34
Abbildung 10. Konzentration von <i>high density lipoprotein-associated cholesterol</i> (HDL-C) im Blutserum der Patienten im Verlauf der medikamentösen Therapie.	35
Abbildung 11. Konzentration von Triglyceriden im Blutserum der Patienten im Verlauf der medikamentösen Therapie.	36
Abbildung 12. Wirkung von 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) auf die Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (a) und die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität aus ebendiesen Zellen (b).	37
Abbildung 13. Wirkung der medikamentösen Therapie auf die 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP)-vermittelte Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten zu verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.	39
Abbildung 14. Effekt verschiedener nikotinerger Agonisten auf die 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP)-vermittelte Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 1).	40
Abbildung 15. Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 1).	41

Abbildung 16. Effekt verschiedener nikotinerger Agonisten auf die 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP)-vermittelte Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 2). 42

Abbildung 17. Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 2)..... 43

Abbildung 18. Effekt verschiedener nikotinerger Agonisten auf die 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP)-vermittelte Interleukin-1 β (IL-1 β)-Freisetzung in den Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 3). 45

Abbildung 19. Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand angereicherter Monozyten (Blutentnahme 3)..... 46

Abbildung 20. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch den nikotinerger Agonisten Acetylcholin (ACh) im Verlauf der medikamentösen Therapie..... 47

Abbildung 21. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch den nikotinerger Agonisten Phosphocholin (PC) im Verlauf der medikamentösen Therapie..... 49

Abbildung 22. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch den nikotinerger Agonisten C-reaktives Protein (CRP) im Verlauf der medikamentösen Therapie. 51

Abbildung 23. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch den nikotinerger Agonisten Nikotin im Verlauf der medikamentösen Therapie. 53

Abbildung 24. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch den nikotinerger Agonisten Glycerophosphocholin (GPC) im Verlauf der medikamentösen Therapie. 55

Abbildung 25. Inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch den nikotinerger Agonisten Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) im Verlauf der medikamentösen Therapie. 57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Referenzwerte der in dieser Studie erhobenen Parameter. 30

Tabelle 2. Patientencharakteristika der eingeschlossenen Patienten..... 32

Abkürzungsverzeichnis

3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A – HMG-CoA

Absent in melanoma 2 protein – AIM2

Acetylcholin – ACh

Acetyl-Coenzym A – Acetyl-CoA

Acetylsalicylsäure – ASS

Apoptosis-associated speck-like protein – ASC

2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat – BzATP

Chronisches Koronarsyndrom – CCS

C-reaktives Protein – CRP

Cyclooxygenase-1 – COX-1

Cyclooxygenase-2 – COX-2

damage-associated molecular patterns – DAMPs

Dipalmitoylphosphatidylcholin – DPPC

Dulbecco's phosphate buffered saline – PBS

Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA

European society of cardiology – ESC

Farnesylpyrophosphat – FPP

Geranylgeranylpyrophosphat – GGPP

High density lipoprotein – HDL

High density lipoprotein-associated cholesterol – HDL-C

Interleukin-1 α – IL-1 α

Interleukin-1 β – IL-1 β

Interleukin-1-Rezeptor-Typ 1 – IL1-R1

Interleukin-1 receptor accessory protein – IL1RAcP

Interleukin-2 – IL-2

Interleukin-6 – IL-6

Intermediate density lipoprotein – IDL

Laktatdehydrogenase – LDH

Lipopolysaccharid – LPS

Lipoprotein (a) – LP(a)

Low density lipoprotein – LDL

Low density lipoprotein-associated cholesterol – LDL-C

L- α -Glycerophosphorycholin – GPC

NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 – NLRP3

Nicht-steroidale Antirheumatika – NSAR

nikotinerger Acetylcholinrezeptor – nAChR

NLR family CARD domain-containing protein 4 – NLRC4

Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells – NF- κ B

Pathogen-associated molecular patterns – PAMPs

Periphere arterielle Verschlusskrankheit – pAVK

Proteinkonvertase Subtilisin Kexin Typ 9 – PCSK9

Phosphocholin – PC

Phospholipase-A2 – PLA2

RPMI-1640-Medium – RPMI

Stickstoffmonoxid – NO

Systemic inflammatory response syndrome – SIRS

Toll-like-receptor 4 – TLR4

Tumornekrosefaktor- α – TNF- α

Very low density lipoprotein – VLDL

Literaturverzeichnis

Aboyans, V.; Ricco, J.B.; Bartelink, M.L.; Björck, M.; Brodmann, M.; Cohnert, T.; Collet, J.P.; Czerny, M.; Carlo, M.; Debus, S.; Espinola-Klein, C.; Kahan, T.; Kownator, S.; Mazzolai, L.; Naylor, A.; Roffi, M.; Röther, J.; Sprynger, M.; Tendera, M.; Tepe, G.; Venermo, M.; Vlachopoulos, C.; Desormais, I. (2018): 2017 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *European Heart Journal* 39, S. 763–821. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx095.

Adams, S.P.; Tsang, M.; Wright, J.M. (2015): Lipid-lowering efficacy of atorvastatin. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD008226. DOI: 10.1002/14651858.CD008226.pub3.

Adhyaru, B.B.; Jacobson, T.A. (2018): Safety and efficacy of statin therapy. *Nature Reviews Cardiology* 15, S. 757–769. DOI: 10.1038/s41569-018-0098-5.

Adinolfi, E.; Giuliani, A.L.; Marchi, E.; Pegoraro, A.; Orioli, E.; Di Virgilio, F. (2018): The P2X7 receptor: a main player in inflammation. *Biochemical Pharmacology* 151, S. 234–244. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.12.021.

Allen, J.A.; Halverson-Tamboli, R.A.; Rasenick, M.M. (2007): Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience* 8, S. 128–140. DOI: 10.1038/nrn2059.

Alsop, R.J.; Himbert, S.; Dhaliwal, A.; Schmalzl, K.; Rheinstädter, M.C. (2018): Aspirin locally disrupts the liquid-ordered phase. *Royal Society Open Science* 5. DOI: 10.1098/rsos.171710.

Alsop, R.J.; Topozini, L.; Marquardt, D.; Kučerka, N.; Harroun, T.A.; Rheinstädter, M.C. (2015): Aspirin inhibits formation of cholesterol rafts in fluid lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848, S. 805–812. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.11.023.

Amati, A.-L.; Zakrzewicz, A.; Siebers, R.; Wilker, S.; Heldmann, S.; Zakrzewicz, D.; Hecker, A.; McIntosh, J.M.; Padberg, W.; Grau, V. (2017): Chemokines (CCL3, CCL4, and CCL5) Inhibit ATP-induced release of IL-1 β by monocytic cells. *Mediators of Inflammation* 2017, S. 1434872. DOI: 10.1155/2017/1434872.

Artenstein, A.W.; Opal, S.M. (2011): Proprotein convertases in health and disease. *New England Journal of Medicine* 365, S. 2507–2518. DOI: 10.1056/NEJMra1106700.

Auffray, C.; Sieweke, M.H.; Geissmann, F. (2009): Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 27, S. 669–692. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557.

Backhaus, S.; Zakrzewicz, A.; Richter, K.; Damm, J.; Wilker, S.; Fuchs-Moll, G.; Küllmar, M.; Hecker, A.; Manzini, I.; Ruppert, C.; McIntosh, J.M.; Padberg, W.; Grau, V. (2017): Surfactant inhibits ATP-induced release of interleukin-1 β via nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Lipid Research* 58, S. 1055–1066. DOI: 10.1194/jlr.M071506.

Barter, P.J.; Brandrup-Wogensen, G.; Palmer, M.K.; Nicholls, S.J. (2010): Effect of statins on HDL-C: a complex process unrelated to changes in LDL-C: analysis of the VOYAGER Database. *Journal of Lipid Research* 51, S. 1546–1553. DOI: 10.1194/jlr.P002816.

Bernheim, H.A.; Block, L.H.; Atkins, E. (1979): Fever: pathogenesis, pathophysiology, and purpose. *Annals of Internal Medicine* 91, S. 261–270. DOI: 10.7326/0003-4819-91-2-261.

Bickel, P.E.; Scherer, P.E.; Schnitzer, J.E.; Oh, P.; Lisanti, M.P.; Lodish, H.F. (1997): Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 272, S. 13793–13802. DOI: 10.1074/jbc.272.21.13793.

Bischoff, M. (2019): Perioperativer Umgang mit Begleitmedikation. *Anästhesiologie und Intensivmedizin*, S. 560–571. DOI: 10.19224/ai2019.560.

Black, R.A.; Kronheim, S.R.; Sleath, P.R. (1989): Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Letters* 247, S. 386–390. DOI: 10.1016/0014-5793(89)81376-6.

Bloch, K. (1965): The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150, S. 19–28. DOI: 10.1126/science.150.3692.19.

Boraschi, D.; Italiani, P.; Weil, S.; Martin, M.U. (2018): The family of the interleukin-1 receptors. *Immunological Reviews* 281, S. 197–232. DOI: 10.1111/imr.12606.

Bresalier, R.S.; Sandler, R.S.; Quan, H.; Bolognese, J.A.; Oxenius, B.; Horgan, K.; Lines, C.; Riddell, R.; Morton, D.; Lanasa, A.; Konstam, M.A.; Baron, J.A. (2005): Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *New England Journal of Medicine* 352, S. 1092–1102. DOI: 10.1056/NEJMoa050493.

Brusés, J.L.; Chauvet, N.; Rutishauser, U. (2001): Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *The Journal of Neuroscience* 21, S. 504–512. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-02-00504.2001.

Busse, R.; Mülsch, A. (1990): Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 275, S. 87–90. DOI: 10.1016/0014-5793(90)81445-T.

Cahn, R.D.; Zwilling, E.; Kaplan, N.O.; Levine, L. (1962): Nature and development of lactic dehydrogenases: The two major types of this enzyme form molecular hybrids which change in makeup during development. *Science* 136, S. 962–969. DOI: 10.1126/science.136.3520.962.

Canè, S.; Ugel, S.; Trovato, R.; Marigo, I.; de Sanctis, F.; Sartoris, S.; Bronte, V. (2019): The endless saga of monocyte diversity. *Frontiers in Immunology* 10, S. 1786. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01786.

Carrick, J.B.; Begg, A.P. (2008): Peripheral blood leukocytes. *The Veterinary Clinics of North America: Equine practice* 24, S. 239–259. DOI: 10.1016/j.cveq.2008.05.003.

Cassatella, M.A.; Meda, L.; Bonora, S.; Ceska, M.; Constantin, G. (1993): Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine* 178, S. 2207–2211. DOI: 10.1084/jem.178.6.2207.

- Catella-Lawson, F.; Crofford, L.J. (2001): Cyclooxygenase inhibition and thrombogenicity. *The American Journal of Medicine* 110, S. 28–32. DOI: 10.1016/S0002-9343(00)00683-5.
- Cekic, C.; Linden, J. (2016): Purinergic regulation of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 16, S. 177–192. DOI: 10.1038/nri.2016.4.
- Chakraborty, R.K.; Burns, B. (2022): Systemic inflammatory response syndrome. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547669/>, zuletzt geprüft am 09.08.2022.
- Chansrichavala, P.; Chantharaksri, U.; Sritara, P.; Ngaosuwankul, N.; Chaiyaroj, S.C. (2010): Atorvastatin affects TLR4 clustering via lipid raft modulation. *International Immunopharmacology* 10, S. 892–899. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.04.027.
- Chapman, M.J. (2007): From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: a role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention. *Pharmacology and Therapeutics* 113, S. 184–196. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2006.08.005.
- Chaudhry, H.; Zhou, J.; Zhong, Y.I.N.; Ali, M.M.; McGuire, F.; Nagarkatti, P.S.; Nagarkatti, M. (2013): Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo (Athens)* 27, S. 669–684. PMID: 17070923.
- Cignarella, A.; Tedesco, S.; Cappellari, R.; Fadini, G.P. (2018): The continuum of monocyte phenotypes: Experimental evidence and prognostic utility in assessing cardiovascular risk. *Journal of Leukocyte Biology*, S. 1–8. DOI: 10.1002/JLB.5RU1217-477RR.
- Comstedt, P.; Storgaard, M.; Lassen, A.T. (2009): The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in acutely hospitalised medical patients: a cohort study. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* 17:67. DOI: 10.1186/1757-7241-17-67.
- Costa-Junior, H.M.; Sarmiento Vieira, F.; Coutinho-Silva, R. (2011): C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic Signalling* 7, S. 7–19. DOI: 10.1007/s11302-011-9215-1.
- Costantini, T.W.; Dang, X.; Coimbra, R.; Eliceiri, B.P.; Baird, A. (2015): CHRFAM7A, a human-specific and partially duplicated $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor gene with the potential to specify a human-specific inflammatory response to injury. *Journal of Leukocyte Biology* 97, S. 247–257. DOI: 10.1189/jlb.4RU0814-381R.
- Crofford, L.J. (2001): Prostaglandin biology. *Gastroenterology Clinics of North America* 30, S. 863–876. DOI: 10.1016/s0889-8553(05)70217-x.
- Dawson, P.A.; Rudel, L.L. (1999): Intestinal cholesterol absorption. *Current Opinion in Lipidology* 10, S. 315–320. DOI: 10.1097/00041433-199908000-00005.
- Di, A.; Xiong, S.; Ye, Z.; Malireddi, R.K.S.; Kometani, S.; Zhong, M.; Mittal, M.; Hong, Z.; Kanneganti, T.-D.; Rehman, J.; Malik, A.B. (2018): The TWIK2 potassium efflux channel in macrophages mediates NLRP3 inflammasome-induced inflammation. *Immunity* 49, S. 56–65. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.032.

- Di Virgilio, F.; Dal Ben, D.; Sarti, A.C.; Giuliani, A.L.; Falzoni, S. (2017): The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity* 47, S. 15–31. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.06.020.
- Diener, H.-C.; Gaul, C.; Kropp, P. (2018): Therapie der Migräneattacke und Prophylaxe der Migräne. S1-Leitlinie: *Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Online verfügbar unter www.dgn.org/leitlinien, zuletzt geprüft am 09.08.2022.
- Dinarello, C.A. (1988a): Biology of interleukin 1. *The FASEB Journal* 2, S. 108–115. DOI: 10.1096/fasebj.2.2.3277884.
- Dinarello, C.A. (1988b): Interleukin-1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 546, S. 122–132. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb21627.x.
- Dinarello, C.A. (1994): The biological properties of interleukin-1. *European Cytokine Network* 5, S. 517–531. PMID: 7727685.
- Dinarello, C.A. (2005): Interleukin-1beta. *Critical Care Medicine* 33, S. 460–462. DOI: 10.1097/01.ccm.0000185500.11080.91.
- Dinarello, C.A. (2009): Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology* 27, S. 519–550. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.
- Dinarello, C.A. (2018): Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews* 281, S. 8–27. DOI: 10.1111/imr.12621.
- Dinarello, C.A.; Simon, A.; van der Meer, J.W.M. (2012): Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 11, S. 633–652. DOI: 10.1038/nrd3800.
- Dinarello, C.A.; Wolff, S.M. (1993): The role of interleukin-1 in disease. *New England Journal of Medicine* 328, S. 106–113. DOI: 10.1056/NEJM199301143280207.
- Duewell, P.; Kono, H.; Rayner, K.J.; Sirois, C.M.; Vladimer, G.; Bauernfeind, F.G.; Abela, G.S.; Franchi, L.; Núñez, G.; Schnurr, M.; Espevik, T.; Lien, E.; Fitzgerald, K.A.; Rock, K.L.; Moore, K.J.; Wright, S.D.; Hornung, V.; Latz, E. (2010): NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, S. 1357–1361. DOI: 10.1038/nature08938.
- Emery, A.E. (1967): The determination of lactate dehydrogenase isoenzymes in normal human muscle and other tissues. *The Biochemical Journal* 105, S. 599–604. DOI: 10.1042/bj1050599.
- Feldberg, W.; Saxena, P.N. (1971): Fever produced by prostaglandin E1. *The Journal of Physiology* 217, S. 547–556. DOI: 10.1113/jphysiol.1971.sp009585.
- Ference, B.A.; Ginsberg, H.N.; Graham, I.M.; Ray, K.K.; Packard, C.J.; Bruckert, E.; Hegele, R.A.; Krauss, R.M.; Raal, F.J.; Schunkert, H.; Watts, G.F.; Borén, J.; Fazio, S.; Horton, J.D.; Masana, L.; Nicholls, S.J.; Nordestgaard, B.G.; van de Sluis, B.; Taskiran, M.-R.; Tokgözoğlu, L.; Landmesser, U.; Laufs, U.; Wiklund, O.; Stock, J.K.; Chapman, M.J.; Catapano, A.L. (2017): Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal* 38, S. 2459–2472. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx144.

- Ferrari, D.; Pizzirani, C.; Adinolfi, E.; Lemoli, R.M.; Curti, A.; Idzko, M.; Panther, E.; Di Virgilio, F. (2006): The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *Journal of Immunology* 176, S. 3877–3883. DOI: 10.4049/jimmunol.176.7.3877.
- Ferroni, P.; Martini, F.; Cardarello, C.M.; Gazzaniga, P.P.; Davi, G.; Basili, S. (2003): Enhanced interleukin-1beta in hypercholesterolemia: effects of simvastatin and low-dose aspirin. *Circulation* 108, S. 1673–1675. DOI: 10.1161/01.CIR.0000094732.02060.27.
- Finkelsztejn, E.J.; Jones, D.S.; Ma, K.C.; Pabón, M.A.; Delgado, T.; Nakahira, K.; Arbo, J.E.; Berlin, D.A.; Schenck, E.J.; Choi, A.M.K.; Siempos, I.I. (2017): Comparison of qSOFA and SIRS for predicting adverse outcomes of patients with suspicion of sepsis outside the intensive care unit. *Critical Care* 21:73. DOI: 10.1186/s13054-017-1658-5.
- Fitzgerald, D.J.; Roy, L.; Catella, F.; Fitzgerald, G.A. (1986): Platelet activation in unstable coronary disease. *New England Journal of Medicine* 315, S. 983–989. DOI: 10.1056/NEJM198610163151602.
- Fry, L.; Lee, A.; Khan, S.; Aziz, K.; Vedre, A.; Abela, G.S. (2022): Effect of aspirin on cholesterol crystallization: A potential mechanism for plaque stabilization. *American Heart Journal Plus: Cardiology Research and Practice* 13, S. 100083. DOI: 10.1016/j.ahjo.2021.100083.
- Galkina, E.; Ley, K. (2007): Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, S. 2292–2301. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.149179.
- Garcia-Marcos, M.; Pérez-Andrés, E.; Tandel, S.; Fontanils, U.; Kumps, A.; Kabré, E.; Gómez-Muñoz, A.; Marino, A.; Dehaye, J.P.; Pochet, S. (2006): Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland. *Journal of Lipid Research* 47, S. 705–714. DOI: 10.1194/jlr.M500408-JLR200.
- Giugliano, R.P.; Sabatine, M.S. (2015): Are PCSK9 inhibitors the next breakthrough in the cardiovascular field? *Journal of the American College of Cardiology* 65, S. 2638–2651. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.05.001.
- Goldfine, A.B. (2012): Statins: is it really time to reassess benefits and risks? *New England Journal of Medicine* 366, S. 1752–1755. DOI: 10.1056/NEJMp1203020.
- Goldstein, J.L.; Brown, M.S. (1990): Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, S. 425–430. DOI: 10.1038/343425a0.
- Grandt, D.; Lappe, V.; Schubert, I. (2021): BARMER Arzneimittelreport 2021. Berlin: Barmer (Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse, 29). Online verfügbar unter <https://www.barmer.de/resource/blob/1031556/2e035a16e2a35a40a8ad5f3268258f02/barmer-arzneimittelreport-2021-band-29-bifg-data.pdf>, zuletzt geprüft am 10.08.2022.
- Greenwood, J.; Steinman, L.; Zamvil, S.S. (2006): Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nature Reviews Immunology* 6, S. 358–370. DOI: 10.1038/nri1839.
- Gross, O.; Thomas, C.J.; Guarda, G.; Tschopp, J. (2011): The inflammasome: an integrated view. *Immunological Reviews* 243, S. 136–151. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01046.x.

- Guilliams, M.; Mildner, A.; Yona, S. (2018): Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity* 49, S. 595–613. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.10.005.
- Hamberg, M.; Svensson, J.; Samuelsson, B. (1975): Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, S. 2994–2998.
- Hasdai, D.; Scheinowitz, M.; Leibovitz, E.; Sclarovsky, S.; Eldar, M.; Barak, V. (1996): Increased serum concentrations of interleukin-1 beta in patients with coronary artery disease. *Heart* 76, S. 24–28. PMID: 8774323.
- Haveman, J.W.; Muller Kobold, A.C.; Cohen Tervaert, J.W.; van den Berg, A.P.; Tulleken, J.E.; Kallenberg, C.G.M.; The T.H. (1999): The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *The Netherlands Journal of Medicine* 55, S. 132–141. DOI: 10.1016/s0300-2977(98)00156-9.
- Head, B.P.; Patel, H.H.; Insel, P.A. (2014): Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838, S. 532–545. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.07.018.
- Hecker, A.; Küllmar, M.; Wilker, S.; Richter, K.; Zakrzewicz, A.; Atanasova, S.; Mathes, V.; Timm, T.; Lerner, S.; Klein, J.; Kaufmann, A.; Bauer, S.; Padberg, W.; Kummer, W.; Janciauskiene, S.; Fronius, M.; Schweda, E.K.; Lochnit, G.; Grau, V. (2015): Phosphocholine-modified macromolecules and canonical nicotinic agonists inhibit ATP-induced IL-1 β release. *Journal of Immunology* 195, S. 2325–2334. DOI: 10.4049/jimmunol.1400974.
- Heinonen, T.M.; Stein, E.; Weiss, S.R.; McKenney, J.M.; Davidson, M.; Shurzinske, L.; Black, D.M. (1996): The lipid-lowering effects of atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor: results of a randomized, double-masked study. *Clinical Therapeutics* 18, S. 853–863. DOI: 10.1016/S0149-2918(96)80045-2.
- Henriksbo, B.D.; Lau, T.C.; Cavallari, J.F.; Denou, E.; Chi, W.; Lally, J.S.; Crane, J.D.; Duggan, B.M.; Foley, K.P.; Fullerton, M.D.; Tarnopolsky, M.A.; Steinberg, G.R.; Schertzer, J.D. (2014): Fluvastatin causes NLRP3 inflammasome-mediated adipose insulin resistance. *Diabetes* 63, S. 3742–3747. DOI: 10.2337/db13-1398.
- Hornung, V.; Bauernfeind, F.G.; Halle, A.; Samstad, E.O.; Kono, H.; Rock, K.L.; Fitzgerald, K.A.; Latz, E. (2008): Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nature Immunology* 9, S. 847–856. DOI: 10.1038/ni.1631.
- Hsieh, K.M.; Blumenthal, H.T. (1956): Serum lactic dehydrogenase levels in various disease states. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 91, S. 626–630. DOI: 10.3181/00379727-91-22353.
- Humphreys, B.D.; Dubyak, G.R. (1996): Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line. *Journal of Immunology* 157, S. 5627–5637. PMID: 8955215.

Ikonomidis, I.; Andreotti, F.; Economou, E.; Stefanadis, C.; Toutouzas, P.; Nihoyannopoulos, P. (1999): Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 100, S. 793–798. DOI: 10.1161/01.cir.100.8.793.

Ipseiz, N.; Pickering, R.J.; Rosas, M.; Tyrrell, V.J.; Davies, L.C.; Orr, S.J.; Czubala, M.A.; Fathalla, D.; Robertson, A.A.B.; Bryant, C.E.; O'Donnell, V.; Taylor, P.R. (2020): Tissue-resident macrophages actively suppress IL-1beta release via a reactive prostanoid/IL-10 pathway. *The EMBO Journal* 39, S. 2207–2211. DOI: 10.15252/embj.2019103454.

Istvan, E.S.; Deisenhofer, J. (2001): Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292, S. 1160–1164. DOI: 10.1126/science.1059344.

Ito, T.; Ikeda, U.; Yamamoto, K.; Shimada, K. (2002): Regulation of interleukin-8 expression by HMG-CoA reductase inhibitors in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 165, S. 51–55. DOI: 10.1016/s0021-9150(02)00194-6.

Jiang, Y.; Ye, F.; Du, Y.; Zong, Y.; Tang, Z. (2021): P2X7R in mast cells is a potential target for salicylic acid and aspirin in treatment of inflammatory pain. *Journal of Inflammation Research* 14, S. 2913–2931. DOI: 10.2147/JIR.S313348.

Kanneganti, T.-D.; Ozören, N.; Body-Malapel, M.; Amer, A.; Park, J.-H.; Franchi, L.; Whitfield, J.; Barchet, W.; Colonna, M.; Vandenabeele, P.; Bertin, J.; Coyle, A.; Grant, E.P.; Akira, S.; Núñez, G. (2006): Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440, S. 233–236. DOI: 10.1038/nature04517.

Karasawa, A.; Michalski, K.; Mikhelzon, P.; Kawate, T. (2017): The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.31186.

Karasawa, T.; Takahashi, M. (2017): Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 24, S. 443–451. DOI: 10.5551/jat.RV17001.

Katsnelson, M.A.; Rucker, L.G.; Russo, H.M.; Dubyak, G.R. (2015): K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. *Journal of Immunology* 194, S. 3937–3952. DOI: 10.4049/jimmunol.1402658.

Kawabata, A. (2011): Prostaglandin E2 and pain—an update. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34, S. 1170–1173. DOI: 10.1248/bpb.34.1170.

Kawano, A.; Tsukimoto, M.; Noguchi, T.; Hotta, N.; Harada, H.; Takenouchi, T.; Kitani, H.; Kojima, S. (2012): Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419, S. 374–380. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.156.

Kelton, J.G.; Blajchman, M.A. (1980): Prostaglandin I2 (prostacyclin). *Canadian Medical Association Journal* 122, S. 175–179. PMID: 6988063.

Kilian, P.L.; Kaffka, K.L.; Stern, A.S.; Woehle, D.; Benjamin, W.R.; Dechiara, T.M.; Gubler, U.; Farrar, J.J.; Mizel, S.B.; Lomedico, P.T. (1986): Interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta bind to the same receptor on T cells. *Journal of Immunology* 136, S. 4509–4514.

- Kirac, D.; Bayam, E.; Dagdelen, M.; Gezmis, H.; Sarikaya, S.; Pala, S.; Altunok, E.C.; Genc, E. (2017): HMGCR and ApoE mutations may cause different responses to lipid lowering statin therapy. *Cellular and Molecular Biology* 63, S. 43–48. DOI: 10.14715/cmb/2017.63.10.6.
- Kirsch, C.; Eckert, G.P.; Mueller, W.E. (2003): Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochemical Pharmacology* 65, S. 843–856. DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01654-4.
- Kleindorfer, D.O.; Towfighi, A.; Chaturvedi, S.; Cockroft, K.M.; Gutierrez, J.; Lombardi-Hill, D.; Kamel, H.; Kernan, W.N.; Kittner, S.; Leira, E.C.; Lennon, O.; Meschia, J.F.; Nguyen, T.N.; Pollak, P.M.; Santangeli, P.; Sharrief, A.Z.; Smith, S.C.; Turan, T.N.; Williams, L.S. (2021): 2021 Guideline for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: A guideline from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 52, S. 364–467. DOI: 10.1161/STR.0000000000000375.
- Knuuti, J.; Wijns, W.; Saraste, A.; Capodanno, D.; Barbato, E.; Funck-Brentano, C.; Prescott, E.; Storey, R.F.; Deaton, C.; Cuisset, T.; Agewall, S.; Dickstein, K.; Edvardsen, T.; Escaned, J.; Gersh, B.J.; Svitil, P.; Gilard, M.; Hasdai, D.; Hatala, R.; Mahfoud, F.; Masip, J.; Muneretto, C.; Valgimigli, M.; Achenbach, S.; Bax, J.J. (2020): 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *European Heart Journal* 41, S. 407–477. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz425.
- Komada, T.; Usui, F.; Kawashima, A.; Kimura, H.; Karasawa, T.; Inoue, Y.; Kobayashi, M.; Mizushina, Y.; Kasahara, T.; Taniguchi, S.; Muto, S.; Nagata, D.; Takahashi, M. (2015): Role of NLRP3 inflammasomes for rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Scientific Reports* 5:10901. DOI: 10.1038/srep10901.
- Kostura, M.J.; Tocci, M.J.; Limjuco, G.; Chin, J.; Cameron, P.; Hillman, A.G.; Chartrain, N.A.; Schmidt, J.A. (1989): Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, S. 5227–5231. PMID: 2787508.
- Koudstaal, P.J.; Ciabattini, G.; van Gijn, J.; Nieuwenhuis, H.K.; de Groot, P.G.; Sixma, J.J.; Patrono, C. (1993): Increased thromboxane biosynthesis in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* 24, S. 219–223. DOI: 10.1161/01.str.24.2.219.
- Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P.D. (2018): Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols* 2018, S. 465–468. DOI: 10.1101/pdb.prot095497.
- Kushner, I. (1982): The phenomenon of the acute phase response. *Annals of the New York Academy of Sciences* 389, S. 39–48. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1982.tb22124.x.
- Lagrost, L.; Girard, C.; Grosjean, S.; Masson, D.; Deckert, V.; Gautier, T.; Debomy, F.; Vinault, S.; Jeannin, A.; Labbé, J.; Bonithon-Kopp, C. (2014): Low preoperative cholesterol level is a risk factor of sepsis and poor clinical outcome in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Critical Care Medicine* 42, S. 1065–1073. DOI: 10.1097/CCM.000000000000165.
- Lamkanfi, M.; Dixit, V.M. (2014): Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, S. 1013–1022. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.007.

Langhorst, M.F.; Reuter, A.; Stuermer, C.A.O. (2005): Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, S. 2228–2240. DOI: 10.1007/s00018-005-5166-4.

Langlois, M.R.; Nordestgaard, B.G. (2018): Which lipids should be analyzed for diagnostic workup and follow-up of patients with hyperlipidemias? *Current Cardiology Reports* 20, S. 1–14. DOI: 10.1007/s11886-018-1036-1.

Le Feuvre, R.A.; Brough, D.; Iwakura, Y.; Takeda, K.; Rothwell, N.J. (2002): Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *The Journal of Biological Chemistry* 277, S. 3210–3218. DOI: 10.1074/jbc.M104388200.

Lea, A.P.; McTavish, D. (1997): Atorvastatin. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidaemias. *Drugs* 53, S. 828–847. DOI: 10.2165/00003495-199753050-00011.

Legrand, C.; Bour, J.M.; Jacob, C.; Capiamont, J.; Martial, A.; Marc, A.; Wudtke, M.; Kretzmer, G.; Demangel, C.; Duval, D.; Hache, J. (1992): Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *Journal of Biotechnology* 25, S. 231–243. DOI: 10.1016/0168-1656(92)90158-6.

Li, D. (2001): Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovascular Research* 52, S. 130–135. DOI: 10.1016/S0008-6363(01)00371-6.

Li, Z.; Wang, Z.; Shen, B.; Chen, C.; Ding, X.; Song, H. (2020): Effects of aspirin on the gastrointestinal tract: pros vs. cons. *Oncology Letters* 20, S. 2567–2578. DOI: 10.3892/ol.2020.11817.

Liao, Y.-H.; Lin, Y.C.; Tsao, S.-T.; Lin, Y.-C.; Yang, A.-J.; Huang, C.-T.; Huang, K.-C.; Lin, W.W. (2013): HMG-CoA reductase inhibitors activate caspase-1 in human monocytes depending on ATP release and P2X7 activation. *Journal of Leukocyte Biology* 93, S. 289–299. DOI: 10.1189/jlb.0812409.

Libby, P. (2013): Collagenases and cracks in the plaque. *The Journal of Clinical Investigation* 123, S. 3201–3203. DOI: 10.1172/JCI67526.

Libby, P. (2021): The changing landscape of atherosclerosis. *Nature* 592, S. 524–533. DOI: 10.1038/s41586-021-03392-8.

Liberale, L.; Carbone, F.; Camici, G.G.; Montecucco, F. (2019): IL-1 β and statin treatment in patients with myocardial infarction and diabetic cardiomyopathy. *Journal of Clinical Medicine* 8, S. 1764. DOI: 10.3390/jcm8111764.

Liu, L.; Pilch, P.F. (2008): A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *The Journal of Biological Chemistry* 283, S. 4314–4322. DOI: 10.1074/jbc.M707890200.

Ludwig, W.-D.; Mühlbauer, B.; Seifert, R. (Hg.) (2021): *Arzneiverordnungs-Report 2021*. 1. Aufl. 2021. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1960417>, zuletzt geprüft am 10.08.2022.

- Ma, W.-T.; Gao, F.; Gu, K.; Chen, D.K. (2019): The role of monocytes and macrophages in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Frontiers in Immunology* 10:1140. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01140.
- Mach, F.; Baigent, C.; Catapano, A.L.; Koskinas, K.C.; Casula, M.; Badimon, L.; Chapman, M.J.; de Backer, G.G.; Delgado, V.; Ference, B.A.; Graham, I.M.; Halliday, A.; Landmesser, U.; Mihaylova, B.; Pedersen, T.R.; Riccardi, G.; Richter, D.J.; Sabatine, M.S.; Taskinen, M.-R.; Tokgözoğlu, L.; Wiklund, O. (2019): 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal*. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz455.
- Mahley, R.W.; Innerarity, T.L.; Rall, S.C.; Weisgraber, K.H. (1984): Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research* 25, S. 1277–1294. PMID: 6099394.
- March, C.J.; Mosley, B.; Larsen, A.; Cerretti, D.P.; Braedt, G.; Price, V.; Gillis, S.; Henney, C.S.; Kronheim, S.R.; Grabstein, K. (1985): Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315, S. 641–647. DOI: 10.1038/315641a0.
- Mariathasan, S.; Weiss, D.S.; Newton, K.; McBride, J.; O'Rourke, K.; Roose-Girma, M.; Lee, W.P.; Weinrauch, Y.; Monack, D.M.; Dixit, V.M. (2006): Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, S. 228–232. DOI: 10.1038/nature04515.
- Markert, C.L. (1984): Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. *Cell Biochemistry and Function* 2, S. 131–134. DOI: 10.1002/cbf.290020302.
- Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J. (2002): The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell* 10, S. 417–426.
- Martín-Sánchez, C.; Alés, E.; Balseiro-Gómez, S.; Atienza, G.; Arnalich, F.; Bordas, A.; Cedillo, J.L.; Extremera, M.; Chávez-Reyes, A.; Montiel, C. (2021): The human-specific duplicated $\alpha 7$ gene inhibits the ancestral $\alpha 7$, negatively regulating nicotinic acetylcholine receptor-mediated transmitter release. *The Journal of Biological Chemistry* 296, S. 247–257. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100341.
- McAdam, B.F.; Mardini, I.A.; Habib, A.; Burke, A.; Lawson, J.A.; Kapoor, S.; Fitzgerald, G.A. (2000): Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* 105, S. 1473–1482. DOI: 10.1172/JCI9523.
- Mistafa, O.; Högberg, J.; Stenius, U. (2008): Statins and ATP regulate nuclear pAkt via the P2X7 purinergic receptor in epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 365, S. 131–136. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.10.148.
- Mistafa, O.; Stenius, U. (2009): Statins inhibit Akt/PKB signaling via P2X7 receptor in pancreatic cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 78, S. 1115–1126. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.06.016.
- Mohebi, R.; Rosenson, R. (2019): Statins in the perioperative period. *F1000Research* 8. DOI: 10.12688/f1000research.17572.1.

Moshage, H.J.; Roelofs, H.M.J.; van Pelt, J.F.; Hazenberg, B.P.C.; van Leeuwen, M.A.; Limburg, P.C.; Aarden, L.A.; Yap, S.H. (1988): The effect of interleukin-1, interleukin-6 and its interrelationship on the synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in primary cultures of adult human hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 155, S. 112–117. DOI: 10.1016/S0006-291X(88)81056-8.

Mueller, Y.M.; de Rosa, S.C.; Hutton, J.A.; Witek, J.; Roederer, M.; Altman, J.D.; Katsikis, P.D. (2001): Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8+ T cells. *Immunity* 15, S. 871–882. DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00246-1.

Munro, S. (2003): Lipid rafts. *Cell* 115, S. 377–388. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00882-1.

Murphy, E.; Curneen, J.M.G.; McEvoy, J.W. (2021): Aspirin in the modern era of cardiovascular disease prevention. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal* 17, S. 36–47. DOI: 10.14797/mdcvj.293.

Nawrocki, J.W.; Weiss, S.R.; Davidson, M.; Sprecher, D.L.; Schwartz, S.L.; Lupien, P.J.; Jones, P.H.; Haber, H.E.; Black, D.M. (1995): Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15, S. 678–682. DOI: 10.1161/01.atv.15.5.678.

Oppenheim, J.J.; Kovacs, E.J.; Matsushima, K.; Durum, S.K. (1986): There is more than one interleukin 1. *Immunology Today* 7, S. 45–56. DOI: 10.1016/0167-5699(86)90124-6.

Ortego, M.; Bustos, C.; Hernández-Presa, M.A.; Tuñón, J.; Díaz, C.; Hernández, G.; Egido, J. (1999): Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 147, S. 253–261. DOI: 10.1016/s0021-9150(99)00193-8.

Owsiany, K.M.; Alencar, G.F.; Owens, G.K. (2019): Revealing the origins of foam cells in atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39, S. 836–838. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.312557.

Ozaki, E.; Campbell, M.; Doyle, S.L. (2015): Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *Journal of Inflammation Research* 8, S. 15–27. DOI: 10.2147/JIR.S51250.

Pasta, A.; Cremonini, A.L.; Pisciotta, L.; Buscaglia, A.; Porto, I.; Barra, F.; Ferrero, S.; Brunelli, C.; Rosa, G.M. (2020): PCSK9 inhibitors for treating hypercholesterolemia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 21, S. 353–363. DOI: 10.1080/14656566.2019.1702970.

Patrignani, P.; Patrono, C. (2015): Cyclooxygenase inhibitors: from pharmacology to clinical read-outs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1851, S. 422–432. DOI: 10.1016/j.bbali.2014.09.016.

Pelegrin, P. (2021): P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: partners in crime. *Biochemical Pharmacology* 187, S. 3210–3218. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114385.

Pepys, M.B.; Hirschfield, G.M. (2003): C-reactive protein: a critical update. *The Journal of Clinical Investigation* 111, S. 1805–1812. DOI: 10.1172/JCI18921.

- Perego, C.; Da Dalt, L.; Pirillo, A.; Galli, A.; Catapano, A.L.; Norata, G.D. (2019): Cholesterol metabolism, pancreatic β -cell function and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1865, S. 2149–2156. DOI: 10.1016/j.bbadis.2019.04.012.
- Perneby, C.; Wallén, N.H.; Rooney, C.; Fitzgerald, D.J.; Hjerdahl, P. (2006): Dose- and time-dependent antiplatelet effects of aspirin. *Thrombosis and Haemostasis* 95, S. 652–658. DOI: 10.1160/TH05-10-0653.
- Pétrilli, V.; Papin, S.; Dostert, C.; Mayor, A.; Martinon, F.; Tschopp, J. (2007): Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation* 14, S. 1583–1589. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402195.
- Preiss, D.; Seshasai, S.R.K.; Welsh, P.; Murphy, S.A.; Ho, J.E.; Waters, D.D.; DeMicco, D.A.; Barter, P.J.; Cannon, C.P.; Sabatine, M.S.; Braunwald, E.; Kastelein, J.J.P.; de Lemos, J.A.; Blazing, M.A.; Pedersen, T.R.; Tikkanen, M.J.; Sattar, N.; Ray, K.K. (2011): Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy: a meta-analysis. *Journal of the American Medical Association* 305, S. 2556–2564. DOI: 10.1001/jama.2011.860.
- Rajamäki, K.; Lappalainen, J.; Öörni, K.; Välimäki, E.; Matikainen, S.; Kovanen, P.T.; Eklund, K.K. (2010): Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *Plos One* 5. DOI: 10.1371/journal.pone.0011765.
- Richter, K.; Mathes, V.; Fronius, M.; Althaus, M.; Hecker, A.; Krasteva-Christ, G.; Padberg, W.; Hone, A.J.; McIntosh, J.M.; Zakrzewicz, A.; Grau, V. (2016): Phosphocholine – an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of α 9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Scientific Reports* 6:28660. DOI: 10.1038/srep28660.
- Richter, K.; Sagawe, S.; Hecker, A.; Küllmar, M.; Askevold, I.; Damm, J.; Heldmann, S.; Pöhlmann, M.; Ruhrmann, S.; Sander, M.; Schlüter, K.-D.; Wilker, S.; König, I.R.; Kummer, W.; Padberg, W.; Hone, A.J.; McIntosh, J.M.; Zakrzewicz, A.; Koch, C.; Grau, V. (2018): C-reactive protein stimulates nicotinic acetylcholine receptors to control ATP-mediated monocytic inflammasome activation. *Frontiers in Immunology* 9:1604. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01604.
- Ridker, P.M.; Cannon, C.P.; Morrow, D.; Rifai, N.; Rose, L.M.; McCabe, C.H.; Pfeffer, M.A.; Braunwald, E. (2005): C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *New England Journal of Medicine* 352, S. 20–28. DOI: 10.1056/NEJMoa042378.
- Ridker, P.M.; Danielson, E.; Fonseca, F.; Genest, J.; Gotto, A.M.; Kastelein, J.J.P.; Koenig, W.; Libby, P.; Lorenzatti, A.; MacFadyen, J.G.; Nordestgaard, B.G.; Shepherd, J.; Willerson, J.T.; Glynn, R.J. (2008): Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *New England Journal of Medicine* 359, S. 2195–2207. DOI: 10.1056/NEJMoa0807646.
- Ridker, P.M.; Everett, B.M.; Thuren, T.; MacFadyen, J.G.; Chang, W.H.; Ballantyne, C.; Fonseca, F.; Nicolau, J.; Koenig, W.; Anker, Stefan D.; Kastelein, J.J.P.; Cornel, J.H.; Pais, P.; Pella, D.; Genest, J.; Cifkova, R.; Lorenzatti, A.; Forster, T.; Kobalava, Z.; Vida-Simiti, L.; Flather, M.; Shimokawa, H.; Ogawa, H.; Dellborg, M.; Rossi, P.R.F.; Troquay, R.P.T.; Libby, P.; Glynn, R.J. (2017): Antiinflammatory therapy with

- canakinumab for atherosclerotic disease. *New England Journal of Medicine* 377, S. 1119–1131. DOI: 10.1056/NEJMoa1707914.
- Ridker, P.M.; Rifai, N.; Clearfield, M.; Downs, J.R.; Weis, S.E.; Miles, J.S.; Gotto, A.M. (2001): Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *New England Journal of Medicine* 344, S. 1959–1965. DOI: 10.1056/NEJM200106283442601.
- Robbins, C.S.; Hilgendorf, I.; Weber, G.F.; Theurl, I.; Iwamoto, Y.; Figueiredo, J.-L.; Gorbатов, R.; Sukhova, G.K.; Gerhardt, L.M.S.; Smyth, D.; Zavitz, C.C.J.; Shikatani, E.A.; Parsons, M.; van Rooijen, N.; Lin, H.Y.; Husain, M.; Libby, P.; Nahrendorf, M.; Weissleder, R.; Swirski, F.K. (2013): Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nature Medicine* 19, S. 1166–1172. DOI: 10.1038/nm.3258.
- Robinson, L.E.; Shridar, M.; Smith, P.; Murrell-Lagnado, R.D. (2014): Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. *The Journal of Biological Chemistry* 289, S. 31983–31994. DOI: 10.1074/jbc.M114.574699.
- Rondeau, J.-M.; Ramage, P.; Zurini, M.; Gram, H. (2015): The molecular mode of action and species specificity of canakinumab, a human monoclonal antibody neutralizing IL-1 β . *mAbs* 7, S. 1151–1160. DOI: 10.1080/19420862.2015.1081323.
- Roth, G.J.; Majerus, P.W. (1975): The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. *The Journal of Clinical Investigation* 56, S. 624–632. DOI: 10.1172/JCI108132.
- Rothberg, K.G.; Heuser, J.E.; Donzell, W.C.; Ying, Y.S.; Glenney, J.R.; Anderson, R.G. (1992): Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, S. 673–682. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90143-z.
- Rubartelli, A.; Cozzolino, F.; Talio, M.; Sitia, R. (1990): A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO Journal* 9, S. 1503–1510. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08268.x.
- Satoh, M.; Ogita, H.; Takeshita, K.; Mukai, Y.; Kwiatkowski, D.J.; Liao, J.K. (2006): Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, S. 7432–7437. DOI: 10.1073/pnas.0510444103.
- Sborgi, L.; Rühl, S.; Mulvihill, E.; Pipercevic, J.; Heilig, R.; Stahlberg, H.; Farady, C.J.; Müller, D.J.; Broz, P.; Hiller, S. (2016): GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *The EMBO Journal* 35, S. 1766–1778. DOI: 10.15252/embj.201694696.
- Schade, D.S.; Shey, L.; Eaton, R.P. (2020): Cholesterol review: a metabolically important molecule. *Endocrine Practice* 26, S. 1514–1523. DOI: 10.4158/EP-2020-0347.
- Scherer, P.E.; Okamoto, T.; Chun, M.; Nishimoto, I.; Lodish, H.F.; Lisanti, M.P. (1996): Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, S. 131–135. DOI: 10.1073/pnas.93.1.131.

- Schrott, H.; Fereshetian, A.G.; Knopp, R.H.; Bays, H.; Jones, P.H.; Littlejohn, T.W.; McLain, R.; Black, D.M. (1998): A multicenter, placebo-controlled, dose-ranging study of atorvastatin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 3, S. 119–124. DOI: 10.1177/107424849800300204.
- Seifert, R. (2021): *Basiswissen Pharmakologie*. 2. Aufl. 2021. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <https://link-springer-com.ezproxy.uni-giessen.de/content/pdf/10.1007%2F978-3-662-60504-2.pdf>, zuletzt geprüft am 10.08.2022. DOI: 10.1007/978-3-662-60504-2.
- Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. (2017): The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18, S. 361–374. DOI: 10.1038/nrm.2017.16.
- Shi, J.; Zhao, Y.; Wang, K.; Shi, X.; Wang, Y.; Huang, H.; Zhuang, Y.; Cai, T.; Wang, F.; Shao, F. (2015): Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526, S. 660–665. DOI: 10.1038/nature15514.
- Shimada, K.; Crother, T.R.; Karlin, J.; Dagvadorj, J.; Chiba, N.; Chen, S.; Ramanujan, V.K.; Wolf, A.J.; Vergnes, L.; Ojcius, D.M.; Rentsendorj, A.; Vargas, M.; Guerrero, C.; Wang, Y.; Fitzgerald, K.A.; Underhill, D.M.; Town, T.; Arditi, M. (2012): Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 36, S. 401–414. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.01.009.
- Siebers, K.; Fink, B.; Zakrzewicz, A.; Agné, A.; Richter, K.; Konzok, S.; Hecker, A.; Zukunft, S.; Küllmar, M.; Klein, J.; McIntosh, J.M.; Timm, T.; Sewald, K.; Padberg, W.; Aggarwal, N.; Chamulitrat, W.; Santoso, S.; Xia, W.; Janciauskiene, S.; Grau, V. (2018): Alpha-1 antitrypsin inhibits ATP-mediated release of interleukin-1 β via CD36 and nicotinic acetylcholine receptors. *Frontiers in Immunology* 9:877. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00877.
- Sluyter, R. (2017): The P2X7 receptor. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1051, S. 17–53. DOI: 10.1007/5584_2017_59.
- Smith, J.B.; Willis, A.L. (1971): Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature New biology* 231, S. 235–237. DOI: 10.1038/newbio231235a0.
- Smyth, E.M.; Grosser, T.; Wang, M.; Yu, Y.; Fitzgerald, G.A. (2009): Prostanoids in health and disease. *Journal of Lipid Research* 50, S. 423–428. DOI: 10.1194/jlr.R800094-JLR200.
- Sproston, N.R.; Ashworth, J.J. (2018): Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Frontiers in Immunology* 9:754. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00754.
- Srinivasula, S.M.; Poyet, J.-L.; Razmara, M.; Datta, P.; Zhang, Z.; Alnemri, E.S. (2002): The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *The Journal of Biological Chemistry* 277, S. 21119–21122. DOI: 10.1074/jbc.C200179200.
- Stern, R.H.; Yang, B.-B.; Hounslow, N.J.; MacMahon, M.; Abel, R.B.; Olson, S.C. (2000): Pharmacodynamics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of atorvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor. *Journal of Clinical Pharmacology* 40, S. 616–623. DOI: 10.1002/j.1552-4604.2000.tb05987.x.

- Stout, M.C.; Asiimwe, E.; Birkenstamm, J.R.; Kim, S.Y.; Campbell, P.M. (2014): Analyzing Ras-associated cell proliferation signaling. *Methods in Molecular Biology* 1170, S. 393–409. DOI: 10.1007/978-1-4939-0888-2_21.
- Stroes, E.; Colquhoun, D.; Sullivan, D.; Civeira, F.; Rosenson, R.; Watts, G.F.; Bruckert, E.; Cho, L.; Dent, R.; Knusel, B.; Xue, A.; Scott, R.; Wasserman, S.M.; Rocco, M. (2014): Anti-PCSK9 antibody effectively lowers cholesterol in patients with statin intolerance: the GAUSS-2 randomized, placebo-controlled phase 3 clinical trial of evolocumab. *Journal of the American College of Cardiology* 63, S. 2541–2548. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.03.019.
- Takeuchi, K. (2014): Gastric cytoprotection by prostaglandin E₂ and prostacyclin: relationship to EP1 and IP receptors. *Journal of Physiology and Pharmacology* 65, S. 3–14. PMID: 24622825.
- Tang, Z.; Scherer, P.E.; Okamoto, T.; Song, K.; Chu, C.; Kohtz, D.S.; Nishimoto, I.; Lodish, H.F.; Lisanti, M.P. (1996): Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *The Journal of Biological Chemistry* 271, S. 2255–2261. DOI: 10.1074/jbc.271.4.2255.
- Tawakol, A.; Fayad, Z.A.; Mogg, R.; Alon, A.; Klimas, M.T.; Dansky, H.; Subramanian, S.S.; Abdelbaky, A.; Rudd, J.H.F.; Farkouh, M.E.; Nunes, I.O.; Beals, C.R.; Shankar, S.S. (2013): Intensification of statin therapy results in a rapid reduction in atherosclerotic inflammation: results of a multicenter fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography feasibility study. *Journal of the American College of Cardiology* 62, S. 909–917. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.04.066.
- Tedgui, A.; Mallat, Z. (2006): Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews* 86, S. 515–581. DOI: 10.1152/physrev.00024.2005.
- Thom, T.; Haase, N.; Rosamond, W.; Howard, V.J.; Rumsfeld, J.; Manolio, T.; Zheng, Z.-J.; Flegal, K.; O'Donnell, C.; Kittner, S.; Lloyd-Jones, D.; Goff, D.C.; Hong, Y.; Adams, R.; Friday, G.; Furie, K.; Gorelick, P.; Kissela, B.; Marler, J.; Meigs, J.; Roger, V.; Sidney, S.; Sorlie, P.; Steinberger, J.; Wasserthiel-Smoller, S.; Wilson, M.; Wolf, P. (2006): Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association statistics committee and stroke statistics subcommittee. *Circulation* 113, S. 85–151. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.171600.
- Thompson, A.; Gao, P.; Orfei, L.; Watson, S.; Di Angelantonio, E.; Kaptoge, S.; Ballantyne, C.; Cannon, C.P.; Criqui, M.; Cushman, M.; Hofmann, A.; Packard, C.J.; Thompson, S.G.; Collins, R.; Danesh, J. (2010): Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *The Lancet* 375, S. 1536–1544. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60319-4.
- Thorat, M.A.; Cuzick, J. (2015): Prophylactic use of aspirin: systematic review of harms and approaches to mitigation in the general population. *European Journal of Epidemiology* 30, S. 5–18. DOI: 10.1007/s10654-014-9971-7.
- Tobert, J.A.; Bell, G.D.; Birtwell, J.; James, I.; Kukovetz, W.R.; Pryor, J.S.; Buntinx, A.; Holmes, I.B.; Chao, Y.S.; Bolognese, J.A. (1982): Cholesterol-lowering effect of mevinolin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase, in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Investigation* 69, S. 913–919. DOI: 10.1172/jci110530.

- Trompet, S.; Postmus, I.; Slagboom, P.E.; Heijmans, B.T.; Smit, R.A.J.; Maier, A.B.; Buckley, B.M.; Sattar, N.; Stott, D.J.; Ford, I.; Westendorp, R.G.J.; de Craen, A.J.M.; Jukema, J.W. (2015): Non-response to (statin) therapy: the importance of distinguishing non-responders from non-adherers in pharmacogenetic studies. *European Journal of Clinical Pharmacology* 72, S. 431–437. DOI: 10.1007/s00228-015-1994-9.
- Usui, F.; Shirasuna, K.; Kimura, H.; Tatsumi, K.; Kawashima, A.; Karasawa, T.; Yoshimura, K.; Aoki, H.; Tsutsui, H.; Noda, T.; Sagara, J.; Taniguchi, S.; Takahashi, M. (2015): Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35, S. 127–136. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303763.
- Vajjhala, P.R.; Mirams, R.E.; Hill, J.M. (2012): Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. *The Journal of Biological Chemistry* 287, S. 41732–41743. DOI: 10.1074/jbc.M112.381228.
- van der Most, P.J.; Dolga, A.M.; Nijholt, I.M.; Luiten, P.G.M.; Eisel, U.L.M. (2009): Statins: mechanisms of neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 88, S. 64–75. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2009.02.002.
- van Furth, R.; Cohn, Z.A. (1968): The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 128, S. 415–435. DOI: 10.1084/jem.128.3.415.
- Vanaja, S.K.; Rathinam, V.A.K.; Fitzgerald, K.A. (2015): Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in Cell Biology* 25, S. 308–315. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.12.009.
- Vane, J.R. (1971): Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New biology* 231, S. 232–235. DOI: 10.1038/newbio231232a0.
- Vane, J.R.; Botting, R.M. (2003): The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research* 110, S. 255–258. DOI: 10.1016/s0049-3848(03)00379-7.
- Vincent, J.-L.; Opal, S.M.; Marshall, J.C.; Tracey, K.J. (2013): Sepsis definitions: time for change. *The Lancet* 381, S. 774–775. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61815-7.
- Wang, D. Q.-H. (2007): Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annual Review of Physiology* 69, S. 221–248. DOI: 10.1146/annurev.physiol.69.031905.160725.
- Weber, A.; Wasiliew, P.; Kracht, M. (2010): Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science Signaling* 3, S. 1-6. DOI: 10.1126/scisignal.3105cm1.
- Weksler, B.B.; Marcus, A.J.; Jaffe, E.A. (1977): Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, S. 3922–3926. DOI: 10.1073/pnas.74.9.3922.
- Yang, Y.; Wang, H.; Kouadir, M.; Song, H.; Shi, F. (2019): Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death and Disease* 10, S. 1–11. DOI: 10.1038/s41419-019-1413-8.
- Yiangou, Y.; Facer, P.; Durrenberger, P.; Chessell, I.P.; Naylor, A.; Bountra, C.; Banati, R.R.; Anand, P. (2006): COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in

activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurology* 6. DOI: 10.1186/1471-2377-6-12.

Yokota, K.; Miyazaki, T.; Hirano, M.; Akiyama, Y.; Mimura, T. (2006): Simvastatin inhibits production of interleukin 6 (IL-6) and IL-8 and cell proliferation induced by tumor necrosis factor-alpha in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 33, S. 463–471. PMID: 16511915.

Yurdagul, A.; Doran, A.C.; Cai, B.; Fredman, G.; Tabas, I.A. (2018): Mechanisms and consequences of defective efferocytosis in atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 4:86. DOI: 10.3389/fcvm.2017.00086.

Zailaie, M.Z. (2005): Decreased proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from vitiligo patients following aspirin treatment. *Saudi Medical Journal* 26, S. 799–805. PMID: 15951873.

Zakrzewicz, A.; Richter, K.; Agné, A.; Wilker, S.; Siebers, K.; Fink, B.; Krasteva-Christ, G.; Althaus, M.; Padberg, W.; Hone, A.J.; McIntosh, J.M.; Grau, V. (2017): Canonical and novel non-canonical cholinergic agonists inhibit ATP-induced release of monocytic interleukin-1 β via different combinations of nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 7$, $\alpha 9$ and $\alpha 10$. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11:189. DOI: 10.3389/fncel.2017.00189.

Zhu, D.; Xiong, W.C.; Mei, L. (2006): Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *The Journal of Neuroscience* 26, S. 4841–4851. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2807-05.2006.

Ziegler-Heitbrock, H.W. (2000): Definition of human blood monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 67, S. 603–606. DOI: 10.1002/jlb.67.5.603.

Ziegler-Heitbrock, L.; Ancuta, P.; Crowe, S.; Dalod, M.; Grau, V.; Hart, D.N.; Leenen, P.J.M.; Liu, Y.-J.; MacPherson, G.; Randolph, G.J.; Scherberich, J.; Schmitz, J.; Shortman, K.; Sozzani, S.; Strobl, H.; Zembala, M.; Austyn, J.M.; Lutz, M.B. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, 74-80. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.

Zoli, M.; Pucci, S.; Vilella, A.; Gotti, C. (2018): Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Current Neuropharmacology* 16, S. 338–349. DOI: 10.2174/1570159X15666170912110450.

Zucker-Franklin, D. (1974): The percentage of monocytes among "mononuclear" cell fractions obtained from normal human blood. *Journal of Immunology* 112, S. 234–240. PMID: 4521396.

Publikationsverzeichnis

Posterbeiträge

2019 – Posterpräsentation im Rahmen des dritten „Science Day“ am Fachbereich

Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen am 01.11.2019

Leon Brandenburg; Sigrid Wilker; Alisa Agné; Winfried Padberg; Ali Erdogan; Oliver Dörr; Veronika Grau.

Effect of Atorvastatin on the cholinergic inhibition of the ATP-mediated interleukin-1 β release

Publikationen

Meyer, M.*; **Brandenburg, L.***; Hudel, H.; Agné, A.; Padberg, W.; Erdogan, A.; Nef, H.; Amati, A.-L.; Dörr, O.; Witte*, B.; Grau, V.* (2020): Who is afraid of CRP? Elevated preoperative CRP levels might attenuate the increase in inflammatory parameters in response to lung cancer surgery. *Journal of clinical medicine* 9:3340. DOI: 10.3390/jcm9103340.

(*geteilte Erst- oder Letztautorschaft)

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 04.05.2023

Leon Benedict Brandenburg

Danksagung

Ich möchte mich zu guter Letzt bei all den Menschen bedanken, die mich in den verschiedensten Stadien dieser Arbeit auf sehr vielfältige Weise unterstützt haben.

Prof. Dr. Veronika Grau danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Möglichkeit, in ihrem Team meine Experimente voranzubringen. Besonders dankbar bin ich für die exzellente Betreuung, die stets offene Tür und zeitnahe konstruktive Rückmeldungen, egal welches Problem mir im Wege stand.

Zudem danke ich allen Mitarbeiterinnen der Sektion Experimentelle Chirurgie. Ohne euch - Dr. Kathrin Richter, Sigrid Wilker, Gabi Fuchs-Moll, Katrin Petri und Sabine Stumpf - hätte ich den experimentellen Part, der dieser Arbeit zugrunde liegt, nicht bewältigen können.

Prof. Dr. Ali Erdogan, Dr. Anca-Laura Amati und Prof. Dr. Oliver Dörr danke ich für die Rekrutierung der Patienten, die produktive Zusammenarbeit sowie ihre Tätigkeiten als Studienärzte und Co-Betreuer im Rahmen dieses Projektes.

Philipp, Alisa und Anna danke ich für eine äußerst kurzweilige Zeit im Labor. Mit euch waren auch triste Tage und Rückschläge mit einem Lachen zu bewältigen. Danke auch für die schönen Zeiten außerhalb des Labors.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für zahlreiche Korrekturen, Anregungen und Erfahrungen, die diese Arbeit stets vorangebracht haben.

Schlussendlich danke ich meiner liebsten Isa für die bedingungslose Unterstützung, psychologische Betreuung und absolute Wertschätzung, die du mir zu jeder Zeit entgegenbringst.