

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

**Assoziation von Lipoproteinen mit Neutrophil Extracellular Traps in
Patient:innen mit abdominellem Aortenaneurysma**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Annika Brandau
aus Hamburg

Hamburg 2023

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.06.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Yskert von Kodolitsch

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda

Inhaltsverzeichnis

Gliederung	Seite
Artikel	4
Darstellung der Publikation	20
Zusammenfassung der Publikation in deutscher und englischer Sprache	28
Erklärung des Eigenanteils	29
Danksagung	30
Lebenslauf	31
Eidesstattliche Erklärung	32
Bibliographie	33



Article

Association of Lipoproteins with Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm

Annika Brandau, Nahla Ibrahim, Johannes Klopff, Hubert Hayden, Maria Ozsvar-Kozma, Taras Afonyushkin, Sonja Bleichert, Lukas Fuchs, Viktoria Watzinger, Verena Nairz et al.

Special Issue

Neutrophils. Fast and Strong

Edited by

Prof. Dr. Galina F. Sud'ina



<https://doi.org/10.3390/biomedicines10020217>

Article

Association of Lipoproteins with Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm

Annika Brandau ¹, Nahla Ibrahim ¹, Johannes Klopf ¹, Hubert Hayden ¹, Maria Ozsvár-Kozma ², Taras Afonyushkin ², Sonja Bleichert ¹, Lukas Fuchs ¹, Viktoria Watzinger ¹, Verena Nairz ¹, Emely Manville ¹, Veronika Kessler ¹, Herbert Stangl ³, Wolf Eilenberg ¹, Christoph Neumayer ¹ and Christine Brostjan ^{1,*}

- ¹ Division of Vascular Surgery, Department of General Surgery, Medical University of Vienna, Vienna General Hospital, 1090 Vienna, Austria; AnnikaBrandau@gmx.de (A.B.); nahla.ibrahim@nyu.edu (N.I.); johannes.klopf@meduniwien.ac.at (J.K.); hubert.hayden@meduniwien.ac.at (H.H.); sonja.bleichert@meduniwien.ac.at (S.B.); n1248453@students.meduniwien.ac.at (L.F.); vickywatzi@gmail.com (V.W.); verenanairz@gmail.com (V.N.); emely.manville@hotmail.com (E.M.); veronika.kessler@gmail.com (V.K.); wolf.eilenberg@meduniwien.ac.at (W.E.); christoph.neumayer@meduniwien.ac.at (C.N.)
 - ² Department of Laboratory Medicine, Medical University of Vienna, Vienna General Hospital, 1090 Vienna, Austria; maria.ozsvarkozma@meduniwien.ac.at (M.O.-K.); taras.afonyushkin@meduniwien.ac.at (T.A.)
 - ³ Center for Pathobiochemistry and Genetics, Department of Medical Chemistry, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria; herbert.stangl@meduniwien.ac.at
- * Correspondence: christine.brostjan@meduniwien.ac.at; Tel.: +43-1-40400-73514



Citation: Brandau, A.; Ibrahim, N.; Klopf, J.; Hayden, H.; Ozsvár-Kozma, M.; Afonyushkin, T.; Bleichert, S.; Fuchs, L.; Watzinger, V.; Nairz, V.; et al. Association of Lipoproteins with Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm. *Biomedicines* **2022**, *10*, 217. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020217>

Academic Editor: Galina F. Sud'ina

Received: 9 December 2021

Accepted: 17 January 2022

Published: 20 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Neutrophil extracellular traps (NETs) are DNA–protein structures released by neutrophils in response to various stimuli, including oxidized, low-density lipoprotein (oxLDL). Accumulating evidence suggests a role for NETs in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm (AAA). In this study, we investigated the potential association of lipoprotein particles and NETs in AAA in comparison to non-AAA control groups. The concentrations of neutrophil myeloperoxidase (MPO), the NET parameters citrullinated histone H3 (citH3) and circulating cell-free DNA (cfDNA), as well as of blood lipids were determined in plasma or serum of patients with AAA ($n = 40$), peripheral artery occlusive disease (PAD; $n = 40$) and healthy donors ($n = 29$). A sandwich ELISA detecting oxidized phosphatidylcholine in association with apolipoprotein B-100 (oxPL/apoB) was applied to measure oxidized phospholipids in circulation. The effect of lipoparticles on NET formation was tested using a DNA release assay with isolated human neutrophils. Plasma MPO, citH3 and cfDNA levels were significantly increased in AAA patients in comparison to healthy donors and PAD patients. Plasma concentrations of citH3 positively correlated with serum oxPL/apoB in AAA patients. In functional *in vitro* assays, the addition of oxLDL induced NET formation in pre-stimulated neutrophils. In conclusion, our data suggest a promoting role of oxLDL on NET formation in AAA patients.

Keywords: abdominal aortic aneurysm; citrullinated histones; lipoproteins; neutrophil extracellular traps; peripheral arterial occlusive disease

1. Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a precarious condition, as patients are often asymptomatic, while the risk of rupture remains a constant threat and leads to death in 80% of cases [1]. Therefore, it is vital to further improve our knowledge on the pathogenesis of this aortic dilatation, so that future therapies can have a causal mode of action and be effective before surgery is indicated.

It is known that immune cells, particularly neutrophils, accumulate in the intraluminal thrombus and adventitia of the AAA and contribute to the progression of disease [2]. Neutrophils release proteolytic enzymes and cause oxidative stress, thereby promoting the degradation of elastin fibers and the death of smooth muscle cells in the aortic wall [3,4].

Activated neutrophils can form neutrophil extracellular traps (NETs), which are part of the innate immune response in pathogen defense [5]. They are also implicated in disease states of chronic inflammation such as atherosclerosis and AAA [6,7]. The backbone of NETs is the expelled, negatively charged nuclear DNA (chromatin). Due to the web-like structure, NETs function in the containment of pathogens. For the release of chromatin, DNA has to be decondensed, which is promoted by the modification of histones, such as citrullination via peptidylarginine deiminase 4 [8,9]. Hence, citrullinated histone H3 (citH3) is considered a marker of NET formation. Moreover, NETs consist of many antimicrobial substances such as neutrophil elastase, myeloperoxidase (MPO) and other neutrophil proteins that are able to degrade virulence factors and kill bacteria [10,11].

Since NETs are not only involved beneficially in the antimicrobial defense but also adversely contribute to the pathogenesis of various disorders, in particular cardiovascular diseases (CVDs), they have been investigated in patients and preclinical disease models of CVDs [12,13]. NETs and associated circulating blood components were found to indicate severe coronary atherosclerosis in a prothrombotic state [14] as well as the extent and prognosis of myocardial infarction [15,16]. Further studies revealed that NETs are also involved in the pathomechanism of abdominal aortic aneurysms; NET inhibition in a murine AAA model suggested an essential role of NETs in the initial disease phase and identified IL-1 β as an inducer of NET formation [17]. NETs were shown to promote the activation of plasmacytoid dendritic cells and the production of type I interferon, which stimulated AAA development by an increased inflammatory response [18]. In the analysis of human AAA samples, the intraluminal thrombus and also the adventitia were found to be enriched with NETs [19]. We have recently reported on elevated levels of citH3 in the tissue and plasma of AAA patients, which showed considerable potential as a biomarker and target to inhibit the progression of AAAs [20].

In cardiovascular diseases, different triggers of NET release have been identified [12]; elevated shear stress in arteries [21] and cholesterol crystals stimulate neutrophils to release NETs [22]. Activated platelets are able to induce NET formation and in turn, NETs may activate platelets and promote coagulation [23,24]. In vitro, NETs can be triggered by various stimuli, of which the protein kinase C activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), the calcium ionophore A23187 and the endotoxin lipopolysaccharide (LPS) are commonly applied [25,26]. Among the various NET stimuli, the effect of lipoprotein particles on NET formation is of particular interest with respect to atherosclerosis and CVD. Awasthi et al. reported that oxidized, low-density lipoprotein (oxLDL) stimulates the formation of NETs via the TLR–PKC–IRAK–MAPK pathway and the activation of NADPH-oxidase 2 [27]. More recently, Obama et al. showed that oxLDL enhances the PMA-induced NET formation of HL-60 derived neutrophils when cells are pre-incubated with the stimulus, then washed and subsequently exposed to oxLDL [28]. However, in vivo evidence for an association of lipoprotein levels with NET factors in CVD is currently still missing.

In our study, we thus aimed to compare the blood levels of NET and lipid parameters in patients with distinct forms of CVD, i.e., AAA versus peripheral artery occlusive disease (PAD), and in healthy donors. We hypothesized that circulating NET markers might be particularly high in the AAA group and correlate with blood lipid levels, thus indicating a potential in vivo link in this disease. Furthermore, we aimed to test in vitro whether the cardiovascular-harmful oxLDL and the cardiovascular-protective, high-density lipoprotein (HDL) would exert antagonistic effects on NET formation to potentially corroborate in vivo findings.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

The clinical study was approved by the Ethics Committee of the Medical University of Vienna (no. 1729/2014) and conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki (and current amendments). Participants for the three study cohorts were recruited

among Vascular Surgery, Visceral Surgery, Ophthalmology and Urology patients at the Medical University of Vienna, Vienna General Hospital and included 40 AAA patients, 40 PAD patients and 29 healthy controls (Table 1). All gave informed written consent to participate in the study.

Table 1. Demographics of study collectives.

Parameter	Healthy (n = 29)	PAD (n = 40)	AAA (n = 40)	p-Value (Groups)
	<i>n</i> (%)			
Sex (male)	26 (89.7%)	32 (80.0%)	32 (80.0%)	0.336 (H/AAA) 0.336 (H/PAD) 1.000 (PAD/AAA)
Smoker				
<i>never</i>	9 (31.0%)	3 (7.5%)	3 (7.5%)	0.021 (H/AAA)
<i>past</i>	14 (48.3%)	24 (60.0%)	20 (50.0%)	0.036 (H/PAD)
<i>current</i>	6 (20.7%)	13 (32.5%)	17 (42.5%)	0.639 (PAD/AAA)
	median (interquartile range)			
Age (years)	66.6 (12.0)	72.7 (13.0)	71.8 (13.0)	0.123 (H/AAA) 0.243 (H/PAD) 0.630 (PAD/AAA)
Body mass index	26.5 (5.3)	25.9 (4.1)	27.3 (5.6)	0.585 (H/AAA) 0.375 (H/PAD) 0.131 (PAD/AAA)
Pack years	25.0 (31.0)	37.0 (49.5)	40.0 (30.0)	0.066 (H/AAA) 0.073 (H/PAD) 0.942 (PAD/AAA)

p-values refer to group comparisons between the healthy (H), abdominal aortic aneurysm (AAA) and peripheral artery occlusive disease (PAD) collectives by Chi square test or Fisher's exact test for expected frequencies < 5 (categorical variables) or Mann-Whitney U test (metric variables).

Inclusion criterion for AAA patients was the AAA diagnosis with a maximum abdominal aortic diameter of ≥ 3 cm. Conversely, PAD patients with a confirmed hospital disease record were recruited. The healthy cohort was defined as unaffected by cardiovascular burden regarding clinically manifest disease such as myocardial infarction, coronary heart disease, stents and coronary artery bypass grafts (Table 2).

Table 2. Comorbidities of study collectives, *n* (%).

Parameter	Healthy (n = 29)	PAD (n = 40)	AAA (n = 40)	p-Value (Groups)
Hypertension	15 (51.7%)	36 (90.0%)	37 (92.5%)	<0.001 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 1.000 (PAD/AAA)
Hyperlipidemia	8 (27.6%)	37 (92.5%)	35 (87.5%)	<0.001 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.712 (PAD/AAA)
PAD	0 (0%)	40 (100%)	0 (0%)	1.000 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) <0.001 (PAD/AAA)
Coronary heart disease	0 (0%)	17 (42.5%)	20 (50.0%)	<0.001 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.501 (PAD/AAA)

Table 2. Cont.

Parameter	Healthy (n = 29)	PAD (n = 40)	AAA (n = 40)	p-Value (Groups)
Myocardial infarction	0 (0%)	9 (22.5%)	13 (32.5%) *	0.002 (H/AAA) 0.008 (H/PAD) 0.339 (PAD/AAA)
Stent	0 (0%)	24 (60.0%)	9 (22.5%) *	0.014 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.002 (PAD/AAA)
Coronary artery bypass graft	0 (0%)	3 (7.5%)	2 (5.0%)	0.506 (H/AAA) 0.258 (H/PAD) 1.000 (PAD/AAA)
Diabetes mellitus	3 (10.3%)	11 (27.5%)	12 (30.0%)	0.051 (H/AAA) 0.080 (H/PAD) 0.805 (PAD/AAA)
Nephropathy	3 (10.3%)	10 (25.0%)	16 (40.0%)	0.006 (H/AAA) 0.124 (H/PAD) 0.152 (PAD/AAA)
Chronic obstructive pulmonary disease	1 (3.4%)	13 (32.5%)	8 (20.0%)	0.069 (H/AAA) 0.003 (H/PAD) 0.204 (PAD/AAA)
Tumor (past >1 year)	5 (17.2%)	5 (12.5%)	6 (15.0%)	1.000 (H/AAA) 0.732 (H/PAD) 0.745 (PAD/AAA)

p-values refer to group comparisons between the healthy (H), abdominal aortic aneurysm (AAA) and peripheral artery occlusive disease (PAD) collectives by Chi square test or Fisher's exact test for expected frequencies < 5. * indicates a missing entry for 1 AAA patient.

The exclusion criteria for all three cohorts comprised organ transplantation, recent cancer and/or chemotherapy in the past year, autoimmune disease and chronic hematological disease. For the cohorts of AAA patients and healthy controls, the presence of PAD was excluded. Aneurysm morphology of AAA patients was determined using computed tomography angiography (CTA) scans, while healthy controls underwent an ultrasound examination to exclude the possibility of AAA. The PAD cohort had a pelvis/leg CTA scan or comparable imaging in the recent past, which attested to them being negative for AAA.

The demographics of all participants were collected via a structured questionnaire. While AAA patients and healthy controls were only group-matched regarding age and sex, a one-to-one matching was performed for the AAA and PAD patients based on age (± 3 years), sex and occurrence of any previous cardiovascular events (myocardial infarction, coronary heart disease, stents or coronary artery bypass grafts).

2.2. Blood Sampling

Peripheral venous blood was collected from all participants and supplied with an anticoagulant mix of citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole (CTAD) for plasma preparation within 60 min. The CTAD blood sample was centrifuged twice for 10 min at 4 °C (at $1000\times g$, then $10,000\times g$) to obtain platelet-free plasma. Hemolytic samples were discarded. Additionally, serum was prepared after 1–2 h of clotting time and was centrifuged once for 10 min at $1000\times g$ at room temperature. The CTAD plasma and serum samples were stored in aliquots at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further testing.

2.3. Measurement of Blood Parameters via ELISA

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the concentrations of citH3, MPO and oxidized phosphatidylcholine in association with apolipoprotein B-100 (oxPL/apoB) as a measure of oxidized phospholipids and a surrogate of oxLDL in

blood samples. The MPO plasma concentration was quantified with the Human Myeloperoxidase Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). To test the citH3 plasma levels, a previously published ELISA protocol was applied [29]. In brief, 96-well plates were coated overnight at 4 °C with an anti-histone antibody (Cell Death Detection ELISA; Roche, Basel, Switzerland). Plasma samples and internal calibrators were applied in duplicates. Detection was performed using an anti-H3Cit antibody (ab5103, Abcam, Cambridge, UK) and an anti-rabbit horseradish peroxidase conjugate (7074S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). The 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate reaction was stopped by acidification and measured at 450 nm in a Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) with the correction wavelength set to 540 nm.

For the quantification of oxPL/apoB, a 96-well plate (BRAND, immunoGrade, Thermo Fisher Scientific) was coated overnight at 4 °C with the MB47 antibody (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) directed against apolipoprotein B-100. The serum samples and internal calibrators were then applied in triplicates. The E06 biotinylated monoclonal mouse antibody (Avanti Polar Lipids) was added for the detection of oxidation-specific phosphatidylcholine epitopes on phospholipids. Bound antibody was measured with NeutrAvidin conjugated to alkaline phosphatase (Thermo Fisher Scientific) and Lumi-Phos Plus substrate (Lumigen, Southfield, MI, USA) in a BioTec Synergy 2 plate reader (Thermo Fisher Scientific). A more detailed protocol was previously published [30,31]. Of note, outliers (deviation by $\geq 25\%$ from both other values) were eliminated from the triplicate measurements.

The routine serum lipid profile and other clinical blood parameters were assessed by the Vienna General Hospital central laboratory. The differential blood count was determined using a Sysmex hematology analyzer (Sysmex Corp., Kobe, Japan).

2.4. Detection of Circulating Cell-Free Nuclear DNA by Polymerase Chain Reaction

DNA from 190 μ L of citrate plasma was isolated with a DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Levels of circulating cell-free nuclear DNA (cfDNA) were assessed by means of quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with a GoTaq[®] qPCR Master Mix Kit (Promega, Madison, WI, USA) and 200 nM primers amplifying the repetitive nuclear *Arthrobacter luteus* Alu element (forward primer: 5'-TCA CGC CTG TAA TCC CAG CA-3', reverse primer: 5'-GTA TTT TTA GTA GAG ACG GGG TTT C-3'). For normalization, an internal calibrator (prepared from plasma of 20 AAA patients) was applied to each qPCR plate, and its DNA content was set to 1.

2.5. Lipoprotein Isolation and Modification

HDL particles were isolated from plasma, obtained from normo-lipidemic healthy volunteers, using sequential flotation ultracentrifugation [32]. Blood donations were approved by the Ethics Committee of the Medical University of Vienna (no. 1414/2016). Low-density lipoprotein (LDL) was purchased from Sigma Merck (LP2-2 mg), and oxLDL was prepared with CuSO₄ and subsequent dialysis as previously described [33].

2.6. DNA Release Assay

Neutrophils were isolated from peripheral blood of healthy volunteers anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic acid. Blood was layered on a gradient of Histopaque (1077 and 1119, Sigma-Aldrich/ Merck KGaA, Darmstadt, Germany) as previously described [34]. The purity of isolated neutrophils was determined using a Sysmex hematology analyzer (Sysmex Corp., Kobe, Japan) and consistently ranged $>95\%$. A total of 1×10^5 cells in 100 μ L of Hank's balanced salt solution (HBSS) with 0.5% fetal calf serum was seeded in a 96-well plate and then stimulated with 5 μ M of A23187 for 30 min. One sample was left unstimulated as a control. The plate was then centrifuged twice at $800 \times g$ for 5 min at room temperature to remove the supernatant and wash the cells with HBSS before adding 100 μ g/mL oxLDL, native LDL (natLDL) or HDL to the primed cells in a total volume of

300 µL of HBSS with 0.5% fetal calf serum. To quantify the DNA release, 5 µM of SYTOX Green (Thermo Fisher Scientific) was added and fluorescence was measured after 90 min at excitation/emission of 485/520 nm using the VarioSkan plate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

2.7. Statistical Analysis

Statistics were evaluated with SPSS 27.0 software (IBM, Armonk, NY, USA). The significance level was set at $p < 0.05$. For metric data, median values and interquartile range (IQR) were calculated. Non-parametric tests were used to evaluate parameter correlations (Spearman r) and differences between the study groups (Mann–Whitney U test). Categorical variables were interpreted with the help of contingency tables and the Chi-square test or Fisher’s exact test for expected frequencies < 5 .

3. Results

3.1. AAA and PAD Patients Have a Comparable Profile of Comorbidities and Medication While Healthy Controls Differ Significantly

The AAA and PAD cohorts, as well as the healthy donors, showed a comparable distribution (Table 1) regarding age (median 67–73 years), sex (80–90% male) and body mass index (median 25.9–27.3). The healthy controls (H) had a significantly lower percentage of current or past smokers compared to the two CVD cohorts (H: 69%, PAD: 93% and AAA: 93%). Furthermore, the AAA and PAD groups exhibited a similar profile of cardiovascular comorbidities (Table 2) including hypertension (90–93%), dyslipidemia (88–93%), coronary heart disease (43–50%) and myocardial infarction (23–33%). Additionally, diabetes mellitus, nephropathy and chronic obstructive pulmonary disease occurred at a similar frequency in those two cohorts. In contrast, the healthy controls showed a significantly lower prevalence for most of these comorbidities. In line with the recorded comorbidities, the matching medication was more frequently given to AAA and PAD patients in comparison to the healthy cohort; more than 80% of the AAA and PAD patients received anti-hypertensive, anti-platelet and lipid-lowering therapy as opposed to the healthy blood donors, of whom only 52% received anti-hypertensive therapy and merely 17% took anti-platelet or lipid-lowering drugs (Table 3).

Table 3. Medication of study collectives, n (%).

Medication	Healthy ($n = 29$)	PAD ($n = 40$)	AAA ($n = 40$)	p -Value (Groups)
Acetylsalicylic acid (Thrombo ASS)	5 (17.2%)	33 (82.5%)	35 (87.5%)	<0.001 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.531 (PAD/AAA)
P2Y12 antagonist (Clopidogrel)	1 (3.4%)	8 (20.0%)	5 (12.5%)	0.389 (H/AAA) 0.069 (H/PAD) 0.363 (PAD/AAA)
Vitamin K antagonist	1 (3.4%)	3 (7.5%)	3 (7.5%)	0.634 (H/AAA) 0.634 (H/PAD) 1.000 (PAD/AAA)
Xa inhibitor	1 (3.4%)	2 (5.0%)	0 (0.0%)	0.420 (H/AAA) 1.000 (H/PAD) 0.494 (PAD/AAA)
Antihypertensive therapy	15 (51.7%)	33 (82.5%)	37 (92.5%)	<0.001 (H/AAA) 0.006 (H/PAD) 0.176 (PAD/AAA)
ACE inhibitor	4 (13.8%)	12 (30.0%)	17 (42.5%)	0.011 (H/AAA) 0.115 (H/PAD) 0.245 (PAD/AAA)

Table 3. Cont.

Medication	Healthy (n = 29)	PAD (n = 40)	AAA (n= 40)	p-Value (Groups)
Angiotensin receptor inhibitor	6 (20.7%)	11 (27.5%)	14 (35.0%)	0.196 (H/AAA) 0.517 (H/PAD) 0.469 (PAD/AAA)
Beta blocker	7 (24.1%)	20 (50.0%)	25 (62.5%)	0.002 (H/AAA) 0.030 (H/PAD) 0.260 (PAD/AAA)
Ca ²⁺ channel blocker	4 (13.8%)	9 (22.5%)	6 (15.0%)	1.000 (H/AAA) 0.361 (H/PAD) 0.390 (PAD/AAA)
Diuretic	4 (13.8%)	11 (27.5%)	14 (35.0%)	0.048 (H/AAA) 0.173 (H/PAD) 0.469 (PAD/AAA)
Lipid-lowering agents(type)	5 (17.2%) (80% statins; 20% drug mix)	38 (95.0%) (100% statins)	36 (90.0%) (91.7% statins; 8.3% drug mix)	<0.001 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.675 (PAD/AAA)
Antidiabetic medication	3 (10.3%)	8 (20.0%)	7 (17.5%)	0.502 (H/AAA) 0.336 (H/PAD) 0.775 (PAD/AAA)
Insulin	0 (0.0%)	5 (12.5%)	1 (2.5%)	1.000 (H/AAA) 0.069 (H/PAD) 0.201 (PAD/AAA)
Metformin	3 (10.3%)	5 (12.5%)	6 (15.0%)	0.724 (H/AAA) 1.000 (H/PAD) 0.745 (PAD/AAA)
Bronchodilators	2 (6.9%)	9 (22.5%)	11 (27.5%)	0.031 (H/AAA) 0.104 (H/PAD) 0.606 (PAD/AAA)

p-values refer to group comparisons between the healthy (H), abdominal aortic aneurysm (AAA) and peripheral artery occlusive disease (PAD) collectives by Chi square test or Fisher's exact test for expected frequencies < 5.

3.2. Neutrophil and NET Parameters Are Particularly Elevated in Blood of AAA Patients

Hospital routine analysis (Table 4) revealed that the previously reported AAA biomarker D-dimer was highest in AAA patients (median levels in H: 0.38 µg/mL, PAD: 0.75 µg/mL, AAA: 1.26 µg/mL), i.e., was significantly elevated compared to PAD patients ($p = 0.008$) and healthy controls ($p < 0.001$). The inflammation marker CRP, however, did not differ significantly between the three groups (0.21–0.27 mg/dL).

In differential blood count, neutrophils were found to be significantly elevated in the PAD ($p < 0.001$) and AAA patients ($p = 0.016$) in comparison to the healthy controls (median levels in H: $3.0 \times 10^3/\mu\text{L}$, PAD: $4.5 \times 10^3/\mu\text{L}$, AAA: $4.0 \times 10^3/\mu\text{L}$). Of note, the PAD patients also had a significantly higher neutrophil count than the AAA cohort ($p = 0.023$). For a subset of patients (three individuals per group), neutrophil identification and quantitation in whole blood was confirmed using flow cytometry based on CD62L+ CD66b+ CD16+ cell staining, as we have previously published [35]. A high degree of correlation was observed between neutrophil levels in differential blood count and in flow cytometric analysis (Spearman coefficient $r = 0.983$, $p < 0.001$).

Table 4. Routine blood parameters of study collectives, median (IQR).

Parameter	Healthy (<i>n</i> = 29)	PAD (<i>n</i> = 40)	AAA (<i>n</i> = 40)	<i>p</i> -Value (Groups)
Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	5.60 (1.80)	7.16 (2.70)	6.35 (2.70)	0.034 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.029 (PAD/AAA)
Neutrophils ($10^3/\mu\text{L}$)	3.00 (1.15)	4.52 (1.96)	4.00 (1.97)	0.016 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.023 (PAD/AAA)
D-dimer ($\mu\text{g/mL}$)	0.38 (0.50) *	0.75 (0.68) §	1.26 (1.13) §	<0.001 (H/AAA) 0.008 (H/PAD) 0.007 (PAD/AAA)
C-reactive protein (mg/dL)	0.24 (0.42)	0.21 (0.32)	0.27 (0.42) #	0.678 (H/AAA) 0.515 (H/PAD) 0.229 (PAD/AAA)

p-values refer to group comparisons between the healthy (H), abdominal aortic aneurysm (AAA) and peripheral artery occlusive disease (PAD) collectives by Mann–Whitney U test. * *n* = 27, § *n* = 36, § *n* = 35, # *n* = 39.

In order to detect neutrophil activation and NET formation in cardiovascular disease, plasma samples of the three groups were further investigated for MPO, citH3 and circulating cfDNA (Figure 1, Table 5). MPO differed significantly between all three collectives and showed the highest levels in the AAA group (median H: 7.5 ng/mL, PAD: 12.1 ng/mL, AAA: 14.5 ng/mL). Comparably, plasma citH3 was significantly elevated in AAA patients versus healthy controls ($p = 0.046$) and showed a statistical trend to be elevated in AAA compared to the PAD group ($p = 0.070$). However, circulating citH3 was not increased in PAD patients in comparison to the healthy blood donors (median H: 292 ng/mL, PAD: 297 ng/mL, AAA: 353 ng/mL). Circulating cfDNA was measured in a subset of participants and was also found to be significantly higher in AAA than PAD patients ($p = 0.003$) or healthy controls ($p = 0.002$). Yet, cfDNA did not differ between the healthy control and PAD cohort (median H: 0.28 RU, PAD: 0.31 RU, AAA: 0.44 RU). Among the investigated neutrophil and NET parameters (Table 6), MPO and citH3 were markedly correlated ($r = 0.387$). MPO and citH3 also showed strong correlations with circulating cfDNA ($r = 0.507$ and $r = 0.599$, respectively) but only weak correlations with neutrophil counts ($r = 0.333$ and $r = 0.211$, respectively).

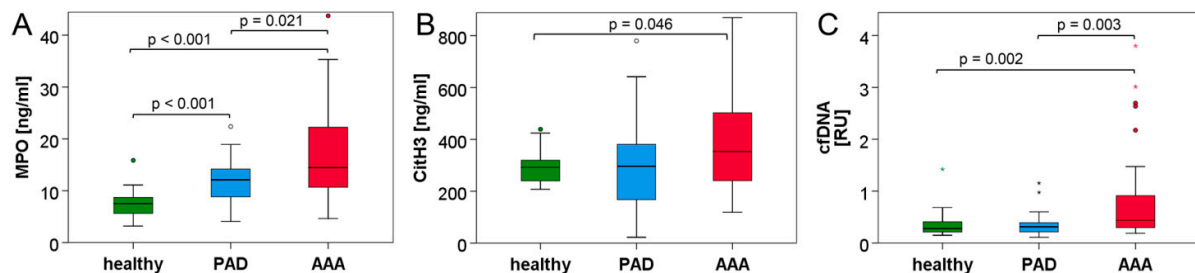


Figure 1. Neutrophil activation and NET parameters are elevated in the blood of AAA patients. Plasma concentrations of myeloperoxidase (A), citrullinated histone H3 (B) and cell-free DNA (C) were determined by ELISA (A,B) or qPCR (C) in the blood of healthy donors and patients with PAD or AAA. Statistical significance was determined by Mann–Whitney U test. Of note, in (A,B), several outliers/extreme values are not shown for better plot resolution.

Table 5. Blood levels of explorative parameters for study collectives, median (IQR).

Parameter	Healthy (n = 29)	PAD (n = 40)	AAA (n = 40)	p-Value (Groups)
citH3 (ng/mL)	292.3 (83.6)	296.4 (221.7)	353.2 (263.3) *	0.046 (H/AAA) 0.734 (H/PAD) 0.070 (PAD/AAA)
MPO (ng/mL)	7.51 (3.20)	12.11 (5.60)	14.47 (11.74)	<0.001 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.021 (PAD/AAA)
cfDNA (RU)	0.277 (0.217)	0.311 (0.190) §	0.437 (0.737) §	0.002 (H/AAA) 1.000 (H/PAD) 0.003 (PAD/AAA)
oxPL/apoB (RU)	6.33 (104.08)	43.42 (92.50)	0.00 (39.00) #	0.197 (H/AAA) 0.181 (H/PAD) 0.001 (PAD/AAA)

p-values refer to group comparisons between the healthy (H), abdominal aortic aneurysm (AAA) and peripheral artery occlusive disease (PAD) collectives by Mann–Whitney U test. cfDNA, cell-free DNA; citH3, citrullinated histone H3; MPO, myeloperoxidase; oxPL/apoB, oxidized phospholipid/apolipoprotein B-100 complexes; RU, relative units; * n = 38, § n = 30, # n = 39.

Table 6. Parameter correlations for all study groups, Spearman test.

Parameter 1	Parameter 2	r	p	n
citH3 (ng/mL)	Neutrophils (10 ³ /μL)	0.211	0.029	107
	MPO (ng/mL)	0.387	<0.001	107
	cfDNA (RU)	0.599	<0.001	89
	Triglycerides (mg/dL)	0.291	0.002	106
	Total cholesterol/HDL ratio	0.215	0.027	106
MPO (ng/mL)	Neutrophils (10 ³ /μL)	0.333	<0.001	109
	cfDNA (RU)	0.507	<0.001	89
	D-dimer (μg/mL)	0.475	<0.001	98
cfDNA (RU)	Triglycerides (mg/dL)	0.257	0.016	88
oxPL/apoB (RU)	Lipoprotein (a) (nmol/L)	0.314	0.001	106

cfDNA, cell-free DNA; citH3, citrullinated histone H3; MPO, myeloperoxidase; oxPL/apoB, oxidized phospholipid/apolipoprotein B-100 complexes; RU, relative units.

3.3. Blood Lipid Levels Show an Association with Circulating NET Markers

The analysis of blood lipids (Table 7) revealed the highest levels of triglycerides in AAA patients, which significantly exceeded the levels of PAD patients (median H: 123 mg/dL, PAD: 85 mg/dL, AAA: 136 mg/dL). Conversely, high-density lipoprotein (HDL) was lowest in the AAA group (median H: 55 mg/dL, PAD: 54 mg/dL, AAA: 49 mg/dL) at a significance level of $p = 0.024$ compared to healthy individuals and $p = 0.051$ compared to PAD patients. In line with the higher frequency of statin prescription in the PAD and AAA group, low-density lipoprotein (LDL) and total cholesterol were significantly lower in the CVD cohorts as compared to the healthy control collective (median LDL in H: 122 mg/dL, PAD: 61 mg/dL, AAA: 86 mg/dL). Yet, the levels of oxidized phospholipids in association with apolipoprotein B-100 (oxPL/apoB) deviated from total LDL levels (Figure 2A, Table 5); PAD patients showed the highest values (median 43 RU), while AAA patients and healthy controls did not differ significantly (0–6.33 RU).

When we proceeded to investigate the potential correlations between circulating NET biomarkers and blood lipids across groups (Table 6), only the NET parameter citH3 correlated weakly and positively with triglycerides ($r = 0.291$) and the total cholesterol to HDL ratio ($r = 0.215$). With respect to the combined data of all three cohorts, oxPL/apoB did not correlate with the explored NET or neutrophil markers. Yet, when the analysis was confined to the AAA collective (Table 8), correlations between MPO, citH3 and cfDNA blood levels were particularly strong ($r \geq 0.560$), and the NET parameter citH3 was significantly associated with oxLDL (oxPL/apoB) ($r = 0.470$). A correlation between citH3 and oxLDL was not observed for PAD patients (data not shown). In line with these results, when AAA patients

were grouped into $\text{citH3}^{\text{low}}$ (\leq median) and $\text{citH3}^{\text{high}}$ ($>$ median) individuals (Figure 2B), the patients with elevated levels of citH3 had significantly higher blood concentrations of oxPL/apoB (median 32 RU, IQR 75 RU versus 0 RU, IQR 0 RU, $p = 0.007$).

Table 7. Lipid profile of study collectives, median (IQR).

Parameter	Healthy ($n = 29$)	PAD ($n = 40$)	AAA ($n = 39$)	p -Value (Groups)
Triglycerides (mg/dL)	123.0 (82.0)	85.0 (63.0)	136.0 (124.0) *	0.097 (H/AAA) 0.256 (H/PAD) 0.001 (PAD/AAA)
Total cholesterol (mg/dL)	200.0 (36.0)	141.5 (43.0)	162.0 (79.0)	0.003 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.031 (PAD/AAA)
HDL cholesterol (mg/dL)	55.0 (22.0)	54.0 (28.0)	49.0 (16.0)	0.024 (H/AAA) 0.559 (H/PAD) 0.051 (PAD/AAA)
LDL cholesterol (mg/dL)—calculated	122.2 (42.1)	60.5 (32.5)	85.6 (72.8)	0.007 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.056 (PAD/AAA)
Total cholesterol/HDL ratio	3.9 (2.2)	2.7 (1.4)	3.8 (1.8)	0.742 (H/AAA) 0.001 (H/PAD) 0.001 (PAD/AAA)
LDL/HDL ratio	2.4 (1.7)	1.3 (0.8)	1.7 (1.6)	0.210 (H/AAA) <0.001 (H/PAD) 0.013 (PAD/AAA)
Lipoprotein (a) (nmol/L)	13.0 (33.0)	46.5 (123.0)	18.0 (65.0) #	0.394 (H/AAA) 0.051 (H/PAD) 0.177 (PAD/AAA)

p -values refer to group comparisons between the healthy (H), abdominal aortic aneurysm (AAA) and peripheral artery occlusive disease (PAD) collectives by Mann–Whitney U test. HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; * $n = 39$, # $n = 38$.

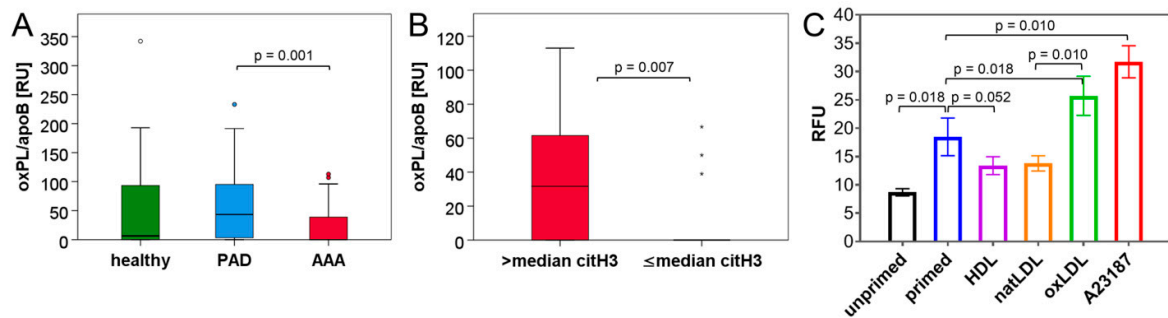


Figure 2. Assessment of oxPL/apoB plasma levels in healthy donors and CVD patients and regulation of NET formation by oxLDL in primed neutrophils. (A) Boxplots illustrate the plasma levels of oxPL/apoB as determined by ELISA in healthy donors and patients with PAD or AAA. (B) Plasma levels of oxPL/apoB are depicted for AAA patients with citH3 concentrations above or below (\leq) the median. Statistical significance was determined by Mann–Whitney U test. (C) NET formation of primed neutrophils is enhanced by oxLDL but not by natLDL or HDL. Neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy donors and were left untreated or primed for 30 min with 5 μM A23187. Neutrophils were then washed and subsequently exposed to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oxLDL, natLDL or HDL (or again to 5 μM A23187) as indicated. DNA release (mean \pm SEM) was quantitated after 90 min in relative fluorescence units (RFU). Statistical analysis is based on paired t -test ($n = 8$ assays).

Table 8. Parameter correlations for the AAA collective, Spearman test.

Parameter 1	Parameter 2	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>n</i>
oxPL/apoB (RU)	citH3 (ng/mL)	0.470	0.003	37
	Neutrophils (10 ³ /μL)	0.363	0.025	38
citH3 (ng/mL)	cfDNA (RU)	0.680	<0.001	30
	MPO (ng/mL)	0.560	<0.001	38
MPO (ng/mL)	cfDNA (RU)	0.566	0.001	30

cfDNA, cell-free DNA; citH3, citrullinated histone H3; MPO, myeloperoxidase; oxPL/apoB, oxidized phospholipid/apolipoprotein B-100 complexes; RU, relative units.

3.4. NET Induction Is Promoted by oxLDL but Unaffected by HDL In Vitro

OxLDL has previously been suggested to enhance the induction of NETs triggered by other stimuli. Yet, HDL has not been investigated in this context [28]. Therefore, we aimed to compare the effects of these lipoprotein particles on NET formation in a DNA release assay. Based on an experimental design comparable to Obama et al. [28], isolated human neutrophils were either left unprimed or stimulated for 30 min with 5 μM of the calcium ionophore A23187. After a washing step, cells were incubated with 100 μg/mL oxLDL, native LDL or HDL for 90 min. The release of DNA into the culture supernatant was monitored using the incorporation of a fluorescent dye as a quantitative measure of NET formation (Figure 2C). In this setup, native LDL and HDL showed a trend to decrease DNA release by primed neutrophils (mean 18.5 RFU, natLDL: 13.8 RFU, HDL: 13.4 RFU), while oxLDL significantly enhanced the A23187-primed NET formation (25.7 RFU). In contrast, no effect of oxLDL was observed for unprimed neutrophils (data not shown).

4. Discussion

Our study evaluated the interrelation of lipoprotein particles with NET parameters in patients with abdominal aortic aneurysm as compared to peripheral artery occlusive disease and healthy controls. While both atherosclerosis and AAA have been associated with NET formation, NETs seem to particularly accumulate in the intraluminal thrombus and promote the inflammatory response in the aneurysm wall [13,19,20]. Since it was shown that oxLDL is able to enhance NET stimulation [28], we wanted to investigate and compare the association of circulating oxPL/apoB and NET components in patients with distinct types of cardiovascular disease.

As we have recently shown, there is evidence for increased neutrophil numbers and neutrophil activation in AAA patients [35]. Myeloperoxidase is released upon neutrophil degranulation and is an abundant component of NETs [10]. In this study, we found that MPO is significantly elevated in AAA patients, not only in comparison to the healthy donors, but also compared to PAD patients with cardiovascular disease (Figure 1A, Table 5). Since histone 3 is citrullinated in the process of NET formation [8,9], it is considered a more specific NET marker than MPO. Similar to MPO, the highest circulating levels of citH3 were recorded in the AAA group (Figure 1B, Table 5), thus indicating that NETs might play a more prominent part in the pathogenesis of AAA as compared to PAD. Furthermore, the fact that citH3 and MPO correlated with circulating nuclear DNA in plasma suggests that a substantial fraction of cell-free DNA in blood may originate from NETs (Table 6).

With respect to the effect of blood lipids on NET release, in vivo evidence is scarce. Hence, this study addressed the potential association of dyslipidemia and the propensity of NET formation in CVD patients. When investigating the different types of blood lipids in the three study cohorts, we found that indeed, the healthy control group had the highest levels of LDL and total cholesterol. This is likely attributed to the fact that only 17% of the healthy participants received lipid-lowering drugs, as compared to 90–95% in the AAA and PAD group (Table 3). Yet, serum levels of oxPL/apoB were significantly elevated in PAD patients (Figure 2A) but did not differ between healthy controls and the AAA collective. This might relate to a lower occurrence of lipid peroxidation in AAA patients, or a more

pronounced retention of oxidized phospholipids at the aneurysm site. Despite the low circulating levels of oxPL/apoB, a significant correlation between oxPL/apoB and the NET marker citH3 was detected for the AAA group. This association was not apparent in the combined data set of all study groups or for the separate PAD cohort (data not shown). Furthermore, AAA patients with elevated (>median) levels of citH3 had significantly higher blood concentrations of oxPL/apoB than citH3^{low} AAA individuals (Figure 2B).

These observations would support the hypothesis that oxLDL is able to induce or enhance NET formation, in particular in the context of AAA disease. Of note, a negative correlation between the cardiovascular protective opponent of oxLDL, namely HDL, and the NET biomarker levels was not apparent from our clinical samples.

In order to investigate the relation between distinct blood lipids and NET formation in more detail, we performed an *in vitro* DNA release assay with human isolated neutrophils. After brief stimulation with a calcium ionophore, the cells were exposed to lipoprotein particles. The experimental setup was comparable to the studies of Awasthi et al. [27] and Obama et al. [28], where HL-60-derived neutrophils underwent short pre-incubation with a known NET stimulus (PMA), followed by treatment with 20 µg/mL native LDL (natLDL) or oxLDL. In these studies, oxLDL but not natLDL was able to enhance NET induction (3-fold). Of note, the pre-stimulation of neutrophils was required for the oxLDL effect. Comparably, in our experimental design, the addition of oxLDL (100 µg/mL) almost doubled the NET formation of neutrophils pre-primed by A23187. OxLDL addition to unprimed neutrophils did not result in DNA release beyond background levels (data not shown). We used a NET stimulus distinct from Obama et al., and additionally tested the effect of HDL and natLDL in this setup. In contrast to oxLDL, a weak inhibitory effect of HDL and natLDL on NET release was observed, which did not reach statistical significance. Thus, in line with the *in vivo* result (the lack of association between HDL and citH3 in blood of CVD patients), the *in vitro* analyses did not detect a substantial functional impact of HDL on NET formation. We further tried to reverse the experimental design, either by pre-incubating neutrophils with blood lipids and then stimulating NET induction, or by concomitantly administering both agonists. However, these approaches did not reveal any effects of oxLDL or HDL on NET formation (data not shown).

5. Conclusions

In this investigation, we found that neutrophil activation and NET parameters are higher in blood of AAA than PAD patients and that the serum concentration of oxPL/apoB in AAA patients is associated with NET markers. This supports previous findings on NETs in the pathogenesis of AAA [17–19] and indicates that NET formation might be more prominent in AAA than in other atherosclerotic cardiovascular diseases—possibly owing to the close association between NETs and the intraluminal thrombus in AAA [19,20]. Furthermore, oxLDL may be functionally connected to the NET release in AAA. Based on the *in vitro* results, we conclude that HDL has little (if any) impact on NET formation, while the effect of oxLDL depends on the priming state of the neutrophil: if the neutrophil is pre-activated, oxLDL may further enhance the NET release, a setting that may likely occur *in vivo* in the context of AAA.

6. Limitations of the Study

While this is the first cross-sectional study to compare levels of blood lipids and NET parameters between distinct types of cardiovascular disease (i.e., closely matched cohorts of AAA and PAD), the findings are primarily based on correlation analyses. Hence, the conclusions are limited to statistically significant associations. Proof for an *in vivo* mechanistic link between oxLDL and NET induction in AAA is not provided by the investigation of clinical samples.

Similarly, the source of circulating NET components in CVD patients cannot be ascertained, as systemic levels are measured. However, with respect to AAA patients, we have previously shown that citH3 levels in circulation drop significantly after sur-

gical AAA repair [20], which strongly supports the aneurysm as the site of origin for citrullinated histones.

Furthermore, the in vitro tests were designed to go beyond previous reports and provide the first evidence that HDL (as opposed to oxLDL) has no or little impact on NET formation. While this is in line with the in vivo results showing a correlation between oxLDL but not HDL and circulating citH3 in AAA patients, the translation of the in vitro findings to in vivo is limited.

Author Contributions: Conceptualization, A.B., W.E., C.N. and C.B.; methodology, H.H., M.O.-K., T.A. and H.S.; sample acquisition and data curation, A.B., J.K., L.F., V.W., V.N., E.M. and V.K.; investigation, A.B., N.I., H.H., M.O.-K. and S.B.; formal analysis, A.B., N.I. and C.B.; writing—original draft preparation, A.B. and C.B., writing—review and editing, all authors; funding acquisition, C.N. and C.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Austrian Science Fund, SFB grant number F 5409-B21. Open Access Funding by the Austrian Science Fund (FWF).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the Medical University of Vienna (no. 1729/2014; 2 December 2014).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank Sven Brandau (University of Duisburg–Essen) for critical reading and helpful discussion, as well as Axel Larena-Avellaneda (University Medical Center Hamburg-Eppendorf) for support during the initiation of the project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AAA, abdominal aortic aneurysm; cfDNA, cell-free DNA; citH3, citrullinated histone H3; CTA, computed tomography angiography; CTAD, citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole; CVD, cardiovascular disease; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; H, healthy controls; HBSS, Hank's balanced salt solution; HDL, high-density lipoprotein; IQR, interquartile range; LDL, low-density lipoprotein; LPS, lipopolysaccharide; MPO, myeloperoxidase; natLDL, native, low-density lipoprotein; NET, neutrophil extracellular trap; oxLDL, oxidized, low-density lipoprotein; oxPL/apoB, oxidized phospholipid in association with apolipoprotein B-100; PAD, peripheral artery occlusive disease; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; RFU, relative fluorescence units; RU, relative units

References

1. Wanhainen, A.; Verzini, F.; Van Herzele, I.; Allaire, E.; Bown, M.; Cohnert, T.; Dick, F.; van Herwaarden, J.; Karkos, C.; Koelemay, M.; et al. Editor's Choice—European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2019 Clinical Practice Guidelines on the Management of Abdominal Aorto-iliac Artery Aneurysms. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2019**, *57*, 8–93. [[CrossRef](#)]
2. Piechota-Polanczyk, A.; Jozkowicz, A.; Nowak, W.; Eilenberg, W.; Neumayer, C.; Malinski, T.; Huk, I.; Brostjan, C. The Abdominal Aortic Aneurysm and Intraluminal Thrombus: Current Concepts of Development and Treatment. *Front. Cardiovasc. Med.* **2015**, *2*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Golledge, J. Abdominal aortic aneurysm: Update on pathogenesis and medical treatments. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, *16*, 225–242. [[CrossRef](#)]
4. Kessler, V.; Klopff, J.; Eilenberg, W.; Neumayer, C.; Brostjan, C. AAA Revisited: A Comprehensive Review of Risk Factors, Management, and Hallmarks of Pathogenesis. *Biomedicines* **2022**, *10*, 94. [[CrossRef](#)]
5. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1532–1535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Brostjan, C.; Oehler, R. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discov.* **2020**, *6*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Klopff, J.; Brostjan, C.; Eilenberg, W.; Neumayer, C. Neutrophil Extracellular Traps and Their Implications in Cardiovascular and Inflammatory Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 559. [[CrossRef](#)]
8. Leshner, M.; Wang, S.; Lewis, C.; Zheng, H.; Chen, X.A.; Santy, L.; Wang, Y. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 307. [[CrossRef](#)]
9. Lewis, H.D.; Liddle, J.; Coote, J.E.; Atkinson, S.J.; Barker, M.D.; Bax, B.D.; Bicker, K.L.; Bingham, R.P.; Campbell, M.; Chen, Y.H.; et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 189–191. [[CrossRef](#)]
10. Cassatella, M.A.; Östberg, N.K.; Tamassia, N.; Soehnlein, O. Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends Immunol.* **2019**, *40*, 648–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hidalgo, A.; Libby, P.; Soehnlein, O.; Aramburu, I.V.; Papayannopoulos, V.; Silvestre-Roig, C. Neutrophil extracellular traps: From physiology to pathology. *Cardiovasc. Res.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Döring, Y.; Libby, P.; Soehnlein, O. Neutrophil Extracellular Traps Participate in Cardiovascular Diseases: Recent Experimental and Clinical Insights. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 1228–1241. [[CrossRef](#)]
13. Megens, R.T.; Vijayan, S.; Lievens, D.; Döring, Y.; van Zandvoort, M.A.; Grommes, J.; Weber, C.; Soehnlein, O. Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* **2012**, *107*, 597–598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Borissoff, J.I.; Joosen, I.A.; Versteyle, M.O.; Brill, A.; Fuchs, T.A.; Savchenko, A.S.; Gallant, M.; Martinod, K.; Ten Cate, H.; Hofstra, L.; et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 2032–2040. [[CrossRef](#)]
15. Blasco, A.; Coronado, M.J.; Vela, P.; Martin, P.; Solano, J.; Ramil, E.; Mesquida, A.; Santos, A.; Cozar, B.; Royuela, A.; et al. Prognostic implications of Neutrophil Extracellular Traps in coronary thrombi of patients with ST-elevation myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* **2021**. [[CrossRef](#)]
16. Mangold, A.; Alias, S.; Scherz, T.; Hofbauer, M.; Jakowitsch, J.; Panzenbock, A.; Simon, D.; Laimer, D.; Bangert, C.; Kammerlander, A.; et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 1182–1192. [[CrossRef](#)]
17. Meher, A.K.; Spinosa, M.; Davis, J.P.; Pope, N.; Laubach, V.E.; Su, G.; Serbulea, V.; Leitinger, N.; Ailawadi, G.; Upchurch, G.R., Jr. Novel Role of IL (Interleukin)-1beta in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2018**, *38*, 843–853. [[CrossRef](#)]
18. Yan, H.; Zhou, H.F.; Akk, A.; Hu, Y.; Springer, L.E.; Ennis, T.L.; Pham, C.T.N. Neutrophil Proteases Promote Experimental Abdominal Aortic Aneurysm via Extracellular Trap Release and Plasmacytoid Dendritic Cell Activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36*, 1660–1669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Delbosc, S.; Alsac, J.M.; Journe, C.; Louedec, L.; Castier, Y.; Bonnaure-Mallet, M.; Ruimy, R.; Rossignol, P.; Bouchard, P.; Michel, J.B.; et al. Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18679. [[CrossRef](#)]
20. Eilenberg, W.; Zagrapan, B.; Bleichert, S.; Ibrahim, N.; Knobl, V.; Brandau, A.; Martelanz, L.; Grasl, M.T.; Hayden, H.; Nawrozi, P.; et al. Histone citrullination as a novel biomarker and target to inhibit progression of abdominal aortic aneurysms. *Transl. Res.* **2021**, *233*, 32–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Yu, X.; Tan, J.; Diamond, S.L. Hemodynamic force triggers rapid NETosis within sterile thrombotic occlusions. *J. Thromb. Haemost.* **2018**, *16*, 316–329. [[CrossRef](#)]
22. Warnatsch, A.; Ioannou, M.; Wang, Q.; Papayannopoulos, V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* **2015**, *349*, 316–320. [[CrossRef](#)]
23. Fuchs, T.A.; Brill, A.; Wagner, D.D. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 1777–1783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Maugeri, N.; Campana, L.; Gavina, M.; Covino, C.; De Metrio, M.; Panciroli, C.; Maiuri, L.; Maseri, A.; D'Angelo, A.; Bianchi, M.E.; et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J. Thromb. Haemost.* **2014**, *12*, 2074–2088. [[CrossRef](#)]
25. Douda, D.N.; Khan, M.A.; Grasmann, H.; Palaniyar, N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 2817–2822. [[CrossRef](#)]
26. Parker, H.; Dragunow, M.; Hampton, M.B.; Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *92*, 841–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Awasthi, D.; Nagarkoti, S.; Kumar, A.; Dubey, M.; Singh, A.K.; Pathak, P.; Chandra, T.; Barthwal, M.K.; Dikshit, M. Oxidized LDL induced extracellular trap formation in human neutrophils via TLR-PKC-IRAK-MAPK and NADPH-oxidase activation. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *93*, 190–203. [[CrossRef](#)]
28. Obama, T.; Ohinata, H.; Takaki, T.; Iwamoto, S.; Sawada, N.; Aiuchi, T.; Kato, R.; Itabe, H. Cooperative Action of Oxidized Low-Density Lipoproteins and Neutrophils on Endothelial Inflammatory Responses Through Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Thålin, C.; Daleskog, M.; Göransson, S.P.; Schatzberg, D.; Lasselin, J.; Laska, A.C.; Kallner, A.; Helleday, T.; Wallén, H.; Demers, M. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3 as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma. *Immunol. Res.* **2017**, *65*, 706–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Tsimikas, S.; Brilakis, E.S.; Miller, E.R.; McConnell, J.P.; Lennon, R.J.; Kornman, K.S.; Witztum, J.L.; Berger, P.B. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 46–57. [[CrossRef](#)]
31. Tsimikas, S.; Kiechl, S.; Willeit, J.; Mayr, M.; Miller, E.R.; Kronenberg, F.; Xu, Q.; Bergmark, C.; Weger, S.; Oberhollenzer, F.; et al. Oxidized phospholipids predict the presence and progression of carotid and femoral atherosclerosis and symptomatic cardiovascular disease: Five-year prospective results from the Bruneck study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2006**, *47*, 2219–2228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Schumaker, V.N.; Puppione, D.L. Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol.* **1986**, *128*, 155–170. [[CrossRef](#)]
33. Yla-Herttuala, S.; Palinski, W.; Rosenfeld, M.E.; Parthasarathy, S.; Carew, T.E.; Butler, S.; Witztum, J.L.; Steinberg, D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Investig.* **1989**, *84*, 1086–1095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Freitas, M.; Porto, G.; Lima, J.L.; Fernandes, E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 570–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zagrapan, B.; Eilenberg, W.; Prausmueller, S.; Nawrozi, P.; Muench, K.; Hetzer, S.; Elleder, V.; Rajic, R.; Juster, F.; Martelanz, L.; et al. A Novel Diagnostic and Prognostic Score for Abdominal Aortic Aneurysms Based on D-Dimer and a Comprehensive Analysis of Myeloid Cell Parameters. *Thromb. Haemost.* **2019**, *119*, 807–820. [[CrossRef](#)]

Darstellung der Publikation

Die vorliegende Publikation mit dem Titel „Association of Lipoproteins with Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm“, welche im Rahmen meiner Dissertation entstand und am 20. Januar 2022 in der Sonderausgabe „Neutrophils, Fast and Strong“ der Fachzeitschrift *Biomedicine* erschien, sollte die Rolle von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in der Pathogenese des abdominalen Aortenaneurysmas (AAA) um weitere Erkenntnisse ergänzen. Dazu untersuchten wir den möglichen Zusammenhang zwischen Lipoproteinen und NET-Formation bei AAA-Patient:innen und führten *in vitro* Untersuchungen zur Stimulation von isolierten Neutrophilen des peripheren Blutes durch.

Das AAA wird in der Fachliteratur häufig definiert als eine Aussackung der abdominalen Aorta auf über 3 cm bei Männern und 2,7 cm bei Frauen, die im Regelfall als Aneurysma verum alle Schichten der Gefäßwand betrifft (Wanhainen 2008; Debus et al. 2018; Wanhainen et al. 2019). Am häufigsten ist das AAA infrarenal lokalisiert, das heißt unterhalb der Abgänge der Arteriae renales (Sakalihasan et al. 2018).

Die Prävalenz des AAA steigt mit dem Lebensalter und beträgt in den westlichen Ländern circa 2-8% (Marcaccio und Schermerhorn 2021). Männer sind häufiger betroffen, die durchschnittliche Prävalenz unter Frauen im Alter von über 70 Jahren lag in einem systematischen Review bei nur 1% (Ulug et al. 2016).

Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung eines AAA gehören vor allem der Nikotinabusus, das männliche Geschlecht und ein höheres Lebensalter. Auch die Hypercholesterinämie, eine positive Familienanamnese, sowie eine symptomatische arteriosklerotische Erkrankung sind mit einem höheren Risiko für das Auftreten eines AAA assoziiert (Larena-Avellaneda und Debus 2020).

Klinisch präsentiert sich das AAA meist asymptomatisch. Für die Erkrankung wenig sensitive Befunde, wie eine abdominelle pulsatile Raumforderung, lokale Schmerzen oder Rückenbeschwerden, können vorkommen (Wanhainen et al. 2019).

In der bildgebenden Diagnostik des AAA spielen vor allem die Sonographie und die computertomographische Angiographie (CTA) eine wichtige Rolle. Während die Sonographie ein einfaches und kostengünstiges Verfahren zum Screening und zur Verlaufskontrolle ist, wird die Durchführung einer CTA insbesondere für die Therapieplanung und bei Verdacht auf eine Ruptur empfohlen (Wanhainen et al. 2019).

Aktuell gibt es keine etablierte medikamentöse Behandlung, die in der Lage ist, die Wachstumsrate eines AAA zu verringern. Aufgrund des hohen kardiovaskulären Risikos von AAA-Patient:innen wird jedoch die medikamentöse, sowie nicht-medikamentöse Therapie der allgemeinen kardiovaskulären Risikofaktoren empfohlen. Hier ist insbesondere die Einstellung des Rauchens effektiv (Wanhainen et al. 2019).

Bei kleinen Aneurysmen sollte in regelmäßigen Abständen eine sonographische Verlaufskontrolle stattfinden. In der Fachliteratur gilt größtenteils übereinstimmend ein Aortendurchmesser ab 5,5 cm bei männlichen Patienten und ab 5,0 cm bei weiblichen Patientinnen als Indikation zur elektiven chirurgischen Aortenreparatur. Auch bei der Entwicklung einer AAA-typischen Symptomatik, sowie bei einer Wachstumsrate ab 1 cm/Jahr sollte eine operative Therapie in Erwägung gezogen werden (Debus et al. 2018).

Es gibt zwei gut etablierte Methoden der chirurgischen Aortenreparatur. Bei der endovaskulären Aortenreparatur (EVAR) wird über einen Zugang in einer Femoralarterie ein Stentgraft in die Aneurysmaregion vorgeschoben. Dieser stabilisiert die Aortenwand ohne deren operativer Eröffnung. Diese Methode zeigte in einigen systematischen Reviews eine verringerte Letalität im ersten Monat nach Operation, im Verlauf jedoch eine erhöhte Reinterventionsrate (Debus et al. 2018). Bei der offenen Aortenreparatur wird über eine Laparotomie Zugang zum Bauchraum erlangt. Dann wird die aneurysmatisch erweiterte Aorta eröffnet und in Inlay-Technik ein Graft eingesetzt (Creech 1966; Larena-Avellaneda und Debus 2018).

Zwischen beiden Methoden existiert kein signifikanter Unterschied in der langfristigen Mortalität (Lederle et al. 2012). Daher kann bei geringem periprozeduralem Risiko in partizipativer Entscheidungsfindung unter Beachtung der individuellen Vor- und Nachteile der jeweiligen Prozeduren die Operationsmethode gewählt werden (Debus et al. 2018).

Die „European Society for Vascular Surgery“ listet das nicht-chirurgische Management des AAA in ihren 2019 erschienenen klinischen Leitlinien als eine bisher ungelöste Aufgabe (Wanhainen et al. 2019). Die eingeschränkten Therapiemöglichkeiten verdeutlichen, warum weitere Erkenntnisse zur Pathogenese des AAA dringend notwendig sind: Um kausal ins Krankheitsgeschehen eingreifen zu können und die Progression eines diagnostizierten AAA zu verlangsamen oder gar zu verhindern, ist es notwendig eine medikamentöse Möglichkeit zu finden, welche an Schlüsselstellen den Pathomechanismus blockiert.

Die Pathogenese des AAA ist, ausgenommen vom Auftreten im Rahmen seltener genetischer Bindegewebserkrankungen (wie z.B. dem Marfan-Syndrom), multifaktoriell bedingt und bisher konnte noch kein therapierbarer Auslöser dieser Erkrankung identifiziert werden. Bekannt ist, dass ein Zusammenspiel aus einer chronischen Entzündungsreaktion, der Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen und ein teilweiser Abbau der extrazellulären Matrix zu einer verminderter Elastizität und reduzierten Stabilität der Gefäßwand führt (Busch et al. 2018). An der chronischen Entzündungsreaktion sind neben neutrophilen Granulozyten auch Mastzellen, Makrophagen sowie Lymphozyten beteiligt. Diese verstärken über die Ausschüttung von Zytokinen und die chemotaktische Rekrutierung weiterer Immunzellen die chronische Inflammation weiter und können über Enzyme auch direkt die extrazelluläre Matrix und die glatten Gefäßmuskelzellen schädigen (Rizas et al. 2009). Bestandteil der extrazellulären Matrix ist u.a. das Elastin, welches im Rahmen des AAA insbesondere durch Matrix-Metalloproteasen (MMP) angegriffen wird (Larena-Avellaneda und Debus 2020). Auch Entzündungszellen wie Mastzellen können MMP aktivieren (Rizas et al. 2009). Die wichtige Rolle einer chronischen Inflammation in der Pathogenese des AAA belegt außerdem, dass die antiinflammatorisch-wirkenden regulatorischen T-Zellen in Mausmodellen die Entstehung der Erkrankung hemmen konnten (Golledge 2018). Aber auch arteriosklerotische Veränderungen könnten über eine pathologische Hämodynamik zur Ausschüttung von Stickstoffmonoxid und damit zu einer überschießenden Gefäßerweiterung führen (Golledge 2018).

Oftmals ist das AAA assoziiert mit dem Auftreten eines intraluminalen Thrombus (ILT), welcher auch in der Pathogenese des AAA eine relevante Rolle einnimmt (Fontaine et al. 2002; Sakalihan et al. 2005). Denn im ILT akkumulieren unter anderem die neutrophilen Granulozyten, welche nach ihrer Aktivierung NETs ausschütten können. NETs sind ursprünglich ein von Neutrophilen genutzter Verteidigungsmechanismus bei Infektionen und dienen der Immobilisation von Pathogenen; NETs können aber auch zur Pathogenese des AAA und weiterer

kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen (Klopf et al. 2021). In der aus einer Publikation von Eilenberg et al. entnommenen Abbildung (Abbildung 1), sind sowohl Neutrophile als auch NET-Bestandteile im Thrombus der Aneurysmaregion einer murinen Aorta erkennbar (Eilenberg et al. 2021). NETs sind extrazelluläre Fasern, die zum großen Teil aus DNA bestehen, aber ebenfalls zelluläre Proteine wie Myeloperoxidase (MPO) und neutrophile Elastase enthalten, welche für einige der (anti-)pathogenen Eigenschaften von NETs verantwortlich sind (Brinkmann et al. 2004; Klopf et al. 2021).

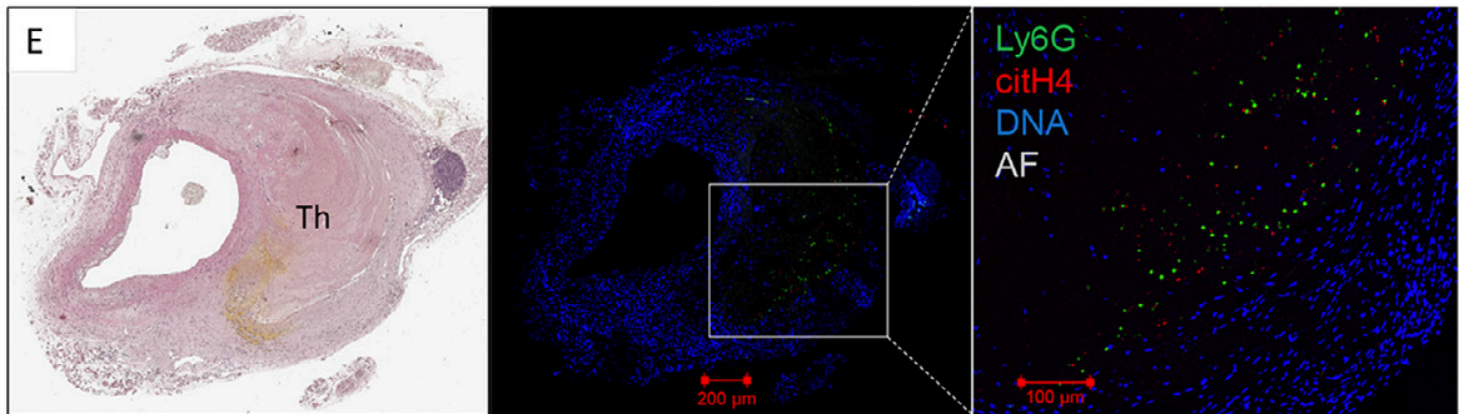


Abbildung 1: Neutrophile und NETs im Aortenaneurysma eines Mausmodells. Nach AAA-Induktion durch Angiotensin-II-Verabreichung in ApoE-defizienten Mäusen wurden im Gewebeschnitt des Aneurysmas sowohl Neutrophile (mittels Ly6G-Marker) als auch NETs (über citH4 (citruiniertes H4) Färbung) nachgewiesen. Neutrophile und NETs treten speziell in der Thrombus (Th) Region gehäuft auf (Eilenberg et al. 2021).

Es gibt zwei mögliche Wege der NET-Ausschüttung durch aktivierte Neutrophile (Guillot et al. 2022). Eine davon ist eine mögliche Form des Zelltodes und wird als suizidale NETose bezeichnet. Im Gegensatz zu den anderen Formen des Zelltodes wie der Apoptose und Nekroptose werden jedoch keine Phagozytose-triggernden Signale ausgelöst und der Vorgang läuft Caspase-unabhängig ab (Fuchs et al. 2007). Die zweite Form der NET-Ausschüttung ist die vitale NETose, bei welcher die Plasmamembran der Neutrophilen intakt bleibt und diese vital bleiben (Pilschek et al. 2010; Guillot et al. 2022). Nicht nur verschiedene Pathogene, sondern u.a. auch Cholesterinkristalle, aktivierte Thrombozyten und oxidiertes Low-Density Lipoprotein (oxLDL) können die NETose auslösen (Warnatsch et al. 2015; Brinkmann 2018; Obama et al. 2019). Nach dieser Aktivierung verliert der Zellkern der neutrophilen Granulozyten seine ursprüngliche Form bis schließlich die Kernmembran zerfällt und somit das Chromatin aus dem Zellkern ins Zytoplasma gelangt. Durch die Ruptur der Zellmembran werden die NETs freigegeben (Brinkmann und Zychlinsky 2007; Fuchs et al. 2007). Für diesen Vorgang ist die Dekondensation des Chromatins notwendig. Diese wird zumeist über die Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD 4) durch die Citruinierung von Histonen bewirkt (Leshner et al. 2012). Das citruinierte Histon H3 (citH3) wird daher auch als Parameter verwendet, um die Ausschüttung von NETs zu quantifizieren (Thälén et al. 2017).

Im Folgenden möchte ich die pathogenetische Bedeutung von NETs beim AAA verdeutlichen. In kardiovaskulären Erkrankungen können NETs durch prothrombogene Eigenschaften eine pathogenetische Rolle spielen. Ihre netzartige Struktur kann als eine Art Gerüst für die Thrombusbildung fungieren (Brill et al. 2012;

Plana et al. 2020). Weitere Mechanismen, über die NETs prothrombogen wirken, sind z.B. die Proteolyse des Tissue Factor Pathway Inhibitors, welcher die extrinsische Blutgerinnung hemmt, sowie die Förderung der roten Thrombusbildung über eine Adhäsion von Thrombo- und Erythrozyten (Fuchs et al. 2010; Massberg et al. 2010). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass NETs beim AAA auch zur Entstehung des ILT beitragen könnten (Plana et al. 2020).

NETs rekrutieren außerdem weitere Immunzellen, wie plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs), welche über eine inflammatorische Reaktion zu weiteren Gewebeschäden führen können (Yan et al. 2016). Es ist bekannt, dass der NET-Bestandteil LL-37 durch die Komplexbildung mit freier DNA zur Rekrutierung von pDCs und damit zur erhöhten Produktion von Typ-I-Interferon führt (Lande et al. 2011). Dies löst wiederum die Produktion von Interferon-gamma durch T-Zellen aus, wodurch die Entzündungsreaktion in der Aneurysmregion über eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen forciert wird (Zhou et al. 2013). Im Mausmodell förderte die Applikation von Komplexen aus zellfreier DNA und dem murinen Analogon von LL-37 die Elastase-induzierte AAA-Bildung (Yan et al. 2016).

Dass eine zielgerichtete NETose-inhibierende Therapie für das AAA effektiv sein könnte, wurde bereits 2016 durch Yan et al. mittels DNase-Einsatz im Tiermodell demonstriert (Yan et al. 2016). Weiters konnte 2018 durch Spinosa et al. im Mausmodell gezeigt werden, dass Resolvin D1, ein Pro-Resolving Mediator, der die Auflösung einer Entzündungsreaktion fördert, nicht nur die Konzentration von NET-Parametern, sondern auch das AAA-Wachstum verringern kann (Spinosa et al. 2018). In einem Mausmodell ebenfalls effektiv war der PAD 4-Inhibitor Cl-Amidin in einer Studie von Meher et al.. Diese Studie identifizierte IL-1 β als wichtigen Antrieb für die NETose-vermittelte AAA-Progression, insbesondere im frühen Krankheitsstadium (Meher et al. 2018).

Aufgrund der dargelegten Evidenz für eine mögliche Beteiligung von NETs an der Entstehung eines AAA, beschäftigte sich die gefäßchirurgische Arbeitsgruppe der Medizinischen Universität Wien, in deren Rahmen die vorliegende Dissertationsarbeit gestaltet wurde, mit dem oben genannten NET-Parameter citH3 als möglichen Biomarker für das AAA und als therapeutischen Angriffspunkt, um die Progression eines AAA zu inhibieren (Eilenberg et al. 2021).

Im Allgemeinen sind Biomarker biologische Merkmale, die mit einem klinischen Ereignis verknüpft sind. Sie können ganz verschiedener Natur sein: neben Proteinen oder Zellen sind beispielsweise auch metabolische Stoffe nachweisbar (Li et al. 2021). Insbesondere für das AAA ist es wichtig, Biomarker mit prognostischem oder sogar prädiktivem Potenzial zu finden, um eine eventuelle Ruptur oder eine stark progressive Erkrankung vor dem fatalen klinischen Ereignis zu erkennen (Li et al. 2021). Neue Biomarker zu finden, kann auch zu einem tieferen Verständnis für einen Pathomechanismus führen und somit auch in der Entwicklung von zielgerichteten Therapien von großem Nutzen sein (Biomarkers-Definitions-Working-Group 2001). Neben MMP-9 wurden in den letzten Jahren unter anderem auch MPO und D-Dimere als Biomarker für das AAA in Studien erprobt und könnten in der Zukunft bei der Entwicklung prognostischer Modelle für das AAA von Nutzen sein (Li et al. 2021). In der erwähnten Arbeit unserer Arbeitsgruppe, wurde eine signifikante Erhöhung der citH3-Werte im Plasma bei AAA-Patient:innen im Vergleich zu einem ebenfalls kardiovaskulär vorerkrankten Kollektiv gezeigt (Eilenberg et al. 2021). Der citH3-Wert war sogar in der Lage, ein schnelles Aneurysmawachstum zu prognostizieren. Auch in humanen AAA-Gewebeproben, die während einer offenen Aortenreparatur gewonnen wurden, haben wir eine Akkumulation von citH3 im intraluminalen Thrombus nachgewiesen. In einem murinen AAA-Modell konnte der PAD4-Inhibitor

GSK484 außerdem die Progression eines bereits bestehenden AAA verhindern (Eilenberg et al. 2021). In der hier zur Dissertation vorgelegten Publikation haben wir insbesondere Patient:innen mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (paVK) der AAA-Gruppe gegenübergestellt, sodass diese Kollektive beide kardiovaskulär vorbelastet waren. Zwar wurde keine signifikante Erhöhung der citH3-Plasmawerte im AAA-Kollektiv im Vergleich zur paVK-Gruppe gezeigt, jedoch wurde das Signifikanz-Niveau nur knapp verfehlt. Beim Vergleich der AAA-Patient:innen mit einer gesunden, nicht kardiovaskulär vorerkrankten, Kontrollgruppe, war die Erhöhung der citH3-Werte im Plasma signifikant (Brandau et al. 2022). Zusammenfassend hat der NET-Parameter citH3 also ein vielversprechendes Potential als Biomarker für das AAA.

Ein Zusammenhang zwischen der, für das AAA pathogenetisch relevanten, NETose und oxLDL ergibt sich vor allem aus den folgenden zwei Publikationen: Im Jahr 2016 veröffentlichten Awasthi et al. eine Arbeit, die zum ersten Mal oxLDL als einen Auslöser der NET-Bildung identifizierte. Dabei wurden die isolierten Neutrophilen direkt stimuliert und oxLDL induzierte die NET-Ausschüttung zeit- und dosisabhängig (Awasthi et al. 2016).

Obama et al. verwendeten die myeloide HL60-Zelllinie und konnten auf vorstimulierten Zellen einen steigernden Effekt von oxLDL auf die NETose feststellen (Obama et al. 2019). Natives LDL (nLDL) hatte in beiden Studien keine aktivierende Wirkung.

Zwar konnte in einer 2019 publizierten Arbeit kein direkter Effekt von oxLDL auf das Wachstum eines AAA gefunden werden, jedoch sind pathogenetische Wirkungen von oxLDL evident, die eine Beteiligung an der AAA-Progression nahelegen (Awasthi et al. 2016; Gutowski et al. 2019). So spielt oxLDL zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose und trägt zu einer chronischen Entzündungsreaktion bei (Kobayashi et al. 2005). Arteriosklerotische Läsionen stehen ebenfalls in Verdacht u.a. über eine Veränderung von glatten Gefäßmuskelzellen die Entstehung eines AAA zu fördern (Golledge 2018). OxLDL kann auch direkten Einfluss auf die glatten Muskelzellen nehmen: Beispielsweise kann es deren Umwandlung zu Schaumzellen fördern, auch proliferative und proinflammatorische Wirkungen sind möglich. Des Weiteren ist bekannt, dass oxLDL gerinnungsfördernde Effekte auf Endothelzellen hat (Obermayer et al. 2018). Somit wäre auch eine Rolle bei der Entstehung eines intraluminalen Thrombus denkbar.

Diese pathogenetischen Parallelen von Arteriosklerose und dem AAA sowie der stimulierende Effekt von oxLDL auf die NET-Bildung, welche in der Pathogenese des AAA, wie oben dargelegt, eine Rolle spielt, veranlassten uns in der vorliegenden Studie den Zusammenhang zwischen Lipoproteinen und NET-Ausschüttung bei AAA-Patient:innen in vivo, sowie in vitro zu untersuchen (Brandau et al. 2022). Ein neuer Aspekt unserer Studie war zudem die Untersuchung, ob High-Density Lipoprotein (HDL), der kardiovaskulär-protective Gegenspieler von oxLDL, auch antagonistisch auf die NETose wirken und diese hemmen könnte.

Im Rahmen unserer Studie wurden 40 Patient:innen mit AAA und 40 Patient:innen mit paVK, sowie 29 gesunde Proband:innen rekrutiert. Eingeschlossen wurden Patient:innen mit einem AAA ab 3 cm oder mit einer klinisch manifesten paVK, wobei die jeweils andere Erkrankung als ausgeschlossen galt. Bei einem Besuch in der gefäßchirurgischen Ambulanz des Allgemeinen Krankenhauses der Stadt Wien wurden Blutproben entnommen und Plasma und Serum aufbereitet, welche bis zur weiteren Testung zunächst bei -80°C gelagert wurden. Außerdem wurden

demographische Daten mittels eines strukturierten Fragebogens erfasst und einige klinische Routine-Laborparameter durch das Zentrallabor der Klinik getestet (Brandau et al. 2022).

Mit Hilfe sogenannter ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assays) bestimmten wir die Plasma-Konzentration der NET-Parameter citH3 und MPO, wohingegen zellfreie DNA (cfDNA) durch eine quantitative PCR gemessen wurde. Die Serum-Konzentration von oxLDL wurde stellvertretend durch einen ELISA für oxidiertes Phosphatidylcholin im Komplex mit Apolipoprotein B-100 ermittelt. In vitro nutzten wir methodisch einen DNA-Release-Assay, um den Effekt von oxLDL, nativem LDL und HDL auf vorstimulierte und nicht-stimulierte, frisch isolierte, zirkulierende humane Neutrophile zu testen (Brandau et al. 2022).

Bei der Analyse der Routine-Laborparameter gab es einige interessante Ergebnisse. In vereinzelt vorher extern publizierten Studien wurde eine mögliche Assoziation zwischen hohen Lipoprotein(a)-Werten (Lp(a)) und AAA-Diagnose postuliert. Eine aktuelle Metaanalyse bestätigt diese Hypothese, spricht aber auch von einer hohen Heterogenität der bisherigen Ergebnisse (Lampsas et al. 2022). In unserer Studie konnten wir jedoch keine signifikanten Unterschiede der Lp(a)-Konzentrationen zwischen den Kollektiven feststellen (Brandau et al. 2022).

Im Weiteren möchte ich die Ergebnisse zu Lp(a) über die Publikation hinaus diskutieren. Die Patient:innen im paVK-Kollektiv zeigten die höchsten Lp(a)-Konzentrationen mit einer nahezu signifikanten Erhöhung im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Brandau et al. 2022, Tabelle 7). Lp(a) ist bereits als Risikofaktor für einige kardiovaskuläre Erkrankungen bekannt und könnte ebenfalls ein Risikofaktor für die Entstehung einer paVK sein (Nestel et al. 2022). Für das AAA ist Lp(a) jedoch bisher nicht als Risikofaktor oder Biomarker etabliert. Weitere Studien und eine standardisierte Lp(a)-Bestimmung sind notwendig, um die Sensitivität von Lp(a) als Biomarker für das AAA trotz hoher Heterogenität der Werte zu prüfen (Lampsas et al. 2022). In unserer Studie konnten wir für Lp(a) kein starkes Potenzial als Biomarker für das AAA erkennen.

Wir zeigten jedoch außerdem eine hoch signifikante Korrelation zwischen Lp(a)-Werten und dem Komplex von oxPL/apoB im Gesamtkollektiv (Brandau et al. 2022, Tabelle 6). Übereinstimmend konnten auch Tsimikas et al., an deren Publikation wir uns für die oxLDL-Bestimmung methodisch orientierten, diese Korrelation in ihrem Gesamtkollektiv feststellen. Die Autor:innen stellten die Hypothese auf, dass der Grund für die starke Korrelation das gehäufte Vorkommen von oxidierten Phospholipiden auf dem Lp(a)-Lipoprotein sein könnte und vermuten darin auch eine Teilursache für die hohe Atherogenität von Lp(a) (Tsimikas et al. 2005).

Wichtiges Ziel unserer Studie war die eingehende Untersuchung eines möglichen pathogenetischen Zusammenhangs von oxLDL und NETs beim AAA anhand von Patient:innenmaterial. Bei den AAA-Patient:innen konnten wir eine Erhöhung der NET-Parameter feststellen. Die MPO- und cfDNA-Werte waren in der AAA-Gruppe sowohl im Vergleich zum paVK-Kollektiv als auch zu den gesunden Proband:innen statistisch signifikant erhöht. Auch bezüglich der citH3-Konzentration zeigte sich im Vergleich zum gesunden Kollektiv eine signifikante und im Vergleich zur paVK-Gruppe eine tendenzielle Erhöhung bei den AAA-Patient:innen. Wie oben bereits erwähnt, konnte unsere Arbeitsgruppe bereits in einem größeren Kollektiv eine statistisch signifikante Assoziation zwischen einer erhöhten citH3-Konzentration und AAA darstellen (Eilenberg et al. 2021).

In unserer Studie wiesen wir für alle getesteten NET-Parameter die höchsten Werte im AAA-Kollektiv nach. Die NET-Parameter untereinander korrelierten in der vorliegenden Arbeit signifikant, besonders deutlich war dies im AAA-Kollektiv. Eventuell könnte dies, verglichen mit anderen kardiovaskulären Erkrankungen wie der paVK, auf einen besonders starken Beitrag von NETs im Pathomechanismus des AAA hinweisen.

Darüber hinaus sollte unsere Studie eine mögliche Assoziation von Lipoproteinen mit NETs im Blut bei AAA-Patient:innen beleuchten. Betrachtet man alle drei Studiengruppen gemeinsam, konnten wir keine Korrelation zwischen oxLDL und NET-Parametern feststellen. In der AAA-Gruppe jedoch zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen citH3 und oxLDL. Passend dazu hatten AAA-Patient:innen mit einem citH3-Wert über dem Median auch eine deutlich signifikant höhere Serumkonzentration von oxLDL.

Im zweiten Teil der Studie untersuchten wir die Wirkung von Lipoproteinen auf die NETose *in vitro*. Im sogenannten DNA-Release-Assay förderte oxLDL die Ausschüttung von NETs durch vorstimulierte Neutrophile. Die Inkubation mit HDL führte jedoch zu keiner signifikanten Veränderung der NET-Ausbildung. Analog zu den Ergebnissen von Obama et al. und Awasthi et al. hatte auch nLDL keinen signifikanten Effekt auf die NETose (Awasthi et al. 2016; Obama et al. 2019). Wir konnten lediglich einen leichten Trend zur NETose-Hemmung durch HDL und nLDL verzeichnen. Zwischenzeitlich erschien jedoch 2022 eine Publikation, welche von einer hemmenden Wirkung durch HDL auf die durch oxLDL induzierte NET-Formation berichtet. Die oxidierte Form von HDL hingegen war wirkungslos, sodass insbesondere oxidierten LDL-Partikeln ein NETose-fördernder Effekt zugesprochen wird (Ohinata et al. 2022). Aus zellbiologischer Sicht ist es wichtig zu unterscheiden, dass sich die Ergebnisse von Ohinata et al. auf die durch oxLDL-induzierte NET-Bildung beziehen, wohingegen wir in der vorliegenden Studie den Effekt von HDL auf mit dem Kalzium-Ionophor A23187 vorstimulierte Neutrophile untersuchten.

Die Assoziation von oxLDL selbst, außerhalb des Kontexts der NETose, mit dem AAA wird in der Fachliteratur sehr kontrovers diskutiert. Während 2019 die Auswirkungen von oxLDL auf die Progression eines AAA in einer Publikation von Gutowski et al. als gering beschrieben werden (Gutowski et al. 2019), wird aktuell insbesondere der Zusammenhang zwischen dem Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), welcher vor allem für die Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen verantwortlich ist, und der Wahrscheinlichkeit einer AAA-Ruptur untersucht (Takahashi et al. 2023). In einer aktuellen Publikation, wurde zwar ein erhöhtes Vorkommen des oben erwähnten LOX-1 in der Aneurysmaregion nachgewiesen (Hofmann et al. 2023), dies scheint jedoch eher einer Aneurysmaruptur entgegenzuwirken. Takahashi et al. konnten im Mausmodell, wider der Erwartungen, feststellen, dass ein Mangel an LOX-1 die Gefäßwand durch eine Verringerung der Fibroblasten sowie der Kollagensynthese in der Adventitia schwächt und somit zu einer erhöhten Rupturwahrscheinlichkeit führt (Takahashi et al. 2023).

Auch im Rahmen unserer Studie zeigte die AAA-Gruppe unerwarteter Weise die niedrigsten, teils kaum nachweisbare, oxLDL-Werte (Brandau et al., Tabelle 5). Trotzdem stützt die signifikante Korrelation zwischen citH3 und oxLDL in der AAA-Gruppe, in Zusammenschau mit dem fördernden Effekt des oxLDL auf vorstimulierte Neutrophile *in vitro*, die Hypothese, dass oxLDL über eine verstärkte NET-Ausschüttung durch vorstimulierte Neutrophile eine fördernde Rolle in der

Pathogenese des AAA spielen könnte. Ein Szenario in dem vorstimulierte Neutrophile mit oxLDL in Kontakt geraten, ist in vivo gerade bei AAA-Patient:innen, z.B. im intraluminalen Thrombus, durchaus gegeben.

Da sich unsere Studie lediglich mit zirkulierenden oxidierten Lipoproteinen beschäftigte, wäre die weitere Erforschung des lokalen oxLDL-Vorkommens in der Aneurysmaregion interessant. Denn es wäre wahrscheinlich, dass eine erhöhte oxLDL-Konzentration hier zu einer Steigerung der NETose führt, wenn neutrophile Granulozyten durch die chronische Entzündungsreaktion vorstimuliert werden. Betrachtet man oxLDL daher im pathomechanistischen Kontext der parallel ablaufenden NET-Bildung, so könnte oxLDL möglicherweise über diesen Mechanismus progressiv auf das AAA wirken. Ebenfalls wäre eine weitere Untersuchung der Ergebnisse von Ohinata et al. wünschenswert, um einen möglichen hemmenden Effekt von HDL auf die oxLDL-induzierte NET-Ausschüttung zu validieren (Ohinata et al. 2022). Um diese Fragen abschließend zu klären, sind weitere Studien notwendig.

Kurzfassung/Abbreviated Version

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) sind Teil der angeborenen Immunabwehr und werden von aktivierten Neutrophilen zur Immobilisierung von Pathogenen ausgeschüttet. Aktuelle Publikationen lassen vermuten, dass NETs auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler kardiovaskulärer Erkrankungen, u.a. dem abdominellem Aortenaneurysma (AAA), spielen. Zu den Stimuli für die Ausschüttung von NETs durch Neutrophile gehört auch oxidiertes Low-Density-Lipoprotein (oxLDL). Ziel unserer Studie war die Erforschung einer möglichen in vivo Assoziation bei AAA-Patient:innen zwischen NET-Parametern und oxLDL. In vitro interessierte uns, ob die Gegenspieler oxLDL und HDL auch in Bezug auf die Ausschüttung von NETs antagonistisch wirken.

In je einem Kollektiv aus AAA-Patient:innen (n=40), gesunden Proband:innen (n=29) und Patient:innen mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (n=40) bestimmten wir die Plasma-Konzentration der NET-Parameter citrulliniertes Histon H3 (citH3), Myeloperoxidase und zellfreie DNA sowie die Serum-Konzentration von oxLDL. In vitro testeten wir den Effekt von oxLDL, nativem LDL und High-Density-Lipoprotein (HDL) auf vorstimulierte und nicht-stimulierte aus peripherem Blut isolierte Neutrophile.

Die AAA-Patient:innen zeigten im Vergleich zu den beiden anderen Kollektiven erhöhte NET-Parameter. In der AAA-Gruppe war eine statistisch signifikante Korrelation zwischen citH3 und oxLDL gegeben.

Im DNA-Release-Assay konnten wir in vitro einen fördernden Effekt von oxLDL auf die NET-Ausschüttung der vorstimulierten, isolierten Neutrophilen nachweisen. HDL hatte keinen Effekt auf die NET-Freisetzung.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass oxLDL über eine verstärkte NET-Ausschüttung durch bereits aktivierte Neutrophile eine Rolle in der AAA-Pathogenese spielen könnte.

Neutrophil extracellular traps (NETs) are part of the innate anti-pathogenic immune response and are released by activated neutrophils. Recent publications suggest that NETs also contribute to the pathogenesis of various cardiovascular diseases, including abdominal aortic aneurysm (AAA). Among other stimuli, oxLD is an inducer of NET formation. In this study we explored a potential in vivo association of NET parameters and oxidized low density lipoprotein (oxLDL) in AAA patients. We also investigated in vitro, whether and how the antagonists oxLDL and high density lipoprotein (HDL) affect the formation of NETs.

In a cohort of AAA patients (n=40), healthy volunteers (n=29) and patients with peripheral artery occlusive disease (n=40) we determined the plasma concentrations of the NET parameters citrullinated Histone H3 (citH3), myeloperoxidase and cellfree DNA, as well as the serum concentration of oxLDL. In vitro we used a DNA release assay for testing the effect of oxLDL, native LDL and HDL on primed and unprimed isolated peripheral blood neutrophils.

The AAA patients showed elevated NET parameters compared to the other two collectives. Furthermore, a statistically significant correlation between citH3 and oxLDL was observed in the AAA group. In the DNA release assay oxLDL enhanced NET release by prestimulated neutrophils. In contrast, HDL had no effect on the NET formation.

In summary oxLDL may contribute to AAA pathogenesis by enhancing NET formation of activated neutrophils.

Erklärung des Eigenanteils

Im Folgenden möchte ich meinen Eigenanteil an dieser Promotionsarbeit, sowie den Anteil der Koautor:innen darstellen.

Das Konzept für die vorliegende Studie und Publikation entwarf ich zusammen mit Prof. Dr. Christine Brostjan, in deren Arbeitsgruppe schon einige Vorarbeiten zur Rolle von NETs bei AAA erhoben worden waren. In der gefäßchirurgischen Forschungsabteilung der Medizinischen Universität Wien (MUW) bestand bereits eine Biobank aus Blutproben von teilnehmenden AAA-Patient:innen, die hauptsächlich von PD Dr. Wolf Eilenberg, Prof. Dr. Christoph Neumayer und Prof. Dr. Brostjan initiiert und gepflegt wurde. Durch die bereits bestehende und stetig wachsende AAA-Biobank, die Expertise der Arbeitsgruppe im Bereich der NET-Forschung sowie mein Interesse an diesem Themengebiet begann ich die Recherche zu möglichen Arbeitshypothesen. Nach Diskussion der Umsetzbarkeit mit Frau Prof. Brostjan, entschieden wird uns für das nun bearbeitete Thema.

Die in der Publikation verwendeten Plasma- und Serum-Proben der AAA-Patient:innen stammen aus der oben erwähnten Biobank. Für die Erweiterung und Akquise weiterer Proben war ich in der Zeit von März 2019 bis März 2020 in Zusammenarbeit mit Verena Nairz, Emely Manville und Veronika Kessler verantwortlich. Auch die Proben der gesunden Proband:innen wurden so akquiriert.

Da für meine Promotionsarbeit und weitere geplante Arbeiten der Forschungsgruppe ein weiteres Kollektiv mit kardiovaskulär vorerkrankten Personen benötigt wurde, rekrutierte ich 40 Patient:innen mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit und ergänzte die Biobank um deren Blutproben. Dazu gehörte ebenfalls die Eingabe von Informationen aus der Anamneseerhebung der in der Biobank vertretenen Patient:innen in eine Datenbank, die maßgeblich von Dr. med. univ. Johannes Klopff konzipiert und gepflegt wurde.

Einen methodischen Plan für die experimentelle Umsetzung erarbeitete ich mit Frau Prof. Brostjan. Die Methodik zur Verarbeitung der Blutproben für die Biobank, sowie für den MPO- und citH3-ELISA erlernte ich von Hubert Hayden, sodass ich die Experimente später selbstständig durchführen konnte. Die qPCR zur Detektion von cfDNA wurde von Herrn Hayden realisiert. Den ELISA zur Quantifizierung von oxPL/ apoB konnte ich zusammen mit Maria Osvar-Kozma umsetzen. Frau Osvar-Kozma und Taras Afonyushkin (Klinisches Institut für Labormedizin, MUW) stellten für diese Publikation das oxLDL bereit und unterstützen mit ihrer Expertise rund um die experimentelle Arbeit mit Lipoproteinen. Herbert Stangl (Institut für Medizinische Chemie und Pathobiochemie, MUW) stellte freundlicherweise das HDL zur Verfügung. Mit Hilfe von Sonja Bleichert eignete ich mir die Methodik zur Isolation von Neutrophilen aus dem peripheren Blut an. Durch Nahla Ibrahim erlernte ich das Verfahren des DNA-Release-Assays für dessen Durchführung und Auswertung Frau Ibrahim und ich verantwortlich waren.

Die Methodik zur statistischen Analyse der erhobenen Daten erklärte mir Frau Prof. Brostjan, sodass ich die statistische Auswertung im Anschluss selbstständig durchführen konnte. Die schriftliche Publikation wurde ebenfalls von mir verfasst und von Frau Prof. Brostjan überarbeitet. In das Korrekturlesen waren neben allen Koautor:innenn und mir auch Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda, sowie Prof. Dr. Sven Brandau involviert.

Die Finanzierung für dieses Forschungsprojekt akquirierten Frau Prof. Brostjan und Herr Prof. Neumayer (Sonderforschungsbereich F 5409-B21, Projekt des Österreichischen Fonds für Wissenschaft und Forschung).

Danksagung

Auf dem Weg zu meiner Promotionsarbeit haben mich die folgenden Personen unterstützt. Aus diesem Anlass möchte ich mich hier sehr herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda, der mir durch die Zusicherung seiner Betreuung und Unterstützung meines Vorhabens ermöglichte, meine Doktorarbeit mit einem Auslandsaufenthalt in Wien zu verbinden. Ebenso möchte ich mich für konstruktive Korrekturen und eine unkomplizierte sowie schnelle Kommunikation bedanken. Auch für die Möglichkeit meine Studienarbeit thematisch mit meinem Promotionsvorhaben zu verknüpfen, bin ich dankbar.

Besonders danke ich auch Frau Prof. Dr. Christine Brostjan für die Betreuung der Arbeit in Wien, die ich mir nicht besser hätte wünschen können. Ich bedanke mich nicht nur für eine wissenschaftlich kompetente, sondern auch für eine auf persönlicher Ebene exzellente Betreuung. Christine hat jeden Schritt dieser Arbeit begleitet und hatte jederzeit ein offenes Ohr zum Zuhören. Wir konnten alle Probleme lösungsorientiert angehen.

Auch der gesamten Arbeitsgruppe um Christine in Wien möchte ich für die gelungene Zusammenarbeit danken. Insbesondere war Nahla Ibrahim mir nicht nur beim Erlernen der Methodik, sondern auch bei der Weiterführung der Arbeiten nach meiner Rückkehr nach Hamburg eine große Unterstützung.

Mit ihrer Kompetenz zum Thema Lipoproteine war Maria Osvar-Kozma eine unentbehrliche Hilfe. Auf eine schnelle und hilfreiche Antwort von ihr konnte ich mich immer verlassen.

Eine große Stütze waren mir auch mein Partner, Luis Niederbuchner, und meine Mutter, Dr. Katja Brandau, die mir jederzeit den Rücken stärkten und ohne deren unermüdliche Ermutigungen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zudem möchte ich mich für die Unterstützung bei meinem Vater, Prof. Dr. Sven Brandau, bedanken, der mir mit seiner Expertise beim Verfassen dieser Arbeit und der Publikation zur Seite stand. Ich habe mich auch sehr gefreut, in seiner Abteilung weitere Methodik erlernen zu dürfen.

Meine Eltern haben mein naturwissenschaftliches Interesse maßgeblich geprägt, sodass ich ihnen diese Arbeit widmen möchte.

Lebenslauf

von

Annika Brandau, geboren am 16.10.1996 in Hamburg

Bildungsweg

- Otto-Pankok-Schule, Mülheim an der Ruhr
2015: Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
- Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Studium der Humanmedizin 2015-2022, Approbation als Ärztin 01/2023
- Experimentelle Promotionsarbeit
03/2019-03/2020: Praktische Arbeiten an der Medizinischen Universität Wien,
Klinik für Gefäßchirurgie, AG Prof. Dr. Christine Brostjan

Arbeitsbeschäftigungen (Auswahl)

- 08/2018-11/2021: Studentische Mitarbeiterin in der Pflege
Katholisches Marienkrankenhaus Hamburg, Unfallchirurgie
- 04/2021-09/2021: COVID-19 Testhelferin und Mitarbeiterin der Impfkampagne
DynaMe Fitness and Health Management GmbH
- seit 08/2023: Ärztin in Weiterbildung, Kinderchirurgie, Universitätsklinikum
Leipzig

Publikationsliste

- Brandau A, Ibrahim N, Klopff J, Hayden H, Ozsvar-Kozma M, Afonyushkin T, Bleichert S, Fuchs L, Watzinger V, Nairz V, Manville E, Kessler V, Stangl H, Eilenberg W, Neumayer C, Brostjan C. "**Association of Lipoproteins with Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm**" Biomedicines (2022).
Darlegung des Eigenanteils: s.o., Publikation im Rahmen der Promotion
- Zagraban B, Eilenberg W, Scheuba A, Klopff J, Brandau A, Story J, Dosch K, Hayden H, Domenig CM, Fuchs L, Schernthaner R, Ristl R, Huk I, Neumayer C, Brostjan C. "**Complement Factor C5a Is Increased in Blood of Patients with Abdominal Aortic Aneurysm and Has Prognostic Potential for Aneurysm Growth**" J Cardiovasc Transl Res (2021).
Darlegung des Eigenanteils: Mitarbeit im Aufbau der Biobank für Plasma- und Serum-Proben der AAA-Patient:innen und insbesondere des Patient:innen-Kollektivs mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit
- Eilenberg W, Zagraban B, Bleichert S, Ibrahim N, Knöbl V, Brandau A, Martelanz L, Grasl MT, Hayden H, Nawrozi P, Rajic R, Häusler C, Pitolidis A, Schirwani N, Scheuba A, Klopff J, Teubenbacher P, Weigl MP, Kirchwegger P, Beitzke D, Stiglbauer-Tscholakoff A, Panzenböck A, Lang I, Mauracher LM, Hell L, Pabinger I, Bailey MA, Scott DJA, Maegdefessel L, Busch A, Huk I, Neumayer C, Brostjan C. "**Histone citrullination as a novel biomarker and target to inhibit progression of abdominal aortic aneurysms**" Transl Res (2021).
Darlegung des Eigenanteils: Mitarbeit im Aufbau der Biobank für Plasma- und Serum-Proben der AAA-Patient:innen; Immunhistochemische Färbungen der murinen Aorten in Kooperation mit Prof. Sven Brandau (Universitätsklinikum-Essen), Abbildung 7

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: Leipzig, den 09.11.2023 *Annika Brandau*

Bibliografie

- Awasthi, D., S. Nagarkoti, A. Kumar, M. Dubey, A. K. Singh, P. Pathak, T. Chandra, M. K. Barthwal, and M. Dikshit. 2016. 'Oxidized LDL induced extracellular trap formation in human neutrophils via TLR-PKC-IRAK-MAPK and NADPH-oxidase activation', *Free Radic Biol Med*, 93: 190-203.
- Biomarkers-Definitions-Working-Group. 2001. 'Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework', *Clin Pharmacol Ther*, 69: 89-95.
- Brandau, A., N. Ibrahim, J. Klopff, H. Hayden, M. Ozsvar-Kozma, T. Afonyushkin, S. Bleichert, L. Fuchs, V. Watzinger, V. Nairz, E. Manville, V. Kessler, H. Stangl, W. Eilenberg, C. Neumayer, and C. Brostjan. 2022. 'Association of Lipoproteins with Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm', *Biomedicines*, 10.
- Brill, A., T. A. Fuchs, A. S. Savchenko, G. M. Thomas, K. Martinod, S. F. De Meyer, A. A. Bhandari, and D. D. Wagner. 2012. 'Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10: 136-44.
- Brinkmann, V. 2018. 'Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade', *J Innate Immun*, 10: 414-21.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. 'Neutrophil extracellular traps kill bacteria', *Science*, 303: 1532-5.
- Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2007. 'Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs', *Nat Rev Microbiol*, 5: 577-82.
- Busch, A., F. Simon, C. Schrimpf, A. L. Menges, A. Zimmermann, H. -H Eckstein, and L. Maegdefessel. 2018. 'Die Pathophysiologie des abdominalen Aortenaneurysmas', *Gefäßchirurgie*, 23: 130-35.
- Creech, O., Jr. 1966. 'Endo-aneurysmorrhaphy and treatment of aortic aneurysm', *Ann Surg*, 164: 935-46.
- Debus, E.S, F. Heidemann, W. Gross-Fengels, A. Mahlmann, E. Muhl, K. Pfister, S. Roth, Ch. Stroszczyński, A. Walther, N. Weiss, M. Wilhelmi, and R.T. Grundmann. 2018. 'S3-Leitlinie zu Screening, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Bauchaortenaneurysmas', AWMF online, Accessed 04.05.2023, 19:30. https://register.awmf.org/assets/guidelines/004-014|_S3_Bauchortenaneurysma_2018-08.pdf.
- Eilenberg, W., B. Zagrapan, S. Bleichert, N. Ibrahim, V. Knöbl, A. Brandau, L. Martelanz, M. T. Grasl, H. Hayden, P. Nawrozi, R. Rajic, C. Häusler, A. Potolidis, N. Schirwani, A. Scheuba, J. Klopff, P. Teubenbacher, M. P. Weigl, P. Kirchwegger, D. Beitzke, A. Stiglbauer-Tscholakoff, A. Panzenböck, I. Lang, L. M. Mauracher, L. Hell, I. Pabinger, M. A. Bailey, D. J. A. Scott, L. Maegdefessel, A. Busch, I. Huk, C. Neumayer, and C. Brostjan. 2021. 'Histone citrullination as a novel biomarker and target to inhibit progression of abdominal aortic aneurysms', *Transl Res*, 233: 32-46.
- Fontaine, V., M. P. Jacob, X. Houard, P. Rossignol, D. Plissonnier, E. Angles-Cano, and J. B. Michel. 2002. 'Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms', *Am J Pathol*, 161: 1701-10.
- Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. 'Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps', *J Cell Biol*, 176: 231-41.
- Fuchs, T. A., A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, and D. D. Wagner. 2010. 'Extracellular DNA traps promote thrombosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 15880-5.
- Golledge, J. 2018. 'Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments', *Nat Rev Cardiol*: 16(4):225-42.
- Guillotin, F., M. Fortier, M. Portes, C. Demattei, E. Mousty, E. Nouvellon, E. Mercier, M. Chea, V. Letouzey, J. C. Gris, and S. Bouvier. 2022. 'Vital NETosis vs. suicidal NETosis during normal pregnancy and preeclampsia', *Front Cell Dev Biol*, 10: 1099038.
- Gutowski, L., K. Gutowska, M. Piorunska-Stolzmann, P. Formanowicz, and D. Formanowicz. 2019. 'Systems Approach to Study Associations between OxLDL and Abdominal Aortic Aneurysms', *Int J Mol Sci*, 20: 20(16):3909.
- Hofmann, A., Y. Khorzom, A. Klimova, S. Wolk, A. Busch, P. Sabarstinski, M. Mücklich, D. Egorov, I. Kopaliani, D. M. Poitz, M. Kapalla, B. Hamann, F. Frank, C. Jänichen, C.

- Brunssen, H. Morawietz, and C. Reeps. 2023. 'Associations of Tissue and Soluble LOX-1 with Human Abdominal Aortic Aneurysm', *J Am Heart Assoc*, 12: e027537.
- Klopf, J., C. Brostjan, W. Eilenberg, and C. Neumayer. 2021. 'Neutrophil Extracellular Traps and Their Implications in Cardiovascular and Inflammatory Disease', *Int J Mol Sci*, 22: 8;22(2):559.
- Kobayashi, K., L. R. Lopez, Y. Shoenfeld, and E. Matsuura. 2005. 'The role of innate and adaptive immunity to oxidized low-density lipoprotein in the development of atherosclerosis', *Ann N Y Acad Sci*, 1051: 442-54.
- Lampsas, S., E. Oikonomou, P. Pantelidis, P. Theofilis, K. Grammatopoulos, A. Marathonitis, M. A. Vavuranakis, G. Siasos, D. Tousoulis, and M. Vavuranakis. 2022. 'Lipoprotein (a) Levels and Abdominal Aortic Aneurysm. A Systematic Review and Meta-analysis', *Curr Pharm Des*, 28: 3492-99.
- Lande, R., D. Ganguly, V. Facchinetti, L. Frasca, C. Conrad, J. Gregorio, S. Meller, G. Chamilos, R. Sebasigari, V. Riccieri, R. Bassett, H. Amuro, S. Fukuhara, T. Ito, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2011. 'Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus', *Sci Transl Med*, 3: 73ra19.
- Larena-Avellaneda, A., and E. S. Debus. 2018. 'Altes und neues zum Aortenaneurysma', *Gefässchirurgie*, 23: 126-29.
- Larena-Avellaneda, Axel, and Eike Sebastian Debus. 2020. 'Aneurysmatische Gefäßerkrankungen: Terminologie, Ätiologie und Lokalisation.' in Eike Sebastian Debus and Walter Gross-Fengels (eds.), *Operative und interventionelle Gefäßmedizin* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg; S. 91-104).
- Lederle, F. A., J. A. Freischlag, T. C. Kyriakides, J. S. Matsumura, F. T. Padberg, Jr., T. R. Kohler, P. Kougias, J. M. Jean-Claude, D. F. Cikrit, and K. M. Swanson. 2012. 'Long-term comparison of endovascular and open repair of abdominal aortic aneurysm', *N Engl J Med*, 367: 1988-97.
- Leshner, M., S. Wang, C. Lewis, H. Zheng, X. A. Chen, L. Santy, and Y. Wang. 2012. 'PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures', *Front Immunol*, 3: 307.
- Li, Y., D. Yang, and Y. Zheng. 2021. 'Challenges of applying circulating biomarkers for abdominal aortic aneurysm progression', *Exp Biol Med (Maywood)*, 246: 1054-59.
- Marcaccio, C. L., and M. L. Schermerhorn. 2021. 'Epidemiology of abdominal aortic aneurysms', *Semin Vasc Surg*, 34: 29-37.
- Massberg, Steffen, Lenka Grahl, Marie-Luise von Bruehl, Davit Manukyan, Susanne Pfeiler, Christian Goosmann, Volker Brinkmann, Michael Lorenz, Kiril Bidzhekov, Avinash B. Khandagale, Ildiko Konrad, Elisabeth Kennerknecht, Katja Reges, Stefan Holdenrieder, Siegmund Braun, Christoph Reinhardt, Michael Spannagl, Klaus T. Preissner, and Bernd Engelmann. 2010. 'Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases', *Nature Medicine*, 16: 887-96.
- Meher, A. K., M. Spinosa, J. P. Davis, N. Pope, V. E. Laubach, G. Su, V. Serbulea, N. Leitinger, G. Ailawadi, and G. R. Upchurch, Jr. 2018. 'Novel Role of IL (Interleukin)-1beta in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Abdominal Aortic Aneurysms', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38: 843-53.
- Nestel, P., W. J. Loh, N. C. Ward, and G. F. Watts. 2022. 'New Horizons: Revival of Lipoprotein (a) as a Risk Factor for Cardiovascular Disease', *J Clin Endocrinol Metab*, 107: e4281-e94.
- Obama, T., H. Ohinata, T. Takaki, S. Iwamoto, N. Sawada, T. Aiuchi, R. Kato, and H. Itabe. 2019. 'Cooperative Action of Oxidized Low-Density Lipoproteins and Neutrophils on Endothelial Inflammatory Responses Through Neutrophil Extracellular Trap Formation', *Front Immunol*, 10: 1899.
- Obermayer, G., T. Afonyushkin, and C. J. Binder. 2018. 'Oxidized low-density lipoprotein in inflammation-driven thrombosis', *J Thromb Haemost*, 16: 418-28.
- Ohinata, H., T. Obama, T. Makiyama, Y. Watanabe, and H. Itabe. 2022. 'High-Density Lipoprotein Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Enhanced by Oxidized Low-Density Lipoprotein or Oxidized Phospholipids', *Int J Mol Sci*, 23.

- Pilsczek, F. H., D. Salina, K. K. Poon, C. Fahey, B. G. Yipp, C. D. Sibley, S. M. Robbins, F. H. Green, M. G. Surette, M. Sugai, M. G. Bowden, M. Hussain, K. Zhang, and P. Kuberski. 2010. 'A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*', *J Immunol*, 185: 7413-25.
- Plana, E., J. Oto, P. Medina, Á Fernández-Pardo, and M. Miralles. 2020. 'Novel contributions of neutrophils in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm, the role of neutrophil extracellular traps: A systematic review', *Thromb Res*, 194: 200-08.
- Rizas, K. D., N. Ippagunta, and M. D. Tilson, 3rd. 2009. 'Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm', *Cardiol Rev*, 17: 201-10.
- Sakalihasan, N., R. Limet, and O. D. Defawe. 2005. 'Abdominal aortic aneurysm', *Lancet*, 365: 1577-89.
- Sakalihasan, N., J. B. Michel, A. Katsargyris, H. Kuivaniemi, J. O. Defraigne, A. Nchimi, J. T. Powell, K. Yoshimura, and R. Hultgren. 2018. 'Abdominal aortic aneurysms', *Nat Rev Dis Primers*, 4: 34.
- Spinosa, M., G. Su, M. D. Salmon, G. Lu, J. M. Cullen, A. Z. Fashandi, R. B. Hawkins, W. Montgomery, A. K. Meher, M. S. Conte, A. K. Sharma, G. Ailawadi, and G. R. Upchurch, Jr. 2018. 'Resolvin D1 decreases abdominal aortic aneurysm formation by inhibiting NETosis in a mouse model', *J Vasc Surg*, 68: 93S-103S.
- Takahashi, K., J. Aono, Y. Nakao, M. Hamaguchi, C. Suehiro, M. Kurata, T. Sakaue, A. Kakino, T. Sawamura, K. Inoue, S. Ikeda, J. Suzuki, and O. Yamaguchi. 2023. 'LOX-1 deficiency increases ruptured abdominal aortic aneurysm via thinning of adventitial collagen', *Hypertens Res*, 46: 63-74.
- Thålin, C., M. Daleskog, S. P. Göransson, D. Schatzberg, J. Lasselin, A. C. Laska, A. Kallner, T. Helleday, H. Wallén, and M. Demers. 2017. 'Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3 as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma', *Immunol Res*, 65: 706-12.
- Tsimikas, S., E. S. Brilakis, E. R. Miller, J. P. McConnell, R. J. Lennon, K. S. Kornman, J. L. Witztum, and P. B. Berger. 2005. 'Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease', *N Engl J Med*, 353: 46-57.
- Ulug, P, J T Powell, M J Sweeting, M J Bown, S G Thompson, S G Thompson, M J Sweeting, E Jones, J T Powell, P Ulug, M J Bown, M J Glover, and on behalf of SWAN Collaborative Group. 2016. 'Meta-analysis of the current prevalence of screen-detected abdominal aortic aneurysm in women', *British Journal of Surgery*, 103: 1097-104.
- Wanhainen, A. 2008. 'How to define an abdominal aortic aneurysm--influence on epidemiology and clinical practice', *Scand J Surg*, 97: 105-9; discussion 09.
- Wanhainen, A., F. Verzini, I. Van Herzele, E. Allaire, M. Bown, T. Cohnert, F. Dick, J. van Herwaarden, C. Karkos, M. Koelemay, T. Kölbel, I. Loftus, K. Mani, G. Melissano, J. Powell, Z. Szeberin, Committee Esvs Guidelines, G. J. de Borst, N. Chakfe, S. Debus, R. Hinchliffe, S. Kakkos, I. Koncar, P. Kolh, J. S. Lindholt, M. de Vega, F. Vermassen, Reviewers Document, M. Björck, S. Cheng, R. Dalman, L. Davidovic, K. Donas, J. Earnshaw, H. H. Eckstein, J. Golledge, S. Haulon, T. Mastracci, R. Naylor, J. B. Ricco, and H. Verhagen. 2019. 'Editor's Choice - European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2019 Clinical Practice Guidelines on the Management of Abdominal Aorto-iliac Artery Aneurysms', *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 57: 8-93.
- Warnatsch, A., M. Ioannou, Q. Wang, and V. Papayannopoulos. 2015. 'Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis', *Science*, 349: 316-20.
- Yan, H., H. F. Zhou, A. Akk, Y. Hu, L. E. Springer, T. L. Ennis, and C. T. N. Pham. 2016. 'Neutrophil Proteases Promote Experimental Abdominal Aortic Aneurysm via Extracellular Trap Release and Plasmacytoid Dendritic Cell Activation', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36: 1660-69.
- Zhou, H. F., H. Yan, J. L. Cannon, L. E. Springer, J. M. Green, and C. T. Pham. 2013. 'CD43-mediated IFN- γ production by CD8+ T cells promotes abdominal aortic aneurysm in mice', *J Immunol*, 190: 5078-85.