

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

**Einfluss thrombozytärer Biomarker auf
die Ausprägung und den klinischen Verlauf
der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis**

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

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

vorgelegt von

Rall, Marcel Maurice

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Sturm

Tag der Disputation: 30.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis	10
1. Einleitung	13
1.1 Nicht-alkoholische Steatosis hepatis (NAFL)	13
1.1.1 <i>Epidemiologie der NAFL</i>	13
1.1.2 <i>Ätiologie und Risikofaktoren der NAFL</i>	14
1.1.3 <i>Pathogenese der NAFL</i>	16
1.1.4 <i>Histologie der NAFL</i>	17
1.1.5 <i>Klinischer Verlauf und Folgen der NAFL</i>	17
1.1.6 <i>Diagnostik der NAFL</i>	19
1.1.7 <i>Differentialdiagnosen der NAFL</i>	22
1.1.8 <i>Therapie der NAFL</i>	23
1.2 Thrombozyten	25
1.2.1 <i>Aufbau und Struktur der Thrombozyten</i>	25
1.2.2 <i>Adhäsion der Thrombozyten</i>	27
1.2.3 <i>Aktivierung der Thrombozyten</i>	28
1.2.4 <i>Aggregation der Thrombozyten</i>	28
1.2.5 <i>Antithrombozytäre Therapie</i>	30
1.3 Thrombozytäre Biomarker.....	33
1.3.1 <i>Chemokine und Chemokinrezeptoren</i>	33
1.3.2 <i>SDF-1</i>	33
1.3.3 <i>CXCR4</i>	34
1.3.4 <i>CXCR7</i>	35
1.3.5 <i>HMGB1</i>	36
1.3.6 <i>P-Selektin (= CD62p)</i>	37
1.3.7 <i>TGF-β1</i>	37

1.4 Fragestellung / Ziele.....	39
2. Material und Methoden	40
2.1 Patientenkollektiv, Studienaufbau und Studienprotokoll.....	40
2.1.1 <i>Basischarakteristika des Patientenkollektivs</i>	43
2.2 Durchflusszytometrische Bestimmungen der Biomarker.....	46
2.3 Magnetresonanztomographie der Leber	47
2.4 Statistische Auswertung.....	49
3. Ergebnisse	51
3.1 Thrombozytäre Biomarker und Lebervolumen	51
3.2 Thrombozytäre Biomarker und Leberfettgehalt.....	64
3.3 Thrombozytäre Biomarker und Antiaggregation.....	77
4. Diskussion	85
5. Zusammenfassung.....	92
6. Veröffentlichungen.....	94
7. Literaturverzeichnis	95
8. Erklärung zum Eigenanteil	111
Danksagung	113
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielhafte, sonographische Aufnahmen der Leber im Vergleich	21
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellbestandteile und des intrazellulären Aufbaus von Thrombozyten	26
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten während verschiedener Phasen der Aktivierung	29
Abbildung 4: Flussdiagramm des Studiendesigns mit Einschlusskriterien und definiertem Endpunkt sowie diagnostischem Vorgehen und Aufteilung in therapeutische Gruppen im Rahmen der Studie	42
Abbildung 5: Beispielhafter Vergleich von MR- und US-Aufnahmen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses und nach 6 Monaten therapeutischer Aggregationshemmung	48
Abbildung 6: Boxplot-Diagramme der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Entwicklung des Lebervolumens im 6-monatigen Verlauf	52
Abbildung 7: Boxplot-Diagramme der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Lebervolumens im 6-monatigen Verlauf	55
Abbildung 8: Boxplot-Diagramme der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Lebervolumens im 6-monatigen Verlauf	57
Abbildung 9: Streudiagramme und Korrelation der Basiswerte der Biomarker und des Lebervolumens	59

Abbildung 10: Streudiagramme und Korrelation der Differenzen der Biomarker und des Lebervolumens zwischen Folge- und Basisuntersuchung	61
Abbildung 11: Streudiagramme und Korrelation der Verhältnisse der Biomarker und des Lebervolumens zwischen Folge- und Basisuntersuchung	62
Abbildung 12: Boxplot-Diagramme der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf	65
Abbildung 13: Boxplot-Diagramme der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf	68
Abbildung 14: Boxplot-Diagramme der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf	70
Abbildung 15: Streudiagramme und Korrelation der Basiswerte der Biomarker und des Leberfettgehalts	72
Abbildung 16: Streudiagramme und Korrelation der Differenzen der Biomarker und des Leberfettgehalts zwischen Folge- und Basisuntersuchung.....	74
Abbildung 17: Streudiagramme und Korrelation der Verhältnisse der Biomarker und des Leberfettgehalts zwischen Folge- und Basisuntersuchung.....	75
Abbildung 18: Boxplot-Diagramme der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf.....	78
Abbildung 19: Boxplot-Diagramme der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf	81

Abbildung 20: Boxplot-Diagramme der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf 83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersichtsdarstellung der Empfehlungen der ESC-Leitlinien (Stand 2017) zur Auswahl von Wirkstoff und Dosierung der P2Y12-Inhibition, aufgeteilt nach Indikation, jeweils in Kombination mit ASS	32
Tabelle 2: Übersichtsdarstellung der Basischarakteristika des Patientenkollektivs, getrennt nach der Entwicklung des Lebervolumens im 6-monatigen Verlauf	43
Tabelle 3: Übersichtsdarstellung der Basischarakteristika des Patientenkollektivs, getrennt nach der Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf	44
Tabelle 4: Übersichtsdarstellung der Basischarakteristika des Patientenkollektivs, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf	45
Tabelle 5: Vergleich der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Entwicklung des Lebervolumens im 6-monatigen Verlauf	51
Tabelle 6: Vergleich der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Lebervolumens im 6-monatigen Verlauf	53
Tabelle 7: Vergleich der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Lebervolumens im 6-monatigen Verlauf	56
Tabelle 8: Vergleich der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf	64

Tabelle 9: Vergleich der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf	66
Tabelle 10: Vergleich der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf	69
Tabelle 11: Vergleich der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf	77
Tabelle 12: Vergleich der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf	79
Tabelle 13: Vergleich der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf	82

Abkürzungsverzeichnis

ADP:	Adenosindiphosphat
ATP:	Adenosintriphosphat
ACS:	akutes Koronarsyndrom
AFL:	alkoholische Fettleber
ALD:	alkoholische Lebererkrankung
ALT:	Alanin-Aminotransferase (entspricht GPT)
ANI:	ALD/NAFLD-Index
AP:	alkalische Phosphatase
ASH:	alkoholische Steatohepatitis
ASS:	Acetylsalicylsäure
AST:	Aspartat-Aminotransferase (entspricht GOT)
AWMF:	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BMI:	Body-Mass-Index
Ca ²⁺ :	Calcium-Ionen
CD:	cluster of differentiation
CDT:	Carbohydrat-defizientes Transferrin
CMV:	Zytomegalievirus
COX:	Cyclooxygenase
CPDA:	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CSI:	chemical shift imaging
CT:	Computertomographie
CVD:	kardiovaskuläre Erkrankung
CXCL12:	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4:	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CXCR7:	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7
DAMP:	damage- / danger-associated molecular pattern
DAPT:	duale antithrombozytäre Therapie
DTS:	dichtes tubuläres System

EBV:	Epstein-Barr-Virus
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ESC:	European Society of Cardiology
ETG:	Ethylglucuronid
FACS:	fluorescence-activated cell sorting
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
γ -GT:	Gamma-Glutamyltransferase
GOT:	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (entspricht AST)
GP:	Glykoprotein
GPT:	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (entspricht ALT)
HbA1c:	Hämoglobin A1c
HCC:	Hepatozelluläres Karzinom
HDL:	high-density lipoprotein
HELLP:	haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count
HIV:	humanes Immundefizienzvirus
HMGB1:	high-mobility group protein B1 / high-mobility group box 1
IL-8:	Interleukin-8
IP ₃ :	Inositoltrisphosphat
KHK:	koronare Herzerkrankung
LDH:	Laktatdehydrogenase
LDL:	low-density lipoprotein
LVEF:	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAST:	Michigan Alcoholism Screening Test
MCV:	mittleres korpuskuläres Volumen
MnSOD:	Mangan-Superoxid-Dismutase
MPV:	mittleres Thrombozytenvolumen
MRE:	Magnetresonanzelastographie
MRS:	Magnetresonanzspektroskopie
MRT:	Magnetresonanztomographie (auch kurz: MR)
MW:	Mittelwert
n:	Anzahl der Patienten / Probanden
NAFL:	nicht-alkoholische Steatosis hepatis / Fettleber

NAFLD:	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NAS:	NAFLD activity score
NASH:	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NKT-Zellen:	natürliche Killer T-Zellen
NSTEMI:	Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt
OCS:	offenes kanalikuläres System
p:	p-Wert
PBS:	phosphatgepufferte Salzlösung
PCI:	perkutane Koronarintervention
PDE-3:	Phosphodiesterase 3
PE:	Phycoerythrin
PF4:	Plättchenfaktor 4
PFA:	Paraformaldehyd
PNPLA3:	patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PSGL-1:	P-selectin glycoprotein ligand-1
RAGE:	receptor for advanced glycation end products
Rho / ρ :	Spearman-Korrelationskoeffizient
RR:	Blutdruckwert nach Riva-Rocci
SCS:	surface-connected system
SD:	Standardabweichung
SDF-1:	stromal cell-derived factor 1
SNARE:	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
STEMI:	ST-Hebungs-Myokardinfarkt
TGF- β :	transforming growth factor- β
TH1-Zellen:	Typ-1-T-Helferzellen
TLR4:	toll-like receptor 4
TM6SF2:	transmembrane 6 superfamily 2 gene
TXA ₂ :	Thromboxan A ₂
US:	Ultraschall
VEGF:	vascular endothelial growth factor
VLDL:	very-low-density lipoprotein
vWF:	von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

1.1 Nicht-alkoholische Steatosis hepatis (NAFL)

Die nicht-alkoholische Steatosis hepatis (NAFL) gehört ebenso wie die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) zum Kreis der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) und ist eine vorwiegend durch metabolische Ursachen bedingte Verfettung der Leber (1, 2). Per Definitionem müssen für die Diagnosestellung übermäßiger Alkoholkonsum und andere Ursachen für sekundäre Steatosen ausgeschlossen sowie mindestens 5% der Hepatozyten von der Verfettung betroffen sein (2, 3). Bei Fortschreiten der Erkrankung kann sie bei 10% bis 20% der Patienten in eine NASH – mit oder ohne Fibrose – übergehen, woraus dann im Lauf der Zeit bei weniger als 5% eine Zirrhose und wiederum bei 2,6% bis 12,8% der zirrhotischen Patienten pro Jahr ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) hervorgehen kann (2, 4-7). Die Zahlen variieren je nach Quelle. Eingeteilt wird die NAFL anhand des Prozentsatzes der von der Steatose betroffenen Hepatozyten in eine milde (< 1/3 betroffen: Grad 1), mäßige (< 2/3 betroffen: Grad 2) und schwere (> 2/3 betroffen: Grad 3) Verlaufsform (2).

1.1.1 Epidemiologie der NAFL

Die Prävalenz der NAFL ist weltweit ansteigend, wobei dies gemeinhin auf die Veränderungen der Ernährungsgewohnheiten und des Lifestyles vieler Menschen zurückgeführt wird (4). So überrascht es auch nicht, dass in einer Studie eine positive Korrelation des Risikos, an einer NAFL zu erkranken, mit dem ökonomischen Status des Heimatlandes festgestellt wurde (8). In eben dieser Studie betrug die Prävalenz der NAFL in Europa knapp 30%, während sie in Asien im Bereich von unter 20% lag. Zudem wurde in einer amerikanischen Studie unter Kaukasiern ein häufigeres Vorkommen der NAFL bei Männern im

Vergleich zu Frauen beobachtet, während der ethnischen Zugehörigkeit ebenfalls ein statistischer Einfluss auf die Prävalenz zugeschrieben werden konnte (9). Lateinamerikaner waren häufiger betroffen als Kaukasier und diese wiederum häufiger als Afroamerikaner (9). Interessanterweise sind jedoch – konträr zur NAFL – Patienten mit einer NASH bevorzugt weiblichen Geschlechts (10).

Eine andere Studie aus den USA ermittelte eine dortige Gesamtprävalenz der NAFL in der Bevölkerung von 46%. In dieser Studie wurde darüber hinaus auch eine positive Korrelation der NAFL mit arterieller Hypertension, Diabetes mellitus, erhöhtem Body-Mass-Index (BMI), vermehrtem Konsum von Fast-Food sowie geringer körperlicher Aktivität festgestellt (11). Unter Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 litten einer weiteren Studie zufolge sogar ungefähr 70% unter einer NAFLD (12). Insbesondere bei Kindern und jungen Erwachsenen gilt die NAFL heutzutage als die häufigste Lebererkrankung (13). Die NASH rangiert in den USA aktuell sogar unter den häufigsten Indikationen für eine Lebertransplantation (4).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren der NAFL

Es gibt eine Reihe von Faktoren, die zur Entwicklung einer NAFL führen können. Allen voran sind hier das metabolische Syndrom und die damit verbundenen Risikofaktoren zu nennen (14), weshalb die NAFLD auch als „hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms“ bezeichnet wird (15). Das metabolische Syndrom umfasst die Faktoren arterielle Hypertonie (Blutdruckwert nach Riva-Rocci (RR) $\geq 130/80$ mmHg), Dyslipidämie (Triglyzeride ≥ 150 mg/dl, high-density lipoprotein (HDL) < 40 mg/dl), erhöhter Nüchternblutzucker (≥ 100 mg/dl) sowie abdominelle Adipositas (Bauchumfang ≥ 88 cm bei Frauen bzw. ≥ 102 cm bei Männern) (2, 16). So wurde in einer Studie festgestellt, dass Patienten mit NAFL im Vergleich zum Durchschnitt der Bevölkerung einen höheren BMI und einen größeren Hüftumfang aufweisen sowie häufiger an einer erhöhten Insulinresistenz oder Diabetes mellitus Typ 2 leiden; ebenfalls betätigen sie sich

seltener körperlich (17, 18). Diabetes mellitus Typ 2 begünstigt darüber hinaus insbesondere ein Fortschreiten der Erkrankung und steigert die damit verbundene Mortalität, wohingegen umgekehrt das Vorhandensein einer NAFLD das kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 erhöht (19). Weitere Risikofaktoren für die Entstehung einer NAFL sind eine ungesunde Ernährungsweise in Form von übermäßigem Kohlenhydratkonsum (20-22), häufige Zwischenmahlzeiten (23) sowie eine stammbetonte Fettverteilung, welche sogar einen bedeutenderen Risikofaktor für die NAFL darzustellen scheint als ein erhöhter BMI (24). Es konnte auch ein gehäuftes Vorkommen der NAFL beim männlichen Geschlecht beobachtet werden (11). Ebenfalls wurde eine Assoziation von Dyslipidämien mit der NAFL festgestellt. Diese Assoziation war umso ausgeprägter, je niedriger der BMI des Patienten war (24). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass niedrige Vitamin-D-Spiegel mit dem histologischen Schweregrad einer NAFL korrelierten (25).

Des Weiteren lassen sich auch diverse endogene Risikofaktoren für die Entwicklung einer NAFL nennen, wie zum Beispiel bestimmte Zusammensetzungen des intestinalen Mikrobioms (26, 27) oder eine erhöhte Permeabilität der Darmschranke (21). Ebenfalls weisen viele Beobachtungen auf eine genetische Mitursache der NAFL hin: So finden sich neben einer familiären Häufung der Erkrankung (28) – beispielsweise wirkt sich eine familiäre Prädisposition für Diabetes mellitus sogar ohne persönliche Erkrankung als Risikofaktor aus (29) – auch eine unterschiedliche Prävalenz sowie ein unterschiedlicher Einfluss der einzelnen Risikofaktoren je nach ethnischer Zugehörigkeit (9, 30). Bestimmten Varianten der Gene PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) und TM6SF2 (transmembrane 6 superfamily 2 gene) konnte zudem eine Assoziation zu einem erhöhten Leberfettgehalt, erhöhten Leberwerten sowie einer vermehrten Inflammation in der Leber nachgewiesen werden (31, 32).

1.1.3 Pathogenese der NAFL

Zu Beginn der Pathogenese der NAFL steht die übermäßige Einlagerung von Lipiden in die Hepatozyten und die damit verbundene Lipotoxizität (33). Diese Einlagerung steht in engem Zusammenhang mit der Freisetzung von Fettsäuren aus Insulin-resistenten Adipozyten im peripheren Gewebe (34). Im Verlauf entwickelt sich zunehmend auch eine hepatische Insulinresistenz (35). Schließlich kommt es, aufgrund der vermehrten Oxidation von freien Fettsäuren in den Hepatozyten, zu oxidativem Stress (36), Aktivierung intrazellulärer Kinasen, Apoptose und Nekrose von Hepatozyten (37) und daraus folgend einer Inflammation, an der Typ-1-T-Helferzellen (TH1-Zellen), Makrophagen, natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen), zytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten (CD = cluster of differentiation) sowie diverse Zytokine beteiligt sind und welche den Übergang zur NASH kennzeichnet (34, 38).

Zusätzlich zu den eben genannten Zellen spielen auch Thrombozyten in Fragen der leberspezifischen Inflammation eine wichtige Rolle, denn sie fördern die Migration von zytotoxischen CD8⁺-T-Lymphozyten und anderen Leukozyten durch das Endothel der Sinusoide, aktivieren Effektorzellen und können das zelluläre und humorale Milieu der Leber sowohl in hepatotoxischer als auch in hepatoprotektiver Weise beeinflussen (39, 40). Dabei üben sie im Hinblick auf die immunpathologischen Vorgänge in der Leber – zumindest im Mausmodell bei akuter viraler Hepatitis – ihre Wirkung auch unabhängig von ihrer prokoagulatorischen Funktion aus (41).

Zudem wurde entdeckt, dass bei der NAFLD in ungefähr einem Drittel aller Fälle eine vermehrte intrahepatische Eisenspeicherung vorkommt, die womöglich ebenfalls, über eine Förderung von oxidativem Stress und Beeinflussung des Zellmetabolismus, zur Pathogenese der Erkrankung beiträgt (42).

Darüber hinaus steht die Obesitas-bedingte NAFLD auch in Zusammenhang mit einer Entzündung des insbesondere viszeralen Fettgewebes, welches pro- und antiinflammatorische Zytokine bzw. Adipokine – genannt seien Adiponektin und

Leptin – freisetzt (43-45). Ein Ungleichgewicht in diesem Adipokin-System trägt zur Inflammation bei der NAFLD bei (43).

1.1.4 Histologie der NAFL

Das typische histologische Kennzeichen der NAFL ist eine Verfettung der Hepatozyten im Sinne einer übermäßigen Akkumulation von Triglyzeriden (46). Es liegt dabei vorwiegend eine makrovesikuläre Steatose vor, während eine mikrovesikuläre Steatose bei der NAFL eher ungewöhnlich ist (46). Zwar können bei der NAFL zusätzlich bereits Zeichen der Inflammation und Lipogranulome erkennbar sein, jedoch sind Zellschädigung – wie Ballonierung, Nekrose und Apoptose von Hepatozyten – oder Fibrose per Definitionem als histologische Kennzeichen der NASH zu werten (46, 47). Die Fibrose beginnt dabei im Regelfall eher läppchenzentral und schreitet dann bei Progression zu einer brückenbildenden Fibrose und Zirrhose fort (46). Die Steatose kann während der fibrotischen Progression einer NASH wieder rückläufig sein (46).

1.1.5 Klinischer Verlauf und Folgen der NAFL

Das klinische Bild der NAFL ist im Regelfall blande, während im Gegensatz dazu die NASH häufig einen progredienten Verlauf nimmt (48). Die Steatose ist bei Fehlen einer NASH-typischen Histologie zudem üblicherweise reversibel (2). Einer Studie aus dem Jahr 2004 zufolge fanden sich darüber hinaus – im Gegensatz zur NASH – bei 80% der Patienten mit einer NAFL normwertige Serumspiegel der Alanin-Aminotransferase (ALT; entspricht der Glutamat-Pyruvat-Transaminase = GPT) (9), weshalb normwertige Transaminasen das Vorliegen einer NAFL keinesfalls ausschließen. Insgesamt gilt das Spektrum der NAFLD jedoch als die häufigste Ursache für erhöhte Leberwerte (49). Eine andere Studie konnte bei NAFL-Patienten erhöhte Werte von Nüchternblutzucker und Triglyzeriden im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe feststellen (50). Außerdem wiesen diese Patienten eine niedrigere Thrombozytenzahl und ein

größeres mittleres Thrombozytenvolumen (MPV) auf. Letzteres korrelierte zusätzlich positiv mit den ALT- und AST-Blutspiegeln (Aspartat-Aminotransferase; entspricht der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase = GOT) sowie dem Vorhandensein einer NAFLD und deren histologischen Kennzeichen (50, 51). In einer weiteren Studie zeigte sich ebenfalls ein schrittweiser Anstieg der MPV-Werte von gesunden Patienten, über Patienten mit NAFL, hin zu Patienten mit NASH (51).

Der Verlauf der NAFLD wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zu diesen zählen neben genetischen Einflüssen und Umweltfaktoren auch der Lebensstil der Betroffenen und das Vorliegen eines metabolischen Syndroms (52). Bereits 1999 fand eine Studie heraus, dass Übergewicht, höheres Lebensalter, Diabetes mellitus und ein De-Ritis-Quotient > 1 (berechnet aus ALT geteilt durch AST) Prädiktoren für einen schweren Krankheitsverlauf darstellen; im Sinne einer ausgeprägten Inflammation und Fibrosierung der Leber im Rahmen einer NASH (29, 53). Ebenso scheint sich Rauchen nachteilig auf den Krankheitsverlauf auszuwirken (54). Zu genetischen Faktoren, die mit einer schlechteren Prognose verbunden sind, zählen ein verbreiteter Polymorphismus (SOD2 C47T) im Gen der Mangan-abhängigen Superoxiddismutase (MnSOD), welche Zellen vor oxidativem Stress schützt, sowie bestimmte Varianten des PNPLA3-Gens (36).

Umgekehrt kann jedoch auch die NAFL einen Risikofaktor für andere Erkrankungen darstellen. So wurde in einer Studie die NAFL als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung eines Typ-2-Diabetes mellitus identifiziert (55) und in einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass eine komorbide NAFL die Mortalität von Patienten mit Diabetes mellitus steigert (56). Des Weiteren erhöht eine NAFL das Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen (CVD) (57). In einer prospektiven Kohortenstudie waren sowohl Steatose als auch erhöhte Aminotransferase-Spiegel, unabhängig von anderen Faktoren, mit der koronaren Herzerkrankung (KHK) assoziiert (58). Die Prävalenz für CVD unter NAFLD-Patienten beträgt einer Studie zufolge bei Männern 26,6% und bei Frauen 18,3% (12). Wesentlich hierfür sind die Veränderungen des Lipidprofils im Serum infolge der Erkrankung. So kommt es zu vermehrter hepatischer

Sekretion von very-low-density lipoprotein- (VLDL-) Partikeln, zu einem gestörten Abbau triglyzeridreicher Lipoproteine, einer Vermehrung von low-density lipoprotein- (LDL-) Cholesterin sowie einer Verminderung von HDL-Cholesterin, wodurch atherosklerotische Gefäßalterationen begünstigt werden (2, 35, 45). Darüber hinaus kommt es bei einer NAFL zur vermehrten Sekretion des Hepatokins Fetuin-A, welches den Glucose- und Lipidstoffwechsel in unvorteilhafter Weise beeinflusst und so zur Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskulären Erkrankungen beiträgt (59).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Einfluss der NAFLD auf die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen: In einer Studie aus dem Jahr 2012 wurde speziell der zirrhotische Krankheitsverlauf bei NASH als Risikofaktor für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms beschrieben (60), während jedoch in einer anderen Studie bei ca. 40% der Patienten mit NAFL- bzw. NASH-assoziiertem HCC keine Zirrhose nachgewiesen werden konnte (61). Zwischen 2,6% bis 12,8% der Patienten mit NASH-bedingter Zirrhose entwickeln pro Jahr ein HCC (7). An der Karzinogenese des HCC scheinen ähnliche pathophysiologische Vorgänge wie bei der Progression der NAFL zur NASH beteiligt zu sein (62).

Insgesamt konnte der sonographisch diagnostizierten NAFL keine Erhöhung der Gesamtmortalität zugeschrieben werden (63). Hingegen war das Vorliegen einer fortgeschrittenen Fibrose im Rahmen einer NASH mit einer 69-prozentigen Zunahme der Mortalität – hauptsächlich kardiovaskulär bedingt – verbunden (63).

1.1.6 Diagnostik der NAFL

In der konsensbasierten S2-Leitlinie der „Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften“ (AWMF) zu nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen aus dem Jahr 2015 wird das diagnostische Vorgehen bei Verdacht auf NAFL beschrieben. So soll, aufgrund der – auch bereits in dieser Dissertation im Abschnitt „Ätiologie und Risikofaktoren der NAFL“ erläuterten – häufigen Komorbidität mit dem metabolischen Syndrom, die Diagnostik zunächst darauf abzielen (2). Hierzu gehört, neben nicht invasiven

Untersuchungen wie der Bestimmung von BMI, Bauchumfang und Blutdruck, auch die labordiagnostische Bestimmung von Nüchternblutzucker, Hämoglobin A1c (HbA1c), Triglyzeriden sowie HDL- und LDL-Cholesterin (2). Zusätzlich sollten die bei Erkrankungen der Leber üblichen Laboruntersuchen der Transaminasen, γ -Glutamyltransferase (γ -GT), alkalischen Phosphatase (AP), Laktatdehydrogenase (LDH), von Albumin, Bilirubin und der Gerinnungswerte durchgeführt werden (64).

Zur weiterführenden Diagnostik kann als bildgebende Maßnahme der ersten Wahl ein transabdomineller Ultraschall (US) erfolgen (65). Als Zeichen einer Steatose gelten dabei eine erhöhte Echogenität des Leberparenchyms, ein abgerundeter Leberunterrand sowie bei stärkerer Ausprägung auch eine dorsale Schallabschwächung (2, 66). Für die Detektion einer mäßig- bis schwergradigen Ausprägung der NAFL wurde für die Methode der Sonographie in einer Meta-Analyse eine Sensitivität von 84,8% und eine Spezifität von 93,6% ermittelt (67). Nachteilig an der Sonographie ist jedoch eine ausgeprägte Minderung der Sensitivität und Spezifität im Falle einer nur geringgradigen Ausprägung der Steatose oder einer vorliegenden Adipositas, weshalb per Ultraschall kein Ausschluss einer NAFL möglich ist (2, 65).

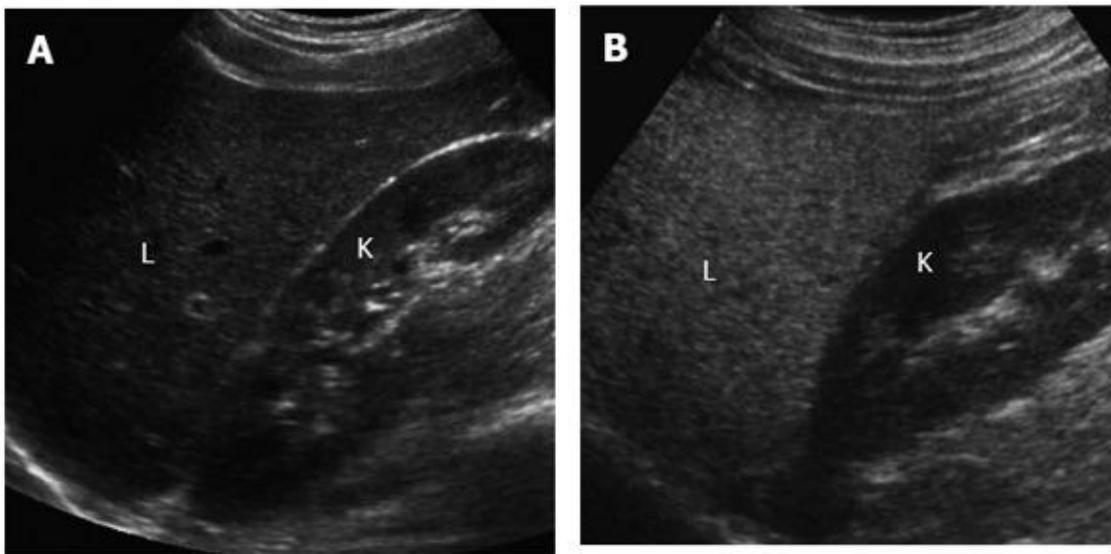


Abbildung 1: Beispielhafte, sonographische Aufnahmen der Leber im Vergleich: Flankenschnitte rechts, gesunde Leber (A) und Steatosis hepatis (B); L = Leber, K = Niere

(aus Lee, S. S. and S. H. Park (2014). "Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease." *World J Gastroenterol* **20**(23): 7392-7402.; ©2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved; lizenziert nach der „CC BY-NC 4.0“-Public License [URI: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode/>])

Die Computertomographie (CT) kommt, aufgrund ihrer besseren Objektivität im Vergleich zur Sonographie, auch als bildgebende Diagnostik in Frage, weist jedoch ebenfalls Schwächen bei der Detektion einer milden NAFL auf (2, 66). Magnetresonanztomographie (MRT) und Magnetresonanzspektroskopie (MRS) werden heutzutage als die genauesten Methoden zur Quantifizierung des hepatischen Fettgehalts angesehen (66). So wurde in einer Studie aus dem Jahr 2010 für die duale Gradienten-Echo MRT-Sequenz bei milder Steatose eine Sensitivität von 76,7% und eine Spezifität von 87,1%, beziehungsweise bei mäßiggradiger Steatose eine Sensitivität von 90,9% und eine Spezifität von 94% bestimmt (68). In einer älteren Studie wurde der Protonen-MR-Spektroskopie eine noch höhere Sensitivität für die Diagnostik des Fettanteils der Leber zugeschrieben als der MRT (69). Generell beruhen die MRT-Sequenzen zur Bestimmung des Fettgehalts auf diversen Fettsuppressionstechniken oder Methoden des „chemical shift imaging“ (CSI) (2). Zur Differenzierung von NAFL

und NASH kann womöglich Gadoxetat-haltiges MRT-Kontrastmittel verwendet werden, welches sich in entzündetem und fibrosiertem Leberparenchym weniger anreichert als bei einfacher Verfettung. Aufgrund bislang noch geringer Fallzahlen bedarf es vor einer endgültigen Aussage jedoch einer umfangreicheren Untersuchung dieses Zusammenhangs (70). Zur Unterscheidung von NAFL und NASH eignen sich ebenfalls die ultraschallgestützte Elastographie („Fibroscan“) sowie die Magnetresonanz-elastographie (MRE), welche vor allem verwendet werden, um das Ausmaß der Fibrosierung bei der NASH zu bestimmen (66).

Als Goldstandard für die Diagnostik der NAFL gilt bis heute die Leberbiopsie (66). Sie ist von Nöten, wenn eine NAFL mit größtmöglicher Sicherheit von einer NASH unterschieden werden muss, und ihre Anwendung wird für diesen Zweck von der Leitlinie empfohlen (2, 71). Die Verwendung des „NAFLD activity score“ (NAS) kann die Differenzierung zwischen NAFL und NASH unterstützen (72). Nichtsdestotrotz unterliegen Leberbiopsien der Gefahr eines Stichprobenfehlers, der zu falsch negativen Ergebnissen führen, jedoch durch Entnahme größerer Biopsien vermindert werden kann (73).

1.1.7 Differentialdiagnosen der NAFL

Einen weiteren wichtigen Teilbereich der NAFL-Diagnostik stellt der Ausschluss anderer möglicher Ursachen der Steatose dar. Insbesondere empfohlen wird von der Leitlinie hierbei der Ausschluss einer alkoholischen Fettleber (AFL), welche ein Teil des Formenkreises der alkoholischen Lebererkrankung (ALD) ist (2). Die Menge des täglichen Alkoholkonsums sollte zu diesem Zweck im Anamnesegespräch erfragt und bei klinischen Studien zusätzlich entsprechende Daten anhand eines validierten Fragebogens, wie zum Beispiel des „Michigan Alcoholism Screening Tests“ (MAST), erfasst werden (74, 75). Während in vielen Quellen ab eines täglichen Alkoholkonsums von 20-40 g von einem kritischen Konsum gesprochen wird (76, 77), empfehlen die Autoren der AWMF-Leitlinie als Grenzwert zur Abgrenzung der nicht-alkoholischen von den alkoholischen

Fettlebererkrankungen für Frauen einen Wert von 10 g pro Tag und für Männer einen Wert von 20 g pro Tag (2). Diese Differentialdiagnostik kann durch die Bestimmung von Carbohydrat-defizientem Transferrin (CDT), mittlerem korpuskulären Volumen (MCV), der γ -GT, dem De-Ritis Quotienten (= AST/ALT), Ethylglucuronid (ETG) im Haar oder Urin sowie dem ALD/NAFLD-Index (ANI) ergänzt werden (2, 78, 79).

Doch neben einer alkoholischen Lebererkrankung sollten noch weitere Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden. Unter anderem die Hämochromatose (2), wobei sich jedoch – wie bereits erwähnt – bei etwa einem Drittel der NAFL-Patienten ebenso wie bei der Hämochromatose eine vermehrte intrahepatische Eisenspeicherung findet (42). Zu den anderen Krankheiten oder Zuständen, die ein der NAFL ähnliches klinisches und histologisches Bild hervorrufen können, zählen der Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, die Gruppe der Autoimmunhepatitiden, Hepatitis B (2), Hepatitis C (80), das humane Immundefizienzvirus (HIV) (81), Zöliakie (82), parenterale Ernährung (83), starker Gewichtsverlust (84), Morbus Wilson (85), diverse Fettstoffwechselstörungen (2, 86), eine Vielzahl an Medikamenten – als Auswahl seien hier genannt: Amiodaron, Methotrexat, Valproat, Tamoxifen, Cisplatin, Glucocorticoide, uvm. (87, 88) – sowie in der Schwangerschaft auch Präeklampsie, HELLP-Syndrom (HELLP = haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count) und die akute Schwangerschaftsfettleber (89).

1.1.8 Therapie der NAFL

Da die NAFL regelhaft durch Faktoren des metabolischen Syndroms bedingt ist, empfiehlt sich ein ähnlicher kausaler, therapeutischer und prophylaktischer Ansatz durch Lebensstilmodifikation (2). Neben regelmäßiger körperlicher Aktivität – besonders in Form von anaerobem Krafttraining – (18), Gewichtsabnahme (90), einer geringen Zufuhr von Kohlenhydraten (22) und Verzicht auf Zwischenmahlzeiten (23), kann sich auch eine mediterrane Ernährungsweise – speziell mit Olivenöl – vorteilhaft auswirken (91). In einer

Studie aus dem Jahr 2009 zeigte sich ab einem Gewichtsverlust von $\geq 5\%$ neben einer Abnahme der Steatose auch eine Besserung der Insulinresistenz. Ab einem Gewichtsverlust von $\geq 9\%$ konnte sogar ein Rückgang der histologischen Zeichen einer Steatohepatitis registriert werden (92).

Da Patienten mit NAFL eine sehr gute Prognose hinsichtlich Mortalität und leberspezifischen Komplikationen aufweisen, sind den Leitlinien zufolge medikamentöse Therapieansätze den Patienten mit NASH vorbehalten (2, 93). Nichtsdestotrotz seien im Folgenden – ungeachtet ihrer Nebenwirkungen – einige Medikamente und Medikamentengruppen genannt, die mit ihrer Wirkung potenziell in der Lage sind, das Ausmaß der Steatose zu vermindern oder dabei unterstützend zu wirken (90): der Lipasehemmer Orlistat zur Gewichtsreduktion (92), Thiazolidinedione bzw. Glitazone als Insulin-Sensitizer (94, 95), Statine als Cholesterinsynthesehemmer (96), der Cholesterinaufnahmememmer Ezetimib (97), mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie beispielsweise Omega-3-Fettsäuren (98, 99) sowie Vitamin E als Vertreter der Antioxidantien gegen den pathogenetisch relevanten oxidativen Stress (90).

Darüber hinaus gibt es mehrere Studien, die einen Zusammenhang zwischen einer antithrombozytären Therapie und einer Minderung histopathologischer Veränderungen – wie Steatose, Inflammation und Fibrose – im Rahmen einer NAFLD und anderer entzündlicher Lebererkrankungen beschreiben (40, 100, 101). Der Effekt wird der bedeutenden immunologischen Rolle zugeschrieben, die die Thrombozyten bei entzündlichen Prozessen in der Leber einnehmen (39). Ein therapeutischer Effekt wurde für den Cyclooxygenase- (COX-) Hemmer Acetylsalicylsäure (ASS), die P2Y12-Inhibitoren Clopidogrel und Ticlopidin sowie insbesondere für den Phosphodiesterase-3- (PDE-3-) Hemmer Cilostazol nachgewiesen (40, 100). Zudem konnte retrospektiv bei Männern sowie Patienten höheren Alters eine Assoziation zwischen regelmäßiger Aspirin®-Einnahme (Wirkstoff: ASS) und verminderter Prävalenz einer NAFLD beobachtet werden (102).

1.2 Thrombozyten

Thrombozyten – oder auch Blutplättchen – sind kleine kernlose Zellen bzw. Zellfragmente, die im Blut zirkulieren und in erster Linie für die primäre Hämostase bei Verletzungen verantwortlich zeichnen (103), aber auch an Chemotaxis, Gefäßfunktionen und Inflammationsprozessen beteiligt sind (104). Sie stammen von den im Knochenmark befindlichen, polyploiden Megakaryozyten ab (103). Mit einem Durchmesser von 2-3 μm und einer durchschnittlichen Lebensdauer von 5-9 Tagen befinden sich die Thrombozyten zu ungefähr zwei Dritteln im Blut und zu einem Drittel in der Milz (105). Obwohl der Richtwert für die Thrombozytenkonzentration zwischen 150.000/ μl und 450.000/ μl liegt, treten relevante Blutungsereignisse bei Fehlen weiterer Risikofaktoren üblicherweise erst ab Werten unter 5.000-10.000/ μl auf (106).

1.2.1 Aufbau und Struktur der Thrombozyten

Während sich Thrombozyten in einem inaktiven Zustand befinden, haben sie eine diskoide Form und enthalten 3 verschiedene Arten sekretorischer Vesikel: α -Granula, elektronendichte Granula (bzw. δ -Granula) und Lysosomen (bzw. λ -Granula) (104). Die Plasmamembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht und enthält zahlreiche Oberflächenrezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle (105). Ihre Oberfläche wird durch ein Netzwerk kanalikulärer Invaginationen vergrößert, welches als „offenes kanalikuläres System“ (OCS) oder auch „surface-connected system“ (SCS) bezeichnet wird (107). Darüber hinaus enthalten Thrombozyten auch ein intrazelluläres Kanalsystem, das „dichte tubuläre System“ (DTS), welches keine Verbindung zur Zellmembran hat und bereits früh während des Aktivierungsprozesses der Thrombozyten Calcium freisetzt (108).

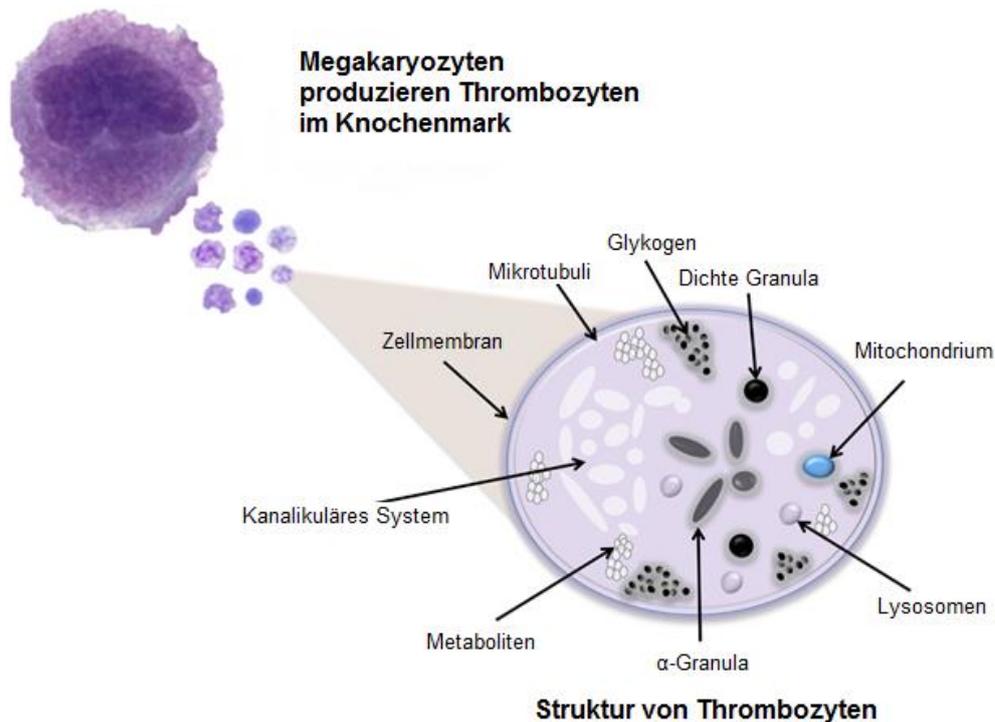


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellbestandteile und des intrazellulären Aufbaus von Thrombozyten: lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme der Thrombozyten-produzierenden Megakaryozyten links-oben; Schemazeichnung intrazellulärer Aufbau der Thrombozyten rechts-unten

(übersetzt aus Zapata, J. C., D. Cox and M. S. Salvato (2014). "The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers." *PLoS Negl Trop Dis* 8(6): e2858.; © 2014 Zapata et al; lizenziert nach der „CC BY 4.0“-Public License [URI: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>])

Die α -Granula sind die größten und zahlreichsten Granula (104) und enthalten viele verschiedene Proteine, die nicht nur für Hämostase und Thrombogenese relevant sind, sondern auch für Wundheilung, Angiogenese, Inflammation und Tumorwachstum (110). Zu ihrem Inhalt zählen große Polypeptide (z.B. Plättchenfaktor 4 (PF4)), verschiedene Gerinnungsfaktoren und andere am Gerinnungsvorgang beteiligte Proteine, Zelladhäsionsmoleküle (z.B. Fibronektin), membranständige Proteine (z.B. P-Selektin, Glykoprotein- (GP-) IIb/IIIa), Wachstumsfaktoren und Zytokine (z.B. vascular endothelial growth

factor (VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β) sowie zahlreiche Chemokine (104).

Die elektronendichten δ -Granula sind die kleinsten Granula und enthalten neben viel Calcium und Phosphat auch Adenin-Nukleotide und Serotonin (104, 111). Sie sind vereinfacht gesagt für die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten zuständig (112) und führen über die Ausschüttung von Serotonin auch zu einer lokalen Vasokonstriktion (104).

Die Lysosomen enthalten vorwiegend Hydrolasen zum Ab- und Umbau eines bestehenden Thrombozytenaggregates und der extrazellulären Matrix (104, 112).

1.2.2 Adhäsion der Thrombozyten

Die Adhäsion der Thrombozyten erfolgt typischerweise als Reaktion auf Schädigungen der Gefäßwand (105). Aufgrund der Verletzung der Endothelschicht, kommen die Thrombozyten mit der darunter liegenden subendothelialen Matrix in Kontakt, woraufhin der – sich an der Zellmembran der Thrombozyten befindende – GPIb-IX-V-Komplex an kollagengebundenen von-Willebrand-Faktor (vWF) bindet (113). Dadurch werden die im Blutstrom schwimmenden Thrombozyten „abgebremst“ und festere Bindungen an das subendotheliale Gewebe ermöglicht (114). Diese werden durch Interaktionen von GPVI und verschiedenen Integrinen mit subendotheliale Kollagen sowie unter anderem Fibronectin und Laminin vermittelt (113, 115).

Beim von-Willebrand-Faktor handelt es sich um ein großes Glykoprotein, das in den α -Granula der Thrombozyten, in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen, im Blutplasma und im subendothelialen Gewebe vorkommt (104, 114).

1.2.3 Aktivierung der Thrombozyten

Zwei Signalwege führen zur Aktivierung der Thrombozyten. Zum einen wird sie vermittelt durch Bindung der entsprechenden Liganden an die oben erwähnten GP-Rezeptoren (105), zum anderen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für Thrombin, Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan A₂ (TXA₂), Noradrenalin und Serotonin (104, 116). Beide Wege führen über die Aktivierung von Phospholipase C zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), welches schließlich zur Freisetzung von Calcium-Ionen (Ca²⁺) aus den intrazellulären Speichern wie dem dichten tubulären System führt (108, 117). Die Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels bewirkt daraufhin einen zusätzlichen Einstrom von Ca²⁺ durch die Plasmamembran, dem sogenannten „store-operated calcium entry“ (117). Zudem kann auch die agonistische Bindung von Adenosinatriphosphat (ATP) an den Ionenkanalrezeptor P2X1 zu einem Calcium-Einstrom führen (117, 118).

1.2.4 Aggregation der Thrombozyten

In Folge des Anstiegs der intrazellulären Calcium-Konzentration finden nun mehrere Vorgänge statt. Erstens führt die Reorganisation des submembranären Zytoskeletts durch Aktinpolymerisation und Phosphorylierung von Myosinfilamenten zur Bildung von Pseudopodien und einer Änderung der diskoiden Form der Thrombozyten (119-121). Dieser Vorgang wird im englischen Sprachgebrauch auch als „shape change“ bezeichnet und fördert durch Oberflächenvergrößerung die räumliche Interaktion und Aggregation von Thrombozyten (104).

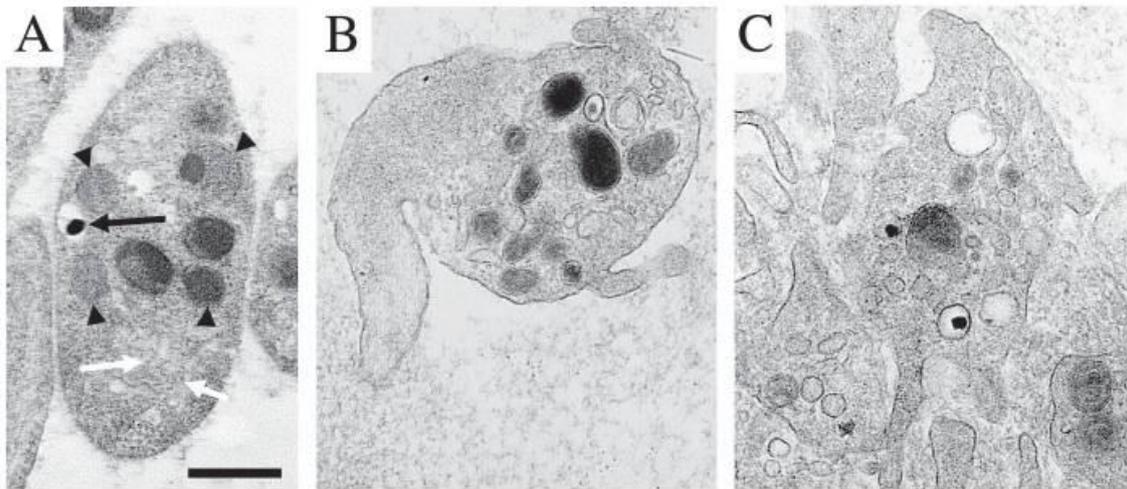


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten während verschiedener Phasen der Aktivierung: (A) inaktiver Thrombozyt mit diskoider Form; (B) beginnender „shape change“ mit Ausbildung von Pseudopodien und zentraler Anordnung der Granula; (C) Thrombozytenaggregat mit ausgeprägtem „shape change“; Balkenlänge = 500 nm

(aus Rumbaut, R. E. and P. Thiagarajan (2010). *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. San Rafael (CA).; DOI: 10.4199/C00007ED1V01Y201002ISP004)

Zweitens lagern sich die Granula im Zentrum der Thrombozyten zusammen und werden anschließend per Exozytose in das offene kanalikuläre System freigesetzt, wodurch ihr Inhalt an die Zelloberfläche gelangt (122, 123). An dem Sekretionsvorgang sind neben Elementen des Zytoskeletts auch SNARE-Proteine und Lipide der Zellmembran beteiligt (SNARE = soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) (124).

Drittens wird die membranständige Phospholipase A₂ aktiviert, welche Arachidonsäure aus der Plasmamembran freisetzt, die dann schließlich über die Cyclooxygenase-1 (COX-1) und die Thromboxan-Synthase zu Thromboxan A₂ metabolisiert wird (104). Die Ausschüttung von Thrombozyten-aktivierenden Stoffen wie Thromboxan A₂, ADP und Serotonin bildet einen positiven Feedback-Mechanismus, wodurch weitere Thrombozyten aktiviert werden, welche die Kaskade der Aggregation verstärken (105). Thromboxan A₂ wirkt zudem auch als Vasokonstriktor (125).

Viertens führt die Aktivierung der Thrombozyten zu einer Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors (wird auch als Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ bezeichnet), der sich bereits in inaktiven Thrombozyten überwiegend an der Zellmembran befindet (126). Durch die Konformationsänderung wird der Rezeptor in einen hohen Affinitätszustand überführt und erlangt so die Fähigkeit, im Plasma befindliches Fibrinogen mit hoher Affinität zu binden (126, 127). Dabei kommt es in der Folge dann zur Aggregation mehrerer Thrombozyten, wenn die divalenten Fibrinogen-Moleküle an die GPIIb/IIIa-Rezeptoren zweier unterschiedlicher Thrombozyten binden (116). Insbesondere bei hohen Scherkäften kommt auch der Bindung von vWF an die GPIb- und GPIIb/IIIa-Rezeptoren eine essenzielle Bedeutung für die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten zu (128).

Dieses relativ instabile thrombozytäre Aggregat stellt das Korrelat der primären Hämostase dar und wird auch als „weißer Thrombus“ bezeichnet (105). Im Zuge der Aktivierung der Thrombozyten wandern zudem negativ geladene Phospholipide in die äußere Lipidschicht der Plasmamembran, wo sie als Katalysatoren für die Gerinnungskaskade dienen, welche in der Bildung eines „roten Thrombus“ endet (104). Hierbei fällt als Zwischenprodukt auch Thrombin an, welches wiederum als potenter Aktivator der Thrombozyten einen positiven Feedback-Mechanismus auslöst (105). Bei der Thrombogenese kommt auch der Kontraktion von Thrombozyten eine wichtige Rolle zu (129).

1.2.5 Antithrombozytäre Therapie

In Europa erhält eine zunehmende Anzahl von Patienten eine duale antithrombozytäre Therapie (DAPT; von engl.: dual antiplatelet therapy), bestehend aus der Gabe von Acetylsalicylsäure (Aspirin®; ASS) und einem oralen Inhibitor des P2Y₁₂-Rezeptors für ADP (130).

ASS führt über eine O-Acetylierung eines Serin-Bausteins zur irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase-Aktivität der Prostaglandin-H-Synthase, welche auch als Cyclooxygenase-1 (COX1) bezeichnet wird (131). Hierdurch kann über

weitere Zwischenschritte weniger Thromboxan A₂ gebildet werden, wodurch es zur Verminderung der Aktivierung von Thrombozyten kommt (105, 131).

Bei den Inhibitoren des P2Y₁₂-Rezeptors stehen verschiedene Wirkstoffe zur Verfügung: Ticlopidin, Clopidogrel und Prasugrel, welche zunächst einer Cytochrom-P450-abhängigen Aktivierung in der Leber bedürfen, sowie Ticagrelor und Cangrelor, welche direkt wirken können und keine weitere Aktivierung mehr benötigen (132). Cangrelor ist zudem als einziger P2Y₁₂-Inhibitor in intravenöser Darreichungsform verfügbar (132). Ticlopidin, Clopidogrel und Prasugrel gehören der Stoffgruppe der Thienopyridine an und vermitteln durch kovalente Bindung an den P2Y₁₂-Rezeptor eine irreversible Hemmung desselbigen und damit eine verminderte Adenylatzyklase-Aktivität sowie folglich eine geringere Aktivierung des GP-IIb/IIIa-Rezeptors (131, 133). Bei Ticagrelor und Cangrelor handelt es sich um schneller wirkende, direkte Inhibitoren des P2Y₁₂-Rezeptors, die über eine Konformationsänderung zu einer reversiblen Hemmung des Rezeptors führen (132, 133). Welche der P2Y₁₂-Inhibitoren in welchen Fällen verwendet werden sollten wird tabellarisch anhand der Leitlinien der „European Society of Cardiology“ (ESC) in der Tabelle auf der folgenden Seite zusammengefasst (130).

Nach einer perkutanen Koronarintervention (PCI) wird im Allgemeinen für die DAPT eine Dauer von mindestens 12 Monaten empfohlen, gefolgt von einer lebenslangen Erhaltungstherapie mit ASS 100 mg/d (132). Bei besonderen Risikokonstellationen kann auch eine Verlängerung der DAPT über 12 Monate hinaus erwogen werden; bei erhöhtem Blutungsrisiko jedoch auch auf eine Dauer von mindestens 6 Monaten verkürzt werden (132).

Des Weiteren existieren mit Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban auch direkte GP-IIb/IIIa-Inhibitoren (132).

Tabelle 1: Übersichtsdarstellung der Empfehlungen der ESC-Leitlinien (Stand 2017) zur Auswahl von Wirkstoff und Dosierung der P2Y12-Inhibition, aufgeteilt nach Indikation, jeweils in Kombination mit ASS

erstmals verwendete Abkürzungen: akutes Koronarsyndrom (ACS), ST-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI)

*(frei modifiziert nach: „Valgimigli, M., H. Bueno, R. A. Byrne, J. P. Collet, F. Costa, A. Jeppsson, P. Juni, A. Kastrati, P. Kolh, L. Mauri, G. Montalescot, F. J. Neumann, M. Petricevic, M. Roffi, P. G. Steg, S. Windecker, J. L. Zamorano, G. N. Levine, E. S. C. S. D. Group, E. S. C. C. f. P. Guidelines and E. S. C. N. C. Societies (2018). "2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)." Eur Heart J **39**(3): 213-260.")*

Indikation	Medikation
Patienten mit ACS	Ticagrelor (180 mg loading dose, 90 mg 2x/d) + ASS
Patienten mit ACS und PCI	Prasugrel (60 mg loading dose, 10 mg/d) + ASS
Patienten mit stabiler KHK und koronarer Stentimplantation	Clopidogrel (600 mg loading dose, 75 mg/d) + ASS
Patienten mit ACS und Kontraindikationen für Ticagrelor oder Prasugrel	Clopidogrel (600 mg loading dose, 75 mg/d) + ASS
Patienten mit STEMI und Thrombolyse	Clopidogrel (300 mg loading dose falls ≤ 75 Jahre, 75 mg/d) + ASS

1.3 Thrombozytäre Biomarker

Bei Biomarkern handelt es sich laut Definition um „biologische Merkmale, welche objektiv gemessen und als Indikatoren für normale biologische Prozesse, pathologische Prozesse oder pharmakologische Reaktionen auf eine therapeutische Intervention beurteilt werden können“ (134).

1.3.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind kleine basische Moleküle, die an membranständige G-Proteingekoppelte Chemokinrezeptoren mit 7 Transmembrandomänen binden (135). Sie werden abhängig von der Struktur ihres N-terminalen Endes in 4 Familien eingeteilt: CC, CXC, C und CX₃C. Chemokine der CC- und CXC-Familien sind dabei am häufigsten (136). Die Chemokinrezeptoren werden entsprechend ihrer zugehörigen Chemokinfamilie klassifiziert (136). Im Jahr 2009 waren bereits ungefähr 50 verschiedene Chemokine und 20 verschiedene Chemokinrezeptoren bekannt, wobei oftmals ein Chemokin an unterschiedliche Rezeptoren und unterschiedliche Chemokine an denselben Rezeptor binden können. Nichtsdestotrotz kommen auch sehr spezifische Ligand-Rezeptor-Paarungen vor (137).

Chemokine und ihre Rezeptoren spielen nicht nur eine Rolle bei der Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen von Entzündungsreaktionen, sondern darüber hinaus auch bei der Tumorprogression durch Beeinflussung von Angiogenese, Invasion und Metastasierung (138, 139) sowie der Organogenese (140). Ebenfalls dienen sie als Kofaktoren für die HIV-Infektion sowie als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für B- und T-Lymphozyten (139).

1.3.2 SDF-1

Der „stromal-cell derived factor 1“ (SDF-1) bzw. das „CXC-Motiv-Chemokin 12“ (CXCL12) ist ein Chemokin aus der CXC-Familie, welches primär die Migration

von Zellen reguliert (141), darüber hinaus jedoch neben der Proliferation von B-Zell-Vorläufern auch die Myelopoese im Knochenmark fördert (142). Ebenfalls steuert es die Rekrutierung und Differenzierung von hämatopoetischen CD34⁺-Stammzellen (143) und spielt eine Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems (144) und des Herzens sowie im Rahmen von Tumorentstehung und Angiogenese (145, 146). Bei Entzündungsvorgängen oder anders gearteten Gewebeschädigungen stellt SDF-1 einen wichtigen Baustein in der Regulation von Reparaturvorgängen dar (147) und wird beispielsweise nicht nur von aktivierten Thrombozyten sezerniert (148), sondern auch an deren Oberfläche exprimiert, wodurch es die Adhäsion von Stammzellen an Thrombozyten fördert und vermittelt (148, 149).

Die Ausschüttung von SDF-1 kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Obwohl die Expression von SDF-1 an der Oberfläche von Thrombozyten in ischämischen Geweben hochreguliert wird (150), konnte beispielsweise in einer Studie gezeigt werden, dass Patienten mit STEMI oder Hyperlipidämie im Plasma signifikant niedrigere SDF-1-Spiegel aufwiesen als Patienten mit stabiler Angina pectoris oder Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI) (151).

SDF-1 ist ein spezifischer Ligand der CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 und 7 (CXCR4 und CXCR7) (141).

1.3.3 CXCR4

Lange Zeit galt CXCR4 als einziger Rezeptor für SDF-1 (146). Endothelzellen exprimieren bereits in ruhendem Zustand CXCR4, wobei der Interaktion von CXCR4 mit seinem spezifischen Liganden SDF-1 eine große Bedeutung in der Induktion von Chemotaxis – durch Vermittlung der Migration von Leukozyten und hämatopoetischen Stammzellen – sowie während Angiogenese und Umbauprozessen der Gefäßwand zukommt (140, 152). CXCR4 wird darüber hinaus nicht nur von einer Vielzahl an Zellen des Immunsystems und des Nervensystems exprimiert, sondern findet sich auch an der Oberfläche von Megakaryozyten und Thrombozyten (140, 153). Hierbei zeigte sich jedoch in

einer Studie, dass Thrombozyten weniger sensitiv auf SDF-1 reagierten als ihre Vorläuferzellen (153). In einer anderen Studie an Patienten mit symptomatischer KHK und Indikation zur PCI wurde herausgearbeitet, dass eine geringere Expression von CXCR4 an der Oberfläche von Thrombozyten signifikant mit einer höheren Mortalität oder dem Auftreten eines Myokardinfarkts assoziiert ist (149).

Über CXCR4 kann darüber hinaus auch die Expression von CXCR7 reguliert werden (154). CXCR4 kommt zudem als Ko-Rezeptor in der Pathogenese von HIV eine entscheidende Rolle zu (144, 155).

1.3.4 CXCR7

Im Jahr 2005 wurde in einer Studie herausgefunden, dass SDF-1 seine Wirkung nicht nur allein über CXCR4 vermittelt, sondern auch über einen weiteren spezifischen Rezeptor: CXCR7 (156). Diverse Studien zeigten jedoch konkret beispielsweise bei akutem Nierenversagen oder zerebralen Infarkten, dass CXCR4 und CXCR7 trotz gleichem Liganden oftmals verschiedenartige Effekte vermitteln und je nach Zelltyp in divergenter Häufigkeit exprimiert werden (157, 158). CXCR7 wird an der Oberfläche einer ganzen Reihe von Zellen exprimiert, dazu zählen aktivierte Endothelzellen, fetale Hepatozyten, die β -Zellen des Pankreas und viele Tumorzelllinien (145, 159), aber auch Thrombozyten (150). Aktivierung von CXCR7 führt zu verstärkter Zelladhäsion sowie vermittelt Wachstum und längeres Überleben von Zellen (145, 154), weshalb es bei der Entstehung von Tumoren eine entscheidende Rolle spielt (160). Über Interleukin-8 (IL-8) und VEGF fördert CXCR7 die Angiogenese in Tumoren (154). Der SDF-1/CXCR4/CXCR7-Achse kommt daher auch eine wichtige Rolle als mögliches therapeutisches Ziel in der Therapie von Tumoren zu (141). CXCR7 dient ebenso wie CXCR4 zudem als Ko-Rezeptor für das HI-Virus (156).

In Bezug auf Thrombozyten konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Expression von CXCR4 und CXCR7 an der Zellmembran sowohl miteinander als auch mit dem Überleben von Thrombozyten und einer Verbesserung der

linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) nach stattgehabtem STEMI signifikant positiv korrelierte (147), wobei letztere Korrelation insbesondere für CXCR7 nachgewiesen werden konnte (147, 150). Eine weitere Kohortenstudie an Patienten mit KHK und ACS ergab, dass sowohl CXCR4 als auch CXCR7 bei Patienten mit KHK – im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv – vermehrt an der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert wurden, während für CXCR7 zusätzlich eine signifikant stärkere Expression bei Patienten mit ACS im Vergleich zu Patienten mit KHK aufgezeigt werden konnte (150). Somit mehren sich die Hinweise, dass der SDF-1/CXCR4/CXCR7-Achse eine wichtige Funktion in Bezug auf die Regulation von Regenerationsvorgängen nach kardialen Schädigungen und möglicherweise auch darüber hinaus zukommt (147, 150, 161).

1.3.5 HMGB1

Bei „high-mobility group protein B1“ oder auch „high-mobility group box 1“ (HMGB1) handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes nukleäres Protein, welches über eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems zur inflammatorischen Reaktion auf infektiöse und nicht-infektiöse schädigende Faktoren beiträgt (162, 163). Freigesetzt werden kann es dabei entweder durch Stimulation des Immunsystems im Rahmen einer entzündlichen Reaktion oder auch als Folge von Zellschädigungen, wie z.B. bei Ischämien (162). Daher wird es auch als „damage- / danger-associated molecular pattern“- (DAMP-) Molekül bezeichnet (163). Des Weiteren setzen Thrombozyten nach Aktivierung ebenfalls HMGB1 frei (164), welches unter anderem einen wesentlichen Beitrag zur Thrombogenese leistet (165). So fördert es nicht nur die Aktivierung von Thrombozyten, sondern auch die Sekretion der Granula und die Adhäsion an Gefäßwände (165). Weiterhin führt es zur Inhibierung der Migration von mesenchymalen Stammzellen (164) sowie zur Rekrutierung von Monozyten über den „receptor for advanced glycation end products“ (RAGE) und verhindert zudem deren Apoptose über den „toll-like receptor 4“ (TLR4) (166).

1.3.6 P-Selektin (= CD62p)

P-Selektin bzw. CD62p ist ein membranständiges Zelladhäsionsmolekül, das vor allem in den thrombozytären α -Granula vorkommt, aber auch in den elektronendichten Granula der Thrombozyten (167) sowie in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen nachgewiesen werden konnte (168). Aufgrund seines vermehrten Vorkommens an der Zelloberfläche von Thrombozyten im Zuge deren Aktivierung, kann es als Marker hierfür dienen und mittels Durchflusszytometrie oder einem „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) quantifiziert werden (169). Seine Wirkung übt P-Selektin über Bindung an Liganden – genannt seien „P-selectin glycoprotein ligand-1“ (PSGL-1) (168), GPIIb α (170) und Sulfatide (171) – an der Oberfläche von anderen Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen aus (168, 172). So fördert es nicht nur durch Stabilisierung der Fibrinogen-GPIIb/IIIa-Bindungen das Wachstum der Thrombozyten-Aggregate oder vermittelt das „Rollen“ von Leukozyten entlang eines aktivierten Endothels, sondern trägt auch, aufgrund der Bildung von Aggregaten aus Thrombozyten und Leukozyten, zu einer Ausschüttung von Zytokinen und einem prothrombotischen Zustand bei (168, 173). CD62p vermittelt ebenfalls die Adhäsion von Stammzellen an aktivierte Thrombozyten und spielt somit eine wesentliche Rolle während Reparaturvorgängen und Remodeling (148).

1.3.7 TGF- β 1

Bei TGF- β handelt es sich um eine Gruppe von Zytokinen, welche in 3 Isoformen unterteilt werden: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 (174). Die häufigste Isoform TGF- β 1 wird nahezu ubiquitär von einer Vielzahl an Zellen gebildet (174). Es vermittelt seine Wirkungen über die Bindung an Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen an der Oberfläche der Zielzellen (175). TGF- β 1 übernimmt unter anderem wichtige Funktionen bei der Regulierung von Zellproliferation, -wachstum und -differenzierung sowie Entzündungsprozessen (174). Des Weiteren ist es auch an der Bildung der extrazellulären Matrix beteiligt und stellt

damit einen wesentlichen Faktor für Vorgänge wie Wundheilung und Fibrosierung dar (175). So spielt es beispielsweise nicht nur bei der Pathophysiologie und Prognose des Myokardinfarkts eine wesentliche Rolle (176, 177), sondern auch in der Genese der NAFLD. Dies gilt für den gesamten Verlauf vom Beginn als einfache Inflammation und Fibrose bis hin zu Zirrhose und HCC (178). TGF- β 1 wird auch an der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert und weist Assoziationen zur SDF-1/CXCR4/CXCR7-Achse auf (179). So führte in einer Studie die SDF-1-abhängige Stimulation von CXCR4- und CXCR7-Rezeptoren zu einer vermehrten Expression von TGF- β 1 an der Oberfläche von Thrombozyten, während hingegen umgekehrt eine Stimulation mit TGF- β 1 keine vermehrte Expression von SDF-1, CXCR4 oder CXCR7 zur Folge hatte (179).

1.4 Fragestellung / Ziele

Die nicht-alkoholische Steatosis hepatis und die koronare Herzerkrankung besitzen gemeinsame Risikofaktoren, von welchen allen voran die Faktoren des metabolischen Syndroms zu nennen sind (15, 180).

Des Weiteren ist bereits bekannt, dass Thrombozyten bei der Entstehung und Progression der Steatosis hepatis eine pathogenetisch relevante Rolle spielen (39).

Verschiedene Studien zeigten zudem, dass die in dieser Studie untersuchten thrombozytären Biomarker mit der Prognose von Patienten mit einer symptomatischen KHK assoziiert sind (147, 149, 150, 177).

Daraus abgeleitet ergab sich als Ziel dieser Dissertation die Untersuchung und Bestimmung der Expression verschiedener thrombozytärer Biomarker in einem gut charakterisierten Patientenkollektiv mit nicht-alkoholischer Steatosis hepatis.

Wesentliche Fragestellungen hierbei waren:

- Sind thrombozytäre Biomarker mit dem Ausprägungsgrad der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis assoziiert?
- Korrelieren thrombozytäre Biomarker mit dem Verlauf der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis?
- Wie ist der zeitliche Verlauf der Expression von thrombozytären Biomarkern mit dem zeitlichen Verlauf der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis assoziiert?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv, Studienaufbau und Studienprotokoll

Diese prospektive, monozentrische Studie wurde von Mai 2016 bis Januar 2018 in den Abteilungen für Innere Medizin III und Innere Medizin VIII sowie der Abteilung für Radiologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt (Projektnummer 587/2016BO2) und folgt den Grundregeln der Deklaration von Helsinki und der guten wissenschaftlichen Praxis (181). Es wurden 30 Patienten in die Studie aufgenommen, welche alle ihr schriftliches Einverständnis erklärten.

Zu den Einschlusskriterien zählten ein Alter von 18 bis 80 Jahren, eine symptomatische KHK oder ein ACS in der Vorgeschichte sowie ein Diabetes mellitus Typ 2 und/oder ein BMI ≥ 30 kg/m² als Risikofaktoren für eine NAFL.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit alkoholischer Steatohepatitis (ASH), autoimmun bedingter Hepatitis, Hämochromatose, Morbus Wilson, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel sowie viral bedingten Hepatitiden mit den Erregern Hepatitis A, B, C, D und E sowie dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem Zytomegalievirus (CMV). Zu diesem Zweck wurden bei jedem Patienten ein für die Studienteilnahme nicht verpflichtender „Michigan Alcoholism Screening Test“ (MAST) durchgeführt sowie einmalig initial die auf die genannten Ausschlusskriterien hinweisenden Laborparameter erhoben. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patienten, die bereits eine antithrombozytäre Therapie als Dauermedikation erhielten.

Nach Durchführung einer medizinisch indizierten perkutanen Koronarangiographie wurden die Patienten innerhalb von maximal 4 Wochen der Studie zugeführt und abhängig von der, je nach Befund, auf die Intervention folgenden antithrombozytären Therapie in 3 Arme aufgeteilt, welche alle die

gleichen Untersuchungen erhielten. Ein Arm bildete die Kontrollgruppe, die keine antithrombozytäre Therapie erhielt. Die beiden anderen Arme wurden durch Patienten mit ASS in Monotherapie beziehungsweise dualer antithrombozytärer Therapie mit ASS und einem P2Y12-Inhibitor über eine Dauer von mindestens 6 Monaten gebildet.

Die Basis- sowie die ca. 6 Monate später stattfindenden Folgeuntersuchungen umfassten die Entnahme von insgesamt 80 ml peripher-venösem Blut für die Multiplate-Impedanzaggregometrie, ein durchflusszytometrisches FACS-Profil („fluorescence-activated cell sorting“) der thrombozytären Biomarker SDF-1, CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p, und TGF- β 1, ein kleines Blutbild sowie die Bestimmung der gebräuchlichen Leber-, Gerinnungs- und Blutfettwerte. Ebenso wurden Serum- und Plasmaproben für zukünftige Untersuchungen konserviert. Zusätzlich kam bei der Basisuntersuchung die oben genannte Ausschlussdiagnostik hinzu. Des Weiteren wurden sowohl bei der Basis- als auch der Folgeuntersuchung eine Sonographie und eine MRT-Bildgebung der Leber durchgeführt.

Für die vorliegende Dissertation spielten als Teilbereich der Studie die Untersuchung der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1 per FACS sowie die Ergebnisse der MRT-Bildgebung eine Rolle. Hierfür wurden die Patienten nach Ab- und Zunahme der magnetresonanztomographisch gemessenen Lebervolumina und Leberfettgehalte sowie entsprechend des Erhaltens oder Nichterhaltens einer antithrombozytären Therapie in jeweils zwei Gruppen eingeteilt und anhand der Expression der genannten Biomarker miteinander verglichen. Von den 30 in die Studie aufgenommen Patienten wurden schließlich 25 in die Auswertung genommen. Die Gründe hierfür waren, dass bei drei der Patienten die MRT-Untersuchungen nicht korrekt durchgeführt werden konnten oder vorzeitig abgebrochen werden mussten sowie bei jeweils einem weiteren Patienten eine akute Lebererkrankung diagnostiziert wurde bzw. die Leberschädigung retrospektiv auf die Einnahme von Methotrexat zurückgeführt werden konnte.

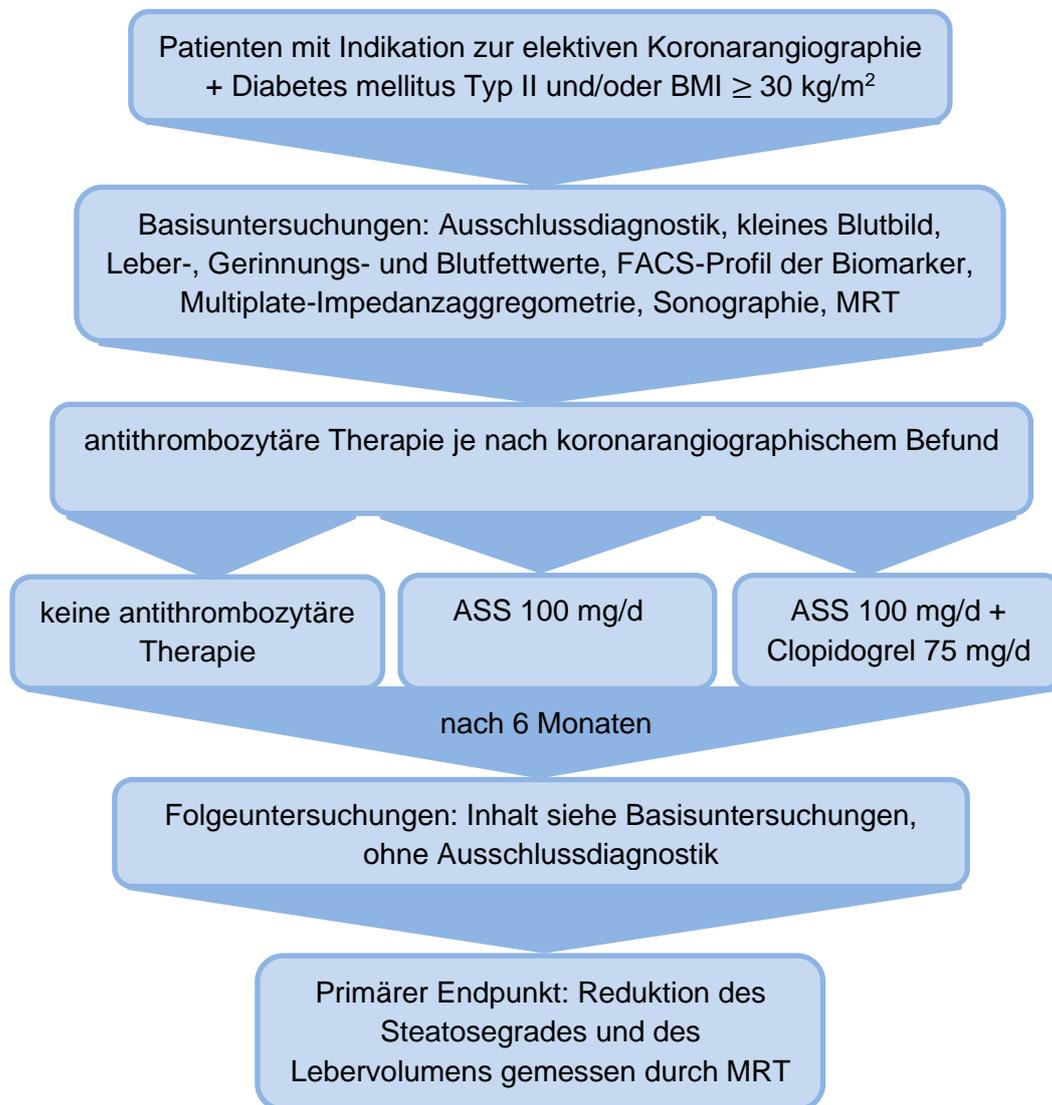


Abbildung 4: Flussdiagramm des Studiendesigns mit Einschlusskriterien und definiertem Endpunkt sowie diagnostischem Vorgehen und Aufteilung in therapeutische Gruppen im Rahmen der Studie

2.1.1 Basischarakteristika des Patientenkollektivs

Tabelle 2: Übersichtsdarstellung der Basischarakteristika des Patientenkollektivs, getrennt nach der Entwicklung des Lebert Volumens im 6-monatigen Verlauf: mit Angabe der p-Werte (p < 0,05 fett markiert); MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Anzahl der Patienten

	Alle Patienten (n = 25)	Abnahme Lebert Volumen (n = 16)	Zunahme Lebert Volumen (n = 8)	p-Wert
Alter in Jahren (MW ± SD)	57,52 (± 10,16)	55,63 (± 8,82)	61,00 (± 12,83)	0,239
weiblich	n = 5 (20 %)	n = 3 (18,8 %)	n = 2 (25 %)	0,722
männlich	n = 20 (80 %)	n = 13 (81,3 %)	n = 6 (75 %)	0,722
Arterielle Hypertension	n = 18 (72 %)	n = 11 (68,8 %)	n = 6 (75 %)	0,751
Hyperlipidämie	n = 15 (60 %)	n = 8 (50 %)	n = 6 (75 %)	0,242
Diabetes mellitus Typ II	n = 6 (24 %)	n = 2 (12,5 %)	n = 3 (37,5%)	0,155
BMI > 30 kg/m²	n = 22 (88 %)	n = 15 (93,8 %)	n = 6 (75 %)	0,190
Raucher/-in	n = 7 (28 %)	n = 5 (31,3 %)	n = 1 (16,7 %)	0,317
Dauermedikation mit Statinen	n = 15 (60 %)	n = 10 (66,7 %)	n = 4 (50 %)	0,435
LVEF [%] (MW ± SD)	57,80 (± 5,97)	58,44 (± 5,39)	57,50 (± 7,07)	0,721
MAST-Score (MW ± SD)	1,16 (± 2,91)	1,13 (± 3,46)	1,38 (± 1,77)	0,851
GOT [U/l] (MW ± SD)	26,36 (± 11,27)	24,06 (± 8,57)	29,50 (± 15,34)	0,273
GPT [U/l] (MW ± SD)	33,52 (± 19,08)	32,35 (± 12,05)	36,63 (± 30,31)	0,615
γ-GT [U/l] (MW ± SD)	57,44 (± 84,05)	68,06 (± 104,00)	37,63 (± 17,82)	0,425
AP [U/l] (MW ± SD)	79,52 (± 24,74)	83,88 (± 25,87)	73,50 (± 22,64)	0,346
Gesamtcholesterin [mg/dl] (MW ± SD)	175,56 (± 38,25)	172,40 (± 35,96)	180,83 (± 44,83)	0,684
HDL [mg/dl] (MW ± SD)	44,69 (± 14,00)	41,90 (± 13,00)	49,33 (± 15,57)	0,320
LDL [mg/dl] (MW ± SD)	113,06 (± 33,58)	113,10 (± 33,23)	113,00 (± 37,34)	0,996

Triglyzeride [mg/dl] (MW ± SD)	199,69 (± 174,84)	227,30 (± 214,18)	153,67 (± 71,20)	0,434
Thrombozytenzahl [Tausend/μl] (MW ± SD)	222,04 (± 66,51)	227,50 (± 78,94)	212,38 (± 40,29)	0,618

Tabelle 3: Übersichtsdarstellung der Basischarakteristika des Patientenkollektivs, getrennt nach der Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf: mit Angabe der p-Werte (p < 0,05 fett markiert); MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Anzahl der Patienten

	Alle Patienten (n = 25)	Abnahme Leberfettgehalt (n = 11)	Zunahme Leberfettgehalt (n = 12)	p-Wert
Alter in Jahren (MW ± SD)	57,52 (± 10,16)	54,45 (± 7,52)	60,00 (± 12,52)	0,217
weiblich	n = 5 (20 %)	n = 2 (18,2 %)	n = 3 (25 %)	0,692
männlich	n = 20 (80 %)	n = 9 (81,8 %)	n = 9 (75 %)	0,692
Arterielle Hypertension	n = 18 (72 %)	n = 7 (63,6 %)	n = 9 (75 %)	0,554
Hyperlipidämie	n = 15 (60 %)	n = 8 (72,7 %)	n = 6 (50 %)	0,265
Diabetes mellitus Typ II	n = 6 (24 %)	n = 2 (18,2 %)	n = 4 (33,3 %)	0,408
BMI > 30 kg/m²	n = 22 (88 %)	n = 11 (100 %)	n = 9 (75 %)	0,075
Raucher/-in	n = 7 (28 %)	n = 3 (27,3 %)	n = 4 (33,3 %)	0,752
Dauermedikation mit Statinen	n = 15 (60 %)	n = 10 (90,9 %)	n = 4 (36,4 %)	0,008
LVEF [%] (MW ± SD)	57,80 (± 5,97)	58,18 (± 3,37)	57,08 (± 8,11)	0,673
MAST-Score (MW ± SD)	1,16 (± 2,91)	0,64 (± 1,50)	1,83 (± 3,93)	0,354
GOT [U/l] (MW ± SD)	26,36 (± 11,27)	28,45 (± 14,03)	25,00 (± 9,46)	0,493
GPT [U/l] (MW ± SD)	33,52 (± 19,08)	31,55 (± 11,65)	35,08 (± 25,75)	0,680
γ-GT [U/l] (MW ± SD)	57,44 (± 84,05)	40,36 (± 19,63)	67,00 (± 119,85)	0,475
AP [U/l] (MW ± SD)	79,52 (± 24,74)	71,64 (± 11,70)	89,58 (± 31,39)	0,086

Gesamtcholesterin [mg/dl] (MW ± SD)	175,56 (± 38,25)	195,75 (± 23,23)	172,55 (± 40,42)	0,304
HDL [mg/dl] (MW ± SD)	44,69 (± 14,00)	40,25 (± 16,74)	47,55 (± 13,20)	0,392
LDL [mg/dl] (MW ± SD)	113,06 (± 33,58)	135,00 (± 29,33)	108,18 (± 33,14)	0,179
Triglyzeride [mg/dl] (MW ± SD)	199,69 (± 174,84)	293,25 (± 346,00)	168,82 (± 72,60)	0,526
Thrombozytenzahl [Tausend/µl] (MW ± SD)	222,04 (± 66,51)	243,00 (± 81,88)	215,17 (± 45,28)	0,319

Tabelle 4: Übersichtsdarstellung der Basischarakteristika des Patientenkollektivs, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf: mit Angabe der p-Werte (p < 0,05 fett markiert); MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Anzahl der Patienten

	Alle Patienten (n = 25)	Ohne Antiaggregation (n = 11)	Mit Antiaggregation (n = 14)	p-Wert
Alter in Jahren (MW ± SD)	57,52 (± 10,16)	59,45 (± 11,17)	56,00 (± 9,44)	0,410
weiblich	n = 5 (20 %)	n = 4 (36,4 %)	n = 1 (7,1 %)	0,070
männlich	n = 20 (80 %)	n = 7 (63,6 %)	n = 13 (92,9 %)	0,070
Arterielle Hypertension	n = 18 (72 %)	n = 7 (63,6 %)	n = 11 (78,6 %)	0,409
Hyperlipidämie	n = 15 (60 %)	n = 5 (45,5 %)	n = 10 (71,4 %)	0,188
Diabetes mellitus Typ II	n = 6 (24 %)	n = 3 (27,3 %)	n = 3 (21,4 %)	0,734
BMI > 30 kg/m²	n = 22 (88 %)	n = 8 (72,7 %)	n = 14 (100 %)	0,037
Raucher/-in	n = 7 (28 %)	n = 1 (9,1 %)	n = 6 (42,9 %)	0,062
Dauermedikation mit Statinen	n = 15 (60 %)	n = 3 (30,0 %)	n = 12 (85,7 %)	0,005
LVEF [%] (MW ± SD)	57,80 (± 5,97)	58,18 (± 6,03)	57,50 (± 6,12)	0,783
MAST-Score (MW ± SD)	1,16 (± 2,91)	0,55 (± 0,93)	1,64 (± 3,80)	0,360
GOT [U/l] (MW ± SD)	26,36 (± 11,27)	25,09 (± 9,20)	27,36 (± 12,92)	0,628

GPT [U/l] (MW ± SD)	33,52 (± 19,08)	35,82 (± 26,53)	31,71 (± 11,07)	0,604
γ-GT [U/l] (MW ± SD)	57,44 (± 84,05)	78,55 (± 124,49)	40,86 (± 21,17)	0,343
AP [U/l] (MW ± SD)	79,52 (± 24,74)	79,82 (± 23,61)	79,29 (± 26,47)	0,959
Gesamtcholesterin [mg/dl] (MW ± SD)	175,56 (± 38,25)	177,89 (± 43,89)	172,57 (± 32,73)	0,793
HDL [mg/dl] (MW ± SD)	44,69 (± 14,00)	49,00 (± 14,97)	39,14 (± 11,29)	0,170
LDL [mg/dl] (MW ± SD)	113,06 (± 33,58)	114,44 (± 36,25)	111,29 (± 32,55)	0,859
Triglyzeride [mg/dl] (MW ± SD)	199,69 (± 174,84)	157,78 (± 67,00)	253,57 (± 253,80)	0,292
Thrombozytenzahl [Tausend/μl] (MW ± SD)	222,04 (± 66,51)	211,45 (± 48,10)	230,36 (± 78,85)	0,492

2.2 Durchflusszytometrische Bestimmungen der Biomarker

Die durchflusszytometrischen FACS-Untersuchungen wurden mit Vollblut durchgeführt, in welchem die Thrombozyten auf die Biomarker SDF-1, CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p, TGF-β1 sowie den thrombozytenspezifischen Marker CD42b (= GPIbα) hin untersucht wurden. Jeder Biomarker wurde in zwei Proben doppelt bestimmt. Das Vollblut wurde zu diesem Zweck peripher-venös direkt in eine 8,5 ml CPDA- (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin-) Monovette entnommen und anschließend im Verhältnis 1:50 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Hersteller: Sigma-Aldrich) verdünnt. Für die Bestimmung von HMGB1 wurde der PBS-Lösung zusätzlich Calcium hinzugefügt. Dieses verdünnte Blut wurde im nächsten Schritt für 30 Minuten lichtgeschützt mit den folgenden Antikörpern inkubiert: anti-h/mCXCL12/SDF-1-FITC, anti-HMGB-1/HMG-1-AlexaFluor488 (Hersteller: alle R&D Systems) und anti-CD62p-FITC (Hersteller: Beckman Coulter) jeweils gemeinsam mit anti-hCD42b-PE (Hersteller: BD Biosciences); sowie anti-hCXCR4-PE, anti-hCXCR7/RDC-1-PE und anti-hTGF-β1-PE

(Hersteller: alle R&D Systems) jeweils gemeinsam mit anti-CD42b-FITC (Hersteller: Beckman Coulter). Die fluoreszierenden Farbstoffe hierbei waren Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Nach der Inkubation wurden die Proben mit 0,5-prozentigem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bis zur Untersuchung für maximal 3 Tage gekühlt gelagert. Die anschließenden Messungen wurden mit dem Gerät FACSCalibur von BD Biosciences durchgeführt.

Aufgrund eines Lieferengpasses des anti-h/mCXCL12/SDF-1-FITC-Antikörpers während des Erhebungszeitraums dieser Studie, konnten in unserem Patientenkollektiv nur sehr wenige Daten zur thrombozytären Expression von SDF-1 gesammelt werden, weshalb dieser Biomarker von den weiteren Analysen ausgeschlossen wurde.

2.3 Magnetresonanztomographie der Leber

Für die Anfertigung der magnetresonanztomographischen Aufnahmen der Leber wurde von der Abteilung für Radiologie des Universitätsklinikums Tübingen ein 3 Tesla MRT-Gerät (Skyra Siemens Healthcare, Erlangen) verwendet. Zur Bestimmung des Lebervolumens sowie des Leberfettgehalts fand hierbei die „Multi-Echo Dixon Sequenz“ (LiverLab Siemens Healthcare, Erlangen) Anwendung.

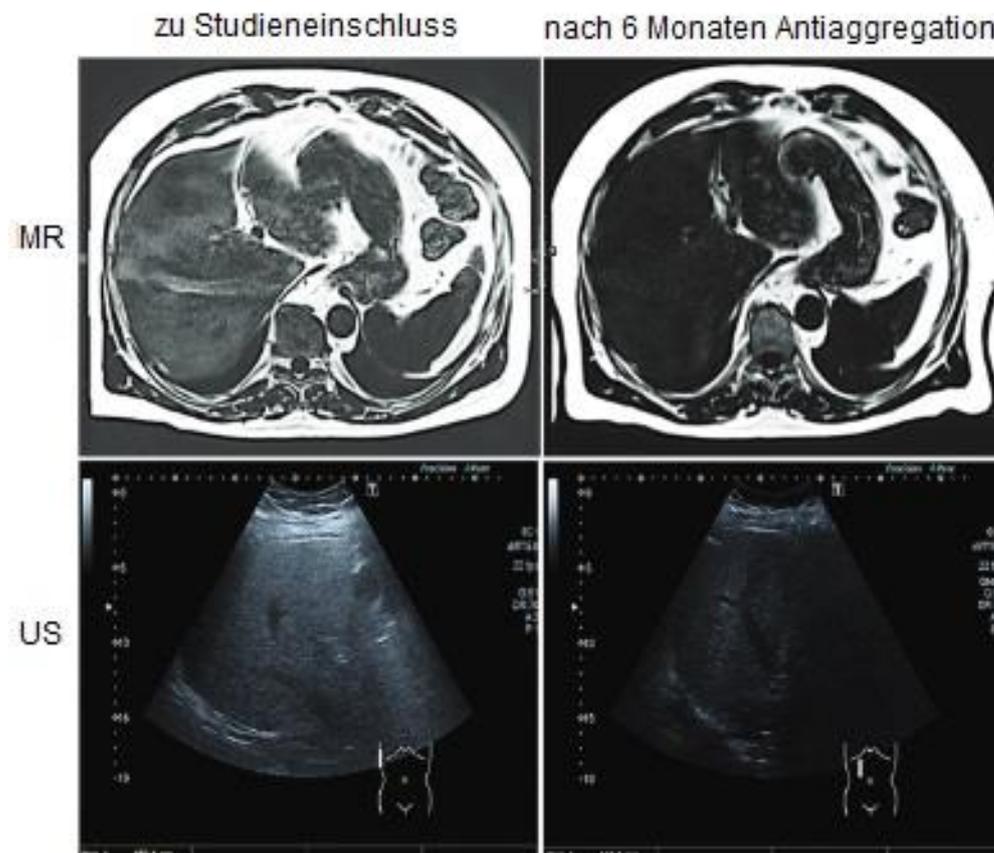


Abbildung 5: Beispielhafter Vergleich von MR- und US-Aufnahmen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses und nach 6 Monaten therapeutischer Aggregationshemmung: MR = Magnetresonanztomographie, US = Ultraschall

(modifiziert und übersetzt aus Malehmir, M., D. Pfister, S. Gallage, M. Szydlowska, D. Inverso, E. Kotsiliti, V. Leone, M. Peiseler, B. G. J. Surewaard, D. Rath, A. Ali, M. J. Wolf, H. Drescher, M. E. Healy, D. Dauch, D. Kroy, O. Krenkel, M. Kohlhepp, T. Engleitner, A. Olkus, T. Sijmonsma, J. Volz, C. Deppermann, D. Stegner, P. Helbling, C. Nombela-Arrieta, A. Rafiei, M. Hinterleitner, M. Rall, F. Baku, O. Borst, C. L. Wilson, J. Leslie, T. O'Connor, C. J. Weston, D. H. Adams, L. Sheriff, A. Teijeiro, M. Prinz, R. Bogeska, N. Anstee, M. N. Bongers, M. Notohamiprodjo, T. Geisler, D. J. Withers, J. Ware, D. A. Mann, H. G. Augustin, A. Vegiopoulos, M. D. Milsom, A. J. Rose, P. F. Lalor, J. M. Llovet, R. Pinyol, F. Tacke, R. Rad, M. Matter, N. Djouder, P. Kubes, P. A. Knolle, K. Unger, L. Zender, B. Nieswandt, M. Gawaz, A. Weber and M. Heikenwalder (2019). "Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer." *Nat Med* **25**(4): 641-655.)

2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programm „IBM SPSS Statistics“ verwendet. Allen Analysen wurde ein Signifikanzniveau von 5% ($p = 0,05$) zugrunde gelegt.

Zur Beschreibung der Basischarakteristika des Patientenkollektivs wurden die untersuchten klinischen Charakteristika und Laborwerte bei nominal skalierten Daten mithilfe des Chi-Quadrat-Tests verglichen und bei metrisch skalierten Daten mithilfe des t-Tests bei unabhängigen Stichproben. Die metrischen Daten wurden tabellarisch mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, die nominalen Daten hingegen mit absoluter Anzahl und relativem Anteil in Prozent.

Aufgrund der geringen Fallzahlen des untersuchten Patientenkollektivs fand zum Vergleich zweier unverbundener, metrisch skaliertes Stichproben der Mann-Whitney-U-Test Anwendung und die jeweiligen Mediane sowie Quartile wurden sowohl tabellarisch als auch grafisch in Form von Boxplots dargestellt. Bei kleinen Stichproben von $n < 30$ wurde hierbei die exakte Signifikanz berichtet. Diese Methode wurde bei den Vergleichen der nach Zu- und Abnahme des Lebervolumens und -fettgehalts sowie nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation gruppierten Patienten hinsichtlich der Expression der thrombozytären Biomarker verwendet.

Für die bivariaten Korrelationsanalysen von Lebervolumen oder Leberfettgehalt mit der Expression der thrombozytären Biomarker wurde aufgrund der geringen Fallzahlen des Patientenkollektivs der Spearman-Korrelationskoeffizient zugrunde gelegt und auf zweiseitige Signifikanz hin überprüft. Die Ergebnisse wurden grafisch in Form von Streudiagrammen mit Anpassungslinie dargestellt.

Obwohl der Einfluss einer antithrombozytären Therapie auf die Expression von thrombozytären Biomarkern nicht Teil der Fragestellung dieser Dissertation war, wurden diese Daten dennoch in die statistische Auswertung mit aufgenommen, da es sich bei der Antiaggregation um die zentrale Störvariable unseres Studiendesigns handelte. Eine umfassende Analyse und vollständige

Interpretation der Ergebnisse dieser Dissertation ist deshalb nur unter Berücksichtigung der möglichen Einflüsse einer Antiaggregation möglich. Zum Zweck einer vollständigen Darstellung der Ergebnisse wurde dabei auch schon zum Basiszeitpunkt die Expression der thrombozytären Biomarker gruppiert nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation analysiert und verglichen, da aufgrund des Studiendesigns zwischen PCI und Basisuntersuchung bis zu 4 Wochen verstreichen konnten und die Patienten daher die Antiaggregation – wenn medizinisch indiziert – schon über einen gewissen Zeitraum erhielten.

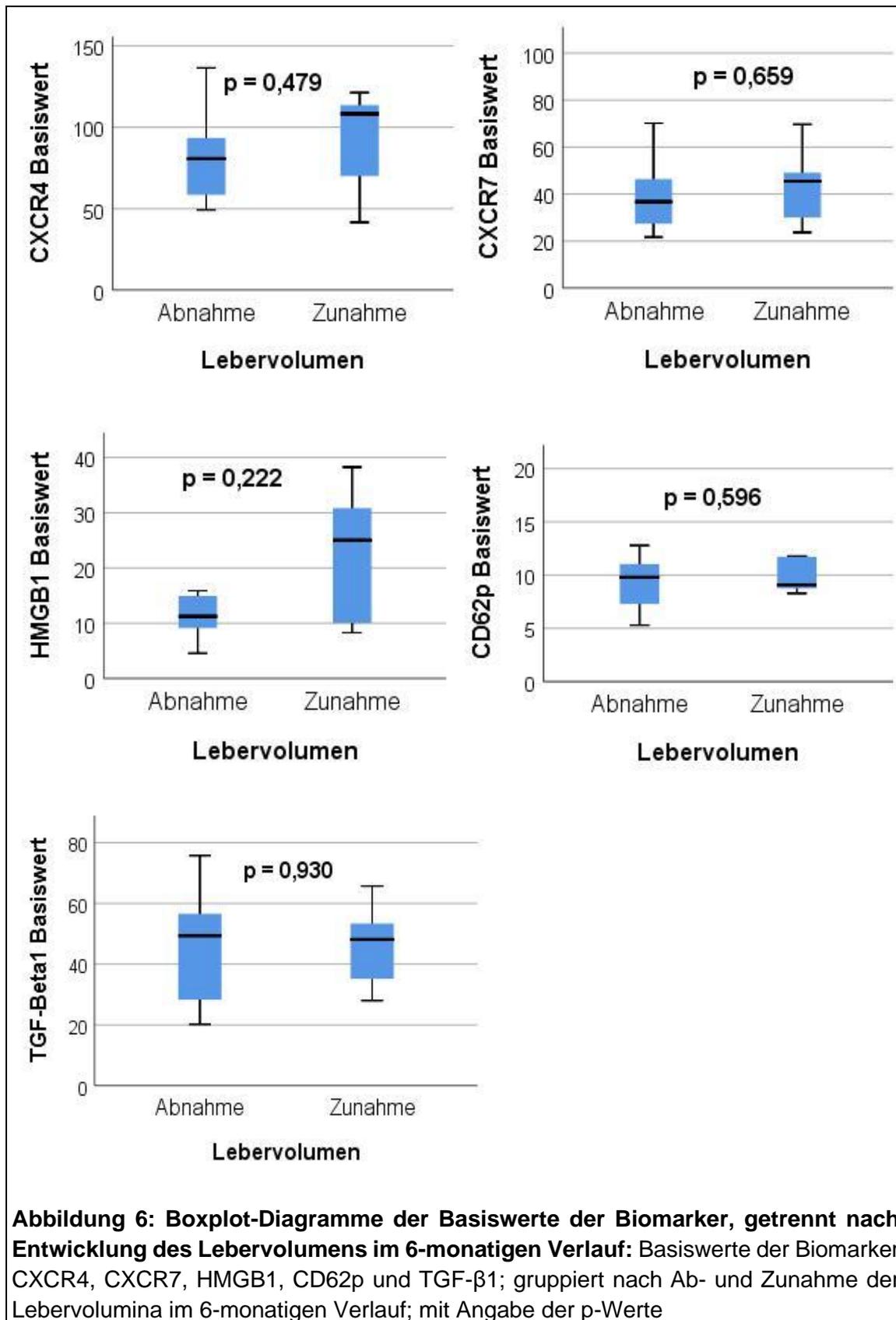
3. Ergebnisse

3.1 Thrombozytäre Biomarker und Lebertvolumen

Um den Einfluss der thrombozytären Biomarker auf die Entwicklung des Lebertvolumens im 6-monatigen Verlauf zu untersuchen, sollen im Folgenden zunächst die Basiswerte tabellarisch und grafisch dargestellt werden:

Tabelle 5: Vergleich der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Entwicklung des Lebertvolumens im 6-monatigen Verlauf: Median und Quartile der Basiswerte der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Ab- und Zunahme der Lebertvolumina im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte (Werte $p < 0,05$ fett hervorgehoben); n = Anzahl der Patienten

Basiswerte	Abnahme Lebertvolumen	Zunahme Lebertvolumen	p-Wert
CXCR4 (Median + 25./75. Perzentile)	80,72 (57,24 / 94,96) n = 11	108,28 (59,93 / 117,35) n = 7	0,479
CXCR7 (Median + 25./75. Perzentile)	36,77 (25,37 / 52,46) n = 11	45,47 (29,35 / 52,66) n = 7	0,659
HMGB1 (Median + 25./75. Perzentile)	11,23 (8,69 / 15,41) n = 8	25,02 (9,17 / 34,53) n = 5	0,222
CD62p (Median + 25./75. Perzentile)	9,79 (6,70 / 11,45) n = 11	9,08 (8,55 / 11,79) n = 7	0,596
TGF-β1 (Median + 25./75. Perzentile)	49,36 (28,04 / 59,10) n = 11	48,13 (34,01 / 54,78) n = 7	0,930



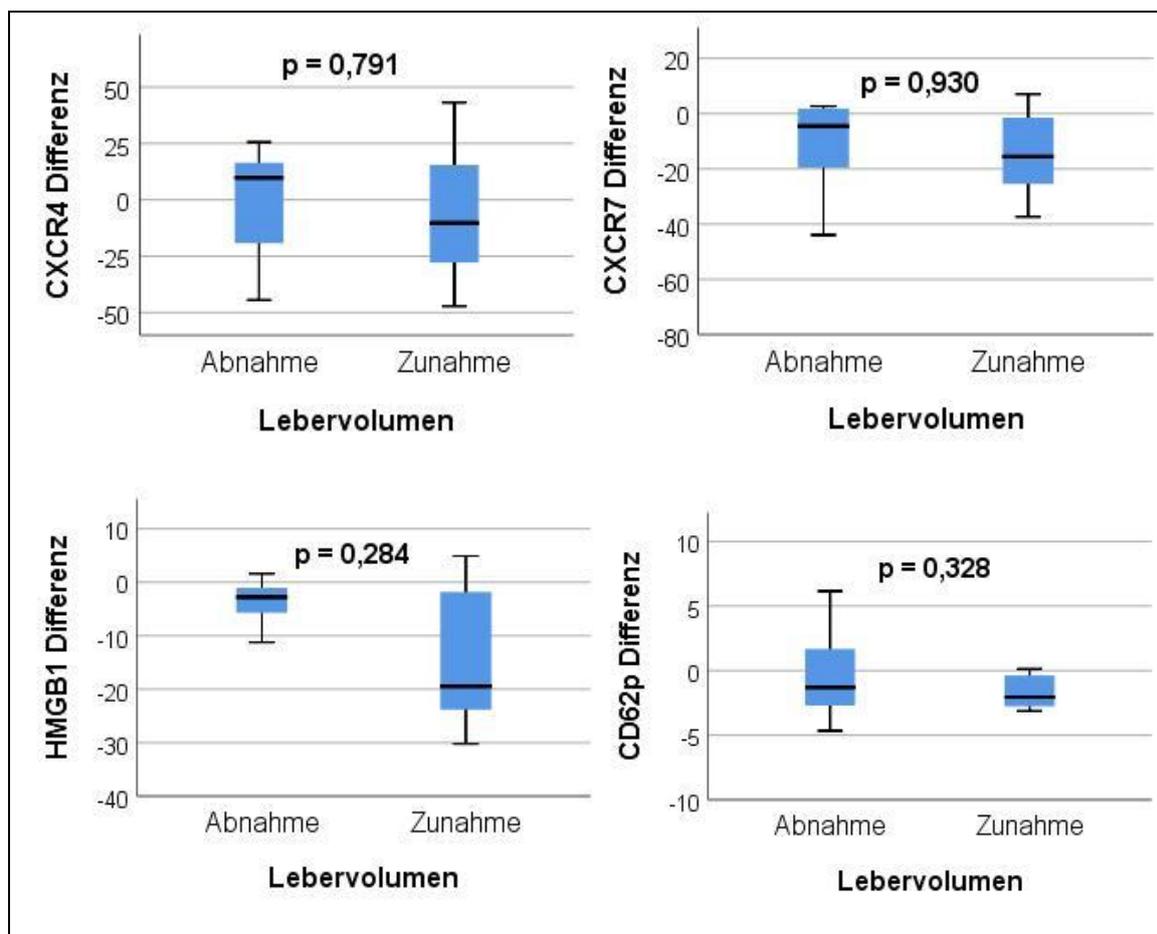
Hierbei zeigten sich im Falle von CXCR4, CXCR7 und insbesondere HMGB1 im Median höhere Basiswerte in der Gruppe derjenigen Patienten, welche im weiteren Verlauf an Lebervolumen zugenommen hatten. Für CD62p und TGF- β 1 unterschieden sich beide Gruppen im Median hingegen nur gering. Trotz der sichtbaren Unterschiede, konnte für keinen der Biomarker per Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zwischen beiden untersuchten Gruppen festgestellt werden. Den niedrigsten p-Wert von 0,222 konnte hierbei trotz kleinster Fallzahlen HMGB1 aufweisen.

Im nächsten Schritt wurden die Differenzen der Biomarker – welche sich rechnerisch aus der Subtraktion der Basiswerte von den in den Folgeuntersuchungen nach 6 Monaten gemessenen Werten ergaben – in Relation zur Entwicklung des Lebervolumens gesetzt:

Tabelle 6: Vergleich der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Lebervolumens im 6-monatigen Verlauf: Median und Quartile der Differenzen (berechnet durch Subtraktion der Basiswerte von denen der Folgeuntersuchung) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Ab- und Zunahme der Lebervolumina im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte (Werte $p < 0,05$ fett hervorgehoben); n = Anzahl der Patienten

Differenzen	Abnahme Lebervolumen	Zunahme Lebervolumen	p-Wert
CXCR4 (Median + 25./75. Perzentile)	9,78 (-35,99 / 18,55) n = 11	-10,29 (-31,79 / 31,44) n = 7	0,791
CXCR7 (Median + 25./75. Perzentile)	-4,50 (-23,76 / 2,20) n = 11	-15,56 (-28,46 / 4,96) n = 7	0,930

HMGB1 (Median + 25./75. Perzentile)	-2,77 (-5,93 / -1,02) n = 8	-19,49 (-27,00 / 1,55) n = 5	0,284
CD62p (Median + 25./75. Perzentile)	-1,30 (-2,86 / 2,66) n = 11	-2,06 (-3,13 / 0,09) n = 7	0,328
TGF-β1 (Median + 25./75. Perzentile)	-7,35 (-12,14 / 2,29) n = 11	-10,74 (-23,65 / 2,11) n = 7	0,860



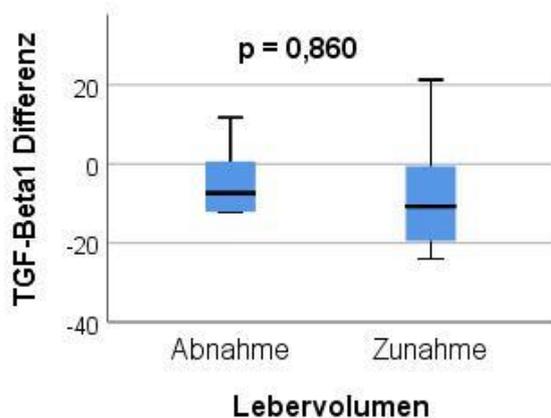


Abbildung 7: Boxplot-Diagramme der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Lebertumens im 6-monatigen Verlauf: Differenzen (berechnet durch Subtraktion der Basiswerte von denen der Folgeuntersuchung) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Ab- und Zunahme der Lebertumens im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte

Auffällig waren hierbei zunächst die fast ausnahmslos negativen Vorzeichen der Ergebnisse im Median. Lediglich für CXCR4 konnte in der Gruppe derjenigen Patienten mit einer Abnahme des Lebertumens ein deutlicher Anstieg der Expression im Median gemessen werden. Obwohl alle weiteren Biomarker im Median sowohl im Kollektiv mit einer Ab- als auch mit einer Zunahme des Lebertumens im Vergleich zur Voruntersuchung vermindert nachweisbar waren, stellten sich doch deutliche Unterschiede beim Vergleich der einzelnen Biomarker dar. So zeigte sich hinsichtlich CXCR4, CXCR7 und insbesondere HMGB1 eine ausgeprägtere Abnahme der Werte in der Gruppe der Patienten, deren Lebertumens zugenommen hatte. Für CD62p und TGF- β 1 war dieser Unterschied geringer ausgeprägt. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich hierbei bei allen untersuchten Biomarkern erneut keine.

Ergänzend wurden schließlich noch die Verhältnisse der Biomarker in beiden Gruppen miteinander verglichen. Diese Werte ergaben sich rechnerisch aus dem Quotienten der Werte der Folgeuntersuchungen und der Basisuntersuchungen:

Tabelle 7: Vergleich der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Lebert Volumens im 6-monatigen Verlauf: Median und Quartile der Verhältnisse (berechnet durch Division der Werte der Folgeuntersuchung durch die Basiswerte) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Ab- und Zunahme der Lebert volumina im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte (Werte $p < 0,05$ fett hervorgehoben); n = Anzahl der Patienten

Verhältnisse	Abnahme Lebertvolumen	Zunahme Lebertvolumen	p-Wert
CXCR4 (Median + 25./75. Perzentile)	1,17 (0,70 / 1,28) n = 11	0,90 (0,73 / 1,52) n = 7	0,860
CXCR7 (Median + 25./75. Perzentile)	0,88 (0,55 / 1,09) n = 11	0,66 (0,46 / 1,17) n = 7	1,000
HMGB1 (Median + 25./75. Perzentile)	0,74 (0,55 / 0,92) n = 8	0,23 (0,22 / 1,14) n = 5	0,284
CD62p (Median + 25./75. Perzentile)	0,90 (0,71 / 1,45) n = 11	0,82 (0,65 / 1,01) n = 7	0,328
TGF-β1 (Median + 25./75. Perzentile)	0,86 (0,73 / 1,08) n = 11	0,77 (0,56 / 1,04) n = 7	0,860

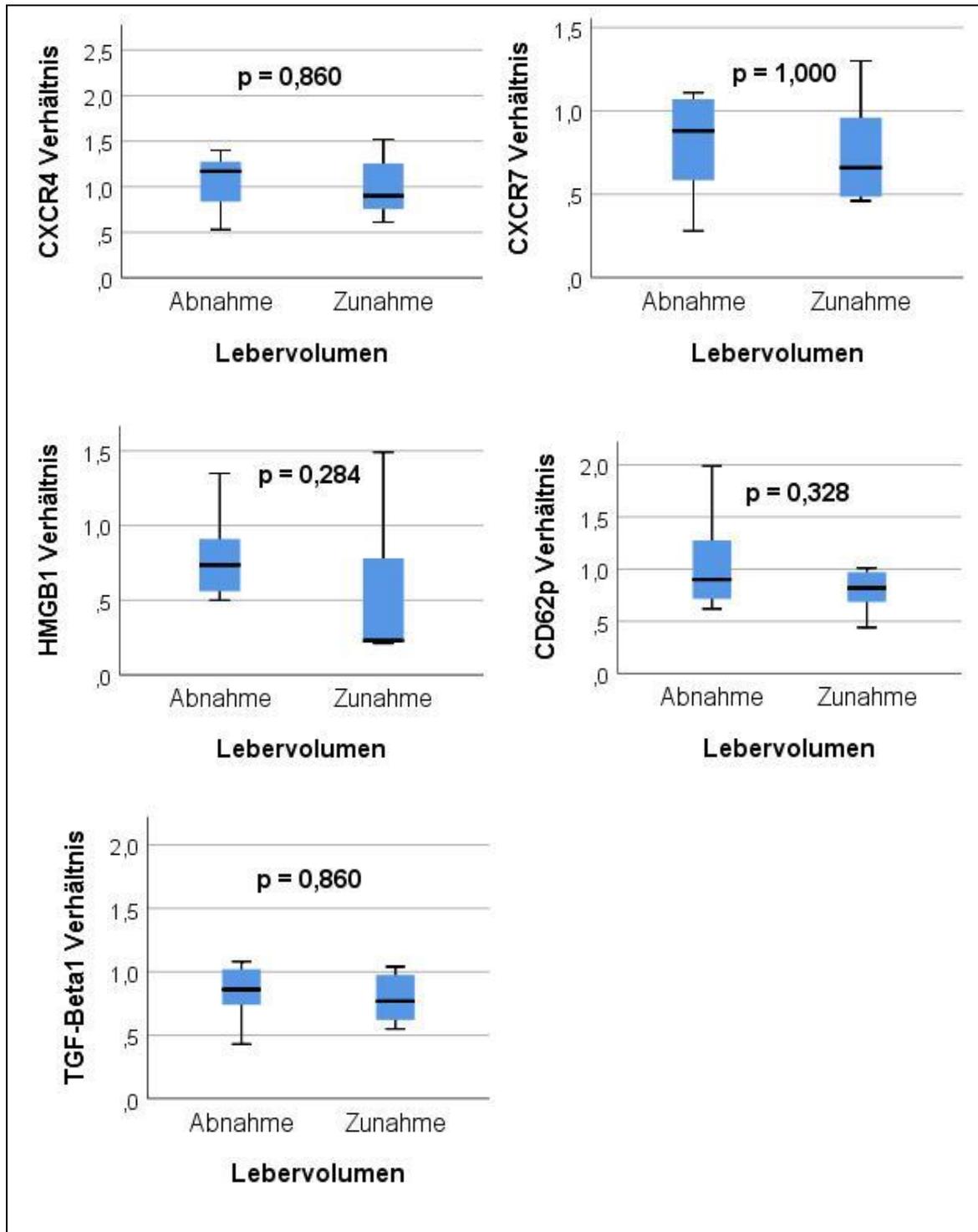
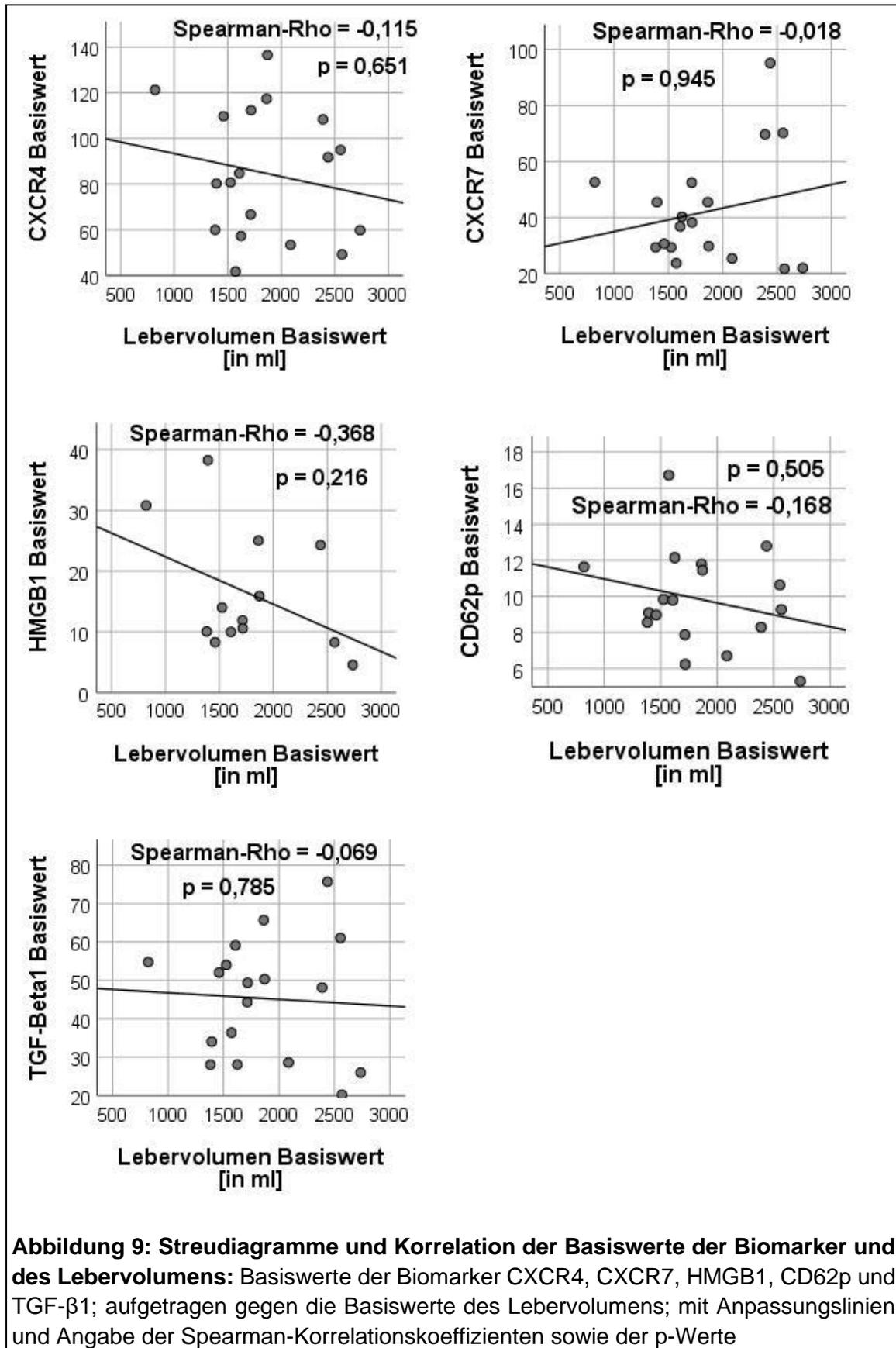


Abbildung 8: Boxplot-Diagramme der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Leber Volumens im 6-monatigen Verlauf: Verhältnisse (berechnet durch Division der Werte der Folgeuntersuchung durch die Basiswerte) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Ab- und Zunahme der Leber Volumina im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte

Bei der Betrachtung der Verhältnisse ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den Differenzen. Lediglich CXCR4 zeigte im Median in der Gruppe mit einer Abnahme des Lebervolumens eine Zunahme der absoluten Werte im zeitlichen Verlauf (erkennbar durch Verhältnis >1). Hinsichtlich CXCR4, CXCR7 und vor allem HMGB1 ergaben sich sichtbare und teils deutliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen; für CD62p und TGF- β 1 waren die Unterschiede erneut geringer ausgeprägt. Auch hier konnten allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede berechnet werden.

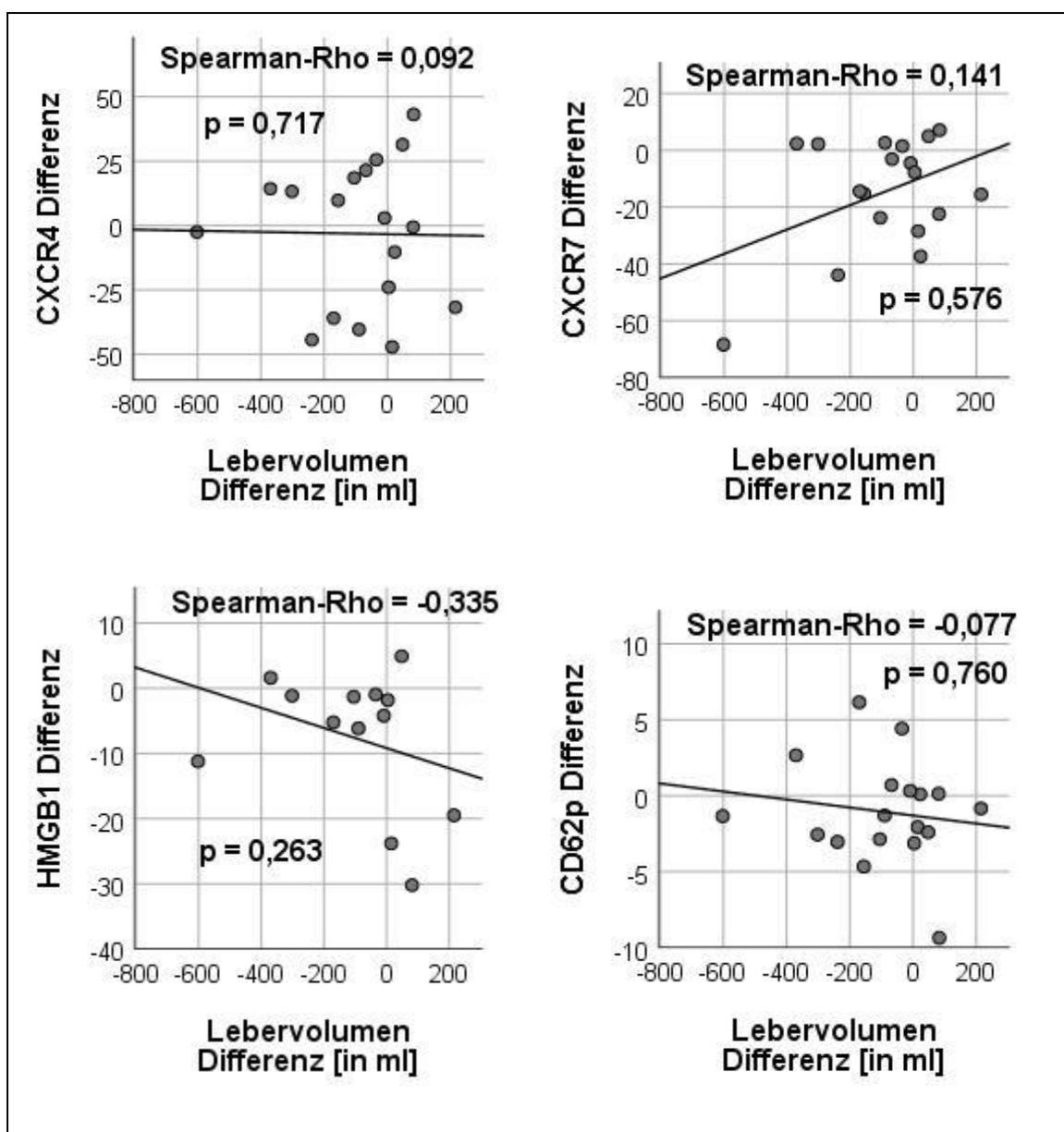
In der Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse lässt sich zum Einfluss thrombozytärer Biomarker auf das Lebervolumen sagen, dass in der an Volumen zunehmenden Gruppe die Biomarker CXCR4, CXCR7 und speziell HMGB1 stärker rückläufig waren als in der abnehmenden Gruppe, ohne dass diese Unterschiede jedoch statistisch signifikant waren. Für TGF- β 1 und insbesondere CD62p war diese Entwicklung nur geringfügig erkennbar. Bezüglich der Basiswerte kann gesagt werden, dass diejenigen Patienten, deren Lebervolumen im Verlauf zunahm, bei Studienaufnahme hinsichtlich CXCR4, CXCR7 und HMGB1 etwas höhere absolute Werte aufwiesen als die Vergleichsgruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Für CD62p und TGF- β 1 war dies nicht der Fall.

Ergänzend wurden schließlich durch Vergleich der Biomarker mit den korrespondierenden Basiswerten, Differenzen und Verhältnissen des Lebervolumens noch die jeweiligen Spearman-Korrelationskoeffizienten bestimmt und grafisch in Form von Streudiagrammen dargestellt:



Bei Betrachtung der Basiswerte ergab sich für HMGB1 mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von -0,368 und einem p-Wert von 0,216 noch der deutlichste Zusammenhang. Die übrigen Biomarker korrelierten zum Basiszeitpunkt weit weniger mit den initial gemessenen Lebertolumina.

Fahren wir mit der Analyse der Korrelation der Differenzen fort:



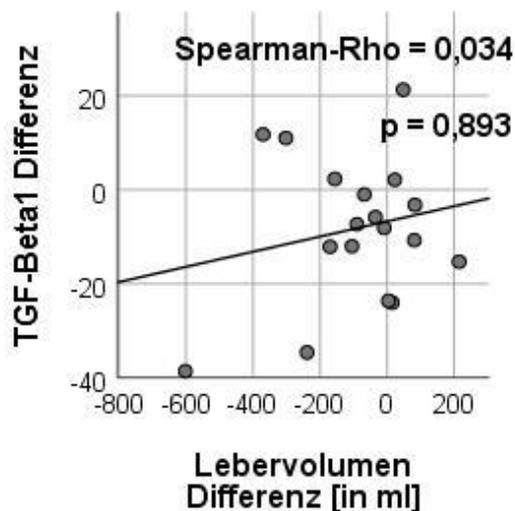
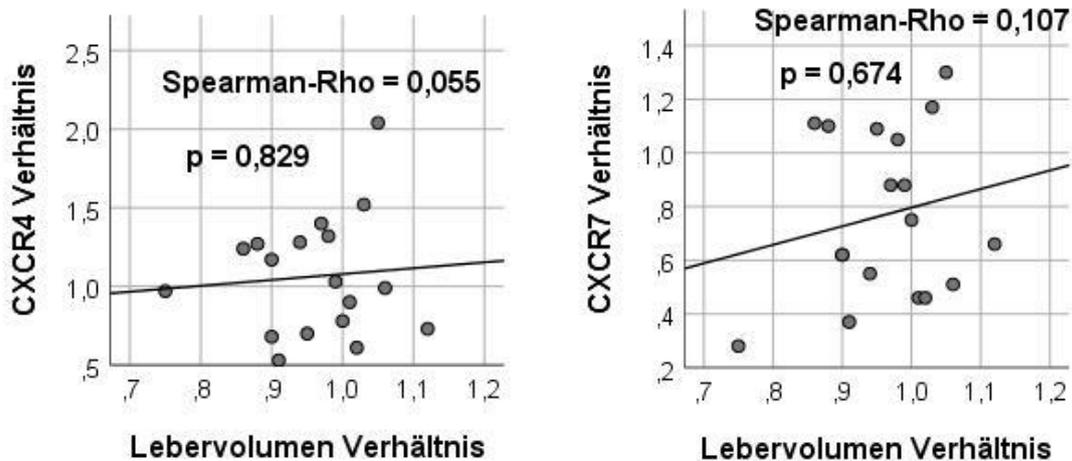


Abbildung 10: Streudiagramme und Korrelation der Differenzen der Biomarker und des Lebervolumens zwischen Folge- und Basisuntersuchung: Differenzen (berechnet durch Subtraktion der Basiswerte von denen der Folgeuntersuchung) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; aufgetragen gegen die Differenzen des Lebervolumens; mit Anpassungslinien und Angabe der Spearman-Korrelationskoeffizienten sowie der p-Werte

Auch hier ergaben sich mit Ausnahme von HMGB1 (Spearman-Rho = -0,335; $p = 0,263$) überwiegend sehr schwache Korrelationskoeffizienten. Bei der Korrelationsanalyse der Verhältnisse sollte sich dies bestätigen:



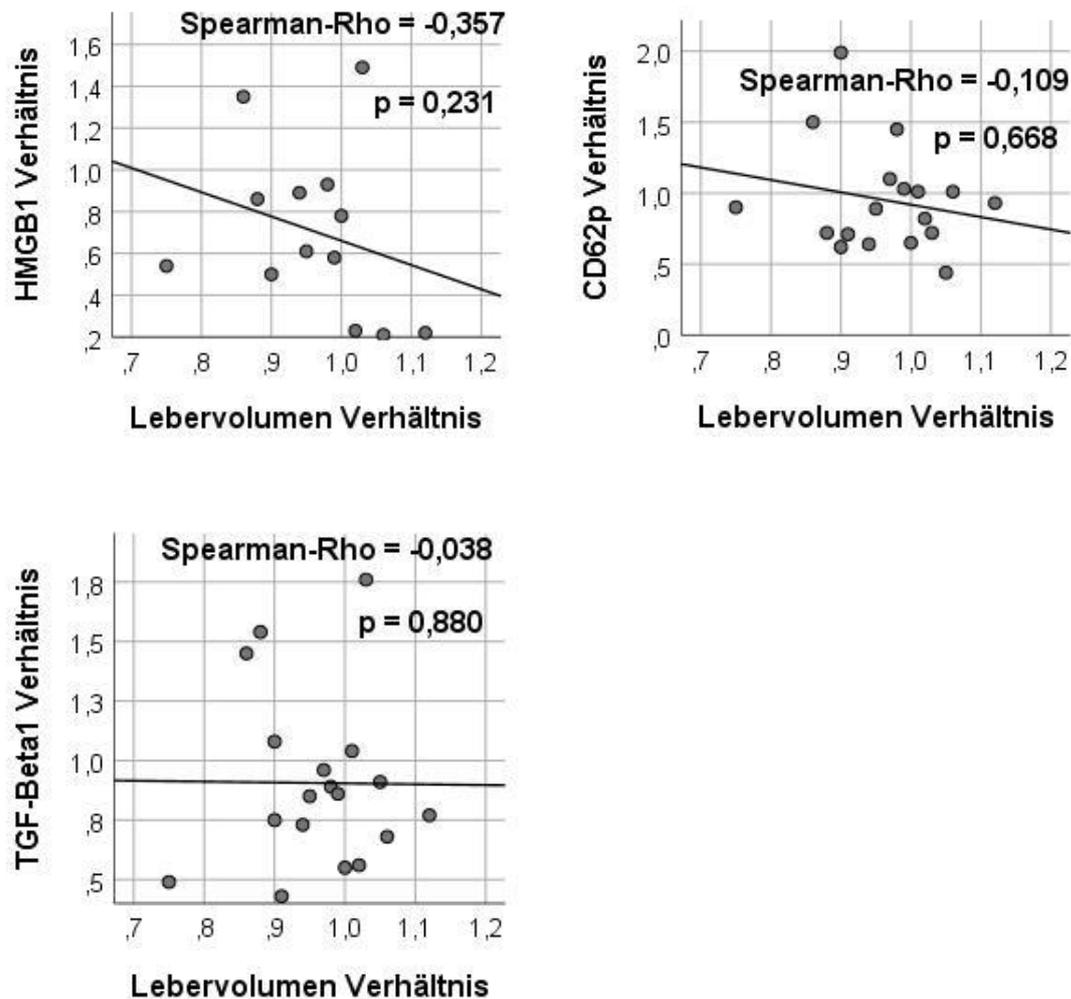


Abbildung 11: Streudiagramme und Korrelation der Verhältnisse der Biomarker und des Lebervolumens zwischen Folge- und Basisuntersuchung: Verhältnisse (berechnet durch Division der Werte der Folgeuntersuchung durch die Basiswerte) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; aufgetragen gegen die Verhältnisse des Lebervolumens; mit Anpassungslinien und Angabe der Spearman-Korrelationskoeffizienten sowie der p-Werte

Erneut wies lediglich HMGB1 mit einem Wert von $Rho = -0,357$ ($p = 0,231$) einen markanten Korrelationskoeffizienten auf. Sowohl bei Korrelation der Basiswerte als auch der Differenzen und Verhältnisse ergab sich also für HMGB1 ein deutlich negativer Korrelationskoeffizient, der zwar in keinem Fall statistisch signifikant war, dennoch aber auf eine inverse Beziehung zwischen dem Ausmaß und der Entwicklung des Lebervolumens und der thrombozytären Expression des

Biomarkers HMGB1 hindeutet. Diese Beziehung war bereits in den nach Ab- und Zunahme gruppierten Untersuchungen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests weiter oben erkennbar, dort jedoch zusätzlich für CXCR4 und CXCR7 sowie mit Abstrichen auch für TGF- β 1. Für diese Biomarker konnte dieser vermutete Zusammenhang in den Korrelationsanalysen jedoch nicht bekräftigt werden.

3.2 Thrombozytäre Biomarker und Leberfettgehalt

Zusätzlich zum Einfluss thrombozytärer Biomarker auf das Lebervolumen untersuchten wir auch den Einfluss auf den Fettgehalt der Leber. Die Basiswerte der nach Ab- und Zunahme getrennten Gruppen stellten sich bei Studieneinschluss wie folgt dar:

Tabelle 8: Vergleich der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf: Median und Quartile der Basiswerte der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Ab- und Zunahme des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte (Werte $p < 0,05$ fett hervorgehoben); n = Anzahl der Patienten

Basiswerte	Abnahme Leberfettgehalt	Zunahme Leberfettgehalt	p-Wert
CXCR4 (Median + 25./75. Perzentile)	63,31 (57,88 / 78,72) n = 8	109,71 (87,61 / 119,30) n = 9	0,008
CXCR7 (Median + 25./75. Perzentile)	33,07 (25,11 / 46,46) n = 8	45,47 (30,23 / 61,18) n = 9	0,167
HMGB1 (Median + 25./75. Perzentile)	10,97 (8,62 / 16,45) n = 6	20,45 (10,00 / 32,67) n = 6	0,180
CD62p (Median + 25./75. Perzentile)	9,44 (8,04 / 11,57) n = 8	9,08 (7,50 / 11,55) n = 9	0,888
TGF-β1 (Median + 25./75. Perzentile)	38,18 (28,02 / 51,58) n = 8	50,31 (41,07 / 57,91) n = 9	0,114

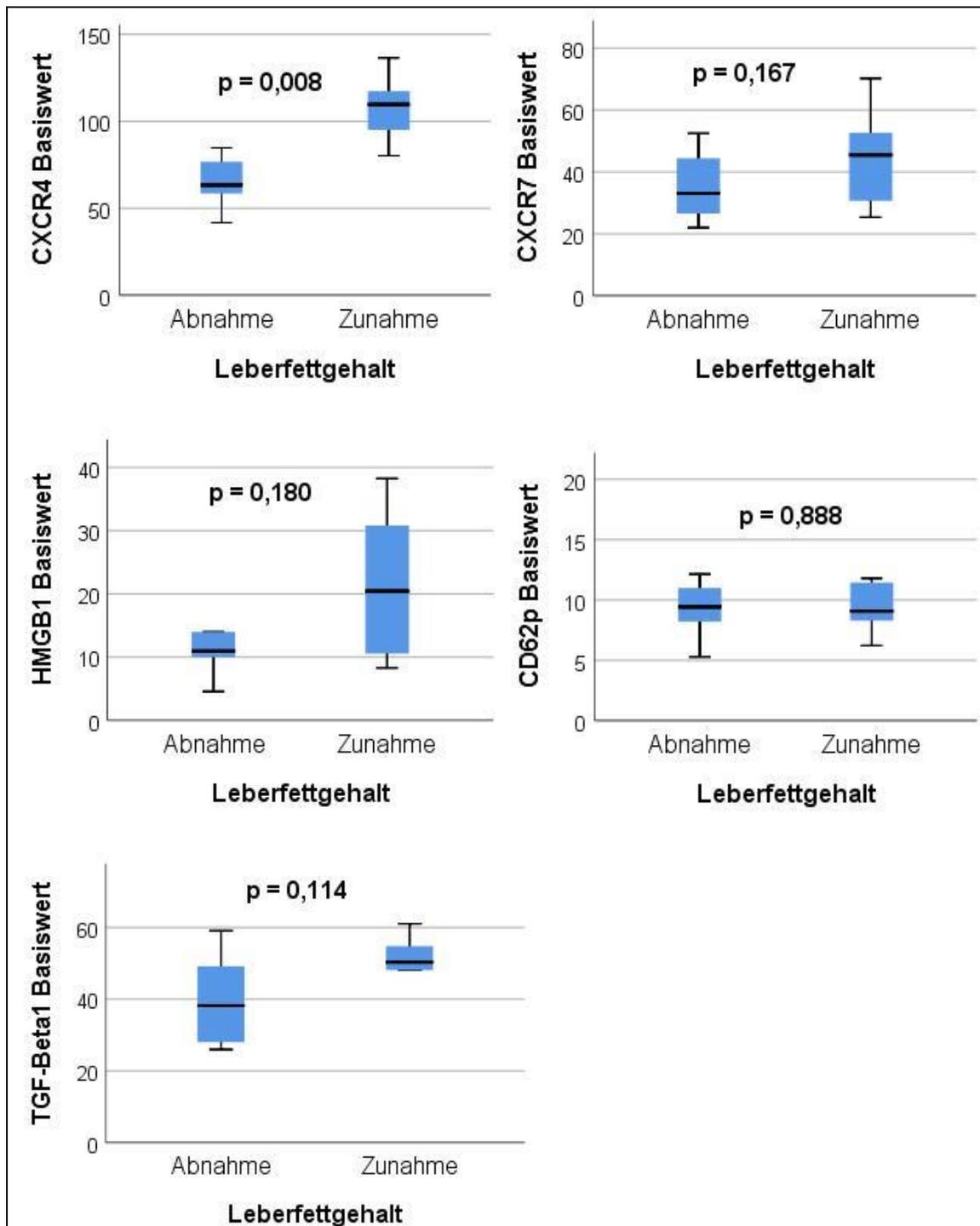


Abbildung 12: Boxplot-Diagramme der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf: Basiswerte der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Ab- und Zunahme des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte

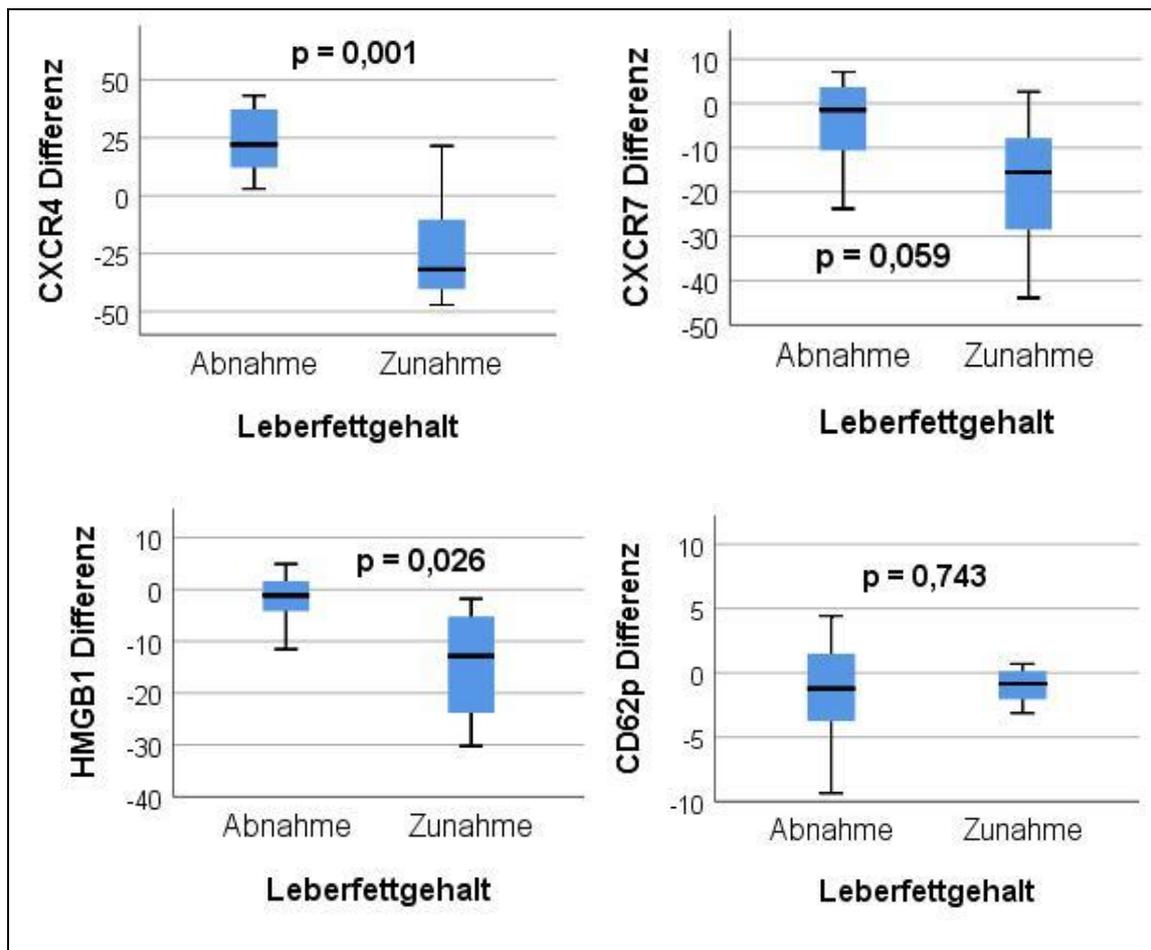
Bei dem Vergleich der Basiswerte zwischen den Kollektiven mit Ab- und Zunahme des Leberfettgehalts fiel auf, dass die Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1 und TGF- β 1 in der später zunehmenden Gruppe bereits zu Studienbeginn deutlich stärker exprimiert waren. Für CXCR4 stellte sich hierbei sogar ein signifikanter Unterschied heraus ($p = 0,008$), während CXCR7 ($p = 0,167$), HMGB1 ($p = 0,180$) und TGF- β 1 ($p = 0,114$) jedoch nicht statistisch signifikant waren. Bezüglich CD62p konnte kaum ein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

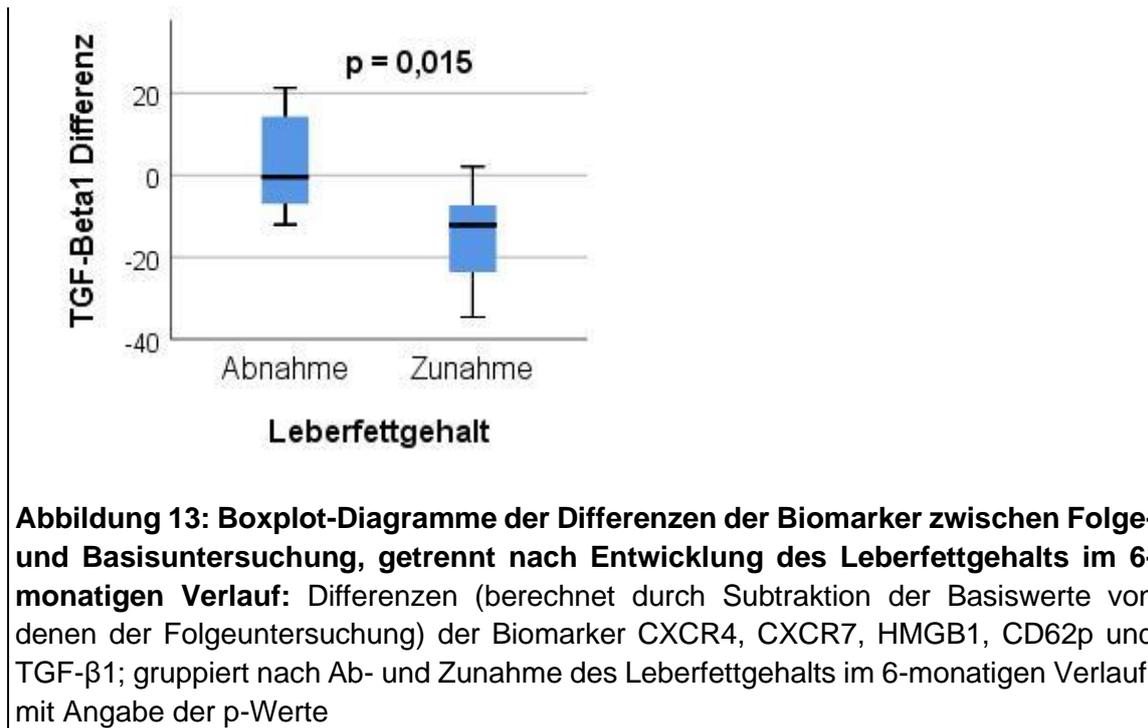
Betrachten wir des Weiteren die Unterschiede der Differenzen beider Gruppen:

Tabelle 9: Vergleich der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf: Median und Quartile der Differenzen (berechnet durch Subtraktion der Basiswerte von denen der Folgeuntersuchung) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Ab- und Zunahme des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte (Werte $p < 0,05$ fett hervorgehoben); n = Anzahl der Patienten

Differenzen	Abnahme Leberfettgehalt	Zunahme Leberfettgehalt	p-Wert
CXCR4 (Median + 25./75. Perzentile)	22,07 (10,92 / 40,24) n = 8	-31,79 (-42,38 / -5,43) n = 9	0,001
CXCR7 (Median + 25./75. Perzentile)	-1,51 (-12,96 / 4,31) n = 8	-15,56 (-32,89 / -5,47) n = 9	0,059
HMGB1 (Median + 25./75. Perzentile)	-1,15 (-6,04 / 2,43) n=6	-12,83 (-25,40 / -4,38) n = 6	0,026

CD62p (Median + 25./75. Perzentile)	-1,23 (-4,21 / 2,08) n = 8	-0,84 (-2,55 / 0,42) n = 9	0,743
TGF-β1 (Median + 25./75. Perzentile)	-0,48 (-7,56 / 15,52) n = 8	-12,14 (-23,83 / -4,19) n = 9	0,015





Hierbei stellten sich signifikante Unterschiede zwischen den Kollektiven mit Ab- und Zunahme des Leberfettgehalts bezüglich der Veränderung der Biomarker CXCR4 ($p = 0,001$), HMGB1 ($p = 0,026$) und TGF- β 1 ($p = 0,015$) im 6-monatigen Verlauf dar. Für CXCR7 konnte ebenfalls ein bedeutender Unterschied zwischen beiden Gruppen gezeigt werden, der allerdings knapp das festgelegte Signifikanzniveau verfehlte ($p = 0,059$). Lediglich für CD62p stellte sich keine wesentliche Veränderung im zeitlichen Verlauf dar. Auffällig war auch, dass CXCR4 als einziger Biomarker in der Gruppe derjenigen Patienten mit einer Abnahme des Leberfettgehaltes im Verlauf der 6 Monate deutlich zunahm im Vergleich zur Basisuntersuchung. Die Expression der übrigen Biomarker war in der im Verlauf abnehmenden Gruppe im Median eher gleichbleibend oder sogar leicht rückläufig.

Die Auswertung der Verhältnisse im Vergleich beider Gruppen zeigte ein ähnliches Bild:

Tabelle 10: Vergleich der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf: Median und Quartile der Verhältnisse (berechnet durch Division der Werte der Folgeuntersuchung durch die Basiswerte) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Ab- und Zunahme des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte (Werte $p < 0,05$ fett hervorgehoben); n = Anzahl der Patienten

Verhältnisse	Abnahme Leberfettgehalt	Zunahme Leberfettgehalt	p-Wert
CXCR4 (Median + 25./75. Perzentile)	1,30 (1,19 / 1,57) n = 8	0,73 (0,65 / 0,95) n = 9	0,002
CXCR7 (Median + 25./75. Perzentile)	0,97 (0,69 / 1,16) n = 8	0,62 (0,46 / 0,82) n = 9	0,027
HMGB1 (Median + 25./75. Perzentile)	0,91 (0,57 / 1,39) n = 6	0,37 (0,22 / 0,65) n = 6	0,026
CD62p (Median + 25./75. Perzentile)	0,86 (0,63 / 1,35) n = 8	0,93 (0,77 / 1,06) n = 9	0,606
TGF-β1 (Median + 25./75. Perzentile)	1,00 (0,87 / 1,44) n = 8	0,75 (0,56 / 0,91) n = 9	0,015

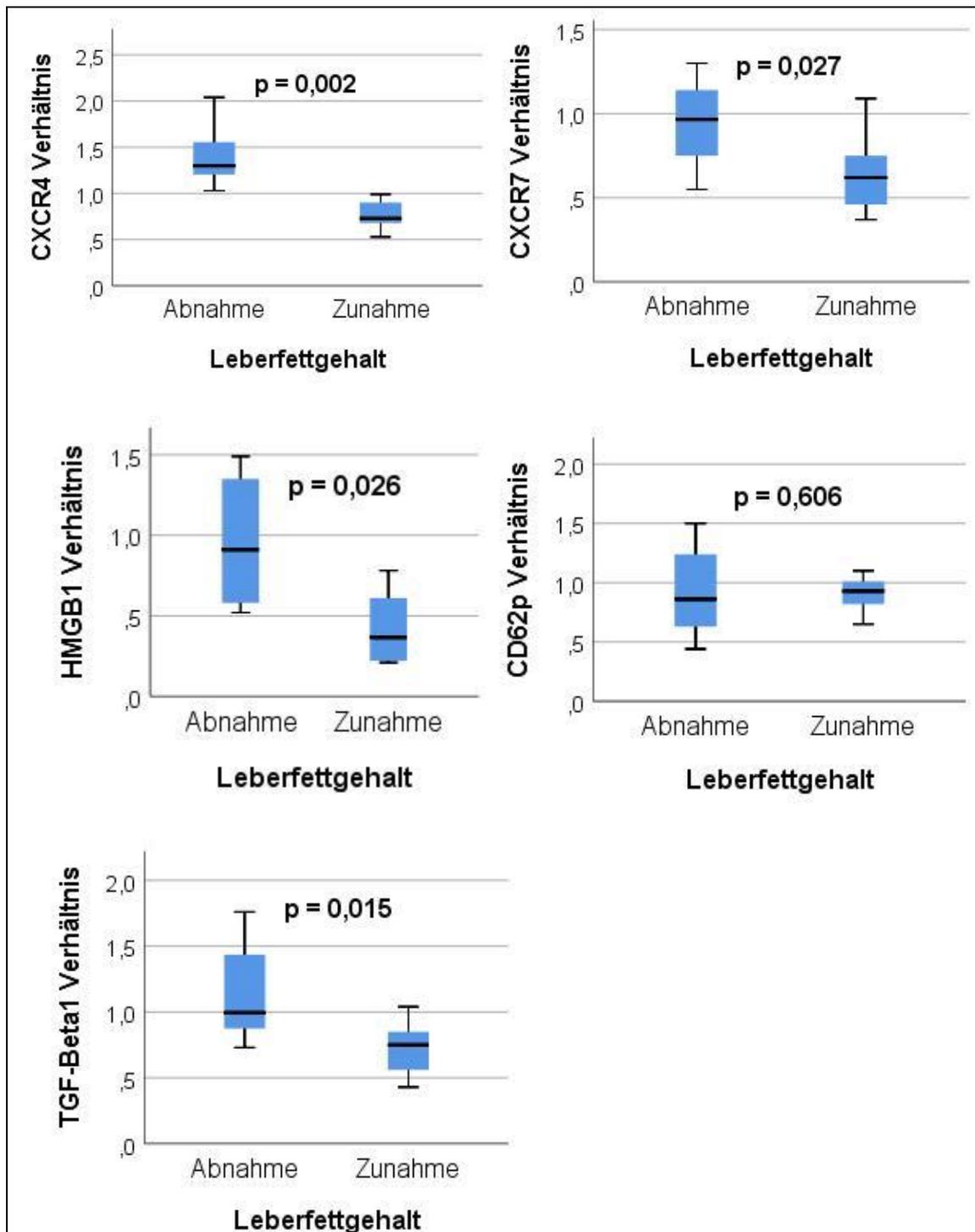
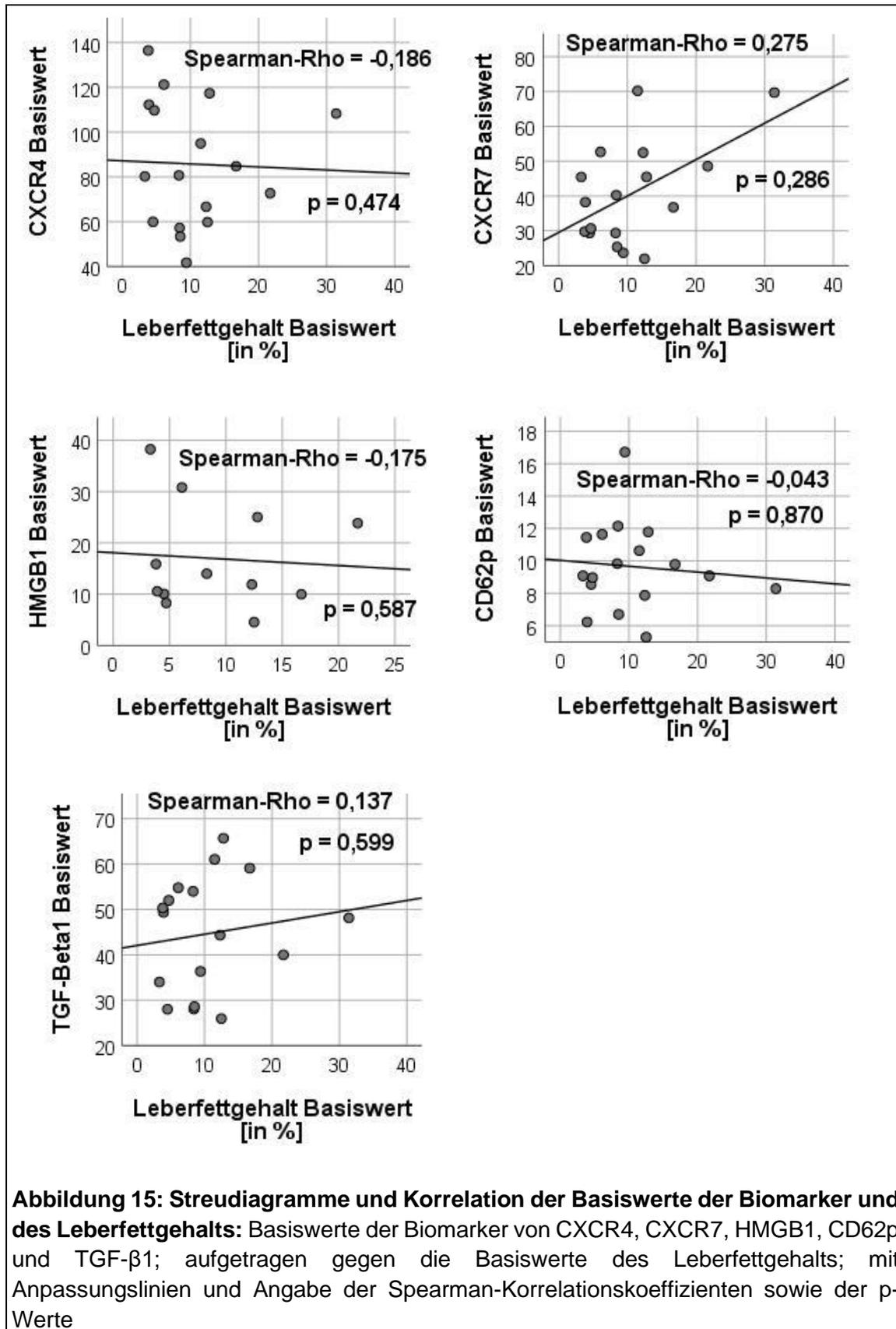


Abbildung 14: Boxplot-Diagramme der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Entwicklung des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf: Verhältnisse (berechnet durch Division der Werte der Folgeuntersuchung durch die Basiswerte) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Ab- und Zunahme des Leberfettgehalts im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte

Auch hierbei konnten für CXCR4 ($p = 0,002$), HMGB1 ($p = 0,026$), TGF- β 1 ($p = 0,015$) und im Gegensatz zur Auswertung der Differenzen auch für CXCR7 ($p = 0,027$) signifikante Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen bestimmt werden, wobei die Expression dieser Biomarker im 6-monatigen Verlauf in der Gruppe mit einer Zunahme des Leberfettgehalts deutlich abnahm. In der Gruppe mit abnehmendem Leberfettgehalt war die Expression nur geringfügig abnehmend oder ungefähr gleichbleibend; im Fall von CXCR4 zeigte sich in dieser Gruppe jedoch sogar eine ausgeprägte Zunahme der Expression. Für CD62p konnten erneut keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

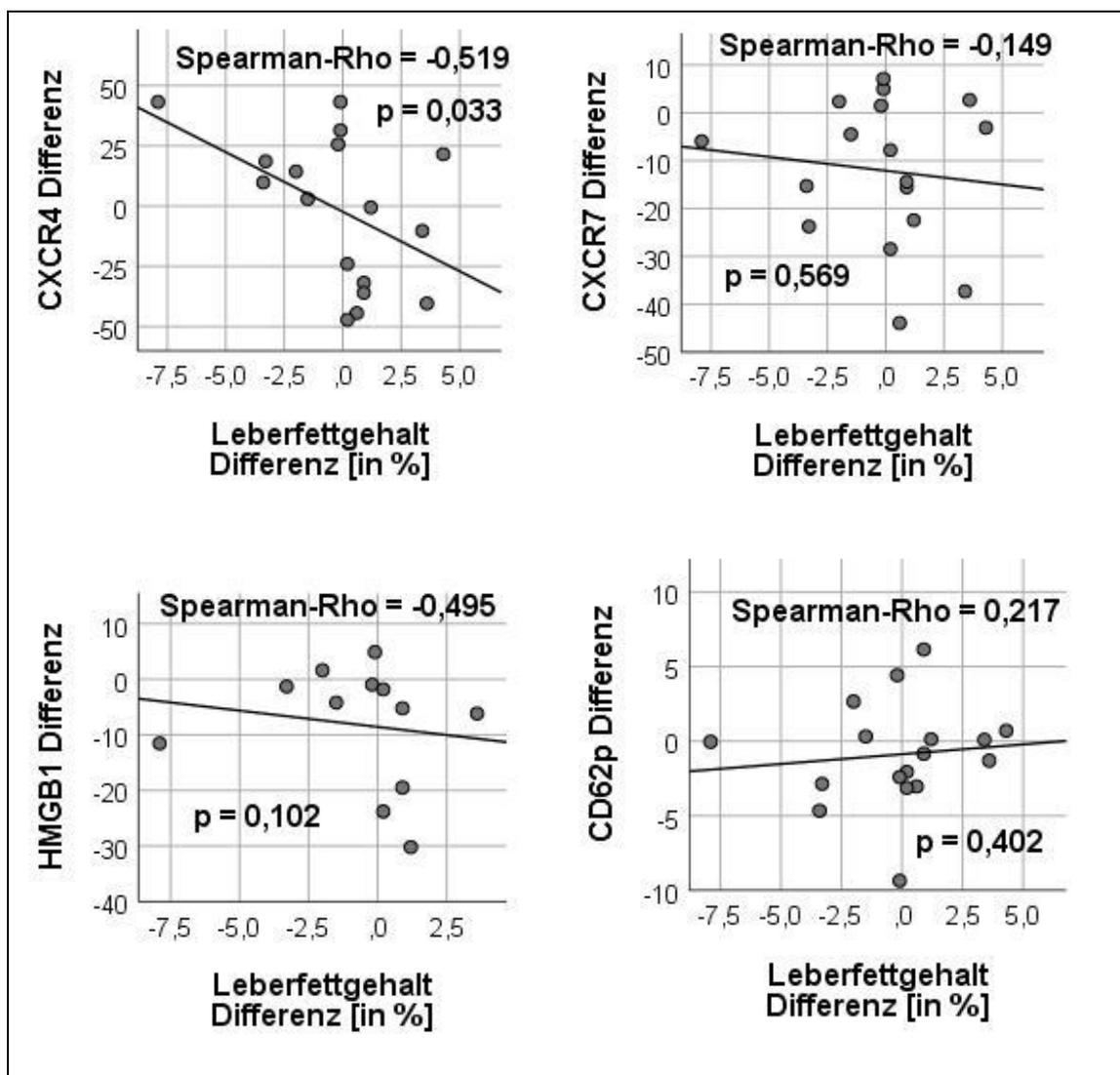
In der Zusammenschau lässt sich zum Einfluss thrombozytärer Biomarker auf den Fettgehalt der Leber sagen, dass speziell CXCR4, CXCR7, HMGB1 und TGF- β 1 im Kollektiv mit zunehmendem Leberfettgehalt im 6-monatigen Verlauf statistisch signifikant stärker rückläufig waren als im Kollektiv mit abnehmendem Leberfettgehalt. Für CD62p konnte kein solcher Zusammenhang belegt werden. Allerdings sollte angemerkt werden, dass eben diese signifikanten Biomarker (CXCR4, CXCR7, HMGB1 und TGF- β 1) schon bei der Basisuntersuchung im später zunehmenden Kollektiv signifikant oder annähernd signifikant stärker exprimiert waren als im abnehmenden Kollektiv.

Auch hier führten wir des Weiteren ergänzende Korrelationsanalysen hinsichtlich der Basiswerte, Differenzen und Verhältnisse der Biomarker im Vergleich mit denen des Leberfettgehalts durch:



Die deutlichste, aber dennoch eine schwache Korrelation zeigte sich bei Betrachtung der Basiswerte für CXCR7 mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von 0,275 und einem p-Wert von 0,286, wobei dies nach Betrachtung des Streudiagramms möglicherweise zu einem nicht unerheblichen Teil von einem Ausreißer begünstigt wurde. Für die anderen Biomarker ergaben sich wesentlich geringere Korrelationskoeffizienten mit höheren p-Werten.

Größere und auch statistisch signifikante Korrelationen ergaben sich jedoch erst beim Vergleich der jeweiligen Differenzen und Verhältnisse:



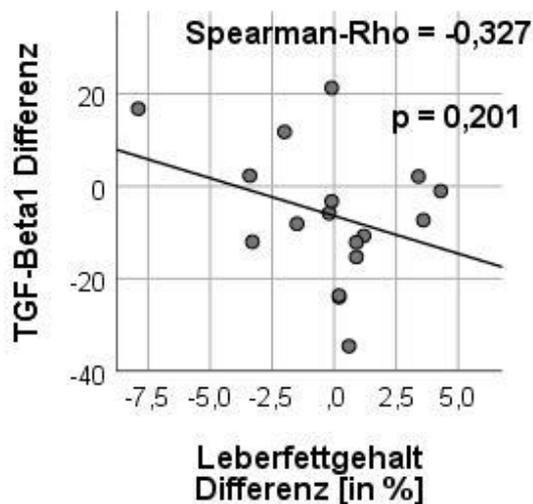
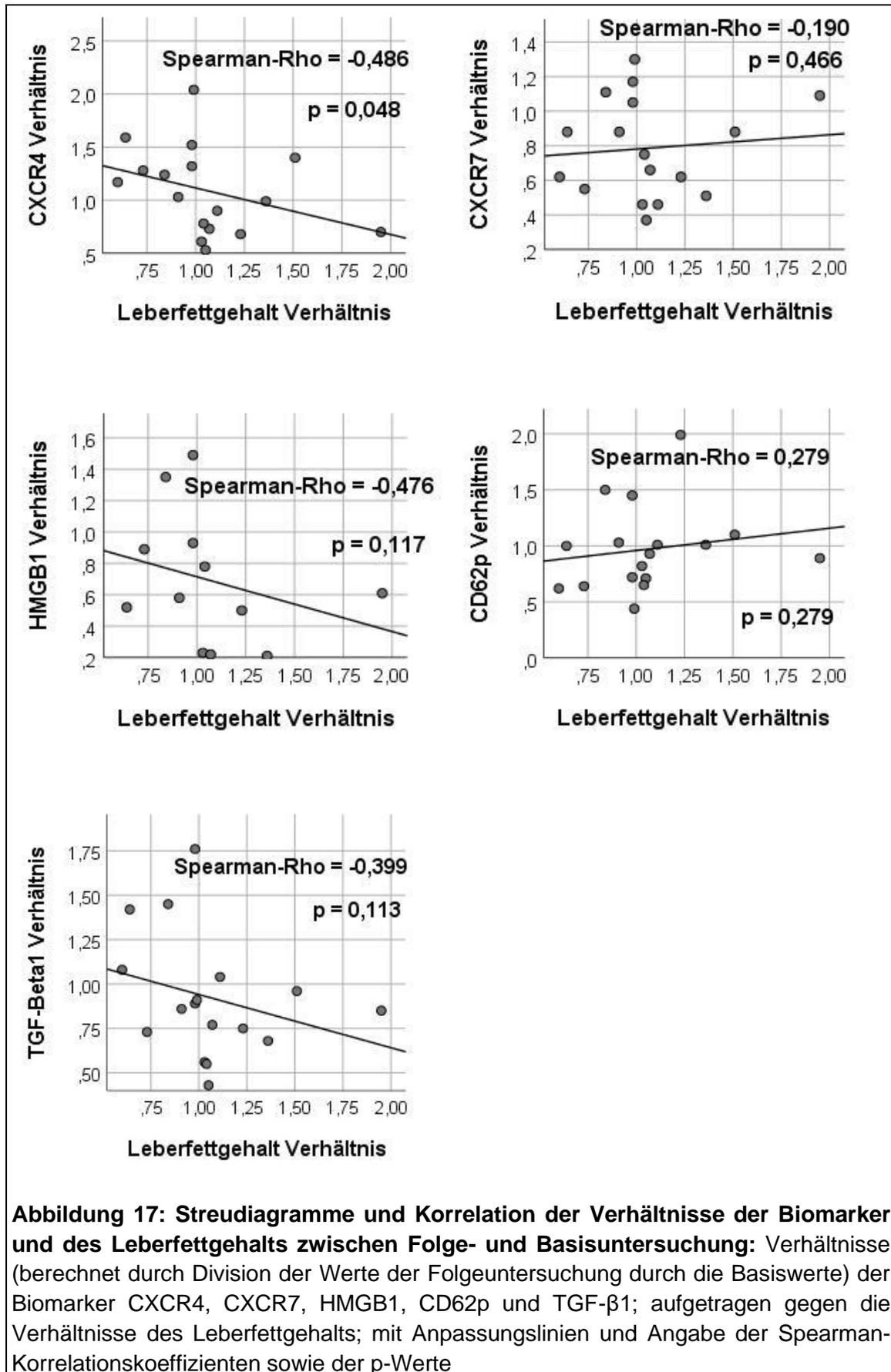


Abbildung 16: Streudiagramme und Korrelation der Differenzen der Biomarker und des Leberfettgehalts zwischen Folge- und Basisuntersuchung: Differenzen (berechnet durch Subtraktion der Basiswerte von denen der Folgeuntersuchung) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; aufgetragen gegen die Differenzen des Leberfettgehalts; mit Anpassungslinien und Angabe der Spearman-Korrelationskoeffizienten sowie der p-Werte

Bei der Korrelation der Differenzen der Biomarker mit den Differenzen des Leberfettgehalts ergab sich für CXCR4 mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von -0,519 und einem p-Wert von 0,033 eine signifikante Korrelation. Für HMGB1 (Rho = -0,495; p = 0,102) und in etwas geringerem Maße auch TGF- β 1 (Rho = -0,327; p = 0,201) konnten ebenfalls annähernd signifikante – oder zumindest deutliche – Korrelationen aufgezeigt werden. Die Differenzen von CXCR7 und CD62p korrelierten schwächer mit denen des Leberfettgehalts.

Bei den Verhältnissen stellte sich ein ähnliches Bild dar:



Die Verhältnisse von CXCR4 (Rho = -0,486; p = 0,048), HMGB1 (Rho = -0,476; p = 0,117) sowie TGF- β 1 (Rho = -0,399; p = 0,113) korrelierten erneut am stärksten und im Fall von CXCR4 auch statistisch signifikant mit den entsprechenden Verhältnissen des Leberfettgehalts. Sowohl für CXCR7 als auch CD62p war die Korrelation wesentlich geringer ausgeprägt.

Auffällig waren hierbei, wie auch schon bei der Korrelationsanalyse der Differenzen, die negativen Vorzeichen der Korrelationskoeffizienten von CXCR4, CXCR7 und TGF- β 1, was auf einen inversen Zusammenhang zur Entwicklung des Leberfettgehaltes hindeutet und auch schon weiter oben beim Vergleich der nach Ab- und Zunahme gruppierten Kollektive mittels Mann-Whitney-U-Test erkennbar wurde. Dabei wurde jedoch auch eine ähnlich geartete inverse Beziehung zum Biomarker CXCR7 erkenntlich, die sich nun in der Korrelationsanalyse nicht mehr in dem Maße darstellen ließ.

3.3 Thrombozytäre Biomarker und Antiaggregation

Da sowohl ein Teil des gesamten Patientenkollektivs eine Antiaggregation mit ASS in Monotherapie oder eine duale Antiaggregation mit ASS + P2Y12-Inhibitor erhielt, als auch ein Teil des Kollektivs keine Antiaggregation erhielt, werteten wir ebenfalls den Einfluss einer Antiaggregation auf die Expression thrombozytärer Biomarker aus. Bei der Basisuntersuchung stellte sich folgendes Bild dar:

Tabelle 11: Vergleich der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf: Median und Quartile der Basiswerte der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte (Werte $p < 0,05$ fett hervorgehoben); n = Anzahl der Patienten

Basiswerte	Ohne Antiaggregation	Mit Antiaggregation	p-Wert
CXCR4 (Median + 25./75. Perzentile)	89,85 (56,97 / 115,08) n = 8	72,71 (59,79 / 109,71) n = 11	0,717
CXCR7 (Median + 25./75. Perzentile)	45,48 (26,97 / 65,44) n = 8	30,67 (29,35 / 48,53) n = 11	0,492
HMGB1 (Median + 25./75. Perzentile)	25,02 (9,12 / 34,53) n = 5	11,88 (9,17 / 19,86) n = 9	0,364
CD62p (Median + 25./75. Perzentile)	10,21 (9,13 / 11,75) n = 8	8,97 (6,70 / 11,45) n = 11	0,152
TGF-β1 (Median + 25./75. Perzentile)	51,46 (34,60 / 60,56) n = 8	44,33 (28,04 / 52,00) n = 11	0,442

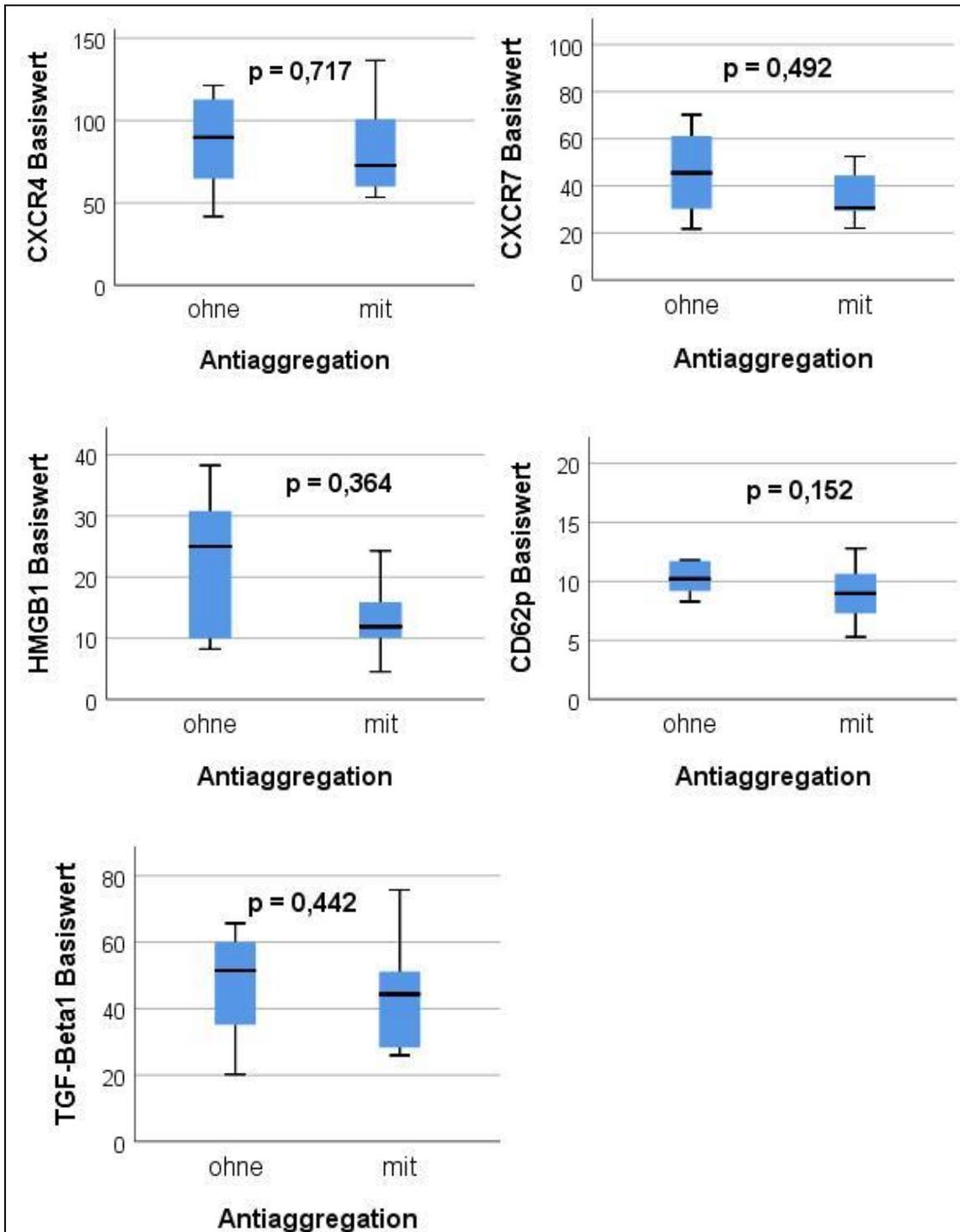


Abbildung 18: Boxplot-Diagramme der Basiswerte der Biomarker, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf: Basiswerte der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte

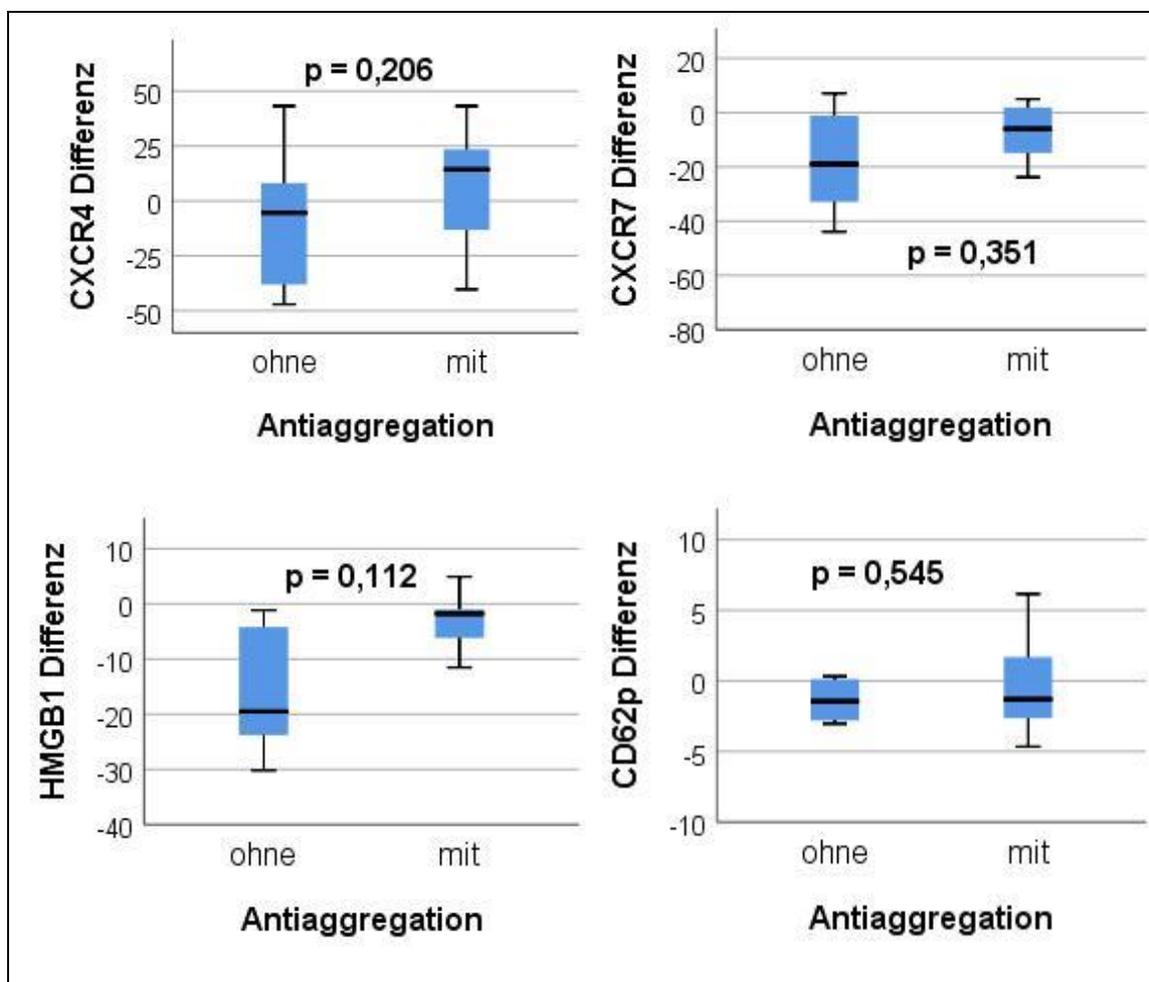
Es zeigte sich bei allen untersuchten Biomarkern, dass deren Expression in dem Kollektiv, das im weiteren Verlauf eine Antiaggregation erhielt, zu Studieneinschluss etwas geringer ausgeprägt war als im Kollektiv ohne Antiaggregation. Für CD62p ergab sich hierbei mit $p = 0,152$ ein kleinerer p-Wert als für alle anderen untersuchten Biomarker. Der relativ größte Unterschied der Basiswerte im Median zeigte sich jedoch für HMGB1.

Wie sich die Biomarker in beiden Kollektiven im Verlauf des Untersuchungszeitraums von 6 Monaten entwickelt hatten, wird im Folgenden zunächst anhand der Differenzen dargestellt:

Tabelle 12: Vergleich der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf: Median und Quartile der Differenzen (berechnet durch Subtraktion der Basiswerte von denen der Folgeuntersuchung) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte (Werte $p < 0,05$ fett hervorgehoben); n = Anzahl der Patienten

Differenzen	Ohne Antiaggregation	Mit Antiaggregation	p-Wert
CXCR4 (Median + 25./75. Perzentile)	-5,43 (-41,24 / 10,69) n = 8	14,33 (-23,99 / 25,58) n = 11	0,206
CXCR7 (Median + 25./75. Perzentile)	-19,00 (-35,11 / 0,53) n = 8	-5,92 (-15,30 / 2,35) n = 11	0,351
HMGB1 (Median + 25./75. Perzentile)	-19,49 (-27,00 / -2,69) n = 5	-1,81 (-8,69 / 0,32) n = 9	0,112

CD62p (Median + 25./75. Perzentile)	-1,45 (-2,92 / 0,12) n = 8	-1,30 (-2,86 / 2,66) n = 11	0,545
TGF-β1 (Median + 25./75. Perzentile)	-9,44 (-21,84 / 0,77) n = 8	-5,84 (-12,14 / 11,75) n = 11	0,395



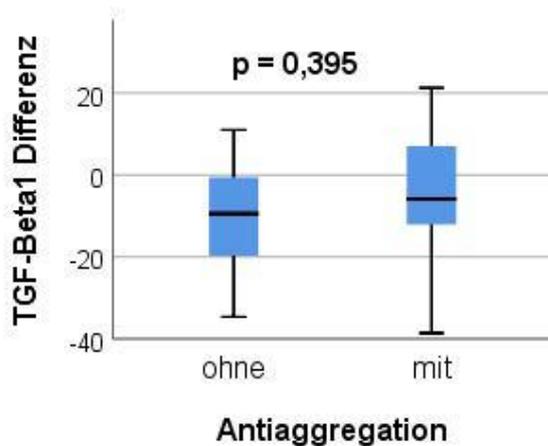


Abbildung 19: Boxplot-Diagramme der Differenzen der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf: Differenzen (berechnet durch Subtraktion der Basiswerte von denen der Folgeuntersuchung) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte

Bei Betrachtung der Differenzen im Median fällt auf, dass für die Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1 und etwas geringer ausgeprägt auch TGF- β 1 ein sichtbarer, aber dennoch statistisch nicht signifikanter Unterschied zwischen beiden untersuchten Gruppen festzustellen war. Am deutlichsten ausgeprägt war der Unterschied hierbei für HMGB1 mit einem p-Wert von 0,112. Für CD62p hingegen blieben die Werte im Verlauf annähernd gleich. In der Gruppe der Patienten, die eine Antiaggregation erhielten, stieg lediglich die Expression von CXCR4 deutlich an. Alle weiteren Biomarker wurden in beiden Gruppen im Verlauf im Median geringer exprimiert als zum Einschlusszeitpunkt, wobei mit Ausnahme von CD62p der Rückgang in der Gruppe ohne Antiaggregation deutlich stärker ausgeprägt war.

Ergänzend wurden noch die Verhältnisse der Biomarker getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation analysiert:

Tabelle 13: Vergleich der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf: Median und Quartile der Verhältnisse (berechnet durch Division der Werte der Folgeuntersuchung durch die Basiswerte) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte (Werte $p < 0,05$ fett hervorgehoben); n = Anzahl der Patienten

Verhältnisse	Ohne Antiaggregation	Mit Antiaggregation	p-Wert
CXCR4 (Median + 25./75. Perzentile)	0,95 (0,64 / 1,21) n = 8	1,24 (0,78 / 1,40) n = 11	0,272
CXCR7 (Median + 25./75. Perzentile)	0,59 (0,46 / 1,05) n = 8	0,88 (0,62 / 1,09) n = 11	0,442
HMGB1 (Median + 25./75. Perzentile)	0,23 (0,22 / 0,72) n = 5	0,78 (0,53 / 1,14) n = 9	0,060
CD62p (Median + 25./75. Perzentile)	0,88 (0,71 / 1,01) n = 8	0,90 (0,65 / 1,45) n = 11	0,600
TGF-β1 (Median + 25./75. Perzentile)	0,82 (0,59 / 1,01) n = 8	0,89 (0,73 / 1,42) n = 11	0,545

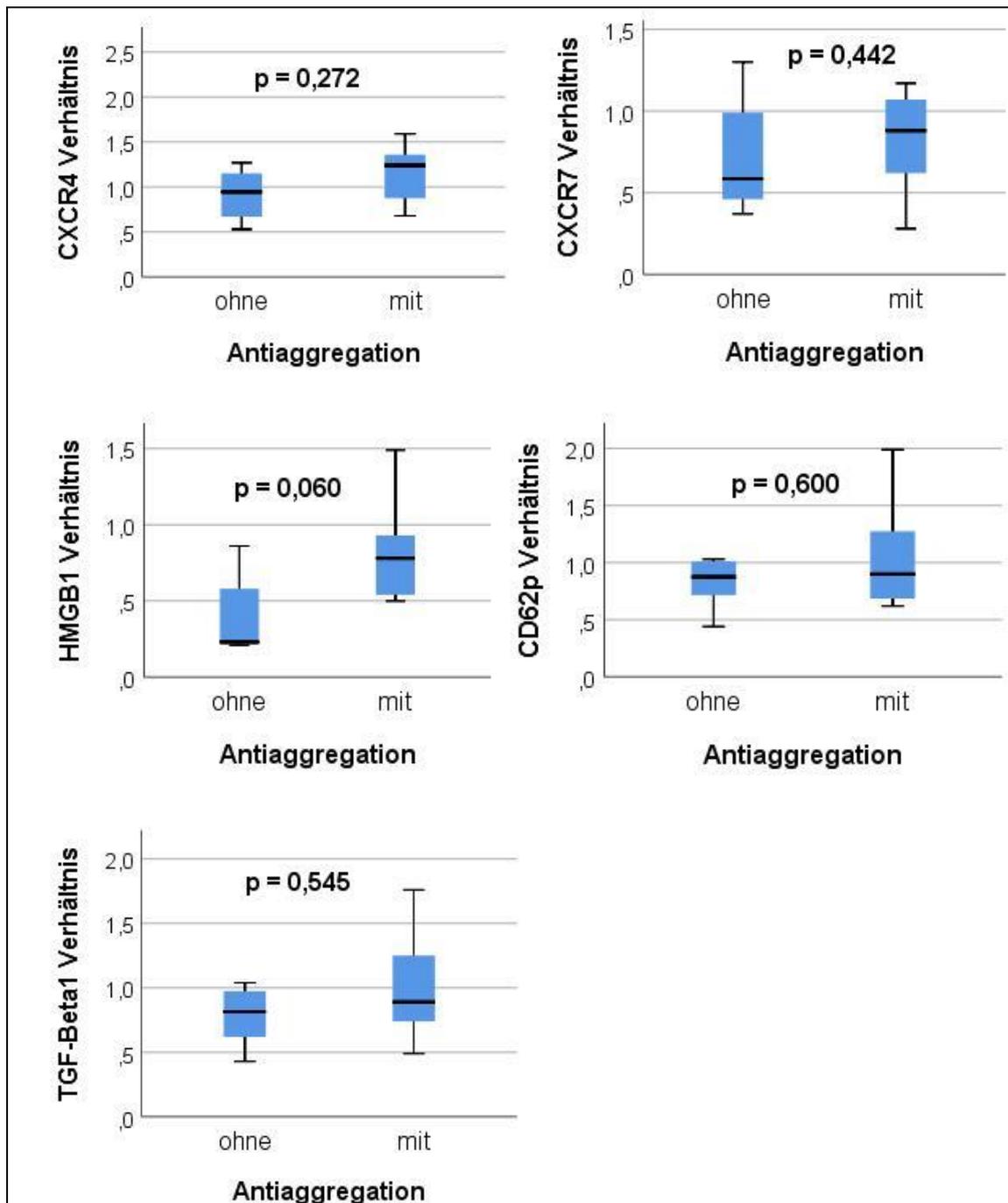


Abbildung 20: Boxplot-Diagramme der Verhältnisse der Biomarker zwischen Folge- und Basisuntersuchung, getrennt nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf: Verhältnisse (berechnet durch Division der Werte der Folgeuntersuchung durch die Basiswerte) der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1; gruppiert nach Erhalten oder Nichterhalten einer Antiaggregation im 6-monatigen Verlauf; mit Angabe der p-Werte

Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Analyse der Differenzen der Biomarker: Nur CXCR4 wurde in der Gruppe mit einer Antiaggregation im Median verstärkt exprimiert. Alle weiteren Biomarker waren in beiden Gruppen im Median rückläufig, wobei sich insbesondere für CXCR4, CXCR7 und HMGB1 deutliche Unterschiede zeigten, welche im Fall von HMGB1 sogar beinahe statistisch signifikant waren ($p = 0,060$). Für TGF- β 1 und CD62p waren die Unterschiede deutlich geringer ausgeprägt.

In der Zusammenschau lässt sich zum Einfluss einer Antiaggregation auf die Expression thrombozytärer Biomarker festhalten, dass speziell CXCR4, CXCR7 und HMGB1 unter Antiaggregation im Verlauf vermehrt exprimiert wurden im Vergleich zu einem ähnlichen Kollektiv ohne Antiaggregation. Insbesondere für HMGB1 konnte hierbei – trotz geringer Fallzahl – annähernd eine statistische Signifikanz errechnet werden. Für TGF- β 1 war dieser Zusammenhang deutlich geringer ausgeprägt, für CD62p kaum erkennbar. Allerdings waren alle untersuchten Biomarker bei Studieneinschluss in dem Kollektiv, das im weiteren Verlauf eine Antiaggregation erhielt, bereits etwas geringer exprimiert als in der Gruppe ohne Antiaggregation, jedoch ohne dabei statistische Signifikanz zu erreichen.

4. Diskussion

Wie bereits bekannt ist, spielen Thrombozyten in der Pathogenese und Progression der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis eine zentrale Rolle (39). Darüber hinaus weist die NAFL nicht nur gemeinsame Risikofaktoren mit der koronaren Herzerkrankung auf (15, 180), sondern es wurde bereits gezeigt, dass verschiedene thrombozytäre Biomarker mit dem Verlauf und der Prognose einer symptomatischen KHK im Zusammenhang stehen (147, 149, 150, 177).

Daraus abgeleitet ergibt sich als erste zentrale Frage dieser Dissertation, ob thrombozytäre Biomarker ebenso mit dem Ausprägungsgrad einer NAFL assoziiert sind. Hierzu betrachteten wir die Expression der Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1 sowie die Lebervolumina und Leberfettgehalte zum Basiszeitpunkt und korrelierten diese miteinander: Es zeigten sich weder bei Korrelation mit dem Lebervolumen noch mit dem Leberfettgehalt ausgeprägte oder signifikante Spearman-Korrelationskoeffizienten, was bedeutet, dass keiner der untersuchten Biomarker in einem unmittelbar greifbaren Zusammenhang zur individuellen Ausprägung der Steatose stand.

Die zweite zentrale Frage dieser Dissertation ist, ob diese thrombozytären Biomarker mit dem Verlauf der Steatose korrelieren. Zur Beantwortung dieser Frage teilten wir unser Patientenkollektiv jeweils nach Ab- und Zunahme von Lebervolumen und Leberfettgehalt im 6-monatigen Verlauf in zwei Gruppen ein und untersuchten, ob sich diese Gruppen hinsichtlich der Expression der thrombozytären Biomarker zum Basiszeitpunkt voneinander unterschieden. Für CXCR4, CXCR7 und HMGB1 ergaben sich sowohl beim Lebervolumen als auch beim Leberfettgehalt, für TGF- β 1 nur beim Leberfettgehalt, sichtbare Unterschiede zwischen beiden Gruppen, wobei dieser Unterschied nur bezüglich CXCR4 und Leberfettgehalt statistisch signifikant war. Es deutete sich jedoch an, dass bei einer größeren Fallzahl womöglich auch die anderen genannten Unterschiede statistisch signifikant hätten ausfallen können. Insgesamt zeigte

sich hierbei, dass eine höhere Expression von CXCR4, CXCR7 und HMGB1 mit einer Zunahme des Lebervolumens und eine höhere Expression von CXCR4, CXCR7, HMGB1 und auch TGF- β 1 mit einer Zunahme des Leberfettgehalts assoziiert war. Die Unterschiede waren jedoch hinsichtlich des Leberfettgehalts deutlich stärker ausgeprägt. Somit lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass eine hohe Expression der eben genannten Biomarker gewissermaßen einen Risikofaktor für eine zukünftige Progredienz der NAFL darzustellen scheint. Für CD62p hingegen ergaben sich keine bedeutenden Unterschiede oder Einflüsse.

Die dritte zentrale Frage dieser Dissertation lautet, inwiefern der zeitliche Verlauf der Expression von thrombozytären Biomarkern mit dem Verlauf der NAFL assoziiert ist. Dies lässt sich am besten beantworten, indem man die Differenzen und Verhältnisse der Biomarker im 6-monatigen Verlauf gruppiert nach Ab- und Zunahme von Lebervolumen und Leberfettgehalt betrachtet, sowie die Differenzen und Verhältnisse der Biomarker mit den Differenzen und Verhältnissen des Lebervolumens und Leberfettgehalts korreliert. Hierbei zeigte sich in den Gruppen mit einer Progredienz von Lebervolumen und Leberfettgehalt eine sichtbar ausgeprägte Abnahme der Expression von CXCR4, CXCR7, HMGB1 und TGF- β 1 im 6-monatigen Verlauf, welche in den nicht-progredienten Gruppen nicht in dem Maße zu sehen war. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch bei unseren geringen Fallzahlen nur beim Vergleich beider Gruppen bezüglich der Entwicklung des Leberfettgehalts. Bei der Expression von CD62p zeigte sich nur hinsichtlich des Lebervolumens eine erkennbare Abnahme in der progredienten Gruppe. In den Korrelationsanalysen waren überwiegend ebenfalls diese Entwicklungen zu erkennen, wenn auch in einem statistisch weniger signifikanten Ausmaß. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine Abnahme der Expression der thrombozytären Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, TGF- β 1 und in geringem Maße auch CD62p möglicherweise mit einem ungünstigen Verlauf der NAFL assoziiert ist.

Um die Erkenntnisse aus dieser Dissertation nun richtig einordnen zu können, soll zunächst noch einmal der wissenschaftlich-literarische Hintergrund

beleuchtet werden. Es ist bereits bekannt, dass Thrombozyten in der Pathogenese der NAFL und auch der NASH eine wichtige Funktion einnehmen, indem sie unter anderem die Migration von zytotoxischen T-Lymphozyten vermitteln (39, 40). Eine kürzlich veröffentlichte Studie fand zudem heraus, dass schon früh im Krankheitsverlauf der NAFL eine vermehrte intrahepatische Akkumulation von Thrombozyten stattfindet, wobei Kupffer-Zellen, Hyaluronan und dessen Rezeptor CD44 eine essenzielle Rolle spielen (182). Des Weiteren wurden Hinweise dafür gefunden, dass vor allem der Aktivierung und Adhäsion der intrahepatischen Thrombozyten eine große Bedeutung in der Pathogenese der NAFLD zukommt, nicht jedoch der Aggregation (182). Dabei scheinen insbesondere die α -Granula und die in ihnen enthaltenen Zytokine und Chemokine, welche auch in dieser Dissertation untersucht wurden, eine wichtige Funktion als proinflammatorische Faktoren zu erfüllen (182). Darüber hinaus nimmt auch GPIIb/IIIa, welches unter anderem als Rezeptor für den vWF und P-Selektin dient und somit die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten vermittelt, eine zentrale Rolle in der Pathogenese der NAFLD ein (113, 182). Neueste Erkenntnisse sprechen jedoch gegen eine kausale Beteiligung von Selektinen und vWF, weshalb GPIIb/IIIa seine Wirkung diesbezüglich möglicherweise auch ohne klassischen Liganden zu erfüllen scheint (182).

Dies erklärt nun zum einen, weshalb CD62p bzw. P-Selektin in dieser Dissertation kein oder nur ein sehr geringer Einfluss auf die Prognose und den Verlauf der NAFL zugeschrieben werden konnte. Zum anderen erklärt es aber auch, weshalb eine vermehrte Expression von CXCR4, CXCR7, HMGB1 und TGF- β 1 – als wichtige Vermittler und Faktoren von Entzündungs- und Reparaturvorgängen sowie „Survival-Marker“ von Thrombozyten (CXCR4 und CXCR7) und „Fibrosemarker“ (TGF- β 1) (147, 161, 162, 174, 175) – mit einer zukünftigen Progression der NAFL assoziiert war. Hingegen geben die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse keine Antwort auf die Frage, warum sich in dieser Dissertation die Expression der womöglich prognostisch relevanten Biomarker bei Progression der NAFL stark rückläufig gestaltete; oder warum die Expression der einzelnen Biomarker nicht relevant mit dem Lebervolumen oder

dem Leberfettgehalt korrelierte, obwohl sie doch nachweisbar einen signifikanten Einfluss auf die zukünftige Entwicklung hatten.

Es lassen sich nun unter Berücksichtigung der Limitationen unseres Studiendesigns verschiedene Überlegungen anstellen. Zunächst einmal handelt es sich bei den hier untersuchten thrombozytären Biomarkern um Faktoren, die vor allem die thrombozytenvermittelte Inflammation und Fibrosierungs- und Reparaturprozesse kennzeichnen (147, 161, 162, 168, 174, 175). Nun ist zwar bekannt, dass bereits früh im Krankheitsverlauf der NAFLD eine hepatische Akkumulation von Thrombozyten stattfindet (182), dennoch sind diese beschriebenen Vorgänge eher kennzeichnend für den Übergang von der NAFL zur NASH (46, 47). Da unser Patientenkollektiv jedoch nur auf Zeichen einer NAFL hin untersucht wurde, lässt sich auf dieser Grundlage vermutlich erklären, weshalb die Expression der untersuchten thrombozytären Biomarker in einem solch frühen Krankheitsstadium nur unzureichend mit der individuellen Ausprägung der Steatose assoziiert war. In einem Patientenkollektiv mit gesicherter NASH könnte das Ergebnis zu einer ähnlichen Fragestellung aber womöglich anders ausfallen.

Darüber hinaus bildete die Applikation einer Antiaggregation im 6-monatigen Studienverlauf eine beträchtliche Störvariable, was sich auch daran zeigte, dass das Erhalten oder Nicht-Erhalten einer Antiaggregation einen erheblichen Einfluss auf die Expression der untersuchten thrombozytären Biomarker hatte. So entwickelte sich die Expression der Biomarker in demjenigen Patientenkollektiv, das eine Antiaggregation erhielt, gleichsinnig zur Gruppe der Patienten ohne Progredienz der NAFL und umgekehrt. Ebenfalls war die Expression der Biomarker in der Gruppe mit Antiaggregation schon zu Beginn geringer ausgeprägt als in der Vergleichsgruppe und würde nach obigen Erkenntnissen somit mit einer besseren Prognose vergesellschaftet sein. Wobei diese bessere Prognose auf den zweiten Blick wohl zumindest teilweise auf die Einnahme einer Antiaggregation zurückzuführen scheint und nicht nur auf die alleinige Expression der thrombozytären Biomarker, denn die Studienteilnehmer erhielten bereits zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung seit maximal 4 Wochen

eine antithrombozytäre Therapie, falls medizinisch indiziert. Hierfür sprechen auch die neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse am Mausmodell, dass eine antithrombozytäre Therapie mit ASS und Clopidogrel nicht nur zu einer Reduktion der Zahl der intrahepatischen Thrombozyten, einer verminderten Aktivierung von Kupffer-Zellen und einer geringeren hepatischen Infiltration von Entzündungszellen führt, sondern auch die Expression von für den Fettstoffwechsel relevanten Genen in einem positiven Sinne beeinflusst und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen reduziert (182). Insgesamt trägt diese antithrombozytäre Therapie neben einer Milderung der Steatose maßgeblich zur Prävention einer NASH und eines NASH-induzierten HCC bei, wobei die vorteilhaften Effekte COX-unabhängig vermittelt werden (182).

Eine weitere wichtige Störvariable stellte bei kardiovaskulär erkrankten Patienten die evidenzbasierte medikamentöse Therapie mit Statinen dar, denn die hepatische Einlagerung von Lipiden wie Cholesterin spielt auch infolge der Lipotoxizität eine wichtige Rolle in der Pathogenese der NAFLD (33, 183). Neben der Cholesterin-senkenden Wirkung vermitteln Statine darüber hinaus jedoch unter anderem auch antiinflammatorische Effekte (184, 185). Diese Wirkungen stellten sich indirekt auch schon in den Basischarakteristika dar, denn Patienten, die Statine erhielten, fanden sich signifikant häufiger in der Gruppe mit einer Abnahme des Leberfettgehalts wieder, jedoch ebenfalls häufiger auch in der Gruppe, welche eine Antiaggregation erhielt.

Eine weitere Limitation der dieser Dissertation zugrunde liegenden Studie war zum einen die geringe Fallzahl von lediglich 25 Patienten, die in die Auswertung gingen, und welche es schwierig machte, statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Darüber hinaus konnten bei manchen dieser Patienten aus organisatorischen Gründen nicht alle geplanten Untersuchungen durchgeführt werden, was die Fallzahlen bei verschiedenen statistischen Auswertungen noch weiter reduzierte. Daher war in den Daten oftmals nur eine Tendenz ohne statistische Signifikanz zu erkennen, was die korrekte Interpretation der Ergebnisse dieser Dissertation fehleranfälliger macht. Zum anderen wurde nicht ausgeschlossen, ob eine Änderung von Lebervolumen, Leberfettgehalt oder der

Expression der thrombozytären Biomarker nicht auch auf Lebensstilfaktoren wie eine gesündere Ernährung, Gewichtsabnahme oder vermehrte körperliche Bewegung im Verlauf des Beobachtungszeitraums von 6 Monaten nach PCI zurückzuführen war.

Um noch einmal auf die Erkenntnis aus der dritten zentralen Frage dieser Dissertation zurückzugreifen, welche besagt, dass eine Abnahme der Expression der thrombozytären Biomarker im Verlauf mit einer ungünstigen Prognose der NAFL assoziiert ist, lässt sich auch nach Betrachtung sowohl des wissenschaftlichen Kenntnisstandes als auch der Störvariablen und Limitationen der Studie keine hinreichende Erklärung dafür finden. Denn ein ungünstiger Verlauf der NAFL wäre durch den Übergang zur NASH und eine Zunahme der Inflammation – auch der thrombozytenvermittelten Inflammation – gekennzeichnet, was bedeuten würde, dass die Expression der proinflammatorischen thrombozytären Biomarker zunehmen müsste (37, 38, 182). Zwar zeigte sich, dass in der Gruppe derjenigen Patienten, welche eine Antiaggregation erhielten, die Expression der Biomarker weit weniger stark abnahm als in der Vergleichsgruppe – ebenso war eine lipidsenkende Therapie mit Statinen signifikant häufiger in der nicht-progredienten Patientengruppe vertreten –, doch eine Erklärung, warum die Expression der thrombozytären Biomarker bei Krankheitsprogredienz der NAFL so ausgeprägt abnahm, liefert dies nicht. Nun wäre denkbar, dass es bei zunehmender Progression infolge des kontinuierlichen Untergangs der Hepatozyten und einer zunehmenden Fibrose zu einem „Ausbrennen“ der Entzündung und folglich einem Rückgang der Expression dieser proinflammatorischen Biomarker kommt, doch erscheint dies bei unserem klinisch überwiegend nur gering betroffenen Patientenkollektiv ohne initial bedeutende Unterschiede hinsichtlich der Serumspiegel der Transaminasen und aufgrund des recht kurzen Beobachtungszeitraums von nur 6 Monaten eher unwahrscheinlich. Sicherlich könnten auch Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Expression der thrombozytären Biomarker zu diesem Ergebnis geführt haben.

Um die zentralen Fragestellungen aus dieser Dissertation noch ausführlicher beantworten zu können, könnte man, unter Bezugnahme auf die Limitationen dieser Studie, in Zukunft eine oder mehrere Studien anschließen, welche beispielsweise nicht nur ein größeres Patientenkollektiv umfassen, sondern auch die thrombozytenvermittelte Inflammation anhand der Expression der thrombozytären Biomarker bei der NASH genauer untersuchen. Es ließe sich eine ähnlich geartete Studie auch bei einem Patientenkollektiv, das keine Antiaggregation oder Statintherapie erhält, durchführen, um diese Störvariablen auszuschließen. Oder man könnte durch Fragebögen Lebensstilfaktoren erfassen und in Bezug zum Verlauf einer NAFL oder NASH setzen. Ebenfalls empfiehlt es sich, die Antiaggregation, welche in dieser Dissertation vor allem als bedeutsame Störvariable zur Darstellung kam, näher ins Blickfeld zu rücken. Denn wie schon in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt, trägt eine duale antithrombozytäre Therapie mit ASS und Clopidogrel bzw. Ticagrelor zur Milderung und Prävention einer NAFLD sowie des NASH-assoziierten HCC bei und könnte damit in Zukunft möglicherweise eine wichtige Therapiesäule für eine bislang medikamentös nur unzureichend behandelbare Erkrankung bilden (182).

5. Zusammenfassung

Bei der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis handelt es sich um eine in Wohlstandsgesellschaften zunehmend häufige Erkrankung, welche eng mit dem metabolischen Syndrom assoziiert ist und gemeinsame Risikofaktoren mit der koronaren Herzerkrankung besitzt. Es ist bereits bekannt, dass die Expression verschiedener thrombozytärer Biomarker prognostische Relevanz für die koronare Herzerkrankung aufweist. Dass die Thrombozyten-vermittelte Inflammation ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis spielt, führte zu der zentralen Fragestellung dieser Dissertation: Inwiefern sind thrombozytäre Biomarker mit dem Ausprägungsgrad, der Prognose und dem Verlauf der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis assoziiert?

Zur Beantwortung dieser Frage führten wir eine prospektive Kohortenstudie an einem kleinen Patientenkollektiv mit Indikation zur elektiven Koronarangiographie und Risikofaktoren für eine nicht-alkoholische Steatosis hepatis durch, von welchem schließlich 25 Patienten in die statistische Auswertung aufgenommen wurden. Die Studie umfasste die Teilnahme an zwei Untersuchungen im Abstand von ungefähr 6 Monaten. Die Expression der thrombozytären Biomarker CXCR4, CXCR7, HMGB1, CD62p und TGF- β 1 wurde mithilfe der Fluoreszenz-aktivierten Durchflusszytometrie bestimmt; das Ausmaß einer hepatischen Steatose mithilfe der Magnetresonanztomographie. Zusätzlich wurde der Einfluss einer Antiaggregation auf die Expression dieser Biomarker analysiert, um der bedeutendsten Störvariable unseres Studiendesigns Rechnung zu tragen.

Bei der Analyse der Werte der Biomarker aus der Basisuntersuchung zeigte sich zunächst, dass diese individuell nur unzureichend mit dem Lebervolumen und dem Leberfettgehalt als Zeichen der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis korrelierten. Gruppierte man das Patientenkollektiv jedoch anhand des zukünftigen Verlaufs im 6-monatigen Untersuchungszeitraum nach Zu- und Abnahme des Ausmaßes der Steatosis hepatis ein, zeigte sich bei den

Basiswerten der Biomarker, dass CXCR4 signifikant ($p = 0,008$) sowie CXCR7 ($p = 0,167$), HMGB1 ($p = 0,180$) und TGF- β 1 ($p = 0,114$) ebenfalls deutlich mit einer zukünftigen Zunahme des Leberfettgehalts assoziiert waren. Für CD62p war dies nicht der Fall. Des Weiteren stellte sich bei Betrachtung des Verlaufs der Expression der Biomarker dar, dass eine Progression der Steatosis hepatis von einer Abnahme der Expression der thrombozytären Biomarker begleitet war, wiederum mit Ausnahme von CD62p. Dieser Zusammenhang war für CXCR4 ($p = 0,002$), CXCR7 ($p = 0,027$), HMGB1 ($p = 0,026$) und TGF- β 1 ($p = 0,015$) signifikant, wobei er hinsichtlich der Entwicklung des Leberfettgehalts wesentlich stärker ausgeprägt war als bezüglich des Lebervolumens.

Hieraus wächst nun die Erkenntnis, dass bestimmte thrombozytäre Biomarker mit der Prognose der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis assoziiert sind und folglich eine hohe Expression hiervon einen Risikofaktor für eine zukünftige Progredienz darzustellen scheint. Jedoch sind die Ergebnisse dieser Dissertation zunächst mit Vorsicht zu betrachten, da verschiedene Limitationen und Schwächen unseres Studiendesigns vorliegen. Neben den geringen Fallzahlen ist dabei vor allem die Einnahme einer Antiaggregation von Teilen unseres Patientenkollektivs zu nennen. So zeigte sich, dass sich die Expression der untersuchten Biomarker nicht unbedingt signifikant, aber dennoch deutlich zwischen den Patientengruppen mit und ohne Antiaggregation unterschied und dabei nach obiger Erkenntnis sogar in vorteilhafter Weise beeinflusst wurde.

Um genauere Aussagen treffen zu können, bietet es sich daher in Zukunft an, eine ähnlich geartete Studie an einem größeren Patientenkollektiv, das keine Antiaggregation erhält, durchzuführen. Genauso scheint es aber auch lohnenswert, in der Forschung die antithrombozytäre Therapie bei der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis näher ins Blickfeld zu rücken, da nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen die duale antithrombozytäre Therapie eine vielversprechende Therapieoption für diese bisher medikamentös nur unzureichend behandelbare Erkrankung darzustellen scheint.

6. Veröffentlichungen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde Folgendes veröffentlicht:

*Malehmir, M., D. Pfister, S. Gallage, M. Szydłowska, D. Inverso, E. Kotsiliti, V. Leone, M. Peiseler, B. G. J. Surewaard, D. Rath, A. Ali, M. J. Wolf, H. Drescher, M. E. Healy, D. Dauch, D. Kroy, O. Krenkel, M. Kohlhepp, T. Engleitner, A. Olkus, T. Sijmonsma, J. Volz, C. Deppermann, D. Stegner, P. Helbling, C. Nombela-Arrieta, A. Rafiei, M. Hinterleitner, M. Rall, F. Baku, O. Borst, C. L. Wilson, J. Leslie, T. O'Connor, C. J. Weston, D. H. Adams, L. Sheriff, A. Teijeiro, M. Prinz, R. Bogeska, N. Anstee, M. N. Bongers, M. Notohamiprodjo, T. Geisler, D. J. Withers, J. Ware, D. A. Mann, H. G. Augustin, A. Vegiopoulos, M. D. Milsom, A. J. Rose, P. F. Lalor, J. M. Llovet, R. Pinyol, F. Tacke, R. Rad, M. Matter, N. Djouder, P. Kubes, P. A. Knolle, K. Unger, L. Zender, B. Nieswandt, M. Gawaz, A. Weber and M. Heikenwalder (2019). "Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer." Nat Med **25**(4): 641-655.*

Die Daten für diese Publikation wurden an einer ähnlichen Patientenkohorte wie die Daten der vorliegenden Dissertation erhoben; letztere wurden jedoch bislang nicht publiziert.

7. Literaturverzeichnis

1. Kleiner DE. Histopathology, grading and staging of nonalcoholic fatty liver disease. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2018;64(1):28-38.
2. Roeb E, Steffen HM, Bantel H, Baumann U, Canbay A, Demir M, et al. [S2k Guideline non-alcoholic fatty liver disease]. *Z Gastroenterol.* 2015;53(7):668-723.
3. Masarone M, Federico A, Abenavoli L, Loguercio C, Persico M. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials.* 2014;9(3):126-33.
4. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2015;35(3):221-35.
5. Firneisz G. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: the liver disease of our age? *World J Gastroenterol.* 2014;20(27):9072-89.
6. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010;52(5):1836-46.
7. Cholankeril G, Patel R, Khurana S, Satapathy SK. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Current knowledge and implications for management. *World J Hepatol.* 2017;9(11):533-43.
8. Zhu JZ, Dai YN, Wang YM, Zhou QY, Yu CH, Li YM. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Economy. *Dig Dis Sci.* 2015;60(11):3194-202.
9. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40(6):1387-95.
10. Neuschwander-Tetri BA, Clark JM, Bass NM, Van Natta ML, Unalp-Arida A, Tonascia J, et al. Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;52(3):913-24.
11. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology.* 2011;140(1):124-31.
12. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007;30(5):1212-8.

13. Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15080.
14. Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2176-94.
15. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2004;24(1):3-20.
16. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
17. Gerber L, Otgonsuren M, Mishra A, Escheik C, Bircerdinc A, Stepanova M, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with low level of physical activity: a population-based study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;36(8):772-81.
18. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Zvibel I, Goldiner I, et al. Role of leisure-time physical activity in nonalcoholic fatty liver disease: a population-based study. *Hepatology*. 2008;48(6):1791-8.
19. Smith BW, Adams LA. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(8):456-65.
20. Oddy WH, Herbison CE, Jacoby P, Ambrosini GL, O'Sullivan TA, Ayonrinde OT, et al. The Western dietary pattern is prospectively associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescence. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):778-85.
21. Volynets V, Kuper MA, Strahl S, Maier IB, Spruss A, Wagnerberger S, et al. Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci*. 2012;57(7):1932-41.
22. Benjaminov O, Beglaibter N, Gindy L, Spivak H, Singer P, Wienberg M, et al. The effect of a low-carbohydrate diet on the nonalcoholic fatty liver in morbidly obese patients before bariatric surgery. *Surg Endosc*. 2007;21(8):1423-7.
23. Koopman KE, Caan MW, Nederveen AJ, Pels A, Ackermans MT, Fliers E, et al. Hypercaloric diets with increased meal frequency, but not meal size, increase intrahepatic triglycerides: a randomized controlled trial. *Hepatology*. 2014;60(2):545-53.

24. Ostovaneh MR, Zamani F, Ansari-Moghaddam A, Sharafkhah M, Saeedian FS, Rohani Z, et al. Nonalcoholic Fatty Liver: The Association with Metabolic Abnormalities, Body Mass Index and Central Obesity--A Population-Based Study. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015;13(7):304-11.
25. Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, et al. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17(7):517-24.
26. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013;58(1):120-7.
27. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2013;57(2):601-9.
28. Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, Salem R, Campbell N, Schork NJ, et al. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1585-92.
29. Loomba R, Abraham M, Unalp A, Wilson L, Lavine J, Doo E, et al. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology*. 2012;56(3):943-51.
30. Bambha K, Belt P, Abraham M, Wilson LA, Pabst M, Ferrell L, et al. Ethnicity and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;55(3):769-80.
31. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40(12):1461-5.
32. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjaerg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2014;46(4):352-6.
33. Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1769-77.
34. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012;142(4):711-25 e6.
35. Musso G, Cassader M, De Michieli F, Rosina F, Orlandi F, Gambino R. Nonalcoholic steatohepatitis versus steatosis: adipose tissue insulin resistance and dysfunctional response to fat ingestion predict liver injury and altered glucose and lipoprotein metabolism. *Hepatology*. 2012;56(3):933-42.

36. Al-Serri A, Anstee QM, Valenti L, Nobili V, Leathart JB, Dongiovanni P, et al. The SOD2 C47T polymorphism influences NAFLD fibrosis severity: evidence from case-control and intra-familial allele association studies. *J Hepatol.* 2012;56(2):448-54.
37. Schuppan D, Schattenberg JM. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28 Suppl 1:68-76.
38. Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, Abdullah Z, Boege Y, Stemmer K, et al. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell.* 2014;26(4):549-64.
39. Chauhan A, Adams DH, Watson SP, Lalor PF. Platelets: No longer bystanders in liver disease. *Hepatology.* 2016;64(5):1774-84.
40. Iannacone M, Sitia G, Narvaiza I, Ruggeri ZM, Guidotti LG. Antiplatelet drug therapy moderates immune-mediated liver disease and inhibits viral clearance in mice infected with a replication-deficient adenovirus. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(11):1532-5.
41. Iannacone M, Sitia G, Isogawa M, Marchese P, Castro MG, Lowenstein PR, et al. Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nat Med.* 2005;11(11):1167-9.
42. Nelson JE, Klintworth H, Kowdley KV. Iron metabolism in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012;14(1):8-16.
43. Adolph TE, Grander C, Grabherr F, Tilg H. Adipokines and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Multiple Interactions. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8).
44. Lallukka S, Sevastianova K, Perttila J, Hakkarainen A, Orho-Melander M, Lundbom N, et al. Adipose tissue is inflamed in NAFLD due to obesity but not in NAFLD due to genetic variation in PNPLA3. *Diabetologia.* 2013;56(4):886-92.
45. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013;93(1):359-404.
46. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16(42):5286-96.
47. Tannapfel A, Denk H, Dienes HP, Langner C, Schirmacher P, Trauner M, et al. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Virchows Arch.* 2011;458(5):511-23.
48. Yeh MM, Brunt EM. Pathological features of fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2014;147(4):754-64.

49. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-85.
50. Ozhan H, Aydin M, Yazici M, Yazgan O, Basar C, Gungor A, et al. Mean platelet volume in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Platelets*. 2010;21(1):29-32.
51. Alkhouri N, Kistangari G, Campbell C, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Mean platelet volume as a marker of increased cardiovascular risk in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2012;55(1):331.
52. Naik A, Kosir R, Rozman D. Genomic aspects of NAFLD pathogenesis. *Genomics*. 2013;102(2):84-95.
53. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30(6):1356-62.
54. Zelber-Sagi S, Shoham D, Zvibel I, Abu-Abeid S, Shibolet O, Fishman S. Predictors for advanced fibrosis in morbidly obese non-alcoholic fatty liver patients. *World J Hepatol*. 2017;9(2):91-8.
55. Park SK, Seo MH, Shin HC, Ryoo JH. Clinical availability of nonalcoholic fatty liver disease as an early predictor of type 2 diabetes mellitus in Korean men: 5-year prospective cohort study. *Hepatology*. 2013;57(4):1378-83.
56. Adams LA, Harmsen S, St Sauver JL, Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Therneau T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(7):1567-73.
57. Stepanova M, Younossi ZM. Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(6):646-50.
58. Wong VW, Wong GL, Yip GW, Lo AO, Limquiaco J, Chu WC, et al. Coronary artery disease and cardiovascular outcomes in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2011;60(12):1721-7.
59. Stefan N, Haring HU. The role of hepatokines in metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(3):144-52.
60. White DL, Kanwal F, El-Serag HB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(12):1342-59 e2.
61. Ertle J, Dechene A, Sowa JP, Penndorf V, Herzer K, Kaiser G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer*. 2011;128(10):2436-43.

62. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology*. 2010;51(5):1820-32.
63. Kim D, Kim WR, Kim HJ, Therneau TM. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology*. 2013;57(4):1357-65.
64. Loria P, Adinolfi LE, Bellentani S, Bugianesi E, Grieco A, Fargion S, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee. *Dig Liver Dis*. 2010;42(4):272-82.
65. Kim SY. Noninvasive markers for the diagnosis of nonalcoholic Fatty liver disease. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013;28(4):280-2.
66. Lee SS, Park SH. Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7392-402.
67. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology*. 2011;54(3):1082-90.
68. Lee SS, Park SH, Kim HJ, Kim SY, Kim MY, Kim DY, et al. Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J Hepatol*. 2010;52(4):579-85.
69. Machann J, Thamer C, Schnoedt B, Stefan N, Haring HU, Claussen CD, et al. Hepatic lipid accumulation in healthy subjects: a comparative study using spectral fat-selective MRI and volume-localized ¹H-MR spectroscopy. *Magn Reson Med*. 2006;55(4):913-7.
70. Bastati N, Feier D, Wibmer A, Traussnigg S, Balassy C, Tamandl D, et al. Noninvasive differentiation of simple steatosis and steatohepatitis by using gadoxetic acid-enhanced MR imaging in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a proof-of-concept study. *Radiology*. 2014;271(3):739-47.
71. Vuppalanchi R, Unalp A, Van Natta ML, Cummings OW, Sandrasegaran KE, Hameed T, et al. Effects of liver biopsy sample length and number of readings on sampling variability in nonalcoholic Fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(4):481-6.
72. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
73. Janiec DJ, Jacobson ER, Freeth A, Spaulding L, Blaszyk H. Histologic variation of grade and stage of non-alcoholic fatty liver disease in liver biopsies. *Obes Surg*. 2005;15(4):497-501.

74. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011;54(1):344-53.
75. Selzer ML. The Michigan alcoholism screening test: the quest for a new diagnostic instrument. *Am J Psychiatry*. 1971;127(12):1653-8.
76. Imbert-Bismut F, Naveau S, Morra R, Munteanu M, Ratziu V, Abella A, et al. The diagnostic value of combining carbohydrate-deficient transferrin, fibrosis, and steatosis biomarkers for the prediction of excessive alcohol consumption. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21(1):18-27.
77. European Association for the Study of L. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2012;57(2):399-420.
78. Hock B, Schwarz M, Domke I, Grunert VP, Wuertemberger M, Schiemann U, et al. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (%CDT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. *Addiction*. 2005;100(10):1477-86.
79. Dunn W, Angulo P, Sanderson S, Jamil LH, Stadheim L, Rosen C, et al. Utility of a new model to diagnose an alcohol basis for steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2006;131(4):1057-63.
80. Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K, Matsumoto K, Saeki A, Yanagi K, et al. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer*. 2003;97(12):3036-43.
81. Sterling RK, Smith PG, Brunt EM. Hepatic steatosis in human immunodeficiency virus: a prospective study in patients without viral hepatitis, diabetes, or alcohol abuse. *J Clin Gastroenterol*. 2013;47(2):182-7.
82. Abenavoli L, Milic N, De Lorenzo A, Luzzza F. A pathogenetic link between non-alcoholic fatty liver disease and celiac disease. *Endocrine*. 2013;43(1):65-7.
83. Ziegler TR. Parenteral nutrition in the critically ill patient. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1088-97.
84. Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol*. 1991;12(2):224-9.
85. Mahmood S, Inada N, Izumi A, Kawanaka M, Kobashi H, Yamada G. Wilson's disease masquerading as nonalcoholic steatohepatitis. *N Am J Med Sci*. 2009;1(2):74-6.

86. Safar Zadeh E, Lungu AO, Cochran EK, Brown RJ, Ghany MG, Heller T, et al. The liver diseases of lipodystrophy: the long-term effect of leptin treatment. *J Hepatol.* 2013;59(1):131-7.
87. Rabinowich L, Shibolet O. Drug Induced Steatohepatitis: An Uncommon Culprit of a Common Disease. *Biomed Res Int.* 2015;2015:168905.
88. Satapathy SK, Kuwajima V, Nadelson J, Atiq O, Sanyal AJ. Drug-induced fatty liver disease: An overview of pathogenesis and management. *Ann Hepatol.* 2015;14(6):789-806.
89. Ahmed KT, Almashhrawi AA, Rahman RN, Hammoud GM, Ibdah JA. Liver diseases in pregnancy: diseases unique to pregnancy. *World J Gastroenterol.* 2013;19(43):7639-46.
90. Musso G, Cassader M, Rosina F, Gambino R. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Diabetologia.* 2012;55(4):885-904.
91. Babio N, Toledo E, Estruch R, Ros E, Martinez-Gonzalez MA, Castaner O, et al. Mediterranean diets and metabolic syndrome status in the PREDIMED randomized trial. *CMAJ.* 2014;186(17):E649-57.
92. Harrison SA, Fecht W, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial. *Hepatology.* 2009;49(1):80-6.
93. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology.* 2012;55(6):2005-23.
94. Tiikkainen M, Hakkinen AM, Korshennikova E, Nyman T, Makimattila S, Yki-Jarvinen H. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;53(8):2169-76.
95. Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV, Lawson A, Ryder SD, Spendlove I, et al. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1176-84.
96. Athyros VG, Mikhailidis DP, Didangelos TP, Giouleme OI, Liberopoulos EN, Karagiannis A, et al. Effect of multifactorial treatment on non-alcoholic fatty liver disease in metabolic syndrome: a randomised study. *Curr Med Res Opin.* 2006;22(5):873-83.

97. Deushi M, Nomura M, Kawakami A, Haraguchi M, Ito M, Okazaki M, et al. Ezetimibe improves liver steatosis and insulin resistance in obese rat model of metabolic syndrome. *FEBS Lett.* 2007;581(29):5664-70.
98. Cussons AJ, Watts GF, Mori TA, Stuckey BG. Omega-3 fatty acid supplementation decreases liver fat content in polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial employing proton magnetic resonance spectroscopy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(10):3842-8.
99. Nobili V, Bedogni G, Alisi A, Pietrobattista A, Rise P, Galli C, et al. Docosahexaenoic acid supplementation decreases liver fat content in children with non-alcoholic fatty liver disease: double-blind randomised controlled clinical trial. *Arch Dis Child.* 2011;96(4):350-3.
100. Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Endo H, Takahashi H, et al. Effectiveness of antiplatelet drugs against experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2008;57(11):1583-91.
101. Sitia G, Aiolfi R, Di Lucia P, Mainetti M, Fiocchi A, Mingozi F, et al. Antiplatelet therapy prevents hepatocellular carcinoma and improves survival in a mouse model of chronic hepatitis B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(32):E2165-72.
102. Shen H, Shahzad G, Jawairia M, Bostick RM, Mustacchia P. Association between aspirin use and the prevalence of nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(9):1066-73.
103. Parise LV. Introduction to a review series: megakaryocytes to platelets in health and disease. *Blood.* 2016;127(10):1215.
104. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease.* San Rafael (CA)2010.
105. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:781857.
106. Slichter SJ. Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Transfus Med Rev.* 2004;18(3):153-67.
107. White JG, Clawson CC. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *Am J Pathol.* 1980;101(2):353-64.
108. Ebbeling L, Robertson C, McNicol A, Gerrard JM. Rapid ultrastructural changes in the dense tubular system following platelet activation. *Blood.* 1992;80(3):718-23.

109. Zapata JC, Cox D, Salvato MS. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(6):e2858.
110. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23(4):177-89.
111. White JG. Electron opaque structures in human platelets: which are or are not dense bodies? *Platelets*. 2008;19(6):455-66.
112. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001;12(5):261-73.
113. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):403-12.
114. Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res*. 2007;120 Suppl 1:S5-9.
115. Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. *J Thromb Haemost*. 2009;7 Suppl 1:200-5.
116. Nguyen-Ho P, Lakkis NM. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists and coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2001;3(2):139-48.
117. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2009;7(7):1057-66.
118. Murugappan S, Shankar H, Kunapuli SP. Platelet receptors for adenine nucleotides and thromboxane A₂. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(4):411-8.
119. Fox JE. Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):198-213.
120. Escolar G, Krumwiede M, White JG. Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol*. 1986;123(1):86-94.
121. Daniel JL, Molish IR, Rigmaiden M, Stewart G. Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response. *J Biol Chem*. 1984;259(15):9826-31.
122. Stenberg PE, Shuman MA, Levine SP, Bainton DF. Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. *J Cell Biol*. 1984;98(2):748-60.
123. Morgenstern E, Neumann K, Patscheke H. The exocytosis of human blood platelets. A fast freezing and freeze-substitution analysis. *Eur J Cell Biol*. 1987;43(2):273-82.

124. Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1152-60.
125. Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep.* 2008;60(1):3-11.
126. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. *Circulation.* 1999;99(1):E1-E11.
127. Ma YQ, Qin J, Plow EF. Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms. *J Thromb Haemost.* 2007;5(7):1345-52.
128. Goto S, Ikeda Y, Saldivar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest.* 1998;101(2):479-86.
129. Munnix IC, Cosemans JM, Auger JM, Heemskerk JW. Platelet response heterogeneity in thrombus formation. *Thromb Haemost.* 2009;102(6):1149-56.
130. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J.* 2018;39(3):213-60.
131. Patrono C, Bachmann F, Baigent C, Bode C, De Caterina R, Charbonnier B, et al. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European society of cardiology. *Eur Heart J.* 2004;25(2):166-81.
132. Fong AYY, Ling HS. Dual Antiplatelet and Glycoprotein Inhibitors in Emergency PCI. In: Watson TJ, Ong PJL, Tcheng JE, editors. *Primary Angioplasty: A Practical Guide.* Singapore2018. p. 99-108.
133. Wallentin L. P2Y(12) inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J.* 2009;30(16):1964-77.
134. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
135. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000;12(2):121-7.

136. Singh RK, Sudhakar A, Lokeshwar BL. Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Prostate Cancer Development and Progression. *J Cancer Sci Ther.* 2010;2(4):89-94.
137. Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity.* 2009;31(5):711-21.
138. Ruffini PA, Morandi P, Cabioglu N, Altundag K, Cristofanilli M. Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer. *Cancer.* 2007;109(12):2392-404.
139. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:217-42.
140. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* 1998;393(6685):595-9.
141. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):709-22.
142. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996;382(6592):635-8.
143. Stellos K, Seizer P, Bigalke B, Daub K, Geisler T, Gawaz M. Platelet aggregates-induced human CD34+ progenitor cell proliferation and differentiation to macrophages and foam cells is mediated by stromal cell derived factor 1 in vitro. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(2):139-45.
144. Lazarini F, Casanova P, Tham TN, De Clercq E, Arenzana-Seisdedos F, Baleux F, et al. Differential signalling of the chemokine receptor CXCR4 by stromal cell-derived factor 1 and the HIV glycoprotein in rat neurons and astrocytes. *Eur J Neurosci.* 2000;12(1):117-25.
145. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* 2006;203(9):2201-13.
146. Yan X, Cai S, Xiong X, Sun W, Dai X, Chen S, et al. Chemokine receptor CXCR7 mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation. *J Cell Biochem.* 2012;113(4):1437-46.
147. Rath D, Chatterjee M, Meyer L, Tekath N, Olma C, Krumm P, et al. Relative survival potential of platelets is associated with platelet CXCR4/CXCR7 surface exposure and functional recovery following STEMI. *Atherosclerosis.* 2018;278:269-77.

148. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. 2006;203(5):1221-33.
149. Rath D, Chatterjee M, Borst O, Muller K, Langer H, Mack AF, et al. Platelet surface expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 is associated with clinical outcomes in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost*. 2015;13(5):719-28.
150. Rath D, Chatterjee M, Borst O, Muller K, Stellos K, Mack AF, et al. Expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 on circulating platelets of patients with acute coronary syndrome and association with left ventricular functional recovery. *Eur Heart J*. 2014;35(6):386-94.
151. Stellos K, Ruf M, Sopova K, Kilias A, Rahmann A, Stamatelopoulos K, et al. Plasma levels of stromal cell-derived factor-1 in patients with coronary artery disease: effect of clinical presentation and cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*. 2011;219(2):913-6.
152. Feil C, Augustin HG. Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247(1):38-45.
153. Majka M, Ratajczak J, Kowalska MA, Ratajczak MZ. Binding of stromal derived factor-1alpha (SDF-1alpha) to CXCR4 chemokine receptor in normal human megakaryoblasts but not in platelets induces phosphorylation of mitogen-activated protein kinase p42/44 (MAPK), ELK-1 transcription factor and serine/threonine kinase AKT. *Eur J Haematol*. 2000;64(3):164-72.
154. Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2008;283(7):4283-94.
155. Wegner SA, Ehrenberg PK, Chang G, Dayhoff DE, Sleeker AL, Michael NL. Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem*. 1998;273(8):4754-60.
156. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35760-6.
157. Schonemeier B, Schulz S, Hoell V, Stumm R. Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain. *J Neuroimmunol*. 2008;198(1-2):39-45.

158. Mazinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med*. 2008;205(2):479-90.
159. Martinez A, Kapas S, Miller MJ, Ward Y, Cuttitta F. Coexpression of receptors for adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2000;141(1):406-11.
160. Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(40):15735-40.
161. Chatterjee M, Rath D, Gawaz M. Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function. *Biochem Soc Trans*. 2015;43(4):720-6.
162. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:139-62.
163. Rath D, Geisler T, Gawaz M, Vogel S. HMGB1 Expression Level in Circulating Platelets is not Significantly Associated with Outcomes in Symptomatic Coronary Artery Disease. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(4):1627-33.
164. Vogel S, Chatterjee M, Metzger K, Borst O, Geisler T, Seizer P, et al. Activated platelets interfere with recruitment of mesenchymal stem cells to apoptotic cardiac cells via high mobility group box 1/Toll-like receptor 4-mediated down-regulation of hepatocyte growth factor receptor MET. *J Biol Chem*. 2014;289(16):11068-82.
165. Vogel S, Bodenstein R, Chen Q, Feil S, Feil R, Rheinlaender J, et al. Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J Clin Invest*. 2015;125(12):4638-54.
166. Vogel S, Rath D, Borst O, Mack A, Loughran P, Lotze MT, et al. Platelet-derived high-mobility group box 1 promotes recruitment and suppresses apoptosis of monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(1):143-8.
167. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood*. 1992;80(1):143-52.
168. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol*. 2004;93(11):855-63.
169. Whiss PA, Andersson RG, Srinivas U. Modulation of P-selectin expression on isolated human platelets by an NO donor assessed by a novel ELISA application. *J Immunol Methods*. 1997;200(1-2):135-43.

170. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med*. 1999;190(6):803-14.
171. Merten M, Beythien C, Gutensohn K, Kuhn P, Meinertz T, Thiagarajan P. Sulfatides activate platelets through P-selectin and enhance platelet and platelet-leukocyte aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(1):258-63.
172. Tailor A, Cooper D, Granger DN. Platelet-vessel wall interactions in the microcirculation. *Microcirculation*. 2005;12(3):275-85.
173. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*. 2000;102(16):1931-6.
174. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51(4):600-6.
175. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci*. 2004;35(2):83-92.
176. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007;74(2):184-95.
177. Rath D, Chatterjee M, Muller I, Muller K, Bockmann C, Droppa M, et al. Platelet expression of transforming growth factor beta 1 is enhanced and associated with cardiovascular prognosis in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*. 2014;237(2):754-9.
178. Fabregat I, Moreno-Caceres J, Sanchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, et al. TGF-beta signalling and liver disease. *FEBS J*. 2016;283(12):2219-32.
179. Rath D, Chatterjee M, Holtkamp A, Tekath N, Borst O, Vogel S, et al. Evidence of an interaction between TGF-beta1 and the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in human platelets. *Thromb Res*. 2016;144:79-84.
180. Jokinen E. Obesity and cardiovascular disease. *Minerva Pediatr*. 2015;67(1):25-32.
181. ICH Harmonised Tripartite Guideline: guideline for good clinical practice. *J Postgrad Med*. 2001;47(2):121-30.
182. Malehmir M, Pfister D, Gallage S, Szydłowska M, Inverso D, Kotsiliti E, et al. Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nat Med*. 2019;25(4):641-55.

183. Min HK, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 2012;15(5):665-74.
184. Lim SY. Role of statins in coronary artery disease. *Chonnam Med J.* 2013;49(1):1-6.
185. Diamantis E, Kyriakos G, Quiles-Sanchez LV, Farmaki P, Troupis T. The Anti-Inflammatory Effects of Statins on Coronary Artery Disease: An Updated Review of the Literature. *Curr Cardiol Rev.* 2017;13(3):209-16.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung für Innere Medizin III, unter Betreuung von Prof. Dr. med. Tobias Geisler und Dr. med. Dominik Rath durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, Prof. Dr. med. Tobias Geisler, Dr. med. Dominik Rath, Prof. Dr. med. Lars Zender und Martina Hinterleitner.

Die Akquirierung der Patienten erfolgte durch Florian Baku und Dr. med. Dominik Rath. Die Blutentnahme, die Durchflusszytometrie (FACS), die Impedanzaggregometrie, die Verarbeitung und Konservierung von Plasma- und Serumproben, die Erhebung der MAST-Fragebögen sowie die Auswertungen von allem Genannten wurden nach Einarbeitung durch Dr. med. Dominik Rath, Lydia Laptev und Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee von mir eigenständig durchgeführt. Die Impedanzaggregometrie sowie die Aufnahme der Plasma- und Serumproben in die Biobank fand gelegentlich auch in Zusammenarbeit mit Lydia Laptev statt. Die Ergebnisse der bildgebenden Untersuchungen wurden mir freundlicherweise von der Abteilung für Radiologie des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt. Weitere klinische Daten der Patienten wurden von Dr. med. Dominik Rath zur Verfügung gestellt. Die statistische Auswertung und Interpretation der Ergebnisse erfolgte nach Anleitung durch Dr. med. Dominik Rath durch mich persönlich.

Für die Publikation „Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. Nat Med. 2019“, welche im Rahmen meiner Dissertation und in enger Kooperation mit Prof. Dr. Mathias Heikenwälder vom Helmholtz Zentrum München erfolgte, habe ich nach Anleitung durch Dr. med. Dominik Rath einen Teil der für jene Studie eingeschlossenen Patienten rekrutiert, alle Patienten charakterisiert, Standard- und experimentelle Laborparameter erhoben sowie einen Teil der statistischen Auswertung durchgeführt; an der Ausarbeitung des Manuskripts war ich jedoch

nicht direkt beteiligt. Die in dieser Dissertation präsentierten Daten entstammen einer ähnlichen Patientenkohorte, wurden allerdings bislang nicht publiziert.

Ich versichere, dieses Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die kritische Revision des Manuskripts erfolgte durch Dr. med. Dominik Rath.

Lichtenstein, der 02.02.2020

Marcel Maurice Rall

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertationsschrift nicht zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Tobias Geisler sowie Dr. med. Dominik Rath für die hervorragende und unkomplizierte Betreuung dieser Arbeit. Der stets freundliche und konstruktive wissenschaftliche Austausch war mir nicht nur in fachlicher oder organisatorischer Hinsicht eine große Hilfe, sondern trug auch wesentlich zur Erweiterung meines medizinischen Wissens und wissenschaftlichen Know-Hows bei.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls herzlich beim gesamten Laborteam und speziell Lydia Laptev und Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee, deren geduldige Einarbeitung mir die Arbeit im Labor überhaupt erst ermöglicht hat.

Ausdrücklich danke ich auch meinem Kollegen Florian Baku für die durchweg gute und harmonische Zusammenarbeit und die hervorragende Organisation.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Freunden Ronja Felske und Vincent Müller für ihren moralischen Beistand, auf welchen ich mich immer verlassen konnte, und ihre fachlichen Ratschläge während der Anfertigung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt schließlich auch meiner Familie und speziell meiner Mutter, die mich stets unterstützte und auf meinem Weg bestärkte. Ohne ihre Hilfe wäre Vieles nicht möglich gewesen. Ihr widme ich diese Arbeit.