# Prognostische Relevanz von Sphingosin-1-phosphat und löslichem P-Selektin in akuten zerebralen Ischämien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nils-Ole Gloyer

aus

Heide

2026

Betreuer der Dissertation: Prof. Dr. Edzard Schwedhelm

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Edzard Schwedhelm

Gutachterin der Dissertation: Prof. Dr. Renate Bonin-Schnabel

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Renate Bonin-Schnabel

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Elke Oetjen

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Maike Frye

Datum der mündlichen Prüfung: 24.07.2026

## Inhaltsverzeichnis

I. Darstellung der Publikation ..... 4
I.a. Einleitung ..... 4
I.a.i. Definition des Schlaganfalls ..... 4
I.a.ii. Epidemiologie des ischämischen Schlaganfalls ..... 4
I.a.iii. Sphingosin-1-phosphat und lösliches P-Selektin ..... 4
I.a.iv. Zielsetzung und Fragestellungen ..... 6
I.b. Methodik ..... 6
I.b.i. Studiendesign ..... 6
I.b.ii. Studienvariablen (Querschnitt) ..... 7
I.b.iii. Studienvariablen (Längsschnitt) ..... 7
I.b.iv. Probenentnahme und Labormethoden ..... 7
I.b.v. Statistische Methoden ..... 8
I.c. Ergebnisse ..... 9
I.c.i. Beschreibung der Studienparameter ..... 9
I.c.ii. Beschreibung der Patient:innenkohorte ..... 9
I.c.iii. Beschreibung der Querschnittsergebnisse ..... 9
I.c.iv. Beschreibung der Längsschnittergebnisse ..... 10
I.d. Diskussion ..... 11
I.d.i. Sphingosin-1-phosphat und zerebrovaskuläre Erkrankungen ..... 11
I.d.ii. Lösliches P-Selektin und zerebrovaskuläre Erkrankungen ..... 12
I.d.iii. Limitationen der MARK-STROKE Studie ..... 12
I.e. Fazit ..... 13
II. Originalversion des veröffentlichten Artikels ..... 14
III. Zusammenfassung ..... 22
III.a. Deutsche Fassung ..... 22
III.b. Englische Fassung ..... 23
IV. Literaturverzeichnis ..... 24
V. Abkürzungsverzeichnis ..... 28
VI. Abbildungsverzeichnis ..... 29
VII. Tabellenverzeichnis ..... 35
VIII. Erklärung des Eigenanteils ..... 42
IX. Eidesstattliche Versicherung ..... 43
X. Danksagung ..... 44

# I. Darstellung der Publikation

## I.a. Einleitung

### I.a.i. Definition des Schlaganfalls

Eine durch die American Heart Association und American Stroke Association im Jahr 2013 aktualisierte Definition des Schlaganfalles beschreibt diesen als plötzlich aufgetretenes, neues fokal-neurologisches Defizit des zentralen Nervensystems mit einer Dauer der Symptomatik von über 24 Stunden. Ebenso wird diese Symptomatik einem Schlaganfall zugeordnet bei jeglichem Nachweis einer Infarzierung oder Hämorrhagie in einer Bildgebung oder Autopsie im funktional-topologisch assoziierten Teil des zentralen Nervensystems. Eine transitorische ischämische Attacke (TIA) wird hiervon abgegrenzt durch eine Dauer der Symptomatik von unter 24 Stunden und gleichzeitiger Abwesenheit eines Bildgebungsnachweises von Infarzierung/Hämorrhagie (Sacco et al., 2013).

### I.a.ii. Epidemiologie des ischämischen Schlaganfalls

Die weltweite Inzidenz von ischämischen Schlaganfällen lag im Jahr 2021 bei 7,8 Millionen Fällen, dies entspricht einer weltweiten Inzidenzrate von 92,4 Fällen pro 100.000 Personenjahre (Collaborators, 2024, Hou et al., 2024). Ferner lag die weltweite Prävalenz von ischämischen Schlaganfällen im Jahr 2021 bei 69,9 Millionen Fällen, was einer weltweiten Prävalenzrate von 819,5 Fällen pro 100.000 Personenjahre enspricht (Collaborators, 2024, Hou et al., 2024). Die Schätzungen der Inzididenzraten von TIA aus Kohortenstudien bewegen sich zwischen 35 und 118,8 Fällen pro 100.000 Personenjahre (Brown et al., 1998, Dennis et al., 1989, Kleindorfer et al., 2005, Lioutas et al., 2021). Durch den ischämischen Schlaganfall wurden im Jahr 2021 weltweit 3,6 Millionen Todesfälle verursacht, dies entspricht einer weltweiten Todesfallrate von 44,2 Todesfällen pro 100.000 Personenjahre (Collaborators, 2024, Hou et al., 2024). Die pathologischen Subtypen der neu aufgtretenen Schlaganfälle im Jahr 2021 gliedern sich in folgende Häufigkeiten: 65,3 % ischämische Schlaganfälle, 28,8 % intrazerebrale Blutungen und 5,8 % subarachnoidale Blutungen (Collaborators, 2024). Die direkten und indirekten Kosten, welche durch Schlaganfälle verursacht wurden, beliefen sich im Jahr 2017 auf 891 Milliarden US-Dollar, respektive 1,12 % des weltweiten Bruttoinlandsproduktes (Owolabi et al., 2022). Patient:innen mit dem Erstereignis eines Schlaganfalls oder einer TIA haben ein erhöhtes Risiko für das (Wieder-)Auftreten eines Schlaganfalls im Verlauf nach dem Erstereignis (Flach et al., 2020, Burn et al., 1994). Das kumulierte Risiko für das Auftreten eines Schlaganfalls nach TIA steigt von 11,7 % (90. Tag) auf 29,9 % (10. Jahr), wobei das Risiko in jüngeren Zeitabschnitten (2000 bis 2017) auf 5,9 % (90. Tag) bis 20,3 % (10. Jahr) geschätzt wird (Lioutas et al., 2021).

### I.a.iii. Sphingosin-1-phosphat und lösliches P-Selektin

Bei Sphingosin-1-phosphat (S1P) handelt es sich um einen phosphorylierten aliphatischen Aminoalkohol. S1P aktiviert fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ($S1PR_{1-5}$) und konnte in nahezu allen Geweben nachgewiesen werden (Rosen et al., 2009, Saba and Hla, 2004, Pappu et al., 2007). Die Konzentrationen von S1P im Blut gesunder Proband:innenkohorten liegen für Plasma im Bereich von 0,75 ± 0,16 µmol/L [arithmetisches Mittel ± Standardabweichung (AM ± SA)] und für Serum zwischen 1,04 ± 0,24 µmol/L [AM ± SA] und 0,804 (Interquartilsabstand: 0,694; 0,920) µmol/L (Moritz et al., 2017, Daum et al., 2020). Das im Blutplasma

zirkulierende S1P ist zu 50 bis 60 % an Apolipoprotein M im High Density Lipoprotein (HDL), zu 30 bis 40 % an Albumin und bis zu 10 % an die Gruppen Low Density Lipoprotein (LDL) sowie Very Low Density Lipoprotein (VLDL) gebunden (Murata et al., 2000). Interessanterweise zeigt sich in *ex-vivo* Experimenten eine vierfach verlängerte Halbwertszeit des HDL-gebundenen S1P im Vergleich mit Albumin-gebundenem S1P (Wilkerson et al., 2012). HDL-gebundenes S1P aktiviert in Endothelzellen den $S1PR_1$ und in glatten Muskelzellen den $S1PR_2$, wobei die Bindung durch den HDL-Rezeptor SR-BI vermittelt wird (Keul et al., 2019, Lee et al., 2017). Darüber hinaus scheint die Bindung des S1P an das Apolipoprotein M des HDL zum Teil dessen antiinflammatorische Eigenschaften zu vermitteln (Galvani et al., 2015, Christensen et al., 2016, Christoffersen et al., 2011).

Die beiden Isoenzyme Sphingosin-Kinase Typ 1 und Typ 2 katalysieren die Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P, wohingegen vorhandenes S1P durch die Enzyme S1P-Lyase, S1P-Phosphatase und die Lipidphosphat-Phosphohydrolasen abgebaut werden kann. Die S1P-Lyase katalysiert dabei den irreversiblen Abbau des S1P in 2-Hexadecenal und Phosphoethanolamin, während die S1P-Phosphatase und Lipidphosphat-Phosphohydrolasen die reversible Hydrolyse des S1P in Phosphat und Sphingosin katalysieren (Le Stunff et al., 2002). Der Stoffwechsel und Transport des S1P zeigt in Thrombozyten einige Besonderheiten, welche unter anderem auf die hohe Aktivität der Sphingosin-Kinase Typ 1 und die Abwesenheit der S1P-Lyase zurückzuführen sind (Anada et al., 2007, Yatomi et al., 2004). Interessanterweise ist dabei in besonderem Maße die Freisetzung und weniger die Produktion von S1P abhängig von der Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten, während Erythrozyten vor allem eine S1P-Bildung in Abhängigkeit von der S1P-Kinase-Aktivität zeigen (Ulrych et al., 2011, Hanel et al., 2007, Yatomi et al., 1995). Ebenso scheint bei einer Freisetzung von S1P aus aktivierten Thrombozyten vor allem Albumin und nicht HDL den primären Bindungspartner im Blut darzustellen (Aoki et al., 2005). S1P spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls: es dichtet die endotheliale Barriere der Blut-Hirn-Schranke ab und beeinflusst die Migration von Immunzellen (Prager et al., 2015). Hierbei zeigten Patient:innen mit akutem ischämischem Schlaganfall eine niedrigere Serum-Konzentration von S1P im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe und zu Patient:innen mit einem hämorrhagischem Schlaganfall (Liu et al., 2020). Weiterführend konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass innerhalb einer Kohorte von Patient:innen mit zerebraler Ischämie Patient:innen mit hohen Serum-Konzentrationen von S1P bessere klinisch-neurologische Scores und eine längere ereignisfreie Zeit aufweisen (Schwedhelm et al., 2021). Unterstützt werden diese Ergebnisse im experimentellen Schlaganfallmodell der $S1PR_1^{-/-}$-Maus, welche eine Abhängigkeit der Infarktvolumina vom Genotyp zeigt (Nitzsche et al., 2021).

Bei P-Selektin handelt es sich um ein Glykoprotein aus der Klasse der Zelladhäsionsmoleküle, welches vor allem auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen zu finden ist (Stenberg et al., 1985, Gotsch et al., 1994). Durch die Interaktion mit dem P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 besitzt das Zelladhäsionsmolekül P-Selektin ebenfalls eine Signalfunktion (Lorant et al., 1993). Weiterhin kann bei Aktivierung eine lösliche Isoform ohne Transmembrandomäne aus den α-Granula der Thrombozyten und den

Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen freigesetzt werden (Ishiwata et al., 1994, Johnston et al., 1989). Einen alternativen Ursprung des zirkulierenden löslichen P-Selektin stellt das vermehrte Ektodomänen-Shedding durch Matrixmetalloproteasen infolge der gesteigerten Oberflächenexpression von P-Selektin dar (Michelson et al., 1996). Die Konzentration von löslichem P-Selektin in gesunden Proband:innen beträgt in Blutplasma etwa 36 ± 9 µg/L [AM ± SA], respektive im Blutserum etwa 125,5 ± 48,6 µg/L [AM ± SA] (Hartwell et al., 1998, Barbaux et al., 2001). Dabei zeigten erhöhte Konzentrationen von löslichem P-Selektin in einer Kohorte gesunder Frauen eine Risikoerhöhung für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse (Ridker et al., 2001). Weiterhin konnte in Querschnittsstudien gezeigt werden, dass Patient:innen mit arterieller Hypertonie, peripherer arterieller Verschlusskrankheit, Hypercholesterinämie, Myokardinfarkt sowie Schlaganfall erhöhte Konzentrationen von löslichem P-Selektin aufweisen (Frijns et al., 1997, Shimomura et al., 1998, Sanada et al., 2005, Wassel et al., 2015, Davi et al., 1998). Neben diesen Eigenschaften als Biomarker für thrombotisch-atherosklerotische Erkrankungen, konnte in tierexperimentellen Modellen der Maus gezeigt werden, dass lösliches P-Selektin einen endogenen Aktivator der Gerinnung darstellt, eine vermehrte Ablagerung von Fibrin bewirkt und weiterhin die endotheliale Adhäsion von Leukozyten verstärket (Andre et al., 2000, Woollard et al., 2008). Darüber hinaus ist lösliches P-Selektin in der Pathophysiologie des Schlaganfalls relevant: lösliches P-Selektin, insbesondere als Dimer, vermittelt eine gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und führt zu größeren Infarktvolumina sowie vermehrter Bildung von atherosklerotischen Läsionen (Kisucka et al., 2009, Panicker et al., 2017).

### I.a.iv. Zielsetzung und Fragestellungen

Acetylsalicylsäure (ASS) ist indiziert in der Sekundärprävention von kardiovaskulären Erkrankungen (Gupta et al., 2024). Sowohl die Konzentration des zirkulierenden S1P als auch des löslichen P-Selektin könnten durch die Gabe von ASS *in-vivo* gesenkt werden, sodass eine differenzierte Auswertung die Aussagekraft der einzelnen Biomarker verbessern könnte (Ferroni et al., 2009, Knapp et al., 2013a). Die hier vorgelegte wissenschaftliche Arbeit vergleicht S1P, lösliches P-Selektin und Thromboxan $B_2$, als Surrogatmarker für die ASS-Wirkung, in einer Kohorte aus Patient:innen mit akutem ischämischem Schlaganfall oder TIA unter Berücksichtigung der thrombozytenaggregationshemmenden Medikation mit ASS. Untersucht werden Querschnittsdaten, wie Demografie, kardiovaskuläre Vorerkrankungen und Risikofaktoren, Laborparameter und funktional-neurologische Scores, sowie Längsschnittdaten im Hinblick auf funktional-neurologische Scores und ereignisfreies Überleben.

## I.b. Methodik

### I.b.i. Studiendesign

Bei der „bioMARKers in STROKE“ (MARK-STROKE) Studie handelt es sich um eine fortlaufende, prospektive, Forscher:innen-initiierte, monozentrische Beobachtungsstudie an einem universitären, tertiären Schlaganfallzentrum einer Metropolregion, dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE). Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer bewilligt (Referenzen: PV4715, PV5979). Die Studie steht im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und es liegen schriftliche Aufklärungen und Einwilligungserklärungen der erfassten Patient:innen oder der rechtlichen

Stellvertreter:innen vor. Die Einschlusskriterien in unsere Studie sind die (i) Diagnose eines akuten ischämischen Schlaganfalls oder TIA bei Entlassung aus dem Krankenhaus durch mindestens eine Facharzt-qualifizierte Person, das (ii) Alter von mindestens 18 Jahren bei Studieneinschluss und die (iii) Aufklärung und schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

### I.b.ii. Studienvariablen (Querschnitt)

Die Daten wurden aus den individuellen elektronischen Patient:innenakten des UKE erfasst. Die erfassten Variablen der Querschnittsanalysen umfassen die Demografie (Alter bei Studieneinschluss, biologisches Geschlecht und Body-Mass-Index (BMI)), die vorliegenden kardiovaskulären Vorerkrankungen und Risikofaktoren (aktueller Raucherstatus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Vorhofflimmern, stattgehabter Myokardinfarkt und stattgehabter Schlaganfall), die Medikation mit Antithrombotika zum Zeitpunkt der Blutentnahme (ASS, Adenosindiphosphat (ADP)-Rezeptorantagonisten und Antikoagulantien), die funktional-neurologischen Scores (National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) und modified Rankin Scale (mRS)) sowie die Daten der klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin (Hämoglobin, Leukozyten, Thrombozyten, HbA1c, Triglyzeride, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin und Kreatinin).

### I.b.iii. Studienvariablen (Längsschnitt)

Die Daten der Längsschnittauswertung zum Zeitpunkt der Entlassung aus dem Krankenhaus stammen aus den individuellen elektronischen Patient:innendaten, während die Daten aus der Zeit der Nachverfolgung aus Angaben durch Patient:innen aus der Abfrage mittels eines Telefonates oder via E-Mail stammen. Die erfassten Variablen der Querschnittsanalysen umfassen die neurologisch-funktionalen Scores zum Zeitpunkt der Entlassung aus dem Krankenhaus (NIHSS und mRS) als auch den kombinierten Endpunkt aus nicht-tödlichem Myokardinfarkt, Schlaganfall, Tod und Wiedervorstellung in einem Krankenhaus.

### I.b.iv. Probenentnahme und Labormethoden

Zur Gewinnung von Blutproben wurde eine sterile Punktion der Vena mediana cubiti mittels Butterfly-Kanüle durchgeführt und das gewonnene Blut in eine Monovette (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland; Plasma: Ethylendiamintetraacetat (EDTA) [1,6 mg/mL Blut]; Serum: Silikat) aspiriert. Nach unmittelbarem Schwenken zum Mischen des Inhalts der Monovette folgte entweder direkt die 20-minütige Zentrifugation bei 2000 g und einer Temperatur von 4 °C sowie die Lagerung bei -80 °C bis zur weiteren Aufbereitung (EDTA) oder nach 30-minütiger Lagerung bei RT (Serum). S1P wurde im Blutserum mittels Flüssigchromatografie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung gemessen nach einer validierten und von uns publizierten Methode (Daum et al., 2020). Die Messung des löslichen P-Selektin wurde in EDTA-Plasma mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die zu untersuchenden Serumproben wurden vor Inkubation im Verhältnis 1 zu 20 mit der herstellereigenen Verdünnungslösung verdünnt. Die angefertigten Standardlösungen reichen unter Verwendung der zuvor genannten Verdünnungslösung in einer Duplationsreihe von 0,781 ng/mL bis 50 ng/mL. Als positive Kontrolle diente rekonstituierten lyophilisiertes humanes Blutserum, während die zuvor genannte Verdünnungslösung als negative Kontrolllösung diente. Es wurden jeweils 100 µL der

verdünnten Proben in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert, die zuvor mit dem spezifischen, monoklonalen Antikörper (Zielstruktur: humanes P-Selektin) beschichtet wurden. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 µL einer Lösung mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem, polyklonalem Antikörper (Zielstruktur: humanes P-Selektin) wurden die Wells dreimal mit 400 µL Waschpuffer gewaschen. Die Entwicklungsreaktion wurde durch Zugabe von 200 µL Substratlösung (stabilisiertes Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) gestartet und nach 15 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur durch Zugabe von 50 µL Stopplösung (2 N Schwefelsäure) beendet. Die optische Dichte wurde bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Reader gemessen. Eine Standardreihe wurde aus den seriellen Verdünnungen der Standardlösung (0,781 ng/mL; 1,56 ng/mL; 3,13 ng/mL; 6,25 ng/mL; 12,5 ng/mL; 25 ng/mL; 50 ng/mL) erstellt, um die absoluten Konzentrationen der Serumproben zu berechnen. Die Konzentrationen von Thromboxan $B_2$ wurde im Blutserum nach Herstellerangaben mittels ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) gemessen. Die Probenmessung umfasste das Pipettieren einer 96-Well-Mikrotiterplatte, welche Blind-, nicht spezifisch bindende und Gesamtaktivitäts-Wells umfasste, sowie Duplikate von acht Stufen der Thromboxan $B_2$ Standards im Bereich von 1,6 bis 1000 pg/mL. Zur Messung der Probe wurden 50 µL einer 1 zu 20 Verdünnung der Serumblutprobe mit 50 µL AChE-Tracer und 50 µL Thromboxan $B_2$ Antiserum vermischt, anschließend folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht. Nach der Inkubationszeit wurden der Inhalt der Wells verworfen und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Entwicklung der Mikrotiterplatte wurde mit 200 µL Ellman-Reagenz in jedes Well gegeben, 90 bis 120 Minuten im Dunkeln auf einem Orbitalschüttler inkubiert und nachfolgend auf einer Wellenlänge von 412 nm ausgelesen. Proben mit einer Konzentration außerhalb der Standardreihe wurden erneut mit einer Verdünnung von 1 zu 5 oder 1 zu 100 gemessen. Die Nachweisgrenze für Thromboxan $B_2$ lag bei 5 pg/mL. Die Variationskoeffizienten der Qualitätskontrollen lagen unter 10 %. Alle Messungen wurden verblindet zu den klinischen Daten der Patient:innen durchgeführt.

### I.b.v. Statistische Methoden

Für mindestens ordinalskalierte Variablen erfolgte die Darstellung des Lage- und Streuungsmaßes als Median mit Interquartilsabstand (IQR). Nominalskalierte Variablen wurden als absolute Zahl sowie relativem Anteil an der absoluten Teilnehmer:innenzahl angegeben. Die Auswertung der Querschnittsdaten von mindestens ordinalskalierten Variablen wurde mithilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Weiterhin wurden Korrelationen durch den nicht-parametrischen Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten geprüft. Die Verteilung von nominalskalierten Variablen wurde mit dem Pearsonschen Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Die Kalkulation der medianen Nachverfolgungszeit inklusive des IQR wurde mit dem reversen Kaplan-Meier-Schätzer ermittelt. Die Darstellung der Überlebenszeitkurven erfolgte in einer Kaplan-Meier-Kurve mit Angabe von Zensurdaten. Die Beschreibung der angegebenen Medikationsgruppen in der Überlebenszeitanalyse erfolgte durch den arithmetisch mittleren Kaplan-Meier-Schätzer inklusive der 95%-KI. Eine Testung auf Heterogenität zwischen den Gruppen erfolgte mittels des Mantel-Cox/Log-Rang-Tests. Zur Auswertung der Hazard Ratio (HR) für den Eintritt des kombinierten Endpunktes wurden univariate und multivariate Cox-Regressionen durchgeführt, die multivariable

Regression erfolgte unter Adjustierung für Alter und Geschlecht. Das Ergebnis der Regressionen wurde als HR mit zugehörigen 95%-KI angegeben. Alle deskriptiven und prospektiven Statistiken wurde mit IBM SPSS Statistics (Version 29.0.1, IBM Corporation, Armonk, NY, USA) durchgeführt, ebenso wurden die Überlebenszeitkurven hiermit generiert. Zur Darstellung der Tabellen wurden die Daten von IBM SPSS Statistics in Microsoft Word (Version 2411, Build 18227.20222, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) überführt und in gleicher Weise die Verteilungen der modifizierten Rankin-Skala (mRS) visualisiert. Alle inferentiellen Testungen wurden zweiseitig durchgeführt. Alle Analysen der Querschnittsdaten, abgesehen von der Auswertung der Grundgesamtheit, erfolgten mit Bonferroni-Korrektur unter Festlegung eines globalen P-Wertes von 0,05. Innerhalb einer Analyse wurden P-Werte unterhalb der angepassten lokalen P-Werte als statistisch signifikant betrachtet. Alle weiteren P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

## I.c. Ergebnisse

### I.c.i. Beschreibung der Studienparameter

Der Einschluss von Patient:innen in unsere Studie erfolgte vom November 2017 bis zum August 2019. Hier wurden 413 konsekutiv vorgestellte Patient:innen von der Stroke Unit des UKE rekrutiert. Nach Ausschluss von Patient:innen, welche nicht die Einschlusskriterien erfüllten, wurden 374 Patient:innen in die Studie eingeschlossen. Der Zeitraum der Nachverfolgung via Telefon oder E-Mail war vom Dezember 2019 bis März 2020, sodass im Median eine Nachverfolgungszeit von 337 (IQR: 227; 451) Tagen abgebildet werden konnte. Während der Nachverfolgung kam es insgesamt zu 79 unerwünschten Ereignissen in 72 Patient:innen von 274 Patient:innen mit verfügbaren Nachverfolgungsdaten. Diese umfassten einen nicht tödlichen Myokardinfarkt, 11 Schlaganfälle, 18 Todesfälle und 49 Wiedervorstellungen in einem Krankenhaus.

### I.c.ii. Beschreibung der Patient:innenkohorte

Die untersuchte Grundgesamtheit (n=374) hat ein medianes Alter bei Studieneinschluss von 70 (IQR: 58; 78) Jahren, wobei 242 Männer mit einem Anteil von 64,7 % teilnahmen. Der mediane BMI betrug 25,71 (IQR: 23,42; 28,35) kg/m². Die drei häufigsten kardiovaskulären Risikofaktoren waren arterielle Hypertonie (n = 272; 72,7 %), Hyperlipidämie (n = 121; 32,4 %) und eine aktuelle Raucheranamnese (n = 94; 25,1 %). Die mediane Konzentration von S1P im Blutserum betrug 1,463 (IQR: 1,256; 1,716) µmol/L, die mediane Konzentration von löslichem P-Selektin im Blutplasma betrug 116,6 (IQR: 79,47; 152,7) ng/mL. Die Medikationsauswertung ergab, dass 270 Patient:innen mit einem Anteil von 72,2 % zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Behandlung mit ASS aufwiesen. Weiter nahmen 76 Patient:innen mit einem Anteil von 20,3 % ADP-Rezeptor-Antagonisten und 72 Patient:innen mit einem Anteil von 19,3 % orale Antikoagulantien ein. Die Kohorte wies einen medianen NIHSS von 1 (IQR: 0; 3) Punkten und einen medianen mRS von 1 (IQR: 0; 2) Punkten auf.

### I.c.iii. Beschreibung der Querschnittsergebnisse

Die Betrachtung der Grundgesamtheit nach Einnahmestatus von ASS zum Zeitpunkt der Blutentnahme ergab zwei Gruppen (ASS, ja: n = 270; ASS, nein: n = 104). Es fanden sich eine signifikant niedrigere Rate an Vorhofflimmern (ASS, ja: n = 26 (9,6 %); ASS, nein: n = 59 (56,7 %); $p < 0.001$) und eine signifikant höhere Rate

an stattgehabten Myokardinfarkten (ASS, ja: n = 40 (14,8 %); ASS, nein: n = 5 (4,8 %); p < 0.001) in der Gruppe unter Einnahme von ASS. Entsprechend zeigte die Gruppe unter Einnahme von ASS eine signifikant höhere Frequenz von ADP-Rezeptorantagonisten (ASS, ja: n = 68 (25,2 %); ASS, nein: n = 8 (7,7 %); p < 0,001) und eine signifikant niedrigere Frequenz von Antikoagulantien (ASS, ja: n = 6 (2,9 %); ASS, nein: n = 65 (62,5 %); p < 0,001). Es wurde kein signifikanter Unterschied der Konzentration von S1P im Serum (ASS, ja: 1,46 (IQR: 1,27; 1,73) µmol/L; ASS, nein: 1,47 (IQR: 1,24; 1,68) µmol/L; p = 0,879) gefunden, wohingegen die Patient:innengruppe mit ASS eine signifikant höhere Konzentration von löslichem P-Selektin aufwies (ASS, ja: 125,55 (IQR: 90,34; 157,39) ng/mL; ASS, nein: 93,63 (IQR: 62,92; 132,60) ng/mL; p < 0,001). Darüber hinaus zeigte die Gruppe mit ASS eine signifikant höhere Konzentration von Triglyzeriden (ASS, ja: 130,0 (IQR: 92,5; 179,5) mg/dL; ASS, nein: 108,5 (IQR: 88,0; 151,5) mg/dL; p = 0,008) und eine signifikant niedrigere Konzentration von Kreatinin (ASS, ja: 0,88 (IQR: 0,74; 1,10) mg/dL; ASS, nein: 0,96 (IQR: 0,82; 1,18) mg/dL; p = 0,031). Eine vollständige Übersicht der Kohorte ist der Tabelle 1 im Tabellenverzeichnis einzusehen. Zum Zeitpunkt der Aufnahme in das Krankenhaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Verteilung von neurologischen und funktionalen Scores für Patient:innen mit hohem S1P verglichen mit niedrigem S1P als auch Patient:innen mit hohem löslichen P-Selektin verglichen mit niedrigem löslichen P-Selektin. Eine vollständige Übersicht zur Verteilung der neurologischen und funktionalen Scores zum Zeitpunkt der Aufnahme ins Krankenhaus ist der Tabelle 2 im Tabellenverzeichnis zu entnehmen, darüber hinaus ist die Verteilung der mRS den Abbildungen 1 & 2 im Abbildungsverzeichnis zu entnehmen. In den Korrelationsanalysen der Gruppe nach Einnahmestatus mit ASS zeigten sich nach Bonferroni-Korrektur signifikante Korrelationen von S1P mit Hämoglobin (Spearmansches ρ = 0,212; p < 0,001), Thrombozyten (Spearmansches ρ = 0,362; p < 0,001), Triglyzeriden (Spearmansches ρ = 0,211; p < 0,001), LDL-Cholesterin (Spearmansches ρ = 0,258; p < 0,001) und löslichem P-Selektin (Spearmansches ρ = 0,254; p < 0,001). Für die Gruppe nach Einnahmestatus ohne ASS ergab sich nach Bonferroni-Korrektur ausschließlich eine Korrelation mit der Thrombozytenzahl (Spearmansches ρ = 0,296; p = 0,003). Eine vollständige Übersicht der Korrelationen ist Tabelle 3 des Tabellenverzeichnis zu entnehmen.

### I.c.iv. Beschreibung der Längsschnittergebnisse

Zum Zeitpunkt der Entlassung aus dem Krankenhaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Verteilung von neurologischen und funktionalen Scores für Patient:innen mit hohem S1P verglichen mit niedrigem S1P als auch Patient:innen mit hohem löslichen P-Selektin verglichen mit niedrigem löslichen P-Selektin. Eine vollständige Übersicht zur Verteilung der neurologischen und funktionalen Scores zum Zeitpunkt der Aufnahme ins Krankenhaus ist der Tabelle 4 im Tabellenverzeichnis zu entnehmen, darüber hinaus ist die Verteilung der mRS den Abbildungen 3 & 4 im Abbildungsverzeichnis zu entnehmen.

Die Auswertung der Daten aus der Nachverfolgung (n=274) zeigte einen numerischen Trend der Kaplan-Meier-Schätzer für ereignisfreies Überleben in der Mantel-Cox-Testung für hohes S1P verglichen mit niedrigem S1P in der Gruppe mit ASS (hohes S1P: 319,2 (IQR: 297,9; 340,4) Tage; niedriges S1P: 302,3 (IQR: 280,7; 324,0) Tage, p = 0,057). In der Cox-Regression zeigte sich jedoch nach Adjustierung für Alter und Geschlecht eine signifikante niedrigere HR für Patient:innen mit hohem S1P in der Gruppe mit Einnahme von

ASS (nicht adjustiert: HR = 0,56 (95%-KI: 0,30; 1,03), p = 0,061; adjustiert: HR = 0,53 (95%-KI: 0,28; 0,98), p = 0,044). Die Auswertung der Daten aus der Nachverfolgung zeigte einen signifikanten Unterschied der Kaplan-Meier-Schätzer für ereignisfreies Überleben in der Mantel-Cox-Testung für niedriges lösliches P-Selektin verglichen mit hohem löslichem P-Selektin in der Gruppe ohne ASS (niedriges lösliches P-Selektin: 331,1 (IQR: 304,0; 358,1) Tage; hohes lösliches P-Selektin: 250,3 (IQR: 204,6; 295,9) Tage, p = 0,005). In der Cox-Regression zeigte sich ebenfalls für das nicht adjustierte und das nach Alter und Geschlecht adjustierte Model eine signifikante höhere HR für Patient:innen mit hohem löslichem P-Selektin in der Gruppe ohne Einnahme von ASS (nicht adjustiert: HR = 3,09 (95%-KI: 1,36; 7,02), p = 0,007; adjustiert: HR = 3,22 (95%-KI: 1,41; 7,36), p = 0,004). Eine vollständige Übersicht der longitudinalen Analysen ist den Tabellen 5 & 6 des Tabellenverzeichnis und den Abbildungen 5 & 6 des Abbildungsverzeichnisses zu entnehmen.

## I.d. Diskussion

### I.d.i. Sphingosin-1-phosphat und zerebrovaskuläre Erkrankungen

In einer veröffentlichten Teilauswertung der MARK-STROKE-Studie konnten wir zeigen, dass ein niedriges S1P im Serum mit einem schwereren neurologischen Defizit und einem schlechteren klinischen Ergebnis assoziiert ist (Schwedhelm et al., 2021). Die Thrombozyten tragen vermutlich zu einem wesentlichen Anteil zum Gesamt-S1P im Serum bei, da S1P nach Aktivierung oder Aggregation von Thrombozyten sowohl produziert als auch ausgeschüttet werden kann (Yatomi et al., 1995, Tani et al., 2005). Weiterhin hat S1P auch eine regulatorische Funktion auf die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten (Liu et al., 2021, Urtz et al., 2015). Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Ausschüttung von S1P abhängig ist von der Thromboxanproduktion und ebenso durch ASS gehemmt werden kann, zeigte sich in unserer Kohorte interessanterweise kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Medikationsgruppen (Ulrych et al., 2011). Darüberhinausgehend zeigten sich in unserer Kohorte im Gegensatz zu Thromboxan $B_2$ signifikant höhere Konzentrationen des löslichen P-Selektin unter Einnahme von ASS, sodass unter Umständen ein weiterer (patho-)physiologischer Stimulationsreiz für den Sekretion von S1P existiert, welcher unabhängig von der Thromboxan-abhängigen Thrombozytenaktivierung ist. Hierauf hinweisend sind auch die Auswertungen der bivariaten Korrelationen des S1P in beiden Medikationsgruppen. Während in der Medikationsgruppe unter Einnahme von ASS signifikante Korrelationen mit löslichem P-Selektin, Hämoglobin, Thrombozytenzahl, Triglyzeriden und LDL-Cholesterin gezeigt werden konnte, war das S1P in der Medikationsgruppe ohne Einnahme von ASS ausschließlich mit der Thrombozytenzahl korreliert. Diese Unterschiede in den Korrelationen unterstreichen den möglichen Beitrag anderer Quellen des zirkulierenden S1P in der Medikationsgruppe unter Einnahme von ASS. Die mediane Konzentration von S1P in unserer MARK-STROKE-Kohorte beträgt 1,46 µmol/L (IQR: 1,26; 1,72) und ist somit vergleichbar mit anderen veröffentlichten Daten, jedoch tendenziell höher. Beispielsweise wurden in einer Studie an gesunden Blutspendenden Serumkonzentrationen von 1,04 ± 0,24 µmol/L (AM ± SA) ermittelt (Soltau et al., 2016, Moritz et al., 2017). Darüber hinaus legen Veröffentlichungen nahe, dass die Konzentration von S1P bei Patient:innengruppen mit kardiovaskulären Erkrankungen möglicherweise niedriger ist (Liu et al., 2020, Knapp et al., 2013b). Die beobachteten Unterschiede in den Konzentrationen könnten auf unterschiedliche

Aufbereitungs- und Messmethoden zurückzuführen sein, beispielsweise auf die präanalytische Vorbereitung, einschließlich Lagerungszeit und -temperatur.

### I.d.ii. Lösliches P-Selektin und zerebrovaskuläre Erkrankungen

Lösliches P-Selektin ist ein Derivat des membranständigen Glykoproteins P-Selektin, welches sich wiederum vor allem auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten und Endothelzellen befindet (Stenberg et al., 1985, Gotsch et al., 1994). Durch das Ektodomänen-Shedding oder die direkte Freisetzung aus den α-Granula von Thrombozyten oder Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen kann lösliches P-Selektin in den Blutstrom freigesetzt werden (Michelson et al., 1996). Erhöhte Konzentrationen von löslichem P-Selektin wurden in zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen festgestellt, wie beispielsweise arterieller Hypertonie, peripherer arterieller Verschlusskrankheit, Hypercholesterinämie, Schlaganfall sowie akutes und chronisches Koronarsyndrom (Frijns et al., 1997, Shimomura et al., 1998, Sanada et al., 2005, Wassel et al., 2015, Davi et al., 1998, Ikeda et al., 1995). Neben dieser Nutzung als Biomarker, zeigten sich ebenfalls direkte Effekte vom löslichen P-Selektin in der Pathophysiologie der Atherosklerose, indem es einen wichtigen Beitrag zur Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten am Endothel leistet, einem wesentlichen Initiator der zugrundeliegenden Inflammation der Gefäßwand (Woollard et al., 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das lösliche P-Selektin in Patient:innen mit akutem Koronarsyndrom mit der Bildung Monozyten-Thrombozyten-Aggregaten assoziiert ist, welche wiederum eine Bindung an das Endothelium vermitteln können und somit die Entwicklung und Progression von atherosklerotischen Plaques beeinflussen könnten (da Costa Martins et al., 2004, Wang et al., 2007). Mit einer medianen Konzentration des löslichen P-Selektin von 116,6 (IQR: 79,47; 152,7) ng/mL in unserer Studienkohorte sind unserer gemessenen Konzentrationen vergleichbar mit anderen zuvor veröffentlichten Arbeiten, welche Plasmakonzentrationen von 53 ± 12 ng/mL [AM ± SA] (Erkrankung: periphere arterielle Verschlusskrankheit mit Claudicatio intermittens) bis 361 ± 90 ng/mL [AM ± SA] (Erkrankung: instabile Angina pectoris) aufwiesen (Davi et al., 1998, Frijns et al., 1997, Ikeda et al., 1995, Shimomura et al., 1998). Vorhandene Unterschiede sind möglicherweise auf Unterschiede im Studienprotokoll als auch Gerinnungshemmer der Monovetten zurückzuführen (Thom et al., 2004). Eine Biomarker-Studie über lösliches P-Selektin in Patient:innen mit akutem ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall kommt zu einem ähnlichen Ergebnis bezüglich des klinischen Ergebnisses, wobei anzumerken ist, dass die Studienmethodik, -parameter und -population stark unterscheiden (Bath et al., 1998).

### I.d.iii. Limitationen der MARK-STROKE Studie

Zunächst erlaubte unser Studienprotokoll vornehmlich den Einschluss von eigenständig einwilligungsfähigen Patient:innen. Hieraus resultiert, dass insbesondere Patient:innen mit schwerem neurologischem Defizit in unserer Kohorte unterrepräsentiert sind, sodass die Generalisierbarkeit der Ergebnisse einschränkt sein könnte. Auswertungen von Gesundheitsdaten der USA zeigten im Gegenzug jedoch auf, dass sich etwa jede/r zweite hospitalisierte Patient:in mit Schlaganfall mit einem NIHSS von null bis inklusive vier vorstellt, unsere Studienergebnisse folglich wichtige Einblick in eine relevante Gruppe des klinischen Alltags liefern können (Reeves et al., 2013, Saber and Saver, 2020). Eine weitere Einschränkung der Generalisierbarkeit ergibt sich aus dem Charakteristikum einer monozentrischen Studie an einem Universitätsklinikum einer

Metropolregion, sodass insbesondere Unterschiede zu Patient:innencharakteristika aus ländlichen Regionen keine Beachtung finden können (Hammond et al., 2020, Loccoh et al., 2022). Die Kalkulation der Studienpower bezogen auf die Endpunkte erfolgte anhand des primären Outcomes, S1P. Daher stellt die Analyse von Subgruppen, wie der Vorbehandlung mit ASS sowie hohes respektive niedriges P-Selektin eine rein explorative Datananalyse dar. Trotzdem zeigte sich in der Subgruppe der nicht mit ASS behandelten Studienteilnehmenden ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit hohem und niedrigem P-Selektin. Aufgrund der geringen Kohortengröße konnten weitere Untergruppen zur Medikation nicht weiter statistisch ausgewertet werden. Weitergehend ist es möglich, dass die Konzentrationsmessung des löslichen P-Selektins sowohl monomeres lösliches P-Selektin als auch P-Selektin-haltige Mikropartikel erfasst hat, wobei sich der Anteil auf etwa 4,7 (IQR: 2,6; 12,5) % der 7,13 (IQR: 1,86; 13,9) $x10^5$ Thrombozyten-abgeleiteten Mikropartikel pro Milliliter beziffern lässt in einer Gruppe von Patient:innen mit kritischer Extremitätenischämie (Tan et al., 2005). Es ist anzumerken, dass durch die präanalytische Präparation diese bereits zum Teil eliminiert werden können, andererseits unsere Messungen ebenso diese Spezies des zirkulierenden, zellfreien P-Selektin mit proinflammatorischer Funktion erfasst (Chandler, 2013).

## I.e. Fazit

Die vorgelegte Studie ermöglicht ein tieferes Verständnis der pathophysiologischen Aspekte von zerebralen Ischämien. Es konnte gezeigt werden, dass eine Unterscheidung der Patient:innen nach Medikationsstatus von ASS die Aussagekraft des löslichen P-Selektins verbessern konnte. Insbesondere Patient:innen ohne bisherige Therapie mit ASS und einem hohen löslichen P-Selektin im Blutplasma weisen dabei ein erhöhtes Risiko für unerwünschte Ereignisse im Verlauf nach dem initialen Krankenhausaufenthalt auf. Hieraus kann man ableiten, dass lösliches P-Selektin als Ergänzung der bestehenden Risikobewertung für Patient:innen mit zerebraler Ischämie ohne ASS-Einnahme herangezogen werden könnte.

# II. Originalversion des veröffentlichten Artikels

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
https://doi.org/10.1007/s00210-025-04595-w

RESEARCH




# Associations of sphingosine-1-phosphate with soluble P-selectin and adverse clinical outcome in patients with cerebral ischemia with and without acetylsalicylic acid treatment

**Nils-Ole Gloyer[1,2] · Eileen Moritz[3] · Laura Schwieren[1,4,5] · Ulrike Meyer[6] · Götz Thomalla[4] · Günter Daum[2,7] · Tim Magnus[4] · Rainer Böger[1] · Chi-un Choe[4,8] · Bernhard H. Rauch[6] · Edzard Schwedhelm[1,2]**

Received: 22 July 2025 / Accepted: 27 August 2025
© The Author(s) 2025, modified publication 2026

**Abstract**

Patients with overt cerebral ischemia are at risk for adverse events after hospital discharge. Sphingosine-1-phosphate is a potent lipid mediator produced and secreted by platelets, which is inhibited via acetylsalicylic acid (ASA). The associations of sphingosine-1-phosphate with biomarkers of platelet activation, i.e., thromboxane $B_2$ and soluble P-selectin, as well as with clinical outcome in ischemic stroke or transient ischemic attack patients' subgroups with and without ASA has not yet been investigated. The bioMARKers in STROKE (MARK-STROKE) cohort is a prospective, single-center, observational study including adult patients with a diagnosis of ischemic stroke or transient ischemic attack. Sphingosine-1-phosphate, thromboxane $B_2$, and soluble P-selectin were measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and ELISA, respectively, to investigate cross-sectional and outcome associations in ASA medication groups. Overall, we included 374 patients (median age 70 (IQR 58; 78) years; sex 242 (64.7%) males; ASA, yes 270 (72.2%)). During the first 365 days of follow-up, we recorded 79 adverse events (death, stroke, myocardial infarction, rehospitalization) in 274 patients with available follow-up. While no statistical differences in neurological and functional deficits were determined by sphingosine-1-phosphate, thromboxane $B_2$, and soluble P-selectin in both ASA medication groups, patients without ASA intake and high soluble P-selectin had shorter event-free survival times (high soluble P-selectin 250 (95%CI 205; 296) days; low soluble P-selectin 331 (95%CI 304; 358) days; $p = 0.005$). In addition, adjusted Cox-regression analysis revealed a higher hazard ratio (HR) for an adverse event during follow-up (HR = 3.22 (95%CI 1.41; 7.36); $p = 0.005$). Our findings may indicate the usability of soluble P-selectin in ASA-naive patients with ischemic stroke/transient ischemic attack for risk stratification.

**Keywords** Acetylsalicylic acid · Aspirin · Antiplatelet drugs · MARK-STROKE · Stroke/prevention

Chi-un Choe, Bernhard H. Rauch, and Edzard Schwedhelm contributed equally to this work.

✉ Edzard Schwedhelm
schwedhelm@uke.de

1 Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

2 German Center for Cardiovascular Research (DZHK e.V.) Partner Site, Hamburg/Kiel/Lübeck, Hamburg, Germany

3 Department of Pharmacology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

4 Department of Neurology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

5 Department of Neurosurgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

6 Department of Pharmacology and Toxicology, University Medicine Oldenburg, Carl von Ossietzky University Oldenburg, Oldenburg, Germany

7 Department of Vascular Medicine, University Heart and Vascular Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

8 Department of Neurology, Klinikum Itzehoe, Itzehoe, Germany

Published online: 08 October 2025

## Introduction

Despite recent improvements in the treatment and care of patients, stroke continues to be the third leading cause of death worldwide in 2021 (Collaborators GBDSRF 2024). Approximately one in four persons aged 25 years or older is considered at-risk of experiencing a stroke in later stages of life, leading to direct and indirect healthcare costs equivalent to 1.12% of the world's gross domestic product (Collaborators GBDLRoS et al. 1990; Owolabi et al. 2022). The heterogeneity of stroke pathophysiology is mirrored by the fact that many primary and secondary preventive measures have been introduced in the treatment of stroke patients, such as antiplatelet agents. Drugs like acetylsalicylic acid (ASA, aspirin) inhibit platelet activation and aggregation, reducing the incidence of thromboembolic events in cerebrovascular at-risk patients (Aboyans et al. 2018; Brown et al. 2021).

Platelets are anucleate blood cells that regulate a variety of important vascular functions beyond hemostasis (Gawaz et al. 2005; Stoll and Nieswandt 2019). Thus, aspects of platelet function have been associated with several atherosclerotic conditions, including peripheral or coronary artery disease and myocardial infarction (Trip et al. 1990; Cassar et al. 2003). Moreover, elevated blood markers of platelet activation can be detected during the acute and chronic phases of cerebral ischemia (Marquardt et al. 2002). We previously investigated several blood-based biomarkers, among them sphingosine-1-phosphate, in the bioMARKers in STROKE (MARK-STROKE) cohort including patients with either transient ischemic attack or ischemic stroke (Schwedhelm et al. 2021a). Sphingosine-1-phosphate is a versatile lipid mediator regulating inflammatory processes, which has been discussed recently as a possible biomarker during acute vascular events such as early ischemic stroke (Liu et al. 2020). Identified sources of circulating sphingosine-1-phosphate include activated platelets, which are pharmacologically targeted by ASA via inhibition of platelet activation and consequently reduction of sphingosine-1-phosphate secretion (Polzin et al. 2013; Ulrych et al. 2011), thus underpinning the role of sphingosine-1-phosphate in inflammation due to its sphingosine-1-phosphate receptor 3-mediated mobilization of P-selectin (Nussbaum et al. 2015). Conclusively, other blood-based biomarkers, like thromboxane $B_2$, as an established COX1-dependent marker, and soluble P-selectin, may be of particular interest for evaluation of the state of platelet activation in healthy individuals as well as vascular disease patients (Ridker et al. 2001; Spencer et al. 2002; Blann et al. 1995; Nadar et al. 2004). Therefore, we investigated cross-sectional as well as longitudinal associations of sphingosine-1-phosphate in our MARK-STROKE cohort stratified by ASA intake as well as potential underlying confounders including biomarkers of platelet activation.

## Methods

### Ethical statement

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hamburg Board of Physicians (Approval codes PV4715, PV5979) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Enrolled patients or their surrogates provided written informed consent.

### Study design

The bioMARKers in STROKE (MARK-STROKE) cohort is an ongoing investigator-initiated, single-center, prospective, observational study at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany (Schwedhelm et al. 2021a; Schwedhelm et al. 2021b; Schwedhelm et al. 2022; Schwieren et al. 2023). Patients were enrolled consecutively and eligible for inclusion in the study if they had (i) diagnosis of an acute ischemic stroke or transient ischemic attack (TIA) by a board-certified neurologist, were (ii) 18 years or older, and (iii) written informed consent was provided.

The study variables extracted from individual electronic patient records include demographics (age at study inclusion, sex, body mass index), medical history and cardiovascular risk factors (current smoking, arterial hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus, atrial fibrillation, prior myocardial infarction or stroke), laboratory data (hemoglobin, leucocytes, platelet count, HbA1c, triglycerides, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, creatinine), medication at the time point of blood sample collection (ASA, adenosine diphosphate (ADP) receptor inhibitors, anticoagulants), and clinical characteristics (National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) at admission, modified Rankin Scale (mRS) at admission).

### Outcome variables

For outcome analyses, scores on the mRS and NIHSS were obtained at discharge through in-person, formal, structured interviews and examinations of patients that were performed by qualified assessors. Furthermore, we obtained follow-up data recording adverse events via phone, mail, or email defined as rehospitalization, myocardial infarction, stroke, and death. Events were included until 365 days after the index date.

### Blood collection and laboratory measurements

Plasma blood samples were collected at the time of inclusion by sterile antecubital venipuncture and aspirated into K3 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) containers (preparation concentration 1.6 mg/mL blood), immediately mixed by inversion, centrifuged at 2000 g and frozen at − 80 °C until further analysis. Similarly, serum blood samples were obtained by aspiration into silicate containers with identical preanalytical preparation procedures. Measurements were performed blinded to clinical data.

Sphingosine-1-phosphate was quantified in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method as previously reported (Daum et al. 2020).

Thromboxane $B_2$ was measured in serum by ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's protocols. In summary, the 96-well plate format was pipetted with blank, non-specific-binding and total activity wells, as well as duplicates of eight steps of the thromboxane $B_2$ calibrators, which ranged from 1.6 to 1000 pg/mL. For sample measurement, 50 µL of a 1:20 dilution of serum blood specimen was added to 50 µL of AChE tracer and 50 µL thromboxane $B_2$ antiserum, which were then incubated at 4 °C overnight. After incubation, the wells were emptied and rinsed five times with washing buffer. For the development of the plate, 200 µL of Ellman's reagent was added to each well and incubated in darkness on an orbital shaker for 90 to 120 min. Subsequently, the plate was read at a wavelength of 412 nm. Sample dilutions outside the standard concentrations were repeated with 1:5 or 1:100 dilutions. The sensitivity was 5 pg/mL thromboxane $B_2$.

Soluble P-selectin in plasma was determined by a sandwich ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocols. In brief, 100 µL of standards, samples, and controls was added to the microplate wells, which were precoated with a monoclonal antibody targeting human P-selectin. Standard concentrations ranged from 0.781 to 50 ng/mL. Plasma samples and controls were diluted 1:20 prior to measurement. After adding 100 µL of a polyclonal detection antibody conjugated to horseradish peroxidase, the plate was incubated for 1 h at room temperature and washed three times. Color development was initiated by adding 200 µL of a substrate solution containing hydrogen peroxide and the chromogen, followed by a 15 min incubation in darkness. The reaction was terminated by adding 50 µL of a stop solution and the plate was read at a wavelength of 450 nm.

### Statistics

Continuous variables were reported as medians and interquartile ranges (IQR), whereas categorical variables were presented as absolute numbers and percentages of the total participants. Spearman's rank correlation test was conducted for bivariate correlation analysis. Mann–Whitney U-test was used for comparing continuous data of two groups. Categorical data were compared using Pearson's chi-squared test. The median follow-up period was determined using the reverse Kaplan–Meier method. We calculated the risk of an adverse event, such as rehospitalization, myocardial infarction, stroke and death, from the time of inclusion in the study, using univariate and multivariable Cox regression analyses including a crude analysis, and a model with age and sex adjustment. The results of the analyses were presented as hazard ratios (HR) and their corresponding 95% confidence intervals (CI). Event-free survival times, stratified by the defined groups, were presented in the Kaplan–Meier plot. The Kaplan–Meier estimators were given as mean event-free survival times in days and corresponding 95% CIs. Heterogeneity between groups concerning the event-free survival times were determined through the Mantel-Cox test. In the longitudinal analyses, the events until 365 days after inclusion in the study were included into the performed test. IBM SPSS Statistics (version 29.0.1, IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for all statistical analyses. All tests were two-sided. For all cross-sectional analyses, except from baseline characteristics, a global *p*-value below 0.05 was targeted and within analyses local *p*-values below Bonferroni-corrected limits were regarded as significant; otherwise, a *p*-value below 0.05 was regarded significant.

### Data availability

Data extracts from MARK-STROKE that support our findings are available upon reasonable request from the corresponding author.

## Results

### Baseline analyses

From November 2017 until August 2019, a total of 413 consecutive suspected stroke patients passed screening at the Stroke Unit at the Department of Neurology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, of which 374 patients were included. From December 2019 through March 2020, all participants were contacted via telephone, mail, or email for follow-up purposes. During a median follow-up period of 337 (IQR 227; 451) days, we recorded 79 adverse events in 72 patients out of 274 patients with available follow-up. Documented events comprised 18 deaths, 1 non-fatal myocardial infarction, 11 strokes, and 49 rehospitalizations (Supplementary Table 5).

At baseline, patients of the MARK-STROKE cohort had a median age of 70 (IQR 58; 78) years, and 242 (64.7%)

were male (Table 1). The three most common vascular risk factors were arterial hypertension ($n = 272$; 72.7%), followed by hyperlipidemia ($n = 121$; 32.4%) and current smoking ($n = 94$; 25.1%). Treatment with ASA was reported in 270 (72.2%) cases. Severity of the neurological deficits, expressed as median NIHSS, was 1 (IQR 0; 3), and the functional status, expressed as median mRS, was 1 (IQR 0; 2).

Assignment of patients according to their medication with ASA deviated two subgroups. Strikingly, there was no difference in sphingosine-1-phosphate levels between patients with and without ASA intake, while there were lower thromboxane $B_2$ and higher soluble P-selectin levels in patients with ASA intake compared to patients without ASA intake. As expected, patients with ASA intake presented a significantly lower frequency of atrial fibrillation and a significantly higher frequency of prior myocardial infarction. Furthermore, patients with ASA intake showed significantly higher levels of triglycerides and lower creatinine (Table 1).

Bivariate cross-sectional analyses revealed a robust correlation between sphingosine-1-phosphate and soluble P-selectin in the ASA-treated subgroup (Spearman's $\rho = 0.254$, $p < 0.001$) and a weak correlation between sphingosine-1-phosphate and thromboxane $B_2$ in the ASA-treated subgroup but not in patients without ASA treatment. Furthermore, sphingosine-1-phosphate in patients with ASA intake was correlated with hematocrit, platelet counts, triglycerides, and LDL-cholesterol ($p < 0.001$ for all) while only being significantly correlated with hematocrit and

**Table 1** Baseline characteristics of total cohort and derivatives. Continuous data are presented in median (interquartile range). Categorical data are presented as absolute numbers (percentage) of participants. Mann–Whitney U or Chi-squared test were used as appropriate. Abbreviations: *ADP*, adenosine diphosphate; *aspirin*, acetylsalicylic acid; *HbA1c*, glycated hemoglobin A1c; *HDL*, high-density lipoprotein; *LDL*, low-density lipoprotein; *NIHSS*, National Institute of Health Stroke Scale; *mRS*, modified Rankin Scale. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$

| Baseline characteristics of patients from the MARK-STROKE cohort | | | |
|---|---|---|---|
| Characteristics | Aspirin, yes ($n = 270$) | Aspirin, no ($n = 104$) | $p$-value |
| Demographics | | | |
| Age—years | 68.0 (57.0; 77.0) | 72.0 (61.3; 81.0) | 0.051 |
| Male sex—no. (%) | 171 (63.3) | 71 (68.3) | 0.371 |
| Body mass index—kg/m2 | 25.8 (23.7; 28.4) | 25.4 (23.2; 28.4) | 0.629 |
| Vascular risk factors | | | |
| Current smoking—no. (%) | 69 (25.5) | 25 (24.0) | 0.762 |
| Hypertension—no. (%) | 195 (72.2) | 77 (74.0) | 0.724 |
| Hyperlipidemia—no. (%) | 91 (33.7) | 30 (28.8) | 0.368 |
| Diabetes mellitus—no. (%) | 51 (18.9) | 13 (12.5) | 0.142 |
| Atrial fibrillation—no. (%) | 26 (9.6) | 59 (56.7) | <0.001*** |
| Prior myocardial infarction—no. (%) | 40 (14.8) | 5 (4.8) | <0.001*** |
| Prior stroke—no. (%) | 43 (15.9) | 19 (18.3) | 0.585 |
| Laboratory | | | |
| Hematocrit—% | 40.8 (37.3; 44.3) | 40.0 (36.6; 42.7) | 0.182 |
| Leucocytes—$10^9$/L | 7.30 (5.88; 8.73) | 7.75 (6.13; 9.98) | 0.073 |
| Platelets—$10^9$/L | 238.5 (195.0; 287.3) | 232.5 (174.3; 269.5) | 0.110 |
| HbA1c—% | 5.7 (5.4; 6.1) | 5.7 (5.4; 5.9) | 0.708 |
| Triglycerides—mg/dL | 130.0 (92.5; 179.5) | 108.5 (88.0; 151.5) | 0.008** |
| HDL-cholesterol—mg/dL | 49.0 (40.0; 60.0) | 49.5 (38.0; 59.0) | 0.525 |
| LDL-cholesterol—mg/dL | 106.0 (77.5; 136.0) | 102.0 (74.5; 131.5) | 0.445 |
| Creatinine—mg/dL | 0.88 (0.74; 1.10) | 0.96 (0.82; 1.18) | 0.031* |
| Sphingosine-1-phosphate—µmol/L | 1.46 (1.27; 1.73) | 1.47 (1.24; 1.68) | 0.879 |
| Thromboxane $B_2$—pg/mL | 416.9 (133.9; 3338) | 14,580 (4146; 39,718) | <0.001*** |
| Soluble P-selectin—ng/mL | 125.6 (90.3; 157.4) | 93.6 (62.9; 132.6) | <0.001*** |
| Symptom onset to blood draw—h | 47.5 (28.3; 92.0) | 42.0 (23.9; 69.0) | 0.104 |
| Medication | | | |
| Aspirin—no. (%) | 270 (100) | 0 (0) | |
| ADP receptor inhibitors—no. (%) | 68 (25.2) | 8 (7.7) | <0.001*** |
| Anticoagulants—no. (%) | 6 (2.9) | 65 (62.5) | <0.001*** |
| Neurology | | | |
| NIHSS—points | 1 (0; 3) | 2 (0; 4) | 0.351 |
| mRS—points | 1 (0; 3) | 1 (0; 3) | 0.887 |

**Table 2** Bivariate correlation analyses of sphingosine-1-phosphate with baseline data. Abbreviations: *aspirin,* acetylsalicylic acid; *HbA1c*, glycated hemoglobin A1c; *HDL*, high-density lipoprotein; *LDL*, low-density lipoprotein. * indicates statistical significance after Bonferroni-correction for multiple comparisons

| Cross-sectional correlation analyses of sphingosine-1-phosphate | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Aspirin, yes ($n=270$) | | Aspirin, no ($n=104$) | |
| Variable | Spearman's ρ | *p*-value | Spearman's ρ | *p*-value |
| Age | −0.127 | 0.038 | −0.253 | 0.010 |
| Body mass index | 0.018 | 0.778 | 0.070 | 0.497 |
| Hematocrit | 0.211 | <0.001* | 0.258 | 0.009 |
| Leucocytes | 0.071 | 0.247 | 0.221 | 0.025 |
| Platelets | 0.362 | <0.001* | 0.296 | 0.003* |
| HbA1c | −0.002 | 0.978 | 0.060 | 0.551 |
| Triglycerides | 0.211 | <0.001* | 0.162 | 0.108 |
| HDL-cholesterol | −0.050 | 0.415 | 0.049 | 0.626 |
| LDL-cholesterol | 0.258 | <0.001* | 0.203 | 0.044 |
| Creatinine | −0.071 | 0.246 | −0.046 | 0.649 |
| Soluble P-selectin | 0.254 | <0.001* | 0.117 | 0.240 |
| Thromboxane $B_2$ | 0.158 | 0.041 | 0.020 | 0.885 |

platelet counts ($p<0.01$ for both) in patients without ASA intake (Table 2).

At baseline, participants without functional/neurological deficit (mRS = 0 or NIHSS = 0) versus patients with functional/neurological deficit (mRS > 0 or NIHSS > 0) were equally distributed among the two groups of low or high sphingosine-1-phosphate and soluble P-selectin (Supplementary Table 1).

## Stroke outcomes

At discharge, participants without functional/neurological deficit (mRS = 0 or NIHSS = 0) versus patients with functional/neurological deficit (mRS > 0 or NIHSS > 0) were equally distributed among the two groups with low or high sphingosine-1-phosphate and soluble P-selectin (Supplementary Table 2).

For longitudinal analyses, the Mantel-Cox analyses in both ASA medication groups revealed no differences in event-free survival time between sphingosine-1-phosphate groups; however, Cox-regression analyses in patients with high sphingosine-1-phosphate revealed a significantly lower hazard ratio for an adverse event after adjusting for age and sex in patients with ASA intake (Supplementary Table 3 & 4). For soluble P-selectin, the Mantel-Cox analyses revealed a significantly shorter event-free survival time for patients without ASA intake and high soluble P-selectin levels (Fig. 1). Concomitantly, Cox-regression analyses showed a significantly higher hazard ratio of this group for an adverse event in crude and adjusted analyses (Table 3).

## Discussion and conclusion

In the MARK-STROKE cohort, we found that (i) although sphingosine-1-phosphate levels did not differ between ASA medication groups, (ii) sphingosine-1-phosphate associates with soluble P-selectin in the ASA medication group. Albeit (iii) sphingosine-1-phosphate was not able to distinguish at-risk patients in the group without ASA treatment, patients with high soluble P-selectin presented a shorter event-free

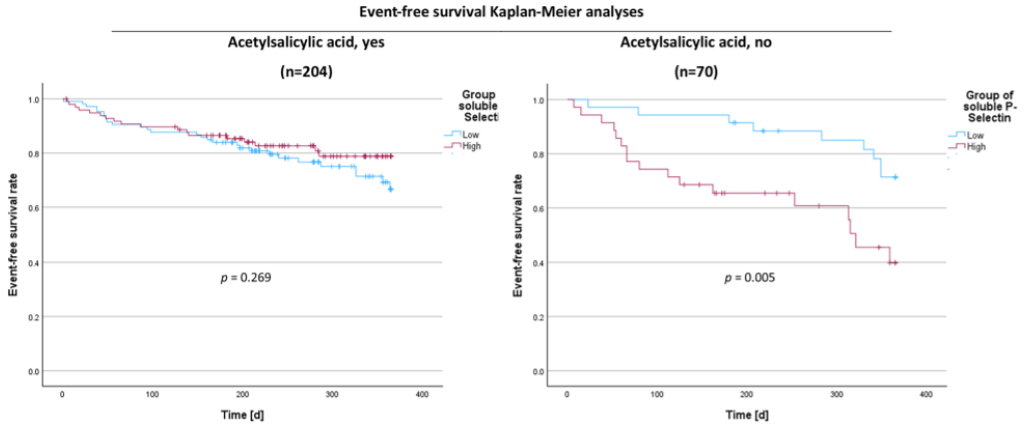



**Fig. 1** Kaplan–Meier analyses according to reported acetylsalicylic acid intake. Group coding: 1—soluble P-selectin above median, 2—soluble P-selectin below median. Classification limits of plasma soluble P-selectin: median (acetylsalicylic acid, yes) = 125.11 ng/mL, median (acetylsalicylic acid, no) = 91.88 ng/mL

**Table 3** Cox-regression analyses according to reported acetylsalicylic acid intake. Regression models: A—unadjusted; B—adjusted for age and sex. Abbreviations: *aspirin*, acetylsalicylic acid; *95%CI*, 95% confidence interval; *HR*, hazard ratio. Classification limits of plasma soluble P-selectin: median (acetylsalicylic acid, yes) = 125.11 ng/mL, median (acetylsalicylic acid, no) = 91.88 ng/mL. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$

| Cox-regression analyses for soluble P-selectin | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Aspirin, yes | | | Aspirin, no | | |
| High vs. low soluble P-selectin | Model | HR (95%CI) | *p*-value | Model | HR (95%CI) | *p*-value |
| | A | 0.73 (0.40; 1.32) | 0.298 | A | 3.09 (1.36; 7.02) | 0.007** |
| | **B** | 0.71 (0.39; 1.29) | 0.259 | **B** | 3.22 (1.41; 7.36) | 0.005** |

survival rate and higher hazard ratio for an adverse event in these patients, exclusively.

Recently, we have shown that serum sphingosine-1-phosphate is inversely associated with severity and outcome after cerebral ischemia (Schwedhelm et al. 2021a). Sphingosine-1-phosphate is produced by and released from platelets upon activation and has been suggested to modulate the platelets' ability to aggregate in response to certain stimuli (Yatomi et al. 1995; Tani et al. 2005; Urtz et al. 2015; Liu et al. 2021). Even though it is known that the secretion of sphingosine-1-phosphate from human platelets is inhibited by ASA (Ulrych et al. 2011), we observed no differences in sphingosine-1-phosphate between both ASA medication groups but reduced thromboxane $B_2$ in the ASA medication group. Conversely, patients with reported ASA intake revealed higher levels of soluble P-selectin, pointing towards other physiological stimuli for secretion of sphingosine-1-phosphate independent from thromboxane mediated platelet activation. Interestingly, there were relevant differences in the associations with sphingosine-1-phosphate according to the ASA use. The significant associations in ASA treated patients with soluble P-selectin, hematocrit, platelet count, triglycerides, and LDL-cholesterol were lessened to a single association with the platelet count in patients without ASA treatment. Thus, underpinning the contribution of other sources to circulatory sphingosine-1-phosphate in patients taking ASA, i.e., red blood cells (Table 2). In line with our previous findings, patients with ASA treatment and high sphingosine-1-phosphate revealed a trend for a lower hazard ratio for an adverse clinical outcome, which became significant after adjustment (Supplementary Table 3).

Soluble P-selectin is a soluble derivative of the membrane-bound P-selectin glycoprotein found on the surfaces of activated platelets and endothelial cells (Stenberg et al. 1985; Bonfanti et al. 1989). Enzymatic cleavage or direct release from the alpha-granules of activated platelets and Weibel-Palade bodies of endothelial cells releases soluble P-selectin into the bloodstream (McEver et al. 1989; Ishiwata et al. 1994; Berger et al. 1998). Elevated levels of soluble P-selectin have been observed in various cardiovascular diseases (CVD), including acute coronary syndrome, ischemic heart disease, and stroke, suggesting its potential use as a biomarker (Blann et al. 1995; Ikeda et al. 1995; Frijns et al. 1997). In atherosclerosis, soluble P-selectin plays a crucial role in the recruitment and adhesion of leukocytes to the endothelium (Woollard et al. 2008). Soluble P-selectin is associated with the formation of monocyte-platelet aggregates, which adhere to the endothelium and facilitate the development and progression of atherosclerotic plaques (Wang et al. 2007; Costa Martins et al. 2004). Additionally, the release of soluble P-selectin promotes a pro-coagulant state, potentially leading to an infarction in downstream arterial vascular territories (Andre et al. 2000). The role of soluble P-selectin in ischemic stroke, the most common type of stroke, is of particular interest and studies have shown that levels of soluble P-selectin are elevated in patients with acute ischemic stroke compared to healthy controls (Frijns et al. 1997). Moreover, soluble P-selectin seemed to predict the adverse event of a stroke after a transient ischemic attack in a large population-based study (Segal et al. 2014).

The concentration of soluble plasma P-selectin measured in our cohort is comparable to other studies on plasma P-selectin in acute and chronic cardio- and cerebrovascular diseases, such as acute myocardial infarction, stroke, ischemic heart diseases, or peripheral artery disease (Blann et al. 1995; Blann et al. 1996; Frijns et al. 1997; Shimomura et al. 1998). Slight differences of soluble P-selectin may be due to the constitution or study design of cohorts (Thom et al. 2004). Notwithstanding the absence of comparability due to the significant disparities in the study population (ischemic and hemorrhagic strokes) and methodologies (severity scales: Glasgow Coma Scale versus mRS/NIHSS), the findings align with those of a previously published study, which also demonstrated an absence of association between soluble P-selectin and short-term outcomes (Bath et al. 1998).

Our findings point towards the need for an improved understanding of the pathophysiological basis and more

comprehensive risk assessment of patients with cerebral ischemia. Patients with high soluble P-selectin plasma levels and without an antiplatelet medication such as ASA may be at an elevated risk for an adverse clinical outcome. These patients may benefit from an optimized follow-up and medical interventions aimed at risk reduction. In agreement with this notion, experimental data show an association of high soluble P-selectin in plasma with poorer stroke outcome, i.e., larger infarction volumes and increased blood–brain barrier permeability, even suggesting soluble P-selectin a potential target option for focal cerebral ischemia (Kisucka et al. 2009).

There are several potential limitations that may have affected the results of our study. Firstly, the study protocol primarily allowed for the inclusion of patients who were able to give their consent independently. As a result, patients with severe neurological deficits who were not able to give informed consent may have been under-represented in our study cohort, thus confining the generalizability. However, it should be noted that about one in two hospitalized stroke patients presents with a NIHSS between zero and four; therefore, our presented study is providing insights into to a clinically relevant patient population (Saber and Saver 2020; Reeves et al. 2013). The characteristics of the single university study center in a metropolitan city may contribute to potential selection bias (Hammond et al. 2020). A limited study power could be linked to the small sample size and short duration of follow-up, as demonstrated by relatively wide 95% confidence intervals and a low number of occurrences of deaths, strokes, or myocardial infarctions during the follow-up period, which may restrict the ability to identify a significant association with relevant endpoints. Furthermore, the reasons for rehospitalization were not documented; thus, non-causal associations cannot be ruled out. Finally, the presence of multiple medical conditions in patients with evident cardiovascular diseases and their resulting treatments could increase the likelihood of medication bias. Additionally, the direct verification of soluble P-selectin as a marker for platelet activation through flow cytometry or light transmission aggregometry was not feasible due to the use of frozen plasma samples.

In conclusion, increased plasma soluble P-selectin levels in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack without ASA treatment are associated with a higher risk of adverse clinical outcomes in longitudinal analyses. Therefore, plasma soluble P-selectin might be an additional prognostic biomarker of interest for the identification of patients at risk, in addition to the conventional risk assessment in patients with cerebral ischemia.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00210-025-04595-w.

**Author contribution** C.-u.C., B.R., and E.S. envisioned the concept, designed the study, and coordinated the research project. N.-O.G. wrote the initial draft of the manuscript. N.-O.G., E.M., L.S., and U.M. analyzed data. N.O.G., E.M., L.S., U.M., G.T., C.-u.C, B.R., and E.S. interpreted data. All authors critically revised the manuscript and approved the final version of this manuscript. The authors declare that all data were generated in-house and that no paper mill was used.

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. C.-u.C. was supported by an Else Kröner Exzellenzstipendium from the Else Kröner-Fresenius Stiftung (grant number 2018 EKES).

**Data availability** Data extracts from MARK-STROKE that support our findings are available upon reasonable request from the corresponding author.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

## References

Aboyans V et al (2018) 2017 ESC guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteriesEndorsed by: the European Stroke Organization (ESO)The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). Eur Heart J 39(9):763–816

Andre P et al (2000) Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. Proc Natl Acad Sci U S A 97(25):13835–13840

Bath PM et al (1998) Von willebrand factor, P-selectin and fibrinogen levels in patients with acute ischaemic and haemorrhagic stroke, and their relationship with stroke sub-type and functional outcome. Platelets 9(3–4):155–159

Berger G, Hartwell DW, Wagner DD (1998) P-selectin and platelet clearance. Blood 92(11):4446–4452

Blann AD et al (1995) von Willebrand factor, soluble P-selectin, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in atherosclerosis. Thromb Haemost 74(2):626–630

Blann AD (1996) Soluble p selectin in peripheral vascular disease: relationship to the location and extent of atherosclerotic disease and its risk factors. Blood Coagul Fibrinolysis 7(8):789–793

Bonfanti R et al (1989) PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. Blood 73(5):1109–1112
Brown DL et al (2021) Benefits and risks of dual versus single antiplatelet therapy for secondary stroke prevention: a systematic review for the 2021 guideline for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack. Stroke 52(7):e468–e479
Cassar K et al (2003) Platelet activation is increased in peripheral arterial disease. J Vasc Surg 38(1):99–103
Collaborators GBDSRF (2024) Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. Lancet Neurol 23(10):973–1003
Collaborators GBDLROS, GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators et al (2018) Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016. N Engl J Med 379(25):2429–2437
da Costa Martins P et al (2004) Platelet-monocyte complexes support monocyte adhesion to endothelium by enhancing secondary tethering and cluster formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(1):193–199
Daum G et al (2020) Determinants of serum- and plasma sphingosine-1-phosphate concentrations in a healthy study group. TH Open 4(1):e12–e19
Frijns CJ (1997) Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. Stroke 28(11):2214–2218
Gawaz M, Langer H, May AE (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest 115(12):3378–3384
Hammond G et al (2020) Urban-rural inequities in acute stroke care and in-hospital mortality. Stroke 51(7):2131–2138
Ikeda H et al (1995) Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. Circulation 92(7):1693–1696
Ishiwata N et al (1994) Alternatively spliced isoform of P-selectin is present in vivo as a soluble molecule. J Biol Chem 269(38):23708–23715
Kisucka J et al (2009) Elevated levels of soluble P-selectin in mice alter blood-brain barrier function, exacerbate stroke, and promote atherosclerosis. Blood 113(23):6015–6022
Liu J (2020) Serum sphingosine 1-phosphate (S1P): a novel diagnostic biomarker in early acute ischemic stroke. Front Neurol 11:985
Liu H et al (2021) Sphingosine-1-phosphate modulates PAR1-mediated human platelet activation in a concentration-dependent biphasic manner. Sci Rep 11(1):15308
Marquardt L et al (2002) Course of platelet activation markers after ischemic stroke. Stroke 33(11):2570–2574
McEver RP et al (1989) GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. J Clin Invest 84(1):92–99
Nadar SK, Lip GY, Blann AD (2004) Platelet morphology, soluble P selectin and platelet P-selectin in acute ischaemic stroke. The west Birmingham stroke project. Thromb Haemost 92(6):1342–1348
Nussbaum C et al (2015) Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes leukocyte rolling by mobilizing endothelial P-selectin. Nat Commun 6:6416
Owolabi MO et al (2022) Primary stroke prevention worldwide: translating evidence into action. Lancet Public Health 7(1):e74–e85
Polzin A et al (2013) Aspirin inhibits release of platelet-derived sphingosine-1-phosphate in acute myocardial infarction. Int J Cardiol 170(2):e23–e24
Reeves M et al (2013) Distribution of National Institutes of Health stroke scale in the Cincinnati/Northern Kentucky stroke study. Stroke 44(11):3211–3213
Ridker PM, Buring JE, Rifai N (2001) Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. Circulation 103(4):491–495
Saber H, Saver JL (2020) Distributional validity and prognostic power of the National Institutes of Health Stroke Scale in US administrative claims data. JAMA Neurol 77(5):606–612
Schwedhelm E et al (2021a) Serum sphingosine-1-phosphate levels are associated with severity and outcome in patients with cerebral ischemia. Stroke 52(12):3901–3907
Schwedhelm E et al (2021b) Trimethyllysine, vascular risk factors and outcome in acute ischemic stroke (MARK-STROKE). Amino Acids 53(4):555–561
Schwedhelm E et al (2022) Effective high-density lipoprotein cholesterol is associated with carotid intima-media thickness and vascular events after acute ischemic stroke. Atherosclerosis 357:9–13
Schwieren L et al (2023) Homoarginine associates with carotid intima-media thickness and atrial fibrillation and predicts adverse events after stroke. Life. https://doi.org/10.3390/life13071590
Segal HC et al (2014) Population-based study of blood biomarkers in prediction of subacute recurrent stroke. Stroke 45(10):2912–2917
Shimomura H (1998) Serial changes in plasma levels of soluble P-selectin in patients with acute myocardial infarction. Am J Cardiol 81(4):397–400
Spencer CG (2002) Von willebrand factor, soluble P-selectin, and target organ damage in hypertension: a substudy of the Anglo-Scandinavian cardiac outcomes trial (ASCOT). Hypertension 40(1):61–66
Stenberg PE (1985) A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. J Cell Biol 101(3):880–886
Stoll G, Nieswandt B (2019) Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke - implications for treatment. Nat Rev Neurol 15(8):473–481
Tani M et al (2005) Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. J Lipid Res 46(11):2458–2467
Thom J et al (2004) Measurement of soluble P-selectin and soluble CD40 ligand in serum and plasma. J Thromb Haemost 2(11):2067–2069
Trip MD et al (1990) Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. N Engl J Med 322(22):1549–1554
Ulrych T (2011) Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation. J Thromb Haemost 9(4):790–798
Urtz N et al (2015) Sphingosine 1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 intrinsically controls platelet aggregation in vitro and in vivo. Circ Res 117(4):376–387
Wang J (2007) Elevated levels of platelet-monocyte aggregates and related circulating biomarkers in patients with acute coronary syndrome. Int J Cardiol 115(3):361–365
Woollard KJ (2008) Pathophysiological levels of soluble P-selectin mediate adhesion of leukocytes to the endothelium through Mac-1 activation. Circ Res 103(10):1128–1138
Yatomi Y et al (1995) Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. Blood 86(1):193–202

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

# III. Zusammenfassung

## III.a. Deutsche Fassung

Der Schlaganfall ist eine epidemiologisch hoch relevante Erkrankung, wovon der ischämische Subtyp mit über 65 % den größten Teil ausmacht. Etwa einer in drei Patient:innen mit einem erlittenen ischämischen Schlaganfall oder transitorisch ischämischer Attacke (TIA) erleiden im Verlauf von zehn Jahren einen weiteren Schlaganfall. Sphingosin-1-phosphat (S1P) hat eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie von Atherosklerose sowie Schlaganfall und wird nach Aktivierung von Thrombozyten von diesen ausgeschüttet. Die Ausschüttung von S1P ist abhängig von Thromboxan und kann entsprechend durch Acetylsalicylsäure (ASS) gehemmt werden. Lösliches P-Selektin ist ein Aktivierungsmarker für Thrombozyten und hat ebenfalls Einfluss auf die Pathophysiologie von Atherosklerose und Schlaganfall.

Bei MARK-STROKE handelt es sich um eine Beobachtungsstudie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, welche volljährige Patient:innen mit akutem ischämischem Schlaganfall oder TIA eingeschlossen hat. S1P wurde durch Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung und lösliches P-Selektin sowie Thromboxan $B_2$, als Surrogatmarker für die ASS-Wirkung, mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay bestimmt. Die gemessenen Marker wurden bezüglich der Querschnittsdaten (Demografie, Risikofaktoren, Labor, Klinik) ausgewertet und Assoziationen zu unerwünschten Ereignissen (Endpunkt: Tod, nicht-tödlicher Myokardinfarkt, Schlaganfall und Hospitalisierung) im Verlauf untersucht.

Es wurde 374 Patient:innen mit einem Altersmedian von 70 Jahren eingeschlossen, wovon 64,7 % männlich waren. In den ersten 365 Tagen traten 79 unerwünschte Ereignisse in 274 Patient:innen mit verfügbaren Nachverfolgungsdaten auf. Zum Zeitpunkt der Entlassung aus dem Krankenhaus gab es keine Heterogenität in den neurologischen und funktionalen Defiziten zwischen beiden Markern und Medikationsgruppen. Hingegen zeigte sich eine signifikant kürzere ereignisfreie Zeit für Patient:innen ohne ASS mit hohem löslichen P-Selektin (hoch: 250 (95%-KI: 205; 296) Tage; niedrig: 331 (95%-KI: 304; 358) Tage; p = 0,005) mit korrespondierender Hazard Ratio (HR) für ein unerwünschtes Ereignis (HR = 3,09 (95%-KI: 1,36; 7,02); p = 0,007).

Erhöhtes lösliches P-Selektin im Plasma in Patient:innen mit zerebraler Ischämie ohne Behandlung mit ASS ist assoziiert mit einem schlechteren, langfristigen Ergebnis. Aus diesem Grund eignet sich lösliches P-Selektin unter Umständen als zusätzlicher prognostischer Faktor zur Identifikation von Hochrisikopatient:innen.

## III.b. Englische Fassung

Stroke is an epidemiologically highly relevant disease, of which the ischemic subtype accounts for the majority (over 65 percent). About one in three patients with an incident ischemic stroke or transient ischemic attack (TIA) is at risk of developing a stroke in the next ten years. Sphingosine-1-phosphate has a central role in the pathophysiological aspects of atherosclerosis as well as stroke and is secreted upon platelet activation. The secretion of sphingosine-1-phosphate is thromboxane-dependent and blocked by acetylsalicylic acid (ASA). Soluble P-selectin is a platelet activation marker also inheriting influences on atherosclerosis and stroke.

MARK-STROKE is a prospective observational study taking place at the university hospital Hamburg-Eppendorf, Germany, enrolling on adult patients with acute ischemic stroke or TIA. Sphingosine-1-phosphate was measured via liquid chromatography tandem mass spectrometry and soluble P-selectin as well as thromboxane $B_2$, as a surrogate biomarker for the effect of acetylsalicylic acid, was determined via enzyme-linked immunosorbent assay. Laboratory measurements were analyzed concerning cross-sectional (demographics, risk factors, standard laboratory, clinical scores) and longitudinal data (end point: death, non-fatal myocardial infarction, stroke and rehospitalization).

In total, 374 patients were included with a median age of 70 years of which 64.7 percent were male. In the first 365 days, we recorded 79 adverse events in 274 patients with available follow-ups. No differences in neurological and functional scores were determined at discharge from hospital, but patients without acetylsalicylic acid with high soluble P-selectin presented significantly shorter event-free survival times (high: 250 (95%-KI: 205; 296) days; low: 331 (95%-KI: 304; 358) days; p = 0.005) and correspondingly higher a hazard ratio (HR) for an adverse event (HR = 3.09 (95%-KI: 1.36; 7.02); p = 0.007).

In conclusion, patients with cerebral ischemia without pretreatment with acetylsalicylic acid who presented with a high soluble P-selectin had a worse long-term outcome. Therefore, soluble P-selectin may be used as an additional risk parameter identifying high-risk patients.

## IV. Literaturverzeichnis


ANADA, Y., IGARASHI, Y. & KIHARA, A. 2007. The immunomodulator FTY720 is phosphorylated and released from platelets. *Eur J Pharmacol,* 568**,** 106–11.

ANDRE, P., HARTWELL, D., HRACHOVINOVA, I., SAFFARIPOUR, S. & WAGNER, D. D. 2000. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 97**,** 13835–40.

AOKI, S., YATOMI, Y., OHTA, M., OSADA, M., KAZAMA, F., SATOH, K., NAKAHARA, K. & OZAKI, Y. 2005. Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel. *J Biochem,* 138**,** 47–55.

BARBAUX, S. C., BLANKENBERG, S., RUPPRECHT, H. J., FRANCOMME, C., BICKEL, C., HAFNER, G., NICAUD, V., MEYER, J., CAMBIEN, F. & TIRET, L. 2001. Association between P-selectin gene polymorphisms and soluble P-selectin levels and their relation to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 21**,** 1668–73.

BATH, P. M., BLANN, A., SMITH, N. & BUTTERWORTH, R. J. 1998. Von Willebrand factor, P-selectin and fibrinogen levels in patients with acute ischaemic and haemorrhagic stroke, and their relationship with stroke sub-type and functional outcome. *Platelets,* 9**,** 155–9.

BROWN, R. D., JR., PETTY, G. W., O'FALLON, W. M., WIEBERS, D. O. & WHISNANT, J. P. 1998. Incidence of transient ischemic attack in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *Stroke,* 29**,** 2109–13.

BURN, J., DENNIS, M., BAMFORD, J., SANDERCOCK, P., WADE, D. & WARLOW, C. 1994. Long-term risk of recurrent stroke after a first-ever stroke. The Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke,* 25**,** 333–7.

CHANDLER, W. L. 2013. Microparticle counts in platelet-rich and platelet-free plasma, effect of centrifugation and sample-processing protocols. *Blood Coagul Fibrinolysis,* 24**,** 125–32.

CHRISTENSEN, P. M., LIU, C. H., SWENDEMAN, S. L., OBINATA, H., QVORTRUP, K., NIELSEN, L. B., HLA, T., DI LORENZO, A. & CHRISTOFFERSEN, C. 2016. Impaired endothelial barrier function in apolipoprotein M-deficient mice is dependent on sphingosine-1-phosphate receptor 1. *FASEB J,* 30**,** 2351–9.

CHRISTOFFERSEN, C., OBINATA, H., KUMARASWAMY, S. B., GALVANI, S., AHNSTROM, J., SEVVANA, M., EGERER-SIEBER, C., MULLER, Y. A., HLA, T., NIELSEN, L. B. & DAHLBACK, B. 2011. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 108**,** 9613–8.

COLLABORATORS, G. B. D. S. R. F. 2024. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Neurol,* 23**,** 973–1003.

DA COSTA MARTINS, P., VAN DEN BERK, N., ULFMAN, L. H., KOENDERMAN, L., HORDIJK, P. L. & ZWAGINGA, J. J. 2004. Platelet-monocyte complexes support monocyte adhesion to endothelium by enhancing secondary tethering and cluster formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 24**,** 193–9.

DAUM, G., WINKLER, M., MORITZ, E., MULLER, T., GEFFKEN, M., VON LUCADOU, M., HADDAD, M., PEINE, S., BOGER, R. H., LARENA-AVELLANEDA, A., DEBUS, E. S., GRALER, M. & SCHWEDHELM, E. 2020. Determinants of Serum- and Plasma Sphingosine-1-Phosphate Concentrations in a Healthy Study Group. *TH Open,* 4**,** e12–e19.

DAVI, G., ROMANO, M., MEZZETTI, A., PROCOPIO, A., IACOBELLI, S., ANTIDORMI, T., BUCCIARELLI, T., ALESSANDRINI, P., CUCCURULLO, F. & BITTOLO BON, G. 1998. Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation,* 97**,** 953–7.

DENNIS, M. S., BAMFORD, J. M., SANDERCOCK, P. A. & WARLOW, C. P. 1989. Incidence of transient ischemic attacks in Oxfordshire, England. *Stroke,* 20**,** 333–9.

FERRONI, P., MARTINI, F., RIONDINO, S., LA FARINA, F., MAGNAPERA, A., CIATTI, F. & GUADAGNI, F. 2009. Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation. *Clin Chim Acta,* 399**,** 88–91.

FLACH, C., MURUET, W., WOLFE, C. D. A., BHALLA, A. & DOUIRI, A. 2020. Risk and Secondary Prevention of Stroke Recurrence: A Population-Base Cohort Study. *Stroke,* 51**,** 2435–2444.

FRIJNS, C. J., KAPPELLE, L. J., VAN GIJN, J., NIEUWENHUIS, H. K., SIXMA, J. J. & FIJNHEER, R. 1997. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke,* 28**,** 2214–8.

GALVANI, S., SANSON, M., BLAHO, V. A., SWENDEMAN, S. L., OBINATA, H., CONGER, H., DAHLBACK, B., KONO, M., PROIA, R. L., SMITH, J. D. & HLA, T. 2015. HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a

biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. *Sci Signal,* 8**,** ra79.

GOTSCH, U., JAGER, U., DOMINIS, M. & VESTWEBER, D. 1994. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun,* 2**,** 7–14.

GUPTA, M., GULATI, S., NASIR, K. & SARRAJU, A. 2024. Aspirin Use Prevalence for Cardiovascular Disease Prevention Among U.S. Adults From 2012 to 2021. *Ann Intern Med,* 177**,** 1139–1141.

HAMMOND, G., LUKE, A. A., ELSON, L., TOWFIGHI, A. & JOYNT MADDOX, K. E. 2020. Urban-Rural Inequities in Acute Stroke Care and In-Hospital Mortality. *Stroke,* 51**,** 2131–2138.

HANEL, P., ANDREANI, P. & GRALER, M. H. 2007. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J,* 21**,** 1202–9.

HARTWELL, D. W., MAYADAS, T. N., BERGER, G., FRENETTE, P. S., RAYBURN, H., HYNES, R. O. & WAGNER, D. D. 1998. Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and in early inflammatory responses. *J Cell Biol,* 143**,** 1129–41.

HOU, S., ZHANG, Y., XIA, Y., LIU, Y., DENG, X., WANG, W., WANG, Y., WANG, C. & WANG, G. 2024. Global, regional, and national epidemiology of ischemic stroke from 1990 to 2021. *Eur J Neurol,* 31**,** e16481.

IKEDA, H., TAKAJO, Y., ICHIKI, K., UENO, T., MAKI, S., NODA, T., SUGI, K. & IMAIZUMI, T. 1995. Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation,* 92**,** 1693–6.

ISHIWATA, N., TAKIO, K., KATAYAMA, M., WATANABE, K., TITANI, K., IKEDA, Y. & HANDA, M. 1994. Alternatively spliced isoform of P-selectin is present in vivo as a soluble molecule. *J Biol Chem,* 269**,** 23708–15.

JOHNSTON, G. I., COOK, R. G. & MCEVER, R. P. 1989. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell,* 56**,** 1033–44.

KEUL, P., POLZIN, A., KAISER, K., GRALER, M., DANNENBERG, L., DAUM, G., HEUSCH, G. & LEVKAU, B. 2019. Potent anti-inflammatory properties of HDL in vascular smooth muscle cells mediated by HDL-S1P and their impairment in coronary artery disease due to lower HDL-S1P: a new aspect of HDL dysfunction and its therapy. *FASEB J,* 33**,** 1482–1495.

KISUCKA, J., CHAUHAN, A. K., ZHAO, B. Q., PATTEN, I. S., YESILALTAY, A., KRIEGER, M. & WAGNER, D. D. 2009. Elevated levels of soluble P-selectin in mice alter blood-brain barrier function, exacerbate stroke, and promote atherosclerosis. *Blood,* 113**,** 6015–22.

KLEINDORFER, D., PANAGOS, P., PANCIOLI, A., KHOURY, J., KISSELA, B., WOO, D., SCHNEIDER, A., ALWELL, K., JAUCH, E., MILLER, R., MOOMAW, C., SHUKLA, R. & BRODERICK, J. P. 2005. Incidence and short-term prognosis of transient ischemic attack in a population-based study. *Stroke,* 36**,** 720–3.

KNAPP, M., LISOWSKA, A., KNAPP, P. & BARANOWSKI, M. 2013a. Dose-dependent effect of aspirin on the level of sphingolipids in human blood. *Adv Med Sci,* 58**,** 274–81.

KNAPP, M., LISOWSKA, A., ZABIELSKI, P., MUSIAL, W. & BARANOWSKI, M. 2013b. Sustained decrease in plasma sphingosine-1-phosphate concentration and its accumulation in blood cells in acute myocardial infarction. *Prostaglandins Other Lipid Mediat,* 106**,** 53–61.

LE STUNFF, H., PETERSON, C., LIU, H., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. 2002. Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim Biophys Acta,* 1582**,** 8–17.

LEE, M. H., APPLETON, K. M., EL-SHEWY, H. M., SORCI-THOMAS, M. G., THOMAS, M. J., LOPES-VIRELLA, M. F., LUTTRELL, L. M., HAMMAD, S. M. & KLEIN, R. L. 2017. S1P in HDL promotes interaction between SR-BI and S1PR1 and activates S1PR1-mediated biological functions: calcium flux and S1PR1 internalization. *J Lipid Res,* 58**,** 325–338.

LIOUTAS, V. A., IVAN, C. S., HIMALI, J. J., APARICIO, H. J., LEVEILLE, T., ROMERO, J. R., BEISER, A. S. & SESHADRI, S. 2021. Incidence of Transient Ischemic Attack and Association With Long-term Risk of Stroke. *JAMA,* 325**,** 373–381.

LIU, H., JACKSON, M. L., GOUDSWAARD, L. J., MOORE, S. F., HUTCHINSON, J. L. & HERS, I. 2021. Sphingosine-1-phosphate modulates PAR1-mediated human platelet activation in a concentration-dependent biphasic manner. *Sci Rep,* 11**,** 15308.

LIU, J., SUGIMOTO, K., CAO, Y., MORI, M., GUO, L. & TAN, G. 2020. Serum Sphingosine 1-Phosphate (S1P): A Novel Diagnostic Biomarker in Early Acute Ischemic Stroke. *Front Neurol,* 11**,** 985.

LOCCOH, E. C., JOYNT MADDOX, K. E., WANG, Y., KAZI, D. S., YEH, R. W. & WADHERA, R. K. 2022. Rural-Urban Disparities in Outcomes of Myocardial Infarction, Heart Failure, and Stroke in the United States. *J Am Coll Cardiol,* 79**,** 267–279.

LORANT, D. E., TOPHAM, M. K., WHATLEY, R. E., MCEVER, R. P., MCINTYRE, T. M., PRESCOTT, S. M. & ZIMMERMAN, G. A. 1993. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest,* 92**,** 559–70.

MICHELSON, A. D., BARNARD, M. R., HECHTMAN, H. B., MACGREGOR, H., CONNOLLY, R. J., LOSCALZO, J. & VALERI, C. R. 1996. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 93**,** 11877–82.

MORITZ, E., WEGNER, D., GROSS, S., BAHLS, M., DORR, M., FELIX, S. B., ITTERMANN, T., OSWALD, S., NAUCK, M., FRIEDRICH, N., BOGER, R. H., DAUM, G., SCHWEDHELM, E. & RAUCH, B. H. 2017. Reference intervals for serum sphingosine-1-phosphate in the population-based Study of Health in Pomerania. *Clin Chim Acta,* 468**,** 25–31.

MURATA, N., SATO, K., KON, J., TOMURA, H., YANAGITA, M., KUWABARA, A., UI, M. & OKAJIMA, F. 2000. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J,* 352 Pt 3**,** 809–15.

NITZSCHE, A., POITTEVIN, M., BENARAB, A., BONNIN, P., FARACO, G., UCHIDA, H., FAVRE, J., GARCIA-BONILLA, L., GARCIA, M. C. L., LEGER, P. L., THEROND, P., MATHIVET, T., AUTRET, G., BAUDRIE, V., COUTY, L., KONO, M., CHEVALLIER, A., NIAZI, H., THARAUX, P. L., CHUN, J., SCHWAB, S. R., EICHMANN, A., TAVITIAN, B., PROIA, R. L., CHARRIAUT-MARLANGUE, C., SANCHEZ, T., KUBIS, N., HENRION, D., IADECOLA, C., HLA, T. & CAMERER, E. 2021. Endothelial S1P(1) Signaling Counteracts Infarct Expansion in Ischemic Stroke. *Circ Res,* 128**,** 363–382.

OWOLABI, M. O., THRIFT, A. G., MAHAL, A., ISHIDA, M., MARTINS, S., JOHNSON, W. D., PANDIAN, J., ABD-ALLAH, F., YARIA, J., PHAN, H. T., ROTH, G., GALL, S. L., BEARE, R., PHAN, T. G., MIKULIK, R., AKINYEMI, R. O., NORRVING, B., BRAININ, M., FEIGIN, V. L. & STROKE EXPERTS COLLABORATION, G. 2022. Primary stroke prevention worldwide: translating evidence into action. *Lancet Public Health,* 7**,** e74–e85.

PANICKER, S. R., MEHTA-D'SOUZA, P., ZHANG, N., KLOPOCKI, A. G., SHAO, B. & MCEVER, R. P. 2017. Circulating soluble P-selectin must dimerize to promote inflammation and coagulation in mice. *Blood,* 130**,** 181–191.

PAPPU, R., SCHWAB, S. R., CORNELISSEN, I., PEREIRA, J. P., REGARD, J. B., XU, Y., CAMERER, E., ZHENG, Y. W., HUANG, Y., CYSTER, J. G. & COUGHLIN, S. R. 2007. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science,* 316**,** 295–8.

PRAGER, B., SPAMPINATO, S. F. & RANSOHOFF, R. M. 2015. Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood-brain barrier. *Trends Mol Med,* 21**,** 354–63.

REEVES, M., KHOURY, J., ALWELL, K., MOOMAW, C., FLAHERTY, M., WOO, D., KHATRI, P., ADEOYE, O., FERIOLI, S., KISSELA, B. & KLEINDORFER, D. 2013. Distribution of National Institutes of Health stroke scale in the Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study. *Stroke,* 44**,** 3211–3.

RIDKER, P. M., BURING, J. E. & RIFAI, N. 2001. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation,* 103**,** 491–5.

ROSEN, H., GONZALEZ-CABRERA, P. J., SANNA, M. G. & BROWN, S. 2009. Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annu Rev Biochem,* 78**,** 743–68.

SABA, J. D. & HLA, T. 2004. Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circ Res,* 94**,** 724–34.

SABER, H. & SAVER, J. L. 2020. Distributional Validity and Prognostic Power of the National Institutes of Health Stroke Scale in US Administrative Claims Data. *JAMA Neurol,* 77**,** 606–612.

SACCO, R. L., KASNER, S. E., BRODERICK, J. P., CAPLAN, L. R., CONNORS, J. J., CULEBRAS, A., ELKIND, M. S., GEORGE, M. G., HAMDAN, A. D., HIGASHIDA, R. T., HOH, B. L., JANIS, L. S., KASE, C. S., KLEINDORFER, D. O., LEE, J. M., MOSELEY, M. E., PETERSON, E. D., TURAN, T. N., VALDERRAMA, A. L., VINTERS, H. V., AMERICAN HEART ASSOCIATION STROKE COUNCIL, C. O. C. S., ANESTHESIA, COUNCIL ON CARDIOVASCULAR, R., INTERVENTION, COUNCIL ON, C., STROKE, N., COUNCIL ON, E., PREVENTION, COUNCIL ON PERIPHERAL VASCULAR, D., COUNCIL ON NUTRITION, P. A. & METABOLISM 2013. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke,* 44**,** 2064–89.

SANADA, H., MIDORIKAWA, S., YATABE, J., YATABE, M. S., KATOH, T., BABA, T., HASHIMOTO, S. & WATANABE, T. 2005. Elevation of serum soluble E- and P-selectin in patients with hypertension is reversed by benidipine, a long-acting calcium channel blocker. *Hypertens Res,* 28**,** 871–8.

SCHWEDHELM, E., SCHWIEREN, L., TIEDT, S., VON LUCADOU, M., GLOYER, N. O., BOGER, R., MAGNUS, T., DAUM, G., THOMALLA, G., GERLOFF, C. & CHOE, C. U. 2021. Serum Sphingosine-1-Phosphate Levels Are Associated With Severity and Outcome in Patients With Cerebral Ischemia. *Stroke,* 52**,** 3901–3907.

SHIMOMURA, H., OGAWA, H., ARAI, H., MORIYAMA, Y., TAKAZOE, K., HIRAI, N., KAIKITA, K., HIRASHIMA, O., MISUMI, K., SOEJIMA, H., NISHIYAMA, K. & YASUE, H. 1998. Serial changes in plasma levels of soluble P-selectin in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol,* 81**,** 397–400.

SOLTAU, I., MUDERSBACH, E., GEISSEN, M., SCHWEDHELM, E., WINKLER, M. S., GEFFKEN, M., PEINE, S., SCHOEN, G., DEBUS, E. S., LARENA-AVELLANEDA, A. & DAUM, G. 2016. Serum-Sphingosine-1-Phosphate Concentrations Are Inversely Associated with Atherosclerotic Diseases in Humans. *PLoS One,* 11**,** e0168302.

STENBERG, P. E., MCEVER, R. P., SHUMAN, M. A., JACQUES, Y. V. & BAINTON, D. F. 1985. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol,* 101**,** 880–6.

TAN, K. T., TAYEBJEE, M. H., LYND, C., BLANN, A. D. & LIP, G. Y. 2005. Platelet microparticles and soluble P selectin in peripheral artery disease: relationship to extent of disease and platelet activation markers. *Ann Med,* 37**,** 61–6.

TANI, M., SANO, T., ITO, M. & IGARASHI, Y. 2005. Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. *J Lipid Res,* 46**,** 2458–67.

THOM, J., GILMORE, G., YI, Q., HANKEY, G. J. & EIKELBOOM, J. W. 2004. Measurement of soluble P-selectin and soluble CD40 ligand in serum and plasma. *J Thromb Haemost,* 2**,** 2067–9.

ULRYCH, T., BOHM, A., POLZIN, A., DAUM, G., NUSING, R. M., GEISSLINGER, G., HOHLFELD, T., SCHROR, K. & RAUCH, B. H. 2011. Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation. *J Thromb Haemost,* 9**,** 790–8.

URTZ, N., GAERTNER, F., VON BRUEHL, M. L., CHANDRARATNE, S., RAHIMI, F., ZHANG, L., ORBAN, M., BAROCKE, V., BEIL, J., SCHUBERT, I., LORENZ, M., LEGATE, K. R., HUWILER, A., PFEILSCHIFTER, J. M., BEERLI, C., LEDIEU, D., PERSOHN, E., BILLICH, A., BAUMRUKER, T., MEDEROS Y SCHNITZLER, M. & MASSBERG, S. 2015. Sphingosine 1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinase 2 Intrinsically Controls Platelet Aggregation In Vitro and In Vivo. *Circ Res,* 117**,** 376–87.

WANG, J., ZHANG, S., JIN, Y., QIN, G., YU, L. & ZHANG, J. 2007. Elevated levels of platelet-monocyte aggregates and related circulating biomarkers in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol,* 115**,** 361–5.

WASSEL, C. L., BERARDI, C., PANKOW, J. S., LARSON, N. B., DECKER, P. A., HANSON, N. Q., TSAI, M. Y., CRIQUI, M. H., ALLISON, M. A. & BIELINSKI, S. J. 2015. Soluble P-selectin predicts lower extremity peripheral artery disease incidence and change in the ankle brachial index: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis,* 239**,** 405–11.

WILKERSON, B. A., GRASS, G. D., WING, S. B., ARGRAVES, W. S. & ARGRAVES, K. M. 2012. Sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier: high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1. *J Biol Chem,* 287**,** 44645–53.

WOOLLARD, K. J., SUHARTOYO, A., HARRIS, E. E., EISENHARDT, S. U., JACKSON, S. P., PETER, K., DART, A. M., HICKEY, M. J. & CHIN-DUSTING, J. P. 2008. Pathophysiological levels of soluble P-selectin mediate adhesion of leukocytes to the endothelium through Mac-1 activation. *Circ Res,* 103**,** 1128–38.

YATOMI, Y., RUAN, F., HAKOMORI, S. & IGARASHI, Y. 1995. Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood,* 86**,** 193–202.

YATOMI, Y., YAMAMURA, S., HISANO, N., NAKAHARA, K., IGARASHI, Y. & OZAKI, Y. 2004. Sphingosine 1-phosphate breakdown in platelets. *J Biochem,* 136**,** 495–502.

## V. Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|---|---|---|
| 95%-KI | – | 95%-Konfidenzintervall |
| ADP | – | Adenosindiphosphat |
| AM ± SA | – | Arithmetisches Mittel ± Standardabweichung |
| ASS | – | Acetylsalicylsäure |
| BMI | – | „Body-Mass-Index“ |
| EDTA | – | Ethylendiamintetraacetat |
| HbA1c | – | Hämoglobin A1c |
| HDL | – | „High Density Lipoprotein“ |
| HR | – | „Hazard Ratio“ |
| IQR | – | Interquartilsabstand |
| LDL | – | „Low Density Lipoprotein“ |
| mRS | – | „modified Rankin Scale“ |
| NIHSS | – | „National Institutes of Health Stroke Scale“ |
| RT | – | Raumtemperatur |
| S1P | – | Sphingosin-1-phosphat |
| TIA | – | Transitorisch ischämische Attacke |
| UKE | – | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |
| VLDL | – | „Very Low Density Lipoprotein“ |

# VI. Abbildungsverzeichnis

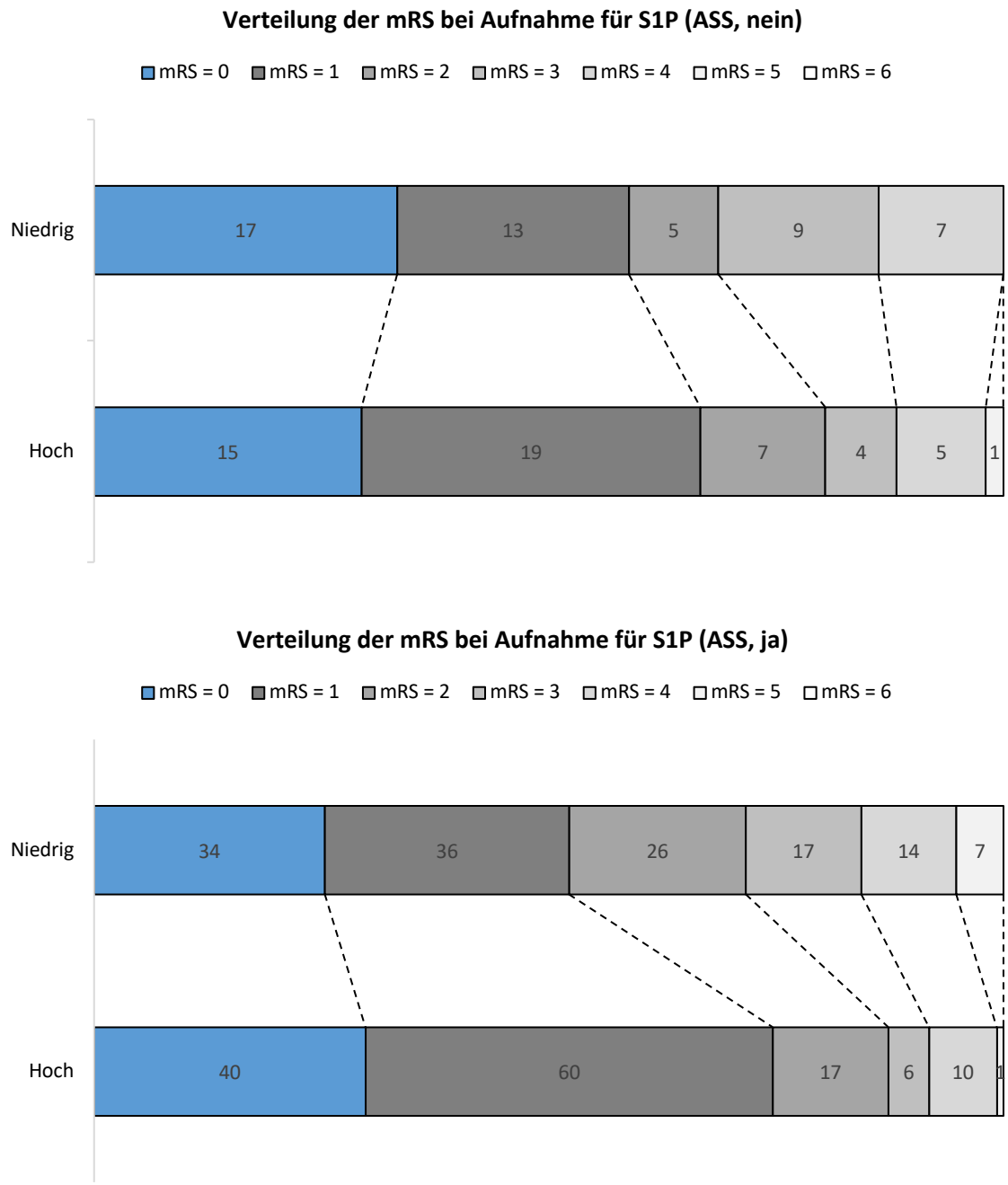



**Abbildung 1: Verteilung der funktionalen Defizite bei Aufnahme ins Krankenhaus für S1P.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Die Kategorien der Testung auf Heterogenität der Verteilung wurden durch blaue und graue Farbgebung verdeutlicht. Klassifikationsgrenzen für S1P: Median (ASS, ja) = 1,458 µmol/L; Median (ASS, nein) = 1,471 µmol/L.

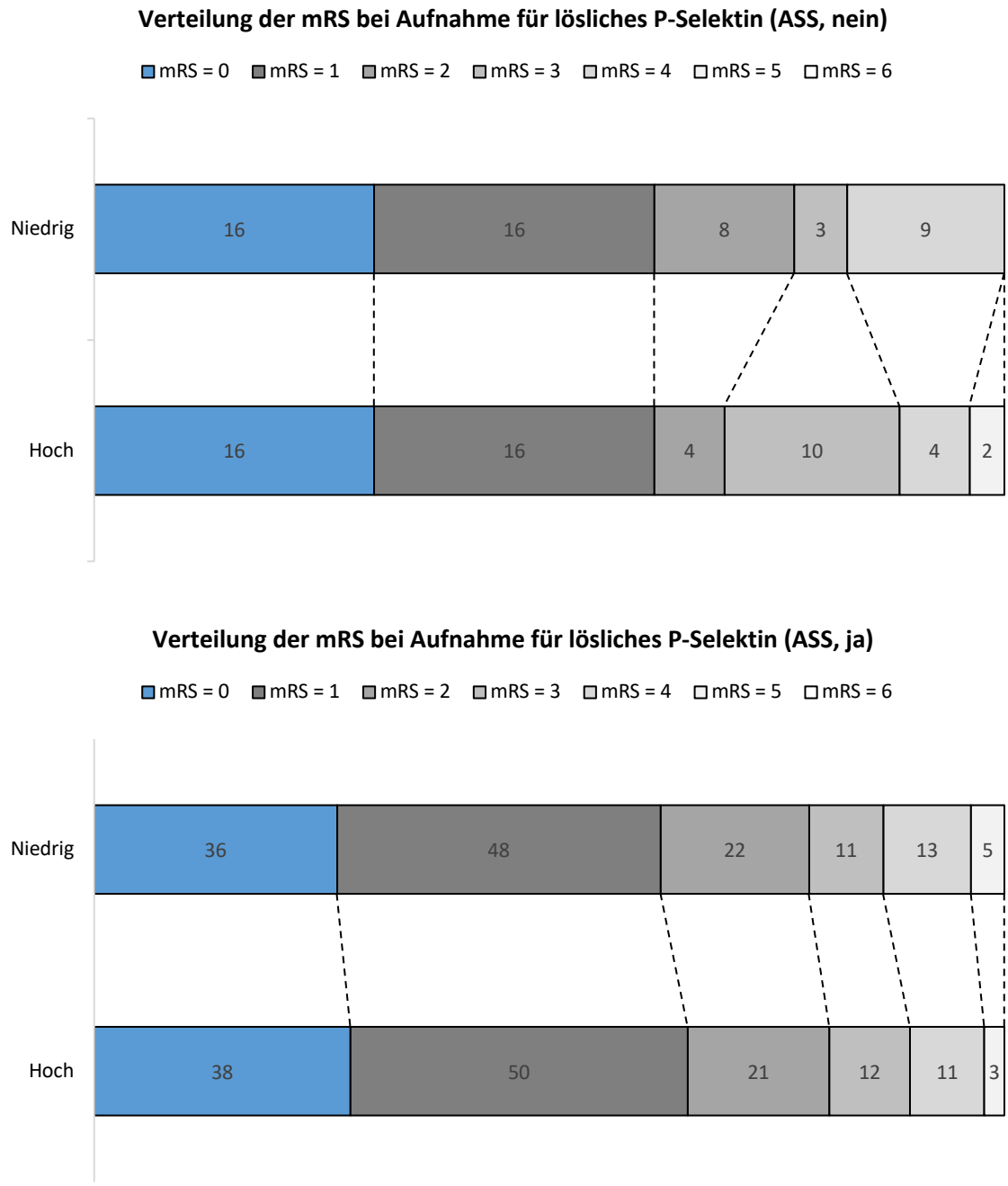



**Abbildung 2: Verteilung der funktionalen Defizite bei Aufnahme ins Krankenhaus für lösliches P-Selektin.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Die Kategorien der Testung auf Heterogenität der Verteilung wurden durch blaue und graue Farbgebung verdeutlicht. Klassifikationsgrenzen für lösliches P-Selektin: Median (ASS, ja) = 125,11 ng/mL; Median (ASS, nein) = 91,88 ng/mL.

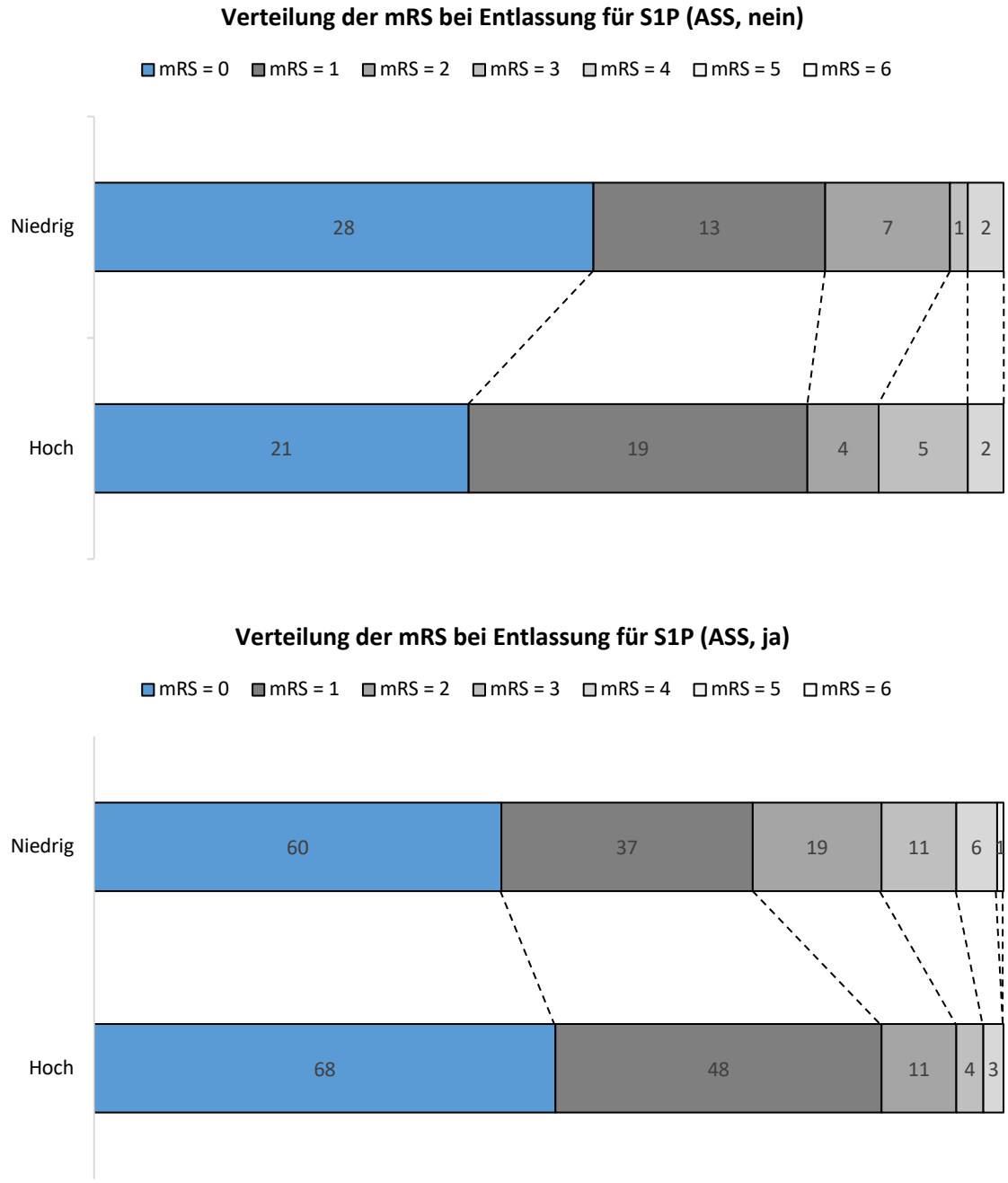



**Abbildung 3: Verteilung der funktionalen Defizite bei Entlassung aus dem Krankenhaus für S1P.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Die Kategorien der Testung auf Heterogenität der Verteilung wurden durch blaue und graue Farbgebung verdeutlicht. Klassifikationsgrenzen für S1P: Median (ASS, ja) = 1,458 µmol/L; Median (ASS, nein) = 1,471 µmol/L.

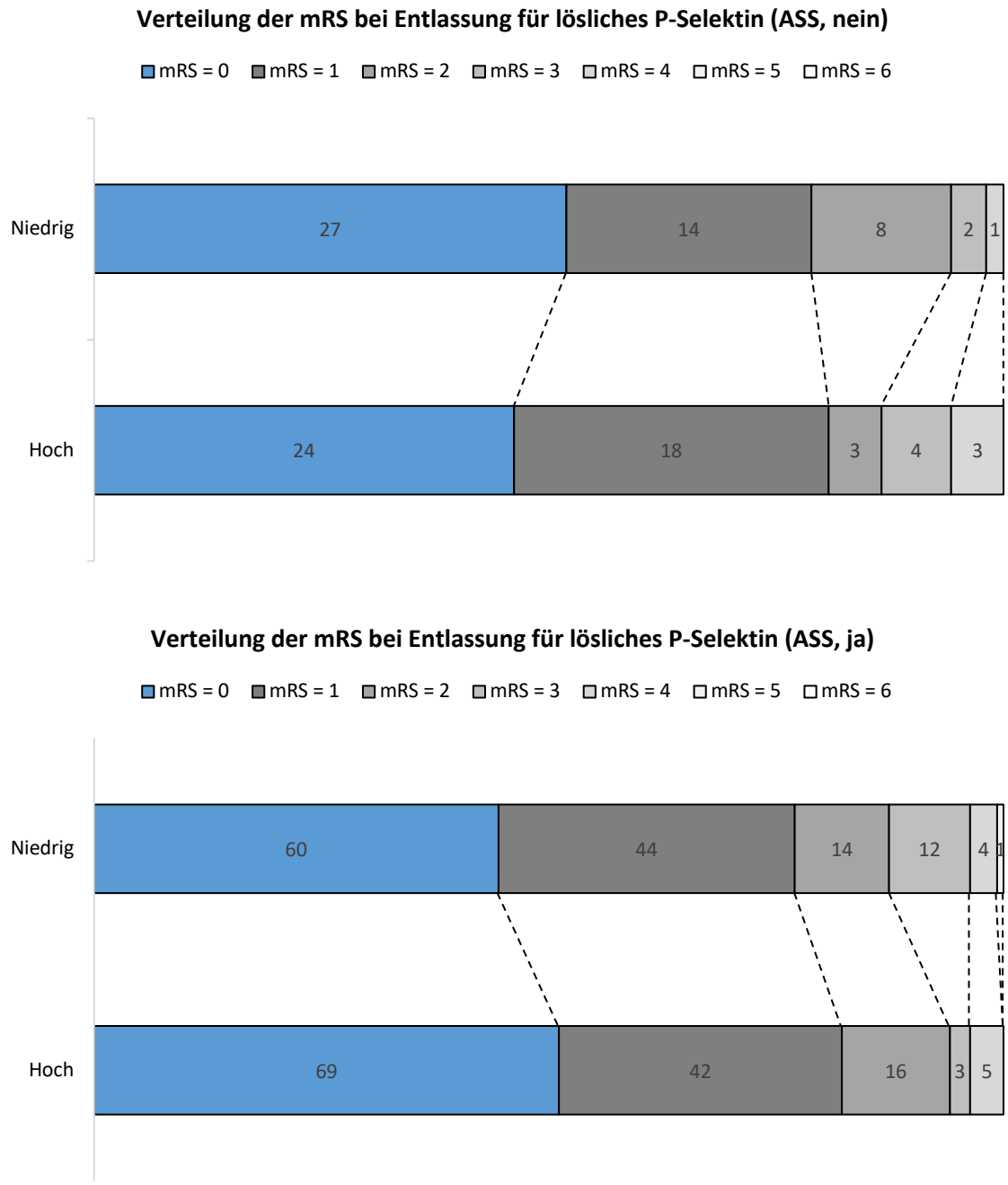
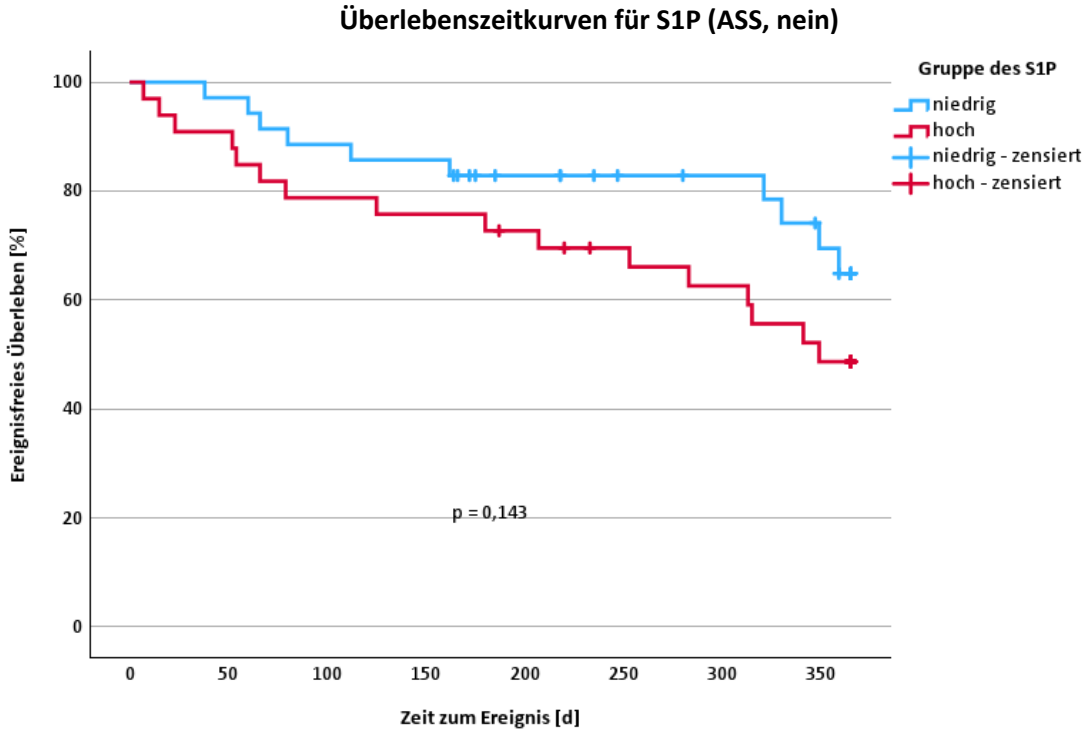



**Abbildung 4: Verteilung der funktionalen Defizite bei Entlassung aus dem Krankenhaus für lösliches P-Selektin.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Die Kategorien der Testung auf Heterogenität der Verteilung wurden durch blaue und graue Farbgebung verdeutlicht. Klassifikationsgrenzen für lösliches P-Selektin: Median (ASS, ja) = 125,11 ng/mL; Median (ASS, nein) = 91,88 ng/mL.



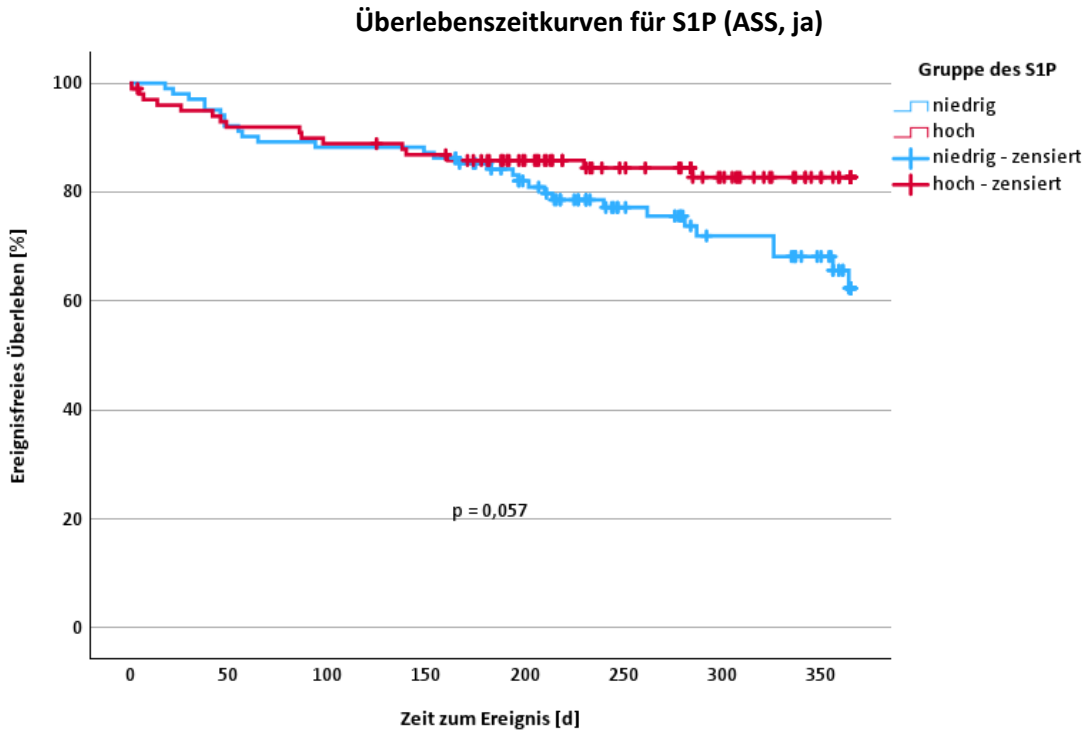




**Abbildung 5: Überlebenszeitkurven für S1P.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Klassifikationsgrenzen für S1P: Median (ASS, ja) = 1,458 µmol/L; Median (ASS, nein) = 1,471 µmol/L.

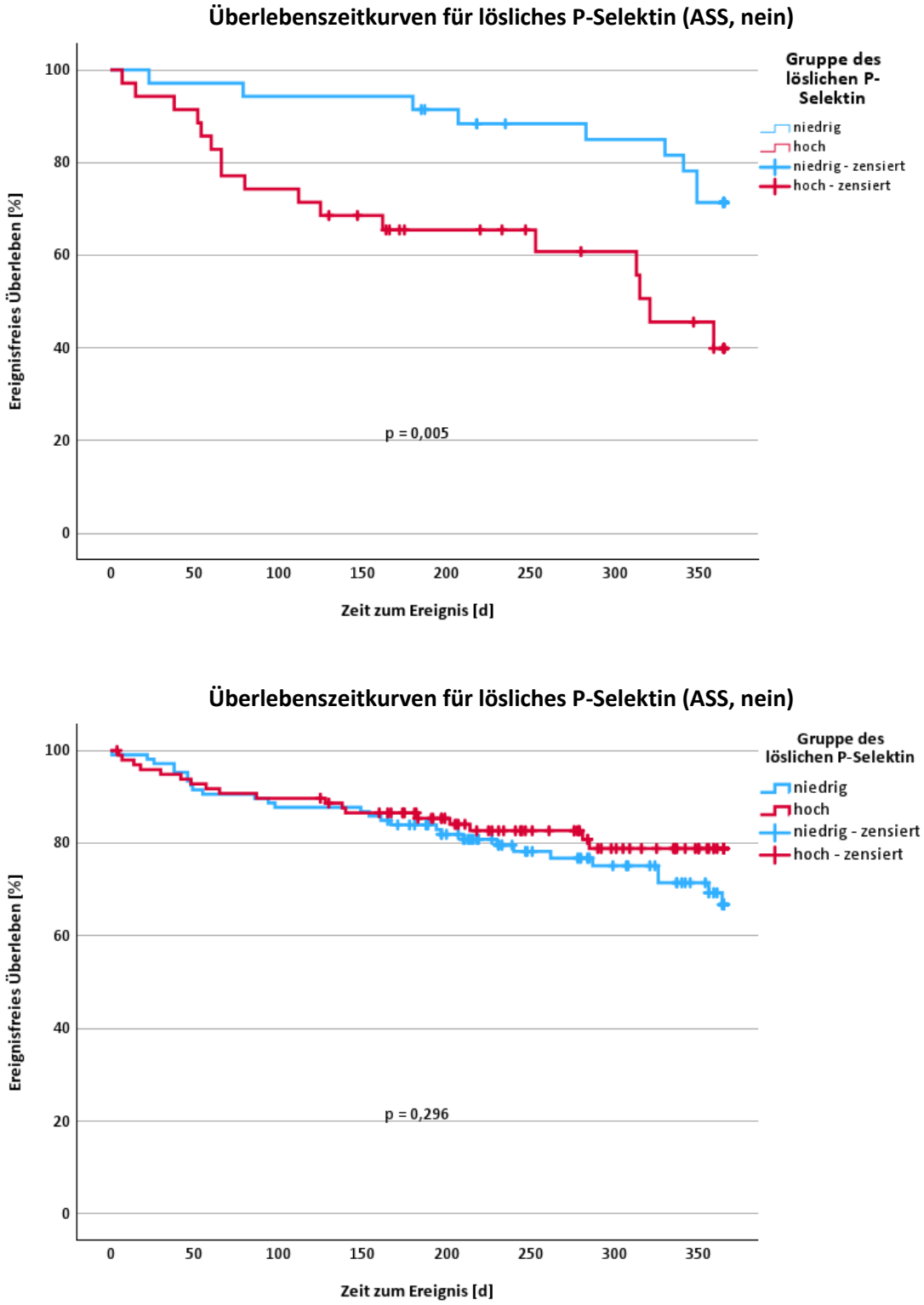



**Abbildung 6: Überlebenszeitkurven für lösliches P-Selektin.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Klassifikationsgrenzen für lösliches P-Selektin: Median (ASS, ja) = 125,11 ng/mL; Median (ASS, nein) = 91,88 ng/mL.
Visuelle Anpassung nach Gloyer NO et al.: Associations of sphingosine-1-phosphate with soluble P-selectin and adverse clinical outcome in patients with cerebral ischemia with and without acetylsalicylic acid treatment. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2025.

# VII. Tabellenverzeichnis

| Charakteristika der Ausgangskohorte von Patient:innen der MARK-STROKE Studie | | | |
|---|---|---|---|
| **Merkmale** | **ASS, ja (n=270)** | **ASS, nein (n=104)** | **P-Wert** |
| **Demografie** | | | |
| Alter – Jahre | 68,0 (57,0; 77,0) | 72,00 (61,25; 81,00) | 0,051 |
| Männlich – No. (%) | 171 (63,3) | 71 (68,3) | 0,371 |
| BMI – kg/m² | 25,83 (23,67; 28,41) | 25,44 (23,18; 28,37) | 0,629 |
| **Risikofaktoren** | | | |
| Aktive Raucher – No. (%) | 69 (25,5) | 25 (24,0) | 0,762 |
| Arterielle Hypertonie – No. (%) | 195 (72,2) | 77 (74,0) | 0,724 |
| Hyperlipidämie – No. (%) | 91 (33,7) | 30 (28,8) | 0,368 |
| Diabetes mellitus – No. (%) | 51 (18,9) | 13 (12,5) | 0,142 |
| Vorhofflimmern – No. (%) | 26 (9,6) | 59 (56,7) | < 0,001*** |
| Stattgehabter Myokardinfarkt – No. (%) | 40 (14,8) | 5 (4,8) | < 0,001*** |
| Stattgehabter Schlaganfall – No. (%) | 43 (15,9) | 19 (18,3) | 0,585 |
| **Labordaten** | | | |
| Hämoglobin – mg/dL | 13,7 (12,5; 15,0) | 13,4 (12,4; 14,8) | 0,182 |
| Leukozyten – $10^9$/L | 7,30 (5,88; 8,73) | 7,75 (6,13; 9,98) | 0,073 |
| Thrombozyten – $10^9$/L | 238,5 (195,0; 287,3) | 232,5 (174,3; 269,5) | 0,110 |
| HbA1c – % | 5,7 (5,4; 6,1) | 5,7 (5,4; 5,9) | 0,708 |
| Triglyzeride – mg/dL | 130,0 (92,5; 179,5) | 108,5 (88,0; 151,5) | 0,008** |
| HDL-Cholesterin – mg/dL | 49,0 (40,0; 60,0) | 49,5 (38,0; 59,0) | 0,525 |
| LDL-Cholesterin – mg/dL | 106,0 (77,5; 136,0) | 102,0 (74,5; 131,5) | 0,445 |
| Kreatinin – mg/dL | 0,88 (0,74; 1,10) | 0,96 (0,82; 1,18) | 0,031* |
| S1P – µmol/L | 1,46 (1,27; 1,73) | 1,47 (1,24; 1,68) | 0,879 |
| Lösliches P-Selektin – ng/mL | 125,55 (90,34; 157,39) | 93,63 (62,92; 132,60) | < 0,001*** |
| Thromboxan $B_2$ – pg/mL | 416,9 (133,9; 3338) | 14580 (4146; 39718) | < 0,001*** |
| **Medikamente** | | | |
| ASS – No. (%) | 270 (100) | 0 (0) | |
| ADP-Rezeptorantagonisten – No. (%) | 68 (25,2) | 8 (7,7) | < 0,001*** |
| Antikoagulantien – No. (%) | 6 (2,9) | 65 (62,5) | < 0,001*** |
| **Klinische Scores** | | | |
| NIHSS – Punkte | 1 (0; 3) | 2 (0; 4) | 0,351 |
| mRS – Punkte | 1 (0; 3) | 1 (0; 3) | 0,887 |

**Tabelle 1: Übersicht der Querschnittsdaten von MARK-STROKE.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Übersetzung nach Gloyer NO et al.: Associations of sphingosine-1-phosphate with soluble P-selectin and adverse clinical outcome in patients with cerebral ischemia with and without acetylsalicylic acid treatment. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2025.

| Neurologische und funktionelle Defizite bei Aufnahme ins Krankenhaus für S1P | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ASS, ja | | ASS, nein | |
| | NIHSS | | NIHSS | |
| | **0** | **1-42** | **0** | **1-42** |
| **Niedriges S1P** | 41 | 93 | 16 | 35 |
| **Hohes S1P** | 46 | 88 | 17 | 34 |
| | **mRS** | | **mRS** | |
| | **0** | **1-6** | **0** | **1-6** |
| **Niedriges S1P** | 34 | 100 | 17 | 34 |
| **Hohes S1P** | 40 | 94 | 15 | 36 |
| **Neurologische und funktionelle Defizite bei Aufnahme ins Krankenhaus für lösliches P-Selektin** | | | | |
| | **ASS, ja** | | **ASS, nein** | |
| | **NIHSS** | | **NIHSS** | |
| | **0** | **1-42** | **0** | **1-42** |
| **Niedriges lösliches P-Selektin** | 41 | 94 | 17 | 35 |
| **Hohes lösliches P-Selektin** | 46 | 89 | 16 | 36 |
| | **mRS** | | **mRS** | |
| | **0** | **1-6** | **0** | **1-6** |
| **Niedriges lösliches P-Selektin** | 36 | 99 | 16 | 36 |
| **Hohes lösliches P-Selektin** | 38 | 97 | 16 | 36 |

**Tabelle 2: Verteilung der neurologischen und funktionalen Defizite bei Aufnahme ins Krankenhaus.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Klassifikationsgrenzen für S1P: Median (ASS, ja) = 1,458 µmol/L; Median (ASS, nein) = 1,471 µmol/L. Klassifikationsgrenzen für lösliches P-Selektin: Median (ASS, ja) = 125,11 ng/mL; Median (ASS, nein) = 91,88 ng/mL. Keine statistische Signifikanz erzielt.

Übersetzung nach Gloyer NO et al.: Associations of sphingosine-1-phosphate with soluble P-selectin and adverse clinical outcome in patients with cerebral ischemia with and without acetylsalicylic acid treatment. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2025.

| Bivariate Korrelationsanalyse für S1P | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ASS, ja (n = 270) | | ASS, nein (n = 104) | |
| **Merkmale** | **Spearmansches ρ** | **P-Wert** | **Spearmansches ρ** | **P-Wert** |
| Alter | -0,127 | 0,038 | -0,253 | 0,010 |
| BMI | 0,018 | 0,778 | 0,070 | 0,497 |
| Hämoglobin | 0,212 | < 0,001* | 0,242 | 0,014 |
| Leukozyten | 0,071 | 0,247 | 0,221 | 0,025 |
| Thrombozyten | 0,362 | < 0,001* | 0,296 | 0,003* |
| HbA1c | -0,002 | 0,978 | 0,060 | 0,551 |
| Triglyzeride | 0,211 | < 0,001* | 0,162 | 0,108 |
| HDL-Cholesterin | -0,050 | 0,415 | 0,049 | 0,626 |
| LDL-Cholesterin | 0,258 | < 0,001* | 0,203 | 0,044 |
| Kreatinin | -0,071 | 0,246 | -0,046 | 0,649 |
| Lösliches P-Selektin | 0,254 | < 0,001* | 0,117 | 0,240 |
| Thromboxan $B_2$ | 0,158 | 0,041 | 0,020 | 0,885 |
| **Bivariate Korrelationsanalyse für lösliches P-Selektin** | | | | |
| | ASS, ja (n = 270) | | ASS, nein (n = 104) | |
| **Merkmale** | **Spearmansches ρ** | **P-Wert** | **Spearmansches ρ** | **P-Wert** |
| Alter | -0,157 | 0,010 | -0,155 | 0,116 |
| BMI | 0,067 | 0,287 | 0,055 | 0,590 |
| Hämoglobin | 0,150 | 0,014 | -0,062 | 0,535 |
| Leukozyten | 0,108 | 0,077 | 0,170 | 0,084 |
| Thrombozyten | 0,427 | < 0,001* | 0,172 | 0,081 |
| HbA1c | 0,062 | 0,314 | 0,068 | 0,496 |
| Triglyzeride | 0,153 | 0,012 | 0,108 | 0,279 |
| HDL-Cholesterin | -0,031 | 0,615 | -0,042 | 0,674 |
| LDL-Cholesterin | 0,179 | 0,003* | 0,067 | 0,507 |
| Kreatinin | -0,161 | 0,008 | -0,042 | 0,669 |
| S1P | 0,254 | < 0,001* | 0,117 | 0,240 |
| Thromboxan $B_2$ | 0,417 | < 0,001* | -0,177 | 0,187 |

**Tabelle 3: Korrelationsanalyse der Querschnittsmerkmalen.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. * statistisch signifikant nach Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestung.

Übersetzung nach Gloyer NO et al.: Associations of sphingosine-1-phosphate with soluble P-selectin and adverse clinical outcome in patients with cerebral ischemia with and without acetylsalicylic acid treatment. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2025.

| Neurologische und funktionelle Defizite bei Entlassung aus dem Krankenhaus für S1P | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ASS, ja | | ASS, nein | |
| | NIHSS | | NIHSS | |
| | **0** | **1-42** | **0** | **1-42** |
| **Niedriges S1P** | 66 | 68 | 28 | 23 |
| **Hohes S1P** | 74 | 60 | 23 | 28 |
| | **mRS** | | **mRS** | |
| | **0** | **1-6** | **0** | **1-6** |
| **Niedriges S1P** | 60 | 74 | 28 | 23 |
| **Hohes S1P** | 68 | 66 | 21 | 30 |
| **Neurologische und funktionelle Defizite bei Entlassung aus dem Krankenhaus für S1P** | | | | |
| | **ASS, ja** | | **ASS, nein** | |
| | **NIHSS** | | **NIHSS** | |
| | **0** | **1-42** | **0** | **1-42** |
| **Niedriges lösliches P-Selektin** | 66 | 69 | 28 | 24 |
| **Hohes lösliches P-Selektin** | 75 | 60 | 25 | 27 |
| | **mRS** | | **mRS** | |
| | **0** | **1-6** | **0** | **1-6** |
| **Niedriges lösliches P-Selektin** | 60 | 75 | 27 | 25 |
| **Hohes lösliches P-Selektin** | 69 | 66 | 24 | 28 |

**Tabelle 4: Verteilung der neurologischen und funktionalen Defizite bei Entlassung aus dem Krankenhaus.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Klassifikationsgrenzen für S1P: Median (ASS, ja) = 1,458 µmol/L; Median (ASS, nein) = 1,471 µmol/L. Klassifikationsgrenzen für lösliches P-Selektin: Median (ASS, ja) = 125,11 ng/mL; Median (ASS, nein) = 91,88 ng/mL. Keine statistische Signifikanz erzielt.

Übersetzung nach Gloyer NO et al.: Associations of sphingosine-1-phosphate with soluble P-selectin and adverse clinical outcome in patients with cerebral ischemia with and without acetylsalicylic acid treatment. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2025.

| Mantel-Cox Analyse für S1P | | |
|---|---|---|
| | **ASS, ja** | **ASS, nein** |
| | **Mittlerer Schätzer (95%-KI)** | **Mittlerer Schätzer (95%-KI)** |
| **Niedriges S1P** | 302,3 (280,7; 324,0) Tage | 312,8 (277,9; 347,6) Tage |
| **Hohes S1P** | 319,2 (297,9; 340,4) Tage | 267,0 (222,2; 311,7) Tage |
| **P-Wert** | 0,057 | 0,143 |
| **Mantel-Cox Analyse für lösliches P-Selektin** | | |
| | **ASS, ja** | **ASS, nein** |
| | **Mittlerer Schätzer (95%-KI)** | **Mittlerer Schätzer (95%-KI)** |
| **Niedriges lösliches P-Selektin** | 305,5 (284,3; 326,7) Tage | 331,1 (304,0; 358,1) Tage |
| **Hohes lösliches P-Selektin** | 314,5 (292,7; 336,3) Tage | 250,3 (204,6; 295,9) Tage |
| **P-Wert** | 0,296 | 0,005** |

**Tabelle 5: Auswertung der mittleren ereignisfreien Überlebenszeit.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Klassifikationsgrenzen für S1P: Median (ASS, ja) = 1,458 µmol/L; Median (ASS, nein) = 1,471 µmol/L. Klassifikationsgrenzen für lösliches P-Selektin: Median (ASS, ja) = 125,11 ng/mL; Median (ASS, nein) = 91,88 ng/mL. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Übersetzung nach Gloyer NO et al.: Associations of sphingosine-1-phosphate with soluble P-selectin and adverse clinical outcome in patients with cerebral ischemia with and without acetylsalicylic acid treatment. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2025.

| Cox-Regression für S1P | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ASS, ja | | | ASS, nein | |
| | Modell | HR (95%-KI) | P-Wert | Modell | HR (95%-KI) | P-Wert |
| Hohes versus niedriges S1P | A | 0,56 (0,30; 1,03) | 0,061 | A | 1,79 (0,81; 3,94) | 0,150 |
| | B | 0,53 (0,28; 0,98) | 0,044* | B | 1,91 (0,85; 4,31) | 0,118 |
| **Cox-Regression für lösliches P-Selektin** | | | | | | |
| | | ASS, ja | | | ASS, nein | |
| Hohes versus niedriges lösliches P-Selektin | Modell | HR (95%-KI) | P-Wert | Modell | HR (95%-KI) | P-Wert |
| | A | 0,73 (0,40; 1,32) | 0,298 | A | 3,09 (1,36; 7,02) | 0,007** |
| | B | 0,71 (0,39; 1,29) | 0,259 | B | 3,22 (1,41; 7,36) | 0,005** |

**Tabelle 6: Auswertung der HR für den Eintritt eines unerwünschten Ereignisses im Verlauf.** Angaben und statistische Verfahren nach angegebener Methodik. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Klassifikationsgrenzen für S1P: Median (ASS, ja) = 1,458 µmol/L; Median (ASS, nein) = 1,471 µmol/L. Klassifikationsgrenzen für lösliches P-Selektin: Median (ASS, ja) = 125,11 ng/mL; Median (ASS, nein) = 91,88 ng/mL. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Übersetzung nach Gloyer NO et al.: Associations of sphingosine-1-phosphate with soluble P-selectin and adverse clinical outcome in patients with cerebral ischemia with and without acetylsalicylic acid treatment. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2025.

## VIII. Erklärung des Eigenanteils

Die Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit im Rahmen der Promotionstätigkeit wurde eingebettet in das Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des UKE (betreuende Person: Prof. Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm (E.S.)) in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Neurologie des UKE (betreuende Person: PD Dr. med. Chi-un Choe (C.U.C.)) sowie der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg (betreuende Person: Prof. Dr. med. Bernhard H. Rauch (B.H.R.)). Die nachfolgende Nennung der Personen in den einzelnen Leistungsanteilen erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Die initiale Idee und Konzeption der Studien wurden von C.U.C., B.H.R. und E.S. ausgearbeitet. Die Studien- und Versuchsplanung erfolgte durch C.U.C, B.H.R. und E.S. Die Datenerhebung und Datenaufbereitung wurden durch C.U.C., Eileen Moritz (E.M.), E.S., Dr. med. Laura Schwieren (L.S.), Nils-Ole Gloyer (N.O.G.) und Dr. rer. nat. Ulrike Meyer (U.M.) bewältigt. Die vorausgehende Literaturrecherche zur vorgelegten Publikation wurde gemeinsam von C.U.C., B.H.R., E.S. und N.O.G. gemeinsam durchgeführt. Sowohl die statistischen Analysen, Entwicklung der ersten Version des Manuskriptes, Darstellungen von Tabellen und Grafiken als auch die Literaturverwaltung wurden vollständig durch N.O.G. erledigt. Die Ergebnisse der statistischen Auswertungen wurden von B.H.R., C.U.C., E.M., E.S., Prof. Dr. med. Götz Thomalla (G.T.), L.S., N.O.G. und U.M. interpretiert. Alle in der Autorenschaft der wissenschaftlichen Publikation genannten Personen haben eine kritische Revision durchgeführt. Die Koordination und Kommunikation der Autorenschaft vor der Einreichung wurde durch C.U.C., B.H.R., E.S. und N.O.G. ermöglicht. Einreichung und Korrespondenz wurde durch E.S. umgesetzt. Die Finanzierung und Ressourcenbeschaffung erfolgten durch B.H.R., C.U.C. und E.S.

## IX. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, 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. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

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

Datum Unterschrift

## X. Danksagung

Mit der Vollendung dieser Promotion geht ein bedeutendes Kapitel meines studentischen Lebens zu Ende. Dieses Werk wäre jedoch nicht ohne die Unterstützung vieler wunderbarer Menschen entstanden, denen ich an dieser Stelle meinen tiefsten Dank aussprechen möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm, der mich mit fachlicher Expertise, wertvollen Anregungen und kritischem Blick durch diese herausfordernde Zeit begleitet hat. Seine Geduld und sein Vertrauen in meine Arbeit haben mich stets motiviert und inspiriert. Ebenso danke ich den aktuellen und ehemaligen Arbeitskolleginnen und -kollegen am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie sowie des Labors der Klinik für Gefäßchirurgie für die wertvollen Hinweise und Unterstützungen. Die gemeinsame Arbeit und der fachliche sowie persönliche Austausch haben diese Zeit bereichert und mir oft neuen Schwung gegeben. Gleichwohl möchte ich dem Cardiovascular Research Center (CVRC) und Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK) e.V. für die finanzielle Unterstützung im Sinne eines Stipendiums sowie dem wissenschaftlichen Transfer im Rahmen der Veranstaltungen des Graduiertenkollegs danken.

Ein herzliches Dankeschön gebührt meinen Freundinnen und Freunden, die mir in den Höhen und Tiefen dieser Promotion stets zur Seite standen. Ihre Ermutigung, ihr Verständnis und die gemeinsamen Ablenkungen haben mich immer wieder aufgerichtet. Von Herzen danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich seit jeher in all meinen Vorhaben unterstützt haben. Ihre bedingungslose Liebe, ihr Vertrauen und ihre aufrichtige Anteilnahme an meinem Werdegang haben mich geprägt und gestärkt. Ebenso möchte ich meiner Schwester danken, die mir stets Rückhalt gegeben und mich daran erinnert hat, dass es neben der Wissenschaft auch noch andere wichtige Dinge im Leben gibt.

Ein weiterer Dank gilt meinen akademischen Weggefährtinnen und Weggefährten, die diesen Weg mit mir gemeinsam gegangen sind. Die unzähligen Stunden des Lernens, der Diskussionen und der gegenseitigen Motivation haben diese Zeit unvergesslich gemacht. Darüber hinaus möchte ich den zahlreichen Menschen danken, die mich auf meinem akademischen Weg inspiriert haben, sei es durch ihre Vorträge, Publikationen oder einfach durch wertvolle Gespräche.

Diese Promotion ist nicht nur das Ergebnis meiner eigenen Anstrengungen, sondern auch der Unterstützung all jener, die mich auf diesem Weg begleitet haben. Ihnen allen gilt mein tief empfundener Dank.