

DISSERTATION

Untersuchungen zur Cholesterin-senkenden Wirkung der
kurzkettigen Fettsäure Propionat.

Investigations into the cholesterol-lowering effect of the short-
chain fatty acid propionate.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Paul Schumann

Erstbetreuer: PD Dr. Arash Haghikia
Datum der Promotion: 23.03.2024

Vorwort

Teilweise wurden die Ergebnisse der Experimente der hier vorliegenden Dissertation bereits vorab in folgender Publikation (Originalarbeit) veröffentlicht:

1. Arash Haghikia, Friederike Zimmermann, **Paul Schumann**, Andrzej Jasina, Johann Roessler, David Schmidt, Philipp Heinze, Johannes Kaisler, Vanasa Nageswaran, Annette Aigner, Uta Ceglarek, Roodline Cineus, Ahmed N Hegazy, Emiel P C van der Vorst, Yvonne Döring, Christopher M Strauch, Ina Nemet, Valentina Tremaroli, Chinmay Dwibedi, Nicolle Kränkel, David M Leistner, Markus M Heimesaat, Stefan Bereswill, Geraldine Rauch, Ute Seeland, Oliver Soehnlein, Dominik N Müller, Ralf Gold, Fredrik Bäckhed, Stanley L Hazen, Aiden Haghikia, Ulf Landmesser

“Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism”

European Heart Journal, Volume 43, Issue 6, 7 February 2022, Pages 518–533,
DOI: 10.1093/eurheartj/ehab644

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	2
Inhaltsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	9
Abstrakt - Deutsch.....	11
Abstract - English.....	12
1. Einleitung.....	13
1.1. Zahlen und Fakten zur Hypercholesterinämie und Atherosklerose.....	13
1.2. Pathogenese der Atherosklerose.....	13
1.3. Hyperlipidämie.....	16
1.4. Diagnostik.....	18
1.5. Prävention.....	18
1.6. Therapie.....	19
1.6.1. Statine.....	20
1.6.2. PCSK9-Inhibitoren.....	21
1.6.3. Cholesterol-Resorptionshemmer.....	22
1.6.4. Weitere aktuelle und zukünftige Therapieoptionen.....	22
1.7. Darmmikrobiom.....	23
1.8. Aktueller Forschungsstand zu Propionat.....	24
1.9. Zielsetzung der Arbeit.....	27
2. Materialien.....	28
2.1. Geräte.....	28
2.2. Software.....	28
2.3. Verbrauchsmaterialien.....	29
3. Methoden.....	32

3.1.	Aufbau der klinischen Studie	32
3.2.	Rekrutierung und Eigenschaften der Patient*innen -Gruppen.....	33
3.3.	Ablauf der klinischen Studie	34
3.4.	Durchflusszytometrische Bestimmung	36
3.4.1.	Markierung von Th1/17-Zellen und Monozyten	36
3.4.2.	Markierung der regulatorischen T-Zellen	37
3.4.3.	Messung und Auswertung der Daten	37
3.5.	Thrombozytenaggregationsdiagnostik.....	40
3.5.1.	Impedanzaggregometrie mittels Multiplate-Systems.....	40
3.5.2.	Spezielle Testverfahren	42
3.6.	Statistik.....	42
4.	Ergebnisse	45
4.1.	Verteilung und Eigenschaften der Patient*innengruppen	45
4.2.	Primärer Endpunkt LDL Cholesterin.....	47
4.3.	Weitere Cholesterinwerte	50
4.4.	Durchflusszytometrie.....	54
4.5.	Sicherheitsparameter	57
4.6.	Unerwünschte Ereignisse (AE).....	59
4.7.	Thrombozytenaggregometrie	61
5.	Diskussion	63
5.1.	Verteilung und Eigenschaften der Patient*innengruppen	63
5.2.	Auswirkungen der Propionatgabe auf das Lipidprofil	64
5.3.	Durchflusszytometrische Messungen.....	66
5.4.	Sicherheitsparameter und AE	68
5.5.	Thrombozytenaggregation	70
5.6.	CRP.....	70
5.7.	Limitationen.....	71
6.	Fazit und Ausblick	72

6. Literatur	73
Eidesstattliche Versicherung	84
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	86
Lebenslauf	87
Publikationsliste	88
Danksagung	89
Bescheinigung des akkreditierten Statistikers	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	28
Tabelle 2: Software.....	28
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 4: Antikörper	30
Tabelle 5: Chemikalien	31
Tabelle 6: Studienablauf.....	34
Tabelle 7: Deskriptive Statistiken der Proband*innen-Gruppen.....	46
Tabelle 8: Absolute Häufigkeiten von AE nach Studienarmen.....	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schritte in der Progression der Atherosklerose.....	14
Abbildung 2: Komposition der Lipoproteine basierend auf dem TG- und Cholesterin- Gehalt und den Apolipoproteinen	17
Abbildung 3: Gating-Strategie der regulatorische T-Zellen	38
Abbildung 4: Gating-Strategie für Th1- und Th17-Zellen	39
Abbildung 5: Gating-Strategie für Monozyten	40
Abbildung 6: Beispiel der Impedanzmessung mittels Multiplate-System	41
Abbildung 7: Auswahl, Zuordnung und Teilnahme an Folgevisiten des Proband*innen- Kollektivs	45
Abbildung 8: Wasserfalldiagramm der LDL-C Differenzen der Proband*innen von der ersten Visite zur dritten Visite	47
Abbildung 9: Unterschiede von LDL-C im Blut zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite, aufgetragen für die Proband*innen der Propionat- und Placebo-Gruppen.....	48
Abbildung 10: Ergebnisse der Analysen des primären Endpunktes nach achtwöchiger Therapie mit Propionat im Vergleich zu Placebo	49
Abbildung 11: Verlauf der Konzentration an Gesamtcholesterin im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite im Boxplot-Diagramm mit Median	50
Abbildung 12: Verlauf des HDL-C-Konzentration im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite	51
Abbildung 13: Ergebnisse des erweiterten Lipidprofils aus Vollblut als Boxplot- Diagramm mit Median	52
Abbildung 14: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der FOXP3-positiven Treg aus EDTA-Vollblut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite, dargestellt als Boxplot-Diagramm	54
Abbildung 15: Verlauf von erster zu dritter Visite der durchflusszytometrischen Ergebnisse.....	55
Abbildung 16: Verlauf der Daten von durchflusszytometrischen Analysen der Monozyten aus EDTA-Vollblut	56
Abbildung 17: Logarithmische Darstellung der Konzentration der GOT (A) und der GPT (B) im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite	57

Abbildung 18: Logarithmische Darstellung der CRP-Konzentration im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite	58
Abbildung 19: Ergebnisse der Glucose- und HbA _{1c} -Messung im Blut dargestellt als Boxplot-Diagramm mit Median	59
Abbildung 20: Ergebnisse der Impedanzaggregometrie mittels Multiplate Analyse aus Hirudin-Vollblut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite ..	61

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACS	Acute Coronary Syndrome (Akutes Koronarsyndrom)
ADP	Adenosindiphosphat
AE	Adverse Event (Unerwünschtes Ereignis)
AMG	Arzneimittelgesetz
ASCVD	Atherosclerotic cardiovascular disease (=Atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen)
Propionat	Calciumpropionat
CBF	Charité – Campus Benjamin Franklin
CRF	Case Report Form
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Cardiovascular disease (=Kardiovaskuläre Erkrankungen)
GCP	Good Clinical Practice
ESC	European Society of Cardiology
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GFR	Glomerular Filtration Rate
GOT	Glutamate Oxaloacetate Transaminase
GPT	Glutamate Pyruvate Transaminase
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HbA1c	Hämoglobin A1c (glykiertes Hämoglobin)
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym A
ICH	International Conference on Harmonization
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IIT	Investigator Initiated Trial
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
ITT	Intent-To-Treat
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-C	Low Density Lipoprotein gebundenes Cholesterin

LOCF	Last Observation Carried Forward
Lp(a)	Lipoprotein a
LPL	Lipoproteinlipase
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	Mean Corpuscular Volume
NPC1L1	Niemann-Pick-C1-Like
NYHA	New York Heart Association
oxLDL	Oxidiertes LDL
PCSK9	Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
Perm-Puffer	Permeabilisierung-Puffer
PGE1	Prostaglandin E1
PROPER-LDL	Safety and Efficacy of PROPIonate for Reduction of LDL Cholesterol (PROPER-LDL Trial)
SAE	Serious Adverse Event
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren
SCORE	Systematic COronary Risk Evaluation
siRNA	Small Interfering Ribonucleic Acid
SUSAR	Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction
TGF	Transforming Growth Factor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone
TRAP	Thrombin receptor activating peptide
TG	Triglyceride
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Abstrakt - Deutsch

Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache weltweit dar. Die Atherosklerose ist eine chronische, inflammatorische kardiovaskuläre Erkrankung, die insbesondere durch eine Dysregulation des Lipidstoffwechsels und immunologische Prozesse der Gefäßwand verursacht wird. Medikamentöse Therapien zielen daher auf eine Senkung des Cholesterinspiegels und eine atheroprotektive Modulation des Immunsystems ab. Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss der Supplementierung mit der kurzkettigen Fettsäure Propionat auf die Gesamt- und LDL-C-Konzentration zu untersuchen.

Methoden

62 Patient*innen mit Hypercholesterinämie wurden randomisiert in eine Placebo- und eine Verum-Gruppe eingeteilt. Die Verum-Gruppe erhielt eine achtwöchige Therapie mit 2x500 mg Propionat pro Tag. Das Lipidprofil (LDL-C, HDL-C, Gesamtcholesterin, Triglyzeride, Apo A1 und B, Lp(a)) und Immunzellen (Treg, Th1, Th17, Monozyten) sowie der inflammatorische Marker C-reaktives Protein, die Thrombozytenaggregation, Nüchternblut-Glukose und HbA1c wurden vor und nach der Therapie bestimmt.

Ergebnisse

Die achtwöchige Propionat-Therapie führte zu einer signifikanten Senkung des LDL-C, Gesamtcholesterins und CRP und einer Erhöhung der immunmodulatorischen Treg im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Propionat hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Nüchternblut-Glukose, HDL, Triglyzeride, Monozyten, Th1- und Th17-Zellen oder die Thrombozytenaggregation. Das Nebenwirkungsprofil von Propionat blieb über den gesamten Studienverlauf auf Placebo-Niveau.

Schlussfolgerungen

Die achtwöchige Gabe von 2x500 mg Propionat am Tag kann sich positiv auf das Lipidprofil und das Immunsystem von Patient*innen mit Hypercholesterinämie auswirken. Multizentrische Studien mit einer hohen Proband*innenzahl sind erforderlich, um diese Ergebnisse abzusichern.

Abstract - English

Introduction

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide. Atherosclerosis is a chronic inflammatory cardiovascular disease caused primarily by deregulation of the lipid metabolism and immunological processes in the blood vessel walls. Medical treatments therefore target a reduction of the cholesterol level and atheroprotective modulation of the immune system. The aim of this study is to investigate the effect of supplementation with the short-chain fatty acid propionate on total and LDL-C concentrations.

Methodology

62 patients with hypercholesterolaemia were randomly divided into a placebo and an experimental group. The experimental group received an eight-week treatment with 2x500 mg propionate per day. The lipid profile (LDL-C, HDL-C, total cholesterol, triglycerides, Apo A1 and B, Lp(a)), immune cells (Tregs, Th1, Th17, monocytes), the inflammation marker C-reactive protein, platelet aggregation, fasting blood glucose levels and HbA1c were determined before and after the treatment.

Results

The eight-week propionate treatment resulted in a significant decrease in LDL-C, total cholesterol and CRP and an increase in the immunomodulating Tregs compared to the placebo group. On the other hand, propionate had no significant effect on fasting blood glucose levels, HDL, triglycerides, monocytes, Th1 and Th17 cells or platelet aggregation. The adverse effects profile of propionate remained at the placebo level over the entire course of the study.

Conclusions

The eight-week administration of 2x500 mg propionate per day may positively influence the lipid profile and the immune system of patients with hypercholesterolaemia. Multicentric studies with a high number of subjects are necessary to verify these results.

1. Einleitung

1.1. Zahlen und Fakten zur Hypercholesterinämie und Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) stellen für Gesundheitssysteme weltweit eine der größten Herausforderungen dar und sind global betrachtet seit Jahren die häufigste Todesursache (1–3). So entfielen 2017 beispielsweise in Deutschland 36,96 % der Todesfälle auf diese Erkrankungen (4). Dabei bilden atherosklerotisch bedingte Folgeerkrankungen (ASCVD) die mit Abstand häufigsten Ursache ab. Hierzu zählen unter anderem der ischämische Schlaganfall, die periphere arterielle Verschlusskrankheit und die Koronare Herzkrankheit (KHK) mit ischämischer Kardiomyopathie und Myokardinfarkt.

1.2. Pathogenese der Atherosklerose

Als chronisch inflammatorischer Prozess weist die Atherosklerose eine komplexe Pathogenese auf, die bis heute nicht abschließend aufgeklärt ist (5). Die Pathogenese der Atherosklerose ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die Krankheit betrifft die Tunica intima der Gefäße, insbesondere an Stellen mit turbulenten Strömungen, wie beispielsweise Bifurkationen oder auch Gefäßabgängen. An eben jenen Schwachstellen ist die hämodynamische Belastung besonders groß, sodass es initial zu einer Störung der Endothelfunktion kommt (6, 7).

Da die Permeabilität des Endothels unter dieser Belastung erhöht ist, kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an das Endothel (8). Weitere Plasmabestandteile, wie Lipoproteine, können zwischen den Endothelzellen vorbei in die Gefäßintima übertreten (9). Bei Hyperlipidämien bildet sich vermehrt die oxidierte Struktur des Low Density Lipoproteins (LDL/oxLDL).

Die Ablagerung der LDL und oxLDL löst nun eine inflammatorische Reaktion aus, die wiederum zur Chemokin-vermittelten Rekrutierung von Monozyten in die Intima führt (10). Dort differenzieren sie zu gewebesansässigen Makrophagen, die nun das LDL phagozytieren (11). Besonders die oxLDL werden effizient über die Scavenger-Rezeptoren phagozytiert und eingelagert, sodass der Makrophage aufgrund seines hohen Gehaltes an oxidierten Lipoproteinen zur sogenannten Schaumzelle wird (12).

Durch Ansammlung und Nekrose dieser entstehen sogenannte „Fatty Streaks“. Solche Lipidansammlungen in der extrazellulären Matrix sind selbst makroskopisch sichtbar und begünstigen die zusätzliche Adhäsion von Thrombozyten (13).

Die hierdurch initiierte Stenosierung und Plauebildung führt zu einer Verengung des Gefäßes. Durch die Sekretion von Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) und die damit einhergehende Proliferation der glatten Muskulatur des Gefäßes entsteht ein Circulus vitiosus aus Inflammation und Stenosierung (14). Die Inflammation unter Beteiligung von Interleukinen (IL) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) führt zur Differenzierung von glatten Muskelzellen hin zu sezernierenden Zellen (15, 16). Im Fibroatherom bilden die Kollagene und Proteoglykane eine kollagene Kappe über der Plaue (17, 18). In diesen kann es zusätzlich zur Einlagerung von Apatit und Kalziumphosphat kommen (19).

Die Intima ist nun strukturell so geschädigt, dass die Vasomotorik deutlich eingeschränkt ist (20). Bei Ruptur der Plaues kommt es durch Austreten des nekrotischen Kerns zur Thrombenbildung und dem Verschluss des Gefäßes (21). Die Folgen des unterbundenen Blutflusses sind, je nach Position des Thrombus, beispielsweise ein Myokardinfarkt oder eine transitorische ischämische Attacke bis hin zum Apoplex (22).

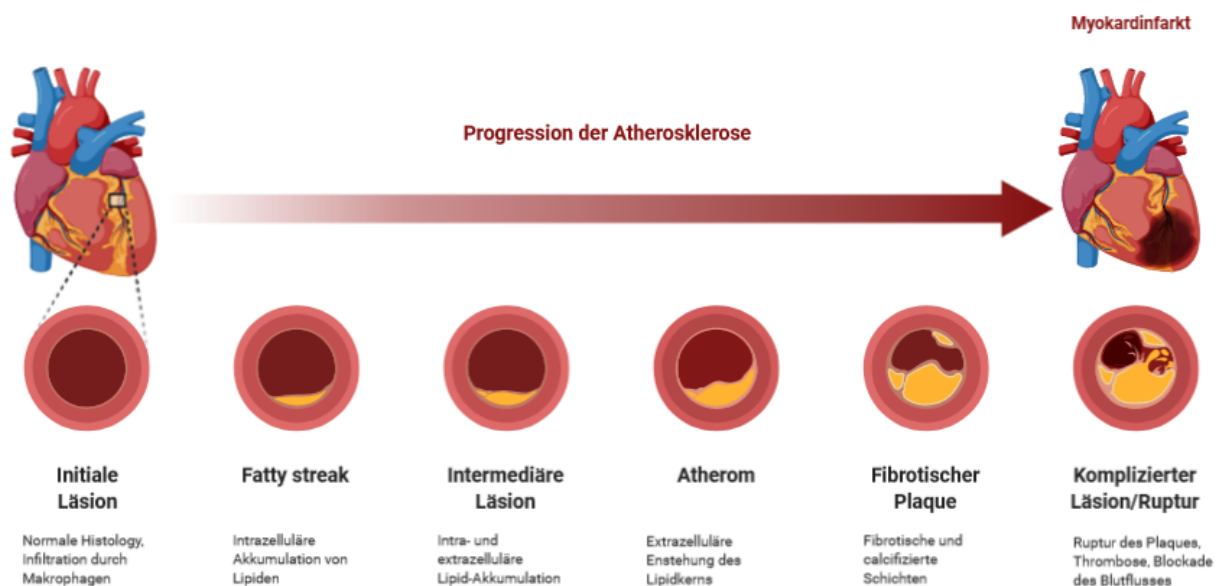


Abbildung 1: Schritte in der Progression der Atherosklerose. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Die Wahrscheinlichkeit für eine Ruptur beziehungsweise die Stabilität der Plaques ist direkt abhängig von deren Zusammensetzung und Morphologie: je höher ihr fibröser Anteil, desto höher die Stabilität. Mit dem Lipidgehalt einer Plaque verhält es sich umgekehrt: je höher der Lipidanteil einer Plaque, desto geringer ist ihre Stabilität (23–25).

Als Risikofaktoren für Atherosklerose sind insbesondere eine arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, familiäre Disposition, Diabetes mellitus sowie Nikotinabusus anzuführen (26). Dabei spielt im Speziellen eine erhöhte Konzentration des LDL eine besondere Rolle. Dieses in der Leber synthetisierte Lipoprotein transportiert Cholesterin und Cholesterin-Ester in die extrahepatischen Gewebe.

Weitere Risikofaktoren sind eine erhöhte Homocystein-Konzentration, erhöhte Serumkonzentrationen des Lipoproteins a (Lp(a)), Adipositas, Bewegungsmangel sowie psychischer Stress (26, 27). Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Pathogenese sind ebenfalls abhängig von Art und Anzahl der Immunzellen sowie ihre komplexe Interaktion vor Ort. Hierbei wird zwischen Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems unterschieden. Zu den Zellen der angeborenen Immunantwort gehören Makrophagen, Mastzellen sowie neutrophile, basophile, eosinophile, und dendritische Immunzellen. B-Lymphozyten und T-Lymphozyten sind an der adaptiven Immunantwort beteiligt. Einige Zellen, wie beispielsweise natürliche Killer-T-Zellen, sind an Prozessen beider Immunantworten beteiligt. Die T-Lymphozyten werden u.a. in T-Helfer(h)1-, Th2-, Th9, Th17 und regulatorische T-Zellen (Treg) differenziert und produzieren unterschiedliche Zytokine und Immunreaktionen.

Beispielsweise fördern Th1-Zellen durch Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ) die Progression der Läsion, destabilisieren diese und aktivieren Monozyten (28). Th2- und Th17-Zellen tragen sowohl positiv als auch negativ zum Entzündungsgeschehen bei. Th17-Zellen produzieren ebenfalls IFN- γ , aber auch IL-6 und den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF). Dies begründet ihren proatherosklerotischen Einfluss (29). Allerdings weisen Th17-Zellen ebenfalls eine hohe Plastizität auf und können zu Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3)-positiven regulatorischen T-Zellen (Treg) konvertieren. Diese wiederum regulieren die Selbsttoleranz und haben eine immunmodulierende Rolle. Durch Sezernierung von Transforming Growth Factor (TGF)- β , IL-10, IL-35 und Adenosin wird die T-

Zellaktivierung inhibiert, die Plaque stabilisiert, und die Aufnahme von oxLDL in die Makrophagen reduziert (28, 30).

Monozyten spielen ebenso eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Monozyten und Makrophagen sind an der Initiierung und Entwicklung atherosklerotischer Läsionen und der Neoangiogenese der Plaques beteiligt (31). Monozyten lassen sich anhand extrazellulärer Marker in folgende Subgruppen unterteilen: klassisch, intermediär und nicht klassisch. Jede dieser Subgruppen weist unterschiedliche primäre Funktionen auf und übernimmt unterschiedliche Rollen bei der Bildung und Destabilisierung von atherosklerotischen Plaques (32, 33). So werden die klassischen Monozyten vorwiegend der Phagozytose und der Zytokin-Produktion zugeordnet, während die intermediären zusätzlich in der Angiogenese eine Schlüsselposition einnehmen. Die nicht-klassischen Monozyten weisen hingegen antiinflammatorische Effekte auf und sind an der Geweberegeneration und Wundheilung beteiligt (34). Das klassische Modell der Makrophagenaktivierung beinhaltet zwei Grundtypen von Makrophagen: proinflammatorische M1-Makrophagen und alternative M2-Makrophagen (35). Die Differenzierung zum M1-Typ erfolgt als Reaktion auf Toll-like-Rezeptor- und Interferon- γ -vermittelte Signalwege sowie durch Pathogen-assoziierte molekulare Komplexe, Lipopolysaccharide und Lipoproteine. Diese Zellen sezernieren proinflammatorische Faktoren, wie die Chemokine CXCL9-11, Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interleukine (36). M1-Makrophagen generieren reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid und fördern hierdurch die Entzündungsreaktion. Die entzündungshemmenden M2-Makrophagen werden als Reaktion auf die Zytokine der Th2-Zellen aktiviert. In atherosklerotischen Läsionen wurden beide Makrophagen-Typen beschrieben, wobei M1-Makrophagen eher in fortschreitenden Plaques angereichert waren und M2-Makrophagen in stabilen Plaques (36).

1.3. Hyperlipidämie

Der Lipidstoffwechsel ist ein wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt zur Prävention der Atherosklerose. Lipoproteine bestehen aus Cholesterinen sowie ihren Estern, Triglyzeriden (TG), Apolipoproteinen und Phospholipiden. Die wichtigsten Lipoproteine, nach zunehmender Dichte geordnet, sind very low-density lipoprotein (VLDL),

intermediate-density lipoprotein (IDL), LDL, Lp(a), und high-density lipoprotein (HDL) (37) (Abb. 2). Sie sind für den Transport von wasserunlöslichen Lipiden im Plasma verantwortlich (38).

Nach der Resorption transportieren große Chylomikronen die Lipide und Cholesterine aus den duodenalen Mukosazellen über die Lymphe in periphere Gewebe. Zu diesem Zeitpunkt sind die Chylomikronen hochgradig TG-reich. In den peripheren Geweben werden die TG durch das Enzym Lipoproteinlipase (LPL) hydrolytisch gespalten, in das Gewebe aufgenommen und als Energiequelle genutzt. In den Hepatozyten der Leber werden die Remnants, also die Chylomikronenreste, weiter abgebaut und VLDL synthetisiert. VLDL sind ebenfalls reich an TG, welche auch durch LPL hydrolysiert werden. Durch den Austausch der Apolipoproteine mit HDL entstehen IDL, die weiter zu LDL abgebaut werden. Diese enthalten Apolipoprotein B-100 und sind sehr reich an Cholesterin, hingegen arm an TG (37).

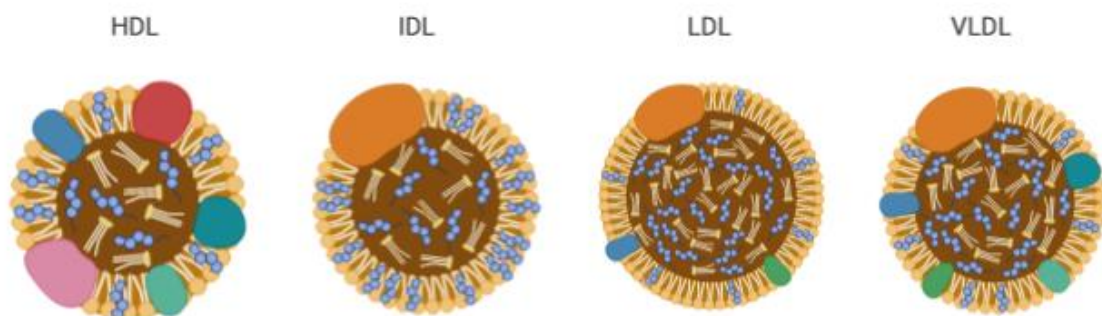


Abbildung 2: Komposition der Lipoproteine basierend auf dem TG- und Cholesterin-Gehalt und den Apolipoproteinen. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Lipoproteine, insbesondere LDL, mit einem Durchmesser von bis zu 70 nm können das Endothel der Gefäße passieren, durch Glykierung gefangen werden und die Atherosklerose initiieren (39). Umso höher die Konzentration des LDL, desto günstiger sind die Bedingungen für eine Plaque-Bildung. Zahlreiche Studien belegen einen direkten Zusammenhang der vom Plasma-LDL transportierten Cholesterinmasse (LDL-C) mit dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (40).

Familiär bedingte Hypercholesterinämie kann schon im Kindesalter auftreten und Atherome bilden (41–43). Daher ist zwischen primärer und sekundärer Dyslipidämie zu unterscheiden.

1.4. Diagnostik

Die familiäre Erkrankungshistorie ist bei der Anamnese ein entscheidender Risikofaktor, der auf eine primäre Hyperlipidämie deuten kann. Wichtigste Vertreterin ist die hetero- oder homozygote familiäre Hypercholesterinämie. Aber auch Erkrankungen und Umstände, die zu einer sekundären Hyperlipidämie führen können, müssen bei der Anamnese berücksichtigt werden. Hierzu zählen im Falle der LDL-Hypercholesterinämie Fehlernährung, Erkrankungen wie Hypothyreose, eine Schwangerschaft sowie unter Umständen die Einnahme bestimmter Wirkstoffe. Klinisch leicht erkennbar sind die Xanthomatosen, kutane Lipideinlagerungen. Besonders häufig treten diese als Xanthelasma an Augenlidern oder palmar und plantar als Xanthoma tendinosum an Sehnen und Fingern auf (27).

Die Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin empfiehlt ein Screening auf Dyslipidämien bereits im Vorschulalter, um frühestmöglich Folgeschäden limitieren zu können (44). Des Weiteren empfiehlt sich gegebenenfalls eine Untersuchung auf schon bestehende ASCVD bei erhöhter Systemic Coronary Risk Estimation (SCORE). Dieser trifft eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit eines kardiovaskulär bedingten Todes in den nächsten zehn Jahren. Hierbei wird die Datenlage nach Region, Geschlecht, Tabakkonsum, dem systolischen arteriellen Druck und der Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma gewichtet, um das individuelle Risiko zu präzisieren (27).

1.5. Prävention

Die Grundlage jeder Therapie atherosklerotischer Patient*innen bildet eine Optimierung des Lebensstils. Entscheidend ist hierbei eine ausgewogene Ernährung. Dabei sollte der Fokus nicht nur auf einer Reduktion des aufgenommenen Fettanteils liegen, da dies allein betrachtet in Studien nicht zu den gewünschten Besserungen führte. Vielmehr sollte die Nahrung möglichst arm an gesättigten Fettsäuren sowie reich an Vollkornprodukten,

Früchten, Gemüse und Fisch sein. Diese mediterrane Ernährungsweise, welche typischerweise auch reich an Olivenöl ist, enthält ebenso hohe Konzentrationen an Vitamin E und C sowie Omega-3-Fettsäuren (45, 46). Anhaltenden Kontroversen zufolge steht der evidenzbasierte Langzeiteffekt einer solchen Diät noch zur Disposition. Allerdings weist insbesondere der Ersatz gesättigter Fettsäuren durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren sowie ein Verzicht auf Trans-Fette einen deutlichen positiveren Nutzen auf als eine simple Fettreduktion (47). Im Speziellen senkt dies auch die LDL-C Plasma-Konzentration im Blut. (48)

Grundlegend positiv wirken sich auch sportliche Aktivität und eine Reduktion von Übergewicht auf die kardiovaskulären Risikofaktoren aus, diese haben hingegen wenig direkten Einfluss auf das LDL-C. Hierbei gilt eine Empfehlung von mindestens 30 Minuten sportlicher Betätigung täglich und einem Body Mass Index zwischen 20 – 25 kg/m². Ebenfalls sollten die Patient*innen sowohl auf aktiven als auch passiven Tabakkonsum verzichten. Eine eventuell bestehende Hypertonie sollte auf unter 140/90 mmHg eingestellt werden. Bei Komorbidität eines Diabetes mellitus sollte sich das HbA1c in einem Korridor unter 7 % befinden.(27)

1.6. Therapie

Die Reduktion des LDL-C ist ein bedeutender Surrogatparameter zur Senkung des kardiovaskulären Risikos und stellt damit ein zentrales Therapieziel dar (49–51). Hierfür ist eine Dauertherapie obligat (52). Dabei ist das individuelle Ansprechen auf die Medikation sehr unterschiedlich. Unter Therapie stehende Patient*innen mit sehr niedrigen LDL-C Konzentrationen weisen ein deutlich niedrigeres kardiovaskuläres Risiko im Vergleich zu einer lediglich moderaten LDL-C Reduktion auf. Daher profitieren Patient*innen auf lange Sicht umso mehr, je niedriger die Werte gehalten werden können (53).

Während bei Patient*innen mit niedrigem CVD-Risiko ein LDL-C Zielwert von unter 116 mg/dl erwogen werden sollte, liegt dieser bei Patient*innen mit einem moderaten CVD-Risiko schon bei 100 mg/dl. Zusätzlich zum Zielwert von 70 mg/dl wird bei einem hohen CVD-Risiko eine Reduktion von mindestens 50 % des Ausgangswertes empfohlen. Allerdings sollte bei Patient*innen mit besonders hohem CVD-Risiko die LDL-

C Plasmakonzentration maximal bei 54 mg/dl liegen und ebenfalls mindestens eine Reduktion um die Hälfte des Ausgangswertes aufweisen. Kommt es innerhalb von zwei Jahren wiederholt zu kardiovaskulären Ereignissen, sollte sogar eine noch potentere LDL-C Senkung in Betracht gezogen werden (27). Die Zielwerte müssen somit individuell auch auf die sonstigen Risikofaktoren abgestimmt werden. HDL hingegen hat sich in Studien nicht als ein Therapieziel etablieren können (54). Das inzwischen obsolete Verhältnis von HDL-C und LDL-C und eine Steigerung des HDL-C konnten in Studien mit Erkrankten das kardiovaskuläre Risiko nicht senken (55).

1.6.1. Statine

Statine stellen als Mittel der Wahl mit großem Abstand die am häufigsten eingesetzte Klasse der Cholesterinsenker dar (27). Sie sind potente Hemmer der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA)-Reduktase, dem regulierenden Enzym der Cholesterin-Biosynthese. Durch Inhibition dieses Enzyms kann das HMG-CoA nicht mehr zu Mevalonsäure umgesetzt werden, was zu einem Abfall der Cholesterin-Konzentration in den Hepatozyten führt (56). Daher exprimieren diese vermehrt LDL-Rezeptoren, wodurch das zirkulierende LDL-C und andere ApoB-haltige Lipoproteine zunehmend in die Hepatozyten aufgenommen werden. Folgend sinkt im Blut die Konzentration an LDL-C um bis zu 116 mg/dl und somit ebenso das Gesamtcholesterin (57). Es kommt ebenfalls zu einer Absenkung der TG-Konzentration und einem Anstieg der HDL-Konzentration (58).

Statine sind Monacolin-Analoga des ursprünglich aus dem Pilz *Aspergillus terreus* isolierten Lovastatin (59). Während Lovastatin und Simvastatin noch Prodrugs darstellten und in der Leber in ihre aktive Wirkform metabolisiert werden mussten, handelt es sich bei den Statinen späterer Generationen um die aktive Hydroxysäure. Die einzelnen Wirkstoffe dieser Klasse unterscheiden sich nicht mechanistisch, sondern in ihrer Pharmakokinetik. Sie werden oral verabreicht, weisen aufgrund unterschiedlicher Lipophilie stark unterschiedliche Bioverfügbarkeiten auf und unterliegen einem ausgeprägten First-Pass-Effekt (60).

Statine weisen zusätzlich sogenannte pleiotrope Effekte auf, wie Vasodilatation durch eine vermehrte Genexpression der NO-Synthase (61). Des Weiteren konnten ihnen in Studien antiinflammatorische und plaquestabilisierende Effekte nachgewiesen werden

(62, 63). Dies führt in der Summe zur Senkung des CVD-Risikos und zementiert den Status der Statine als First-line Therapeutikum (57).

Dem im Allgemeinen sehr guten Ansprechen auf Statine steht eine große Anzahl von Patient*innen gegenüber, die eine Statintherapie ablehnen oder auf diese nicht ansprechen (64, 65). Dies kann an fehlender Compliance seitens der Patient*innen liegen, aber auch an einer genetischen Prädisposition (66). Aufgrund der wachsenden medialen Aufmerksamkeit bezüglich der möglichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen einer Hochdosis-Statin-Therapie, wie Rhabdomyolyse, gastrointestinale Störungen oder ein erhöhtes Risiko für Hyperglykämien, wünschen viele Patient*innen Therapiealternativen (67).

1.6.2. PCSK9-Inhibitoren

Die neueste Klasse der Cholesterinsenker stellen die der Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 (PCSK9)-Inhibitoren dar (68). Als monoklonare Antikörper binden sie selektiv an PCSK9, die den Abbau der hepatozytären LDL-Rezeptoren einleitet. Somit steigt die Anzahl der LDL-Rezeptoren, wodurch folgend vermehrt LDL-C in die Hepatozyten aufgenommen wird. Durch diesen Mechanismus sind LDL-Reduktionen von über 73 % möglich, was sie zu der potentesten Klasse innerhalb der Cholesterinsenker macht (69).

In Studien zeigen sie auch bei bislang therapieresistenten Patient*innen die gewünschten Erfolge (27, 70, 71). Es zeigte sich zusätzlich zur LDL-C-Senkung eine Reduktion der bestehenden Atherome. Daher sind sie insbesondere für Hochrisikopatient*innen und in der Sekundärprävention eine potente Therapieoption. Die Wirkstoffe weisen ein sehr sicheres Nebenwirkungsprofil auf Placebo-Niveau auf. Da sie jedoch subkutan injiziert werden müssen, kann es zu Irritationen an der Injektionsstelle kommen. Zudem bestehen Bedenken hinsichtlich der Wirksamkeit bei der Senkung der Mortalität, der Kosteneffektivität und der langfristigen Sicherheit von extrem niedrigen LDL-Cholesterinwerten (56, 72). Daher werden sie in der Regel nicht als First-line Therapeutikum eingesetzt, sondern als Add-on zu Statinen beziehungsweise als Solotherapie bei Statin-Unverträglichkeit (58). Als neuester Vertreter hemmt Inclisiran als doppelsträngige small interfering RNA (siRNA) direkt über RNA-Interferenz das PCSK9-Gen und somit die PCSK9-Bildung (73).

1.6.3. Cholesterol-Resorptionshemmer

Ezetimib hemmt selektiv, als bisher einziger Vertreter der Cholesterol-Resorptionshemmer, das Protein Niemann-Pick C1-Like 1(NPC1L1), welches für den intestinalen Transport von endogenem und exogenem Cholesterin in den Blutkreislauf zuständig ist (74). Dabei kann durch synergistische Effekte eine bis zu 25-%ige LDL-C Reduktion zusätzlich zur Statinwirkung erzielt werden. Ezetimib weist ein sehr sicheres Profil auf und eignet sich aufgrund dessen und durch den Wirkmechanismus als Add-on Therapie. Es wird häufig auch als Alternative zu Statinen oder in Kombination zur bestehenden Therapie mit Fibraten, Statinen oder PCSK9-Inhibitoren eingesetzt (58, 75).

1.6.4. Weitere aktuelle und zukünftige Therapieoptionen

Als weitere Therapieoptionen zur Senkung des CVD-Risikos stehen beispielsweise Fibrate und Ionenaustauscher zur Verfügung. Diese kommen allerdings aufgrund der Überlegenheit anderer Wirkstoffklassen vergleichsweise deutlich seltener zum Einsatz. So weisen ältere Fibrate starke Interaktionen bis hin zur Rhabdomyolyse bei Kombination mit Statinen auf. Darüber hinaus haben sie geringere Auswirkungen auf die Plasmacholesterin-Konzentration, senken allerdings die Triglyzerid-Konzentration im Plasma, über Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren- α vermittelt, um circa 50 % (76).

Ionenaustauscher hingegen werden nicht resorbiert, weisen aber eine hohe Affinität zu Gallensäuren auf. Daher binden sie diese und steigern die fäkale Eliminierung der Gallensäuren, die in der Leber aus Cholesterin synthetisiert werden, um das bis zu Zehnfache. Durch einen Feedback-Mechanismus wiederum kompensieren die Hepatozyten dies mittels vermehrter Expressierung von LDL-Rezeptoren, sodass die LDL-C Konzentration im Blut um bis zu 25 % sinkt. Allerdings sind hierfür sehr hohe Dosierungen nötig, die mit belastenden unerwünschten Wirkungen, wie Obstipation und Steatorrhö einhergehen können (77).

Neue Ansätze zur Senkung des LDL-C sind aufgrund der Bedeutung für Patient*innen weltweit in ständiger Entwicklung. So gibt es, neben vielen Weiteren, Mipomersen als Antisense-Oligonukleotid zur Blockade der Messenger-RNA für Apolipoprotein-B-100. Eine neue vielversprechende Kandidatin ist die Bempedoinsäure als erste neue

Vertreterin ihrer Klasse. Nach Aktivierung in der Leber hemmt sie die ATP-Zitrat-Lyase und greift somit ebenso in die Cholesterinsynthese ein (58). Präparate, die entweder Bempedoinsäure als Monotherapie oder in Kombination mit Ezetimib beinhalten, wurden vor kurzem für Patient*innen mit primärer Hypercholesterinämie zugelassen (78). In einer aktuellen klinischen Studie konnte eine Dreifach-Kombination von Bempedoinsäure, Ezetimib und Atorvastatin die LDL-C-Werte von über 90 % der Patient*innen auf die empfohlenen Richtwerte reduzieren (79). In einer Phase 3-Studie bewirkte eine Kombinationstherapie mit Bempedoinsäure und Ezetimib ohne zusätzliche Statine bei Patient*innen mit Statin-Intoleranz eine signifikante Reduktion der LDL-C-Werte gegenüber Placebo (80). Eine weitere Phase-3-Studie demonstrierte die Wirksamkeit einer Bempedoinsäure-Ezetimib-Therapie bei Patient*innen, die bereits eine Statin-Therapie erhielten (81). Es konnte eine zusätzliche Senkung des LDL-C durch die Ergänzungstherapie erzielt werden. Die Kombination von Bempedoinsäure mit Ezetimib könnte somit insbesondere für solche Patient*innen relevant sein, die Statin-intolerant sind.

1.7. Darmmikrobiom

Der menschliche Körper ist besiedelt durch eine komplexe und dynamische Vielzahl an Archaeen, Viren, einzelligen Eukaryoten und einen überwiegenden Anteil an Bakterien (82, 83). Die Gesamtheit aller Mikroorganismen die einen Menschen besiedeln bezeichnet man als Mikrobiota sowie deren Genom als Mikrobiom. Je nach Besiedlungsort bilden die Organismen beispielsweise das pulmonale, nasale oder vaginale Mikrobiom. Unter diesen beherbergt das Darmmikrobiom mit über hundert Trillionen Zellen die meisten Vertreter, welche durch ihre jeweilige Zusammensetzung einen entscheidenden Beitrag zur Funktionalität des Darmtraktes leisten (83). Daher haben insbesondere Verschiebungen in der Zusammensetzung der Mikroorganismen und deren Verhältnisse immense Auswirkungen auf Funktionen des ganzen Körpers. So spielt das Darmmikrobiom eine entscheidende Rolle bei der Fermentation von schwer verdaulichen Nahrungsbestandteilen, der Synthese bestimmter Vitamine und der Regulation der Darmbarriere. Dabei stimulieren sie das Immunsystem und sind an der Aktivierung von T- und B-Lymphozyten beteiligt. (84)

Verschiebungen im Darmmikrobiom führen zu Dysbiosen und daher zu Störungen dieses Synergismus. Bei Störungen von diesem kommt es zur Schädigung der Darmbarriere, was es anderen Mikroorganismen ermöglicht, sich in dieser Nische vermehrt anzusiedeln (85). Die Ernährung der Patient*innen ist ausschlaggebend für das Ausmaß und die Vielfalt der Mikroorganismen im Darm. Ändert sich diese, verschieben sich die Anteile der Mikroorganismen. Dasselbe Prinzip ist auch auf eine Beeinflussung durch Arzneimittel anzuwenden. Wobei zu beachten ist, dass diese Alterationen ebenso Auswirkungen auf die Arzneimittelwirkung selbst haben können (86).

Diese komplexen Beziehungen stellen ein noch junges, sich rapide entwickelndes Forschungsgebiet in der Medizin dar, wobei noch viele Zusammenhänge geklärt werden müssen. Bisherige Ergebnisse zeigen unter anderem Verbindungen zwischen dem Darmmikrobiom und neuroinflammatorischen, neurodegenerativen, metabolischen und gastrointestinalen Erkrankungen (87–90). Im Speziellen untermauern diverse Studien die Beeinflussung der Atherosklerose durch das Darmmikrobiom (91, 92). So nimmt es mittels der Metabolite sowohl direkt als auch indirekt Einfluss auf den Energiehaushalt, die hormonelle Steuerung und die Nahrungszufuhr. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei die kurzkettigen Fettsäuren (SCFA), die nach Synthese über das Darmepithel resorbiert werden können. Die genauen Mechanismen und zugrundeliegenden Mikroorganismen beziehungsweise deren Metabolite werden bis heute noch nicht vollständig verstanden. Unverdaute Nahrungsbestandteile wie Stärke, Ballaststoffe und komplexe Polysaccharide werden zu SCFA fermentiert. Neben Acetat und Butyrat entsteht hierbei auch Propionat.

Diese SCFA dienen sowohl als Energielieferanten als auch als Signalmoleküle für den menschlichen Körper. (84)

1.8. Aktueller Forschungsstand zu Propionat

Eine der Hauptvertreterinnen der SCFA ist die Propionsäure bzw. deren Salz Propionat. Die Propionsäure ist eine niedere Monokarbonsäure mit 3 Kohlenstoff-Atomen. Sie wird vorwiegend im Kolon von bestimmten Bakterien-Phyla beim Abbau unverdauter Kohlenhydrate fermentiert (84). Kalziumpropionat ist in der Europäischen Union bereits

als Lebensmittelzusatzstoff unter Nummer E 282 zugelassen und wird bislang zur Konservierung von Backwaren eingesetzt (93).

Versuche mit gnotobiotischen Mäusen belegen die Synthese des Propionats durch Mikrobiota, und ferner die Inhibierung der Histon-Deacetylasen vermittelte Hochregulierung der regulatorischen T-Zell (Treg) -Bildung durch das Propionat (94). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Fettsäuren in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge die T-Zell-Differenzierung beeinflussen. Unter Gabe von Fettsäuren mit mittlerer bis höherer Kettenlänge in Mausmodellen differenzierten sich die T-Zellen vorwiegend zu proinflammatorischen Th1- und Th17-Zellen. Wohingegen unter Propionat-Gabe vermehrt immunregulierende Treg im Dünndarm zu finden waren (95). Weiter wurde festgestellt, dass Multiple-Sklerose-Patient*innen erniedrigte Propionat-Konzentrationen im Serum aufweisen. Nach zweiwöchiger Propionat-Gabe konnte sowohl ein Anstieg an peripheren Treg als auch eine Senkung der peripheren Th17-Zellen festgestellt werden (96). Al-Lahham et al. testeten die Wirkung von Propionsäure auf das Fettgewebe adipöser Personen anhand von Fettgewebeexplantaten, die für 24 Stunden mit Propionsäure inkubiert wurden (97). Zudem wurden in der Monozyten-Zelllinie THP-1 nach Differenzierung dieser Zellen zu Makrophagen die Auswirkungen einer Propionsäurebehandlung auf Immunzellen analysiert. Die Behandlung von Fettgewebeexplantaten mit Propionsäure führte zu einer signifikanten Herunterregulierung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, während Gene, die an anabolen Stoffwechselwegen beteiligt sind, hochreguliert wurden. Im Zellkulturmodell zeigte sich eine ähnliche verminderte Expression proinflammatorischer Proteine.

Des Weiteren weist die Propionsäure metabolische Effekte auf. So werden ebenfalls im Mausmodell positive Effekte auf den Fett- und Zuckerstoffwechsel beschrieben. Durch Aktivierung des „Free fatty acid receptor“ 2 und 3 vermittelt kommt es vermehrt zur Ausschüttung von Glucagon-like-peptide 1 und Peptid YY, die eine appetitzügelnde Wirkung haben (98). Auch in der Humanstudie konnte dies bestätigt werden. Weiterhin konnte bei Langzeitgabe eine Reduktion des abdominalen Fettgewebes und der Fettablagerungen in der Leber verzeichnet werden (11). Demgegenüber stehen Ergebnisse einer weiteren kleinen klinischen Studie, die auf die Möglichkeit hindeuten, dass Propionat postprandial zu Hyperglykämien führt (99). Es wurde postuliert, dass

Propionat die vermehrte Ausschüttung von Noradrenalin fördert. Folgend steigen auch die Konzentration an Glukagon und Fettssäure-bindendes-Protein 4, was in einer Hyperinsulinämie resultieren kann. Unter Dauertherapie könnte sich hierdurch eine relative Insulinresistenz entwickeln (99).

Weitere Versuche in Mausmodellen zeigen Linderungen in Bezug auf Hypertonie, Hypertrophie und atherosklerotischen Läsionen durch Modulation der T-Zelldifferenzierung. Diese untermauern die Bedeutung der Treg für den Wirkmechanismus des Propionats (100).

Propionat aktiviert den im Kolon, der Leber, der Skelettmuskulatur und auf Adipozyten exprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPR) 41. Dies weist auf einen Einfluss in den Energiehaushalt des Körpers hin (85). Die Differenzierung von 3T3-L1-Adipozyten und C2C12-Muskelzellen zeigte eine erhöhte Expression von GPR41 sowohl auf der mRNA- und Protein-Ebene (101). Die Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme in die 3T3-L1-Zellen wurde durch Propionsäure erhöht, während dies für solche Zellen, in denen GPR41 durch siRNA herunterreguliert war, nicht der Fall war. In C2C12-Zellen wurde nur die basale, nicht aber die Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme durch Propionsäure erhöht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GPR41 die durch Propionsäure erhöhte Aufnahme von Glukose in Adipozyten vermittelt.

Zusammenfassend weisen sowohl Tierversuchsstudien als auch Studien an humanen Zellen und Geweben darauf hin, dass Propionsäure sowohl in den Lipid- als auch den Glukosestoffwechsel eingreift und die Differenzierung und Funktion (z.B. die Zytokin- und Chemokin-Expression) von Immunzellen modulieren kann.

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Aus der Bedeutung der Hyperlipidämie als Ursache der Atherosklerose lässt sich daher die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ableiten. Es besteht Bedarf an zusätzlichen und alternativen Therapien zu den etablierten Wirkstoffklassen wie den Statinen, insbesondere in der primären Langzeitprävention bei Patient*innen, die zwar eine nicht-familiäre Hypercholesterinämie haben aber ansonsten ein geringes kardiovaskuläres Risiko, sodass die Bereitschaft einer medikamentösen Therapie in der Regel bei diesen Patient*innen gering ist. Hierbei birgt insbesondere der Darmmetabolit Propionat großes Potential. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde eine doppelblinde, prospektive, randomisierte und Placebo-kontrollierte klinische Studie durchgeführt. Die Studie prüfte den potenziellen Einfluss der Supplementierung mit der kurzkettigen Fettsäure Propionat auf die Gesamt- und LDL-C-Konzentration.

Dabei wurden insbesondere folgende Fragestellungen untersucht:

1. Führt eine tägliche Gabe von 1.000 mg Propionat im Vergleich zu Placebo zu einer signifikanten Senkung der LDL-C-Konzentration im Blut?
2. Wie sicher und effektiv ist eine solche Verabreichung von Propionat?
3. Welche immunologischen Auswirkungen hat die Gabe von Propionat auf die Leukozyten, und inwiefern sind regulatorische T-Zellen an diesen Auswirkungen beteiligt?
4. Hat die Supplementierung von Propionat einen Einfluss auf Thrombozytenaggregation?

2. Materialien

2.1. Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Firma (Sitz)
Durchflusszytometer Attune NxT	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Gefriergerät -80 °C MDF-U72	Sanyo (Osaka, Japan)
Gefriergerät -20 °C	Bosch (Gerlingen, Deutschland)
Kühlgerät +4 °C	Bosch (Gerlingen, Deutschland)
Multiplate Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Ultraschall Philips iU22	Philips (Amsterdam, Niederlande)
Vitalparameter-Monitor SureSigns VS2+	Philips (Amsterdam, Niederlande)
Personenwaage MPS	KERN & SOHN GmbH (Balingen, Deutschland)
Vortexer MS2 Reagenzglasschüttler	IKA Works INC (Wilmington, North Carolina, USA)
Kühlzentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

2.2. Software

Tabelle 2: Software

Software	Firma (Sitz)
Kaluza 2.1	Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA)
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corp. (Redmond, Washington, USA)
Microsoft Word 2019	Microsoft Corp. (Redmond, Washington, USA)
GraphPad PRISM 8.4.2	GraphPad Software (San Diego, Kalifornien, USA)
Statistical Software R 3.6.17	GNU GPL (General Public License)
REDCap 9.5.25	Vanderbilt University (Nashville, Tennessee, USA)

2.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma (Sitz)
Durchflusszytometrie-Röhrchen 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
VACUETTE™ Blutentnahme-Set 21G	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
VACUETTE™ HOLDEX Einweghalter	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Steriler Wundverband 5 x 7,2 cm	Fink & Walter GmbH (Merchweiler, Deutschland)
EDTA-Blutentnahmeröhrchen 6 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
EDTA-Blutentnahmeröhrchen 3 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Serum-Blutentnahmeröhrchen 9 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Heparin-Blutentnahmeröhrchen 2,5 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Citrat-Blutentnahmeröhrchen 3,5 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Fluorid-Blutentnahmeröhrchen 2 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Hirudin-Blutentnahmeröhrchen 3 ml	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
BD™ Vacutainer CPT Ficoll Blutentnahmeröhrchen	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Multiplate-Testzellen	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Kryogefäße 1,8 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Falcon™ Röhrchen	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)

Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
-----------------	--

2.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

Marker (Clone)	Label	Host/Isotyp	Firma (Sitz)
CD161 (DX12)	PE	Mouse C3H	BD (Franklin Lakes, USA)
CD183 (1C6/CXCR3)	APC	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD (Franklin Lakes, USA)
CD196/CCR6 (11A9)	PerCP- Cy5.5	Mouse IgG1, κ	BD (Franklin Lakes, USA)
CD4 (RPA-T4)	FITC	Mouse IgG1, κ	BD (Franklin Lakes, USA)
CD25 (BC96)	APC	Mouse IgG1, κ	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
CD4 (OKT4)	FITC	Mouse IgG2b, κ	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
FOXP3 (236A/E7)	PE	Mouse IgG1, κ	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
CD45 (HI30)	AF700	Mouse IgG1, κ	Biolegend (San Diego, USA)
CD11b (ICRF44)	PB	Mouse IgG1, κ	Biolegend (San Diego, USA)
CD62L (DREG-56)	PE/Cy7	Mouse IgG1, κ	Biolegend (San Diego, USA)
CD16 (3G8)	APC	Mouse IgG1, κ	Biolegend (San Diego, USA)
CD182/CXCR2 (5E8/CXCR2)	AF488	Mouse IgG1, κ	Biolegend (San Diego, USA)
CD184/CXCR4 (12G5)	PE	Mouse IgG2a, κ	Biolegend (San Diego, USA)
CD16 (3G8)	APC	Mouse IgG1, κ	Biolegend (San Diego, USA)
CD14 (HCD14)	FITC	Mouse IgG1, κ	Biolegend (San Diego, USA)
HLA-DR (L243)	PB	Mouse IgG2a, κ	Biolegend (San Diego, USA)

2.5 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Firma (Sitz)
BD FACS™ Lyselösung	BD (Franklin Lakes, USA)
eBioscience™ Flow Cytometry Färbepuffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
eBioscience™ Permeabilisierungspuffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
eBioscience™ Puffersatz für intrazelluläre Fixierung und Permeabilisierung	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
eBioscience™ UltraComp eBeads	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Isotone Kochsalzlösung Miniplasco connect	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
ADPtest Reagenz	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Prostaglandin E1 Reagenz	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
TRAPtest Reagenz	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)

3. Methoden

3.1. Aufbau der klinischen Studie

Es wurde eine prospektive, randomisierte, Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie der Phase 2b durchgeführt. Die Studie wurde am 18. Juli 2018 im Verzeichnis klinischer Studien der National Institutes of Health (clinicaltrials.gov) unter der Identifikationsnummer NCT03590496 registriert.

Die aktuell geltenden Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten und durch ein Votum der Datenschutzbeauftragten der Charité Universitätsmedizin Berlin am 25. Oktober 2017 (Votum: 507/17/ST3) genehmigt. Ebenso erteilte die zuständige Ethikkommission der Charité am 22. August 2017 (Votum: EA4/134/17) für die PROPER-LDL Studie ihre Genehmigung.

Die Visiten wurden in der Klinik für Kardiologie an der Charité - Campus Benjamin Franklin (CBF) durchgeführt. Die Daten wurden mittels Erhebungsbögen (Case Report Files) sowohl händisch auf Papier (CRF) als auch digital (eCRF) dokumentiert. Zur digitalen Speicherung und sicheren Übertragung der Daten wurde das Programm REDCap verwendet. Blutproben für die Routine-Labordiagnostik wurden zur Analyse an die Labor Berlin GmbH gesendet, welche nach DIN EN ISO 15189 akkreditiert ist. Die Analysen mittels Durchflusszytometrie und Aggregometrie wurden im CBF in den Laboren der Kardiologie durchgeführt, ebenso wie die entsprechende Asservierung der Blutproben.

Die Rekrutierung und Behandlung der Patient*innen erfolgte von April 2018 bis Juni 2019. Während des Studienzeitraumes von acht Wochen erhielten die Patient*innen der Verum-Gruppe täglich zweimal 500 mg Propionat in magensaftresistenten Kapseln. Die Patient*innen der Placebo-Gruppe erhielten zweimal täglich eine Kapsel mit den pharmakologisch nicht aktiven Hilfsstoffen Magnesiumstearat (Ligamed MF-2V), pyrogene Kieselsäure (HDK® N 20 Wacker Pharma) und Trikalziumphosphat (Tri-Cafos 200-7).

Die Herstellung, Verpackung, Beschriftung und Verblindung der Prüfpräparate erfolgte, ebenso wie die Erstellung der Randomisierungsliste, durch einen pharmazeutischen Lohnhersteller mit der Herstellungserlaubnis nach §13 AMG. Für die Randomisierung der

Patient*innen wurde jeweils ein individueller Identifikationscode (C01 - C62) vergeben. Über den gesamten Zeitraum bis zur statistischen Auswertung der Studie wurde die Verblindung der Patienten*innen und des Studienpersonals zu jedem Zeitpunkt gewahrt.

3.2. Rekrutierung und Eigenschaften der Patient*innen -Gruppen

Es wurden insgesamt 62 Patient*innen in die Studie eingeschlossen. Die Rekrutierung erfolgte aus dem Patient*innen-Pool der kardiologischen Stationen, der Ambulanz sowie durch Anwerbung mittels Flyer, Anzeigen im Intranet der Charité und im öffentlichen Nahverkehr der Stadt Berlin.

Die Eignungsüberprüfung für die PROPER-LDL Studie erfolgte mithilfe der Systematic Coronary Risk Estimation (SCORE) der European Society of Cardiology (ESC) (27). Hierbei wurden Alter, systolischer Blutdruck, Gesamt-Cholesterin sowie der Raucherstatus gewichtet. Ein niedriges kardiovaskuläres Risiko entspricht einem SCORE von bis zu 1 %, dieser galt als Einschlusskriterium für die Studie. Außerdem wurde eine LDL-Cholesterin-Konzentration von über 115 mg/dl zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie als Einschlusskriterium definiert. Das Alter der Patient*innen wurde auf eine Altersspanne von 20 bis 70 Jahren begrenzt. Für die Aufnahme in die Studie mussten die Patient*innen voll geschäftsfähig sein, um ihre Einwilligung zur Studie schriftlich erklären zu können.

Die Patient*innen wurden zudem anhand definierter Ausschlusskriterien für die Studie geprüft, um eine ethisch und medizinisch vertretbare Teilnahme der Patient*innen gewährleisten zu können sowie die Beeinflussung der Ergebnisse durch externe Faktoren zu limitieren. Medizinisch nicht vertretbar war der Einschluss von Risiko-Patient*innen mit einem akutem Koronarsyndrom (ACS) innerhalb der letzten vier Wochen oder chronisch-systematischer Herzinsuffizienz (NYHA-Grade II - IV). Ebenso wurden aufgrund etwaiger Akkumulationseffekte Patient*innen mit chronischer Niereninsuffizienz und einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter 45 ml/min sowie mit chronischen Erkrankungen der Leber ausgeschlossen, da diese die Wirkung der Testsubstanz sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können.

Aus demselben Grund wurden Patient*innen mit hämatologischen Erkrankungen und schweren Erkrankungen anderer Organsysteme (Tumore, Infektionen) ausgeschlossen.

Aus ethischen Gründen wurden keine Schwangeren in die Studie aufgenommen und der Status regelmäßig während der Studie abgefragt. Die gleichzeitige Teilnahme an anderen klinischen Studien war ebenfalls ein Ausschlusskriterium.

Des Weiteren durften die Patient*innen aktuell keine cholesterinsenkende Medikation einnehmen, beziehungsweise mussten sie diese bei Statin-Unverträglichkeit seit mindestens acht Wochen abgesetzt haben.

3.3. Ablauf der klinischen Studie

Die Patient*innen wurden nach dem Einschluss in die Studie über einen Zeitraum von acht Wochen behandelt, wobei sowohl nach einer Woche eine telefonische Zwischenabfrage erfolgte als auch nach vier, beziehungsweise acht Wochen die Zwischen- und Abschlussvisiten folgten. Wie in Tabelle 6 aufgeführt, wurden zu den jeweiligen Terminen diverse Parameter bestimmt und dokumentiert. Die Proband*innen wurden zu festen Terminen entsprechend des Protokolls einbestellt.

Tabelle 6: Studienablauf

Abfrage/ Untersuchung	Visite 1 (Einschluss)	Telefonische Zwischenabfrage	Visite 2	Visite 3 (Abschluss)
Zeitpunkt in Tagen (± 2)	0	7	28	56
Demografie	X			
Medizinische Vorgeschichte	X			
Schwangerschaft	X		X	X
Stuhlgang	X		X	X
Echokardiografie	X			
Körperliche Untersuchung	X			
Vitalzeichen	X		X	X
Blutuntersuchung	X		X	X
Stuhlprobe	X			X

Begleitmedikation	X		X	X
Unerwünschte Ereignisse		X	X	X
Ein- und Ausschlusskriterien	X			
Dispensierung der Medikation	X		X	
Rückgabe der Medikation			X	X
Thrombozytenaggregationsdiagnostik	X		X	X
Durchflusszytometrische Analyse	X			X

Während jeder Visite wurden die Patient*innen auf einer geeichten Stationswaage gewogen und der Blutdruck und Puls mittels Oberarmmessung doppelt im Abstand von zwei Minuten überprüft. Anschließend wurde der aktuelle Zustand abgefragt, sowie gegebenenfalls Stuhlproben entgegengenommen und bei -80 °C gesichert. Die Ausgabe der Studienmedikation erfolgte mit dem Hinweis auf die magensaftresistente Formulierung der Kapsel, um ein Öffnen der Kapsel durch die Patient*innen zu verhindern. Die alte Studienmedikation wurde zurückgenommen und ein „Drug-Count“ durchgeführt, um die Compliance der Patient*innen zu monitoren.

Für die folgende Blutentnahme mussten die Patient*innen seit mindestens acht Stunden nüchtern sein und ebenso auf koffein- oder nikotinhaltige Genussmittel verzichtet haben. Die venöse Blutentnahme im Sitzen oder Liegen erfolgte in der Regel aus den Venen der Ellenbeuge. Hierbei wurde jeweils Serum, EDTA-Blut, Citrat-Blut, Hirudin-Blut, Lithium-Heparin-Blut sowie Fluorid-Blut in entsprechenden Röhrchen gesammelt. Abschließend wurden etwaige offene Fragen im Gespräch mit den Patient*innen erörtert.

Für Standardanalysen wurde das entsprechende Material an die Labor Berlin GmbH gesendet. Das Material für die experimentellen Untersuchungen (Durchflusszytometrie und Aggregometrie) wurde entsprechend der Protokolle verarbeitet. Ebenso wurden für

spätere Analysen diverse Aliquote nach klimatisierter Zentrifugation für zehn Minuten bei 1.500 rpm bei -80 °C gesichert.

3.4. Durchflusszytometrische Bestimmung

Für die immunologische Analyse der Proben erfolgte eine antikörpermarkierte Messung per Attune NxT Durchflusszytometer. Hierfür wurde das gevortexte EDTA-Vollblut direkt nach der Blutentnahme für die Antikörper-Färbung verwendet. Dabei wurden etwa eine Million Zellen pro Färbung kalkuliert. Während der gesamten Prozedur erfolgten alle Inkubationen unter Ausschluss von Licht.

3.4.1. Markierung von Th1/17-Zellen und Monozyten

Auf den Boden des FACS-Röhrchens wurden 5 µL der entsprechenden Fluorochrom-markierten Antikörper für die jeweilige Zellfärbung vorgelegt.

Für die Th1- und Th17-Zellen wurden Antikörper gegen CD4 (FITC; RPA-T4), CD161 (PE, DX12), CCR6 (PerCP-Cy5.5, 11A9) und CD183 (APC, 1C6/CXCR3) verwendet, für die Monozyten Antikörper gegen CD16 (APC), CD14 (FITC) und HLA-DR (PB). Nach Zugabe von 100 µL EDTA-Vollblut erfolgte die Homogenisierung mittels Vortexer. Um die Antikörper-Bindung zu gewährleisten, wurden die Proben für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Erythrozyten-Lyse für sieben Minuten unter Zugabe von 2 ml BD FACS™ Lysing Solution. Das Röhrchen wurde erneut gevortext, um eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Suspension zu gewährleisten. Die Phase mit den lysierten Erythrozyten wurde durch Zentrifugation bei 500 g und 4 °C separiert und dekantiert. Von diesem Zeitpunkt an wurde mit den Proben auf Eis gearbeitet, um eine ausreichende Temperierung und damit Stabilität der Antikörper-Antigen-Fluorochrom-Bindung zu gewährleisten. Die Probe wurde zweimal mit 2 ml eBioscience™ Flow Cytometry Färbepuffer gewaschen und durch Zentrifugation unter gleichen Bedingungen aufgereinigt, wobei die Pellets am Grund des Röhrchens vor dem Waschen mit einer Pipette resuspendiert wurden. Abschließend wurde das Pellet mit 500 µL Flow Cytometry Färbepuffer resuspendiert und vor der Messung gevortext.

3.4.2. Markierung der regulatorischen T-Zellen

Auf den Boden des FACS-Röhrchens wurden jeweils 5 µL der Fluorochrom-markierten Antikörper gegen CD4 (FITC, OKT-4) und CD25 (APC, BC96) vorgelegt.

Nach Zugabe von 100 µL EDTA-Vollblut erfolgte die Homogenisierung mittels Vortexer. Die Proben wurden im Dunkeln und bei Raumtemperatur 20 Minuten lang inkubiert, um die Antikörper-Bindung zu gewährleisten. Die Erythrozyten wurden durch Zugabe von 2 ml BD FACS™ Lysing Solution für sieben Minuten lysiert. Das Röhrchen wurde gevortext, um eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Suspension zu gewährleisten. Die Phase mit den lysierten Erythrozyten wurde durch Zentrifugation bei 500 g und 4 °C separiert und dekantiert. Um eine ausreichende Kühlung und Stabilität der Antikörper-Antigen-Fluorochrom-Bindung zu gewährleisten, wurde auch hier ab diesem Zeitpunkt mit den Proben auf Eis gearbeitet. Zur intrazellulären Färbung der regulatorischen T-Zellen, wurden die Zellen mittels vernetzter Proteine fixiert und die Zellmembran permeabilisiert. Dieser Prozess wird durch eine dreißigminütige Inkubation mit eBioscience™ Puffersatz für intrazelluläre Fixierung und Permeabilisierung gewährleistet. Dem Waschen und Zentrifugieren mit eBioscience™ Permeabilisierungspuffer schloss sich der Anfärbeschritt mit 5 µL anti-FoxP3-Antikörper im Permeabilisierungspuffer an. Die Inkubationszeit betrug mindestens eine Stunde. Anschließend wurde die Probe zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, zentrifugiert und dekantiert. Abschließend folgte die Resuspension des Pellets in 500 µL Flow Cytometry Staining Buffer. Vor der Messung wurden die Proben gevortext.

3.4.3. Messung und Auswertung der Daten

Während der Lagerung und Messung wurden die Proben vor Licht geschützt und gekühlt. Die Messungen mit vier Lasern und 14 möglichen Farben erfolgten mit dem Attune NxT (Thermo Fisher). Hierbei wurden alle Ereignisse in 200 µL Probe bei einer Geschwindigkeit von 100 µL/min detektiert. Für die Kompensation der einzelnen Färbungen wurden Kompensationsbeads genutzt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms Kaluza in der Version 2.1 (Beckman Coulter).

Für die prozentuale Auswertung der regulatorischen T-Zellen wurden die Lymphozyten durch ein erstes Gate eingegrenzt. Danach wurden die Foxp3- und CD25-positiven Zellen

der CD4-positiven Population dargestellt. Die Gating-Strategie der regulatorischen T-Zellen ist in Abb. 3 dargestellt.

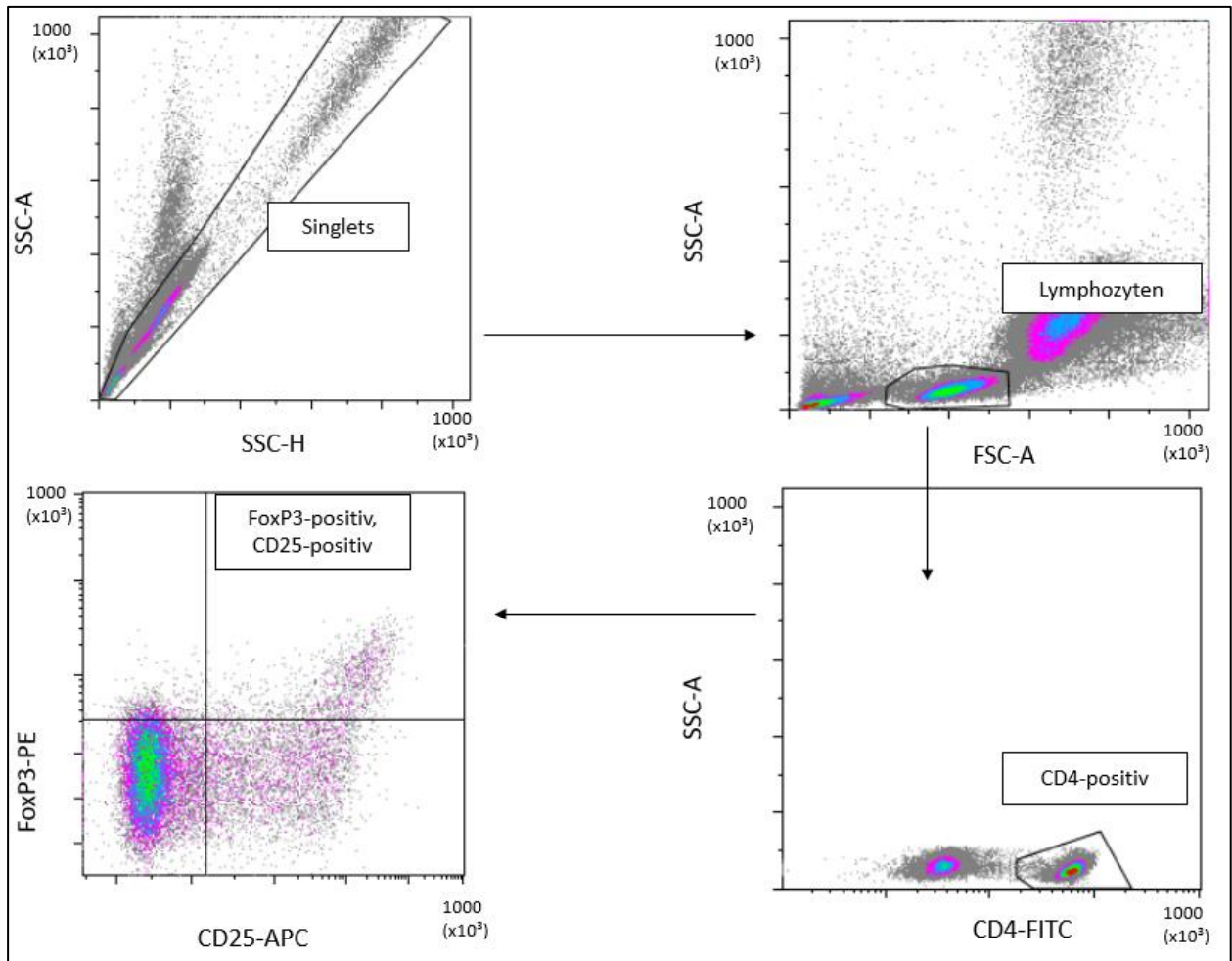


Abbildung 3: Gating-Strategie der regulatorische T-Zellen

Die weiteren T-Zellen wurden ebenfalls mittels CD4-positiven Zellen der Lymphozyten gefiltert, um dann die CD161-positiven Zellen nach Th1- und Th17-Zellen mittels CD183-Marker zu differenzieren (Abb. 4)

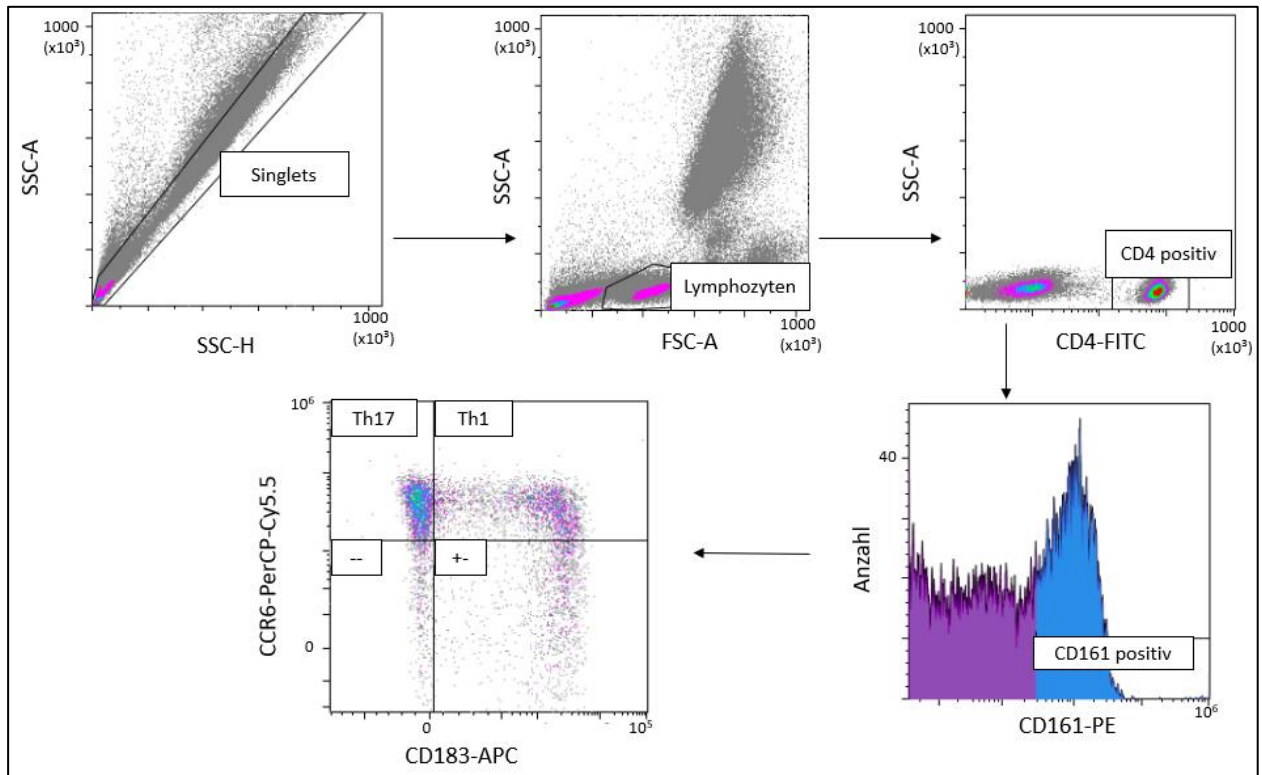


Abbildung 4: Gating-Strategie für Th1- und Th17-Zellen

Die HLA-positiven Subpopulationen der Monozyten wurden durch CD16 und CD14 in die drei Unterklassen non-classical, intermediate und classical unterschieden (Abb. 5).

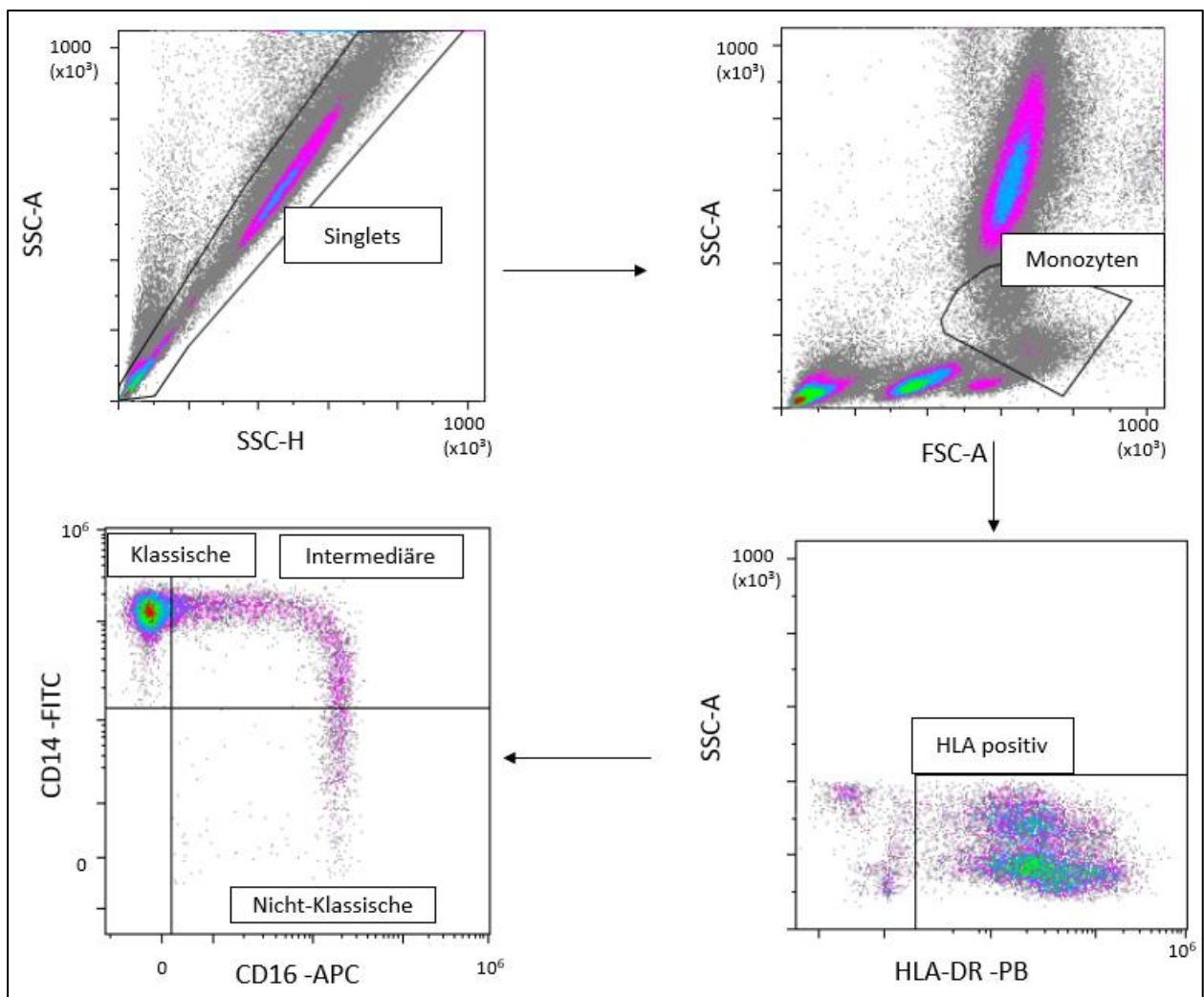


Abbildung 5: Gating-Strategie für Monozyten

3.5. Thrombozytenaggregationsdiagnostik

Zur Ermittlung des Einflusses von Propionat auf die Thrombozytenfunktion wurde das Verfahren der Impedanzaggregometrie aus Vollblut angewandt. Diese Messung erlaubt anhand steigender elektrischer Widerstände Rückschlüsse auf die Blutgerinnung (102). Als Analysengerät diente das Multiplate-System von Roche Diagnostics. Um eine Aktivierung der Thrombozyten-Gerinnung nach Blutentnahme zu verhindern, wurden Entnahmeröhrchen mit Hirudinzusatz verwendet und darauf geachtet, die Scherkräfte möglichst gering zu halten.

3.5.1. Impedanzaggregometrie mittels Multiplate-Systems

300 µL Hirudin-Vollblut und 300 µL 0,9%ige Kochsalzlösung wurden in eine Einweg-Testzelle mit zwei Elektroden vorgelegt, deren Sensoren aus silberbeschichtetem Kupfer bestanden. Die Homogenisierung der Substrate wurde durch einen integrierten Magnetrührer gewährleistet. Auf der metallischen Oberfläche lagern sich hierbei Proteine, wie zum Beispiel Fibrinogen, an. Es folgte eine dreiminütige Inkubationszeit, nach der die entsprechenden Thrombozytenaktivatoren hinzugegeben wurden. Ab diesem Zeitpunkt erfolgt die Aufzeichnung der Thrombozytenaggregation an den Elektroden durch Messung der Impedanz, also dem Wechselstromwiderstand.

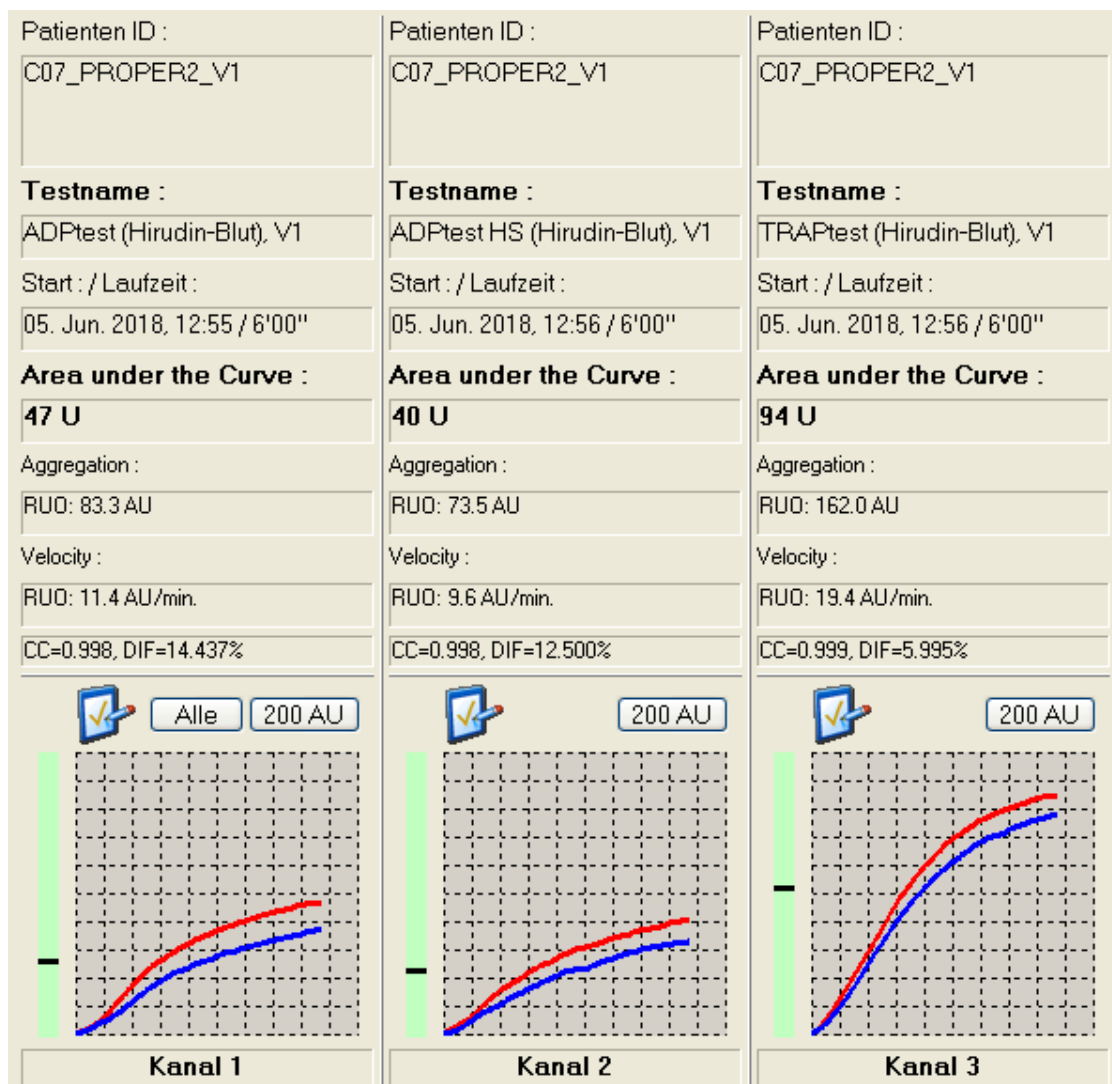


Abbildung 6: Beispiel der Impedanzmessung mittels Multiplate-System

Durch Zugabe der Reagenzien werden die athrombogenen Thrombozyten stimuliert und die Rezeptoren Gp IIb/IIIa rekrutiert. Mithilfe dieser Rezeptoren haften die Thrombozyten an der Sensorenoberfläche an und sorgen hierdurch für einen zunehmenden Widerstand zur angelegten Wechsellspannung. Dieser wird parallel für beide Sensoren aufgezeichnet und als „Area Under the Curve“ (AUC) ausgegeben (Abb. 6)

Die AUC ist hierbei sowohl von den Faktoren der Geschwindigkeit als auch der maximal erreichten Aggregation abhängig. Je höher die Impedanz ist, desto stärker ist die Anlagerung der aktivierten Thrombozyten an die Sensorenoberfläche proportional zur Gerinnung (103, 104).

3.5.2. Spezielle Testverfahren

In einem speziellen Testverfahren wurde als Reagenz Adenosindiphosphat zugegeben, das die Thrombozyten über die ADP-Rezeptoren P2Y₁₂ und P2Y₁ aktiviert. In einem zweiten Verfahren wurde zusätzlich der physiologische Inhibitor dieses Reaktionsweges Prostaglandin E₁ hinzugegeben, um die Sensitivität zu erhöhen. Dies ermöglicht die Detektion schwächerer antagonistischer Effekte auf den ADP-Rezeptor. Im dritten Testverfahren wurde das Thrombin Receptor Activating Peptide-6 (TRAP) verwendet, welches an den Thrombin-Rezeptor bindet und zu einer potenten Aktivierung und damit Rekrutierung des Gp IIb/IIIa führt.

3.6. Statistik

Die geschätzte durchschnittliche Senkung des LDL-Cholesterins über 8 Wochen basiert auf einer früheren Pilotstudie mit 22 Patient*innen, bei der eine Senkung von 16,9 mg/dl bei Patient*innen beobachtet wurde, die zweimal täglich mit 500 mg/dl Propionat behandelt wurden (96). Um in einem zweiseitigen t-Test mit einem Typ-I-Fehlerniveau von 0,05 und einer Power von 80% eine mittlere Reduktion von mindestens 15 mg/dl nachzuweisen, werden 28 Patient*innen pro Gruppe benötigt. Unter der Annahme einer Drop-out-Rate von 10 % wurde eine Stichprobengröße von 62 Patient*innen geschätzt. Alle Patient*innen, die randomisiert wurden und entweder zur zweiten oder dritten Visite erschienen, wurden in die statistische Auswertung mit einbezogen.

Als primärer Endpunkt wurde die Änderung des LDL-C im Blut definiert. Alle primären und sekundären Endpunkte wurden durch Subtraktion der Messwerte von Visite 1 von der Visite 3 berechnet.

Fehlende Werte wurden für jede Visite multipel imputiert, mithilfe des R-Pakets mice (105). Dabei basierte die Imputation auf den jeweiligen Werten des Endpunktes bei den Visiten, der Gruppenzugehörigkeit, sowie den demografischen Charakteristiken Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, Diabetes-Status und Raucher-Status. Des Weiteren wurden die Therapietreue sowie die weiteren Endpunkte des*der jeweiligen Patient*in in die Berechnung mit einbezogen. Um die Hypothese der Wirksamkeit der täglichen Einnahme von 1000 mg Propionat über einen Zeitraum von acht Wochen auf den primären Endpunkt der Senkung des LDL-C zu untersuchen, wurde eine messwiederholte Kovarianzanalyse (ANCOVA) berechnet. Als unabhängige Variable wurde die Gruppenzugehörigkeit (Propionat, Placebo) gewählt, welche an ihren jeweiligen Ausgangswerten bei Visite 1 adjustiert wurde. Als Indikator für die Wirksamkeit von Propionat wurden hierbei die jeweiligen Messwerte von Visite 3 abzüglich des Messwertes der Visite 1 gewählt. Als Kriterium der Signifikanz wurde für alle Analysen ein Signifikanzniveau von 5 % angenommen.

Außerdem basiert eine weitere Analyse auf dem Eliminierungsverfahren (Complete case vs. available case-Analyse), sodass lediglich Patient*innen berücksichtigt wurden, die sowohl bei Visite 1 und 3 erschienen sind. Als drittes erfolgte eine Analyse anhand einer multiplen Imputation getrennt für die beiden Gruppen. Diese zwei letztgenannten statistischen Analysen wurden lediglich beim primären Endpunkt der Studie durchgeführt und dienen als Sensitivitätsanalysen für dessen primäre Analyse.

Als Sicherheitsparameter wurden vorab unerwünschte Ereignisse (AE) sowie das Überschreiten der GOT- und GPT-Grenzwerte definiert. Um zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Gruppenzugehörigkeit (Placebo oder Propionat) und dem Auftreten von AE (ja oder nein) gibt, wurde eine binär logistische Regression berechnet. Die Grenzwerte liegen für die GPT bei ≤ 41 U/L bei Männern und ≤ 31 U/L bei Frauen, sowie für GOT ≤ 50 U/L bei Männern und ≤ 35 U/L bei Frauen. Weiterhin wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Gruppenzugehörigkeit (Placebo oder Propionat) und dem Überschreiten der Grenzwerte (ja oder nein) mittels binär logistischer Regression überprüft.

Die Dokumentation und Verwaltung der Daten erfolgte mithilfe des online basierten Datenmanagementsystems RedCap. Die statistische Analyse erfolgte ebenfalls verblindet und fand in Kooperation mit dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité Berlin statt. Für die Analyse der Daten und Generierung der Grafiken wurden die Softwareprogramme R (105, 106) und Microsoft Excel 2019 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Verteilung und Eigenschaften der Patient*innengruppen

Die Stichprobenumfangsplanung für den primären Endpunkt der LDL-C Senkung ergab einen Stichprobenumfang von 62 Proband*innen, um eine ausreichende Teststärke zu gewährleisten. Von den 79 Freiwilligen, die sich über den gesamten Zeitraum für die Studie meldeten, erwiesen sich nach Anwendung der Ein- und Ausschlusskriterien 17 als nicht geeignet oder lehnten nach Aufklärung eine Teilnahme an der Studie ab (siehe Abb. 7).

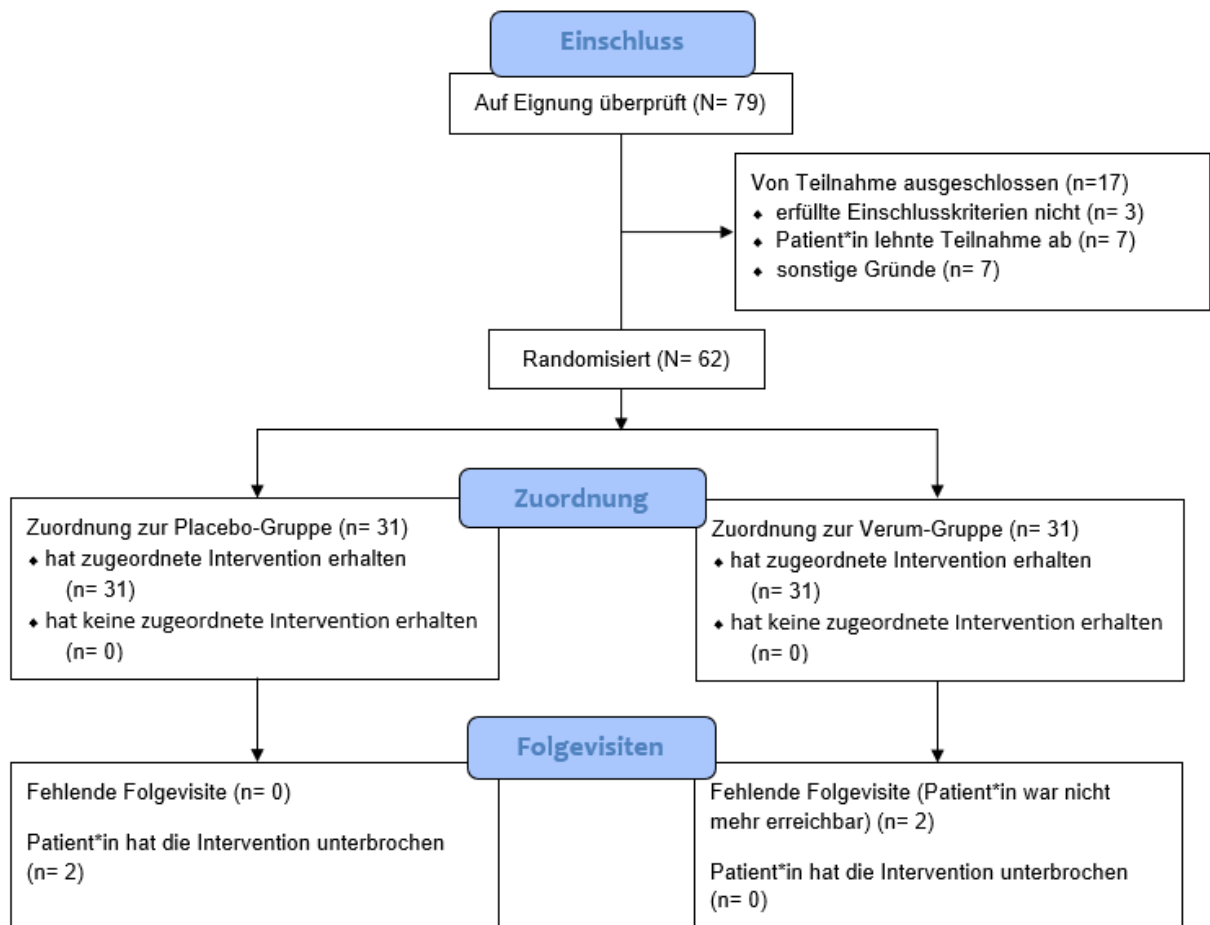


Abbildung 7: Auswahl, Zuordnung und Teilnahme an Folgevisiten des Proband*innen-Kollektivs

Die 31 jeweils randomisiert zugeordneten Proband*innen erhielten alle die gruppenzugehörige Intervention. Lediglich 6,45 % der Verum-Gruppe erschienen nicht zur Abschlussvisite, während dies ebenfalls auf 6,45 % der Placebo-Gruppe zutraf.

Die Verteilung der demografischen Faktoren stellt sich gleichermaßen in beiden Gruppen dar (Tabelle 7). Bei der Geschlechterverteilung zeigten sich Unterschiede mit 72,58 % weiblichen Probandinnen und 27,42 % männlichen Probanden. Größere Unterschiede fanden sich lediglich bei dem aktuellen Raucherstatus. Hier waren 54,8 % der Verum-Gruppe aktive Raucher*innen, während nur 38,71 % der Placebo-Gruppe dies angegeben haben.

Tabelle 7: Deskriptive Statistiken der Proband*innen-Gruppen Für die Variablen Geschlecht, Diabetiker*in und Raucher*in sind absolute Häufigkeiten angegeben. Für alle weiteren Parameter wurden der Median und der Interquartilsabstand (IQR) berechnet. Diese Daten wurden zum Zeitpunkt der ersten Visite innerhalb der Anamnese erhoben.

	Placebo-Gruppe	Verum-Gruppe	Gesamt
Geschlecht			
- weiblich	23	22	45
- männlich	8	9	17
Alter [a]	54	53	53,5
Median (IQR)	(43,5 - 59)	(39 - 58,5)	(42 - 59)
Körpergröße [cm]	167	172	170
Median (IQR)	(164 - 176)	(167,5 - 177,5)	(165 - 177)
Körpergewicht [kg]	74	78	75,2
Median (IQR)	(69,3 - 82,3)	(72 - 89,7)	(70 - 88,5)
Gesamtcholesterin	255	251	254,5
Baseline [mg/dl]	(230 - 289,5)	(221 - 273,5)	(225,2 - 286,8)
Median (IQR)			
LDL-Cholesterin	185,00	183	184
Baseline [mg/dl]	(155 - 205,5)	(155 - 203)	(155 - 204,8)
Median (IQR)			
Diabetiker*in	0	1	1

Raucher*in	12	17	29
------------	----	----	----

4.2. Primärer Endpunkt LDL Cholesterin

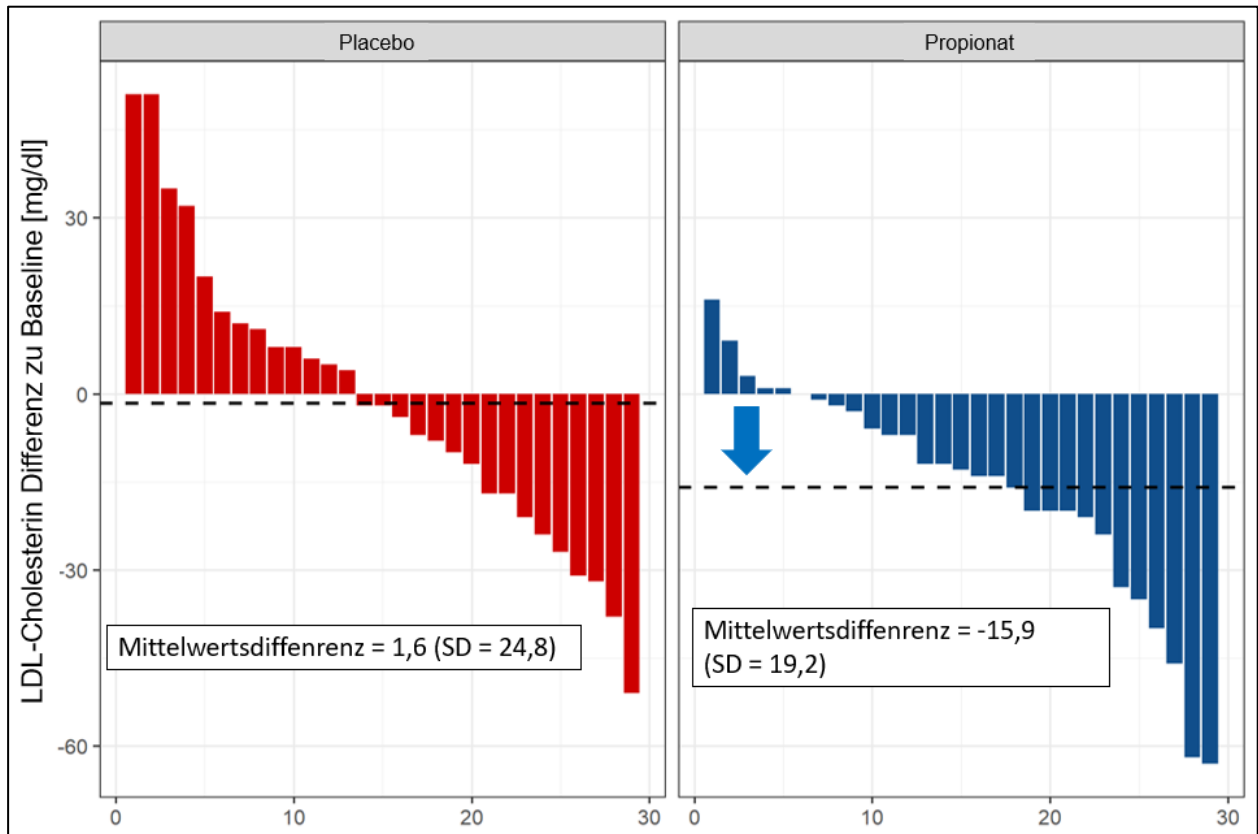


Abbildung 8: Wasserfalldiagramm der LDL-C Differenzen der Proband*innen von der ersten Visite zur dritten Visite. Hierfür wurden grafisch nur Fälle aufgetragen, die alle relevanten Erhebungszeitpunkte absolvierten, d. h. zu beiden Visiten präsent waren. Die eingezeichneten Mittelwerte der Differenzen (Mean Difference) wurden mittels multipler Imputation berechnet. (107)

Der Mittelwert der LDL-C Senkung (Abb. 8) im Blut betrug nach achtwöchiger Therapie in der Verum-Gruppe - 15,90 mg/dl (SD = 19,21), in der Placebo-Gruppe lediglich - 1,59 mg/dl (SD = 24,77). Die messwiederholte ANCOVA für Placebo und Propionat ergab unter Berücksichtigung der Baseline bei einem angenommenen Fehlerniveau von 0,5 einen signifikanten Unterschied des LDL-C für die Propionat-Gruppe gegenüber der Placebo-Gruppe von - 14,32 mg/dl ($p = 0,016$; 95 % CI = - 25,81; - 2,83) (Abb. 9). Dies

bedeutet, dass die achtwöchige Substitution mit täglich 1000 mg Propionat einen positiven Einfluss auf die LDL-C Konzentration gegenüber der Vergleichsgruppe ausübte.

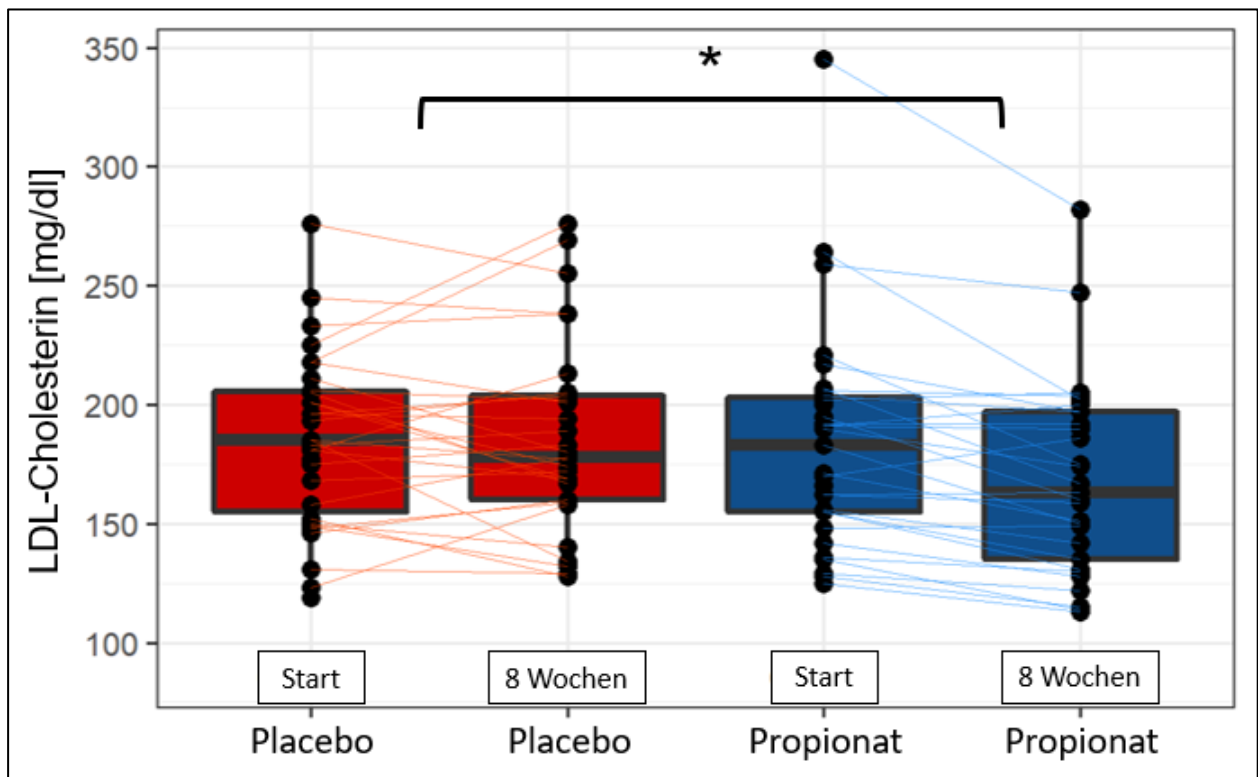


Abbildung 9: Unterschiede von LDL-C im Blut zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite, aufgetragen für die Proband*innen der Propionat- und Placebo-Gruppen. Dargestellt ist der Verlauf der Datenpunkte der einzelnen Proband*innen als Boxplot-Diagramm mit Median. Die Berechnung der messwiederholten ANCOVA ergab einen statistisch signifikanten Unterschied des LDL-C nach achtwöchiger Einnahme von Propionat oder Placebo. (107)

Als erste Sensitivitätsanalyse wurde eine ANCOVA ohne multiple Imputation auf Basis der kompletten Studienteilnahme durchgeführt. Es ergab sich eine signifikante LDL-Cholesterinsenkung um - 14,92 mg/dl ($p = 0,009$; 95 % CI = - 25,00; - 3,83). Als zweite Sensitivitätsanalyse wurde eine multiple Imputation innerhalb der Behandlungsgruppen anstelle des gesamten Patient*innenkollektivs durchgeführt. Hierfür wurde ebenfalls eine signifikante LDL-Cholesterinsenkung um - 14,94 mg/dl ($p = 0,013$; 95 % CI = - 26,52; - 3,36) berechnet.

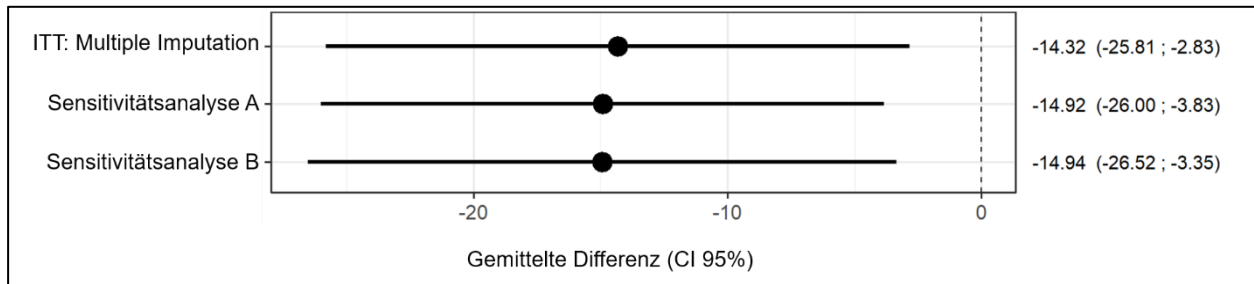


Abbildung 10: Ergebnisse der Analysen des primären Endpunktes nach achtwöchiger Therapie mit Propionat im Vergleich zu Placebo. Dargestellt ist der Mittelwert der LDL-Cholesterinsenkung innerhalb des Konfidenzintervalls von 95 %. Die obere Linie repräsentiert die reguläre ITT-Analyse des primären Endpunktes. Fehlende Werte wurden mittels multipler Imputation auf Grundlage aller Datensätze errechnet. Für die Sensitivitätsanalyse A wurden nur Proband*innen einbezogen, die sowohl zur ersten als auch zur dritten Visite präsent waren. Daher erfolgte keine multiple Imputation. Für die Sensitivitätsanalyse B wurden alle randomisierten Proband*innen mit einbezogen. Fehlende Werte wurden mittels multipler Imputation innerhalb der Gruppen errechnet. (107)

Wie in Abbildung 10 dargestellt, liegen die jeweiligen Endpunkte und die Wahrscheinlichkeitswerte der Sensitivitätsanalysen sehr nah beieinander. Daher zeichnen sich die Analysen des primären Endpunktes durch eine hohe Robustheit bei der Berechnung der fehlenden Datenpunkte aus.

Bei der Betrachtung der Subgruppen nach Geschlecht der Teilnehmenden ergab sich in der Berechnung der entsprechenden ANCOVA eine signifikante LDL-Cholesterinsenkung von - 15,75 mg/dl ($p = 0,048$; 95 % CI = - 31,31; - 0,18) für männliche Probanden. Hingegen zeigte sich bei den Probandinnen weiblichen Geschlechts eine LDL-Cholesterinsenkung um - 12,364 mg/dl ($p = 0,087$; 95 % CI = - 26,61; 1,89).

4.3. Weitere Cholesterinwerte

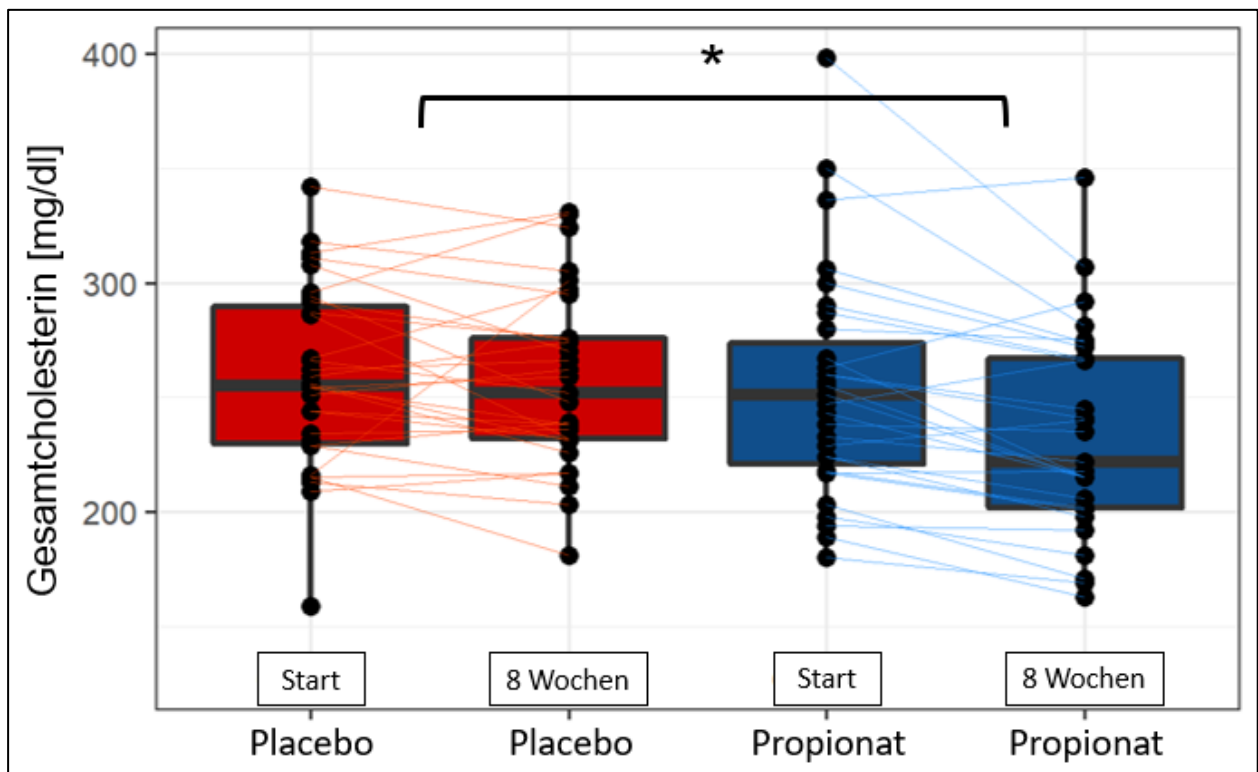


Abbildung 11: Verlauf der Konzentration an Gesamtcholesterin im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite im Boxplot-Diagramm mit Median. Die messwiederholte ANCOVA ergab einen signifikanten Unterschied des Gesamtcholesterins im Blut von Proband*innen, die mit Propionat behandelt wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe. (107)

Der Mittelwert der Gesamtcholesterin-Senkung (Abb. 11) im Blut betrug nach achtwöchiger Therapie in der Verum-Gruppe - 19,55 mg/dl (SD = 24,57) in der Placebo-Gruppe lediglich - 5,28 mg/dl (SD = 27,17). Bei einem angenommenen Fehlerniveau von 0,5 zeigt die ANCOVA einen signifikanten Unterschied in der Therapie mit 1000 mg Propionat und Placebo (- 16,68 mg/dl ($p = 0,014$; 95 % CI = - 29,85; - 3,50)). Dies zeigt eine überlegene Gesamtcholesterin-Senkung der Propionat-Therapie gegenüber der Kontrollgruppe.

Dem gegenüber steht eine statistisch nicht signifikante Veränderung des HDL-Cholesterins (Abb.12). Während in der Placebo-Gruppe das HDL-Cholesterin im Blut um - 4,69 mg/dl (SD = 8,00) abnahm, zeigte sich lediglich eine Reduktion um - 0,66 mg/dl

(SD = 5,85) in der Propionat-Gruppe. Der Anstieg von 3,21 mg/dl weist bei einem angenommenen Fehlerniveau von 0,5 keine Signifikanz auf ($p = 0,078$; 95 % CI = - 0,38; 6,80). Dies weist darauf hin, dass eine Behandlung mit Propionat in der Verum-Gruppe zu keiner relevanten Veränderung des HDL-Cholesterins im Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe führt.

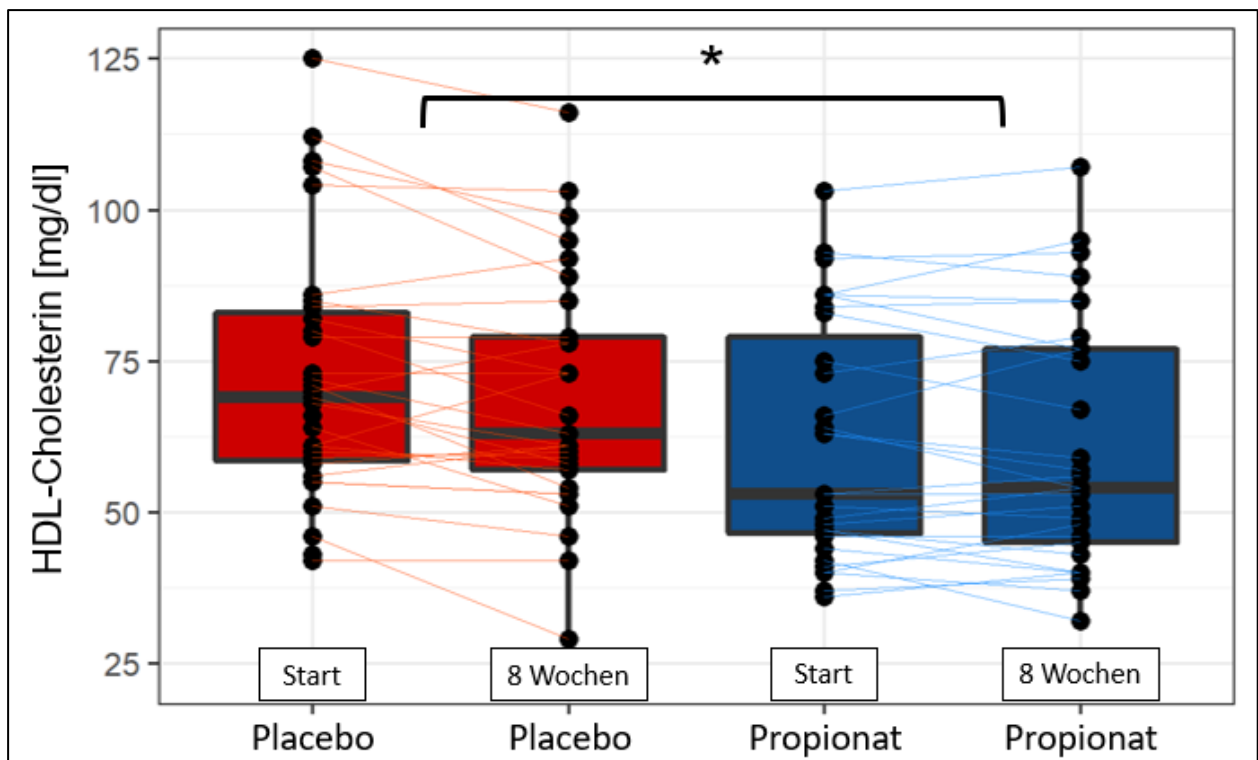


Abbildung 12: Verlauf des HDL-C-Konzentration im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Dargestellt als Boxplot-Diagramm mit Median. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich bei Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein statistisch bedeutsamer Unterschied von HDL-C im Blut von Proband*innen, die über acht Wochen mit Propionat behandelt wurden. (107)

Durch Messung der Konzentration der Triglyzeride im Blut konnte kein inferenzstatistisch bedeutsamer Effekt durch die Propionat-Therapie erzielt werden (Abb. 13 A). Deskriptiv wurde eine Senkung von - 2,56 mg/dl ($p = 0,794$; 95 % CI = - 22,06; 16,94) beobachtet.

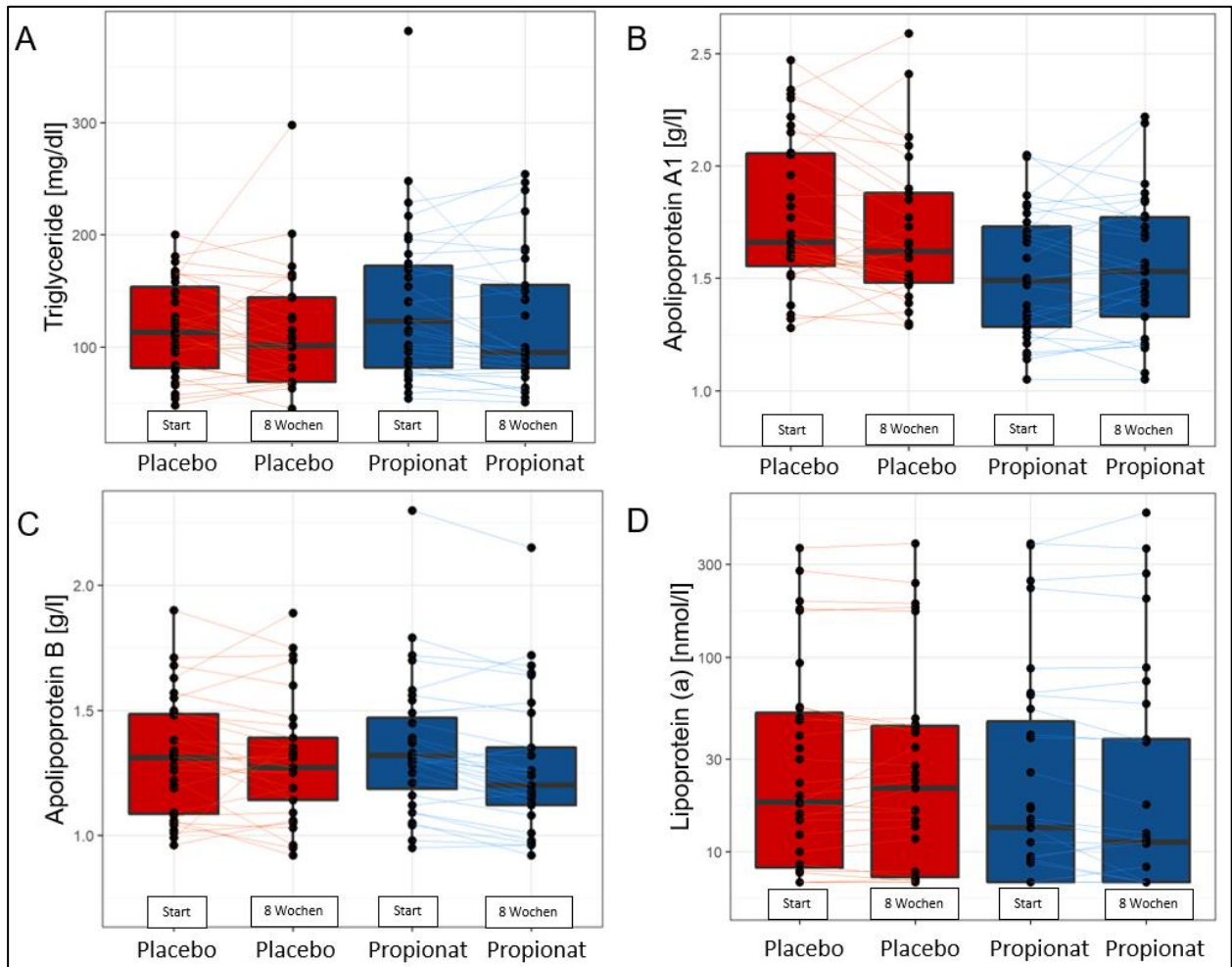


Abbildung 13: Ergebnisse des erweiterten Lipidprofils aus Vollblut als Boxplot-Diagramm mit Median. **A** Verlauf der Konzentration an Triglyzeriden im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Im Gruppenvergleich zeigte sich bei Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **B** Verlauf der Konzentration an Apolipoprotein A1 im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Im Gruppenvergleich zeigte sich bei Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **C** Verlauf der Konzentration an Apolipoprotein B im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Im Gruppenvergleich zeigte sich bei Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **D** Verlauf der Konzentration an Lipoprotein (a) im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Im Gruppenvergleich zeigte sich bei Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. (107)

Auch die deskriptiv betrachtete Steigerung der Konzentration von Apolipoprotein A1 um 0,09 g/L ($p = 0,078$; 95 % CI = - 0,01; 0,18) (Abb. 13 B) und die Senkung von Apolipoprotein B um - 0,03 g/l ($p = 0,402$; 95 % CI = - 0,10; 0,034) (Abb. 13 C) im Blut wies interferenzstatistisch keine Signifikanz auf. Das impliziert, dass die Gabe von Propionat zu keiner Änderung der Apolipoproteine A1 und B führt.

Die Konzentration von Lp(a) zeigt einen beobachteten Anstieg von 6,537 nmol/L in der Verum-Gruppe gegenüber Placebo-Behandlung (Abb. 13 D). Dieser Effekt weist mit einem angenommenen Fehlerniveau von 0,5 keine Signifikanz auf ($p = 0,300$; 95 % CI = - 5,98; 19,06). Daher deutet dies darauf hin, dass eine Propionat-Substitution unter den gewählten Studienbedingungen keine Wirkung auf die Konzentration von Lp(a) hat.

4.4. Durchflusszytometrie

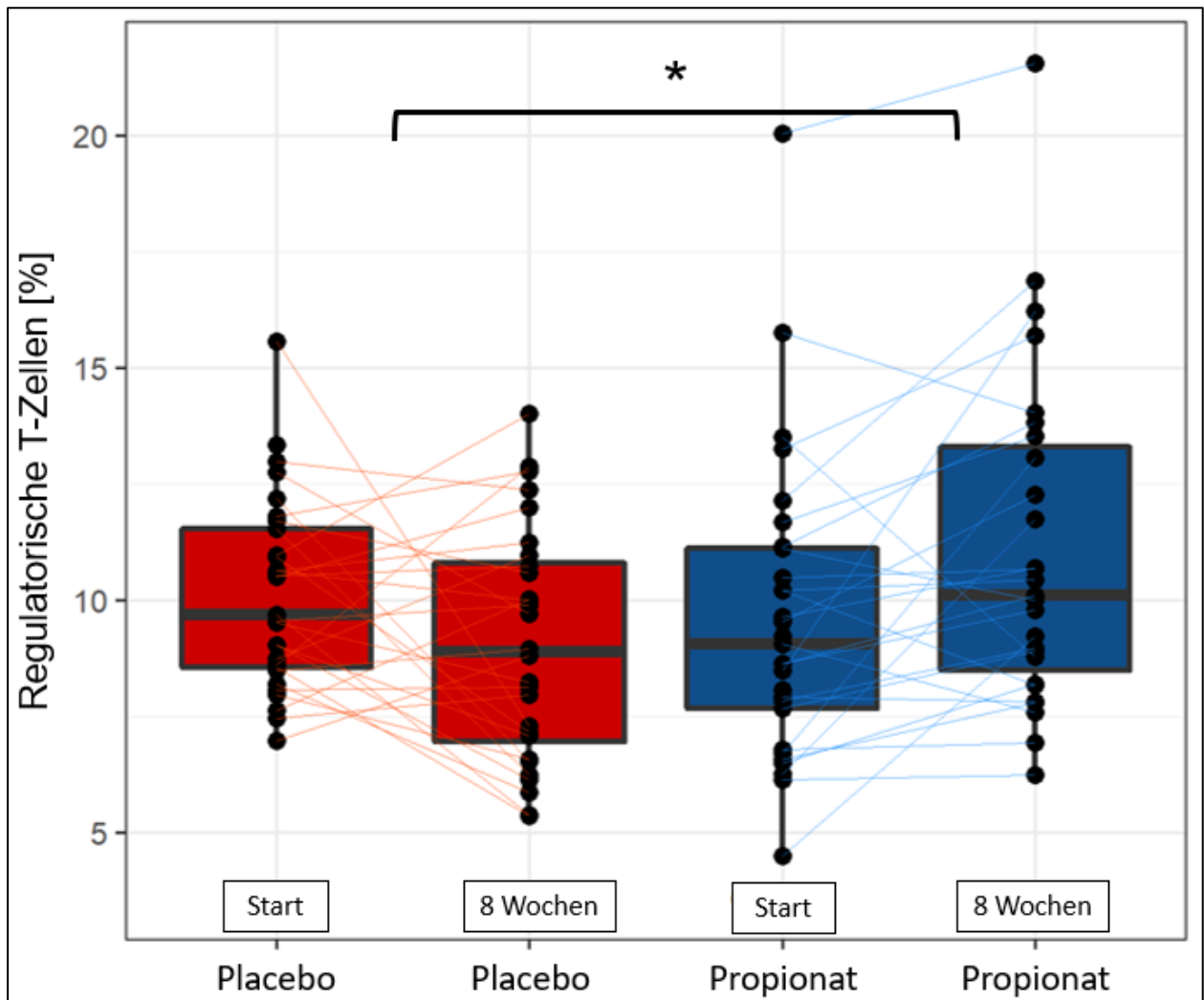


Abbildung 14: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der FOXP3-positiven Treg aus EDTA-Vollblut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite, dargestellt als Boxplot-Diagramm. Aufgetragen ist der Verlauf der Daten der einzelnen Proband*innen als prozentualer Anteil der CD25+ Zellen. Die messwiederholte ANCOVA ergab einen signifikanten Effekt für den Anstieg der Treg-Population in der Verum-Gruppe. (107)

Während in der Placebo-Gruppe der Median von 9,7 % auf 8,9 % fiel, stieg dieser unter Einnahme von Propionat von 9,1 % auf 10,1 %. Die Analyse mittels messwiederholter ANCOVA der durchflusszytometrischen Untersuchung des antikörpermarkierten EDTA-Vollblutes (Abb. 14) ergab einen für den Ausgangswert korrigierten Anstieg der FOXP3+CD25+-Zellen um 2,192 % ($p = 0,003$; 95 % CI = 0,77; 3,62). Dieser signifikante

Effekt zeigt eine vermehrte Bildung von Treg unter täglicher Gabe von 1000 mg Propionat über acht Wochen.

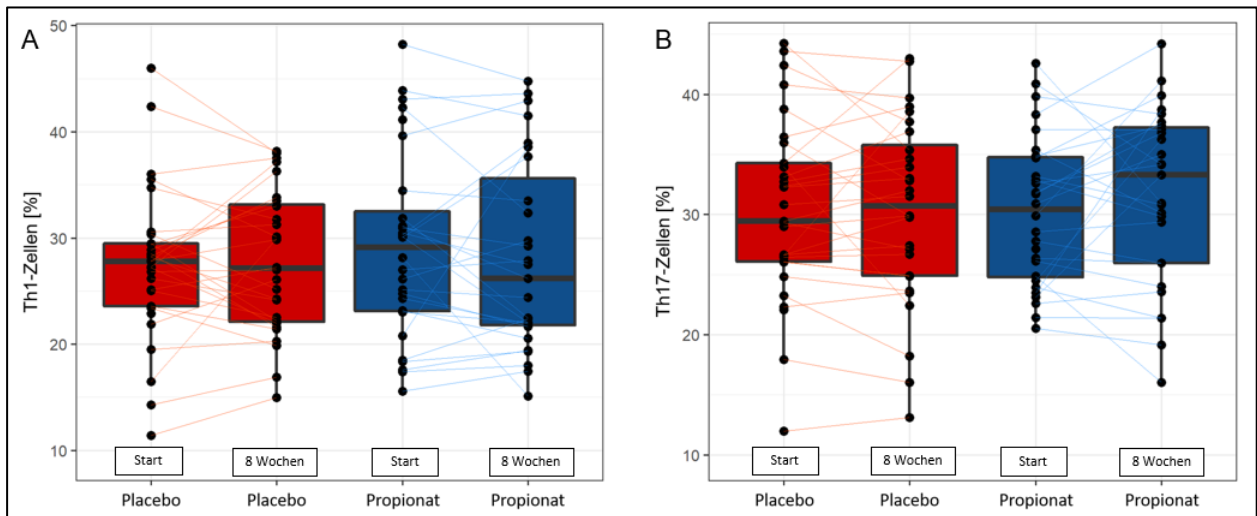


Abbildung 15: Verlauf von erster zu dritter Visite der durchflusszytometrischen Ergebnisse. Die Daten der Proband*innen wurden als Boxplot-Diagramm mit Median aufgetragen. **A** Zeigt die Ergebnisse der Th1-Zell-Markierung als prozentualer Anteil der CCR6+CXCR3+-Zellen von den CD161+CD4+-Zellen. Im Gruppenvergleich zeigte sich bei Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **B** Zeigt sind die Ergebnisse der Th17-Zell-Markierung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CCR6+CXCR3- -Zellen von CD161+CD4+-Zellen. Die ANCOVA ergab interferenzstatistisch keinen Effekt. (107)

Die durchflusszytometrische Analyse der Th1- und Th17-Zellen ergab interferenzstatistisch keinen signifikanten Effekt nach achtwöchiger Therapie mit Propionat (Abb. 15). Der Anteil der Th1-Zellen fiel um - 0,382 % ab ($p = 0,787$; 95 % CI = - 3,21; 2,45), während der Anteil der Th17-Zellen um 0,927 % ($p = 0,515$; 95 % CI = - 1,91; 3,76) anstieg. Diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant. Dies spricht nicht für eine Beeinflussung der Th1- und Th17-Zellpopulationen unter Studienbedingungen.

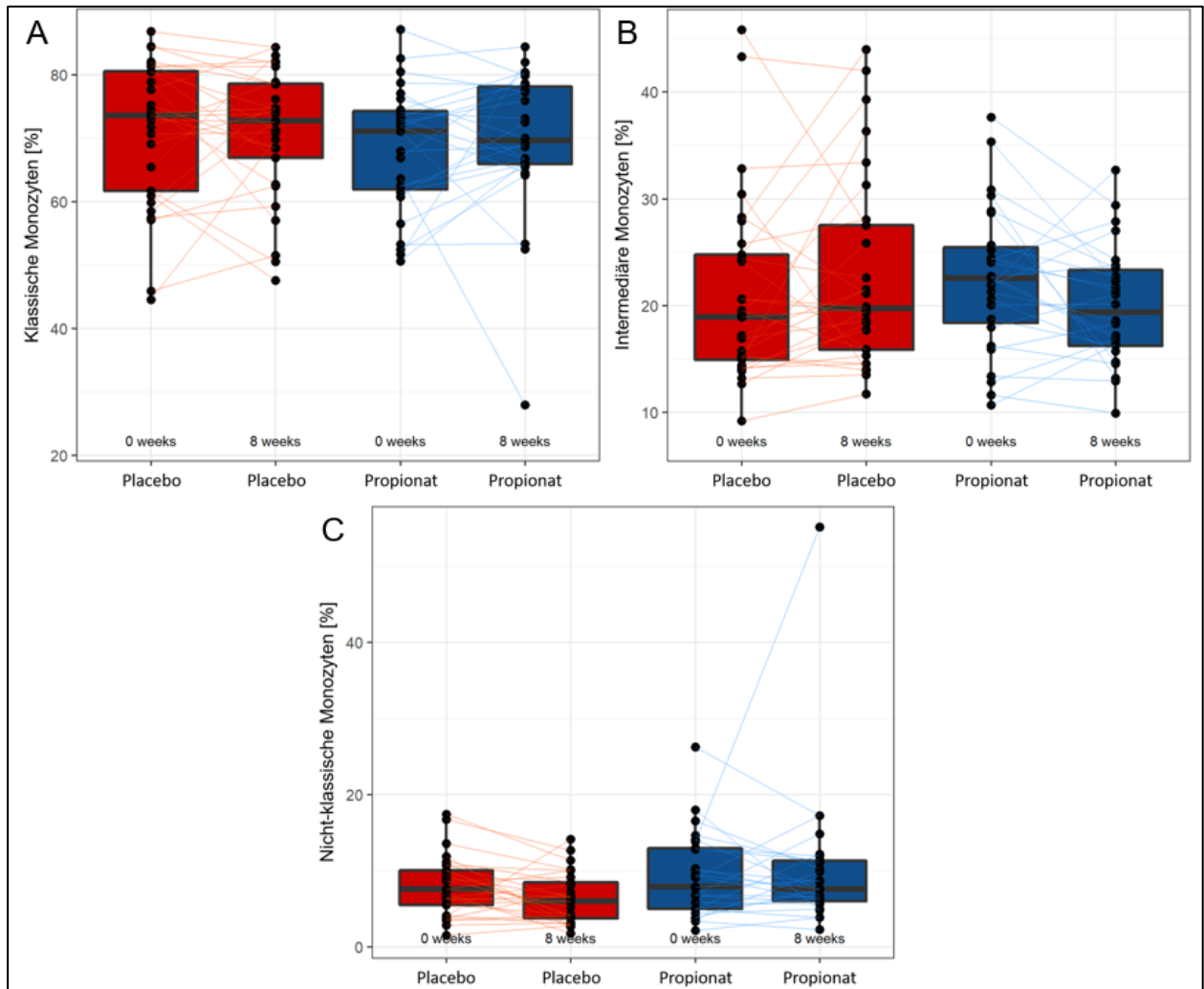


Abbildung 16: Verlauf der Daten von durchflusszytometrischen Analysen der Monozyten aus EDTA-Vollblut. Aufgetragen wurden die Datenpunkte der einzelnen Proband*innen als Boxplot-Diagramm nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Anhand des Prozentsatzes der HLA+ Monozyten wurden diese in folgende Subpopulationen unterschieden: Klassische (A), intermediäre (B) und nicht-klassische (C) Monozyten. Die messwiederholte ANCOVA ergab keine statistisch bedeutsamen Effekte. (107)

Innerhalb der Monozyten-Subpopulationen war eine Verschiebung zu beobachten (Abb. 16). Deskriptiv betrachtet nahmen die klassischen Monozyten um 0,32 % ($p = 0,903$; 95 % CI = - 4,92; 5,55) zu, jedoch sank der Anteil der intermediären Monozyten um - 2,88 % ($p = 0,133$; 95 % CI = - 6,69; 0,92) und der Anteil der nicht-klassischen Monozyten stieg um 2,92 % ($p = 0,101$; 95 % CI = - 0,59; 6,42). Diese Verschiebung war allerdings mit dem angenommenen Fehlerniveau von 0,5 nicht signifikant. Daher kann

bei einer achtwöchigen Gabe von 1000 mg Propionat täglich von keinem Effekt auf die Monozyten-Subpopulationen ausgegangen werden.

4.5. Sicherheitsparameter

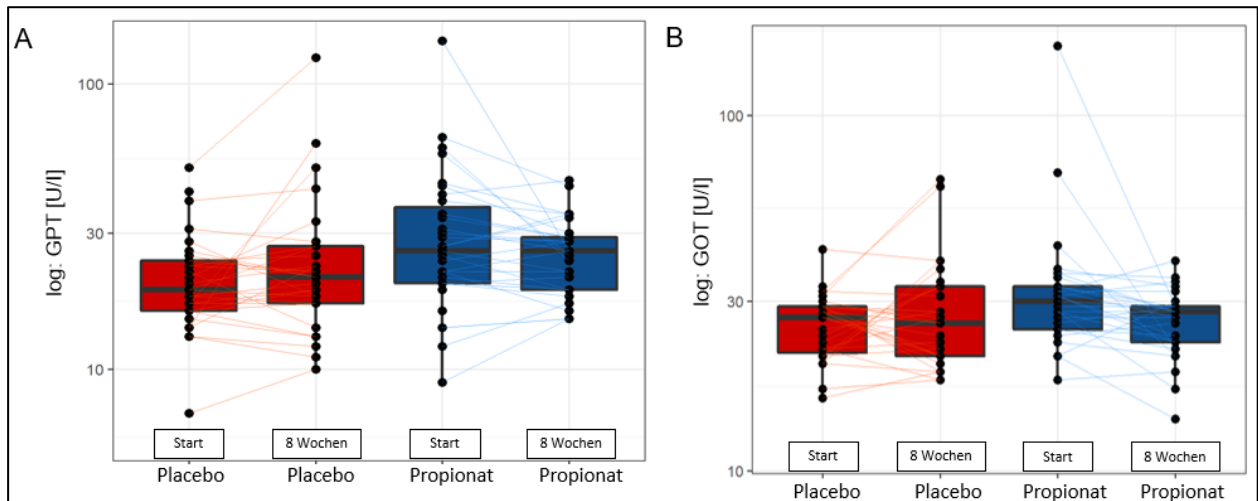


Abbildung 17: Logarithmische Darstellung der Konzentration der GOT (A) und der GPT (B) im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Dargestellt ist der Datenverlauf der einzelnen Proband*innen als Boxplot-Diagramm mit Median. Die messwiederholte ANCOVA ergab keine statistisch belastbaren Effekte. (107)

Als Sicherheitskriterium wurde das Überschreiten der Grenzwerte von GOT und GPT im Blut vorab definiert. Die GOT wies deskriptiv betrachtet in der Vergleichsgruppe eine Verletzung der festgelegten Grenzen bei 12,9 % auf, wohingegen dies bei 0 % der Proband*innen im Behandlungsarm auftrat. Während 12,9 % der Placebo Gruppe deskriptiv betrachtet eine Überschreitung der GPT auswies, trat dies bei 16,1 % des Propionat-Arms auf. Insgesamt ergab die messwiederholte ANCOVA jedoch keine signifikante Änderung der Parameter. Die GOT (Abb. 17 B) sank in der Verum-Gruppe im Verhältnis zu Placebo um - 2,62 U/L ($p = 0,273$; 95 % CI = - 7,37; 2,12). Die GPT (Abb. 17 A) reduzierte sich sogar um - 4,05 U/L ($p = 0,327$; 95 % CI = - 12,25; 4,16). Diese Veränderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant, weshalb für die Gabe von

1000 mg Propionat täglich kein eindeutiger Effekt auf den GPT und GOT angenommen werden kann.

Eine interferenzstatistische Untersuchung des C-reaktiven Proteins (CRP) mittels messwiederholter ANCOVA wies eine signifikante Reduktion von - 2,48 mg/L ($p = 0,045$; 95 % CI = - 4,90; - 0,06) nach einer achtwöchigen Behandlung mit 1000 mg Propionat im Vergleich zu Placebo auf (Abb.18). Dies zeigt eine antiinflammatorische Wirkung in der Verum-Gruppe in Bezug auf die CRP-Konzentration im Blut.

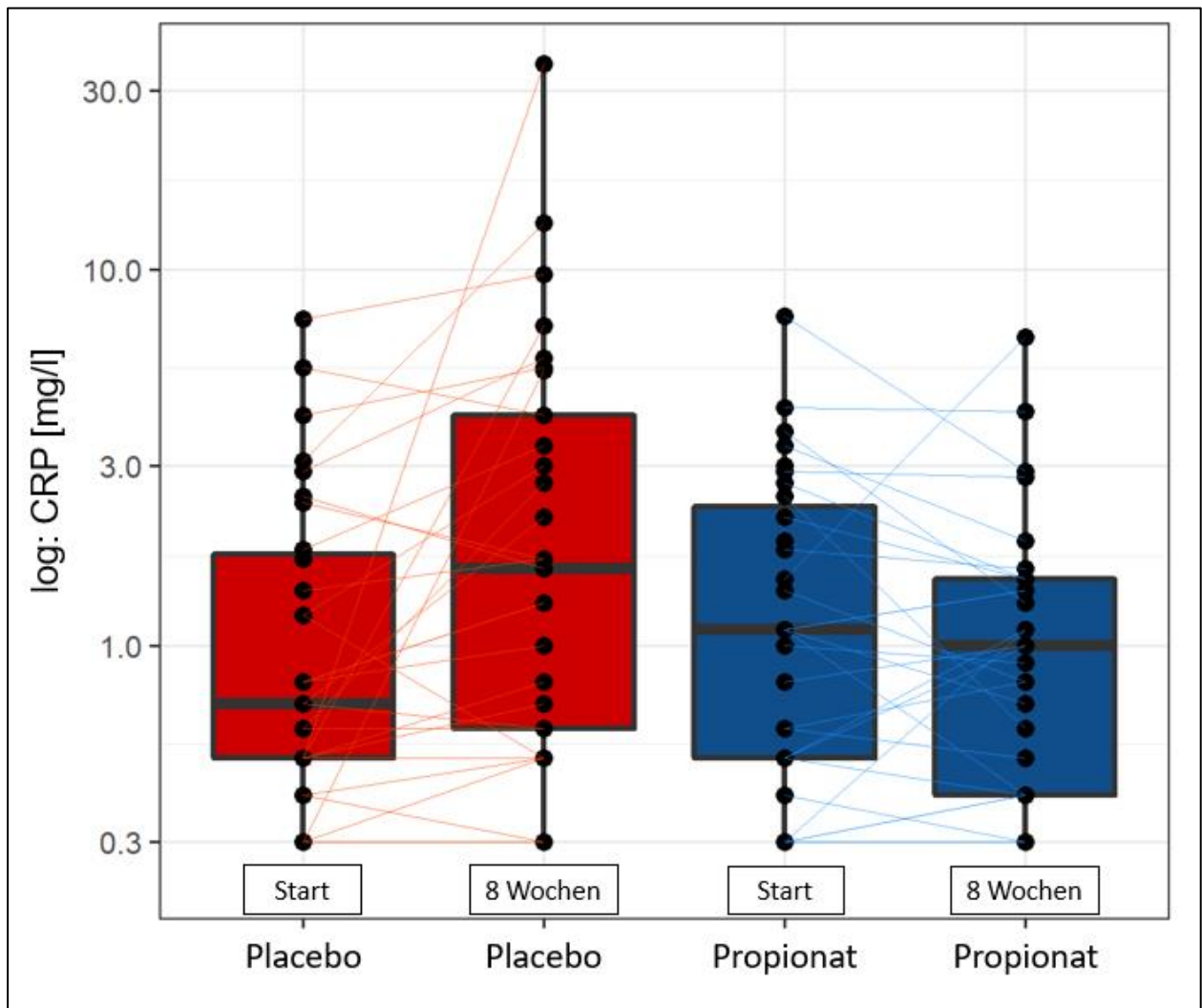


Abbildung 18: Logarithmische Darstellung der CRP-Konzentration im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Dargestellt ist der Verlauf der Daten der einzelnen Proband*innen als Boxplot-Diagramm mit Median. Die Analyse mittels messwiederholter ANCOVA ergab eine signifikante Reduktion des Entzündungsparameters. (107)

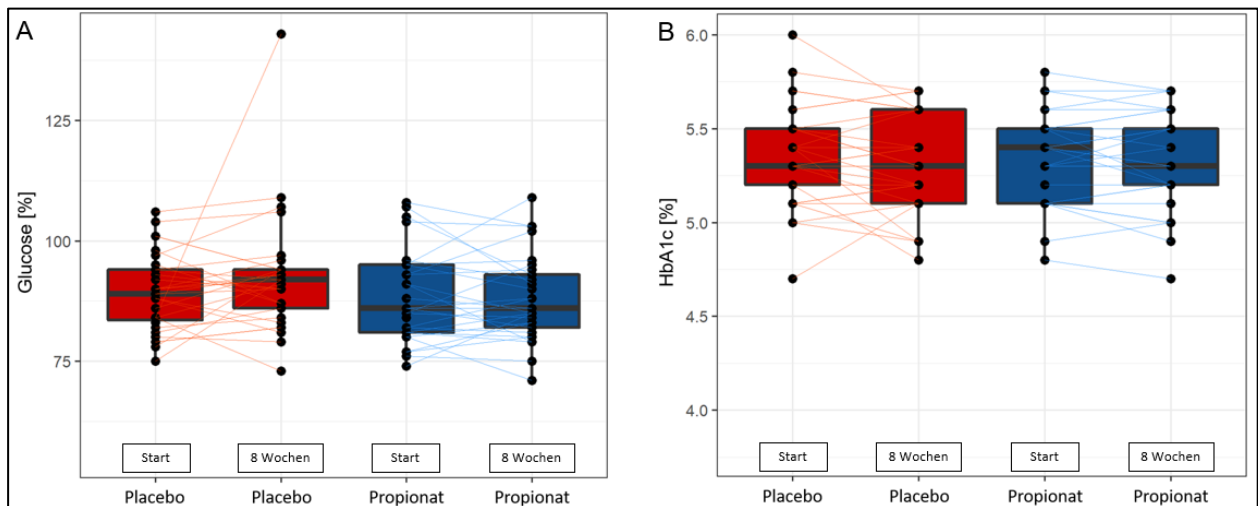


Abbildung 19: Ergebnisse der Glucose- und HbA_{1c}-Messung im Blut dargestellt als Boxplot-Diagramm mit Median. **A** Abgebildet ist der Verlauf des Gehalts der Nüchtern-Glukose im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich bei Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **B** Abgebildet ist der Verlauf des Anteils an HbA_{1c} im Blut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich bei Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. (107)

Eine interferenzstatistische Untersuchung mittels ANCOVA ergab sowohl bei der Nüchtern-Glukose-Messung (Abb. 19 A) als auch bei der HbA_{1c}-Messung (Abb. 19 B) keine statistisch bedeutsamen Effekte. Deskriptiv betrachtet zeigten sich nur geringe Unterschiede zur Placebo-Gruppe. So stieg der HbA_{1c} um 0,05 % ($p = 0,270$; 95 % CI = - 0,04; 0,13) und die Nüchtern-Glukose fiel um - 3,751 % ($p = 0,154$; 95 % CI = - 8,96; 1,46). Daher konnte für eine tägliche Substitution von 1000 mg Propionat über acht Wochen kein diabetogener Effekt beobachtet werden.

4.6. Unerwünschte Ereignisse (AE)

Lediglich 22,6 % der Proband*innen der Verum-Gruppe benannten auf Nachfrage mindestens eine AE, gegenüber 35,5 % in der Placebo-Gruppe (Tabelle 8). Somit lag die

Prävalenz für das Auftreten von AE unter Placebo-Niveau. Die häufigsten unerwünschten Wirkungen in der Propionat-Gruppe stellten Nausea mit 12,9 %, Cephalgie mit 6,5 % und abdominelle Schmerzen mit 6,5 % dar.

Tabelle 8: Absolute Häufigkeiten von AE nach Studienarmen

	Placebo	Propionat	Gesamt
Abdominelle Schmerzen	1	2	3
Akute Gastritis	2	0	2
Bipolare Störung	1	0	1
Cephalgie	0	2	2
Grippaler Infekt	1	0	1
Diarrhoe	1	1	2
Flatulenzen	1	1	2
Nausea	1	4	5
Sodbrennen	2	1	3
Vertigo	1	0	1
Gesamtsumme der AE	11	11	22
Patient*innen mit AE	11	7	18

4.7. Thrombozytenaggregometrie

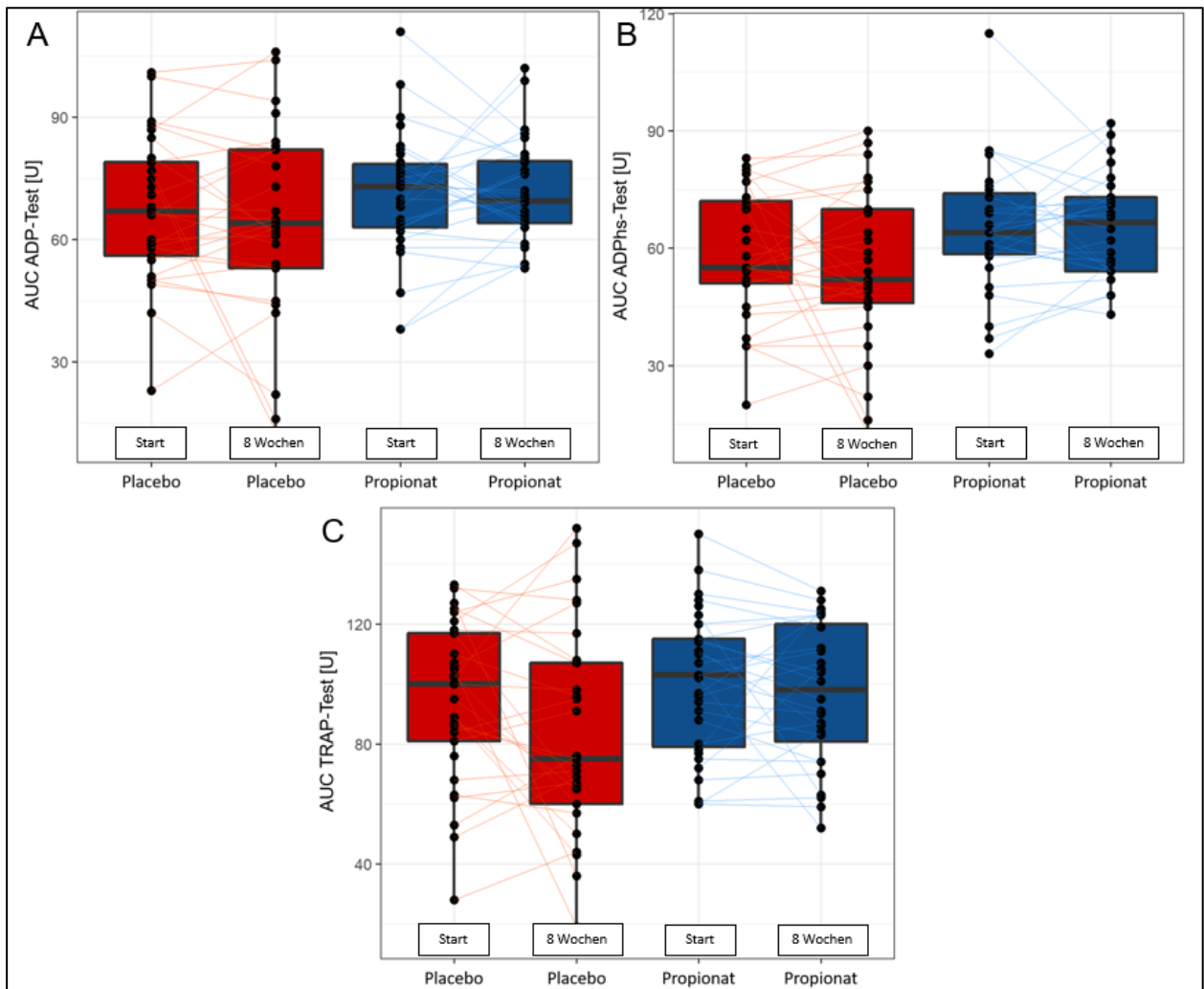


Abbildung 200: Ergebnisse der Impedanzaggregometrie mittels Multiplate Analyse aus Hirudin-Vollblut nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. **A** Verlauf der Aggregometrieergebnisse unter Zusatz von ADP nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich bei Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **B** Verlauf der Aggregometrieergebnisse unter Zusatz von ADP und Prostaglandin E1 nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich bei Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **C** Verlauf der Aggregometrieergebnisse unter Zusatz von TRAP nach Behandlungsarmen zum Zeitpunkt der ersten und dritten Visite. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich bei

Berechnung der messwiederholten ANCOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Berechnung der ANCOVA der ADP-Test-Ergebnisse (Abb. 20) ergab keinen statistisch relevanten Effekt. Die deskriptive Statistik ergab einen Anstieg um 4,91 U ($p = 0,259$; 95 % CI = - 3,73; 13,55). Ebenso zeigten sich deskriptiv betrachtet Steigerungen beim ADPhs-Test mit 6,19 U ($p = 0,131$; 95 % CI = - 1,90; 14,29) und beim TRAP-Test mit 9,55 U ($p = 0,181$; 95 % CI = - 4,60; 23,71). Eine Erhöhung ist gleichbedeutend mit einer gesteigerten Aggregation der Thrombozyten. Da die Effekte keine Signifikanz aufweisen, kann von keiner Änderung der Thrombozytenaggregation unter täglicher Einnahme von 1000 mg Propionat über acht Wochen ausgegangen werden.

5. Diskussion

Die Hypercholesterinämie ist nach wie vor der entscheidende Parameter zur Risikoreduktion von atherosklerotisch bedingten Erkrankungen. Da bis dato keine kurativen Optionen zur Behandlung der Atherosklerose zur Verfügung stehen, ist es umso wichtiger, diverse Therapieansätze zur Risikominimierung zu finden. Für diese Arbeit wurde erstmalig eine prospektive, Placebo-kontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie der Phase 2b unter Gabe von 1000 mg Propionat zur Untersuchung der Reduktion des LDL-C mit 62 Proband*innen über acht Wochen durchgeführt. Das Ziel dieser Studie ist es, die Auswirkungen einer ergänzenden Therapie hypercholesterinämischer Patient*innen mit Propionat zu prüfen.

Die Haupteergebnisse der Studie sind wie folgt:

1. Die achtwöchige Verabreichung von 1000 mg Propionat am Tag veränderte das Lipidprofil der Proband*innen. LDL-C und das Gesamtcholesterin konnten durch die Gabe von Propionat im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant gesenkt werden. Die Propionat-Gabe hatte jedoch nach acht Wochen keinen signifikanten Einfluss auf HDL, Triglyzeride, die Apolipoproteine A1 und B oder Lp(a).
2. Bezüglich der Immunzellpopulationen zeigten sich nach achtwöchiger Propionat-Therapie ein signifikanter Anstieg von Treg, aber keine signifikanten Unterschiede in den Th1- und Th17-Zellen oder den Monozyten-Subpopulationen im Vergleich zu der Placebo-Gruppe.
3. Der inflammatorische Marker CRP konnte durch die Propionat-Therapie im Vergleich zu Placebo signifikant gesenkt werden.
4. Propionat übte keinen nachweisbaren signifikanten Einfluss auf die GOT und GPT-Levels, die Nüchtern-Blutglukose oder HbA1c aus.
5. Unerwünschte, leichte Nebenwirkungen traten bei weniger als einem Viertel der Proband*innen in der Propionat-Gruppe auf.

5.1. Verteilung und Eigenschaften der Patient*innengruppen

Für die Studie wurden 62 Proband*innen mit diagnostizierter Hypercholesterinämie eingeschlossen. Der Median des LDL-C-Ausgangswertes der Kohorte lag bei 184 mg/dl und übersteigt damit deutlich den minimal empfohlenen Zielwert der ESC von < 115 mg/dl

(27). Lediglich 6,45 % schlossen die Studie nicht ab. Die Geschlechterverteilung unterschied sich in den Studienarmen minimal um eins. Allerdings waren 72,58 % aller Testpersonen weiblichen Geschlechts, da diese Gruppe eine erhöhte Bereitschaft zur Teilnahme an der klinischen Studie gezeigt hat. Die Frauen wiesen in der untersuchten Gruppe im Allgemeinen im Verhältnis zu Männern einen niedrigeren SCORE als Männer auf. Auch bei den weiteren demografischen Variablen fand sich eine sehr ähnliche Verteilung zwischen den Behandlungsarmen. Als größter Unterschied ist hier der Raucherstatus hervorzuheben, da dieser das kardiovaskuläre Risiko deutlich erhöhen kann (27). So ist der Anteil in der Propionat-Gruppe an aktiven Raucher*innen um 16,12 % größer als in der Placebo-Gruppe. Aufgrund der Ein- und Ausschlusskriterien wurden nur Freiwillige mit einem SCORE von bis zu 1 % eingeschlossen, was einem niedrigen Risiko für einen kardiovaskulär bedingten Tod binnen der nächsten 10 Jahre entspricht (27).

5.2. Auswirkungen der Propionatgabe auf das Lipidprofil

Bei der Behandlung einer Hypercholinesterinämie steht eine Modifikation des Lipidprofils der Patient*innen im Vordergrund. Hierbei ist das primäre Therapieziel das LDL-C, und damit einhergehend das Gesamtcholesterin zu senken.

In der vorliegenden Studie konnte eine deutliche LDL-C Senkung um 14,32 mg/dl gegenüber Placebo nach achtwöchiger Propionat-Therapie erzielt werden. Diese signifikanten Ergebnisse konnten durch jede der durchgeführten Sensitivitätsanalysen bestätigt werden. Damit ist der cholesterinsenkende Effekt einer Propionat-Einnahme erstmals gesichert im Menschen nachgewiesen worden. Dieser Effekt schien besonders bei männlichen Probanden ausgeprägt zu sein (Senkung um 15,75 mg/dl im Vergleich zu 12,36 mg/dl bei Frauen), jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass die Subgruppe eine geringere Anzahl aufweist.

Dem folgend wurde das Gesamtcholesterin in der vorliegenden Kohorte ebenfalls signifikant durch Propionat um 16,68 mg/dl reduziert.

Während in der Placebo-Gruppe das Gesamtcholesterin um lediglich 5,28 mg/dl sank, konnte es in der Verum-Gruppe um 19,55 mg/dl gesenkt werden. Dies ist vermutlich auf den Anteil der LDL-C-Senkung zurückzuführen, da sich das HDL-C nicht signifikant veränderte. Die vorliegende Untersuchung ist die erste Placebo-kontrollierte

Doppelblindstudie zu den Auswirkungen von Propionat auf das Lipid- und Cholesterin-Profil des Menschen, weshalb keine Vergleichswerte zur Verfügung stehen, um die Ergebnisse einzuordnen. Es wurden jedoch einige in vitro- und in vivo-Studien an isolierten Zellen und Versuchstieren zu den Auswirkungen einer Propionat-Behandlung auf den Lipidstoffwechsel durchgeführt.

Thacker et al. konnten bereits 1981 an Schweinen, die über zehn Wochen Propionsäurehaltiges Futter erhielten, eine signifikant erniedrigte Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma demonstrieren (108). Es wurde jedoch keine detaillierte Analyse des Lipidprofils und der Cholesterinkomponenten durchgeführt, sodass die Reduktion des Gesamtcholesterins auf eine geringere Nahrungsaufnahme oder eine gesunkene HDL-Konzentration zurückgeführt wurde.

In in vitro-Studien an isolierten Hepatozyten von Ratten konnte demonstriert werden, dass eine Propionat-Behandlung sowohl die Fettsäure-Synthese als auch die Cholesterinbiosynthese inhibiert (109–111). Durch ihre in Mausversuchen erhaltenen Erkenntnisse legten Higashimura et al. nahe, dass Propionat eine negative Wirkung auf die Triglyzeridakkumulation hat. Sie beschrieben eine über Aktivierung von PPAR- α induzierte Senkung der Triglyzerid-Konzentration (101).

Es ist denkbar, dass neben der Veränderung der Lipoproteine auch die Cholesterinbiosynthese in der Leber durch Propionat reduziert wurde. Die Beobachtung dieser Studien, dass Propionat in vitro die Triglyzerid-Biosynthese reduziert, konnte in der vorliegenden Studie in vivo nicht bestätigt werden, da sich die Triglyzeridwerte im Blut nicht signifikant von der Placebo-Gruppe unterschieden. Hier wurde jedoch nicht die Triglyzerid-Biosynthese evaluiert, so dass die unveränderten Triglyzerid-Spiegel vermutlich im Zusammenhang mit dem Transport durch Lipoproteine im Blut stehen, nicht mit der Biosynthese in der Leber. Es konnten in der vorliegenden Studie keine Änderungen der Konzentration des HDL-C im Blut beobachtet werden. Die Bedeutung von HDL-C im Zusammenhang mit einer Hypercholesterinämie wird kontrovers diskutiert. Einerseits hat das HDL-C die Funktion, Cholesterin aus den peripheren Geweben zur Leber zu transportieren und somit das Cholesterin und die Triglyzeride in den Geweben zu senken. Andererseits konnte eine Modulation dieses Parameters in Studien nicht zu der gewünschten Senkung des kardiovaskulären Risikos führen. Zudem stellt entgegen anfänglicher Vermutungen das Verhältnis von HDL-C zu LDL-C keinen aussagekräftigen

Surrogatparameter dar und gilt somit als obsolet in der Bewertung des Risikos von Herz-Kreislaufkrankungen (112). Aus diesem Grund ist das HDL-C nicht mehr der Angriffspunkt aktueller medikamentöser Therapien. Der aktuelle Fokus liegt auf der Senkung des LDL-C und des Gesamtcholesterins (27). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, die eine signifikante Senkung dieser beiden Parameter demonstrieren, sind also besonders relevant für die medikamentöse Therapie der Hypercholesterinämie. Die beobachtete Reduktion des Gesamtcholesterins nach Einnahme von Propionat ist im Einklang mit den Ergebnissen von Tierversuchsstudien in Ratten (113) und Hamstern (114).

5.3. Durchflusszytometrische Messungen

Atherosklerose ist eine degenerative, fortschreitende, chronisch entzündliche Erkrankung. Insbesondere die Inflammation wird mit bestimmten begünstigenden Risikofaktoren assoziiert. Aus diesem Grund stellen neuere Therapieansätze neben der Modulation des Lipidprofils die Modulation des Immunsystems und der Immunzellen in den Fokus. Das Ziel derartiger Ansätze ist die Verschiebung der Immunreaktion von der proinflammatorischen Immunantwort zu einer atheroprotektiven Antwort (115). Der Zusammenhang zwischen Inflammation und atherosklerotischen Plaques besteht u.a. in der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und der Aktivierung von Makrophagen, die zu der Plaquebildung beitragen. Verschiedene Immunzellen stehen hiermit in Zusammenhang.

Eine Erhöhung der Treg könnte potenziell zu einer atheroprotektiven Immunantwort beitragen (30). In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer Propionat-Therapie auf die Blutkonzentration von Treg analysiert. Treg nahmen im Vergleich zu der Placebo-Gruppe in der Propionat-Gruppe um absolut 2,192 % zu, was einem relativen Anstieg des Medians um 11 % entspricht. Daher gilt die Hypothese des Propionat-vermittelten Anstiegs der Treg nach achtwöchiger Therapie mit einem Fehlerniveau von 0,5 als angenommen. Wie von Taams et al. beschrieben unterdrücken Treg sowohl die adaptive als auch angeborene Immunreaktion durch Sekretion von Zytokinen wie IL-10, TGF- β und IL-35. Indirekt inhibieren sie kompetitiv ebenso die Proliferation von proinflammatorischen T-Effektorzellen, da beide Substrate des IL-2 sind (116). Dies bestätigen antiinflammatorische Effekte, die kürzlich von Bartolomaeus et al. im

Apolipoprotein E (ApoE) Knockout-Mausmodell beobachtet worden waren (100). Im Detail stellten sie darüber hinaus sogar eine Reduktion der atherosklerotischen Läsionen fest. In Mäusen ohne Treg zeigten sich auch keine kardioprotektiven Effekte, sodass sie derartige Effekte den Treg zuschrieben (101). Des Weiteren konnte Ait-Outfella et al. einen Zusammenhang im ApoE-Mausmodell zwischen einer Zunahme der Größe von atherosklerotischen Läsionen und einer niedrigen Konzentration von Treg nachweisen (117). Diese Erkenntnisse aus dem Mausmodell gilt es weiter zu untersuchen, um eine valide Übertragung auf den menschlichen Organismus zu gewährleisten. Daher sind die Resultate der Studie entscheidend für Translation der Forschungsergebnisse aus den Tiermodellen auf den Menschen und belegen den positiven Effekt auf die humane Treg-Bildung. Allerdings ist die Therapiedauer von acht Wochen unter Studienbedingungen zu kurz, um etwaige positive Effekte auf harte Endpunkte bestimmen zu können. Daher gilt es auch im Hinblick hierauf eine Anschlussstudie durchzuführen.

Haghikia et al. beschrieben in Mausmodellen nach Gabe von Fettsäuren mit mittlerer bis höherer Kettenlänge einen Anstieg von proinflammatorischen Th1- und Th17-Zellen, wohingegen unter Propionat-Gabe vermehrt immunregulierende Treg gebildet wurden (95). Als C3-Fettsäure inhibiert Propionat die Histon-Deacetylasen und begünstigt damit die Differenzierung von Tregs (94). Daher erhärten die Resultate der hier durchgeführten Studie die Ergebnisse von Haghikia et al. im Mausmodell (95) und lassen möglicherweise die Übertragung auf den Menschen zu.

Monozyten spielen in der atherosklerotischen Pathogenese eine entscheidende Rolle, da sie aus dem Blut in die Intima rekrutiert werden und dort zu Makrophagen differenzieren. Die Subpopulationen dieser Monozyten wurden in der vorliegenden Studie untersucht, zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Propionat- und der Placebo-Gruppe. Deskriptiv betrachtet zeigten sich jedoch tendenzielle Veränderungen. Während die Subpopulation der klassischen Monozyten kaum eine Änderung aufwies, zeigte sich nach achtwöchiger Propionat-Gabe ein Trend in der Verschiebung von intermediären hin zu nicht-klassischen Monozyten. Insbesondere erhöhte Konzentrationen von intermediären Monozyten waren in vorherigen Studien mit einem erhöhten atherosklerotischen Risiko vergesellschaftet. Durch die Produktion von Zytokinen wie IL-6 und TNF- α fungieren die intermediären Monozyten als Treiber der Inflammation (34, 118, 119). Der tatsächliche Einfluss einer Propionat-Gabe auf die

Monozyten-Population muss in größeren prospektiven Studien bestätigt werden. Sollte Propionat tatsächlich die Konzentration dieser proatherosklerotischen Immunzellen modulieren können, wäre dies ein interessanter Therapieansatz, um die proinflammatorische Immunantwort von Patient*innen mit Atherosklerose zu einer atheroprotektiven Immunantwort umzuwandeln.

Wie Ridker et al. in der CANTOS-Studie erstmals zeigen konnten, kann eine gezielt antiinflammatorische Therapie das Risiko für erneute kardiovaskuläre Ereignisse, unabhängig von Cholesterinkonzentrationen, senken (120). Dies unterstreicht das Verständnis der Atherosklerose als inflammatorische Erkrankung und zeigt das Potential für eine kombinierte Therapie aus LDL-C-Senkung und Entzündungshemmung. Durch Steigerung der Konzentration an Tregs und die beschriebene Reduktion des LDL-C erfüllt Propionat beide Kriterien. So wäre es sinnvoll die Studienergebnisse an größeren und multizentrischen Kohorten zu überprüfen und Propionat auch als Ad-on-Therapie in Kombination mit einem hochpotenten Cholesterinsenker wie Statinen oder PCSK9-Inhibitoren zu testen.

5.4. Sicherheitsparameter und AE

Bei jeder neuen medikamentösen Therapie stellt sich die Frage nach der Sicherheit für die Patient*innen. Diese wird üblicherweise basierend auf den unerwünschten Nebenwirkungen und bestimmten Blutparametern überprüft. Im Falle der Atherosklerose werden hierbei die GOT und GPT zugrunde gelegt, da sie die erfolgreiche Clearance der Medikamente in der Leber widerspiegeln. In der vorliegenden Studie bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der GOT und GPT zwischen der Propionat- und Kontrollgruppe. Es bestand sogar ein Trend zu niedrigeren GOT- und GPT-Levels in der Propionat-Gruppe. Daher kann dieses Sicherheitskriterium als erfüllt angesehen werden. Im Zeitraum von acht Wochen traten nur bei weniger als einem Viertel der Patient*innen unter Propionat-Therapie Nebenwirkungen auf, darüber hinaus waren diese alle als leicht einzustufen. Die Inzidenz lag sogar leicht unter der der Placebo-Gruppe, weshalb von der Sicherheit und Verträglichkeit einer täglichen Propionat-Gabe von 1000 mg ausgegangen werden kann.

Der Stoffwechsel und die Sicherheit von Propionat wurden bereits in einigen Studien untersucht. Propionat wird von Darmbakterien durch Fermentation unverdauter

Kohlenhydrate unter physiologischen Bedingungen in Abhängigkeit von der Nahrung produziert (84, 121). Propionat ist im Rahmen der Verordnung E282 in der Europäischen Union bereits als Lebensmittelzusatzstoff zur Konservierung von Backwaren zugelassen (93). Hierbei ist jedoch im Vergleich zu einer therapeutischen Gabe von deutlich geringeren Aufnahmemengen auszugehen, weswegen sich aus der Zulassung als Lebensmittelzusatzstoff die unbedingte Sicherheit für den Menschen nicht ableiten lässt. In Tierversuchsstudien an Hunden lag die Propionat-Menge, die Nebenwirkungen auslöste, zehnmal höher als die für Lebensmittelzwecke zugelassene Höchstmenge (122). In der vorliegenden Studie konnten keine negativen Effekte auf die Propionat-Therapie zurückgeführt werden. Die Sicherheit von Propionat als Therapeutikum ist jedoch im Menschen noch nicht ausreichend belegt. Zudem konnten im Tierversuch auch negative Aspekte des Propionats aufgezeigt werden. So konnten Tirosh et al. zeigen, dass eine Propionat-Gabe in Mäusen zu einer Dysregulation des Glukose-Stoffwechsels und einer Insulinresistenz führte (99). Dies wurde auf eine vermehrte Ausschüttung von Noradrenalin zurückgeführt, die in Folge die Konzentration von Glukagon und Fettsäurebindendem-Protein 4 senkte und eine Hyperinsulinämie hervorrufen könnte. Unter Dauertherapie mit Propionat könnte sich somit eine relative Insulinresistenz entwickeln (89). Andere Tierversuchsstudien demonstrierten jedoch günstige Effekte von Propionat, die den Glukose- und Fettstoffwechsel betreffen. Durch Aktivierung der freien Fettsäure-Rezeptoren 2 und 3 kam es vermehrt zur Ausschüttung von Glucagon-like-Peptid 1 und Peptid YY, die eine appetitzügelnde Wirkung haben (88). Weiterhin konnte bei Langzeitgabe eine Gewichtsreduktion sowohl im Bauchraum und der Leber verzeichnet werden (13). In der vorliegenden Studie zeigte sich hingegen keine aussagekräftige Wirkung von Propionat auf die Nüchtern-Glukose oder den HbA1c-Wert. Vereinzelt starke Schwankungen in der Glukose-Konzentration ließen sich auf Proband*innen zurückführen, die sich nicht an die Nahrungsmittelkarenz von mindestens acht Stunden gehalten hatten. Für eine Sicherheitsbewertung im Menschen bedarf es demzufolge weiterer, gut kontrollierten Kohortenstudien mit hohen Proband*innenzahlen mit längeren Beobachtungszeiträumen, bevor diese Substanz eine breitflächige Anwendung finden kann.

5.5. Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation ist ein wichtiger Bestandteil der Plaque-Bildung in der Entstehung der Atherosklerose und spielt insbesondere beim akuten Gefäßverschluss im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms eine kritische Rolle, weshalb dieser Faktor bei der Entwicklung antiatherosklerotischer Medikamente Berücksichtigung findet. Eine Auswirkung von Propionat auf die Thrombozytenaggregation wurde nach bisherigem Kenntnisstand noch nicht untersucht. In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Thrombozytenaggregation zwischen der Propionat-Gruppe und der Placebo-Gruppe festgestellt werden. Die Ergebnisse der Aggregometrie deuten auf einen leichten Anstieg der Thrombozytenaggregation hin, jedoch waren die Unterschiede zur Placebo-Gruppe relativ gering und statistisch nicht signifikant. Aufgrund der geringen Proband*innenzahl kann die Auswirkung von Propionat auf die Thrombozytenaggregation basierend auf den vorliegenden Ergebnissen nicht beurteilt werden.

5.6. CRP

CRP ist ein systemischer Indikator einer Inflammation und wird als einer der aussagekräftigsten Entzündungsmarker eingestuft. Liegt ein erhöhter CRP-Wert vor, lässt dies auf eine Entzündungsreaktion im Körper schließen. Hohe CRP-Werte sind zudem mit Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems assoziiert. Zudem wurde CRP als kausativer Faktor bei der Atherosklerose-Entstehung diskutiert (123). In Patient*innen mit Hypercholesterinämie und Atherosklerose finden Entzündungsprozesse statt, die zu der Pathogenese beitragen, sodass der CRP-Wert dieser Patient*innen oft erhöht ist. Die Therapie dieser Patient*innen hat neben der Modulation des Fett- und Cholesterinstoffwechsels die Veränderung der inflammatorischen Prozesse zum Ziel (120). In der vorliegenden Studie wurde der CRP-Wert im Blut bestimmt und konnte nach achtwöchiger Propionat-Gabe im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant gesenkt werden. Dies untermauert eine antiinflammatorische Wirkung des Propionats im Organismus, jedoch gibt es nach bisherigem Kenntnisstand keine Studien, die den Zusammenhang zwischen Propionat und dem CRP-Wert im Menschen untersucht haben. Es ist denkbar, dass Propionat modulierende Wirkung auf die IL-1 β -

Inflammasome Kaskade ausübt, wie dies in einer experimentellen Arbeit gezeigt wurde (124), und in der Folge die hepatische CRP-Synthese beeinflusst.

5.7. Limitationen

Die vorliegende Studie weist einige Limitationen auf, die im Folgenden adressiert werden sollen. Eine Limitation ist die niedrige Proband*innenzahl und das monozentrische Studiendesign, sodass die Ergebnisse in einer größeren, multizentrischen Studie bestätigt werden müssen. Einige in der Studie beobachtete Trends erreichten möglicherweise deshalb keine Signifikanz. Insbesondere Studien zur Sicherheit und Verträglichkeit müssen mit hohen Proband*innenzahlen durchgeführt werden, um den Einsatz von Propionat bei Patient*innen mit Hypercholesterinämie empfehlen zu können. Basierend auf den – wenn auch begrenzten – Sicherheitsdaten, die hier erhoben wurden, könnte geschlussfolgert werden, dass eine Dosis von 2x 500 mg pro Tag für eine Anwendungsdauer von 8 Wochen verträglich ist. Aufgrund der mangelnden Studienlage zur Propionat-Therapie im Menschen ist die optimale Dosierung und Anwendungsdauer nicht bekannt und muss ebenfalls evaluiert werden. Es ist denkbar, dass eine längere Anwendung der Propionat-Therapie über acht Wochen hinaus zu weiteren protektiven Effekten auf das Immunsystem und den Lipidstoffwechsel führen könnte. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die cholesterinsenkende Wirkung nach längerer Einnahme abgeschwächt wird, z.B. durch kompensatorische Feedback-Mechanismen.

6. Fazit und Ausblick

Die vorliegende Studie stellt die erste Untersuchung der Auswirkungen einer achtwöchigen Propionat-Therapie bei Patient*innen mit Hypercholesterinämie dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine tägliche Gabe von 1000 mg Propionat in diesem Zeitraum sowohl das LDL-C als auch das Gesamtcholesterin senken und Treg als Modulatoren der atherosklerotischen Plaque-Bildung erhöhen kann. Sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die Sicherheit von Propionat war in dieser Kohorte gut. Eine ergänzende Propionat-Gabe könnte demzufolge zu einer Verbesserung des Lipidprofils und der Inflammation von hypercholesterinämischen Patient*innen beitragen. Multizentrische Phase 3-Studien mit einer hohen Proband*innenzahl sind notwendig, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Tierversuchsstudien auf den Menschen zu gewährleisten und die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit einer kleinen Studienkohorte zu bestätigen. Es ist ebenso denkbar, dass eine solche Ergänzungstherapie mit Propionat in Kombination mit etablierten Wirkstoffen zu einer Reduktion der Dosis cholesterinsenkender Medikamente beitragen kann.

6. Literatur

1. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J* 2016; 37(42):3232–45. doi: 10.1093/eurheartj/ehw334.
2. Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe--epidemiological update 2015. *Eur Heart J* 2015; 36(40):2696–705. doi: 10.1093/eurheartj/ehv428.
3. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J* 2014; 35(42):2950–9. doi: 10.1093/eurheartj/ehu299.
4. Statistisches Bundesamt Deutschland. Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2017: Statistisches Bundesamt Deutschland; 2019 [Stand: 09.04.2020]. Verfügbar unter: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html.
5. Aluganti Narasimhulu C, Fernandez-Ruiz I, Selvarajan K, Jiang X, Sengupta B, Riad A, Parthasarathy S. Atherosclerosis--do we know enough already to prevent it? *Curr Opin Pharmacol* 2016; 27:92–102. doi: 10.1016/j.coph.2016.02.006.
6. Wong KKL, Wu J, Liu G, Huang W, Ghista DN. Coronary arteries hemodynamics: effect of arterial geometry on hemodynamic parameters causing atherosclerosis. *Med Biol Eng Comput* 2020; 58(8):1831–43. doi: 10.1007/s11517-020-02185-x.
7. Eshtehardi P, McDaniel MC, Suo J, Dhawan SS, Timmins LH, Binongo JNG, Golub LJ, Corban MT, Finn AV, Oshinski JN, Quyyumi AA, Giddens DP, Samady H. Association of coronary wall shear stress with atherosclerotic plaque burden, composition, and distribution in patients with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc* 2012; 1(4):e002543. doi: 10.1161/JAHA.112.002543.
8. Gawaz M, Stellos K, Langer HF. Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. *J Thromb Haemost* 2008; 6(2):235–42. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02867.x.
9. Skålén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002; 417(6890). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12066187/>.
10. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011; 12(3):204–12. doi: 10.1038/ni.2001.
11. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, Blundell JE, Bell JD, Thomas EL, Mt-Isa S, Ashby D, Gibson GR, Kolida S, Dhillon WS, Bloom SR, Morley W, Clegg S, Frost G. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 2015; 64(11):1744–54. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307913.

12. Shashkin P, Dragulev B, Ley K. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des* 2005; 11(23):3061–72. doi: 10.2174/1381612054865064.
13. Ahmadsei M, Lievens D, Weber C, Hundelshausen P von, Gerdes N. Immune-mediated and lipid-mediated platelet function in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2015; 26(5):438–48. doi: 10.1097/MOL.0000000000000212.
14. Poston RN. Atherosclerosis: integration of its pathogenesis as a self-perpetuating propagating inflammation: a review. *Cardiovasc Endocrinol Metab* 2019; 8(2):51–61. doi: 10.1097/XCE.0000000000000172.
15. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(5):812–9. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.159327.
16. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; 86(2):515–81. doi: 10.1152/physrev.00024.2005.
17. Otsuka F, Kramer MC, Woudstra P, Yahagi K, Ladich E, Finn AV, Winter RJ de, Kolodgie FD, Wight TN, Davis HR, Joner M, Virmani R. Natural Progression of Atherosclerosis from Pathologic Intimal Thickening to Late Fibroatheroma in Human Coronary Arteries: A Pathology Study. *Atherosclerosis* 2015; 241(2):772–82. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.011.
18. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(5):1159–65. doi: 10.1161/ATVBAHA.106.134080.
19. Perrotta I, Perri E. Ultrastructural, Elemental and Mineralogical Analysis of Vascular Calcification in Atherosclerosis. *Microsc Microanal* 2017; 23(5):1030–9. doi: 10.1017/S1431927617012533.
20. Zeiher AM, Schächinger V, Saubier B, Just H. Assessment of endothelial modulation of coronary vasomotor tone: insights into a fundamental functional disturbance in vascular biology of atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 1994; 89 Suppl 1:115–28. doi: 10.1007/978-3-642-85660-0_11.
21. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 2014; 114(12):1852–66. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.
22. Otsuka F, Yasuda S, Noguchi T, Ishibashi-Ueda H. Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther* 2016; 6(4):396–408. doi: 10.21037/cdt.2016.06.01.
23. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2):115–26. doi: 10.1056/NEJM199901143400207.
24. Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 2016; 118(4):620–36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
25. Wu M-Y, Li C-J, Hou M-F, Chu P-Y. New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2017; 18(10). doi: 10.3390/ijms18102034.

26. Haverich A, Boyle EC. Atherosclerosis Risk Factors. In: Haverich A, Boyle EC, Hrsg. *Atherosclerosis Pathogenesis and Microvascular Dysfunction*. Cham: Springer International Publishing; 2019. S. 9–45 Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-030-20245-3_2.
27. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, Backer GG de, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen M-R, Tokgozoglul, Wiklund O. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2020; 41(1):111–88. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455.
28. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407(6801):233–41. doi: 10.1038/35025203.
29. Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, Tedgui A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S364-9. doi: 10.1194/jlr.R800092-JLR200.
30. Albany CJ, Trevelin SC, Giganti G, Lombardi G, Scottà C. Getting to the Heart of the Matter: The Role of Regulatory T-Cells (Tregs) in Cardiovascular Disease (CVD) and Atherosclerosis. *Front Immunol* 2019; 10:2795. doi: 10.3389/fimmu.2019.02795.
31. Moroni F, Ammirati E, Norata GD, Magnoni M, Camici PG. The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis. *Mediators Inflamm* 2019; 2019:7434376. doi: 10.1155/2019/7434376.
32. Drechsler M, Duchene J, Soehnlein O. Chemokines control mobilization, recruitment, and fate of monocytes in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35(5):1050–5. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304649.
33. E. Idzkowska, A. Eljaszewicz, P. Miklasz, W. J. Musial, A. M. Tycinska, M. Moniuszko. The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scandinavian Journal of Immunology* 2015; 82(3):163–73. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/sji.12314>.
34. Jaipersad AS, Lip GYH, Silverman S, Shantsila E. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63(1):1–11. doi: 10.1016/j.jacc.2013.09.019.
35. Bobryshev YV, Ivanova EA, Chistiakov DA, Nikiforov NG, Orekhov AN. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Res Int* 2016; 2016:9582430. doi: 10.1155/2016/9582430.
36. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Nikiforov NG, Elizova NV, Sobenin IA, Orekhov AN. Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. *International Journal of Cardiology* 2015; 184:436–45. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.03.055.
37. Yassine H, Tappin K, Sethi MJ. Basics in Lipoprotein Metabolism. In: Yassine H, Hrsg. *Lipid Management: From Basics to Clinic*. Cham: Springer International

Publishing; 2015. S. 1–16 Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-319-11161-2_1.

38. Biggerstaff KD, Wooten JS. Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. *Adv Physiol Educ* 2004; 28(1-4):105–6. doi: 10.1152/advan.00048.2003.
39. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 2007; 116(16):1832–44. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890.
40. Di Angelantonio E, Gao P, Pennells L, Kaptoge S, Caslake M, Thompson A, Butterworth AS, Sarwar N, Wormser D, Saleheen D, Ballantyne CM, Psaty BM, Sundström J, Ridker PM, Nagel D, Gillum RF, Ford I, Ducimetiere P, Kiechl S, Koenig W, Dullaart RPF, Assmann G, D'Agostino RB, Dagenais GR, Cooper JA, Kromhout D, Onat A, Tipping RW, Gómez-de-la-Cámara A, Rosengren A, Sutherland SE, Gallacher J, Fowkes FGR, Casiglia E, Hofman A, Salomaa V, Barrett-Connor E, Clarke R, Brunner E, Jukema JW, Simons LA, Sandhu M, Wareham NJ, Khaw K-T, Kauhanen J, Salonen JT, Howard WJ, Nordestgaard BG, Wood AM, Thompson SG, Boekholdt SM, Sattar N, Packard C, Gudnason V, Danesh J. Lipid-related markers and cardiovascular disease prediction. *JAMA* 2012; 307(23):2499–506. doi: 10.1001/jama.2012.6571.
41. Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, Ziada KM, Hobbs RE, McCarthy PM, Young JB, Nissen SE. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 2001; 103(22):2705–10. doi: 10.1161/01.cir.103.22.2705.
42. McGill HC, McMahan C. Determinants of atherosclerosis in the young. *The American Journal of Cardiology* 1998; 82(10):30–6. doi: 10.1016/S0002-9149(98)00720-6.
43. Davies H. Atherogenesis and the coronary arteries of childhood. *International Journal of Cardiology* 1990; 28(3):283–91. doi: 10.1016/0167-5273(90)90310-2.
44. Chourdakis M, Buderus S, Dokoupil K, Oberhoffer r, Schwab KO, Wolf M et al. S2k-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von Hyperlipidämien bei Kindern und Jugendlichen: Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS); 2015. Verfügbar unter: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/027-068.html>.
45. Dalen JE, Devries S. Diets to prevent coronary heart disease 1957-2013: what have we learned? *Am J Med* 2014; 127(5):364–9. doi: 10.1016/j.amjmed.2013.12.014.
46. Mente A, Koning L de, Shannon HS, Anand SS. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2009; 169(7):659–69. doi: 10.1001/archinternmed.2009.38.
47. Forouhi NG, Krauss RM, Taubes G, Willett W. Dietary fat and cardiometabolic health: evidence, controversies, and consensus for guidance. *BMJ* 2018; 361:k2139. doi: 10.1136/bmj.k2139.
48. Schwingshackl L, Bogensberger B, Benčić A, Knüppel S, Boeing H, Hoffmann G. Effects of oils and solid fats on blood lipids: a systematic review and network meta-analysis. *J Lipid Res* 2018; 59(9):1771–82. doi: 10.1194/jlr.P085522.

49. Ferrières J. Effects on coronary atherosclerosis by targeting low-density lipoprotein cholesterol with statins. *Am J Cardiovasc Drugs* 2009; 9(2):109–15. doi: 10.1007/BF03256582.
50. Foks AC, Frodermann V, ter Borg M, Habets KLL, Bot I, Zhao Y, van Eck M, van Berkel TJC, Kuiper J, van Puijvelde GHM. Differential effects of regulatory T cells on the initiation and regression of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2011; 218(1):53–60. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.029.
51. Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, Daemen MJ, Demer LL, Hegele RA, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, Watts GF, Bruckert E, Fazio S, Ference BA, Graham I, Horton JD, Landmesser U, Laufs U, Masana L, Pasterkamp G, Raal FJ, Ray KK, Schunkert H, Taskinen M-R, van de Sluis B, Wiklund O, Tokgozoglu L, Catapano AL, Ginsberg HN. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* 2020; 41(24):2313–30. Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/41/24/2313/5735221>.
52. Silverman MG, Ference BA, Im K, Wiviott SD, Giugliano RP, Grundy SM, Braunwald E, Sabatine MS. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 2016; 316(12):1289–97. doi: 10.1001/jama.2016.13985.
53. Boekholdt SM, Hovingh GK, Mora S, Arsenault BJ, Amarencu P, Pedersen TR, LaRosa JC, Waters DD, DeMicco DA, Simes RJ, Keech AC, Colquhoun D, Hitman GA, Betteridge DJ, Clearfield MB, Downs JR, Colhoun HM, Gotto AM, Ridker PM, Grundy SM, Kastelein JJP. Very low levels of atherogenic lipoproteins and the risk for cardiovascular events: a meta-analysis of statin trials. *J Am Coll Cardiol* 2014; 64(5):485–94. doi: 10.1016/j.jacc.2014.02.615.
54. Di Bartolo BA, Psaltis PJ, Bursill CA, Nicholls SJ. Translating Evidence of HDL and Plaque Regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38(9):1961–8. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.307026.
55. März W, Kleber ME, Scharnagl H, Speer T, Zewinger S, Ritsch A, Parhofer KG, Eckardstein A von, Landmesser U, Laufs U. HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. *Clin Res Cardiol* 2017; 106(9):663–75. doi: 10.1007/s00392-017-1106-1.
56. Alberts AW. Effects of HMG CoA Reductase Inhibitors on Cholesterol Synthesis. *Drug Invest* 1990; 2(S2):9–17. doi: 10.1007/BF03258189.
57. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res* 2017; 120(1):229–43. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308537.
58. Simons LA. An updated review of lipid-modifying therapy. *Med J Aust* 2019; 211(2):87–92. doi: 10.5694/mja2.50142.
59. Barrington WT, Luscis AJ. Atherosclerosis: Association between the gut microbiome and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2017; 14(12):699–700. doi: 10.1038/nrcardio.2017.169.

60. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res* 2014; 88:3–11. doi: 10.1016/j.phrs.2014.03.002.
61. Barrios-González J, Pérez-Sánchez A, Bibián ME. New knowledge about the biosynthesis of lovastatin and its production by fermentation of *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020; 104(21):8979–98. doi: 10.1007/s00253-020-10871-x.
62. Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *The American Journal of Cardiology* 2003; 91(4):4–8. doi: 10.1016/S0002-9149(02)03267-8.
63. Jain MK, Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(12):977–87. doi: 10.1038/nrd1901.
64. Trompet S, Postmus I, Slagboom PE, Heijmans BT, Smit RAJ, Maier AB, Buckley BM, Sattar N, Stott DJ, Ford I, Westendorp RGJ, Craen AJM de, Jukema JW. Non-response to (statin) therapy: the importance of distinguishing non-responders from non-adherers in pharmacogenetic studies. *Eur J Clin Pharmacol* 2015; 72:431–7. doi: 10.1007/s00228-015-1994-9.
65. Vicki F, Sinclair F, Wang H, Dailey D, Hsu J, Shaber R. Patients' Perspectives on Nonadherence to Statin Therapy: A Focus-Group Study. *Perm J* 2010; 14(1):4–10.
66. Chasman DI, Giulianini F, MacFadyen J, Barratt BJ, Nyberg F, Ridker PM. Genetic determinants of statin-induced low-density lipoprotein cholesterol reduction: the Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) trial. *Circ Cardiovasc Genet* 2012; 5(2):257–64. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.961144.
67. Tarn DM, Barrientos M, Pletcher MJ, Cox K, Turner J, Fernandez A, Schwartz JB. Perceptions of Patients with Primary Nonadherence to Statin Medications. *J Am Board Fam Med* 2021; 34(1):123–31. doi: 10.3122/jabfm.2021.01.200262.
68. Duprez DA, Handelsman Y, Koren M. Cardiovascular Outcomes and Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Inhibitors: Current Data and Future Prospects. *Vasc Health Risk Manag* 2020; 16:403–18. doi: 10.2147/VHRM.S261719.
69. Tsouka AN, Tellis CC, Tselepis AD. Pharmacology of PCSK9 Inhibitors: Current Status and Future Perspectives. *Curr Pharm Des* 2018; 24(31):3622–33. doi: 10.2174/1381612824666181010144823.
70. Katzmann JL, Gouni-Berthold I, Laufs U. PCSK9 Inhibition: Insights From Clinical Trials and Future Prospects. *Front Physiol* 2020; 11:595819. doi: 10.3389/fphys.2020.595819.
71. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bittner VA, Diaz R, Edelberg JM, Goodman SG, Hanotin C, Harrington RA, Jukema JW, Lecorps G, Mahaffey KW, Moryusef A, Pordy R, Quintero K, Roe MT, Sasiela WJ, Tamby J-F, Tricoci P, White HD, Zeiher AM. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med* 2018; 379(22):2097–107. doi: 10.1056/NEJMoa1801174.
72. Cho KH, Hong YJ. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition in cardiovascular disease: current status and future perspectives. *Korean J Intern Med* 2020; 35(5):1045–58. doi: 10.3904/kjim.2020.140.

73. Ray KK, Landmesser U, Leiter LA, Kallend D, Dufour R, Karakas M, Hall T, Troquay RPT, Turner T, Visseren FLJ, Wijngaard P, Wright RS, Kastelein JJP. Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med* 2017; 376(15):1430–40. doi: 10.1056/NEJMoa1615758.
74. Patel SB. Ezetimibe: A Novel Cholesterol-lowering Agent that Highlights Novel Physiologic Pathways. *Curr Cardiol Rep* 2004; 6(6):439–42.
75. Zhan S, Tang M, Liu F, Xia P, Shu M, Wu X. Ezetimibe for the prevention of cardiovascular disease and all-cause mortality events. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 11:CD012502. doi: 10.1002/14651858.CD012502.pub2.
76. Chapman MJ, Redfern JS, McGovern ME, Giral P. Niacin and fibrates in atherogenic dyslipidemia: pharmacotherapy to reduce cardiovascular risk. *Pharmacol Ther* 2010; 126(3):314–45. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.01.008.
77. Mazidi M, Rezaie P, Karimi E, Kengne AP. The effects of bile acid sequestrants on lipid profile and blood glucose concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Cardiology* 2017; 227:850–7. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.10.011.
78. Blödt K. A new player in the fight against dyslipidemia - bempedoic acid. *Vasa* 2021; 50(2):159. doi: 10.1024/0301-1526/a000930.
79. Rubino J, MacDougall DE, Sterling LR, Hanselman JC, Nicholls SJ. Combination of bempedoic acid, ezetimibe, and atorvastatin in patients with hypercholesterolemia: A randomized clinical trial. *Atherosclerosis* 2021; 320:122–8. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.12.023.
80. Ballantyne CM, Banach M, Mancini GB, Lepor NE, Hanselman JC, Zhao X, La Leiter. Efficacy and safety of bempedoic acid added to ezetimibe in statin-intolerant patients with hypercholesterolemia: A randomized, placebo-controlled study. *Atherosclerosis* 2018; 277. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29910030/>.
81. Ballantyne CM, Laufs U, Ray KK, Leiter LA, Bays HE, Goldberg AC, Stroes ES, MacDougall D, Zhao X, Catapano AL. Bempedoic acid plus ezetimibe fixed-dose combination in patients with hypercholesterolemia and high CVD risk treated with maximally tolerated statin therapy. *Eur J Prev Cardiol* 2020; 27(6):593–603. doi: 10.1177/2047487319864671.
82. Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res* 2017; 120(7):1183–96. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.
83. Tang WHW, Hazen SL. The Gut Microbiome and Its Role in Cardiovascular Diseases. *Circulation* 2017; 135(11):1008–10. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024251.
84. Tang WHW, Bäckhed F, Landmesser U, Hazen SL. Intestinal Microbiota in Cardiovascular Health and Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 2019; 73(16):2089–105. doi: 10.1016/j.jacc.2019.03.024.
85. Ahmad AF, Dwivedi G, O'Gara F, Caparros-Martin J, Ward NC. The gut microbiome and cardiovascular disease: current knowledge and clinical potential. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019; 317(5):H923-H938. doi: 10.1152/ajpheart.00376.2019.

86. Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, Zeller G, Telzerow A, Anderson EE, Brochado AR, Fernandez KC, Dose H, Mori H, Patil KR, Bork P, Typas A. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* 2018; 555(7698):623–8. doi: 10.1038/nature25979.
87. Hirschberg S, Gisevius B, Duscha A, Haghikia A. Implications of Diet and The Gut Microbiome in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 2019; 20(12). doi: 10.3390/ijms20123109.
88. Dahlin M, Prast-Nielsen S. The gut microbiome and epilepsy. *EBioMedicine* 2019; 44:741–6. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.024.
89. Knox NC, Forbes JD, Peterson C-L, van Domselaar G, Bernstein CN. The Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Lessons Learned From Other Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Am J Gastroenterol* 2019; 114(7):1051–70. doi: 10.14309/ajg.0000000000000305.
90. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, van Hul M, Vieira-Silva S, Falony G, Raes J, Maiter D, Delzenne NM, Barys M de, Loumayer A, Hermans MP, Thissen J-P, Vos WM de, Cani PD. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med* 2019; 25(7):1096–103. doi: 10.1038/s41591-019-0495-2.
91. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warrier M, Brown JM, Krauss RM, Tang WHW, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013; 19(5):576–85. doi: 10.1038/nm.3145.
92. Jie Z, Xia H, Zhong S-L, Feng Q, Li S, Liang S, Zhong H, Liu Z, Gao Y, Zhao H, Zhang D, Su Z, Fang Z, Lan Z, Li J, Xiao L, Li J, Li R, Li X, Li F, Ren H, Huang Y, Peng Y, Li G, Wen B, Dong B, Chen J-Y, Geng Q-S, Zhang Z-W, Yang H, Wang J, Wang J, Zhang X, Madsen L, Brix S, Ning G, Xu X, Liu X, Hou Y, Jia H, He K, Kristiansen K. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Commun* 2017; 8(1):845. doi: 10.1038/s41467-017-00900-1.
93. Europäische Kommission. VERORDNUNG (EU) Nr. 966/2014 DER KOMMISSION: zur Änderung des Anhangs der Verordnung (EU) Nr. 231/2012 mit Spezifikationen für die in den Anhängen II und III der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates aufgeführten Lebensmittelzusatzstoffe hinsichtlich der Spezifikationen für Calciumpropionat: Amt für Veröffentlichungen der Europäischen Union; 2014 [Stand: 27.05.2020]. Verfügbar unter: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2014/966/oj?locale=de>.
94. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikly S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudensky AY. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013; 504(7480):451–5. doi: 10.1038/nature12726.
95. Haghikia A, Jörg S, Duscha A, Berg J, Manzel A, Waschbisch A, Hammer A, Lee D-H, May C, Wilck N, Balogh A, Ostermann AI, Schebb NH, Akkad DA, Grohme DA, Kleinewietfeld M, Kempa S, Thöne J, Demir S, Müller DN, Gold R, Linker RA. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity* 2015; 43(4):817–29. doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.007.

96. Duscha A, Gisevius B, Hirschberg S, Yissachar N, Stangl GI, Eilers E, Bader V, Haase S, Kaisler J, David C, Schneider R, Troisi R, Zent D, Hegelmaier T, Dokalis N, Gerstein S, Del Mare-Roumani S, Amidror S, Staszewski O, Poschmann G, Stühler K, Hirche F, Balogh A, Kempa S, Träger P, Zaiss MM, Holm JB, Massa MG, Nielsen HB, Faissner A, Lukas C, Gatermann SG, Scholz M, Przuntek H, Prinz M, Forslund SK, Winklhofer KF, Müller DN, Linker RA, Gold R, Haghikia A. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell* 2020; 180(6):1067-1080.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.035.
97. Al-Lahham S, Roelofsen H, Rezaee F, Weening D, Hoek A, Vonk R, Venema K. Propionic acid affects immune status and metabolism in adipose tissue from overweight subjects. *European journal of clinical investigation* 2012; 42(4). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21913915/>.
98. Psichas A, Sleeth ML, Murphy KG, Brooks L, Bewick GA, Hanyaloglu AC, Ghatei MA, Bloom SR, Frost G. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int J Obes (Lond)* 2015; 39(3):424–9. doi: 10.1038/ijo.2014.153.
99. Tirosh A, Calay ES, Tuncman G, Claiborn KC, Inouye KE, Eguchi K, Alcalá M, Rathaus M, Hollander KS, Ron I, Livne R, Heianza Y, Qi L, Shai I, Garg R, Hotamisligil GS. The short-chain fatty acid propionate increases glucagon and FABP4 production, impairing insulin action in mice and humans. *Sci Transl Med* 2019; 11(489). doi: 10.1126/scitranslmed.aav0120.
100. Bartolomaeus H, Balogh A, Yakoub M, Homann S, Markó L, Höges S, Tsvetkov D, Krannich A, Wundersitz S, Avery EG, Haase N, Kräker K, Hering L, Maase M, Kusche-Vihrog K, Grandoch M, Fielitz J, Kempa S, Gollasch M, Zhumadilov Z, Kozhakhmetov S, Kushugulova A, Eckardt K-U, Dechend R, Rump LC, Forslund SK, Müller DN, Stegbauer J, Wilck N. Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage. *Circulation* 2019; 139(11):1407–21. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036652.
101. Han J-H, Kim I-S, Jung S-H, Lee S-G, Son H-Y, Myung C-S. The effects of propionate and valerate on insulin responsiveness for glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes via G protein-coupled receptor 41. *PLoS ONE* 2014; 9(4):e95268. doi: 10.1371/journal.pone.0095268.
102. Panizza R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag* 2015; 11:133–48. doi: 10.2147/VHRM.S44469.
103. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. *Journal of Pharmacological Methods* 1980; 3(2):135–58. doi: 10.1016/0160-5402(80)90024-8.
104. Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *Int J Mol Sci* 2017; 18(8). doi: 10.3390/ijms18081803.
105. van Buuren S, Groothuis-Oudshoorn K. mice : Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *J. Stat. Soft.* 2011; 45(3). doi: 10.18637/jss.v045.i03.
106. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, Golemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen T, Miller E, Bache S, Müller K,

- Ooms J, Robinson D, Seidel D, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H. Welcome to the Tidyverse. *JOSS* 2019; 4(43):1686. doi: 10.21105/joss.01686.
107. Haghikia A, Zimmermann F, Schumann P, Jasina A, Roessler J, Schmidt D, Heinze P, Kaisler J, Nageswaran V, Aigner A, Ceglarek U, Cineus R, Hegazy AN, van der Vorst EPC, Döring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Kränkel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Müller DN, Gold R, Bäckhed F, Hazen SL, Haghikia A, Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *Eur Heart J* 2022; 43(6):518–33. doi: 10.1093/eurheartj/ehab644.
 108. THACKER PA, SALOMONS MO, AHERNE FX, MILLIGAN LP, BOWLAND JP. INFLUENCE OF PROPIONIC ACID ON THE CHOLESTEROL METABOLISM OF PIGS FED HYPERCHOLESTEROLEMIC DIETS. *Can. J. Anim. Sci.* 1981; 61(4):969–75. doi: 10.4141/cjas81-119.
 109. Demigné C, Morand C, Levrat MA, Besson C, Moundras C, Rémésy C. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr* 1995; 74(2):209–19. doi: 10.1079/bjn19950124.
 110. Nishina PM, Freedland RA. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr* 1990; 120(7):668–73. doi: 10.1093/jn/120.7.668.
 111. Wright RS, Anderson JW, Bridges SR. Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 195(1):26–9. doi: 10.3181/00379727-195-43113.
 112. Lemieux I, Lamarche B, Couillard C, Pascot A, Cantin B, Bergeron J, Dagenais GR, Després JP. Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: the Quebec Cardiovascular Study. *Arch Intern Med* 2001; 161(22):2685–92. doi: 10.1001/archinte.161.22.2685.
 113. Berggren AM, Nyman EM, Lundquist I, Björck IM. Influence of orally and rectally administered propionate on cholesterol and glucose metabolism in obese rats. *Br J Nutr* 1996; 76(2):287–94. doi: 10.1079/bjn19960032.
 114. Zhao Y, Liu J, Hao W, Zhu H, Liang N, He Z, Ma KY, Chen Z-Y. Structure-Specific Effects of Short-Chain Fatty Acids on Plasma Cholesterol Concentration in Male Syrian Hamsters. *J Agric Food Chem* 2017; 65(50):10984–92. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04666.
 115. Ilhan F, Kalkanli ST. Atherosclerosis and the role of immune cells. *World J Clin Cases* 2015; 3(4):345–52. doi: 10.12998/wjcc.v3.i4.345.
 116. Taams LS, Vukmanovic-Stejic M, Smith J, Dunne PJ, Fletcher JM, Plunkett FJ, Ebeling SB, Lombardi G, Rustin MH, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, Salmon M, Akbar AN. Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32(6):1621. doi: 10.1002/1521-4141(200206)32:6<1621::AID-IMMU1621>3.0.CO;2-Q.
 117. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson A-KL, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D,

- Tedgui A, Mallat Z. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006; 12(2):178–80. doi: 10.1038/nm1343.
118. Hristov M, Weber C. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011; 106(5):757–62. doi: 10.1160/TH11-07-0500.
119. Herrero-Fernandez B, Gomez-Bris R, Somovilla-Crespo B, Gonzalez-Granado JM. Immunobiology of Atherosclerosis: A Complex Net of Interactions. *Int J Mol Sci* 2019; 20(21). doi: 10.3390/ijms20215293.
120. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017; 377(12):1119–31. doi: 10.1056/NEJMoa1707914.
121. Hosseini E, Grootaert C, Verstraete W, Van dWT. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutrition reviews* 2011; 69(5). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21521227/>.
122. Safety of the extension of use of sodium propionate (E 281) as a food additive. *EFS2* 2016; 14(8). doi: 10.2903/j.efsa.2016.4546.
123. Paffen E, DeMaat MPM. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovasc Res* 2006; 71(1):30–9. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.03.004.
124. Truax AD, Chen L, Tam JW, Cheng N, Guo H, Koblansky AA, Chou W-C, Wilson JE, Brickey WJ, Petrucelli A, Liu R, Cooper DE, Koenigsknecht MJ, Young VB, Netea MG, Stienstra R, Sartor RB, Montgomery SA, Coleman RA, Ting JP-Y. The Inhibitory Innate Immune Sensor NLRP12 Maintains a Threshold against Obesity by Regulating Gut Microbiota Homeostasis. *Cell Host Microbe* 2018; 24(3):364-378.e6. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.009.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Paul Schumann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Cholesterin-senkenden Wirkung der kurzkettigen Fettsäure Propionat“ / „Investigations into the cholesterol-lowering effect of the short-chain fatty acid propionate.“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Paul Schumann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Arash Haghikia, Friederike Zimmermann, **Paul Schumann**, Andrzej Jasina, Johann Roessler, David Schmidt, Philipp Heinze, Johannes Kaisler, Vanasa Nageswaran, Annette Aigner, Uta Ceglarek, Roodline Cineus, Ahmed N Hegazy, Emiel P C van der Vorst, Yvonne Döring, Christopher M Strauch, Ina Nemet, Valentina Tremaroli, Chinmay Dwibedi, Nicolle Kränkel, David M Leistner, Markus M Heimesaat, Stefan Bereswill, Geraldine Rauch, Ute Seeland, Oliver Soehnlein, Dominik N Müller, Ralf Gold, Fredrik Bäckhed, Stanley L Hazen, Aiden Haghikia, Ulf Landmesser, "Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism" European Heart Journal, 2022

Beitrag im Einzelnen:

Verantwortlich für die Organisation und Durchführung jeglicher Datengewinnung durch die klinischen Human-Studie und dem darin gewonnen Untersuchungsmaterial war Paul Schumann. Explizit sind hier Probengewinnung, die labortechnischen Analyse mittels Durchflusszytometrie und Thrombozytenaggregationsdiagnostik sowie Auswertung und Bewertung der Ergebnisse aufzuführen. Hieraus entstanden unter anderem Tabelle 1, 2, und Abbildungen 6, 7 sowie die daraus abgeleiteten Ergebnisse (sowie weitere Daten im Anhang der Publikation).

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Journal-Artikel mit Peer-review-Verfahren

Publikation 1: Haghikia A, Zimmermann F, **Schumann P**, Jasina A, Roessler J, Schmidt D, Heinze P, Kaisler J, Nageswaran V, Aigner A, Ceglarek U, Cineus R, Hegazy AN, van der Vorst EPC, Döring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Kränkel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Müller DN, Gold R, Bäckhed F, Hazen SL, Haghikia A, Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. Eur Heart J. 2022 Feb 10;43(6):518-533

Publikation 2: Zimmermann F, Roessler J, Schmidt D, Jasina A, **Schumann P**, Gast M, Poller W, Leistner D, Giral H, Kränkel N, Kratzer A, Schuchardt S, Heimesaat MM, Landmesser U, Haghikia A. Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids. J Clin Med. 2020 May 25;9(5):1596

Publikation 3: Gast M, Rauch BH, Haghikia A, Nakagawa S, Haas J, Stroux A, Schmidt D, **Schumann P**, Weiss S, Jensen L, Kratzer A, Kraenkel N, Müller C, Börnigen D, Hirose T, Blankenberg S, Escher F, Kühl AA, Kuss AW, Meder B, Landmesser U, Zeller T, Poller W. Long noncoding RNA NEAT1 modulates immune cell functions and is suppressed in early onset myocardial infarction patients. Cardiovasc Res. 2019 Nov 1;115(13):1886-1906

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich besonders bei PD Dr. med. Arash Haghikia, meinem Betreuer, für sein Vertrauen in mich und die intensive fachliche und persönliche Betreuung bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Professor Dr. Ulf Landmesser für die Möglichkeit meine Dissertation in der Klinik für Kardiologie am Campus Benjamin Franklin der Charité absolvieren zu können und seine stimulierenden Anregungen während der Studie.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Mitdoktoranden David Schmidt, Friederike Zimmermann, Philipp Heinze, Vanasa Nageswaran, Andrzej Jasina und Johann Rössler der Arbeitsgruppe Haghikia für die intensive Zusammenarbeit sowie Rat und Tat über die Jahre.

Vielen Dank auch an das gesamte Laborteam der AG Landmesser, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Abschließend danke ich meiner Familie, Freunden und allen die mich auf diesem Weg begleitet haben für den emotionalen Rückhalt sowie Leona Faulstich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie (IBiKE)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzschka

Name, Vorname: Schumann, Paul

E-mailadresse: paul.schumann@charite.de

Matrikelnummer: 224646

PromotionsbetreuerIn: PD Dr. Arash Haghikia

Promotionsinstitution/ Klinik: Medizinische Klinik für Kardiologie, CBF

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin
Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietzschka@charite.de
<https://biometrie.charite.de>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Paul Schumann innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie (IBiKE) bei meinem Kollegen Herrn Klaus Lenz und mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

Termin 1: 6.2.2019; Termin 2: 2.12.2022; Termin 3: 28.3.2023

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Es handelt sich um eine verblindete randomisierte klinische Phase 2b Studie, die in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie geplant und ausgewertet wurde.
- Zur Deskription eignen sich Tabellen, stratifiziert nach Behandlungsgruppe. Kontinuierliche Parameter können mit Mittelwert und Standardabweichung oder Median und Interquartilsabstand beschrieben werden, kategoriale Variablen mit relativen und absoluten Häufigkeiten. Grafisch eignen sich vor allem Boxplots getrennt nach Gruppen, unter anderem für den primären Endpunkt LDL-Cholesterin, sowie für alle kontinuierlichen sekundären Endpunkte.
- Das zu verwendende Modell für den primären Endpunkt ist eine Analysis of Covariance (ANCOVA), wobei die abhängige Variable die Differenz von Visite 3 zur Baseline-Visite ist, die unabhängigen Variablen die Behandlungsgruppe sowie die Baseline-Messung des LDL-Cholesterin. Hierbei ist dann die Annahme der Normalverteilung der Residuen zu überprüfen.
- Sekundäre Endpunkte können mit ähnlichen Verfahren ausgewertet, wenn die Annahmen der Modelle erfüllt sind. Hierbei ist aber zu beachten, dass diese Auswertungen als explorativ angesehen werden und dementsprechend interpretiert werden müssen.
- Im Fall von fehlenden Werten sollen verschiedene Methoden verwendet werden: eine complete case Analyse (basierend auf alle vorhandenen Datenpunkten), eine multiple Imputation für die gesamte Stichprobe, sowie eine multiple Imputation separat für die Behandlungsgruppen

Diese Bescheinigung garantiert weder die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren noch die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 18.4.2023

Name des Beraters/ der Beraterin: Annette Aigner, PhD