

Aus der medizinischen Klinik II  
für Kardiologie, Angiologie und Intensivmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. I. Eitel

**Immunologische Charakterisierung von Patienten mit asymptomatischer  
und symptomatischer peripherer arterieller Verschlusskrankung (pAVK)**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Sektion Medizin -**

Vorgelegt von  
**Antje Beatrice Lübken**  
aus Bremen

Lübeck 2025



1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Harald Langer

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Marco Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.06.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Vorbemerkung:

In dieser Arbeit wird von Patienten gesprochen. Der Terminus wurde gewählt, um den Lesefluss zu optimieren. Es werden damit stets alle Geschlechter impliziert und an Stellen relevanter Differenzierung gesondert darauf hingewiesen.

Meinen Eltern gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1	Einleitung .....	1
1.1	Konzept der Atherosklerose .....	2
1.1.1	Definition .....	2
1.1.2	Entstehung .....	2
1.1.3	Assoziierte Erkrankungen .....	4
1.2	Die periphere arterielle Verschlusskrankung (pAVK).....	4
1.2.1	Definition der pAVK .....	4
1.2.2	Prävalenz und Relevanz für die Gesamtbevölkerung .....	5
1.2.3	Ätiologie .....	5
1.2.4	Klinische Präsentation .....	5
1.2.5	Morbidität und Mortalität .....	6
1.2.6	Diagnostik der pAVK .....	7
1.2.7	Die asymptomatische pAVK .....	9
1.2.8	Einteilung der pAVK .....	9
1.2.9	Therapieoptionen.....	9
1.3	Hintergründe von Ischämie und Schmerz .....	12
1.4	Kollateralenbildung und endogene Revaskularisierung .....	13
1.5	Myeloide Zellen .....	15
1.5.1	Überblick über die Familie der myeloiden Zellen .....	16
1.5.2	Monozyten und Makrophagen .....	16
1.5.2.1	Rolle von Monozyten und Makrophagen bei Plaquebildung und Revaskularisierung .....	18
1.6	Ziel der Studie .....	20
2	Material und Methoden .....	21
2.1	Studiendesign .....	21
2.2	Ethikvotum .....	21
2.3	Screening .....	21
2.4	Verifizierung der pAVK-Diagnose durch einen unabhängigen Untersucher .....	22
2.5	Vorgehen bei Studieneinschluss .....	23
2.5.1	Baselinevisite-Fragebogen / Erheben von Vordiagnosen .....	23
2.5.2	Klinische Untersuchung .....	23
2.5.3	Fragebogen zur Charakterisierung der pAVK-Symptomatik .....	23
2.5.4	Verifizierung des pAVK-Stadiums mittels 6-Minuten-Gehtest .....	24
2.5.5	Beurteilung der subjektiven Lebensqualität mittels EQ5D-Fragebogen .....	24
2.5.6	Erfassung von Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten .....	25
2.6	Blutentnahme und Matching von symptomatischen Patienten .....	25
2.7	Fluorescence activated cell sorting-(FACS): Durchflusszytometrische Messung der Monozyten .....	26

2.7.1	Panel-Erstellung .....	26
2.7.2	Probenvorbereitung und Färbung für die Durchflusszytometrie.....	26
2.7.3	Datenaufnahme .....	29
2.8	Analyse der FACS-Daten .....	29
2.8.1	Kompensation und Gating .....	29
2.8.2	Statistische Analyse der Monozytensubpopulationen .....	33
2.9	Bestimmung von angiogenese- und immunologisch relevanten Markern mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	37
2.10	Follow-up .....	38
2.11	Weitere statistische Analyse.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs anhand klinischer und epidemiologischer Daten	39
3.2	pAVK-Befunde .....	44
3.3	Lebensqualität und Gesundheitsverhalten .....	47
3.4	Ergebnisse des Follow-ups .....	48
3.5	Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	50
3.5.1	Zellzahlen .....	50
3.5.2	Verhältnisse der Zellreihen .....	51
3.5.3	Die klassischen Monozytensubgruppen .....	52
3.5.4	Binäre Gates der Monozyten.....	53
3.5.5	Relevante Monozytenoberflächenmarker in klassischen Monozytensubgruppen ...	54
3.5.6	Signifikant unterschiedliche Subgruppen .....	55
3.6	ELISA-Ergebnisse .....	57
3.6.1	VEGF-ELISA.....	57
3.6.2	Interleukin-6-ELISA .....	57
3.6.3	hsCRP-ELISA.....	57
3.6.4	CXCL4-ELISA.....	57
3.7	Korrelationsberechnungen .....	59
3.7.1	ELISA-Korrelationen.....	59
3.7.2	Korrelationsmatrices.....	61
4	Diskussion .....	63
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	63
4.2	Die klassischen Monozytensubgruppen im Kontext der Atherosklerose .....	64
4.3	Bedeutung von CD11c, CD202b sowie CD40.....	67
4.4	Marker mit Unterschieden, die nicht signifikant ausfielen .....	70
4.5	Was sagen die 4 gebildeten Subgruppen aus?.....	74
4.6	Limitationen .....	75
4.7	Ausblick .....	77
5	Zusammenfassung .....	79
II.	Literaturverzeichnis .....	IX

III. Abbildungsverzeichnis.....	XXII
IV. Tabellenverzeichnis.....	XXIII
V. Anhang .....	XXIV
a. Baseline-Fragebogen .....	XXIV
b. pAVK-Symptomatikfragebogen .....	XXVII
c. Auswertung Symptomatikfragebogen .....	XXVII
d. 6-Minuten-Gehtest.....	XXVIII
e. Fragebogen zum Gesundheitsverhalten .....	XXVIII
f. Auflistung verwendeter Blutentnahmemonovetten.....	XXIX
g. Hersteller und Bezugsquelle der Antikörper des FACS-Panels.....	XXIX
VI. Danksagung .....	XXX
VII. Publikationen .....	XXXI

## I. Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae
ABI	Ankle brachial index; Knöchel-Arm-Index
ACE	Angiotensin Converting Enzyme; Angiotensin konvertierendes Enzym
AS; asympt.	Asymptomatische Patientengruppe
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body mass index
CCL; CCR	Chemokin-Ligand; Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation (membrangebundene Glykoproteine)
CFU	Colony-forming unit; koloniebildende Einheit
CHIP	Clonal hematopoiesis of indeterminate potential; klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial
CI	Confidence interval; Konfidenzintervall
CMP	Common myeloid progenitor; oligopotente myeloische Stammzelle
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CSE	Cholesterinsynthese
CSF	Colony-stimulating factor; Kolonie-stimulierender Faktor
CT	Computertomographie
CX3CR1	CX3C-Motiv-Chemokinrezeptor 1
DC	Dendritic cell; dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DOAK	Direkte orale Antikoagulation
E	Erythrozyt
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPC	Endotheliale Vorläuferzelle
ESC	European Society of Cardiology
EVAR	Endovaskuläre Aneurysmreparatur
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FKDS	Farbkodierte Duplexsonographie
FSC	Forward Scatter
FU	Follow-up
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating faktor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate

GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
HbA1c	Glykiertes adultes Hämoglobin
HDL	High-density Lipoprotein
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
hs-CRP	Hoch-sensitives C-reaktives Protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INR	International ratio
IPAQ	International physical activity questionnaire
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
Konz.	Konzentration
LDL	Low-density Lipoprotein
LP-ID	LUERPAD-Identifikationsnummer
LUERPAD	LUEbeck Registry of Peripheral Artery Disease patients
MCP	Monocyte chemoattractant protein
Meg	Megakaryozyt
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor
MFI	Mean fluorescent intensity; mittlere Fluoreszenzaktivität
MRT	Magnetresonanztomographie
NET	Neutrophile extrazelluläre Fallen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
ns	Nicht signifikant
OAK	Orale Antikoagulation
OR	Odds Ratio
oxLDL	Oxidiertes low-density Lipoprotein
P1 / P2	Panel 1 / Panel 2
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankung
PBS	Phosphate-buffered saline; phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Percutaneous intervention; perkutane Intervention

PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
RNA	Ribonukleinsäure
ROUT	Robust regression and outlier
s	Signifikant
S; sympt.	Symptomatische Patientengruppe
SCF	Stammzellefaktor
SD	Standard deviation; Standardabweichung
SSC	Sideward scatter
TAH	Thrombozytenaggregationshemmer
TBI	Toe brachial index; Zehen-Arm-Index
TEA	Thrombendarteriektomie
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tpt	Tera-Partikel
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WBC	White blood cell count; Anzahl weißer Blutkörperchen
Z.n.	Zustand nach

## 1 Einleitung

Eine schwere periphere arterielle Verschlusskrankung (pAVK) zeichnet sich dadurch aus, dass nur noch wenige Meter zu Fuß zurückgelegt werden können, bevor starke Schmerzen und Wadenkrämpfe einsetzen und diese den Patienten zum Anhalten zwingen.<sup>1</sup> Das betroffene Gewebe wird minderdurchblutet und stirbt im schlimmsten Fall ab, was eine Amputation zur Folge haben kann.<sup>2</sup> Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie die pAVK, spielen in einer ständig alternden Gesellschaft mehr denn je eine große Rolle. Sie führen zu einem hohen Leidensdruck bei Erkrankten, die hierdurch in ihrer Alltagsaktivität stark eingeschränkt oder gar durch notwendig werdende stationäre Aufenthalte aus dem Alltag gerissen werden. Neben Krebs, chronischen Atemwegserkrankungen und Diabetes mellitus sind kardiovaskuläre Erkrankungen eine der vier Haupttodesursachen in Europa,<sup>3</sup> weltweit sogar die häufigste Todesursache<sup>4</sup> und belasten damit auch die Gesundheitssysteme aus ökonomischer Sicht erheblich.<sup>5</sup> Manche kardiovaskuläre Risikofaktoren werden seltener, so zum Beispiel das Rauchen.<sup>5</sup> Andere, wie Übergewicht, nehmen hingegen gerade in der westlichen Bevölkerung immer stärker zu.<sup>6</sup>

Der wesentliche Pathomechanismus kardiovaskulärer Erkrankungen ist eine atherosklerotische Verengung bis hin zum Verschluss arterieller Gefäße. Die Atherosklerose beschreibt einen langsam voranschreitenden, entzündlichen Prozess.<sup>7</sup> An den Koronararterien manifestiert sich die Atherosklerose zum Beispiel als Angina pectoris.<sup>8</sup> An den Beinarterien kann sie zur Claudicatio intermittens, weit verbreitet als Schaufensterkrankheit bezeichnet, führen.<sup>9,10</sup> Sind die Halsschlagadern betroffen, so können ischämische Schlaganfallereignisse eintreten. pAVK, Herzinfarkt und Schlaganfall sind also unterschiedliche Manifestationsformen derselben Erkrankung.<sup>11</sup> Gerade deshalb ist ein gutes Verständnis der Atherosklerose von großer Bedeutung. Die Erkrankungen unterscheiden sich aber auch an einigen Stellen: So wird beim akuten Verschluss der Koronararterien eher von einem thrombotischen Ereignis mit Plaqueruptur am Ort der Obstruktion ausgegangen, während es bei der pAVK öfter zu embolischen Verschlüssen distal der eigentlichen Arterienläsion kommt.<sup>12</sup> Epidemiologisch fällt im Hinblick auf die pAVK auf, dass mehr Frauen, Rauchende und dunkelhäutige Patienten betroffen sind als bei der koronaren Herzerkrankung (KHK). Biochemisch werden bei der pAVK im Vergleich zur

KHK höhere LDL (low-density Lipoprotein)- und CRP (C-reaktives Protein)-Werte beobachtet.<sup>13</sup>

Die pAVK tritt in äußerst unterschiedlichen Ausprägungen auf, von asymptomatisch bis hin zu starken Schmerzen und Nekrosen.<sup>14</sup> Für diese klinische Heterogenität scheint die Bildung von Umgehungskreisläufen, sogenannten Kollateralen, ausschlaggebend zu sein,<sup>15</sup> welche maßgeblich durch myeloide Zellen beeinflusst wird.<sup>16</sup> Um nun die klinische Heterogenität auf molekularer Ebene besser zu verstehen und hieraus Erkenntnisse hinsichtlich neuer Therapieoptionen zu gewinnen, wurden im Rahmen dieser Arbeit immunologische Unterschiede bei asymptomatischen und symptomatischen Patienten untersucht.

## **1.1 Konzept der Atherosklerose**

### **1.1.1 Definition**

Der Begriff Atherosklerose beschreibt einen pathologischen Prozess, wobei der Wortbestandteil „Sklerose“ aus dem altgriechischen stammt und mit „Verhärtung“ zu übersetzen ist.<sup>17</sup> Eine Läsion der innersten Gefäßschicht (Intima) führt zur Lipideinwanderung und -ablagerung in Form von Plaques mit anschließender chronischer Entzündungsreaktion und mündet schließlich im Verschluss der Gefäße.<sup>18,19</sup> Die atherosklerotisch bedingten Veränderungen arterieller Zellwände kommen im gesamten Körper vor, auch wenn die für diese Erkrankung charakteristischen Plaques sich nur an ausgewählten Stellen entwickeln.<sup>20,21</sup>

Oft wird der Begriff mit der Arteriosklerose gleichgesetzt. Diese ist jedoch ein Überbegriff für Erkrankungen arterieller Blutgefäße und beschreibt neben der Atherosklerose auch andere, die Gefäßelastizität verändernde arterielle Erkrankungen, wie die Mönckeberg-Mediasklerose und die Arteriolosklerose.<sup>22</sup>

### **1.1.2 Entstehung**

Die arterielle Wand besteht aus drei Schichten: der außen befindlichen, bindegewebigen Adventitia, der Media, bestehend aus elastischen Fasern und glatten Muskelzellen sowie der Intima mit Endothelzellen.<sup>11,23</sup>

Im Rahmen der Atherosklerose kommt es zu Veränderungen insbesondere der inneren Arterienwandschichten. An dieser entzündlichen Reaktion sind zahlreiche Faktoren wie Entzündungszellen, Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Thrombozyten und eine endotheliale Dysfunktion beteiligt.<sup>7,24–26</sup> Durch die Interaktion von im Blut gelösten Lipiden mit der Gefäßwand wird die Entwicklung von fettreichen

atherosklerotischen Plaques vorangetrieben.<sup>27,28</sup> LDL dringt in die Gefäßwand ein und löst den Beginn atherosklerotischer Veränderungen aus.<sup>29</sup> Modifiziertes LDL wie zum Beispiel oxidiertes LDL und proinflammatorische Zytokine aktivieren das Endothel<sup>11,30,31</sup> sowie Immunzellen wie Monozyten, dendritische Zellen, Makrophagen und T-Zellen.<sup>32-35</sup> Endothelzellen exprimieren daraufhin Leukozytenadhäsionsmoleküle, wodurch es zur Adhäsion von Monozyten und Lymphozyten ans Endothel und deren Zytokin-vermittelte Einwanderung in die Intima kommt.<sup>11,36</sup> Sich aus Monozyten entwickelnde Makrophagen nehmen in der Intima abgelagerte Lipide auf und werden so zu Schaumzellen. Auch in die Intima eingewanderte glatte Muskelzellen können sich umwandeln und durch Lipidaufnahme in Schaumzellen transformieren.<sup>18,37</sup> Atherosklerotische Plaques entstehen ab dem Schulalter und entwickeln sich über Jahrzehnte fort. Sie führen zur Verengung von Gefäßen und damit zu einer Mangeldurchblutung des betroffenen Gewebes.<sup>4</sup>

Diese Plaques durchlaufen verschiedene Entwicklungsstufen. Die American Heart Association klassifizierte diese in Vorstufen ohne klinische Symptome (I-III) und weiter entwickelte Läsionen (IV-VI):

Im ersten Stadium (I) kommt es zu Lipidanreicherungen in der Intima mit wenigen Schaumzellen. Das zweite Stadium ist gekennzeichnet durch Fettstreifen („fatty streaks“) auf der Intima, Schaumzellen sowie glatte Muskelzellen mit Lipiden. Es wandern T-Lymphozyten ein. Stadium III bildet mit extrazellulären Fetttröpfchen und einer Intimaverdickung eine Vorstufe zum Atherom, ehe es im Stadium IV zur Bildung eines Lipidkerns durch lokale Anhäufung von Lipiden und Auflösung der Intimastruktur durch Einlagerung von Schaumzellen und Proteoglykanen kommt. Anschließend, im Stadium V, folgen bindegewebige Umbauten, die bei Umschließung des Lipidkerns Fibroatherom genannt werden. Mit diesem Prozess geht eine Reduktion des Gefäßdurchmessers einher. Treten daraufhin Komplikationen auf, wird dies als Stadium VI bezeichnet. Die Stadien VII und VIII beschreiben Veränderungen durch eine Modulierung der Lipidanreicherung, die zu einer Kalzifizierung oder auch zu weiterem bindegewebigen Umbau führen können.<sup>38</sup>

Als Komplikation der Atherosklerose können Thromben entstehen, die lokal oder fernab (dann thromboembolisch) einen Gefäßverschluss verursachen. Als Ursache hierfür wird die Ruptur einer dünnen fibrösen Schutzschicht angesehen, die zur Zerstörung der atherosklerotischen Plaque führt. Die eigentlich widerstandsfähige kollagenreiche Kappe wird durch den Einfluss von Entzündungszellen labil, indem die

Kollagensynthese reduziert und Kollagenasen überexprimiert werden. Durch die Ruptur liegen thrombogene Substanzen frei, die bei Kontakt mit Thrombozyten zu einer akuten Thrombose führen, klinisch apparent in Form akuter Symptome wie Brustschmerz im Rahmen eines Herzinfarktes oder akuter Beinschmerz bei Verschluss einer Arterie der unteren Extremität oder einer Schlaganfallsymptomatik.<sup>39,40</sup>

Als Risikofaktoren der Atherosklerose werden nach traditioneller Auffassung veränderte Blutfettwerte (erhöhtes LDL, verringertes HDL (high-density Lipoprotein), erhöhte Triglyzeride), Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Bluthochdruck und ein erhöhtes Alter angesehen.<sup>41,42</sup> Zudem haben Forschungsergebnisse gezeigt, dass Ernährungsgewohnheiten, Luftverschmutzung, Schlafmangel und Umgebungsgereusche eine Rolle spielen. In den letzten zwanzig Jahren konnten die genetischen Ursachen einer familiären Disposition entschlüsselt werden. Einen neueren Aspekt stellen klonale hämatopoetische Stammzellen (englisch: clonal hematopoiesis of indeterminate potential; CHIP) dar, die zuvor aus der Onkogenese bekannt waren.<sup>43–46</sup>

### **1.1.3 Assoziierte Erkrankungen**

Atherosklerose kann im gesamten Organismus vorkommen. Somit ist es nicht verwunderlich, dass sich die Erkrankung in Form verschiedenster klinischer Bilder zeigt. Die häufigsten Formen sind Schlaganfall, Myokardinfarkt (z.T. mit daraus resultierender ischämischer Kardiomyopathie) und die periphere arterielle Verschlusskrankung.<sup>8–10,47</sup> Auch kann die Erkrankung zum Beispiel zu einer Mesenterialischämie oder einer Niereninsuffizienz durch Nierenarterienstenose führen.<sup>48,49</sup>

## **1.2 Die periphere arterielle Verschlusskrankung (pAVK)**

### **1.2.1 Definition der pAVK**

Die pAVK wird definiert als Stenose oder Verschluss von Arterien der oberen oder unteren Extremitäten mit einhergehender Durchblutungsstörung.<sup>50</sup>

Im englischen Sprachgebrauch wird zwischen „peripheral arterial disease“, was sich auf alle Arterien außer Koronararterien und Aorta bezieht, und „peripheral artery disease“, womit ausschließlich Arterien der unteren Extremität gemeint sind, unterschieden.<sup>51</sup> Diese Arbeit beschäftigt sich mit der pAVK der unteren Extremität.

### **1.2.2 Prävalenz und Relevanz für die Gesamtbevölkerung**

Im Jahr 2010 lebten einer statistischen Schätzung zufolge weltweit 202 Millionen Menschen mit einer pAVK.<sup>52</sup> Die Anzahl pAVK-Erkrankter steigt stetig,<sup>53</sup> aktuell sind es schätzungsweise über 230 Millionen Menschen.<sup>54</sup> Die Häufigkeit der pAVK nimmt mit dem Alter zu, beträgt ab einem Alter von siebzig Jahren etwa 15-20% und Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen.<sup>14</sup> In den letzten Jahren wurde eine Zunahme insbesondere auch in Ländern niedrigen bis mittleren Einkommens sowie ethnisch starke Unterschiede beobachtet. So haben Menschen afrokaribischer Abstammung ein zwölfmal erhöhtes Risiko, an einer pAVK zu erkranken. Auch bei Frauen liegt in einigen Regionen eine erhöhte Prävalenz vor.<sup>55,56</sup> Insgesamt verursacht die pAVK eine immense Einschränkung der Lebensqualität<sup>57</sup> sowie eine starke wirtschaftliche Belastung der Gesundheitssysteme weltweit.<sup>58</sup>

Die Wahrscheinlichkeit, an einer pAVK zu erkranken, erhöht sich bei Vorliegen einer KHK um den Faktor vier.<sup>50</sup> Etwa 40% der Patienten mit mindestens zwei kardiovaskulären Risikofaktoren und gesicherter KHK haben eine pAVK.<sup>59</sup> 40 bis 60% der pAVK-Patienten wiederum haben auch eine KHK und zerebrale Atherosklerose. Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie haben in bis zu 30% eine pAVK.<sup>60</sup>

### **1.2.3 Ätiologie**

Circa 95% aller chronischen pAVK-Fälle liegt eine Atherosklerose zugrunde. Die übrigen 5% verteilen sich auf genetische, anderweitig entzündliche und traumatische Ursachen.<sup>61</sup> Die Risikofaktoren entsprechen den oben beschriebenen Risikofaktoren der Atherosklerose, wobei dem Nikotinabusus hier eine besonders starke Bedeutung zugeschrieben wird.<sup>56</sup>

### **1.2.4 Klinische Präsentation**

Die pAVK kann akut oder chronisch auftreten und von asymptomatisch über eine intermittierende Claudicatio, Ruheschmerzen bis hin zu Ulkus und Gangrän reichen. Aufgrund der verminderten Durchblutung kann es bei pAVK-Patienten zu trockenen, blassen und kühlen Beinen sowie spärlicher Behaarung kommen. Beschreibt der Patient einen reproduzierbaren, belastungsabhängigen, oft krampfartigen Muskelschmerz, der sich in Ruhe rasch bessert, ist dies hinweisend auf eine Claudicatio intermittens. Ist die pAVK fortgeschritten und liegt eine kritische Extremitätenischämie vor, dann treten oft bereits im Ruhezustand Schmerzen auf. Diese bessern sich, wenn das Bein tiefgelagert wird, da es dann zu einer besseren Blut- und damit

Sauerstoffversorgung kommt.<sup>50</sup> Liegen zusätzlich zur pAVK andere Erkrankungen, wie zum Beispiel eine Diabetes-assoziierte Polyneuropathie vor, dann kann die Schmerzwahrnehmung eingeschränkt sein.<sup>62</sup> Im schlimmsten Fall kommt es durch eine akute oder chronische Ischämie zum Gewebeuntergang (einem Infarkt), der eine Amputation der Extremität zur Folge haben kann.<sup>12,50,61,63</sup> In Abhängigkeit von der Lokalisation der Gefäßverengung treten Symptome in Füßen, Waden, Oberschenkeln oder dem Gesäß auf. Es werden Einetagen- und Mehretagenerkrankungen anhand der betroffenen Gefäßsegmente unterschieden.<sup>50</sup>

Nur etwa 10% aller pAVK-Patienten beklagen pAVK-typische Symptome einer Claudicatio intermittens.<sup>9</sup> Etwa 40% haben keine Beinschmerzen, während die übrigen 50% andersartige Symptome beschreiben, womit eine pAVK oft unerkannt bleibt.<sup>1,64</sup>

### **1.2.5 Morbidität und Mortalität**

Liegt eine symptomatische pAVK mit Claudicatio intermittens vor, dann kommt es in 25% der Fälle zu einer spontanen Besserung, etwa die Hälfte der Patienten behält konstante Symptome und in 25% verschlechtert sich die Symptomatik. Dies kann bis zur kritischen Extremitätenischämie mit der Notwendigkeit einer Amputation führen, ist aber mit 2% der Fälle selten.<sup>50</sup> Das deutlich erhöhte Risiko kardialer und zerebraler Ereignisse dominiert bei diesen Patienten.<sup>50</sup> Wie in der COPART-Studie gezeigt werden konnte, ist die Ein-Jahres-Mortalitätsrate in fortgeschrittenen Stadien der pAVK stark erhöht. Im Stadium III nach Fontaine beträgt sie 23,1%, im Stadium IV bei Vorliegen von Ulzerationen 28,7%.<sup>65</sup> Zudem weisen Patienten mit asymptomatischer oder symptomatischer pAVK auch nach Anpassung der konventionellen Risikofaktoren eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität auf.<sup>52</sup> Direkt hinter koronarer Herzerkrankung und Schlaganfall folgend ist die pAVK die dritthäufigste kardiovaskuläre Todesursache.<sup>51</sup>

Wenn pAVK und KHK miteinander einhergehen, wird die pAVK aufgrund einer durch Dyspnoe limitierten Gehstrecke häufig übersehen, die Prognose verschlechtert sich bei Vorliegen beider Erkrankungen aber stark.<sup>51</sup> Das gleichzeitige Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung, Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz oder eines Diabetes mellitus verschlechtert die Prognose nachweislich.<sup>50</sup> Dies konnte unter anderem im REACH-Register, einem internationalen Register atherosklerotisch erkrankter Patienten mit 3647 Zentren in 29 Ländern weltweit, gezeigt werden.<sup>50,66</sup>

### 1.2.6 Diagnostik der pAVK

Zu Diagnostik und Therapie der pAVK existieren aktuell unterschiedliche Auffassungen je nach Fachgesellschaft.<sup>67</sup> Die hier dargestellten Vorgehensweisen entsprechen der neuesten Fassung der Empfehlungen der European Society of Cardiology (ESC) (Ausgabe 2017). Nach Rücksprache mit dem an der Leitlinie beteiligten Autor Lawall befindet sich diese aktuell in Überarbeitung, ein Zugriff auf neuere Empfehlungen sei derzeit allerdings noch nicht möglich.

Die Diagnostik einer pAVK kann klinisch, mithilfe einer Messung des Ankle-Brachial-Index (ABI), duplexsonographisch oder mittels Schnittbildgebung in Form einer Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgen.<sup>68</sup> Zunächst sollten eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung durchgeführt werden. Der Fokus liegt hierbei auf dem Beschwerdebild, Hautveränderungen, Hautstatus, muskulärer Konstitution, Farbe, Behaarung und Temperatur der unteren Extremitäten im Seitenvergleich.<sup>50</sup>

Im Anschluss werden Verschlussdrücke durch Blutdruckmessung an den Extremitätenarterien bestimmt. Der Ankle-Brachial-Index (ABI) kann hieraus durch Division des systolischen Beinarteriendruckes durch den systolischen Arteriendruck der jeweiligen Extremität errechnet werden und eine pAVK somit breitflächig, nicht-invasiv detektiert werden.<sup>63,69</sup>

$$ABI = \frac{\text{systolischer **Bein**arteriendruck [mmHg]}}{\text{systolischer **Arm**arteriendruck [mmHg]}}$$

Ein normwertiger ABI liegt dabei zwischen 0,9 und 1,4.<sup>63,68</sup>

Ist der ABI auffällig, so spiegelt dies eine mögliche Gefäßveränderung wieder, die zu einer Verminderung der Beindurchblutung führt.<sup>70</sup> Ein zu hoher (>1,4) und ein zu niedriger (<0,9) ABI-Wert weisen auf das Vorliegen einer pAVK hin.<sup>71</sup> ABI-Werte zwischen 0,7 und 0,9 definieren eine leichte, ABI-Werte zwischen 0,5 und 0,7 eine moderate und ABI-Werte unter 0,5 eine schwere pAVK.<sup>51</sup> Neuere Studien sehen einen ABI von unter 1,0 bereits als pathologisch an.<sup>71</sup> In einer Metaanalyse zahlreicher Studien zur Genauigkeit der pAVK-Diagnostik mittels ABI wurde für in Ruhe gemessene ABI-Werte unter 0,9 eine Sensitivität von 75% und eine Spezifität von 86% für das Vorliegen einer pAVK ermittelt.<sup>72</sup> Für eine noch genauere Krankheits-erfassung eignen sich ABI-Messungen nach Belastung. Kommt es hier zu einer ABI-Abnahme um 15-20%, so liegt eine pAVK vor.<sup>73</sup>

Bei einem ABI größer als 1,4 wird von einer Mediasklerose, also einer Versteifung der mittleren Gefäßwand, ausgegangen. In diesen Fällen zeigt sich oft auch eine abgeflachte Dopplerpulscurve und es sollte eine Toe-Brachial-Index-(TBI)-Messung zur Diagnosesicherung erfolgen. Dabei wird der systolische Blutdruck der Zehenarterien mit dem Blutdruck der Armarterien verglichen.<sup>73,74</sup> Ist der TBI kleiner als 0,7, spricht dies für das Vorliegen einer pAVK.<sup>70</sup>

Die farbkodierte Duplexsonographie (FKDS), durch die Gefäße und ihr Wandaufbau dargestellt werden und gleichzeitig die Messung des Blutstroms möglich ist, findet in der Diagnostik sowie der Therapieplanung der pAVK als Methode der ersten Wahl Anwendung.<sup>75</sup> Frühe atherosklerotische Veränderungen der Intima-Media-Dicke sowie pathologisch veränderte Blutflüsse können mittels FKDS dargestellt und andere Erkrankungen differentialdiagnostisch abgegrenzt werden.<sup>50,76</sup> Insbesondere zur Therapieplanung werden zusätzlich Computertomographie- und Magnetresonanz-Angiographien (CTA oder MRA) herangezogen.<sup>77</sup>

Um die Symptomatik des Patienten zu objektivieren, die pAVK zu klassifizieren und Behandlungsergebnisse einzuschätzen wird ein Gehstest durchgeführt. Dabei wird der Patient zu schnellem Gehen auf einem Laufband oder auf flacher Ebene aufgefordert und die zurückgelegte Strecke sowie Symptomatik dokumentiert. Anhand der erhobenen schmerzfreien Gehstrecke können unter anderem die Stadien IIa (>200m schmerzfreie Gehstrecke) und IIb (<200m schmerzfreie Gehstrecke) nach Fontaine voneinander abgegrenzt werden.<sup>78</sup> Beachtet werden muss dabei, dass sich auch andere Erkrankungen mit einer Claudicatio-Symptomatik präsentieren können, darunter z.B. die Claudicatio spinalis bei Kompression des Rückenmarks, die sich im Gegensatz zur Claudicatio intermittens bei pAVK durch Beugung der Lendenwirbelsäule in der Regel mildern lässt. Auch eine Arthrose (langsames Abklingen der Schmerzen, Besserung bei Entlastung), eine venöse Claudicatio (enge, schneidende Schmerzen nach der Bewegung, Besserung durch Hochlagerung), eine Nervenwurzelkompression (scharfe, einschließende Schmerzen auch in Ruhe, Besserung durch Handlungsänderung) und ein chronisches Kompartmentsyndrom (Engegefühl und schneidende Wadenschmerzen nach starker Anstrengung vor allem bei muskulösen Menschen) sollten als Ursache für die Symptomatik in Erwägung gezogen und abgegrenzt werden.<sup>60</sup>

### 1.2.7 Die asymptomatische pAVK

Die französische IPSILON-Studie mit 1340 eingeschlossenen, ambulanten KHK-Patienten ohne weitere Atherosklerose-Manifestationen zeigte, dass die Dunkelziffer pAVK-Erkrankter hoch ist. So konnte bei 26,6% der Patienten eine pAVK anhand des ABIs festgestellt werden, wobei mehr als die Hälfte der Patienten asymptomatisch war.<sup>79</sup> Daten aus der in den USA durchgeführten PARTNERS Studie sowie aus der in Deutschland erhobenen getABI-Studie zeigten ebenfalls eine hohe Dunkelziffer der pAVK.<sup>9,80</sup> Trotz hochgradiger Stenosen haben also viele Patienten keine pAVK-Symptome oder Zeichen der Gewebeischämie, wie z.B. Hautnekrosen.<sup>81,82</sup> Eine Atherosklerose kann in diesen Fällen mittels pathologisch erniedrigter ABI-Werte nicht-invasiv detektiert werden. Da diese Messungen direkt mit kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität korrelieren, kann der ABI auch bei asymptomatischen Patienten zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos herangezogen werden.<sup>83–85</sup> Eine asymptomatische pAVK wird dabei bei einem ABI unter 0,9 in Abwesenheit sonstiger Symptome beschrieben.<sup>70</sup>

### 1.2.8 Einteilung der pAVK

Im deutschsprachigen Raum wird die pAVK klinisch nach Fontaine in die Stadien I bis IV eingeteilt, im internationalen wissenschaftlichen Bereich findet hingegen meist die Klassifikation nach Rutherford (Grade I-III, Kategorien 1-6) Anwendung.<sup>74</sup>

Fontaine		Rutherford		
Stadium	Klinisches Bild	Grad	Kategorie	Klinisches Bild
I	asymptomatisch	0	0	asymptomatisch
Ila	Schmerzfremie Gehstrecke >200m	I	1	leichte Claudicatio intermittens
Iib	Schmerzfremie Gehstrecke <200m	I	2	mäßige Claudicatio intermittens
		I	3	schwere Claudicatio intermittens
III	Ischämischer Ruheschmerz	II	4	ischämischer Ruheschmerz
IV	Ulkus, Gangrän	III	5	kleinflächige Nekrosen
		III	6	großflächige Nekrosen

Tabelle 1: Klassifikation der pAVK nach Fontaine und Rutherford.

### 1.2.9 Therapieoptionen

Der aktuellen Leitlinie zufolge werden als Behandlungsziele eine Hemmung des Krankheitsfortschrittes, die Risikoreduktion vaskulärer Ereignisse, eine Schmerzreduktion sowie die Erhöhung von Gehleistung und Lebensqualität angesehen.<sup>86,87</sup> Je nach pAVK-Stadium und dementsprechender Symptomatik (s.o.: „Einteilung der pAVK“) treten unterschiedliche Prioritäten in den Fokus. Als Basistherapie wird eine Modulierung von Risikofaktoren empfohlen. Diese soll in allen pAVK-Stadien statt-

finden und beinhaltet körperliche Aktivität, Anstreben eines normwertigen BMIs, Nikotinkarenz bei entsprechendem Abusus und eine adäquate diätetische sowie medikamentöse Einstellung von Hypertonus, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus.<sup>68,86</sup> Hinzu kommt die ebenfalls in allen Stadien empfohlene antithrombotische Therapie mittels Acetylsalicylsäure (ASS) 100 mg / Clopidogrel 75 mg, da bereits eine asymptomatische pAVK ein relevantes Risiko für vaskuläre Ereignisse mit sich bringt. In neueren Studien wurde ein positiver Effekt von niedrig dosiertem Rivaroxaban festgestellt und dieses anstelle von Clopidogrel empfohlen. Nach Ausschluss eines hohen Blutungsrisikos sollte eine Kombination von 2,5 mg Rivaroxaban und niedrigdosiertem ASS verabreicht werden.<sup>88</sup> Als hohes Blutungsrisiko werden hier Schlaganfälle, zerebrale Erkrankungen, gastrointestinale Blutungen oder Erkrankungen und damit verbundene Anämie in der Vorgeschichte, Leberversagen, Koagulopathie, extrem hohes Alter oder eine Nierenschädigung mit Glomerulärer Filtrationsrate (GFR) unter 15ml/min/1,73m<sup>2</sup> angesehen.<sup>89</sup> Bei Patienten mit ASS-Allergie, hohem Blutungsrisiko und nach einer Revaskularisation kann Clopidogrel anstelle von ASS verabreicht werden.<sup>90,91</sup> Ein Gehtraining wird in den Stadien I und II nach Fontaine empfohlen. Es kann die schmerzfreie Gehstrecke verlängern und positiv auf Hypertonus, Hypercholesterinämie und Übergewicht wirken. Die Gehstreckenverlängerung wird u.a. durch eine erhöhte Ausschüttung von Gefäßwachstumsfaktoren und damit Kollateralenbildung, eine verbesserte Endothelfunktion, Neuinnervierung von Muskelfasern, eine erhöhte Glykolyseaktivität, normalisierte Stickstoffmonoxid-(NO)-Werte, eine erhöhte Gesamtfitness und stärkere Muskulatur bewirkt.<sup>92,93</sup> Symptomatik-modulierende Medikamente wie Cilostazol und Naftidrofuryl können zusätzlich im Stadium II zur Reduktion der Claudicatio intermittens verabreicht werden.<sup>94,95</sup> Ein positiver Effekt hinsichtlich der Amputationsraten ist bekannt, während eine tatsächliche Verlängerung der Gehstrecke zumindest im Hinblick auf Cilostazol kontrovers diskutiert wird.<sup>96</sup> Eine spezielle Wundbehandlung ist im Stadium IV bei Ulkus und Gangrän empfohlen.<sup>86</sup> Interventionelle Verfahren oder eine Bypassanlage mittels Operation sind in den Stadien III und IV sowie bei hohem Leidensdruck bereits im Stadium II indiziert.<sup>86</sup> Die beiden Strategien zeigen ähnliche Outcomes, die interventionelle Angioplastie scheint jedoch günstiger und mit weniger Komplikationen behaftet zu sein. Eine individuelle Entscheidung anhand von Komorbiditäten und Gefäßanatomie des Patienten sowie der Expertise des Behandlers ist notwendig.<sup>97-99</sup> In der zukünftig

geltenden Leitlinie zur pAVK sollen medikamentöse Therapien in den Fokus gerückt und Revaskularisationen erst in späteren Krankheitsstadien empfohlen werden.<sup>100</sup>

In einigen Studien wie dem REACH-Register, der PARTNERS-Studie und der getABI-Studie wurde deutlich, dass es derzeit eine ausgesprochene Unterversorgung von Patienten mit pAVK gibt.<sup>9,101-103</sup>

Zusätzlich zur deutschen Leitlinie konnten neue Forschungsergebnisse einige andere Therapiemöglichkeiten aufzeigen. So scheint eine medikamentöse Therapie mit Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9-(PCSK9)-Hemmern bei Patienten mit kritischer Extremitätenischämie von Vorteil zu sein. Das in der FOURIER-Studie angewandte Evolocumab senkt LDL-Cholesterin-Werte und führt damit zu einer Verringerung kardiovaskulärer Ereignisse sowie akuter Ischämien.<sup>104,105</sup> Insgesamt scheint die Statintherapie sehr effektiv zu sein, bringt aber auch mit Muskelbeschwerden häufig relevante Nebenwirkungen mit sich. Seltene, aber gravierende Nebenwirkungen wie Diabetesentwicklung und hämorrhagische Schlaganfälle wurden ebenfalls beschrieben.<sup>106</sup> Weitere LDL-senkende Medikamente sind Inhibitoren der intestinalen Cholesterinresorption (z.B. Ezetimib)<sup>107</sup> und Bempedoinsäure (hemmt die Adenosintriphosphat-(ATP)-Citrat-Lyase, die sich im Stoffwechsel oberhalb der  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-Coenzym-A-(HMG-CoA)-Reduktase befindet).<sup>108</sup> Inclisiran ist eine interferierende Ribonukleinsäure (RNA), die die PCSK9-Produktion senkt. Es hat eine lange Halbwertszeit und muss daher nur ein bis zweimal im Jahr verabreicht werden.<sup>109</sup> Neue Antidiabetika, wie SGLT2-Inhibitoren oder GLP1-Agonisten wirken zum Teil protektiv, gleichzeitig wird jedoch eine höhere Amputationsrate bei kritischer Extremitätenischämie diskutiert.<sup>110</sup>

Zur Optimierung der Gehstrecke gibt es Ansätze unter anderem mit anorganischen Nitraten, gewonnen z.B. aus Rote-Beete-Saft<sup>111</sup> und mit Antioxidantien, die u.a. in schwarzer Schokolade enthalten sind.<sup>112</sup> Kontrovers diskutiert wird eine Gehstrecken-verlängernde Wirkung des Angiotensin-Rezeptor-Blockers Telmisartan.<sup>113,114</sup> Um die inflammatorische Komponente der Atherosklerose zu adressieren, wurde eine Therapie mit dem Antikörper Canakinumab (Zielstruktur IL-1 $\beta$ ) in der CANTOS-Studie untersucht und ein positiver Effekt auf die Gehstrecke gefunden.<sup>115</sup> In Erprobung befinden sich auch weitere Antioxidantien, Ranolazine, Nitrate und Endothelin-Rezeptor-Antagonisten.<sup>68</sup>

Die aktuell verfügbaren Therapien senken zwar die Rate an Herzinfarkten und Schlaganfällen, können den Fortschritt der pAVK mit zunehmend belastender

Claudicatio-Symptomatik bis hin zum Extremitätenverlust aber nicht ausreichend aufhalten.<sup>116</sup> Deshalb gibt es Forschungsbemühungen, die Durchblutung direkt zu fördern, indem eine Bildung neuer Gefäße und Umgehungskreisläufe angeregt wird. Einerseits wird dies mittels sogenannter therapeutischer Angiogenese in Form rekombinanter Zytokin-Proteine oder Gentherapien oder als direkte Zelltherapie erprobt. Im Tiermodell konnten Erfolge erzielt werden, die jedoch bislang in randomisierten klinischen Studien nicht ausreichend belegt wurden.<sup>117–119</sup>

### **1.3 Hintergründe von Ischämie und Schmerz**

Im Rahmen der pAVK kommt es, wie auch bei anderen atherosklerotisch bedingten Erkrankungen, zu einer Minderdurchblutung von Gewebe, also einer Ischämie.<sup>120</sup>

Diese Ischämie macht sich unter anderem durch Schmerzen und eine schlechtere Funktion bis hin zum Absterben von beanspruchtem Gewebe bemerkbar.<sup>63</sup>

Die zum Beispiel durch eine Gefäßverengung ausgelöste Minderdurchblutung führt zu einem Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff im nachgeschalteten Gewebe.<sup>92</sup>

Es wird davon ausgegangen, dass der Untergang von geschädigtem Gewebe lokale periphere Nerven aktiviert (und nur in geringerem Ausmaß der Nährstoffmangel selbst).<sup>121</sup> Durch den Mangel an Sauerstoff kann nicht mehr ausreichend aerobe Zellatmung betrieben werden und es wird weniger ATP bereitgestellt.<sup>92</sup>

Die in Zellwänden vorkommende ATP-abhängige Natrium-Kalium-Pumpe kommt zum Erliegen, wodurch sich intrazellulär Natrium und Wasser anreichern und ein osmotisch bedingtes Anschwellen der Zellen bewirken.<sup>122</sup> Kommt es dann zum Einstrom von Kalzium in die Zellen, führt dies zu einer Übererregung der Zellmembran mit daraus resultierender Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).<sup>121,123</sup>

ROS schädigen Zellen, wobei sie eine extrazelluläre Azidose hervorrufen.<sup>123,124</sup> Zusätzlich zu diesem Mechanismus verstärkt durch anaerobe Zellatmung entstehendes Laktat die Azidose. Ischämischer Schmerz, wie er als typisches Merkmal der pAVK vorkommt, entsteht durch neuronale Wahrnehmung der Azidose. Die durch den zuvor beschriebenen Prozess erhöhte Konzentration an Wasserstoffionen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen aktiviert säuresensible Ionenkanäle (Familie der Natriumkanäle).<sup>121,124,125</sup>

Diese stimulieren wiederum afferente Muskelnervenfasern, die die Signale über das Rückenmark zum Thalamus weitergeben. Im zerebralen Kortex wird dies schließlich als ischämischer Schmerz wahrgenommen.<sup>126</sup> Er präsentiert sich als durch Anstrengung hervorgerufener brennender, krampfartiger Waden-

schmerz, kann in späteren Stadien aber auch schon in Ruhe einsetzen. Auch kommen Parästhesien und Taubheit vor.<sup>92,121</sup> Sichtbar wird die Ischämie durch eine violette oder blasse Verfärbung der Extremität, Kälte oder schlechte Wundheilung mit Ulkusbildung bis hin zur Nekrose.<sup>63,127</sup>

Wie oben beschrieben bleibt die pAVK jedoch häufig asymptomatisch. Weitestgehend unklar ist, warum einige Patienten so starke Schmerzen entwickeln und andere davon verschont bleiben.<sup>79,81,82</sup>

#### **1.4 Kollateralenbildung und endogene Revaskularisierung**

Mögliche Ursache der beschriebenen Symptom-Heterogenität ist eine interindividuell unterschiedliche Ausprägung der endogenen Revaskularisierung.<sup>15</sup> Aus der Forschung zur KHK ist bereits bekannt, dass manche Patienten mit besserer Kollateralenbildung trotz hochgradig atherosklerotisch veränderter Gefäße keinen Myokardinfarkt erleiden und ein besseres 5-Jahres-Überleben aufweisen.<sup>128,129</sup> Immunzellen und insbesondere Monozyten scheinen dabei eine essentielle Rolle zu spielen.<sup>130</sup>

Als Reaktion auf eine progrediente arterielle Verengung und damit einhergehende Ischämie reagiert der Organismus mit der Bildung von Umgehungskreisläufen zum Ausgleich der Blutversorgung.<sup>131,132</sup> So konnte auch im Hindlimb-Ischemia Modell gezeigt werden, dass sich nach einer durch Ligation der Femoralarterie hervorgerufenen Ischämie zahlreiche Kollateralen entwickeln.<sup>133,134</sup> Eine verstärkte Kollateralenbildung kann z.B. mithilfe der Magnet-Resonanz-Angiographie (MRA) visualisiert werden.<sup>135</sup> Mittels Messung der Arterienwanddicke und Flussbestimmung können die klinischen Veränderungen evaluiert werden.<sup>136</sup> Der ABI scheint hingegen weitgehend unabhängig von der Kollateralisierung zu sein.<sup>135</sup>

Bei der Gefäßneubildung im Rahmen der Gewebeischämie bei Atherosklerose spielt vor allem die Arteriogenese eine wichtige Rolle.<sup>133</sup> Sie bezeichnet das Aussprossen bereits perfundierter Arterien ins ischämische Gewebe hinein aufgrund einer Veränderung der shear stress (Scherbelastungs-) Verhältnisse.<sup>137-140</sup> Shear stress beschreibt dabei die Kraft pro Flächeneinheit Gefäßwand.<sup>141</sup> Kommt es zu einer Verlegung einer Arterie, so nimmt der shear stress zu. Nach aktuellem Verständnis wird dies durch im Endothelium befindliche Mechanorezeptoren registriert und durch Aktivierung bestimmter Signalkaskaden eine vermehrte Expression an Proteinen bewirkt, die an der Anlockung von Monozyten beteiligt sind.<sup>21</sup> Dies sind

unter anderem das vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1),<sup>142</sup> das monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)<sup>143,144</sup> und der transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ).<sup>141</sup> Monozyten und Entzündungszellen haften zunächst am Endothel, dringen dann weiter in die extrazelluläre Matrix ein und differenzieren sich schließlich zu Makrophagen.<sup>145,146</sup> Diese schütten proinflammatorische Zytokine (z.B. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ )), Wachstumsfaktoren und Matrixmetalloproteinasen aus. Daraufhin proliferieren glatte Gefäßmuskelzellen, der Durchmesser und die Funktionalität des Gefäßes nehmen zu und der shear stress sinkt folglich. Resultierend werden vorerst keine weiteren Kollateralen gebildet.<sup>141,147</sup>

Andere Mechanismen der Gefäßaussprossung und -neubildung sind Angiogenese und Vaskulogenese. Die Angiogenese bezeichnet die Proliferation von Endothelzellen am Ort der Ischämie, welche sich über primitive Röhren schließlich zu Gefäßen weiterentwickeln.<sup>148</sup> Daraufhin wandern glatte Muskelzellen ein und formen schließlich Arterien.<sup>143</sup> Dieser Prozess wird durch den Hypoxie-induzierten Faktor 1 (HIF-1) ausgelöst, durch endotheliale Wachstumsfaktoren angetrieben und kann mittels Gehtraining verstärkt werden.<sup>127,149</sup> Durch die exogene Zufuhr von Wachstumsfaktoren konnte im Tiermodell eine verbesserte Durchblutung erreicht werden, in klinischen Studien blieb dieser Effekt jedoch bislang aus.<sup>116</sup> Im Rahmen der Vaskulogenese spielen hämatopoetische und endotheliale Stammzellen eine große Rolle.<sup>137</sup> Stimulierende Faktoren wie G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) und GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor) führen zur Mobilisierung von insbesondere hämatopoetischen angiogenen Zellen aus dem Knochenmark. Diese werden unter Einfluss von Zytokinen in das ischämische Gewebe aufgenommen und sezernieren selbst wiederum Zytokine und Metalloproteinasen zur Gefäßneubildung bzw. können sich auch selbst zu reifen Endothelzellen differenzieren.<sup>150,151</sup> Diese Prozesse sind stark beeinflusst durch immunologische Modulation. Ein Zusammenspiel aller drei Mechanismen ist entscheidend.<sup>132,152</sup>

Eine optimale Kollateralenentwicklung ist offenbar möglich, wenn einerseits erhöhter shear stress<sup>140</sup> und andererseits die Anlockung von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark stattfinden.<sup>130,153</sup> Zahlreiche Autoren kommen jedoch zu dem Schluss, dass das Wissen über molekulare Mechanismen der Kollateralisierung noch zu limitiert ist. Die Übertragbarkeit von Tiermodellen, in denen häufig eine akute Ischämie produziert wird, auf die chronisch progrediente Verengungssituation im Menschen ist dabei bislang eine entscheidende Schwachstelle.<sup>116,154</sup>

Wie gut ein bestimmter Patient nun Kollateralen bildet, ist für die klinische Risikostratifizierung sowie für neue Therapieansätze äußerst relevant<sup>155</sup>, aber noch nicht gut erforscht.<sup>154</sup> In Studien zur therapeutischen Angiogenese, also einer Stimulation zur Kollateralenbildung, wurden endotheliale Wachstumsfaktoren, wie der vaso-endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)<sup>156</sup>, Immunzell-stimulierende Faktoren wie z.B. GM-CSF<sup>157</sup> oder auch reife Zellen des Immunsystems (z.B. Makrophagen) ins ischämische Gewebe eingebracht.<sup>154</sup> Im Rahmen von Gentherapien führte das Einbringen nichtkodierender RNA (Mikro-RNA oder lange, nicht-kodierende RNA) im Tiermodell zur Modulierung der Gefäßneubildung und bewirkte eine verstärkte Durchblutung mit zügigerer Wiederherstellung der Beinfunktion.<sup>116,154</sup>

### **1.5 Myeloide Zellen**

Für das bessere Verständnis der Kollateralenbildung scheinen also insbesondere myeloide Zellen und darunter vor allem Monozyten von Bedeutung zu sein. Um herauszufinden, ob Mechanismen der Kollateralenbildung dabei eine Rolle spielen, dass der Phänotyp der pAVK zwischen asymptomatisch und symptomatisch so unterschiedlich sein kann, ist also eine Messung von Monozyten zielführend.

Als myeloide Zellen (von griechisch „myelodes“ = markähnlich)<sup>17</sup> werden Zellen des blutbildenden Systems bezeichnet, die aus einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle entstanden sind und nicht dem lymphatischen System angehören.<sup>158</sup> Diese oligopotenten myeloischen Stammzellen, auch common myeloid progenitors (CMP), befinden sich vorwiegend in spezialisierten Mikroumgebungen des Knochenmarks und differenzieren sich zu koloniebildenden Einheiten (CFU) und schließlich zu reifen myeloiden Zellen.<sup>159</sup> Zu den myeloiden Zellen gehören Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, Mastzellen, Thrombozyten, Erythrozyten und alle ihre Vorläuferzellen.<sup>160,161</sup> Die Differenzierung von reifen myeloischen Zellen aus myeloiden Vorläuferzellen wird durch Wachstumsfaktoren wie Zytokine (Interleukin-(IL)-3, IL-6, IL-11) und Stammzellfaktor (SCF) reguliert.<sup>162</sup> In neuer Literatur wird jedoch die strikte Trennung der lymphatischen und myeloischen Zelllinien wie auch der Zeitpunkt der Spezialisierung und deren Steuerungsmechanismen in Frage gestellt.<sup>163,164</sup>

Myeloide Zellen und ihre Produkte haben dementsprechend eine Vielzahl von Funktionen. Sie reifen per Erythropoese, Thrombopoese, Granulopoese bzw. Monopoese aus<sup>165</sup> und sind daraufhin z.B. beteiligt an der Blutgerinnung und -homöostase,

an vielfältigen immunologischen Prozessen<sup>166</sup> und auch an Gewebshomöostase und -umbau.<sup>167</sup>

### 1.5.1 Überblick über die Familie der myeloiden Zellen

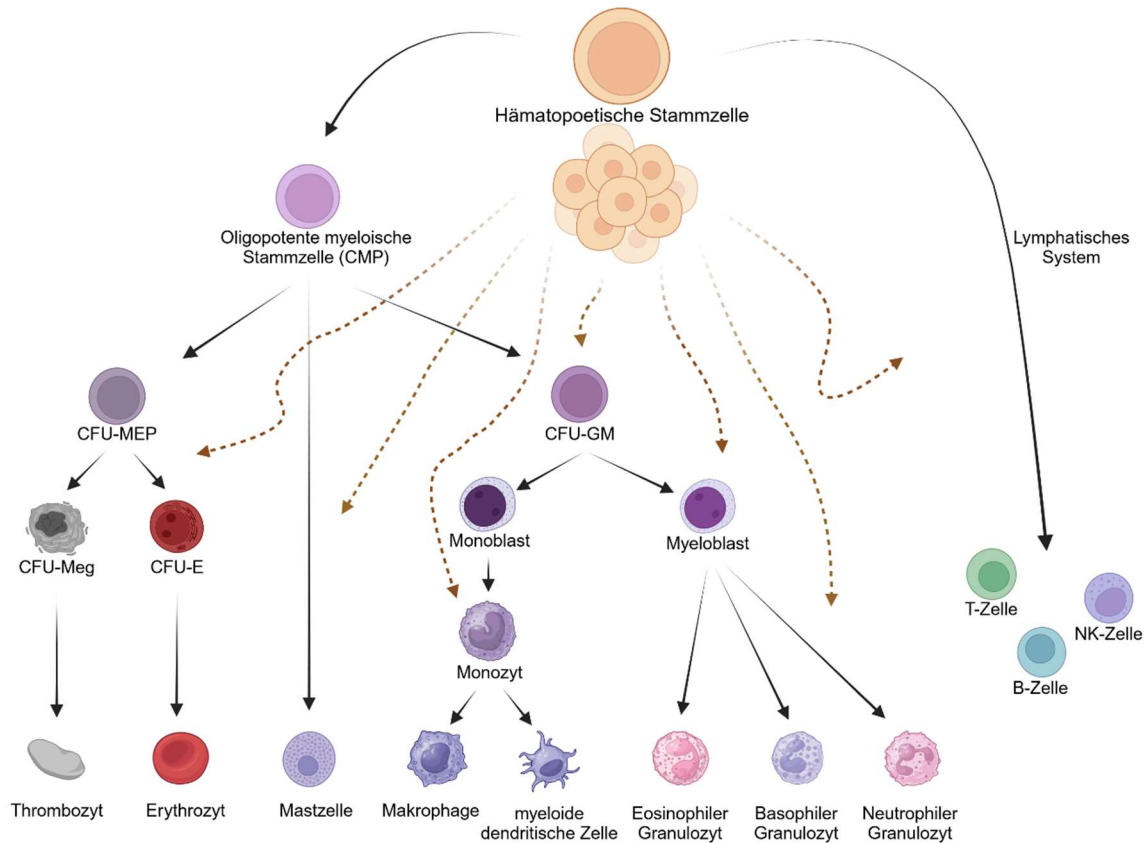


Abbildung 1: Differenzierung myeloider Zellen. CMP = common myeloid progenitor; oligopotent myeloische Stammzelle, CFU = colony-forming unit; koloniebildende Einheit, MEP = Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor, GM = bipotente hämatopoetische Stammzelle, Meg = Megakaryozyt, E = Erythrozyt, NK-Zelle = natürliche Killerzelle. Erstellt mit biorender.com.

### 1.5.2 Monozyten und Makrophagen

Monozyten beschreiben eine heterogene Zellgruppe mit verschiedenen Phänotypen, Funktionen und Bewegungsmustern.<sup>168</sup> Neben der Hämatopoese und Reservoirbildung im Knochenmark scheint der Körper auch eine Fähigkeit zur Bildung von Monozyten in der Milz und Speicherung in z.B. Milz, Lunge und Haut zu besitzen.<sup>168,169</sup> Histomorphologisch gehören Monozyten als mononukleäre Zellen mit nierenförmigem Kern zu den weißen Blutkörperchen (Leukozyten)<sup>170</sup> und machen 10% aller im Blut zirkulierenden Leukozyten aus.<sup>165,170</sup> Sie können frei im Blut zirkulieren sowie in Gewebe einwandern.<sup>171,172</sup> Monozyten sind fähig, sich in Makrophagen oder dendritische Zellen zu differenzieren, erfüllen aber auch ohne Umwandlung eigenständig Aufgaben.<sup>145</sup> Sie sind an der Entstehung und Beendigung

lokaler Entzündungsprozesse beteiligt, haben eine Wirkung im Rahmen des angeborenen Immunsystems (u.a. Anlockung von Granulozyten) und sind Bestandteil des mononukleären Phagozytensystems als besonders mobile Zellen zusammen mit dendritischen Zellen und Makrophagen.<sup>173</sup> Im Hinblick auf die Atherosklerose spielen Monozyten bei der Plaqueentwicklung, Endothelüberwachung und Gefäßneubildung eine wichtige Rolle.<sup>143,146,174–178</sup>

Nach aktuellem Kenntnisstand können Monozyten anhand der Expression ihrer Oberflächenmarker CD14 und CD16 in drei Gruppen aufgeteilt werden: klassische Monozyten (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>) mit einem Anteil von etwa 80-90%, sowie intermediäre (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>) und nicht-klassische Monozyten (CD14<sup>-</sup>, CD16<sup>++</sup>), gemeinsam etwa 10-20% aller Monozyten.<sup>168,171,179</sup> CD14 ist ein Ko-Rezeptor für Toll-like-Rezeptoren und damit u.a. an der Aufnahme von Lipopolysacchariden beteiligt<sup>180</sup> und CD16 ist ein IgG-Rezeptor.<sup>181</sup> Während klassische Monozyten durchschnittlich nur einen Tag im Blut überleben, haben nicht-klassische Monozyten eine Lebensdauer von etwa sieben Tagen.<sup>130</sup> Eine noch genauere Unterscheidung der drei klassischen Subgruppen gelingt unter Zuhilfenahme der Oberflächenmarker CCR2, CD36, HLA-DR und CD11c. Intermediäre Monozyten können von klassischen Monozyten durch erhöhte Expression von CD16, HLA-DR und CD11c abgegrenzt werden. Im Vergleich zu nicht-klassischen Monozyten weisen intermediäre Monozyten erhöhte Werte an CD14, CCR2 und CD36 auf. Auch werden Versuchsprotokolle durch diese zusätzlichen Marker reproduzierbarer.<sup>182</sup> Weitere Unterscheidungsmerkmale werden aktuell zahlreich erforscht.<sup>183</sup>

Klassische Monozyten als größte Gruppe der Monozyten<sup>179</sup> sind an der Gewebereparatur, Immunantwort und Entzündungsreaktion (Phagozytose, Ausschüttung pro-inflammatorischer Proteine) beteiligt.<sup>183</sup>

Intermediäre Monozyten haben einen Anteil von etwa 5% an allen Monozyten im Gesunden.<sup>179</sup> Sie sind beteiligt an der Proliferation und Stimulierung von T-Zellen, MHC-II-Verarbeitung und Genpräsentation, der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und spielen eine Rolle bei der Angiogenese.<sup>179</sup> Die Zellen scheinen das Endothel kontinuierlich zu überwachen, um im Falle einer Entzündung oder Gefäßverletzung schnell einzuwandern.<sup>176,179</sup>

Nicht-klassische Monozyten belaufen sich auf circa 10% aller Monozyten im Gesunden.<sup>179</sup> Sie sind beteiligt an der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung,<sup>179,184</sup> der Kontrolle der Endothelintegrität, Erkennung von Viren und der Endothelmigration.<sup>183</sup>

Im Falle einer „Notfall-Hämatopoese“ zum Beispiel bei akuter Entzündung können Monozyten ohne die o.g. Vorstufen direkt aus der Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzelle entstehen.<sup>185</sup> Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  sind an dieser akuten Stammzellaktivierung beteiligt.<sup>186</sup> Die Monozytenzahl kann hierdurch schnell stark gesteigert werden und die Zellen weisen z.T. andere, für die akute Situation praktikable Eigenschaften auf.<sup>168</sup> Dies kann zu epigenetischen Langzeitveränderungen führen und so z.B. eine erhöhte Monozytenzahl auch bei wiederhergestellter Homöostase noch nachweisbar sein.<sup>168</sup>

Je nach Erkrankung können die Zellzahlen jeweiliger Monozytensubgruppen stark variieren.<sup>183</sup> So konnten in früheren Forschungsarbeiten Größenänderungen der intermediären Monozytensubpopulation bei Herzinsuffizienz, Nieren-, Gefäß- und Autoimmunerkrankungen festgestellt werden<sup>187–193</sup> und aus der Populationsgröße die Mortalität unabhängig vorhergesagt werden.<sup>128</sup> Bei der KHK hingegen wurde eine Vergrößerung der nicht-klassischen Monozytensubpopulation beobachtet.<sup>193</sup> Auch wurde eine Beteiligung von Monozyten an der Karzinogenese und neurodegenerativen Erkrankungen festgestellt.<sup>194,195</sup> Modell vieler dieser Studien waren jedoch Mäuse, womit eine Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus überprüft werden muss.

#### **1.5.2.1 Rolle von Monozyten und Makrophagen bei Plaquebildung und Revaskularisierung**

Im Rahmen der Bildung atherosklerotischer Plaques und deren Blutversorgung durch neu gebildete Gefäßstränge (Neovaskularisierung) sind Monozyten und sich daraus bildende Makrophagen äußerst relevant.<sup>196,197</sup> Während der Plaqueentstehung werden sie durch Chemokine, die vom aktivierten Endothel sezerniert wurden, angelockt. Monozyten mit den Oberflächenrezeptoren Chemokin-Rezeptor 2 (CCR2) und CX3C-Motiv-Chemokinrezeptor 1 (CX3CR1) wirken dabei förderlich auf die Plaqueprogression.<sup>198,199</sup> Nach Einwanderung in die subendotheliale Matrix erfolgt die Aufnahme von Lipiden, sodass sich Schaumzellen formieren.<sup>25</sup> Zusätzlich phagozytieren Monozyten bzw. daraus differenzierte Makrophagen u.a. oxidierte Blutfette, induzieren eine Entzündung, den Zelltod und eine Antwort des angeborenen Immunsystems.<sup>200,201</sup> Verschiedene Monozytensubtypen bzw. Makrophagen können dabei unterschiedliche Aufgaben übernehmen.<sup>197,201</sup> So haben Studien z.B. gezeigt, dass nicht-klassische Monozyten, die vermutlich für die Beseitigung apoptotischer Zellen aus dem nekrotischen Plaquekern verantwortlich

sind und zumindest bei KHK protektiv wirken, gehäuft bei Atherosklerose vorkommen.<sup>177</sup> Intermediäre Monozyten scheinen negativ mit der Atheroskleroseausbreitung (hier Intima-Media-Dicke)<sup>202</sup> zusammen zu hängen. Klassische Monozyten korrelierten hingegen mit kardiovaskulären Ereignissen.<sup>202</sup> In der frühen Phase der Plaqueentwicklung könnten so durch CCL2 vermehrt klassische Monozyten angelockt werden, während später durch den nekrotischen Kern eher nicht-klassische Monozyten eine übergeordnete Rolle spielen.<sup>177,178</sup> Die genauen Mechanismen auf Rezeptorebene müssen jedoch weiter untersucht werden.

Aus Monozyten entwickelte Makrophagen und dendritische Zellen tragen ebenfalls zur Plaquebildung bei und können zusätzlich die fibröse Plaquekappe kalzifizieren.<sup>197</sup> Zudem werden inflammatorische Monozyten, die sich zu M2-Makrophagen umwandeln, offenbar zum Rückgang der atherosklerotischen Entzündung sowie zur Verkleinerung atherosklerotischer Plaques benötigt.<sup>203</sup>

Monozyten und sich daraus entwickelnde Makrophagen sind aber nicht nur an der Bildung atherosklerotischer Plaques beteiligt, sondern spielen auch bei der Bildung neuer Gefäße, der Neovaskularisierung, eine entscheidende Rolle.<sup>204</sup> Im Rahmen atherosklerotischer Veränderungen kommt es zunächst zu einer Verdickung der Intima, also der innersten Gefäßwandschicht.<sup>205</sup> Die lipidreiche atherosklerotische Plaque nimmt an Größe zu und kann im Inneren nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Diese Hypoxie fördert über eine vermehrte Ausschüttung von Botenstoffen die Angiogenese<sup>206,207</sup> (siehe Kapitel 1.4). Die Neovaskularisierung findet allerdings zum Teil bereits vor der Plaqueentwicklung statt,<sup>208</sup> weshalb eine Stimulation zur Gefäßneubildung durch die lokale Entzündungsreaktion selbst ebenfalls wichtig zu sein scheint.<sup>137</sup> Die Bildung von Kollateralen auch abseits der atherosklerotischen Plaque wird maßgeblich durch Entzündungsprozesse beeinflusst, an denen Monozyten teilhaben.<sup>16</sup> Sie werden durch das monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) in die arterielle Zellwand gelockt, wie schon Ito et al. 1997 im Rattenmodell herausfanden.<sup>144</sup> Bei MCP-1 knockout, also verminderter Fähigkeit zur Monozytenanlockung, wurde im Tiermodell eine deutlich verminderte Kollateralisierung festgestellt.<sup>199</sup> Auch bei verminderter Monozytenzahl konnte eine verlangsamte Kollateralisierung gezeigt werden.<sup>143,209</sup> Faktoren wie die Zunahme von Fluid shear stress und chemische Botenstoffe wie EphrinB2 und Vasodilator-stimulierendes Phosphoprotein beeinflussen die Monozytenrekrutierung und somit die Atherosklerose- und Kollateralenentwicklung.<sup>16</sup> In neu

angelegten Kollateralen konnten im Rahmen von Hindlimb-ischemia-Modellen Monozytenansammlungen bzw. deren proangiogene Wirkung nachgewiesen werden.<sup>199,210</sup> Kürzlich wurden zahlreiche epigenetische Veränderungen von Monozyten nach Ischämietraining gefunden, die zu einer verbesserten Arteriogenese führen.<sup>210</sup>

Wie zuvor beschrieben können Monozyten und Makrophagen eine Reihe von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Metalloproteinasen und vasoaktiven Substanzen produzieren und somit Gefäßwachstum und Arteriogenese vorantreiben. Ihr Potenzial zur Umwandlung in Endothelzellen scheint hingegen nicht ausschlaggebend für die proangiogene Wirkung zu sein.<sup>120,211</sup>

## **1.6 Ziel der Studie**

Ziel dieser Arbeit im Rahmen der LUERPAD-IMMUNO-Studie (LUEbeck Registry of Peripheral Artery Disease patients – characterisation of the patient's IMMUNologic profile) ist es, ein besseres molekulares Verständnis der klinischen Heterogenität pAVK-Erkrankter zu erlangen. Studien haben belegt, dass ein großer Teil an Patienten mit hochgradiger Stenosierung der Beinarterien keine Symptome hat und auch keine Zeichen der Gewebeischämie wie z.B. Hautnekrosen aufweist.<sup>81,82</sup> Mechanismen der Kollateralenbildung werden für die unterschiedliche Symptomausprägung verantwortlich gemacht<sup>15</sup> und myeloide Zellen wiederum modulieren möglicherweise diese Kollateralisierung.<sup>16</sup> Um nun immunologische Unterschiede asymptomatischer und symptomatischer pAVK-Patienten zu identifizieren, wurden Monozyten und relevante Oberflächenmarker dieser gemessen und mit einer Reihe klinischer Daten in Beziehung gesetzt. Es wurde ein translationaler Ansatz gewählt, um die Immuncharakterisierung möglichst realistisch zu ermöglichen. Ein Langzeit-Ziel dieser Forschungsrichtung soll es sein, neue Therapiestrategien zur Anpassung an atherosklerotische Gefäßverengungen und -verschlüsse zu entwickeln, um Patienten ein weniger eingeschränktes Leben zu ermöglichen, die Lebensqualität zu erhöhen und das Mortalitätsrisiko zu senken.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Die LUERPAD-IMMUNO-Studie wurde prospektiv, monozentrisch und unverblindet als Registerstudie angelegt. Daten wurden auf dem Kliniklaufwerk der Medizinischen Klinik II (UKSH Lübeck) sowie anonymisiert auf dem Laufwerk der kardi-immunologischen Forschungsgruppe gespeichert.

### **2.2 Ethikvotum**

Die LUERPAD-IMMUNO-Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck am 15. Januar 2020 genehmigt (Aktenzeichen 19-403). Sie ist konform mit den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki von 1964 und Ihrer letzten Revision von 2013 sowie dem STROBE Statement.<sup>212</sup> Die Patienten wurden eingehend über Inhalt und Ablauf der Studie informiert. Sie konnten die Teilnahme zu jeder Zeit ohne negative Konsequenzen abbrechen. Eine schriftliche Einwilligung aller eingeschlossenen Patienten lag vor.

### **2.3 Screening**

Für das Screening wurden Patienten mit bekannter Atherosklerose (Koronare Herz-erkrankung (KHK), Karotisstenose, Nierenarterienstenose u.a.) anhand von Arzt-briefen und Befunden identifiziert. Dafür wurden im Zeitraum von August 2020 bis Februar 2022 am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) Campus Lübeck etwa 4000 Patientenakten gesichtet. Patienten mit Diabetes mellitus, Autoimmun-erkrankungen, dialysepflichtiger Niereninsuffizienz, akutem Koronarsyndrom, Hepatitis-/HIV-Infektion, immunmodulatorischen Therapien, vorheriger Organtrans-plantation oder aktiver Krebstherapie in den letzten zwei Jahren wurden dabei von vornherein ausgeschlossen (Ausschlusskriterien). Da bei Patienten, die die Ein-schlusskriterien erfüllten, gehäuft ein Diabetes mellitus vorlag, stellte dies den häufigsten Ausschlussgrund dar.

Die Patienten wurden im stationären Umfeld aufgesucht, über die Studie aufgeklärt, nach pAVK-Symptomen und Begleiterkrankungen befragt und schließlich einer ABI-Messung unterzogen. Dazu diente ein ABI-Messsystem (BOSCH + SOHN GmbH u. Co. KG., Jungingen, Deutschland) bestehend aus Messgerät, Blutdruck-manschetten und einem mit der Software boso profil-manager XD ausgestatteten Laptop. Die Blutdruckmanschetten wurden an alle vier Extremitäten zeitgleich an-gelegt. Das Messsystem erfasste automatisiert Blutdruck, Puls und Pulswellen-

geschwindigkeit und berechnete den ABI. Bei auffälligen ABI-Werten wurden die Patienten darauf angesprochen, ob sie einem Einschluss in die Studie und damit einer Blutentnahme zustimmten.

#### **2.4 Verifizierung der pAVK-Diagnose durch einen unabhängigen Untersucher**

Patienten mit der Bereitschaft zur weiteren Studienteilnahme und auffälligen ABI-Werten (Definition siehe Kapitel 1.2.6: „Diagnostik der pAVK“) wurden zur Bestätigung der Diagnose pAVK einer manuellen Verschlussdruckmessung unterzogen, um etwaige Messungenauigkeiten zu berücksichtigen. Eine Divergenz der ABI-Werte beider Untersuchungstechniken war dabei nicht selten. Deshalb wurde zur Optimierung der Sensitivität der Grenzwert 1,0 für die automatische Messung festgelegt. Ziel war es im Folgenden, den Einschluss falsch-positiver Patienten zu minimieren im Sinne eines Vier-Augen-Prinzips. Konnte in der angiologischen Abteilung die Diagnose einer pAVK bestätigt werden, wurden die Patienten definitiv in die Studie eingeschlossen. Mit 0,9 wurde ein konservativer Grenzwert für den endgültigen Studieneinschluss gewählt, um die Rate falsch-positiver pAVK-Diagnosen zu minimieren. Folgender Flow-chart verdeutlicht die hierdurch erreichte genaue Patientenselektion zur Detektion von Patienten mit asymptomatischer pAVK.

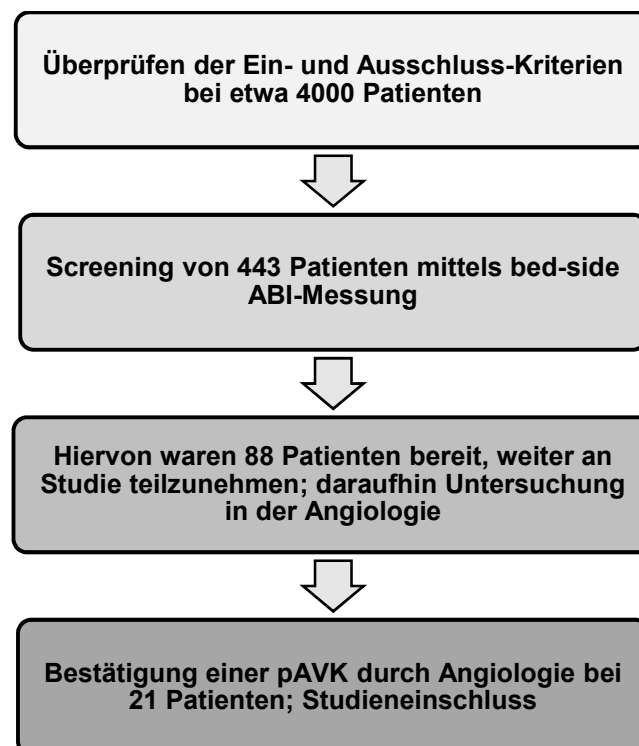


Abbildung 2: Flussschema zur Veranschaulichung der Patientenakquisition asymptomatischer Patienten.

## **2.5 Vorgehen bei Studieneinschluss**

Durch die angiologische Abteilung bestätigte Patienten wurden über den weiteren Studienablauf und datenschutzrechtliche Aspekte aufgeklärt. Sofern keine Operation, Intervention oder ein akutes infektiöses Geschehen vorlag erfolgte die Visite bei „Baseline“.

### **2.5.1 Baselinevisite-Fragebogen / Erheben von Vordiagnosen**

Nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis des jeweiligen Patienten erfolgte im Rahmen der Baselinevisite eine strukturierte Befragung zu Vorerkrankungen, Komorbiditäten, aktueller Medikation und zusätzlichen Untersuchungen sowie die Erhebung aktueller relevanter Laborparameter (siehe Anhang). Dies sollte einer genaueren Charakterisierung der Patientenpopulation und der Identifikation möglicher korrelierender Erkrankungen oder Laborparameter dienen.

### **2.5.2 Klinische Untersuchung**

Die Patienten wurden klinisch auf das Vorliegen typischer pAVK-assoziierter Befunde wie z.B. veränderter Leisten-, Popliteal- und Fußpulse, Rekapillarierungszeiten, trophische Störungen oder kalte oder blasse Beine untersucht. In der angiologischen Abteilung wurde eine Duplexsonographie durchgeführt, bei der Flussprofile der Aa. femorales communes und superficiales, Aa. popliteae, Aa. tibiales posteriores und Aa. dorsales pedes erfasst wurden. Auch wurden arterielle Stenosen oder Verschlüsse dokumentiert.

### **2.5.3 Fragebogen zur Charakterisierung der pAVK-Symptomatik**

Um die Diagnose der asymptomatischen pAVK systematisch zu sichern, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein pAVK-Fragebogen entwickelt und angewendet, angelehnt an Studienergebnisse von Rose et. al. (The diagnosis of ischaemic heart pain and intermittent claudication in field surveys, Rose, 1962) und an den San Diego Questionnaire.<sup>214</sup> Dieser erfasst die jeweilige Symptomatik (schmerzfreies Gehen, weitere Symptome einer peripheren Durchblutungsstörung) des Patienten (siehe Anhang). Die Angaben wurden schließlich als Score verwendet, indem für jede pAVK-typische Symptomatik ein Punkt angerechnet wurde.

#### **2.5.4 Verifizierung des pAVK-Stadiums mittels 6-Minuten-Gehtest**

Die pAVK wird nach Fontaine klinisch anhand der schmerzfreien Gehstrecke klassifiziert.<sup>86</sup> Patienten mit asymptomatischer pAVK sind dadurch gekennzeichnet, dass sie, wie bereits oben beschrieben, keine Einschränkung ihrer Gehstrecke aufgrund von pAVK-Symptomen (z.B. Beinschmerzen) aufweisen. Um dies zu bestätigen wurde mit jedem Patienten ein 6-Minuten-Gehtest absolviert. Hierbei wurden die Atemnot vor und nach Belastung, die gefühlte Anstrengung, die gesamte Gehstrecke sowie die schmerzfreie Gehstrecke erfasst. Während des Gehens aufgetretene Symptome wurden dokumentiert. Bei einigen Patienten der asymptomatischen Gruppe war die Gehstrecke durch Herzinsuffizienzsymptome eingeschränkt. Dies wurde durch die Begleitung des 6-Minuten-Gehtests mittels spezifischer Fragen erfasst und konnte so differenziert werden. Ein auffälliger 6-Minuten-Gehtest im Sinne dieser Studie stellte demnach nur einer dar, bei dem die Patienten das Gehen aufgrund von typischen pAVK-Symptomen unterbrechen mussten.

#### **2.5.5 Beurteilung der subjektiven Lebensqualität mittels EQ5D-Fragebogen**

Um auch einen Blick auf mögliche Veränderungen der Lebensqualität zu werfen, wurde der EQ5D-Bogen herangezogen. Dieser Fragebogen wurde von einer internationalen, multidisziplinären Forschungsgruppe entwickelt und erfasst anhand der fünf Dimensionen Mobilität, Selbstfürsorge, übliche Aktivität, Schmerzen und Angst/Depression die individuelle Lebensqualität. Zusätzlich soll der Patient seinen derzeitigen Gesundheitszustand auf einer Skala von null bis einhundert Prozent einschätzen. Einhundert Prozent entspricht dabei dem besten vorstellbaren Gesundheitszustand.<sup>215</sup> Diese Daten wurden sowohl bei Studieneinschluss als auch beim Follow-up erhoben.

Die Ergebnisse des Fragebogens zur Lebensqualität (EQ5D-3L) wurden einerseits deskriptiv dargestellt. Andererseits erfolgte die Berechnung des „EQ5D“-Indexes nach der durch Greiner et al.<sup>216</sup> beschriebenen Formel:

$$Y = a + \beta_1MO + \beta_2SC + \beta_4PD + \beta_6M2 + \beta_9P2 + \beta_{10}A2 + \beta_{11}N3$$

Dabei steht „Y“ für den patientenindividuellen Index, „a“ für den „Interception“ genannten und regelhaft eingebrachten Faktor 0,999, „β“ für die pro Kategorie erhobene Patienteneinschätzung, und die Großbuchstaben für die verschiedenen Kategorien („MO“ = mobility, „SC“ = self care, „PD“ = pain/discomfort, „A“ = anxiety).

„M2“, „P2“ und „A2“ wurden jeweils gleich 1 gesetzt, sobald der Patient extreme Probleme in diesem Bereich angab, ansonsten gingen sie mit dem Wert 0 in die Rechnung ein. Zusätzlich wurde „N3“ gleich 1 gesetzt, wenn bei mindestens einer der Kategorien extreme Probleme angegeben worden waren, sonst =0.

### **2.5.6 Erfassung von Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten**

Ein weiterer Patientenfragebogen erfasste das allgemeine Gesundheitsverhalten der Patienten und wurde anhand der Kurzform des international physical activity questionnaire (IPAQ)-Fragebogens entwickelt. Der Patient sollte die Dauer seiner milden, moderaten und anstrengenden Aktivitäten in Tagen pro Woche und Stunden pro Tag angeben. Dazu wurden den Patienten Beispiele für die jeweiligen Aktivitätskategorien genannt. (Z.B.: milde Aktivität entspricht langsamem Gehen, moderate Aktivität entspricht Gartenarbeit und Putzen, anstrengende Aktivität entspricht dem Heben schwerer Objekte oder anstrengendem Sport).<sup>217</sup>

## **2.6 Blutentnahme und Matching von symptomatischen Patienten**

Wie in der Einleitung erläutert, sollte im Rahmen dieser Studie untersucht werden, ob die Ausbildung einer asymptomatischen pAVK mit einem spezifischen immunologischen Phänotyp assoziiert ist. Da für diese Frage möglicherweise diejenigen Faktoren und Zellen eine Rolle spielen, welche die Gefäßbildung und damit die Bildung von Kollateralkreisläufen beeinflussen, wurde hierbei auf die Untersuchung von Monozyten im Blut der Fokus gelegt. Bei Einschluss erfolgte die Abnahme von Blutproben (siehe Anhang). Die Leukozytenkonzentration wurde mittels Hämozytometer (Sysmex, Norderstedt, Deutschland) bestimmt.

Um eine optimale Aussagekraft der Studie zu gewährleisten, wurde ein Matching der Patienten mit symptomatischer pAVK, welche leichter für eine Rekrutierung zugänglich sind, durchgeführt. Geeignete symptomatische Patienten wurden dafür vorwiegend aus dem Patientenpool bevorstehender perkutaner transluminaler Angioplastien (PTAs) der Becken- und Beingefäße identifiziert. Es wurden asymptomatische und symptomatische Patienten anhand ihres Alters und Geschlechts gematcht. Nach schriftlichem Einverständnis erfolgte die Daten- und Probenasservierung gemäß dem oben beschriebenen Ablauf noch vor der angiologischen Intervention.

## **2.7 Fluorescence activated cell sorting-(FACS): Durchflusszytometrische Messung der Monozyten**

Um die Patienten immunologisch zu charakterisieren, wurde das abgenommene Blut zur Messung von Monozyten aufbereitet.

### **2.7.1 Panel-Erstellung**

Die Fluorochrom-gebundenen Antikörper wurden im Vorhinein titriert, um die beste Konzentration zur Unterscheidung negativer und positiver Populationen zu finden. Hierzu half der Stain-Index. Dieser dient zur Abschätzung der relativen Fluoreszenzintensität eines Fluorochroms. Die Berechnung des Stain-Indexes erfolgte gemäß folgender Formel:  $(\text{MFI pos.} - \text{MFI neg.}) / (2 \times \text{SD neg.})$ . Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität der negativen Population (MFI neg.) wurde vom Mittelwert der Fluoreszenzintensität der positiven Population (MFI pos.) subtrahiert und anschließend durch die zweifache Standardabweichung der negativen Population dividiert.<sup>218</sup>

Zusätzlich zu den asymptomatischen und symptomatischen pAVK-Patienten wurde Blut von zwölf gesunden Kontrollprobanden abgenommen und per Durchflusszytometrie analysiert. Dies diente zur Überprüfung des Antikörper-Panels.

### **2.7.2 Probenvorbereitung und Färbung für die Durchflusszytometrie**

Zunächst wurde für zwei verschiedene Panel je ein sogenannter Mastermix, bestehend aus zwölf verschiedenen, charakterisierenden Antikörpern angesetzt. Diese wurden zur klaren Identifizierung von Monozytensubpopulationen verwendet. Zusätzlich wurden Oberflächenmarker gemessen, die laut aktueller Literatur für die Revaskularisation von besonderer Bedeutung sind. Die Funktionen einzelner Antikörper werden im Verlauf erläutert. Die Antikörperbezeichnungen und ihre jeweiligen Konzentrationen sind der folgenden Abbildung zu entnehmen. Hersteller und Bezugsquelle siehe Anhang.

Verwendetes Antikörper-Panel zur Charakterisierung von Immunzellen						
Fluorophor	Panel 1	Bestellnr.	Konzentration	Panel 2	Bestellnr.	Konzentration
FITC	CD16 cl. 3G8	302006	1:50	CD16 cl. 3G8	302006	1:40
PerCP/Cy5.5	HLA-DR cl. L243	307630	1:30	HLA-DR cl. L243	307630	1:30
APC / Alexa 647	CD191 cl. 5F10B29	362908	1:40	CD202b cl. 33.1	334209	1:20
Alexa700	CD66b cl. G10F5	305114	1:50	CD66b cl. G10F5	305114	1:50
	CD3 cl. OKT3	317340	1:100	CD3 cl. OKT3	317340	1:100
	CD56 cl. 5.1H11	362522	1:100	CD56 cl. 5.1H11	362522	1:100
	CD19 cl. HIB19	302226	1:100	CD19 cl. HIB19	302226	1:100
APC-Cy7	Zombie NIR	305126	1:100	Zombie NIR	305126	1:100
BV421	CD192 cl. K036C2	357210	1:30	CD192 cl. K036C2	357210	1:30
BV510	CD45 cl. 2D1	368526	1:20	CD45 cl. 2D1	368526	1:20
BV605	CD163 cl. GHI/61	333616	1:20	CD40 cl. 5C3	334336	1:40
BV650	CD14 cl. M5E2	301836	1:30	CD14 cl. M5E2	301836	1:30
PE	CX3CR1 cl. 2A9-1	341604	1:70	CCR5 cl. J418F1	359106	1:20
PE-TR/PE-Dazzle594	CD11c cl. Bu15	337228	1:80	CD11c cl. Bu15	337228	1:80
PE-Cy5.5						
PE-Cy7	CD36 cl. 5-271	336222	1:20	CD36 cl. 5-271	336222	1:20

Tabelle 2: Verwendetes Antikörper-Panel zur Charakterisierung von Immunzellen. Angabe der jeweiligen Fluorophore mit Farbspektrum, Antikörpern, der Bestellnummern sowie deren Konzentration. In Panel zwei wurden die Antikörper CD191, CD163 und CX3CR1 durch CD202b, CD40 und CCR5 ersetzt. Die Antikörper wurden von BioLegend, San Diego, USA bezogen.

Das entnommene Patientenblut (9 ml, EDTA-Monovette) wurde auf  $3 \times 10^3$  Leukozyten / $\mu$ l mittels PBS-Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung) verdünnt. Dann wurden je 300  $\mu$ l verdünntes Vollblut in die mit Panelbezeichnung oder Einzelantikörper beschrifteten FACS-Tubes pipettiert.

Um tote Zellen anzufärben, wurde zu den voll zu färbenden Proben (P1.1-1.3, P2.1-2.3) Zombie NIR (BioLegend, San Diego, USA) hinzugegeben und zehn Minuten inkubiert.

Für die Kompensation der Zombie-Probe wurden 50  $\mu$ l verdünntes Blut und 150  $\mu$ l PBS für fünf Minuten bei 60°C erhitzt, um Zellen sicher abzutöten, die im Folgenden durch Zombie NIR angefärbt wurden. Die Probe kühlte ab, woraufhin die Zugabe von 100  $\mu$ l verdünntem Blut (Konz.  $3 \times 10^3$  / $\mu$ l) erfolgte. Dann wurde die Kompensationsprobe mit 3  $\mu$ l Zombie NIR angefärbt.

Zur Unstained-Probe (Kontrollprobe, ungefärbt) wurden 100  $\mu$ l FACS-Puffer hinzugefügt, zu je drei Proben für Panel 1 und 2 je 100  $\mu$ l Mastermix. Für Einzelfärbungen, die der Kompensation dienten, wurde jeweils ein Antikörper zu 300  $\mu$ l verdünntem Blut pipettiert. Alle Proben wurden durch Vortexen gemischt. Für 30 Minuten inkubierten die Proben bei 4°C in der Dunkelheit.

Um in einem Schritt Erythrozyten zu lysieren und die restlichen Blutzellen zu fixieren, wurden 3 ml RBC Lys/Fix-Lösung (hergestellt aus neun Teilen VE H<sub>2</sub>O und einem Teil RBC-Lys/Fix; Cat-Nr.:422401, Hersteller BioLegend, San Diego, USA) hinzugegeben und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden durch Vortexen gemischt und dann erneut zehn Minuten inkubiert.

Im Folgenden wurden die Tubes bei 350 g und 7°C fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 3 ml eisgekühlter FACS-Puffer hinzugegeben, um die Proben zu waschen. Nun erfolgte ein erneuter Zentrifugierschritt bei o.g. Einstellungen. Der Überstand wurde abgesaugt und das verbliebene Pellet in 120 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Material	Bezugsquelle
Pipetten (0,5-10µl; 2-20µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Tubes 50 ml; 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen, PS, Rundboden, 12 x 75 mm, 5 ml	LABSOLUTE®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eppi Racks	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Stepper	Brand, Berlin, Deutschland
Vortexer RS-VA 10	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 380 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Kühlschrank Liebherr Comfort NoFrost 5°C, -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Glaszylinder 500 ml	Brand, Berlin, Deutschland
Hämozytometer Sysmex XP-300	Sysmex, Norderstedt, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Materialien und Geräte mit Bezeichnung und Herstellerangabe.

Puffer-Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS-Puffer	1000 ml Aqua dest. 2 Stück PBS Tabletten (Gibco)
FACS-Puffer	0,5% BSA (AppliChem) 0,1% Na-Azide (Sigma-Aldrich) in 1x PBS

Tabelle 4: Verwendete Puffer mit Bezeichnung, Zusammensetzung und Bezugsquelle.

### 2.7.3 Datenaufnahme

An die beschriebenen Vorbereitungen schloss sich die Messung der Proben mittels Durchflusszytometer (CytoFlex S, Beckman Coulter Inc., CA, USA) bei einer Flussrate von zehn Mikrolitern pro Minute und zehn Minuten Aufnahmedauer an. So konnten so viele Zellen wie möglich aufgenommen werden. Die Abortrate betrug dabei stets unter 5,5%. Bei höherer Abortrate wurden die Proben weiter mit FACS-Puffer verdünnt. Durch je drei technische Replikate jeder Panelprobe wurden die methodischen Verzerrungen möglichst gering gehalten.

## 2.8 Analyse der FACS-Daten

### 2.8.1 Kompensation und Gating

Die aufgenommenen Zellen wurden mittels der Software Kaluza, Version 2.1 (Beckman Coulter Inc., CA, USA) in Plots dargestellt.

Zunächst wurde im Vollblut der stabile Fluss der Probe durch das Zytometer sichergestellt. Dann wurden Doubletten mittels FSCarea vs. FSCwidth-Gating bzw. mittels FSCarea vs. FSCheight-Gating ausgeschlossen. FSC beschreibt dabei die Vorwärtslichtstreuung, also das in einem kleinen Winkel zum Laserstrahl durch die Zelle abgelenkte Licht. Es ist ein Maß für die Zellgröße. Zur Verbesserung der Genauigkeit wurde ebenfalls noch ein SSCarea vs. SSCheight-Plot verwendet. SSC beschreibt die Seitwärtslichtstreuung, also das in einem rechten Winkel zum Laserstrahl durch die Zelle abgelenkte Licht als Maß für die Granularität der Zellen.<sup>219</sup>

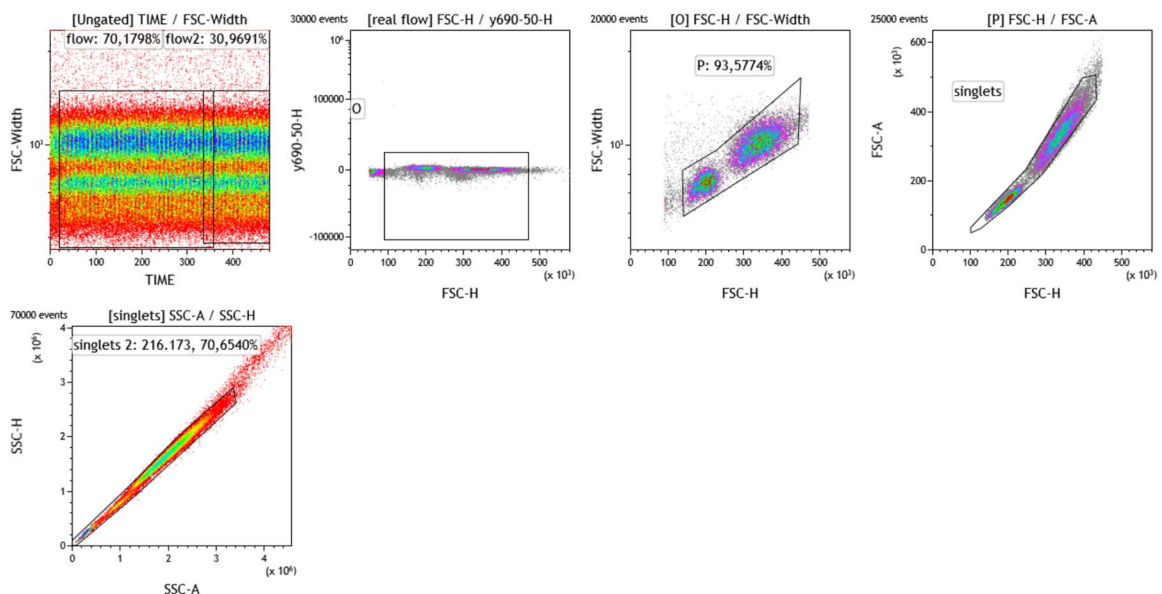


Abbildung 3: Gatingstrategie zur Sicherstellung eines stabilen Flusses sowie zum Ausschluss von Doubletten. H steht dabei für height und A für area. Singlets sind die nach Ausschluss von Doubletten gegateten Einzelzellen.

Mit den so identifizierten Einzelzellen wurde die Kompensation des Multiplex-FACS-Panels für jeden Patienten individuell anhand von Einzelfärbungen mit jeweils nur einem fluoreszenzmarkierten Antikörper angepasst. Daraufhin wurde in einem weiteren Schritt die gesamte Kompensation mittels eines „alle Farben gegen alle Farben“-Ansatzes überprüft und weiter optimiert. Auf diese Weise konnte für eine spektrale Überlappung korrigiert werden. Auf Grund sogenannter „batch effects“, die durch technische Schwankungen zwischen den Messtagen auftreten,<sup>220</sup> ist davon auszugehen, dass eine Kompensationsmatrix nicht für jeden Versuchstag ohne Anpassung angewendet werden kann.

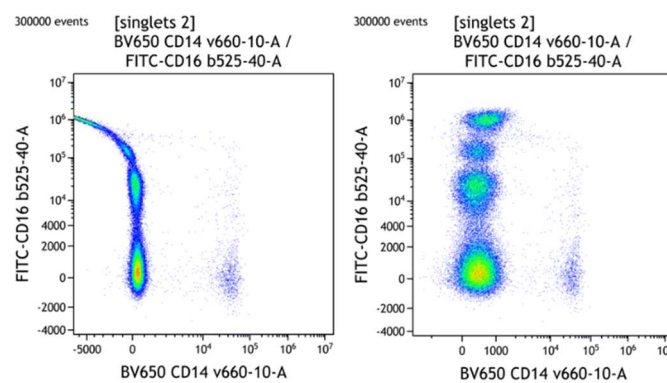


Abbildung 4: Kompensation am Beispiel von CD 14 und CD16. Links uncompensiert, rechts kompensiert.

Nach der Kompensation wurden Leukozyten mittels eines CD45- vs. FSCarea-Gates identifiziert, welche dann als separates FCS-file (Dateiformat Flow cytometry standard) exportiert wurden.

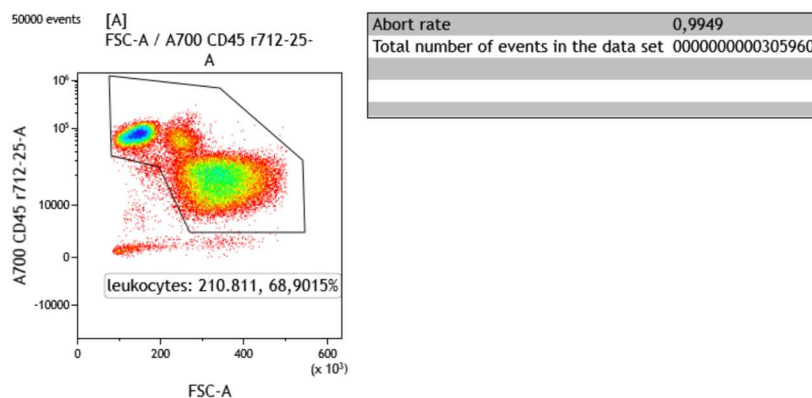


Abbildung 5: Darstellung der Leukozyten-Identifizierung.

Mittels Gating der Monozytenpopulation durch CD45 vs. SSCarea konnten Monozyten identifiziert werden. Diese wurden dann durch Lineage-Gating vs. CD45 und HLA-DR weiter aufgereinigt.

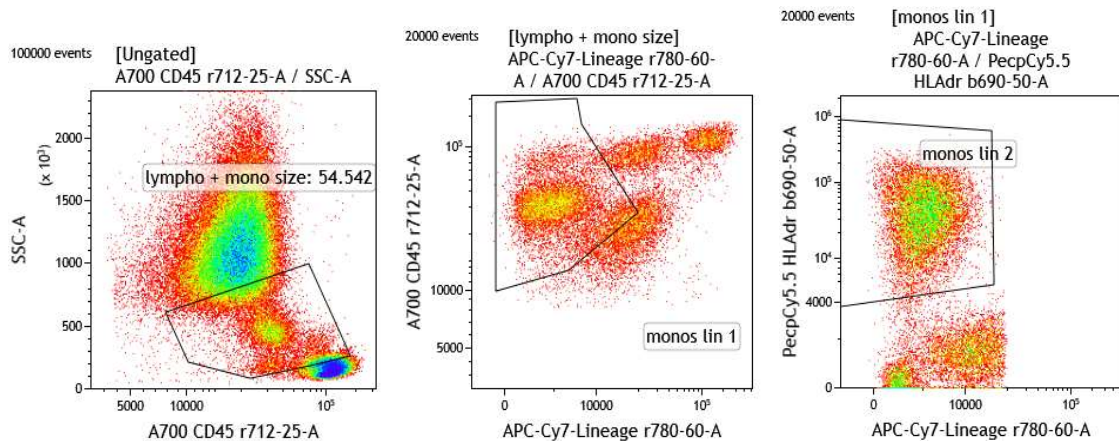


Abbildung 6: Monozyten-Gating und -aufreinigung.

Durch miteinander verknüpfte Gates (Funktion der Kaluza-Software) wurden die Zellen im Folgenden systematisch weiter aufgereinigt. Auf diese Weise konnte eine hohe Sicherheit der Identifizierung der Gesamt-Monozyten-Population erreicht werden.

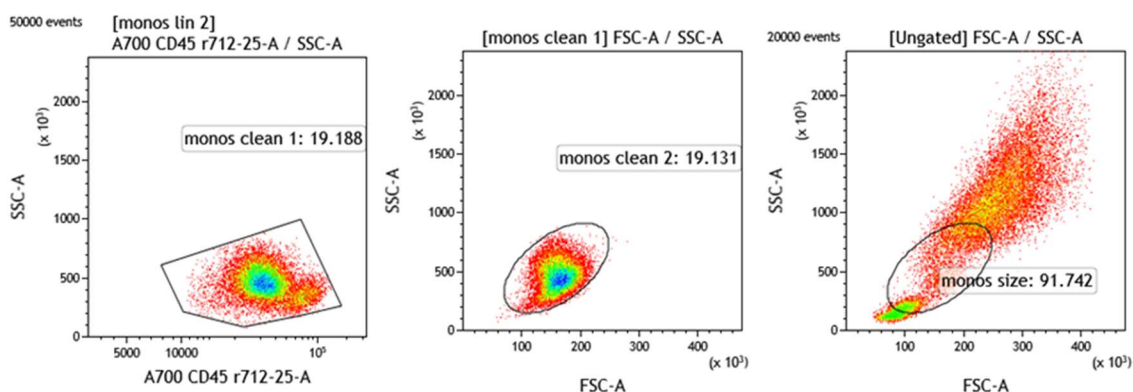


Abbildung 7: Weitere Aufreinigung der Monozyten mithilfe verknüpfter Gates.

Schließlich konnte hierdurch das klassische Monozyten-Gate CD14 vs. CD16 dargestellt werden, bei dem Monozyten ein charakteristisches „Wasserfall-Muster“ zeigen. Durch einen weiteren Aufreinigungsschritt wurde sichergestellt, dass keine Lymphozyten das Monozyten-Gate verunreinigen.<sup>221</sup>

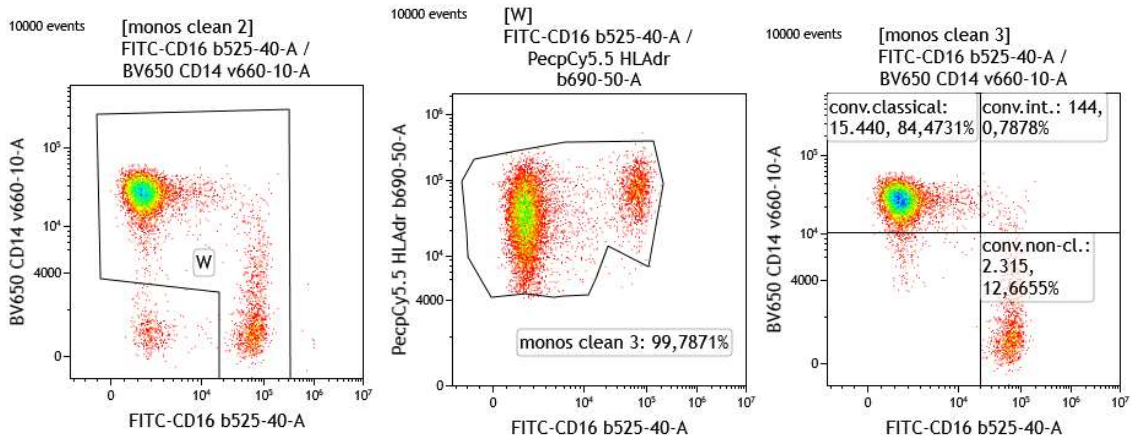


Abbildung 8: Klassisches Monozyten-Gate CD14 vs. CD16 und Lymphozyten-Ausschluss.

Die jeweiligen Zellzahlen (z.B. Granulozytenzahl, Lymphozytenzahl, Leukozytenzahl, Monozytenzahl) wurden in Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) importiert.

Um eine optimale Analyse trotz der bekannten „batch effects“ zu ermöglichen, wurden die Gates zur weiteren Charakterisierung und auch zur Festlegung der CD14- und CD16-Grenzen anhand charakteristisch auftretender Populationen der Monozyten festgelegt und individuell überprüft.

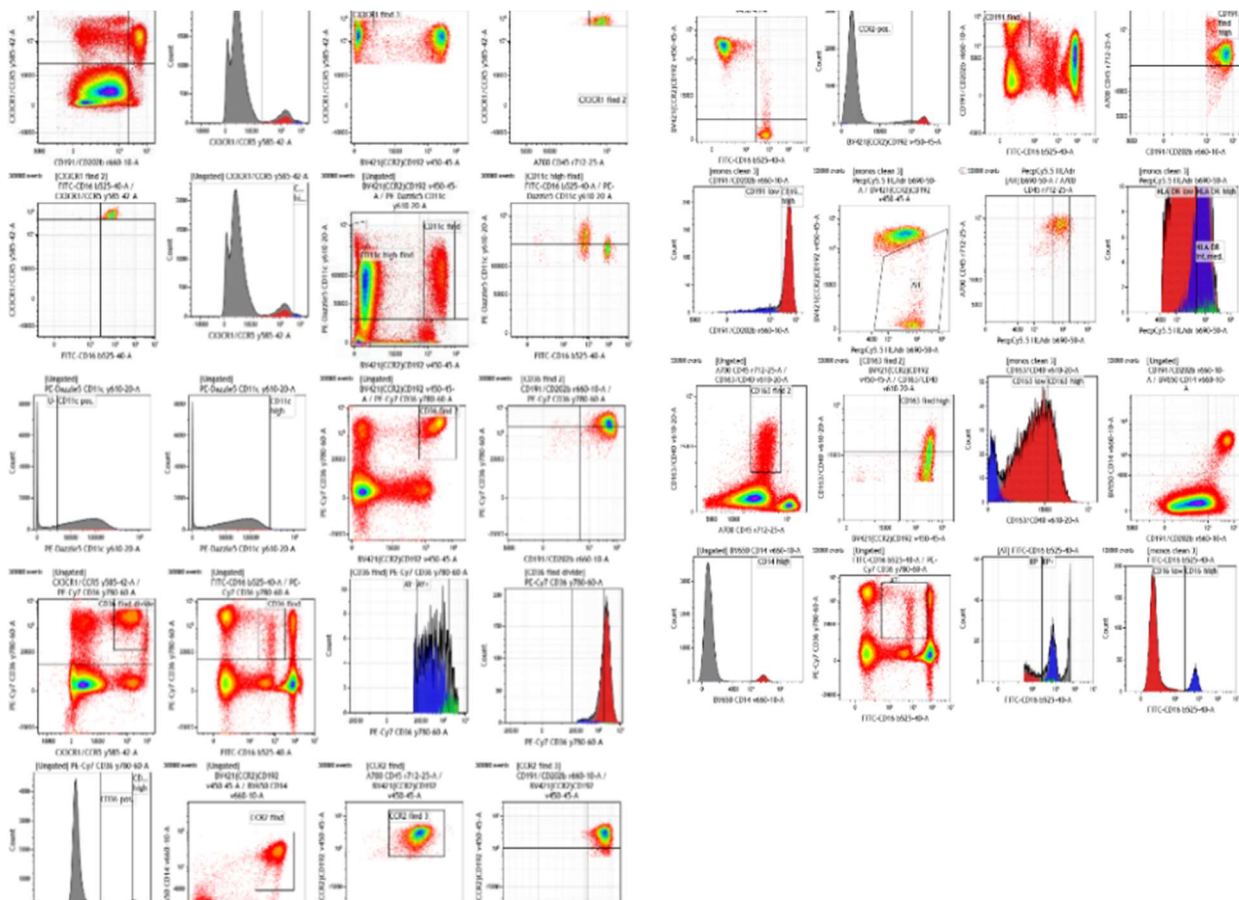


Abbildung 9: Festlegung der Gates zur finalen Analyse anhand charakteristisch auftretender Monozytensubpopulationen.

## 2.8.2 Statistische Analyse der Monozytensubpopulationen

Diese Datenpunkte wurden einer statistischen Analyse unterzogen, um so Populationen zu identifizieren, welche Patienten mit asymptomatischer pAVK charakterisieren. In der Literatur gibt es bislang keinen eindeutigen Konsens, wie das Gating von Monozyten jenseits von CD14 und CD16 durchgeführt werden soll. Deshalb erfolgte das hier beschriebene, vielschrittige Verfahren: In Kaluza wurden zunächst anhand der Funktion „Treeplots“ Baumdiagramme für jeden Marker erstellt.

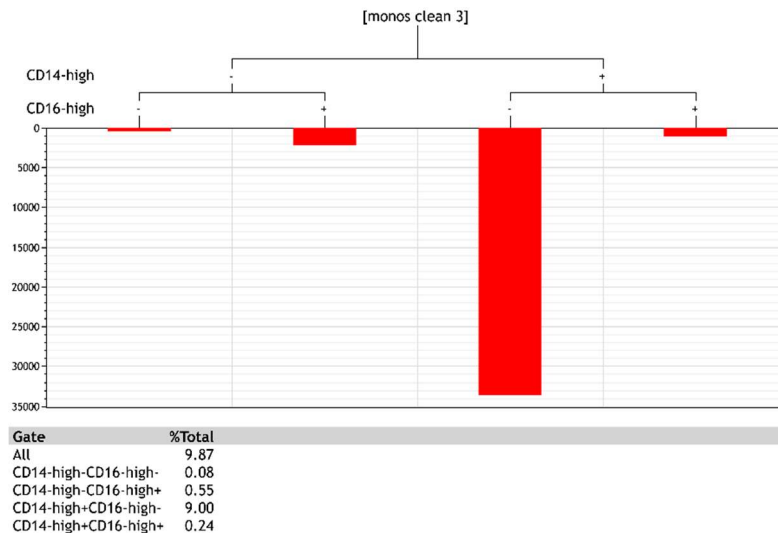


Abbildung 10: Treeplot aus Kaluza. Aufteilung anhand der Verzweigungen in markerpositive und -negative Zellen, vereinfachend hier nur für CD14 und CD16 dargestellt.

Daraufhin wurden die Werte in Excel dokumentiert und die Anteile markerpositiver Zellen an allen Monozyten, allen Leukozyten sowie die absoluten Zellzahlen pro Milliliter Blut anhand der Monozyten- und Leukozytenzahl berechnet. In Prism GraphPad Version 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) wurden alle Datenpunkte eingepflegt und nach asymptomatisch und symptomatisch in zwei Gruppen unterteilt. Es wurden alle gegen alle Marker tabellarisch aufgelistet und in „percent of all Monocytes“, „percent of all Leukocytes“ und „absolute number“ angegeben. Aus dem bei Einschluss gemessenen White-blood-cell-count (WBC, Leukozytenzahl) wurde die „absolute number“, also die absolute Zahl jeweiliger Zellen pro Milliliter Patientenblut, errechnet. In Prism wurden dann zunächst die Zellzahlen visualisiert. Auch die Verhältnisse von Leukozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zueinander sowie ihre Anteile an der Gesamtleukozytenpopulation wurden mithilfe von Prism dargestellt (für genaue Werte und Aufteilung nach Panel siehe Ergebnisteil).

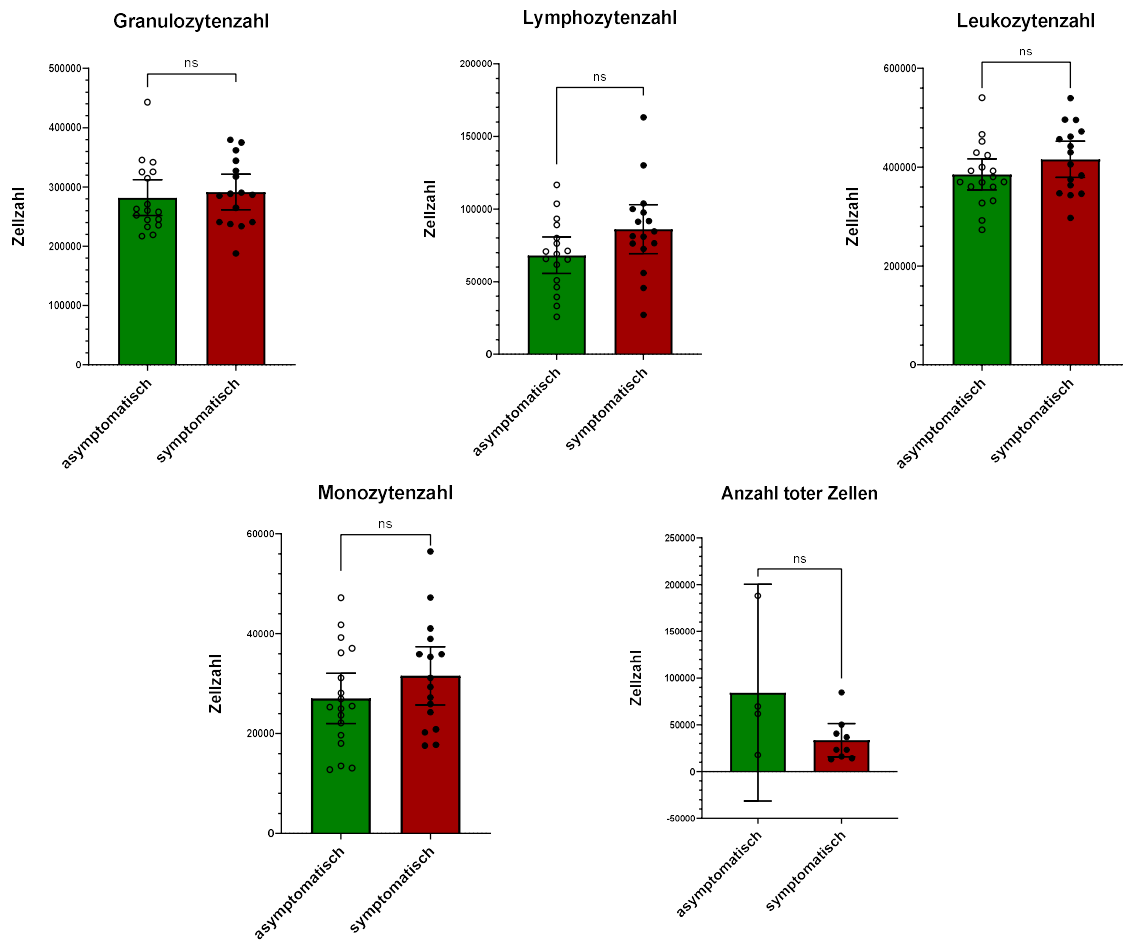


Abbildung 11: Darstellung der Zellzahlen mithilfe von Prism Graph Pad. Balkendiagramme mit Angabe von Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall.

Anschließend konnten Unterschiede der Monozytensubgruppen zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten identifiziert werden.

Dafür wurden die Anteile markerpositiver Zellen an allen Monozyten dargestellt (binäre Gates, siehe Ergebnisteil). Folgend wurden die drei klassischen Subgruppen (klassische, intermediäre und nicht klassische Monozyten) dargestellt und schließlich alle gegen alle Marker aufgelistet, um alle möglichen Rezeptorausprägungskombinationen zu erfassen. Die Ergebnisse dieser Auswertung werden im Ergebnisteil näher dargestellt.

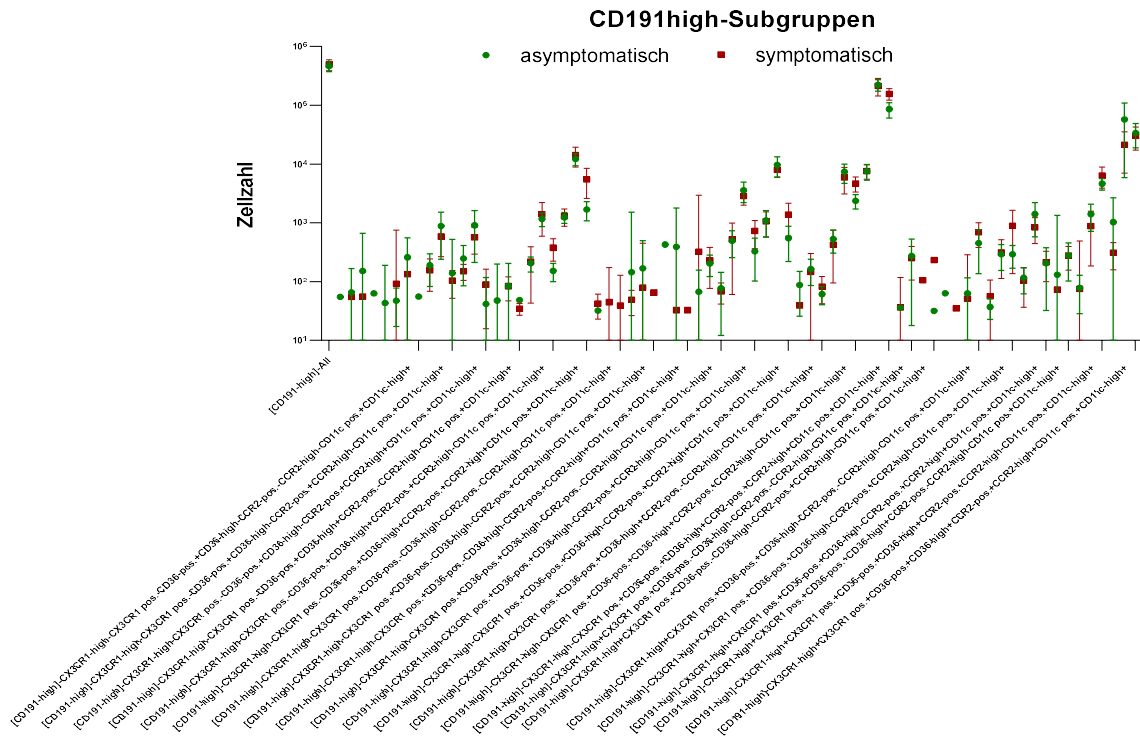


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der Monozytensubgruppen, hier für CD191high-Monozyten. Jede mögliche Markerkombination wurde damit abgedeckt und auf Unterschiede zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten untersucht. Darstellung der Mittelwerte und ihrer 95%-Konfidenzintervalle je Patientengruppe.

Um die beiden Patientengruppen auf Unterschiede hinsichtlich der Rezeptorbelastung der Monozyten zu untersuchen, wurden statistische Tests durchgeführt. Da die Messergebnisse nicht normalverteilt vorlagen (Prüfung mittels QQ-Plots und Testen auf Normalverteilung), wurde ein ungepaarter, nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test angewendet. Für die Betrachtung „alle gegen alle Marker“ legten wir ein Signifikanzniveau von  $\alpha=0,01$  an. Der Schwellenwert, ab dem Daten in die Auswertung eingingen, lag für „percent of all Monocytes“ bei 0,05, für „percent of all Leukocytes“ bei 0,004 und für „absolute number“ bei 30. Somit beinhaltete jede signifikant unterschiedliche Population mindestens 15 Zellen. Unter „Row statistics“ wurde dann geprüft, bei wie vielen der Patienten die Population vorkam. Subgruppen, die sich signifikant zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten unterschieden und bei einem Großteil der Patienten vorkamen, wurden identifiziert und graphisch visualisiert.

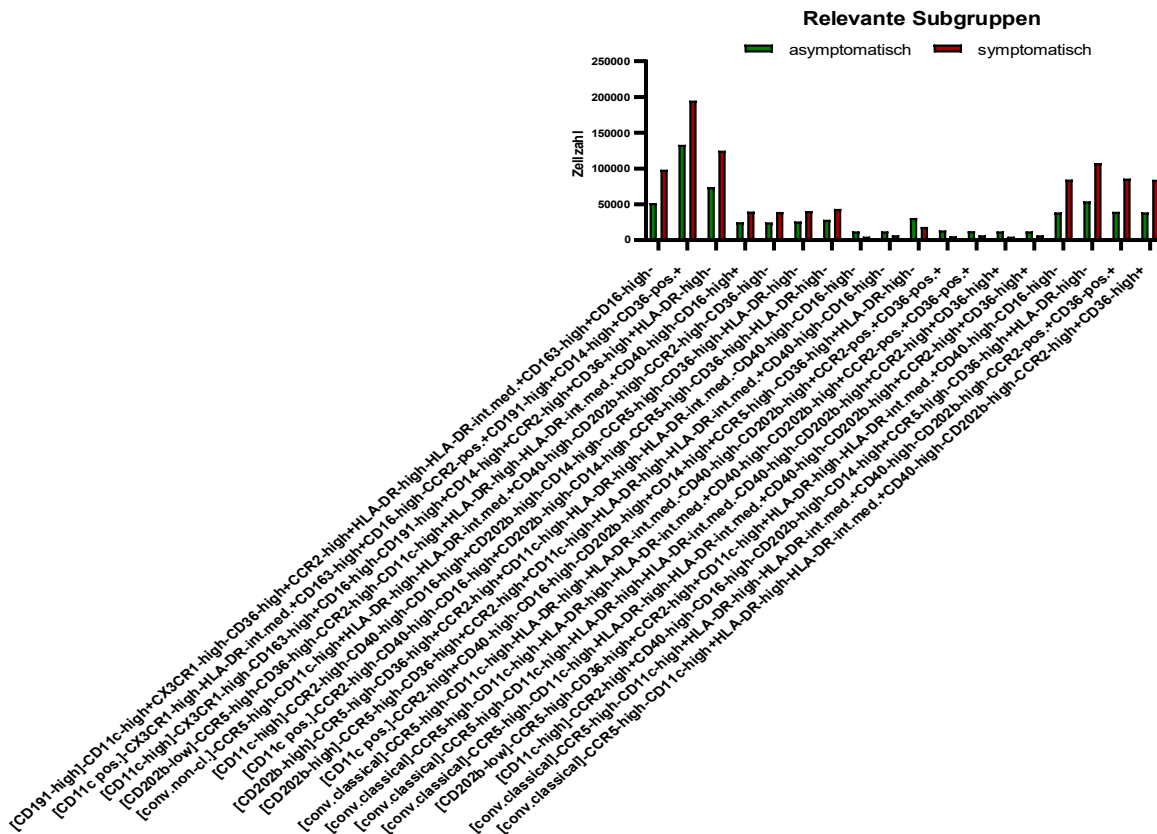


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der visualisierten Subgruppen mit relevanten Unterschieden. Balkendiagramme mit Darstellung des Mittelwertes der Zellzahlen der jeweiligen Patientengruppe (asymptomatisch/symptomatisch).

Zur besseren Übersicht wurden relevante Subgruppen in Excel dargestellt. Zum Teil konnten Subgruppen mit sich überschneidenden Rezeptorausprägungen zusammengeführt werden.

Marker	Threshold		significance	p-Wert	n asmt.	n sympt.
NO significance found	Th=0,05	CD16 high		0,01 none		
CD16 low	Th=0,05	[CD16-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high-CD11c pos.-CD11c-high-CD14-high+ [CD16-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high-CD11c pos.+CD11c-high-CD14-high+ [CD16-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high-CD14-high+ [CD16-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high+CD14-high+ [CD16-low]-CCR5-high+CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high+CD14-high-	Yes - 0,01 Yes Yes Yes	0,005624 0,000005 0,00329 0,000187	42 50 50 50	30 45 45 45
CD40 high	Th=0,05	[CD40-high]-CCR5-high+CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high-CD14-high+	Yes - 0,01	0,000623	41	35
CD40 low	Th=0,05	[CD40-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high-CD11c pos.-CD11c-high-CD14-high+ [CD40-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high-CD11c pos.+CD11c-high-CD14-high+ [CD40-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high-CD11c pos.+CD11c-high-CD14-high+ [CD40-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high-CD14-high+ [CD40-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high+CD14-high+ [CD40-low]-CCR5-high+CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high+CD14-high-	Yes - 0,01 Yes Yes Yes Yes	0,005116 0,007902 0,000002 0,002706 0,000256	42 21 50 50 50	30 12 45 45 45
CD202b high	Th=0,05	[CD202b-high]-All [CD202b-high]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high-CD14-high+ [CD202b-high]-CCR5-high+CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high-CD14-high+	Yes Yes Yes	0,000045 <0,000001 0,000254	50 50 45	45 45 35
CD202b low	Th=0,05	[CD202b-low]-All [CD202b-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.-CCR2-high-CD11c pos.+CD11c-high-CD14-high- [CD202b-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high-CD11c pos.+CD11c-high-CD14-high+ [CD202b-low]-CCR5-high-CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high+CD14-high+ [CD202b-low]-CCR5-high+CD36-pos.+CD36-high+CCR2-pos.+CCR2-high+CD11c pos.+CD11c-high+CD14-high-	Yes - 0,01 Yes Yes Yes Yes	0,000045 0,007664 0,00002 0,000036 0,000964	50 24 50 50 33	45 10 45 45 35

Abbildung 14: Beispiel der Auswertung von Monozytensubgruppen in Excel. Aufgeführt sind Markerbezeichnung, Schwellenwert (=Threshold), sonstige beteiligte Marker, p-Wert sowie die Probenanzahl n pro Gruppe.

## 2.9 Bestimmung von angiogenese- und immunologisch relevanten Markern mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ist ein enzymatisches Immunabsorptionsverfahren und ermöglicht einen quantitativen Nachweis von Proteinen und niedermolekularen Verbindungen.<sup>222</sup> Im Rahmen der LUERPAD-IMMUNO-Studie wurden die Konzentrationen von VEGF, Interleukin 6 (IL-6), high-sensitivity-CRP (hs-CRP) und CXCL4 bestimmt. Es wurden folgende ELISA-Kits verwendet:

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Quantikine® ELISA Human VEGF	R&D Systems, Minneapolis, USA	DVE00 / SVE00 / PDVE00
Human IL-6 ELISA Kit	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA	EH2IL6
High sensitivity CRP Enzyme ELISA-Kit	ORIGENE, Rockville, Maryland, USA	EA101010
Quantikine® ELISA Human CXCL4 Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA	DPF40

Tabelle 5: Verwendete ELISAs: Bezeichnung, Hersteller, Bestellnummer.

VEGF ist ein wichtiger Mediator der Angio- sowie Vaskulogenese.<sup>223</sup> IL-6 und hs-CRP sind entscheidend an der Entzündungsreaktion der Atherosklerose beteiligt.<sup>224,225</sup> CXCL4 induziert einerseits die Differenzierung von Monozyten und andererseits deren Bindung an Endothelzellen. Damit können die Monozyten im Rahmen der Atherosklerose in den subendothelialen Raum eintreten.<sup>226</sup>

Es wurde eine mit spezifischen Antikörpern beschichtete Wellplatte verwendet. Darauf wurde eine Serumlösung aufgetragen, sodass das Antigen der zu messenden Substanz an den an der Platte haftenden Antikörper binden konnte. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe mit Standardproben pipettiert. Es erfolgte eine Zweifachbestimmung, sodass je zwei Wells den gleichen Inhalt hatten. Nach Inkubation folgten Waschschrte und die Zugabe einer Konjugatlösung nach Herstellerprotokoll. Im Anschluss wurde eine Substratlösung hinzugegeben, die mit ihrer Farbe (blau-grüner Farbumschlag) proportional das im ersten Schritt gebundene Substrat durch Bindung an den spezifischen polyklonalen Antikörper widerspiegelte. Nach einer Einwirkzeit wurde die Färbung mittels Stopplösung beendet (gelber Farbumschlag). Die Farbintensität wurde mittels eines ELISA-Readers (FLUOstar Omega, BMG-Labtech, Ortenberg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Anhand der Farbintensität der Standardverdünnungen konnte die genaue Substratkonzentration bestimmt werden.

## **2.10 Follow-up**

Zur Nachverfolgung wurden die Patienten nach sechs und zwölf Monaten erneut befragt und untersucht mittels der oben beschriebenen Vorgehensweisen. Es konnte so unter anderem beurteilt werden, wie stabil die pAVK-Erkrankung verlief und wie sich die Gesamtsituation der Patienten veränderte.

## **2.11 Weitere statistische Analyse**

Es wurde eine statistische Beratung im Umfang von vier Stunden durch einen Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck in Anspruch genommen.

Die klinischen Daten wurden in Prism Graph Pad Version 9 eingepflegt und zunächst zur Deskription der Patientengruppen genutzt (Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen, Konfidenzintervallen, Medianen, statistisches Testen auf Unterschiede zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten mittels Fisher's exact test bei ordinal skalierten Daten und T-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test bei stetigen Variablen, Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$ ). Es wurden Balkendiagramme, Box-and-Whisker-Plots und Kreisdiagramme erstellt. Bei Vorliegen ungleicher Standardabweichen bei gleichzeitiger Normalverteilung wurde eine Korrektur mittels des Welch's T-Test einberechnet. Im weiteren Verlauf wurden Korrelationen berechnet, um einen möglichen Zusammenhang klinischer Daten mit auffälligen Zellpopulationen zu erfassen. Hierzu wurden die Daten zunächst hinsichtlich ihrer Verteilung nach Kolmogorov-Smirnof, D'Agosto & Pearson sowie Shapiro-Wilk geprüft und anschließend korreliert. Für normalverteilte Daten fand die Berechnung nach Pearson Anwendung, wohingegen für nicht-normalverteilte Daten eine Spearman-Rank-Methode benutzt wurde, die gegenüber Ausreißern weniger anfällig als andere Methoden ist.<sup>227</sup> Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden Heat maps erstellt.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs anhand klinischer und epidemiologischer Daten**

Zur Rekrutierung von Patienten für die LUERPAD-IMMUNO-Studie wurden täglich die in der Kardiologie, Neurologie und Nephrologie stationär behandelten Patienten gescreent. Diese Stationsauswahl wurde aufgrund hier vermehrt vorkommender kardiovaskulärer Risikofaktoren getroffen. Das Screening belief sich insgesamt auf 4000 Patientenakten. Hieraus ergaben sich 443 Patienten, die auf eine pAVK mittels ABI-Messung gezielt untersucht werden konnten. Bei 88 Patienten wurde ein auffälliger ABI festgestellt und eine Untersuchung in der angiologischen Abteilung veranlasst.

Anhand der Ein- und Ausschlusskriterien konnten insgesamt zwanzig asymptotische Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Zusätzlich wurden achtzehn symptomatische Patienten anhand der Patientenliste des Herzkatheterlabors und der Angiologie identifiziert und eingeschlossen. Insgesamt vier Patienten mussten nach Einschluss aus der Studie ausgeschlossen werden, weil sie nach intensiverer Anamnese und Recherche die Ein- und Ausschlusskriterien nicht ausreichend erfüllten. Dies war begründet in einer immunsuppressiven Therapie, normwertigen ABI- und TBI-Werten (trotz dopplersonographischem oder computertomographischem Nachweis einer pAVK) sowie eines pAVK-Stadiums IV. Das Stadium IV der pAVK geht mit offenen Wunden einher,<sup>51</sup> die zu einer Entzündungsreaktion und damit möglicherweise veränderten Monozytenpopulationen führen.

Der Altersdurchschnitt der asymptotischen Patienten betrug 74,9 Jahre (Mittelwert; Median 75 Jahre) mit einem minimalen Alter von 62 Jahren und einem maximalen Alter von 85 Jahren, der Altersdurchschnitt der symptomatischen Gruppe lag bei 71,1 Jahren (Mittelwert, Median 70,5 Jahre), wobei der jüngste Patient 60 Jahre und der älteste Patient 82 Jahre alt war. Die symptomatischen Patienten waren zu den Asymptotischen nach Alter und Geschlecht gematcht, also zugeteilt, worden. Zu der asymptotischen Gruppe zählten sieben weibliche und elf männliche Patienten, zu der symptomatischen Gruppe acht weibliche und neun männliche Patienten.

Der mittlere BMI der asymptotischen Patienten lag bei 25,6 kg/m<sup>2</sup> (Median 26,8 kg/m<sup>2</sup>), der der symptomatischen Patienten bei 26,8 kg/m<sup>2</sup> (Median 27,15 kg/m<sup>2</sup>).

Bezüglich kardiovaskulärer Risikofaktoren verhielt es sich wie folgt: Bei neun der symptomatischen Patienten war im Vorfeld eine koronare Herzkrankheit (KHK) diagnostiziert worden, bei sieben Patienten nicht. In der asymptomatischen Gruppe waren fünfzehn diagnostizierte KHK-Patienten, drei ohne KHK-Diagnose. Zum Baselinezeitpunkt wiesen alle asymptomatischen Patienten eine arterielle Hypertonie auf; dreizehn von ihnen wurden deshalb mit drei oder mehr Medikamenten behandelt. Vierzehn symptomatische Patienten waren betroffen; acht davon wurden mit drei oder mehr Medikamenten antihypertensiv therapiert. Eine Therapie mittels Lipidsenker erfolgte bei 72,22% der asymptomatischen Patienten und 81,25% der symptomatischen Patienten. Da ein Diabetes Mellitus (Cut-off-Wert für Studieneinschluss HbA1c 6,5%, Maximum in Patientenkollektiv: 6,2%) als Ausschlusskriterium galt, war dieser kardiovaskuläre Risikofaktor bei den Patienten zu vernachlässigen. Etwa drei Viertel aller Patienten waren aktive Raucher oder hatten früher geraucht, wobei von den asymptomatischen Patienten ein größerer Anteil den Nikotinabusus beendet hatte.

Zehn der symptomatischen Patienten hatten bereits eine endovaskuläre Revaskularisation erhalten, ein Patient eine operative Revaskularisation. Insgesamt acht Patienten hatten vor Einschluss einen Schlaganfall erlitten. Alle, von denen der Befund erhebbar war, waren ischämischer Genese. Die Patienten teilten sich auf die asymptomatische und symptomatische Gruppe gleich auf (4/4). Zwei symptomatische Patienten hatten bereits eine Carotis-Thrombendarteriektomie (TEA), drei Patienten einen Carotis-Stent erhalten. Insgesamt sieben Patienten waren vor Einschluss mindestens einmal von einem Herzinfarkt betroffen. Vier davon fielen in die asymptomatische, drei in die symptomatische pAVK-Gruppe. Zehn Patienten hatten bereits eine perkutane Intervention (PCI) der Herzkranzarterien erhalten. Sieben Patienten waren mittels koronarer Bypass-Anlage therapiert worden. Bei zwei Patienten war ein (thorako-)abdominelles Aortenaneurysma diagnostiziert worden. Einer dieser Patienten hatte bereits eine Dissektion erlitten. Bei einem anderen Patienten war eine minimalinvasive endovaskuläre Aneurysmreparatur (EVAR) durchgeführt worden.

Hinsichtlich der Komorbiditäten zeigte sich folgendes Bild: Neun asymptomatische und vier symptomatische Patienten wiesen eine Niereninsuffizienz auf, wobei zur Diagnosestellung eine glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unter 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> ausschlaggebend war, wie in der aktuellen Literatur beschrieben.<sup>228</sup> Elf asympto-

matische sowie ein symptomatischer Patient waren von Vorhofflimmern betroffen, drei asymptomatische und ein symptomatischer Patient hatten eine bekannte Hepatopathie. An einer chronischen Lungenerkrankung (Asthma oder COPD) litten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses sechs asymptomatische und fünf symptomatische Patienten.

26 Patienten hatten in ihrer Medikation Plättcheninhibitoren, elf hingegen nicht. 22 davon bekamen ASS, sechs Clopidogrel und jeweils einer Ticagrelor beziehungsweise Prasugrel. Eine orale Antikoagulation erhielten fünfzehn Patienten, davon vier mittels Vitamin-K-Antagonist, fünf mittels Rivaroxaban und sechs Patienten mittels Apixaban.

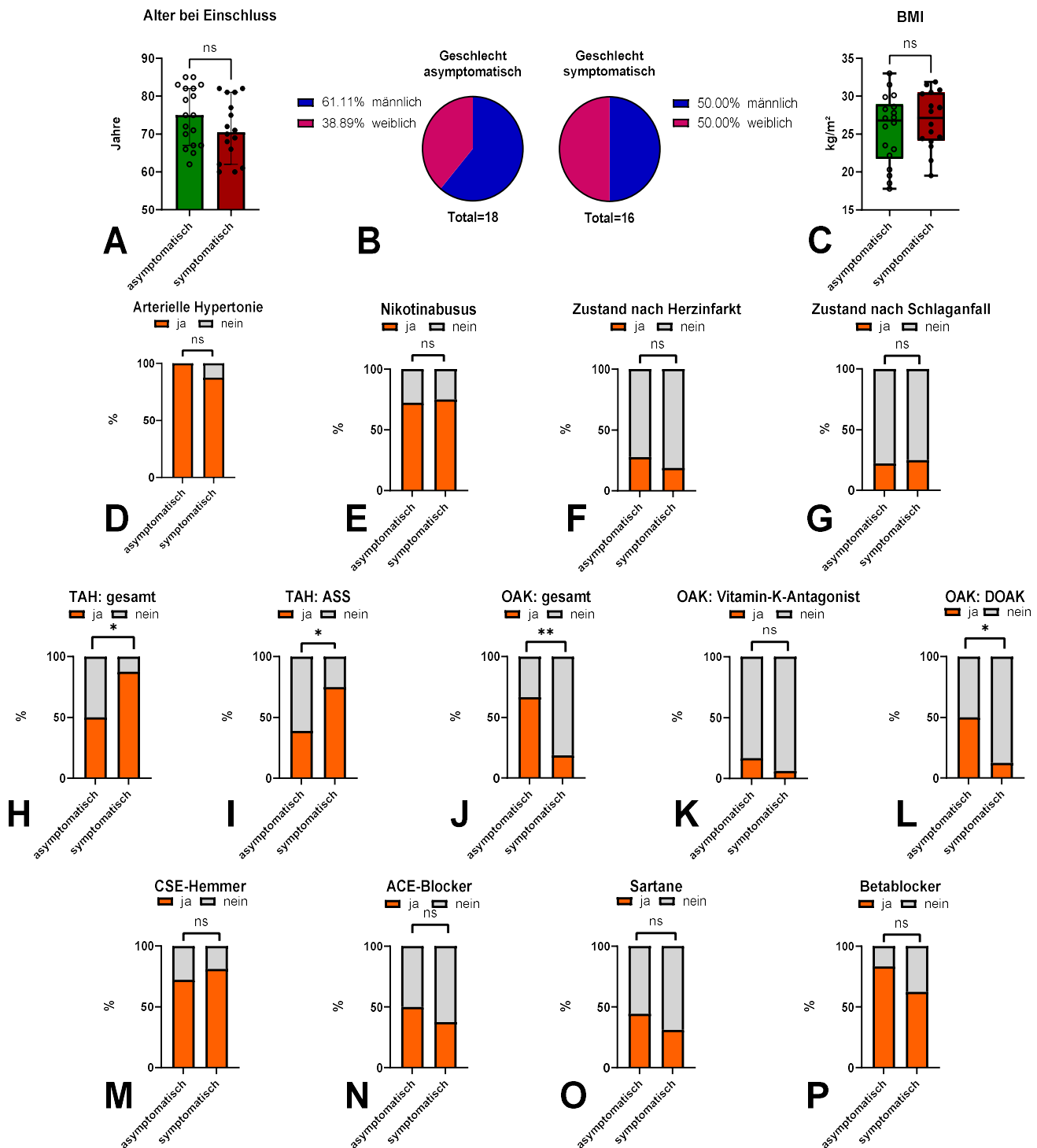


Abbildung 15: Charakterisierung des Patientenkollektivs. A: Alter der Patienten bei Studieneinschluss in Jahren. Aufteilung in asyptomatische und symptomatische Gruppe. Balkendiagramm mit Angabe von Median und 95%-Konfidenzintervall. Darstellung aller individuellen Datenpunkte. Nach ungepaartem, doppelseitigem T-Test bei Normalverteilung kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. B: Geschlechterverteilung der Patienten. Kreisdiagramm eingefärbt nach jeweiligen prozentualen Anteilen des Geschlechts. C: BMI-Verteilung beider Patientengruppen. Box-and-Whisker-Plot mit Angabe von Median, 25. und 75. Perzentil, Minimum und Maximum. Darstellung aller individuellen Datenpunkte. Nach ungepaartem, doppelseitigem T-Test bei Normalverteilung kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. D-G: Kardiovaskuläre Risikofaktoren. Gestapelte Balkendiagramme mit Prozentangaben. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen nach T-Test / Mann-Whitney-U-Test. H-P: Medikamenteneinnahme. Gestapelte Balkendiagramme mit Prozentangaben. TAH = Thrombozytenaggregationshemmer, OAK = Orale Antikoagulation, DOAK = direkte orale Antikoagulanzen. Signifikanter Unterschied bei Einnahme von TAHs (\*;  $p=0,0296$ ), genauer ASS (\*;  $p=0,045$ ) sowie bei oraler Antikoagulation (\*\*;  $p=0,007$ ), genauer DOAKs (\*;  $p=0,0296$ ) nach Fisher's exact test. Kein signifikanter Unterschied bei Einnahme von Vitamin-K-Antagonisten.

Laborchemisch zeigte sich bezüglich der untersuchten Parameter Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten, Thrombozyten, partielle Thromboplastinzeit (PTT), Kreatinin, Harnstoff, Kalium, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin und LDL-Cholesterin kein signifikanter Unterschied zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten. Die Gerinnungswerte Quick und International Ratio (INR) sowie die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unterschieden sich signifikant:

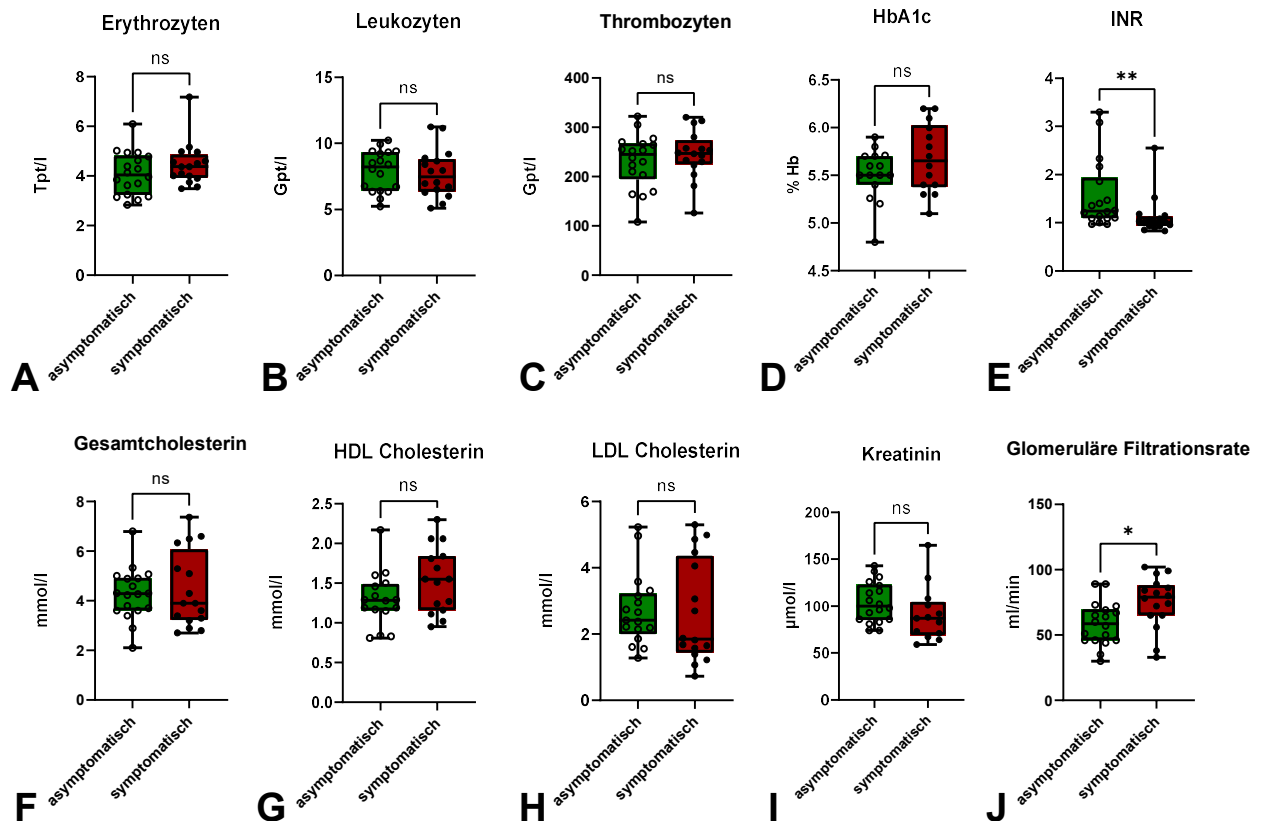
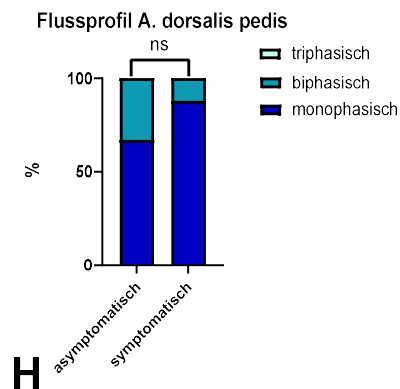
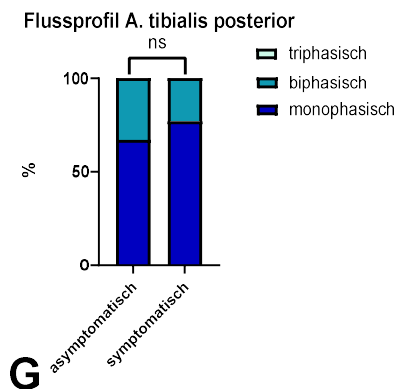
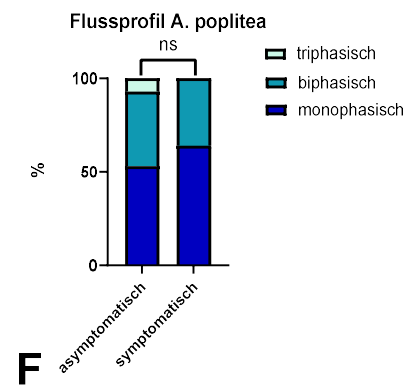
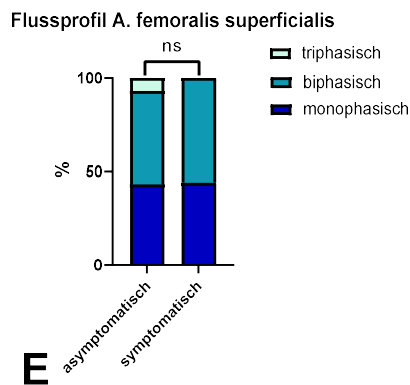
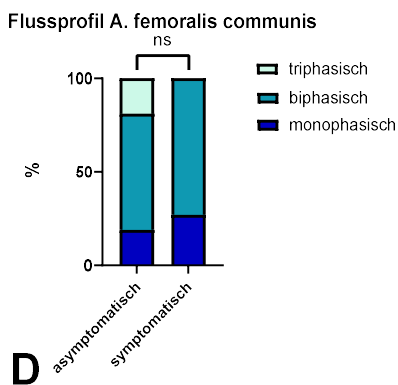
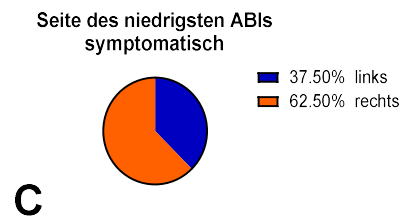
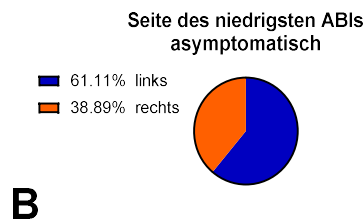
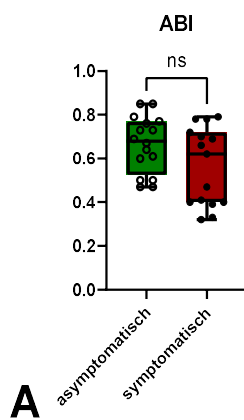


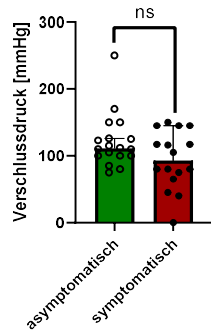
Abbildung 16: Laborwerte. Box-and-Whisker-Plots mit Angabe von Median, 25. und 75. Perzentil, Minimum und Maximum. Darstellung aller individuellen Datenpunkte. A-C: Erythrozyten [Tpt/l], Leukozyten [Gpt/l], Thrombozyten [Gpt/l]; Unterschied nicht signifikant nach ungepaartem, doppelseitigem T-Test bei Normalverteilung. D: HbA1c [% des Hämoglobins], Unterschied nicht signifikant nach ungepaartem, doppelseitigem T-Test bei Normalverteilung. E: INR, nach Mann-Whitney-U-test für nicht-normalverteilte Daten signifikanter Unterschied zwischen asymptomatischer und symptomatischer Patientengruppe (\*\*),  $p=0,0034$ . F-H: Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, jeweils [mmol/l]. Unterschied nicht signifikant nach ungepaartem, doppelseitigem T-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test. I: Kreatinin [µmol/l]; Unterschied nicht signifikant nach ungepaartem, doppelseitigem T-Test bei Normalverteilung. J: GFR. Nach ungepaartem, doppelseitigem T-Test bei Normalverteilung signifikanter Unterschied zwischen asymptomatischer und symptomatischer Patientengruppe (\*),  $p=0,013$ .

### 3.2 pAVK-Befunde

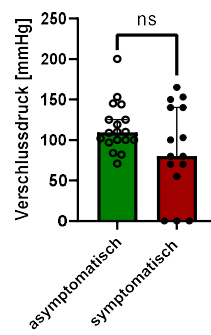
Zur Diagnose der pAVK wurde eine Knöchel-Arm-Indexmessung (Ankle-Brachial-Index, ABI) herangezogen in Kombination mit der durch den Patienten beschriebenen Beschwerdesymptomatik. Ein ABI unter 0,9 galt dabei als Grenzwert (wie oben beschrieben konservativer Wert zur Vermeidung falsch-positiver Befunde). Die ABI-Werte der symptomatischen Patientengruppe waren tendenziell etwas niedriger als diejenigen der asymptomatischen Patientengruppe. Es ergab sich hier jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied. Auch bei der sonographischen Untersuchung der Bein- und Fußarterien ergaben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten.



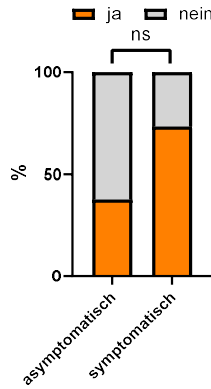
Verschlussdruck A. tibialis post.



Verschlussdruck A. dorsalis pedis



Stenosenachweis



Verschlussnachweis

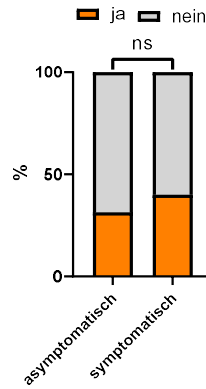


Abbildung 17: Angiologisches Profil. Testung auf Unterschiede zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten mittels Mann-Whitney-U-Test für nicht-normalverteilte Daten. A: Niedrigster ABI jedes Patienten. Box-and-Whisker-Plot mit Angabe von Median, 25. und 75. Perzentil, Minimum und Darstellung der Einzelwerte. Kein signifikanter Unterschied. Es wurde der ABI-Wert eines Patienten mit 0,0 exkludiert und als Ausreißer betrachtet. B und C: Seite des niedrigsten ABIs. Kreisdiagramm mit Prozentangaben je Patientengruppe. D-H: Flussprofile der Aa. femorales communis und superficialis, poplitea, tibialis posterior sowie dorsalis pedis, jeweils Seite des geringsten ABIs. Gestapelte Balkendiagramme mit Färbung nach prozentualem Anteil monophasischer, biphasischer und triphasischer Profile. Kein signifikanter Unterschied. I und J: Verschlussdrücke der Aa. tibialis posterior und dorsalis pedis, jeweils Seite des geringsten ABIs. Kein signifikanter Unterschied. K: Stenosenachweise der Beinarterien anhand des Sonographiebefundes. Kein statistisch signifikanter Unterschied. L: Verschlussnachweis der Beinarterien anhand des Sonographiebefundes. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

Da nur bei sieben von achtzehn asymptomatischen Patienten eine vaskuläre Bildgebung (CT oder MRT) vorlag, war ein Vergleich der Stenose- oder Verschlussnachweise anhand dessen nicht sinnvoll.

Im Rahmen der Baselinevisite wurde bei allen Patienten der funktionelle Status mittels 6-Minuten-Gehtest und Symptomatikfragebogen erhoben. Die Patienten wurden nach Fontaine und Rutherford klassifiziert. Nur Patienten mit einem Fontaine-Stadium I (asymptomatisch) oder IIb (symptomatisch) bzw. Rutherford Kategorie 0 (asymptomatisch), 2 oder 3 (symptomatisch, Gehstrecke >100 bzw. <100m)<sup>63</sup> wurden in die Studie aufgenommen. Ein Fragebogen zur Claudicatio intermittens half dabei bei der Einstufung.

Mittels Symptomatikfragebogen sollten die Beschwerden noch weiter differenziert werden. Insbesondere in Hinblick auf Schwächegefühl, Krämpfe und Schmerzen in den Beinen während des Gehens ließ sich gut zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten differenzieren.

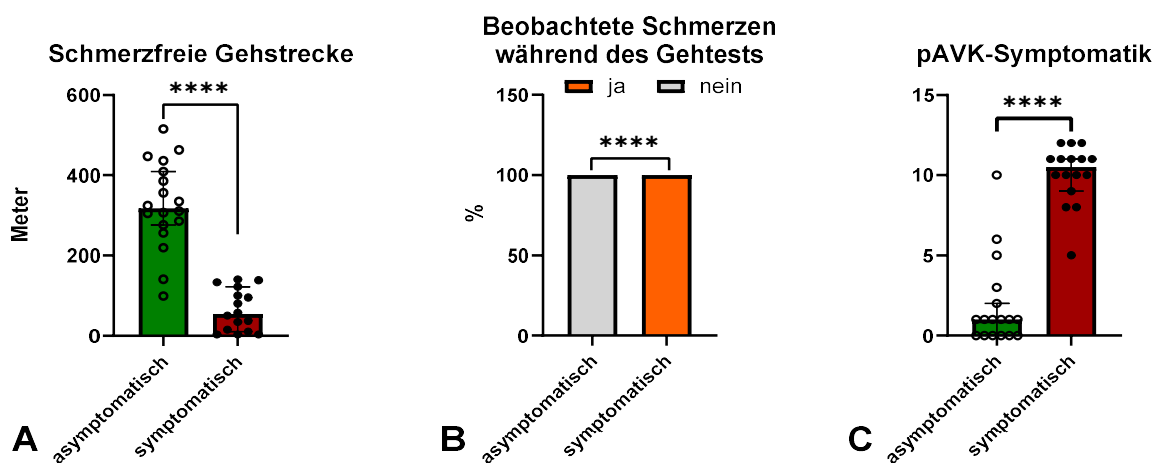


Abbildung 18: pAVK-Symptomatik. A: Schmerzfrequenzfreie Gehstrecke der asymptomatischen und symptomatischen Gruppe im Vergleich. Balkendiagramm mit Angabe von Median und 95%-Konfidenzintervall sowie Darstellung aller Einzelwerte. Statistisch signifikanter Unterschied (\*\*\*\*;  $p < 0,0001$ ) nachgewiesen mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test. B: Beobachtete Schmerzen während des 6-Minuten-Gehtests. 100% der symptomatischen Patienten entwickelten Schmerzen, während dies bei 0% der Asymptomatischen geschah. Unterschied nach Fisher's exact test (\*\*\*\*; OR=0; 95%-KI: 0 – 0,02059,  $p < 0,0001$ ). C: pAVK-Symptomatik laut Fragebögen. Vergleich von asymptomatischen und symptomatischen Patienten. Alle symptomatischen Patienten sowie zwei asymptomatische Patienten beschrieben Beinschmerzen beim Laufen, die im Folgenden weiter differenziert und mittels anschließender Folgefragen und Untersuchungen näher charakterisiert wurden. Zur Angabe des Scores wurde jede pAVK-typische Symptomatik mit einem Punkt versehen und daraus pro Patient die Summe berechnet. Balkendiagramm mit Angabe von Median und 95%-KI sowie allen Einzelwerten. Signifikanter Unterschied (\*\*\*\*;  $p < 0,000001$ ).

### 3.3 Lebensqualität und Gesundheitsverhalten

Weiterhin wurden die Patienten bezüglich ihrer derzeitigen Lebensqualität mithilfe des EQ5D-Fragebogens eingehend interviewt (siehe Tabelle). Auch im Hinblick auf den geschätzten Gesundheitszustand mit einhundert Prozent als Optimum unterschieden sich beide Gruppen kaum (hier nicht gezeigt).

	n gesamt		Keine Probleme n (%)		Einige Probleme n (%)		Extreme Probleme n (%)	
	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S
<b>Beweglichkeit / Mobilität</b>	18	16	12 (67%)	2 (13%)	6 (33%)	14 (88%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Für sich selbst sorgen</b>			17 (94%)	14 (88%)	1 (6%)	2 (13%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Allgemeine Tätigkeiten</b>			15 (83%)	10 (63%)	3 (17%)	6 (38%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Schmerz</b>			12 (67%)	1 (6%)	6 (33%)	13 (81%)	0 (0%)	2 (13%)
<b>Angst/ Niedergeschlagenheit</b>			12 (67%)	12 (75%)	6 (33%)	4 (25%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 6: Ergebnisse des EQ5D-Fragebogens zur Lebensqualität. n = Anzahl befragter Patienten, % = Anteil aller Patienten dieser Gruppe, die mit „ja“ antworteten. AS = asymptomatisch; S = symptomatisch.

Zudem wurde, wie oben bereits beschrieben, auch der EQ5D-Index berechnet, um die Lebensqualität beider Gruppen vergleichen zu können. Dieser fiel bei der asymptomatischen Gruppe deutlich höher aus.

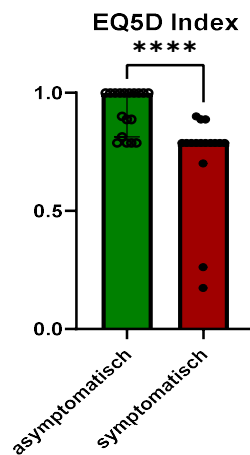


Abbildung 19: EQ5D-Index. Berechnung nach Greiner et al. <sup>216</sup>. Insgesamt wurde die Lebensqualität bezüglich der im EQ5D-Score berücksichtigten Aspekte durch die asymptomatischen Patienten signifikant höher eingeschätzt als durch die symptomatischen pAVK-Patienten (\*\*\*\*;  $p < 0,0001$  nach Mann-Whitney-U-Test; Median AS: 0,999, Median S: 0,788). Angabe von Median und 95%-Konfidenzintervallen sowie Darstellung der Einzelwerte.

### **3.4 Ergebnisse des Follow-ups**

Die Patienten wurden nach sechs und zwölf Monaten zur Beurteilung der Krankheitsstabilität und möglicher Einflussfaktoren einer Nachuntersuchung (Follow-up, FU) unterzogen, sofern sie noch kontaktierbar waren. Daraus ergaben sich folgende Erkenntnisse:

Zwischen Studieneinschluss und Follow-up erhielten achtzehn Patienten einen gefäßmedizinischen Eingriff. Davon stammten drei aus der asymptomatischen und fünfzehn aus der symptomatischen Gruppe.

Acht Patienten hatten die Studienteilnahme beendet (sechs asymptomatische Patienten und ein symptomatischer Patient), vier Patienten waren im Verlauf verstorben. Drei ehemals asymptomatische Patienten wurden im Verlauf symptomatisch, zwei davon mit einem Stadium IIa, ein Patient mit einem Stadium IV nach Fontaine. Bei den symptomatischen Patienten (ehemals Stadium IIb) konvertierten vier Patienten (nach gefäßmedizinischem Eingriff) in das Stadium IIa und sieben waren zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung asymptomatisch (Stadium I). Von den Patienten, die zwar in dem pAVK-Symptomatikfragebogen bei Studienbeginn eine Schmerzsymptomatik in den Beinen angegeben hatten, diese aber als nicht pAVK-typisch gewertet wurde, entwickelte kein Patient eine symptomatische pAVK.

Anhand dieser Angaben wurden die erhobenen Daten erneut auf Unterschiede zwischen stabil asymptomatischen und symptomatischen Patienten untersucht. Dabei mussten Patienten, die die Studie zwischenzeitlich abgebrochen hatten oder verstorben waren, ausgeschlossen werden. Aus Fragebögen, Untersuchungsdaten und Laborwerten ließen sich die gleichen, wie oben beschriebenen Tendenzen und Unterschiede feststellen. Hinsichtlich des EQ5D-Indexes hatte jedoch zwischenzeitlich eine Angleichung der empfundenen Lebensqualität stattgefunden. Beim Follow-up wurde zusätzlich ein Fragebogen zum Gesundheitsverhalten (sog. IPAQ; dieser erfasst Bewegungs- und Ernährungsgewohnheiten)<sup>217</sup> erhoben.

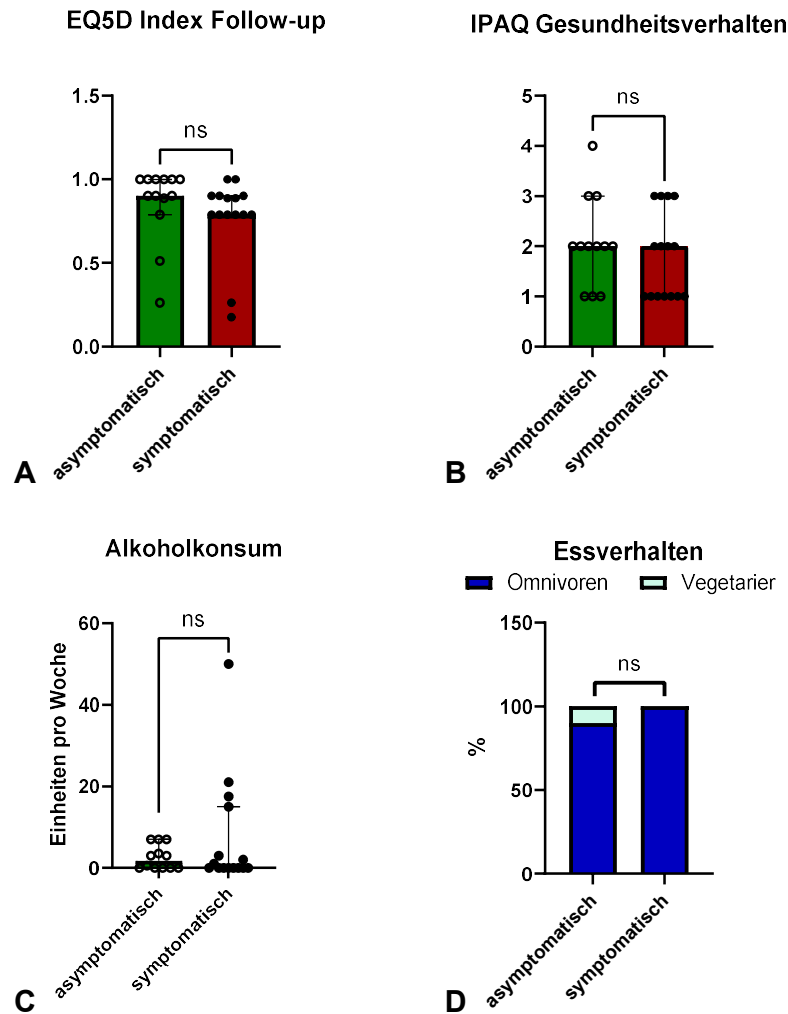


Abbildung 20: Ergebnisse des Follow-ups. Asymptomatische und symptomatische Patienten im Vergleich. A-C: Balkendiagramme mit Angabe von Median, 95%-Konfidenzintervall sowie allen Einzelwerten. Nach Mann-Whitney-U-Tests kein signifikanter Unterschied. A: EQ5D-Index bei Follow-up. Berechnung nach Greiner et al.<sup>216</sup>. Insgesamt wurde die Lebensqualität bezüglich der im EQ5D-Score berücksichtigten Aspekte durch die asymptomatischen Patienten beim Follow-up zwar nach wie vor höher eingeschätzt als durch symptomatische pAVK-Patienten, der signifikante Unterschied hob sich jedoch auf. ( $p = 0,0705$  nach Mann-Whitney-U-Test; Median asymptomatische Gruppe: 0,900, Median symptomatische Gruppe: 0,788). B: IPAQ-Gesundheitsverhalten. Für die vorwiegende Bewegung wurde ein Score berechnet (sitzende Aktivität=1, milde Aktivität=2, moderate Aktivität=3, schwere Aktivität=4); für die Definition der Aktivitäten siehe Methodenteil. C: Alkoholkonsum in Einheiten pro Woche je nach Patientengruppe (asymptomatisch vs. symptomatisch). Eine Einheit Alkohol entspricht 0,33 l Bier oder 1/8 l Wein/Sekt oder 2 cl Brandy. D: Essverhalten (Omnivoren/Vegetarier). Gestapelte Balkendiagramme. Darstellung in Prozent an insgesamt pro Gruppe beantworteten Fragebögen.

### 3.5 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Um Unterschiede im Hinblick auf das immunologische Profil der beiden Patientengruppen zu identifizieren, wurden wie oben beschrieben Monozyten aus dem Patientenblut isoliert, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern konjugiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Nach multiplen Kompensations- und Gatingsschritten konnten die durchflusszytometrisch gewonnenen Daten statistisch analysiert werden.

#### 3.5.1 Zellzahlen

Es ergaben sich aus den oben beschriebenen Gates (siehe Methodenteil) folgende Zellzahlen:

Zellreihe		Asymptomatisch (n=18)	Symptomatisch (n=16)
<b>Leukozytenzahl (Zellen/ml Blut) Median (Min; Q1; Q3; Max)</b>	Panel 1	375.483 (258.392; 333.279; 430.296; 538.069)	439.187 (283.731; 328.343; 477.769; 542.838)
	Panel 2	384.733 (284.504; 345.086; 419.071; 542.713)	431.235 (237.305; 358.077; 466.437; 536.913)
<b>Granulozytenzahl (Zellen/ml Blut) Median (Min; Q1; Q3; Max)</b>	Panel 1	253.230 (195.179; 232.021; 333.859; 441.037)	294.630 (177.647; 229.236; 333.617; 394.519)
	Panel 2	264.508 (227.485; 243.658; 310.225; 444.326)	284.531 (170.056; 245.118; 345.678; 378.751)
<b>Lymphozytenzahl (Zellen/ml Blut) Median (Min; Q1; Q3; Max)</b>	Panel 1	67.940 (28.171; 46.611; 93.437; 115.685)	80.819 (26.698; 71.974; 104.955; 162.827)
	Panel 2	67.217 (23.415; 55.506; 87.148; 117.658)	82.755 (27.583; 65.685; 95.633; 163.593)
<b>Monozytenzahl (Zellen/ml Blut) Median (Min; Q1; Q3; Max)</b>	Panel 1	25.863 (6.318; 18.039; 34.892; 45.396)	31.835 (14.610; 20.310; 40.457; 61.648)
	Panel 2	25.575 (12.974; 20.677; 36.342; 48.403)	30.277 (15.014; 22.039; 37.985; 51.264)

*Tabelle 7: Zellzahlen. Die Bestimmungen wurden nach Präparation, Färbung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper und durchflusszytometrischer Messung mit anschließender manueller Kompensation sowie Gating durchgeführt. Angabe von Median, Minimum, 25. und 75. Perzentil (Q1/Q3) sowie Maximum.*

Alle Zelllinien wurden auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen der asymptomatischen und der symptomatischen Patientengruppe bei Vorliegen von Normalverteilungen mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test untersucht. Im Vorhinein wurden Ausreißer detektiert und eliminiert. Die Unterschiede lagen stets über dem festgelegten Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$ .

### 3.5.2 Verhältnisse der Zellreihen

Die Zellreihen wurden durch Division ins Verhältnis zueinander gesetzt. Dabei fanden sich hinsichtlich Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten keinerlei starke Differenzen zwischen beiden Gruppen.

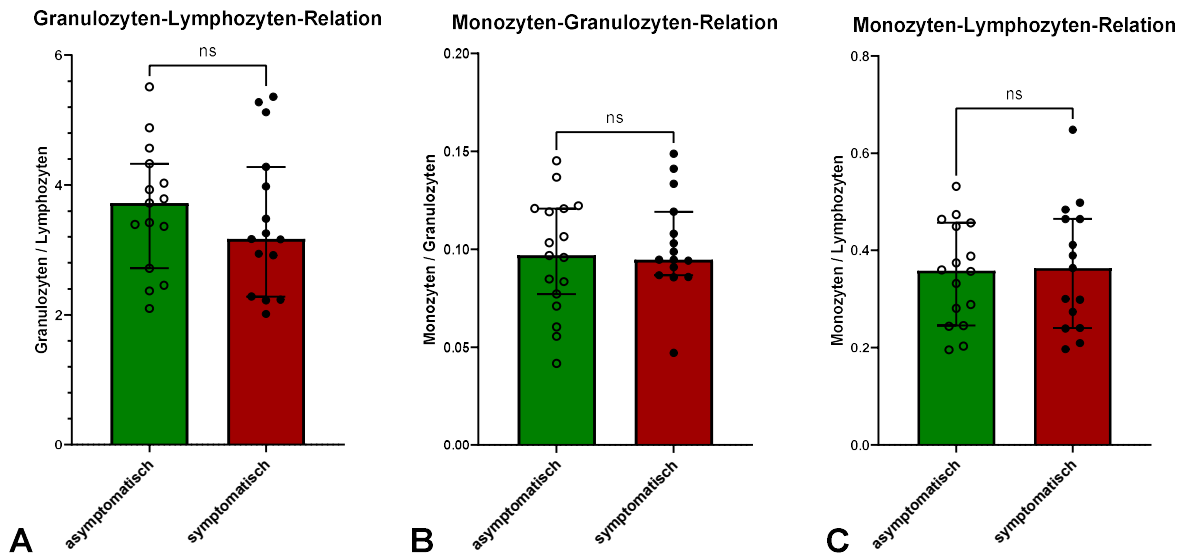


Abbildung 21: Verhältnisse der Zellreihen. Balkendiagramme mit Angabe von Median, 95%-Konfidenzintervall sowie Darstellung aller Einzelwerte. Keine signifikanten Unterschiede bei Testung mittels doppelseitigem, un-gepaartem T-Test bei Normalverteilung. A: Granulozyten-Lymphozyten-Relation. Es wurden die Zellzahlen von Granulozyten und Lymphozyten dividiert. Aus den Zellzahlen von Panel 1 und Panel 2 wurden Mittelwerte gebildet. Die Daten wurden im Vorhinein auf Ausreißer mittels der ROUT-Methode überprüft und daraufhin vier Proben eliminiert. B: Monozyten-Granulozyten-Relation. Es wurden die Zellzahlen von Monozyten und Granulozyten dividiert. Die Daten wurden im Vorhinein auf Ausreißer mittels der ROUT-Methode überprüft und daraufhin eine Probe eliminiert. C: Monozyten-Lymphozyten-Relation. Es wurden die Zellzahlen von Monozyten und Granulozyten dividiert. Die Daten wurden im Vorhinein auf Ausreißer mittels der ROUT-Methode überprüft und daraufhin drei Proben eliminiert.

### 3.5.3 Die klassischen Monozytensubgruppen

Klassischerweise werden die Monozyten drei Untergruppen zugeordnet: Den klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten, die sich anhand ihrer Ausprägung der Oberflächenrezeptoren CD14 und CD16 unterscheiden. Nach dieser Einteilung ergab sich für die untersuchten Patienten ein Trend zu erhöhtem Vorkommen nicht-klassischer Monozyten bei symptomatischen Patienten, der jedoch nicht statistisch signifikant war.

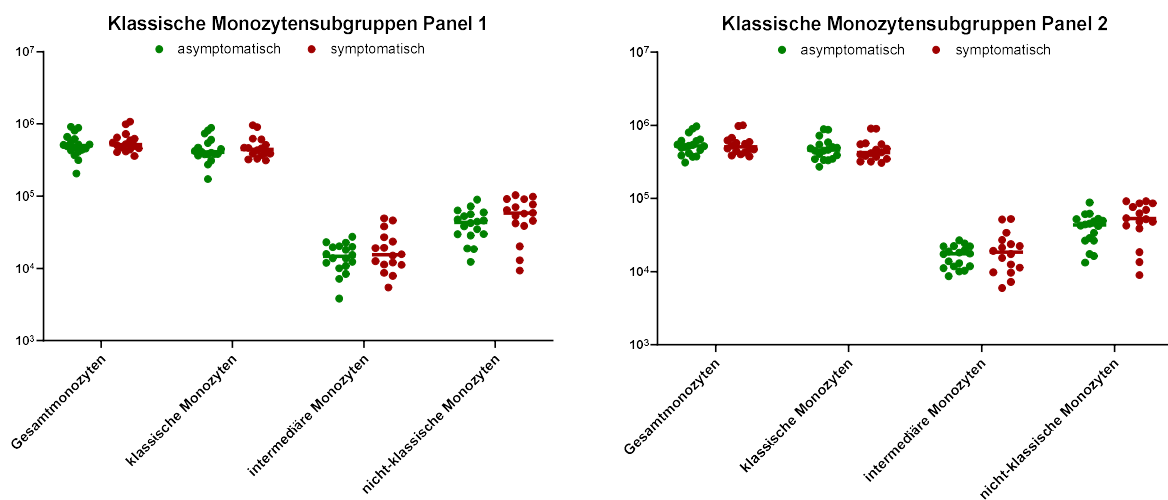


Abbildung 22: Monozyten eingeteilt anhand ihrer Oberflächenmarker CD14 und CD16 für asymptotische und symptomatische pAVK-Patienten, Panel 1 und 2 einzeln dargestellt. Von links nach rechts: Anzahl aller gezählten Monozyten, klassische Monozyten (CD14+ CD16-) (Panel 1:  $p=0,5281$ ; Panel 2:  $p=0,7723$ ), intermediäre Monozyten (CD14+ CD16+) (Panel 1:  $p=0,5973$ ; Panel 2:  $p=0,6455$ ) und nicht-klassische Monozyten (CD14- CD16+) (Panel 1&2: jeweils  $p=0,1017$ ). 10er-logarithmische Darstellung mit Median und Einzeldatenpunkten.

### 3.5.4 Binäre Gates der Monozyten

Anhand binärer Gates, also Monozyten, die in diesem Schritt nur in Hinblick auf einen Marker betrachtet wurden, fiel in Panel 1 ein Unterschied der Ausprägung von CD11c, CD 163, CD191, HLA-DR und CD16 auf. Im Mann-Whitney-U-Test war der Unterschied CD11c-stark exprimierender Zellen mit  $p=0,00237$  statistisch signifikant, die Zellen kamen bei symptomatischen Patienten gehäuft vor. In Panel 2 unterschieden sich zusätzlich die Expression von CCR5, CD40 und CD202b. Der Unterschied war bei CD11c und CD202b statistisch signifikant. CD202b-exprimierende Zellen waren hingegen bei den asymptomatischen Patienten vermehrt vorhanden.

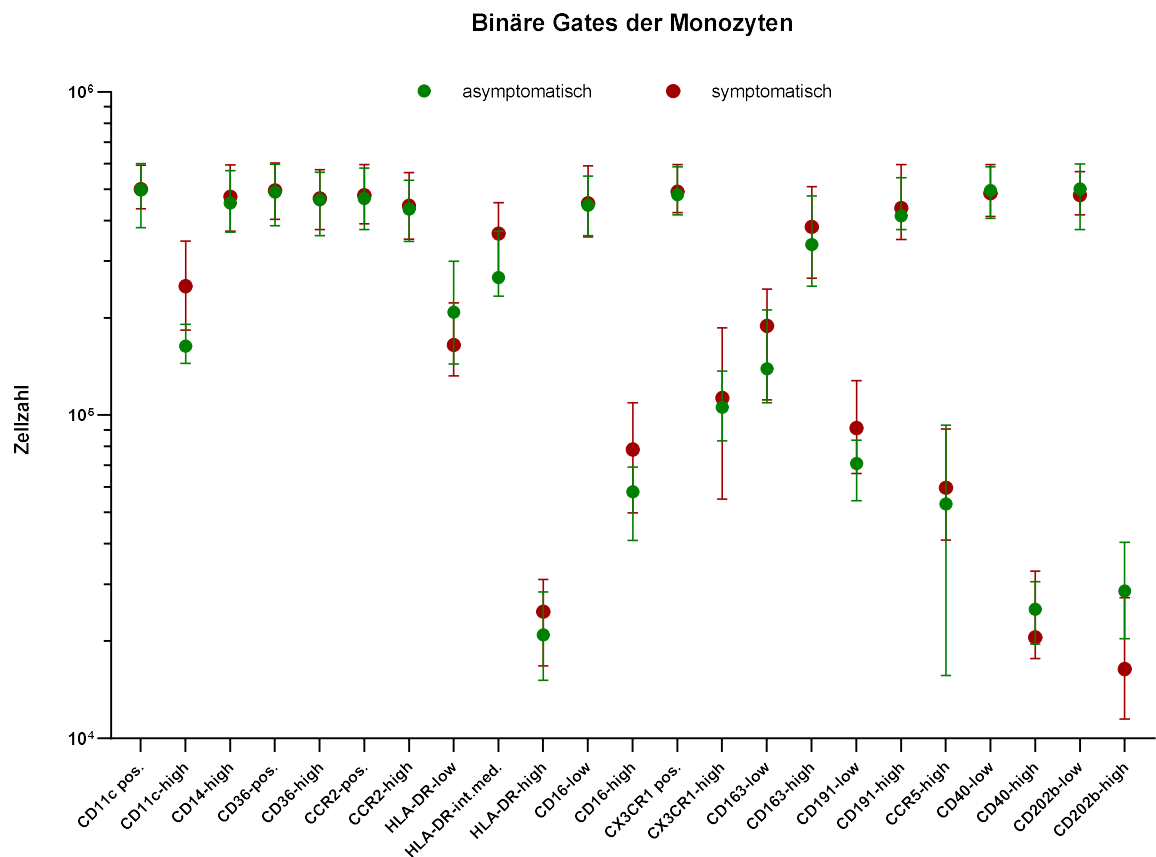


Abbildung 23: Binäre Gates der Monozyten aus Panel 1 und 2 nach Mittelwertbildung aus den Tubes beider Panels. Gezeigt werden die jeweiligen Zellzahlen mit Median und 95%-Konfidenzintervall der jeweiligen Gruppe, Achsenmaßstab Logarithmus zur Basis 10. CD11c stark exprimierende Monozyten kommen bei symptomatischen Patienten signifikant häufiger vor (Mann-Whitney-U-Test,  $p=0,003471$ ). CD202b stark exprimierende Monozyten sind dagegen bei der asymptomatischen Patientengruppe häufiger (Mann-Whitney-U-Test,  $p=0,022405$ ).

### 3.5.5 Relevante Monozytenoberflächenmarker in klassischen Monozytensubgruppen

Als Nächstes wurde untersucht, ob die oben beschriebenen charakterisierenden Oberflächenmarker den klassischen Monozytensubgruppen zuzuordnen sind. CD11c zeigte sich sowohl bei Betrachtung aller Monozyten, als auch bei isolierter Betrachtung der klassischen Monozyten signifikant stärker ausgeprägt bei der Gruppe der symptomatischen Patienten in Panel 1 und 2. CD40 (nur in Panel 1 enthalten) wurde durch nicht-klassische Monozyten der symptomatischen Patienten stärker exprimiert. Der Marker CD202b aus Panel 2 hingegen war insbesondere auf den klassischen Monozyten bei asymptomatischen Patienten vermehrt vorhanden.

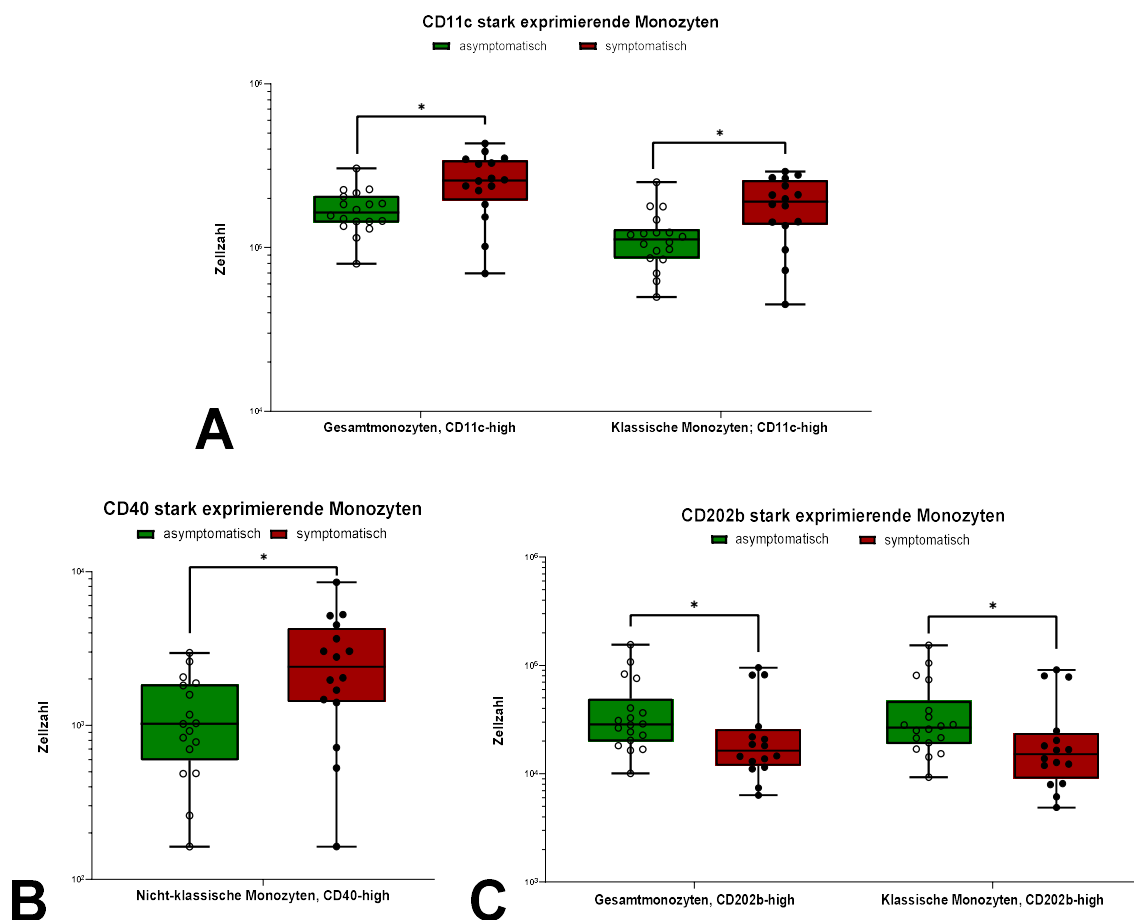


Abbildung 24: Relevante Monozytenoberflächenmarker mit Unterschieden zwischen asymptomatischer und symptomatischer Patientengruppe. Box-and-Whisker-Plots mit Angabe von Median, 25. und 75. Perzentil sowie Minimum und Maximum sowie Darstellung aller Einzelwerte. A: CD11c-stark exprimierende Monozyten, Zellzahlen durch Mittelwertbildung beider Panels errechnet. Sowohl bei Betrachtung aller CD11c-positiven Monozyten, wie auch bei den klassischen Monozyten (CD14+) fallen vermehrt CD11c-stark exprimierende Zellen bei symptomatischen Patienten auf. Dieser Unterschied ist nach Mann-Whitney-U statistisch signifikant (\*;  $p=0,003471$  (alle CD11c+ Monozyten) bzw.  $p=0,004434$  (klassische, CD11c-positive Monozyten)). B: CD40-stark exprimierende Monozyten des Panels 2. Bei Betrachtung der nicht-klassischen Monozyten (CD16+) fallen vermehrt CD40-stark exprimierende Zellen bei symptomatischen Patienten auf. Dieser Unterschied ist nach Mann-Whitney-U statistisch signifikant (\*;  $p=0,0297$ ). Ein Ausreißer wurde ausgeschlossen (asymptomatischer Patient). C: CD202b-stark exprimierende Monozyten des Panels 2. Sowohl bei Betrachtung aller CD202b-positiven Monozyten, wie auch bei den klassischen Monozyten (CD14+) fallen vermehrt CD202b-stark exprimierende Zellen bei asymptomatischen Patienten auf. Dieser Unterschied ist nach Mann-Whitney-U statistisch signifikant (\*;  $p=0,0224$  (alle CD202b+ Monozyten) bzw.  $p=0,0122$  (klassische, CD202b-positive Monozyten)).

### **3.5.6 Signifikant unterschiedliche Subgruppen**

Hier wurden alle untersuchten Oberflächenrezeptorausprägungen miteinander kombiniert und auf Unterschiede zwischen asymptomatischer und symptomatischer Gruppe untersucht. Ziel war es, anhand der untersuchten Oberflächenmarker Subgruppen zu identifizieren, die gegebenenfalls für eine der Patientengruppen charakteristisch sind.

Für folgende Kombinationen fiel der Test auf statistische Signifikanz positiv aus:

Subgruppe 1: Klassische Monozyten, die insbesondere CD11c, CD191, CCR2, CD36 und CD163 exprimieren.

Subgruppe 2: Nicht-klassische Monozyten, die CD202b kaum bis gar nicht exprimieren und positiv bzw. stark exprimierend für CD11c sind.

Subgruppe 3: Klassische Monozyten, die stark positiv für CD202b sind. Dabei werden CD36, CCR2 und CD11c exprimiert.

Subgruppe 4: Klassische Monozyten, die durch CD11c, CD36 und CCR2 charakterisiert werden, während der Oberflächenmarker CD202b kaum vorhanden ist.

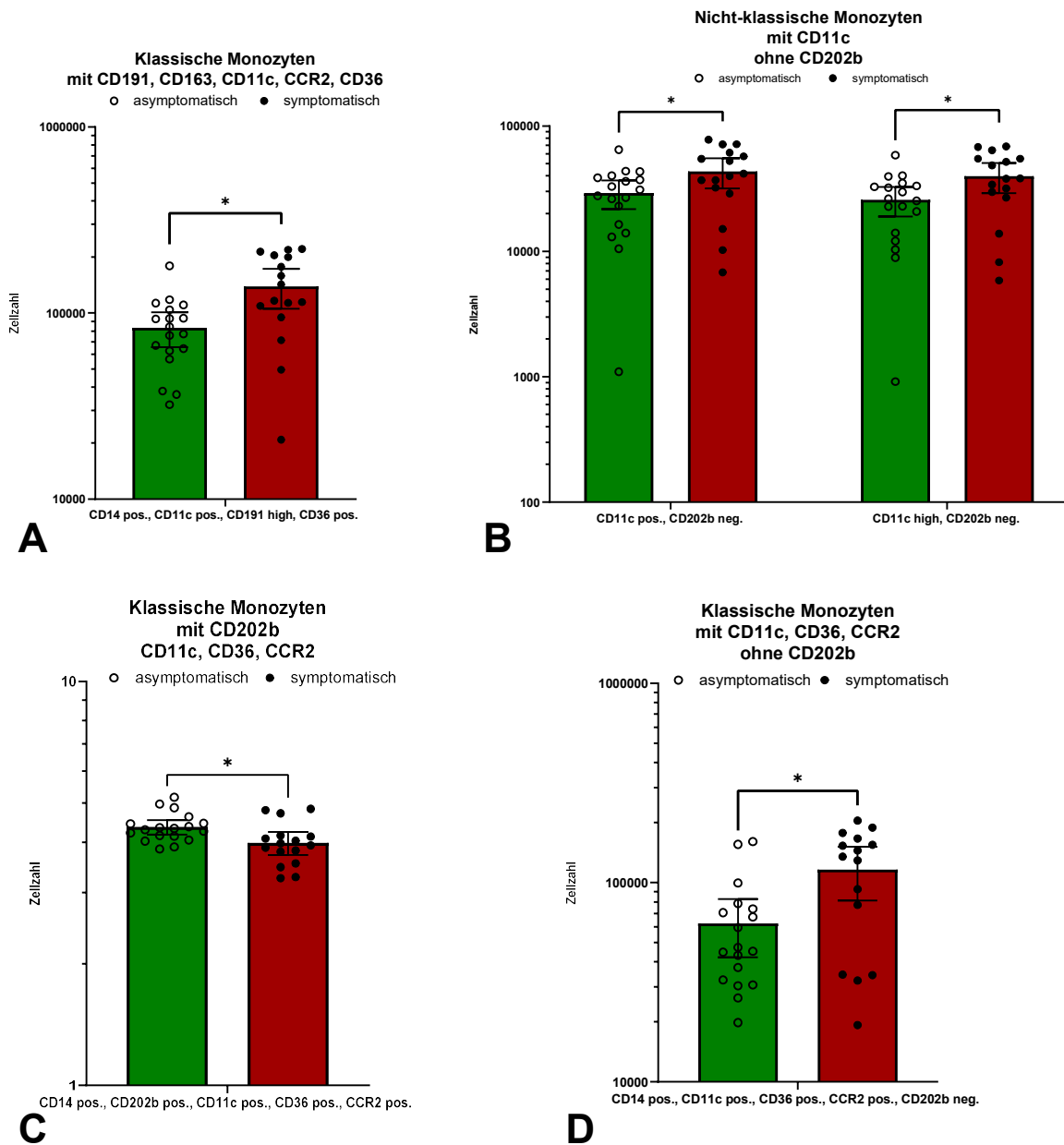


Abbildung 25: Monozytensubgruppen, identifiziert anhand aller untersuchten Oberflächenmarker. Vergleich asymptomatischer und symptomatischer Patienten. Balkendiagramme mit Angabe von Mittelwert, 95%-Konfidenzintervall sowie allen Einzelwerten. Achsen 10-er logarithmisch. A: Anzahl klassischer Monozyten mit o.g. Rezeptorausprägung. Nach ungepaartem, doppelseitigem Welch's T-Test signifikanter Unterschied (\*;  $p=0,0047$ ). B: Anzahl nicht-klassischer Monozyten mit o.g. Rezeptorausprägung. Nach ungepaartem, doppelseitigem T-Test signifikanter Unterschied (\*;  $p=0,0332$  (CD11c positiv) bzw.  $=0,0234$  (CD11c high). C: Anzahl klassischer Monozyten mit o.g. Rezeptorausprägung. Die Daten wurden im Vorfeld bei Vorliegen einer logarithmischen Normalverteilung logarithmiert. Nach ungepaartem, doppelseitigem T-Test signifikanter Unterschied (\*;  $p=0,0141$ ). D: Anzahl klassischer Monozyten mit o.g. Rezeptorausprägung. Nach ungepaartem, doppelseitigem Welch's T-Test signifikanter Unterschied (\*;  $p=0,0089$ ).

## **3.6 ELISA-Ergebnisse**

### **3.6.1 VEGF-ELISA**

Die mittels ELISA erhobenen VEGF-Konzentrationen wurden in Prism eingegeben und bei Vorliegen einer log-Normalverteilung in einen normalverteilten Datensatz transformiert. Es konnten keine Ausreißer identifiziert werden. Es ergab sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (nach ungepaartem, doppelseitigem T-Test bei Normalverteilung).

### **3.6.2 Interleukin-6-ELISA**

Unter den Ergebnissen des Interleukin-6-ELISAs wurden zunächst Ausreißer identifiziert mittels der ROUT (robust regression and outlier)-Methode in Prism Graph Pad. Dieser liegt ein bestimmtes, mehrschrittiges Verfahren zur Erkennung von Ausreißern zugrunde. Hieraufhin wurden vier Werte der asymptomatischen und zwei der symptomatischen Patientengruppe exkludiert. Werte der übrigen Proben lagen normalverteilt vor. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. Auch ohne Ausschluss von Ausreißern ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

### **3.6.3 hsCRP-ELISA**

Unter den Werten des high-sensitivity-CRP-ELISAs wurden keine Ausreißer und auch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen detektiert.

### **3.6.4 CXCL4-ELISA**

Die Konzentrationen des CXCL4-ELISAs lagen normalverteilt vor und es wurden keinerlei Ausreißer identifiziert. Es zeigten sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede.

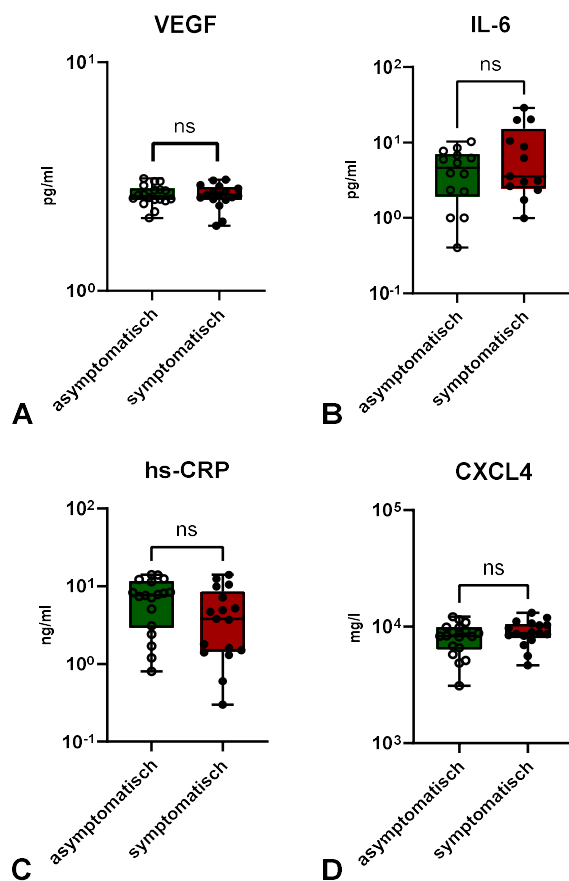


Abbildung 26: ELISA-Messungen. Box-and-Whisker-Plot mit Angabe von Median, 25. und 75. Perzentil, Minimum und Maximum sowie Darstellung aller Einzelwerte. Vergleich von asymptotischen und symptomatischen Patienten. Die Gruppen wiesen nach ungepaarten, doppelseitigen T-Testen keinen signifikanten Konzentrationsunterschied auf (ns;  $p > 0,05$ ). A: VEGF-Konzentrationen in pg/ml. Werte log-transformiert bei Vorliegen einer logarithmischen Normalverteilung. B: Interleukin-6-Konzentrationen in pg/ml. Ausreißer wurden entfernt. 10er-logarithmische Darstellung. C: high-sensitivity-(hs)-CRP-Konzentrationen asymptotischer vs. symptomatischer Patienten in mg/l. 10er-logarithmische Darstellung. D: CXCL4-Konzentrationen asymptotischer vs. symptomatischer Patienten in ng/ml. 10er-logarithmische Darstellung.

### **3.7 Korrelationsberechnungen**

Um die erhobenen Studiendaten in Beziehung zueinander zu setzen, wurden Korrelationsberechnungen durchgeführt. Zunächst erfolgte dies mittels direkter Einzelkorrelationen, also der Betrachtung zweier Datensätze. Die ELISA-Konzentrationen wurden so mit Zellzahlen und Rezeptorexpressionen korreliert:

#### **3.7.1 ELISA-Korrelationen**

Zwischen der Höhe der VEGF-Konzentration und der Expression im Durchflusszytometer gemessener Oberflächenmarker zeigte sich bei gemeinsamer Betrachtung aller Patienten keine Korrelation (95%-Konfidenzintervall des Korrelationskoeffizienten  $r$  (nach Pearson) schloss stets Null mit ein). In der Gruppe symptomatischer Patienten korrelierte die Konzentration von VEGF jedoch positiv mit dem Anteil nicht-klassischer Monozyten (s.u.).

In der Gruppe der asymptomatischen Patienten zeigte sich eine Korrelation von CD14 sowie CD16 stark exprimierenden Monozyten (intermediäre Monozyten) und der IL-6-Konzentration (s.u.). Diese Richtung ließ sich ebenso bei dem symptomatischen Patientenkollektiv nachweisen: Korrelation intermediärer Monozyten mit der IL-6-Konzentration (s.u.).

Die Oberflächenmarker auf Monozyten korrelierten mit der hs-CRP-Konzentration wie folgt: Bei den asymptomatischen Patienten ergab sich eine negative Korrelation für hsCRP mit HLA-DR int.-med. / CCR2 low-Monozyten, mit CD11c high-Monozyten, mit CD14 low / CD16 high-Monozyten, mit CD16 high total-Monozyten, mit CX3CR1 high-Monozyten sowie mit CD191 low-Monozyten. Für die genauen Werte der Korrelationskoeffizienten und Konfidenzintervalle siehe Tabelle weiter unten. Bei den symptomatischen Patienten korrelierten die Anteile intermediärer Monozyten und HLA-DR-high-Monozyten positiv mit der hs-CRP-Konzentration.

Die Konzentrationen korrelierten nicht mit der Oberflächenmarkerexpression auf Monozyten bei gemeinsamer Korrelation aller Patienten. Bei Korrelation der CXCL4-Konzentrationen asymptomatischer Patienten mit Oberflächenmarkern auf Monozyten ergaben sich die in der Tabelle aufgeführten positiven Zusammenhänge.

Bei den symptomatischen Patienten korrelierte die CXCL4-Konzentration negativ mit dem Anteil klassischer Monozyten und mit CD16-hohen-Monozyten.

Asymptomatisch		Symptomatisch	
<b>VEGF</b>			
		<b>Nicht-klassische Monozyten</b>	r=0,5305, 95%-KI= 0,02511 bis 0,8200
<b>IL-6</b>			
<b>CD14-high / CD16-high</b>	r=0,54, 95%-KI= 0,08015 bis 0,8103	<b>CD14-high / CD16-high</b>	r=0,6106, 95%-KI= 0,1431 bis 0,8553
<b>hsCRP</b>			
<b>HLA-DR int.-med. / CCR2 low</b>	r= -0,4968, 95%-KI= -0,7890 bis -0,02120		
<b>CD11c high</b>	r= -0,5059; 95%-KI= -0,7936 bis -0,03330		
<b>CD14 low / CD16 high</b>	r= -0,4937; 95%-KI= -0,7875 bis -0,01714		
<b>CD16 high total</b>	r= -0,5302; 95%-KI= -0,8056 bis -0,06657		
<b>CX3CR1 high</b>	r= -0,4845; 95%-KI= -0,7829 bis -0,005072		
<b>CD191 low</b>	r= -0,5403; 95%-KI= -0,8105 bis -0,08059		
		<b>Intermediäre Monozyten</b>	r=0,5199; 95%-KI= 0,01040 bis 0,8151
		<b>HLA-DR high</b>	r=0,7289; 95%-KI= 0,3457 bis 0,9037
<b>CXCL4</b>			
<b>Monozytenzahl gesamt</b>	r=0,5305; 95%-KI= 0,06693 bis 0,8057		
<b>CD14 high</b>	r=0,5439; 95%-KI= 0,08566 bis 0,8122		
<b>CD14 high / CD16 low</b>	r=0,5347; 95%-KI= 0,07275 bis 0,8078	<b>Klassische Monozyten</b>	r= -0,6527; 95%-KI= -0,8731 bis -0,2110
<b>CD16 low</b>	r=0,5402; 95%-KI= 0,08041 bis 0,8104		
		<b>CD16 high</b>	r= -0,5300; 95%-KI= -0,8197 bis -0,02442
<b>CCR2 positiv</b>	r=0,5515, 95%-KI= 0,09647 bis 0,8159		
<b>CCR2 high</b>	r=0,5551; 95%-KI= 0,1015 bis 0,8176		
<b>CD191 positiv</b>	r=0,5371, 95%-KI= 0,07610 bis 0,8089		
<b>CD191 high</b>	r=0,5596; 95%-KI= 0,1080 bis 0,8197		
<b>CD11c positiv</b>	r=0,5329; 95%-KI= 0,07019 bis 0,8069		
<b>CX3CR1 positiv</b>	r=0,5171; 95%-KI= 0,04854 bis 0,7991		
<b>CD163 high</b>	r=0,6473; 95%-KI= 0,2420 bis 0,8603		
<b>CD36 positiv</b>	r=0,5435; 95%-KI= 0,08509 bis 0,8120		
<b>CD36 high</b>	r=0,5556; 95%-KI= 0,1023 bis 0,8179		
<b>HLA-DR low</b>	r=0,4823; 95%-KI= 0,002135 bis 0,7817		

Tabelle 8: Ergebnisse der Korrelationsberechnungen von ELISA-Konzentrationen und Monozytenoberflächenmarkern.  $r$  = Korrelationskoeffizient nach Pearson, 95%-KI = 95%-Konfidenzintervall.

### **3.7.2 Korrelationsmatrices**

Neben den oben gezeigten Einzelbetrachtungen wurden unter Beachtung der vorliegenden Verteilung der Daten Korrelationsmatrices für ausgewählte klinische Daten, Zellzahlen und Rezeptoraktivitäten erstellt. Erkennbar wurden Clusterbildungen in den Bereichen:

- BMI, kardiovaskuläre Risikofaktoren sowie Komorbiditäten in Beziehung zur CD11c-Ausprägung auf Monozyten
- Kardiovaskuläre Risikofaktoren sowie Komorbiditäten in Beziehung zu Immunzellkonzentrationen (Granulozyten, Leukozyten, Monozyten)
- ELISA-Konzentrationen von VEGF, IL-6, hs-CRP und CXCL4 in Beziehung zur CD11c-Ausprägung.

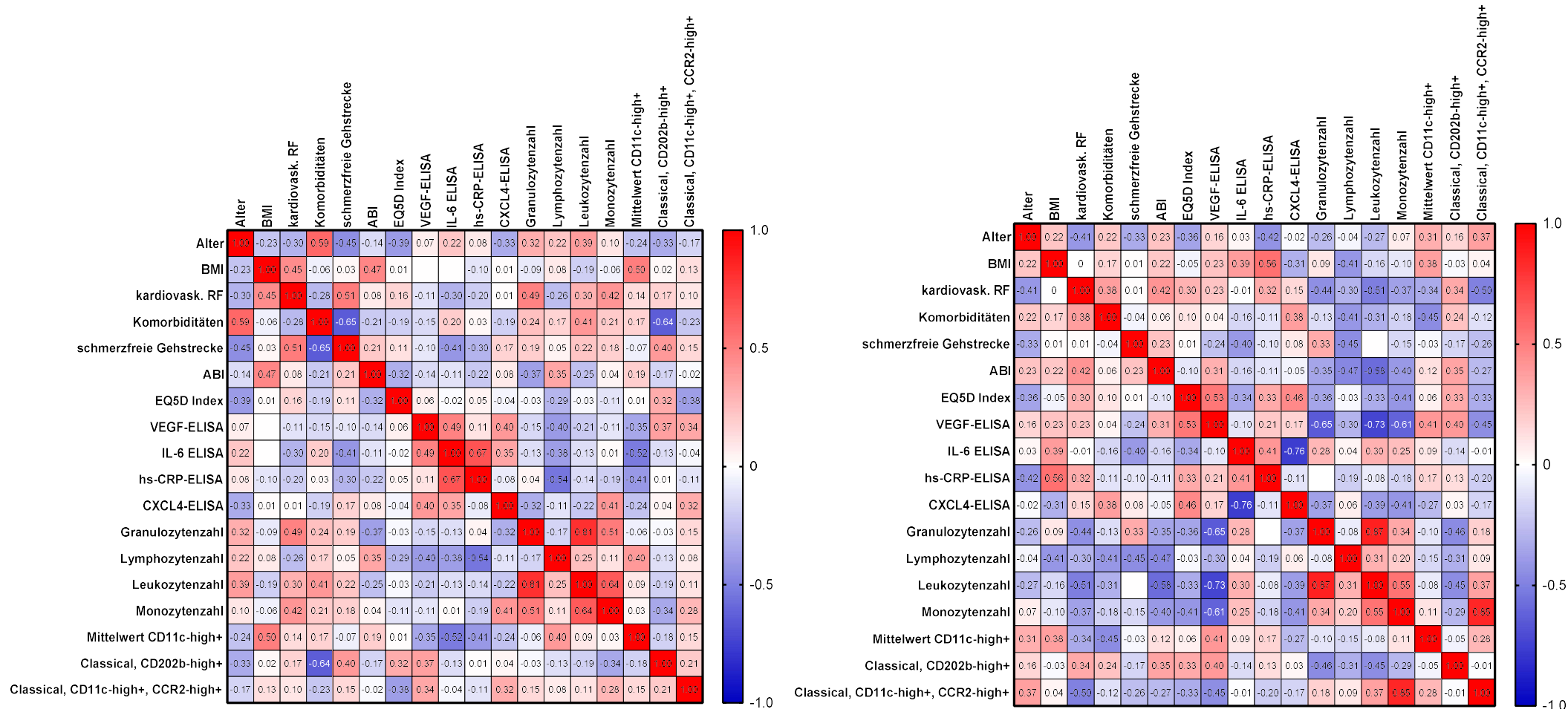


Abbildung 27: Korrelationsmatrices. Links asymptotische Patienten, rechts symptomatische Patienten. Korreliert wurden ausgewählte Daten aus den bei Studieneinschluss erhobenen Daten. Angabe der Korrelationskoeffizienten im jeweiligen Feld, Kodierung der Intensität der Korrelation in Form einer Heatmap durch Farben (blau = starke negative Korrelation, rot = starke positive Korrelation).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die pAVK betrifft global circa 230 Millionen Menschen und hat durch ihre gravierenden Folgen für Individuum und Gesellschaft eine hohe Relevanz.<sup>14,54</sup> Die klinische Präsentation ist sehr heterogen. Aus früheren Forschungsarbeiten ist bekannt, dass Mechanismen der Kollateralenbildung für die Symptomausprägung verantwortlich sein könnten<sup>15</sup> und myeloide Zellen wiederum wahrscheinlich die Kollateralisation beeinflussen.<sup>16</sup> In dieser Arbeit wurde daher gezielt das immunologische Profil asymptomatischer und symptomatischer pAVK-Patienten untersucht. Hierfür wurden durchflusszytometrisch maßgeblich Oberflächenmarker auf Monozyten gemessen, verglichen und mit klinischen und epidemiologischen Daten der Patienten in Beziehung gesetzt.

In Zusammenschau aller klinischen und epidemiologischen Daten ähnelten sich die asymptomatische und die symptomatische Patientengruppe, was durch das oben beschriebene Matching begünstigt wurde. Zur Untersuchung möglicher Unterschiede des immunologischen Profils war dies wünschenswert. Die Patienten wiesen eine Reihe kardiovaskulärer Risikofaktoren auf. Mit einem Durchschnittsalter von etwa 73 Jahren waren zumindest in diesem Studienkollektiv eher ältere Menschen von einer peripheren arteriellen Verschlusskrankung betroffen. Es fielen bei den asymptomatischen Patienten längere Gerinnungszeiten auf, die mit einer vermehrten Einnahme von Gerinnungshemmern erklärt werden konnten. Aufgefallen ist außerdem eine geringere GFR bei asymptomatischen Patienten.

Tendenziell zeigten asymptomatische Patienten bessere Flussprofile und eine geringere Rate an Stenosen und Verschlüssen, jedoch ohne statistisch signifikante Effekte, womit eine eher homogene Gesamtpatientenpopulation gesehen wurde. Erwartungsgemäß bestand ein großer Unterschied im Hinblick auf die schmerzfreie Gehstrecke, die ein Unterscheidungskriterium der Patientengruppen darstellte. Die Lebensqualität wurde durch asymptomatische Patienten interessanterweise deutlich besser beurteilt als durch symptomatische. Zum Follow-up bestand dieser Unterschied nicht mehr, es hatte aber ein Großteil der symptomatischen Patienten inzwischen auch einen Eingriff erhalten, der eine Symptomverbesserung zur Folge hatte. Mit acht Studienabbruchern und vier verstorbenen Patienten war das Follow-up-Kollektiv deutlich kleiner. Es gab drei Konversionen eines asymptomatischen in

ein symptomatisches Stadium. Da die Auswertung von stabil asymptomatischen versus symptomatischen Patienten jedoch mit den Ergebnissen der Gesamtkohorte übereinstimmte, konnten die Gruppeneinteilungen bestätigt werden. Bezüglich der Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten stellten sich keine größeren Unterschiede dar, tendenziell bewegten sich die symptomatischen Patienten etwas mehr. Hinsichtlich der Konzentrationen von VEGF, Interleukin-6, hs-CRP und CXCL4 fanden sich keine relevanten Unterschiede. Die Werte korrelierten jedoch zum Teil mit dem Vorkommen von Monozytenoberflächenmarkern. Bei den Zellzahlen und den Relationen der untersuchten Zellarten zueinander wurden keine Unterschiede festgestellt. Es konnten tendenziell mehr nicht-klassische Monozyten bei den symptomatischen Patienten gefunden werden, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Im Hinblick auf die Ausprägung einzelner Monozytenoberflächenmarker zeigten sich Unterschiede bei CD11c, CD163, CD191, HLA-DR und CD16, CCR5, CD202b sowie CD40. Die Unterschiede fielen nur für CD11c vermehrt bei symptomatischen und CD202b vermehrt bei asymptomatischen Patienten auf allen Monozyten sowie auf den klassischen Monozyten signifikant aus. CD40 wurde nur auf den nicht-klassischen Monozyten symptomatischer Patienten vermehrt exprimiert. Es konnten anhand aller verwendeter Marker vier Monozytensubgruppen herausgearbeitet werden, die sich bei den beiden Patientengruppen deutlich unterschieden. Eine Wechselbeziehung (Korrelation) wurde am deutlichsten bei CD11c mit klinischen Parametern gesehen.

#### **4.2 Die klassischen Monozytensubgruppen im Kontext der Atherosklerose**

In dieser Studie ergaben sich zwischen asymptomatischen und symptomatischen pAVK-Patienten keine Unterschiede hinsichtlich der Gesamtmonozytenzahlen. In der Literatur werden Erhöhungen der Monozytenzahlen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko,<sup>197</sup> aber auch mit verbesserter Entwicklung von Kollateralen in Verbindung gebracht.<sup>143,229</sup> Anhand dessen lässt sich unsere Beobachtung am ehesten durch die Homogenität des Gesamtpatientenkollektivs erklären, das in seiner Gesamtheit von der Atherosklerose betroffen ist. Im Hinblick auf sich unterscheidende Kompensationsmechanismen scheint ein differenzierterer Blick auf die Expression einzelner Marker notwendig zu sein.

Ebenfalls sahen wir keinen signifikanten Frequenzunterschied in den durch CD14 und CD16 definierten klassischen Monozytensubgruppen. Die Funktion dieser drei Subgruppen wird kontrovers diskutiert und einige Studien kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen, was wohl vor allem dem unterschiedlichen Studiendesign geschuldet ist.<sup>197</sup> Da der gegenwärtige Forschungsstand zu Monozytenpopulationen im Rahmen der pAVK äußerst limitiert ist, wurden Forschungsarbeiten zu anderen atherosklerotischen Erkrankungen miteinbezogen. Demnach sind klassische Monozyten an der frühen Entstehung atherosklerotischer Plaques beteiligt, indem sie von CCL2 angezogen werden.<sup>198,199,230</sup> Dies ist kongruent zum Ergebnis dieser Studie, dass der Chemokin-Rezeptor 2 vorwiegend auf klassischen Monozyten exprimiert wurde. Im Kontext der Malmö Diet and Cancer study wurden klassische Monozyten als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert. Die Monozyten waren aus zuvor tiefgefrorenen Patientenproben isoliert und per Durchflusszytometrie gemessen worden.<sup>202</sup> Für beide Patientengruppen besteht demnach also ein ähnliches kardiovaskuläres Risiko. Passend dazu waren, wie oben beschrieben, auch die zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos verwendbaren ABI-Werte ähnlich.

Intermediären Monozyten wird eine wichtige Rolle in Bezug auf die Plaquevulnerabilität und -kalzifizierung zugeschrieben.<sup>231</sup> Durch Ausprägung proangiogener Substrate und Marker sollen sie zudem besonders stark an der Revaskularisierung beteiligt sein.<sup>196,232</sup> Wir konnten in dieser Studie zwar eine starke Expression des proangiogenen Markers CD202b auf intermediären Monozyten beobachten, doch bestand diese ebenfalls auf klassischen Monozyten. Ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen asymptomatischer und symptomatischer Patientengruppe betraf spannenweise die klassischen Monozyten, womit diese CD202b-positiven klassischen Monozyten für körpereigene Kompensationsmechanismen viel eher von Relevanz zu sein scheinen (siehe Folgekapitel). Wildgruber et al. untersuchten die Rolle intermediärer Monozyten direkt bei pAVK-Patienten, was eine bessere Vergleichbarkeit mit dieser Studie ermöglicht. Die Arbeitsgruppe stellte einen Anstieg intermediärer Monozyten mit Zunahme des pAVK-Stadiums fest.<sup>233</sup> Einen derartigen Anstieg beobachteten wir beim Vergleich von Patienten der pAVK-Stadien I und II nach Fontaine nicht. Es könnte jedoch sein, dass Patienten dieser beiden Stadien eine ähnliche Atheroskleroseausprägung aufweisen, während sich diese in höheren Stadien verändert. Beide Gruppen unterschieden sich nicht signifikant

hinsichtlich der angiologischen Messwerte trotz ausgeprägt unterschiedlichem Symptommniveau.

Interessanterweise zeigte sich bei den nicht-klassischen Monozyten eine deutliche Tendenz zu vermehrtem Vorkommen bei symptomatischen Patienten, die mit  $p=0,1017$  jedoch nicht signifikant ausfiel. Es gibt einige Forschungsarbeiten zur Funktion dieser Monozytensubgruppe. So wurde im Rahmen der koronaren Herzkrankheit bereits ein erhöhtes Vorkommen nicht-klassischer Monozyten mit einer endothelialen Dysfunktion und erhöhtem oxidativem Stress in Verbindung gebracht.<sup>234</sup> Zudem scheinen nicht-klassische Monozyten eine übergeordnete Rolle bei der Aufnahme von LDL-Cholesterin zu spielen.<sup>235</sup> Dahingegen wurden in Mäusen, die ein Defizit an klassischen Monozyten, nicht aber an nicht-klassischen Monozyten aufwiesen, kleinere atherosklerotische Läsionen und geringere Zahlen apoptotischer Zellen gefunden,<sup>236</sup> was wiederum eine protektive Wirkung vermuten lässt. Narasimhan und Kollegen unterstützten diese These mit der Beobachtung eines protektiven Effektes nicht-klassischer Monozyten im Mausmodell.<sup>178</sup> Quintar et al. fanden heraus, dass nicht-klassische Monozyten eine wichtige Funktion bei der Gefäßpatrouillierung einnehmen und in atherosklerotischer Umgebung erhöht sind.<sup>237</sup> Ihre Rekrutierung scheint von CCR5 abhängig zu sein.<sup>198</sup> CCR5 ist ein Rezeptor, der ebenfalls auf den Monozyten symptomatischer Patienten tendenziell erhöht war.

Es wird deutlich, dass aktuell kontroverse Meinungen zur Atherosklerose-fördernden bzw. schützenden Wirkung nicht-klassischer Monozyten bestehen. Das tendenziell erhöhte Vorkommen bei symptomatischen Patienten weist darauf hin, dass diese Monozyten zum Atheroskleroseprozess beitragen und ein geringeres Vorkommen eher zu einer verringerten Atherosklerose oder auch besseren Kompensationsmechanismen führt. Dass der Effekt jedoch nicht signifikant war und zugleich mit nicht signifikant unterschiedlichen angiologischen Parametern einherging, spricht für keine großen Unterschiede der Atheroskleroseausprägung im Gesamtpatientenkollektiv. Parameter der pAVK-Schwere korrelierten nicht mit der Anzahl nicht-klassischer Monozyten. Insgesamt sahen wir also im Gegensatz zu anderen Forschungsarbeiten keinen relevanten Unterschied nicht-klassischer Monozyten. Eine erhöhte endotheliale Dysfunktion und oxidativer Stress könnten auch körpereigene Kompensationsmechanismen, wie zum Beispiel eine Kollateralenbildung, beeinträchtigen. Hierzu liegen bislang keine spezifischen Forschungsarbeiten vor,

weshalb eine weitere Untersuchung dieser offenbar hoch relevanten Monozyten-subgruppe interessant ist. So konnte bei Patienten mit KHK bereits gezeigt werden, dass bessere Kollateralen vorliegen, wenn mehr klassische Monozyten vorhanden sind.<sup>229</sup> Die Rolle nicht-klassischer Monozyten auch im Rahmen der pAVK ist hingegen unklar.

### **4.3 Bedeutung von CD11c, CD202b sowie CD40**

Wie oben beschrieben, fielen bei den Patientenkollektiven Unterschiede hinsichtlich bestimmter Oberflächenmarker auf, die hier näher diskutiert werden sollen.

CD11c als charakteristischer Oberflächenmarker reifer Monozyten<sup>238</sup> lag vermehrt bei symptomatischen Patienten vor. Er kommt auf Monozyten, aber auch auf dendritischen Zellen und Makrophagen vor.<sup>239</sup> CD11c ist ein Integrin und für die Monozytenadhäsion an Fibrinogen und eine Entzündungsreaktion entscheidend.<sup>240</sup> Thomas et al. stellten bei gesunden Menschen eine vermehrte Expression auf intermediären und nicht-klassischen Monozyten im Vergleich zu klassischen fest.<sup>182</sup> Die erhöhte Expression auf intermediären und nicht-klassischen Monozyten konnte in dieser Studie bei beiden Patientengruppen bestätigt werden. Dahingegen wurden Unterschiede in der CD11c-Expression zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten bei den Gesamtmonozyten und den klassischen Monozyten gefunden. Der Marker ist bei Hypercholesterinämie erhöht.<sup>241</sup> Da bezüglich der Lipidwerte aber kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen vorlag, muss dem beobachteten Expressionsunterschied eine andere Ursache zugrunde liegen. CD11c scheint entscheidend an der Entwicklung der Atherosklerose beteiligt zu sein, da die für die Atherosklerose entscheidenden Prozesse bei Verringerung des Integrins nicht so stark ausgeprägt sind (verringerte Monozytenadhäsion, verringerte Monozytenanhäufung in atherosklerotischen Läsionen, verringerte Atheroskleroseentwicklung).<sup>241</sup> Da CD11c bei symptomatischen Patienten deutlich erhöht vorlag, könnte dies auf eine verstärkte atherosklerotische Aktivität hinweisen. CD11c lässt sich durch Gehtraining absenken.<sup>242</sup> Ein strukturiertes Gehtraining wurde in dieser Studie nicht erfasst, sondern die Alltagsaktivität. In der allgemeinen Aktivität jedoch bestand kein signifikanter Unterschied und sogar eine Tendenz zu erhöhter Aktivität bei symptomatischen Patienten. Trotzdem ist es interessant, dass eine Intervention wie Gehtraining, welches bekanntermaßen die Symptomatik der pAVK reduziert, auch mit einer Reduktion an CD11c-exprimierenden Monozyten

einhergeht. Auch wir haben in dieser Studie eine geringere CD11c-Expression bei weniger symptomatischen, beziehungsweise gänzlich asymptomatischen Patienten gesehen. Damit scheint die Untersuchung von CD11c auf Monozyten ein vielversprechender Ansatzpunkt für das bessere Verständnis der körpereigenen Kompensationsmechanismen bei pAVK zu sein. Studien hierzu liegen bislang nicht vor.

CD202b, auch Tie-2 oder Angiopoetin-Rezeptor-1 genannt und als Rezeptor-Tyrosinkinase wirksam,<sup>232</sup> kam signifikant häufiger bei asymptomatischen Patienten vor. Der Rezeptor wird sowohl in Homöostase als auch im aktivierten Endothel produziert, was einerseits auf eine pro-angiogene und andererseits eine instand haltende Funktion hinweist.<sup>196,243</sup> Hauer et al. erzielten im Mausmodell eine Reduktion der Atherosklerose durch Impfung gegen CD202b.<sup>244</sup> Dahingegen zeigten Anisimov et al. sowohl bei an KHK erkrankten Patienten als auch bei muriner Atherosklerose, dass CD202b atheroprotektiv wirkt. Eine Ausschaltung der Rezeptor-Tyrosinkinase führt demnach zur Verstärkung der Atherosklerose durch vermehrte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, Ansammlung von Immunzellen und eine Entzündungsreaktion.<sup>245</sup> Die erhöhte CD202b-Expression auf Monozyten asymptomatischer pAVK-Patienten lässt zum einen darauf schließen, dass CD202b tatsächlich protektiv gegenüber einer Atherosklerose wirkt, aber ggf. auch durch sein pro-angiogenes Potential körpereigene Kompensationsmechanismen unterstützt und dadurch zur Asymptomatik beiträgt. Dass dieser Unterschied besonders auch beim Vergleich der klassischen Monozytenpopulationen auffiel, bestätigt die in der Literatur beschriebene Teilhabe klassischer Monozyten an der Kollateralenbildung.<sup>229</sup> Im Umkehrschluss lässt diese Beobachtung die Folgerung zu, dass asymptomatische pAVK-Patienten unter anderem durch die vermehrte Expression CD202b-positiver klassischer Monozyten eine verbesserte Kompensation hochgradiger Stenosen, möglicherweise durch eine vermehrte Kollateralisierung, aufweisen. Passend zu der oben diskutierten Expressionsabnahme von CD11c durch Gehtraining wurde ein Gehtraining mit erhöhter CD202b-Expression in Verbindung gebracht.<sup>246</sup> Da Gehtraining letztlich eine Symptom-reduzierende Intervention darstellt, scheint CD202b an der Symptomkompensation entscheidend beteiligt zu sein. Wir beobachteten dies ebenfalls durch eine erhöhte CD202b-Expression bei asymptomatischen Patienten. Bei pAVK-Patienten mit chronisch-kritischer Ischämie wurde festgestellt, dass CD202b bei erhöhten Entzündungsparametern abnimmt.<sup>247</sup> Dies

sollte zwar mit Vorsicht im Hinblick auf das bei unseren Patienten andere pAVK-Stadium betrachtet werden, doch ist es interessant, dass unsere Patienten bei nicht unterschiedlichen Entzündungswerten einen relevanten Unterschied der CD202b-Expression aufwiesen. Die Studienautoren kommen zu dem Schluss, dass Entzündungen eine Verstärkung der pAVK bewirken. Beide Gruppen der LUERPAD-Studie sind damit in Bezug auf die entzündungsabhängige pAVK-Schwere homogen.

CD40 gilt als wichtiger Immuncheckpoint und existiert in löslicher sowie membran-gebundener Form. CD40 wird auf einer Vielzahl von Zellen, insbesondere B-Zellen und myeloiden Zellen, exprimiert und führt zur Aktivierung des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems.<sup>248</sup> CD40-aktivierten Monozyten wurde eine pro-inflammatorische Eigenschaft zugesprochen.<sup>249</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung von CD40-Signalwegen zu einer Abmilderung der Atherosklerose führt, da dieses mitverantwortlich für Plaqueprogression und Entzündung ist.<sup>250</sup> Eine Interaktion von Monozyten und T-Zellen inklusive der gegenseitigen Aktivierung ist durch CD40-Bindung möglich. Die Produktion von IL-12, IL-1 $\beta$  sowie weiterer Chemo- und Zytokine wird angeregt.<sup>251,252</sup> Eine Erhöhung der Expression des CD40-Rezeptors auf untersuchten nicht-klassischen Monozyten bei symptomatischen Patienten lässt darauf schließen, dass die auch schon im Rahmen von CD11c angenommene erhöhte Atheroskleroseaktivität vorliegt sowie eine Symptomatik durch zunehmende Gefäßokklusion hervorgerufen wird. Da die angiologischen Parameter zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten jedoch nicht signifikant unterschiedlich waren, weist dies auf Kompensationsmechanismen bei asymptomatischen Patienten hin, die der atherosklerotischen Aktivität und einer Endotheldysfunktion entgegenwirken. Trotz der entzündungsfördernden Wirkung von CD40 sahen wir keine Unterschiede hinsichtlich Entzündungsparametern wie IL-6 und hsCRP.

Es zeigt sich also, dass Marker, die für eine Atheroskleroseprogression mitverantwortlich sind, bei symptomatischen Patienten hochreguliert waren, während CD202b, ein für die Angiogenese entscheidender Angiopoetin-Rezeptor, bei den asymptomatischen Patienten im Vordergrund stand. Dies spricht für verbesserte körpereigene Kompensationsmechanismen.

Bei den Korrelationsberechnungen fiel insbesondere bei CD11c eine Clusterbildung auf. Diese verhielt sich für asymptomatische und symptomatische Patienten entgegengesetzt. Damit wird der oben detektierte Unterschied der beiden Patientengruppen hier bestätigt. CD11c auf Monozyten scheint für endogene Kompensationsmechanismen bei pAVK eine entscheidende Rolle zu spielen. Es lohnt sich, diesem Effekt in der Zukunft mechanistisch auf den Grund zu gehen.

#### **4.4 Marker mit Unterschieden, die nicht signifikant ausfielen**

CD16 ist ein Fc-Rezeptor des Immunglobulin G und an der Bildung von Immunkomplexen sowie der Phagozytose beteiligt.<sup>181</sup> Eine Tendenz zu erhöhter Expression lag bei symptomatischen Patienten vor, der Unterschied war mit  $p=0,08$  für Panel 1 und  $p=0,12$  für Panel 2 jedoch nicht signifikant. CD16 definiert intermediäre und nicht-klassische Monozyten.<sup>197</sup> In früheren Forschungsarbeiten wurde eine Zunahme der intermediären Monozytenpopulation bei schwerer pAVK festgestellt.<sup>233</sup> Interessanterweise zeigte sich in dieser Studie zwischen asymptomatischen und symptomatischen pAVK-Patienten kein Unterschied intermediärer Monozyten, was für eine homogene pAVK-Ausprägung spricht. Auch scheinen die intermediären Monozyten somit keinen wesentlichen Anteil an körpereigenen Kompensationsmechanismen zu haben. Bezüglich der nicht-klassischen Monozyten konnte hingegen eine Tendenz zu stärkerer Expression bei symptomatischen Patienten gesehen werden. Der Unterschied fiel mit  $p=0,10$  für beide Panels jedoch nicht signifikant aus. Die nicht-klassische Monozytenpopulation ist an einer endothelialen Dysfunktion beteiligt.<sup>234</sup> Die beobachtete Tendenz könnte auf eine erhöhte Atheroskleroseaktivität und Dysfunktionalität bei symptomatischen Patienten hinweisen und sollte weiter untersucht werden.

CD191, auch CCR1 (Chemokin-Rezeptor 1) genannt, wird vor allem auf klassischen Monozyten, weniger auf intermediären und gar nicht auf nicht-klassischen Monozyten gesunder Menschen exprimiert.<sup>253</sup> Bei unserem Patientenkollektiv wurde die stärkste Expression ebenfalls auf klassischen Monozyten beobachtet. Zusätzlich kam der Rezeptor aber auch auf nicht-klassischen Monozyten vor. Im Hinblick auf Atherosklerose-fördernde Eigenschaften nicht-klassischer Monozyten sowie des Rezeptors CD191 wirkt eine zusätzliche Expression auf dieser Monozytensubgruppe plausibel. Die Expression scheint mit der Entwicklung einer Atherosklerose assoziiert zu sein.<sup>239</sup> CD191 ist wichtig für die Rekrutierung von Immunzellen und

Monozyten werden insbesondere in der frühen Phase der Plaquebildung durch CD191 rekrutiert.<sup>236,239</sup> Insofern könnte ein Vorliegen der Atherosklerose sowohl beim asymptomatischen als auch beim symptomatischen Patientenkollektiv die Expression auch auf nicht-klassischen Monozyten erklären. Anhand dieses Markers ist kein deutlicher Atherosklerose-Aktivitätsunterschied beider Gruppen bei ähnlichem Expressionsmuster ersichtlich.

CD163, ein Hb-scavenger (Fresszellen-) Rezeptor,<sup>254</sup> wurde durch asymptomatische und symptomatische pAVK-Patienten ähnlich exprimiert. Es ist bekannt, dass der Rezeptor vorwiegend auf klassischen und intermediären Monozyten vorkommt.<sup>183</sup> In dieser Studie wurde dies bestätigt. CD163+-Makrophagen sind an einer lipidunabhängigen Atheroskleroseentwicklung insofern beteiligt, als dass sie die VCAM-Expression in der Plaque sowie die Entzündungsintensität erhöhen. Dies führt zu einer erhöhten Plaqueprogression sowie HIF-1 $\alpha$ - und VEGF-A-Expression. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Angiogenese in der Plaque, zu erhöhter Gefäßpermeabilität und einer Ansammlung von Entzündungszellen.<sup>255</sup> Hinsichtlich dieser Eigenschaften scheinen sich die beiden Patientengruppen also sehr ähnlich zu sein und CD163 bei der Symptom-Kompensation keine ausgeprägte Rolle zu spielen. Auch passt dies dazu, dass hinsichtlich der gemessenen Entzündungsparameter sowie des Wachstumsfaktors VEGF keine Unterschiede bestanden.

HLA-DR, ein humanes Leukozyten-Antigen vom DR-Isotyp, ist ein MHC-II-Zelloberflächenrezeptor zur Antigenpräsentation.<sup>256</sup> Dieser lag marginal erhöht bei symptomatischen Patienten vor, der Unterschied war jedoch nicht signifikant, weshalb kein Einfluss auf die unterschiedliche Atheroskleroseentwicklung und Kompensationsmechanismen vermutet werden kann. Wir beobachteten eine sehr starke Expression auf intermediären Monozyten, wohingegen nur ein kleiner Anteil klassischer und nicht-klassischer Monozyten HLA-DR aufwies. Kürzlich fanden Connaughton et al. bei einer Studie zu Monozyten übergewichtiger und nicht-übergewichtiger Probanden heraus, dass eine Subdifferenzierung humaner intermediärer Monozyten anhand der HLA-DR Expression möglich ist und diese Expression offenbar mit Funktionen wie Adhärenz und Lipidaufnahme jeweiliger Monozyten zusammenhängt.<sup>257</sup> Eine weitergehende Untersuchung dieser Funktionsunterschiede wäre sicherlich auch im Rahmen der pAVK spannend.

CCR5 wurde zunächst als Ko-Rezeptor von Makrophagen im Rahmen der HIV-Infektion entdeckt,<sup>258</sup> spielt aber auch bei der Atherosklerose im Sinne einer progressionsfördernden Wirkung eine starke Rolle.<sup>259</sup> Der Ko-Rezeptor ist beteiligt an der Rekrutierung von Monozyten in die atherosklerotische Plaque.<sup>236</sup> Sein ähnliches Vorkommen bei asymptomatischen und symptomatischen Patienten weist auf eine ähnliche Atheroskleroseaktivität hin. Spannend ist aber, dass bei Einzelbetrachtung nicht-klassischer Monozyten eine deutliche Tendenz zu verstärkter CCR5-Expression bei symptomatischen Patienten bestand. Der Unterschied war mit  $p=0,08$  zwar nicht signifikant, aber doch auffällig im Vergleich zu klassischen und intermediären Monozyten. CCR5 ist, wie oben beschrieben für die Rekrutierung insbesondere nicht-klassischer Monozyten notwendig. In der Gesamtbetrachtung wird damit deutlich, dass nicht-klassische, CCR5-reiche Monozyten offenbar einen Beitrag zur Symptomatik leisten.

CD36, auch Fettsäuretranslokase oder Glykoprotein IV genannt, gehört zur Familie der B2-scavenger Rezeptoren. Er ist relevant für die Aufnahme langkettiger Fettsäuren und die Bildung von Schaumzellen.<sup>260,261</sup> Eine deutlich erhöhte Expression konnte bei fortgeschrittener Atherosklerose beobachtet werden.<sup>262</sup> Ebenfalls scheint CD36 an weiteren Entzündungsreaktionen beteiligt zu sein.<sup>260</sup> Es bestand zwischen den hier untersuchten Patientengruppen kein Expressionsunterschied. CD36 wurde in beiden Gruppen vor allem auf klassischen und intermediären Monozyten exprimiert. Damit ist kein Atherosklerose-Aktivitätsunterschied oder eine Beeinflussung der Symptom-Kompensation alleinig durch CD36 anzunehmen.

Bezüglich CCR2 (Chemokin-Rezeptor 2, auch CD192 genannt) zeigte sich in dieser Studie kein Expressionsunterschied zwischen Monozyten asymptomatischer und symptomatischer Patienten. Der Chemokin-Rezeptor wurde in beiden Gruppen vorwiegend auf klassischen Monozyten exprimiert, weniger auf intermediären und kaum auf nicht-klassischen Monozyten. Generell wird CCR2 auf Monozyten und zum Teil auch auf T-Lymphozyten exprimiert und befindet sich damit vorwiegend in Blut, Milz und Knochenmark.<sup>230</sup> Der zu CCR2 gehörende Ligand CCL2 ist ein Chemokin, das Monozyten-Chemotaxis und T-Lymphozyten-Differenzierung reguliert und sich in multiplen Organen des Körpers befindet.<sup>230,263</sup> Das Liganden-Rezeptor-Paar ist an der Bewegung von Monozyten im Rahmen einer Entzündung, der Migration von Monozyten sowie weiteren Immunzellen in die Gefäßwand<sup>264</sup> und damit

Aktivierung der Atherosklerose beteiligt. Ebenfalls wurden CCR2 und sein Ligand mit der Plaquevulnerabilität in Verbindung gebracht.<sup>265</sup> CCR2 kann aber auch andere Liganden aus der Chemokinfamilie binden, deren Rolle bislang noch weitgehend ungewiss ist.<sup>230</sup> Die ähnliche CCR2-Expression durch asymptomatische und symptomatische Patienten lässt eine ähnliche Atheroskleroseaktivität vermuten. CCR2 scheint nicht entscheidend an körpereigenen Kompensationsmechanismen mitzuwirken.

CX3CR1 wurde auf nicht-klassischen Monozyten symptomatischer Patienten tendenziell vermehrt exprimiert, der Unterschied war mit  $p=0,11$  jedoch nicht signifikant. Bei Betrachtung aller Monozyten ergab sich ein sehr ähnliches Expressionsmuster beider Patientengruppen. CX3CR1 ist auch als Fractalkine-Rezeptor bekannt. Der Rezeptor wurde im Mausmodell und auch im menschlichen Organismus als wichtige Komponente zur Wiederherstellung der Durchblutung in ischämischem Gewebe mittels Gefäßneubildung identifiziert.<sup>266</sup> Die in dieser Studie beobachtete vermehrte Expression auf nicht-klassischen Monozyten symptomatischer Patienten ist umso interessanter. In anderen Forschungsarbeiten wurden humane CX3CR1-exprimierende, nicht-klassische Monozyten identifiziert, die mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert sind<sup>267,268</sup> und im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von CX3CR1 zu verminderter Atherosklerose führt.<sup>269</sup> Unsere Beobachtung einer Tendenz zu vermehrter CX3CR1-Expression auf nicht-klassischen Monozyten symptomatischer Patienten spricht damit eher für eine durch diese Monozyten verstärkte Atherosklerose. Körpereigene Kompensationsmechanismen scheinen durch diese Monozyten nicht in für die Symptomatik ausschlaggebendem Maße beeinflusst zu werden.

Es gibt Studien, die einen Zusammenhang zwischen Monozytenzahlen und der Atheroskleroseprogression herstellen.<sup>270</sup> Anhand der hier erhobenen Daten lässt sich fragen, ob der Zusammenhang nicht genauer durch die Größe bestimmter Monozytenuntergruppen bzw. die Expression bestimmter Oberflächenmarker beschrieben werden kann.

Die zuletzt diskutierten Oberflächenmarker boten keinen signifikanten Unterschied. Tendenzen und auch ähnliche Expressionsmuster erschienen dennoch erwähnenswert. Um zu untersuchen, ob diese Tendenzen tatsächlich relevant sind und Unter-

schiede zwischen beiden Gruppen nicht nur zufällig gefunden wurden, wären weitere, größere und langfristige Studien notwendig.

#### **4.5 Was sagen die 4 gebildeten Subgruppen aus?**

Wir arbeiteten zusätzlich Subgruppen heraus, die durch verschiedene Markerexpressionen beider Patientengruppen gekennzeichnet waren. Hier fiel auf, dass klassische Monozyten mit dem Profil CD191, CD163, CD11c, CCR2 und CD36 verstärkt bei symptomatischen Patienten vorkamen, explizit ohne bzw. mit geringer CD202b-Expression. Es handelt sich hier also um Monozyten, die früh an der Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque beteiligt sind.<sup>230,236,239,241,255,262,264</sup> Außerdem fanden sich nicht-klassische Monozyten, die reich an CD11c bei schwacher CD202b-Expression waren, vermehrt bei den symptomatischen Patienten. Dies spiegelt also ebenfalls ein Atherosklerose-begünstigendes Profil der Monozyten wider.<sup>241</sup> Klassische Monozyten, die durch CD202b geprägt waren, also mit starker Expression eines proangiogenen Markers,<sup>245</sup> wurden hingegen vermehrt bei asymptomatischen Patienten nachgewiesen. Zusätzlich konnten klassische Monozyten identifiziert werden, die mit CD11c, CD36 und CCR2 Marker zur Atheroskleroseprogression exprimierten und vermehrt bei symptomatischen Patienten vorlagen.

Die Ergebnisse der Subgruppenanalyse lassen darauf schließen, dass weniger die klassischen Monozytensubgruppen (klassisch, intermediär, nicht-klassisch), sondern vielmehr durch zusätzliche Oberflächenmarker definierte Monozytensubgruppen entscheidend für die Krankheitsausprägung sind. Außerdem lässt sich die Annahme verbesserter körpereigener Kompensationsmechanismen asymptomatischer Patienten, anhand dieser Unterschiede befürworten. Zur sicheren Bestätigung sollten jedoch weitere Studien auch mit simultaner Bildgebung zum Nachweis von Kollateralen durchgeführt werden.

## 4.6 Limitationen

Bei der Durchführung dieser Studie gab es einige Herausforderungen, die an dieser Stelle thematisiert werden sollen.

Insgesamt zeigte sich eine hohe Variabilität der Markerexpression auf Monozyten, so zum Beispiel bei CCR2. Diese wird unter anderem durch das Kollektiv älterer, oft multimorbider Patienten erklärbar sein. Möglicherweise wurden dadurch aber bei hoher Streuung der Markerexpression Unterschiede zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten maskiert, die bei einer größeren Studienpopulation aufgefallen wären. Durch streng angelegte Ein- und Ausschlusskriterien war die Rekrutierung einerseits schwierig, andererseits wurde dadurch aber auch ein homogenes Kollektiv erreicht. Störfaktoren wie veränderte Monozytenpopulationen, die zum Beispiel beim Diabetes mellitus<sup>197</sup> auftreten, konnten somit von vornherein eliminiert werden. Biologische Unterschiede wurden durch ein Alters- und Geschlechtsmatching reduziert.

Hinsichtlich der Studiendurchführung war die Patientenbefragung durch eine konstante Person von Vorteil, da ein nicht vermeidbarer systematischer Fehler so gleichgerichtet bei beiden Patientengruppen anzunehmen ist und eine Befragung möglichst identisch durchgeführt wurde. Durch eine Verblindung könnte an dieser Stelle eine noch höhere Verlässlichkeit erzielt werden, wofür jedoch mehr Personal für Screening, Studieneinschluss, Befragung und klinische Untersuchung benötigt würde. Um möglichst viele Patienten für die Studie zu gewinnen und zu erhalten, wurden auch Hausbesuche durchgeführt. Die hierbei im Vergleich zum stationären Aufenthalt veränderte Kontextsituation könnte zu Änderungen bei Angaben zum Beispiel zur Lebensqualität geführt haben. Das fortgeschrittene Alter einiger Patienten und daraus entstehende Lebensumstände wurden zwar ansatzweise mittels o.g. Fragebögen abgedeckt, dies könnte zur vollständigen Berücksichtigung jedoch z.B. mittels Langform erweitert werden. Im Rahmen der LUERPAD-Studie erschien das unter Abwägung der Studienadhärenz und Informationsgewinnung nicht praktikabel. Zur bestmöglichen Unterscheidung einer pAVK von anderen Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik wurden mehrstufig Fragebögen, klinische Parameter und Funktionstests angewandt. Die schmerzfreie Gehstrecke in Kombination mit einem pathologischen ABI galten schließlich als Kriterien zur Gruppenzuordnung. ABI-Messungen nach Belastung wurden aus Gründen der Praktikabilität nicht durchgeführt. Es wäre jedoch interessant, zu untersuchen, wie sich ABI-Werte ins-

besondere bei asymptomatischen pAVK-Patienten nach Belastung verhalten. Bei einem asymptomatischen Patienten wurde durch ausführliche Anamnese eine Claudicatio spinalis bei simultaner asymptomatischer pAVK diagnostiziert und fachärztlich angiologisch bestätigt. Im Follow-up bestätigte sich diese Einordnung ebenfalls. Die Bestätigung der pAVK-Diagnose im Sinne eines Vier-Augen-Prinzips führte hierbei zu einer Qualitätssteigerung. Um jedoch eine fehlerfreie Zuordnung nicht nur bestmöglich, sondern nahezu sicher zu garantieren, müssten noch weitere bildgebende Verfahren und interdisziplinäre Untersuchungsmethoden sowie ein mehrere Jahre umfassendes Follow-up zur Anwendung kommen.

Zusätzlich zur Diagnosebestätigung ist eine Bildgebung in Form von CT- oder MRT-Angiographie zur Beurteilung der Kollateralisierung essentiell. Wir konnten diese auf Grund des Studiendesigns, mangelnder Kapazitäten sowie ethischer Gründe nicht durchführen. Eine Recherche bezüglich im Vorfeld durchgeführter Bildgebungen ergab bedauerlicherweise nicht ausreichend vergleichbare Befunde. Im Vordergrund stand in dieser Studie der Nachweis immunologischer Unterschiede bei symptomatischer Heterogenität. Wie oben beschrieben scheinen dieser Heterogenität unter anderem verschieden stark ausgeprägte Kollateralkreisläufe zugrunde zu liegen. Mit der beobachteten CD202b-Erhöhung bei asymptomatischen Patienten sahen wir einen Markerunterschied, der auf körpereigene Kompensationsmechanismen hindeutete und mit CD202b einen für die Kollateralenbildung bekannten Marker betraf. Ob diese Patienten nun tatsächlich eine vermehrte Kollateralisierung aufweisen, bleibt jedoch ungewiss.

Eine Blutentnahme erfolgte bei Studieneinschluss und die zu untersuchenden Zellen wurden direkt im Anschluss isoliert, was zu einer hohen Probenqualität durch kurze Stand- und Transportzeiten führte. Studien haben allerdings gezeigt, dass unter anderem Zytokine einer zirkadianen Rhythmik unterliegen<sup>271</sup> und zusätzlich abhängig von der Nahrungsaufnahme sind. So kann zum Beispiel CD11c bei vorübergehender Hypertriglyceridämie erhöht vorliegen.<sup>272,273</sup> Die Blutentnahmen erfolgten zwecks Probenverarbeitung zwar meist am Morgen oder Vormittag, doch wäre eine genauere Eingrenzung hier förderlich gewesen.

Verunreinigungen der Proben oder gerätebedingte Messfehler wurden durch einen täglichen Qualitätscheck, Färbung der Proben mittels Zombie NIR zum Ausschluss toter Zellen, eine große Eventzahl sowie vielschrittiges Gating reduziert und sich zur Qualitätsoptimierung an vorhergegangenen Studien orientiert.<sup>171</sup> Eine Ergebnis-

verzerrung durch manuelle Kompensation und Gatefestlegung kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, wurde aber durch standardisiertes Vorgehen ohne Wissen über die Gruppenzugehörigkeit der Patientenproben reduziert. Die statistische Auswertung erfolgte deskriptiv. Um Aussagen über kausale Zusammenhänge zu treffen wäre eine erhöhte Fallzahl nötig gewesen.

Auffällig waren zudem ein erhöhtes Studieninteresse sowie eine bessere Studienadhärenz bei symptomatischen pAVK-Patienten, was am Ehesten durch den erhöhten Leidensdruck, der die Krankheit „direkt vor Augen führt“ und damit auch studienunabhängige engmaschigere Nachuntersuchungsintervalle zu erklären ist.

#### **4.7 Ausblick**

Es konnte herausgearbeitet werden, dass zwischen asymptomatischen und symptomatischen pAVK-Patienten relevante immunologische Unterschiede bestehen. Bei sehr ähnlichen angiologischen Parametern zeigten sich starke Unterschiede hinsichtlich der pAVK-Symptomatik beider Patientengruppen. Dies scheint auf bessere körpereigene Kompensationsmechanismen asymptomatischer Patienten zurückzuführen zu sein. Es konnte anhand der bei den jeweiligen Gruppen auf Monozyten verstärkt exprimierten Marker festgestellt werden, dass symptomatische Patienten ein Profil Atherosklerose-fördernder Rezeptoren exprimieren, während asymptomatische Patienten ein Angiogenese-förderndes Profil aufweisen. Dies könnte ein therapeutischer Ansatzpunkt zur Minderung von Leiden und dem Risiko schwerer vaskulärer Komplikationen sein. Weitere, auch größere Studien sind diesbezüglich notwendig. Zudem könnten weitere Biomarker und Oberflächenrezeptoren von Monozyten, aber auch andere Immunzellen von Bedeutung sein.

Im Gegensatz zu zahlreichen Studien zur Atherosklerose,<sup>274,275</sup> von denen sich jedoch keine mit diesem spezifischen Patientenkollektiv befasst hatte, sahen wir keine Unterschiede hinsichtlich Entzündungsmarkern wie CRP oder Interleukinen. Dies könnte mit der in beiden Gruppen vorliegenden atherosklerotischen Erkrankung zusammenhängen und zeigt, dass die Grunderkrankung Atherosklerose bei beiden Gruppen nahezu gleich ausgeprägt war.

Hinsichtlich des Studiendesigns könnte der monozentrische Ansatz durch Einbindung mehrerer Standorte deutschland- oder auch weltweit ausgeweitet und so bessere Aussagen über die Gesamtpopulationen, ggf. auch mit Rücksicht auf lokale und ethnische Unterschiede, getroffen werden. Dies würde zudem eine größere

Fallzahl ermöglichen, durch die insbesondere hinsichtlich klinischer Aspekte und Fragebögen zu Themen wie Lebensqualität und Gesundheitsverhalten verlässlichere Aussagen getroffen werden könnten. Auch wäre es auf lange Sicht wünschenswert, nicht nur Patienten mit einem pAVK-Risikoprofil, sondern zufällig aus der Gesamtbevölkerung bestimmte Personen zu untersuchen. Das gewählte Patientenkollektiv ist, wie bereits weiter oben diskutiert, recht schwer zu rekrutieren. Eventuell ist dies auch ein Grund, weshalb keine direkten Vergleichsstudien vorliegen. Die weitere Forschung an diesen Patientengruppen erscheint höchst interessant.

Interessante Forschungsfragen werfen die Zusammenhänge von Symptomausprägung, klinischen Parametern und Rezeptorausprägungen sowie die Tendenz zu Atherosklerose-Progression und Kollateralenentwicklung auf. Die LUERPAD-Studie kann hierzu den Auftakt geben und stellt mögliche Herangehensweisen dar. Die Subgruppeneinteilung könnte erweitert, fortgeführt und bestätigt werden. Therapieansätze zur Atherosklerose-Limitierung und Kollateraleninduktion sind vorstellbar. Eine therapeutische Beeinflussung von Monozytensubgruppen zur Kollateralenbildung und eine zeitgleiche Progressionsreduktion der Atherosklerose können eine Symptomreduktion und Risikominimierung erzielen und sind damit langfristige Ziele.

## 5 Zusammenfassung

Die pAVK ist eine klinische Manifestationsform der Atherosklerose mit global hoher Morbidität, Mortalität und wirtschaftlicher Belastung. Eine für die Stufendiagnostik wesentliche Basismethode ist die Messung des ABIs. Derzeit führt keine gängige Therapie zum langfristigen Sistieren der Symptome. Hinsichtlich der Symptomatik besteht eine ausgeprägte klinische Heterogenität. Für die Asymptomatik einiger Patienten scheint eine vermehrte Kollateralenbildung verantwortlich zu sein. Sowohl an der pAVK-Entstehung als auch an der Kollateralenbildung sind myeloide Zellen entscheidend beteiligt.

Um molekulare Mechanismen der klinischen Heterogenität zu entschlüsseln wurden im Rahmen der LUERPAD-Studie am UKSH Lübeck für diese Arbeit 4000 Patientenakten hinsichtlich Risikofaktoren für eine pAVK unter Berücksichtigung von Ausschlusskriterien, wie Diabetes mellitus, gescreent. Es konnten nach ABI-Messung bei 443 Patienten und angiologischer Diagnosebestätigung schließlich 20 asymptomatische Patienten in die Studie eingeschlossen und 18 symptomatische Patienten dazu gematcht werden. Die Patienten wurden zu pAVK-Symptomatik, Lebensqualität und Gesundheitsverhalten befragt. Es fand eine klinisch-angiologische Untersuchung inklusive Gehstest statt, Laborwerte wurden erhoben und Blut zur Analyse u.a. der Monozytenpopulationen entnommen. Dieses wurde aufbereitet, per Durchflusszytometrie gemessen und nach Gating und Kompensation auf Populationsunterschiede untersucht. Ein Follow-up erfolgte nach 6 und 12 Monaten.

Hinsichtlich klinischer oder laborparametrischer Befunde wurden keine wesentlichen Unterschiede detektiert. Immunologische Unterschiede in Bezug auf Monozyten konnten festgestellt werden. Zwar unterschieden sich die Größen klassischer CD14/CD16-Monozytenpopulationen nicht signifikant, asymptomatische Patienten prägten jedoch Kollateralen-begünstigende Faktoren stärker aus (CD202b). Bei symptomatischen Patienten fiel hingegen eine vermehrte Expression pro-atherosklerotischer Faktoren auf (CD11c, CD40). Zusätzlich konnten vier sich unterscheidende Monozytensubgruppen anhand aller untersuchten Marker identifiziert werden. Damit wurde die ursprüngliche Annahme immunologischer Unterschiede zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten gestützt. Bei Verifizierung durch weitere Studien könnten diese Erkenntnisse für die zukünftige pAVK-Therapie genutzt und eine Übertragbarkeit auf andere atherosklerotische Erkrankungen überprüft werden.



## II. Literaturverzeichnis

1. McGrae McDermott, M. *et al.* Leg Symptoms in Peripheral Arterial Disease. *JAMA* **286**, 1599 (2001).
2. Conte, M. S. *et al.* Global vascular guidelines on the management of chronic limb-threatening ischemia. *J. Vasc. Surg.* **69**, 3S-125S.e40 (2019).
3. WHO-Regionalbüro für Europa. Der Europäische Gesundheitsbericht 2021: Wesentliche Perspektiven. Bestandsaufnahme der gesundheitsbezogenen Ziele für nachhaltige Entwicklung in der COVID-19-Ära unter besonderer Berücksichtigung der Maxime, niemanden zurückzulassen. (2022).
4. Roth, G. A. *et al.* Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**, 1–25 (2017).
5. Smith, S. C. *et al.* Moving From Political Declaration to Action on Reducing the Global Burden of Cardiovascular Diseases. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 2151–2153 (2013).
6. Williams, E. P., Mesidor, M., Winters, K., Dubbert, P. M. & Wyatt, S. B. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr. Obes. Rep.* **4**, 363–370 (2015).
7. Galkina, E. & Ley, K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 165–197 (2009).
8. Thygesen, K. *et al.* Third universal definition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **33**, 2551–2567 (2012).
9. Hirsch, A. T. *et al.* Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* **286**, 1317–24 (2001).
10. Behrendt, C.-A. *et al.* Die Wahrnehmung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) als Volkskrankheit: Behandeln wir nur die Spitze eines riesigen Problems? *Gefäßchirurgie* **28**, 58–60 (2023).
11. Libby, P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature* **592**, 524–533 (2021).
12. Narula, N., Olin, J. W. & Narula, N. Pathologic Disparities Between Peripheral Artery Disease and Coronary Artery Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **40**, 1982–1989 (2020).
13. Agarwal, S. & Naderi, S. Etiopathogenic differences in coronary artery disease and peripheral artery disease: results from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Angiology* **65**, 883–90 (2014).
14. Criqui, M. H. & Aboyans, V. Epidemiology of Peripheral Artery Disease. *Circ. Res.* **116**, 1509–1526 (2015).
15. McDermott, M. M. *et al.* Proximal Superficial Femoral Artery Occlusion, Collateral Vessels, and Walking Performance in Peripheral Artery Disease. *JACC Cardiovasc. Imaging* **6**, 687–694 (2013).
16. Liao, L. & Bai, Y. The dynamics of monocytes in the process of collateralization. *Aging Med. (milt.)* **2**, 50–55 (2019).
17. Duden online. 'Sklerose'. <https://www.duden.de/node/167343/revision/1434356> (2023).
18. Murakami, T. Atherosclerosis and arteriosclerosis. *Hypertens. Res.* **46**, 1810–1811 (2023).
19. Ross, R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126 (1999).
20. Fleiner, M. *et al.* Arterial Neovascularization and Inflammation in Vulnerable Patients. *Circulation* **110**, 2843–2850 (2004).
21. Davies, P. F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.* **75**, 519–60 (1995).
22. Debus, E. S. *et al.* Ursachen und Risikofaktoren der Arteriosklerose. *Gefäßchirurgie* **18**, 544–550 (2013).
23. Ross, R. The arterial wall and atherosclerosis. *Annu. Rev. Med.* **30**, 1–15 (1979).
24. Riccioni, G. & Sblendorio, V. Atherosclerosis: from biology to pharmacological

- treatment. *J. Geriatr. Cardiol.* **9**, 305–17 (2012).
25. Bäck, M., Yurdagul, A., Tabas, I., Öörni, K. & Kovanen, P. T. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 389–406 (2019).
  26. Nording, H. M., Seizer, P. & Langer, H. F. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front. Immunol.* **6**, 98 (2015).
  27. Frostegård, J., Huang, Y. H., Rönnelid, J. & Schäfer-Elinder, L. Platelet-Activating Factor and Oxidized LDL Induce Immune Activation by a Common Mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 963–968 (1997).
  28. Miller, Y. I. *et al.* Oxidation-Specific Epitopes Are Danger-Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity. *Circ. Res.* **108**, 235–248 (2011).
  29. Mehta, J. L. *et al.* Deletion of LOX-1 Reduces Atherogenesis in LDLR Knockout Mice Fed High Cholesterol Diet. *Circ. Res.* **100**, 1634–1642 (2007).
  30. Berliner, J. A. *et al.* Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J. Clin. Invest.* **85**, 1260–1266 (1990).
  31. Shang, D., Liu, H. & Tu, Z. Pro-inflammatory cytokines mediating senescence of vascular endothelial cells in atherosclerosis. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **37**, 928–936 (2023).
  32. Frostegard, J. *et al.* Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 904–908 (1990).
  33. Frostegård, J. *et al.* Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. A J. Vasc. Biol.* **12**, 461–467 (1992).
  34. Atout, R. *et al.* Human group X secreted phospholipase A2 induces dendritic cell maturation through lipoprotein-dependent and -independent mechanisms. *Atherosclerosis* **222**, 367–374 (2012).
  35. Barlic, J., Zhang, Y., Foley, J. F. & Murphy, P. M. Oxidized Lipid-Driven Chemokine Receptor Switch, CCR2 to CX3CR1, Mediates Adhesion of Human Macrophages to Coronary Artery Smooth Muscle Cells Through a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ -Dependent Pathway. *Circulation* **114**, 807–819 (2006).
  36. van der Wal, A. C., Das, P. K., Tigges, A. J. & Becker, A. E. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* **141**, 1427–33 (1992).
  37. Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V & Orekhov, A. N. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J. Mol. Med. (Berl)*. **95**, 1153–1165 (2017).
  38. Sary, H. C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1177–8 (2000).
  39. Sakakura, K. *et al.* Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Hear. Lung Circ.* **22**, 399–411 (2013).
  40. Moroni, F., Ammirati, E., Norata, G. D., Magnoni, M. & Camici, P. G. The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis. *Mediators Inflamm.* **2019**, 1–11 (2019).
  41. Andersson, C., Johnson, A. D., Benjamin, E. J., Levy, D. & Vasan, R. S. 70-year legacy of the Framingham Heart Study. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 687–698 (2019).
  42. Farnier, M., Zeller, M., Masson, D. & Cottin, Y. Triglycerides and risk of atherosclerotic cardiovascular disease: An update. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **114**, 132–139 (2021).
  43. Brook, R. D., Newby, D. E. & Rajagopalan, S. Air Pollution and Cardiometabolic Disease: An Update and Call for Clinical Trials. *Am. J. Hypertens.* **31**, 1–10 (2017).
  44. Münzel, T. Up in the air: links between the environment and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* **115**, e144–e146 (2019).
  45. Drager, L. F. *et al.* Sleep Apnea and Cardiovascular Disease: Lessons From Recent Trials and Need for Team Science. *Circulation* **136**, 1840–1850 (2017).

46. Jaiswal, S. *et al.* Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 111–121 (2017).
47. Makover, M. E., Shapiro, M. D. & Toth, P. P. There is urgent need to treat atherosclerotic cardiovascular disease risk earlier, more intensively, and with greater precision: A review of current practice and recommendations for improved effectiveness. *Am. J. Prev. Cardiol.* **12**, 100371 (2022).
48. Huber, T. S. *et al.* Chronic mesenteric ischemia: Clinical practice guidelines from the Society for Vascular Surgery. *J. Vasc. Surg.* **73**, 87S-115S (2021).
49. Düsing, P. *et al.* Vascular pathologies in chronic kidney disease: pathophysiological mechanisms and novel therapeutic approaches. *J. Mol. Med. (Berl)*. **99**, 335–348 (2021).
50. Lawall, H., Huppert, P. & Rümenapf, G. S3-Leitlinie PAVK - Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. *Vasa* **45**, 1–96 (2016).
51. Aboyans, V. *et al.* 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur. Heart J.* **39**, 763–816 (2018).
52. Fowkes, F. G. R. *et al.* Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* **382**, 1329–1340 (2013).
53. Malyar, N. *et al.* Recent trends in morbidity and in-hospital outcomes of in-patients with peripheral arterial disease: a nationwide population-based analysis. *Eur. Heart J.* **34**, 2706–2714 (2013).
54. Song, P. *et al.* Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Lancet Glob. Heal.* **8**, e721–e729 (2020).
55. Kullo, I. J. *et al.* Ethnic differences in peripheral arterial disease in the NHLBI Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy (GENOA) study. *Vasc. Med.* **8**, 237–242 (2003).
56. Eraso, L. H. *et al.* Peripheral arterial disease, prevalence and cumulative risk factor profile analysis. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **21**, 704–711 (2014).
57. Marrett, E., DiBonaventura, M. daCosta & Zhang, Q. Burden of peripheral arterial disease in Europe and the United States: a patient survey. *Health Qual. Life Outcomes* **11**, 175 (2013).
58. Calo, P. *et al.* Die Epidemiologie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und deren sozioökonomische Bedeutung – Synopse. *Gefässchirurgie* **26**, 81–86 (2021).
59. Poredos, P. & Jug, B. The prevalence of peripheral arterial disease in high risk subjects and coronary or cerebrovascular patients. *Angiology* **58**, 309–15 (2007).
60. Norgren, L. *et al.* Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **33**, S1–S75 (2007).
61. Hirsch, A. T. *et al.* ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic). *J. Vasc. Interv. Radiol.* **17**, 1383–1398 (2006).
62. Dolan, N. C. *et al.* Peripheral Artery Disease, Diabetes, and Reduced Lower Extremity Functioning. *Diabetes Care* **25**, 113–120 (2002).
63. Gardner, A. W. & Afaq, Z. Management of Lower Extremity Peripheral Arterial Disease. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* **28**, 349–357 (2008).
64. Andras, A. & Ferket, B. Screening for peripheral arterial disease. *Cochrane database Syst. Rev.* CD010835 (2014) doi:10.1002/14651858.CD010835.pub2.
65. Cambou, J. P. *et al.* Characteristics and Outcome of Patients Hospitalised for Lower Extremity Peripheral Artery Disease in France: The COPART Registry. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **39**, 577–585 (2010).
66. Bhatt, D. L. *et al.* Comparative Determinants of 4-Year Cardiovascular Event Rates in Stable Outpatients at Risk of or With Atherothrombosis. *JAMA* **304**, 1350 (2010).
67. Kithcart, A. P. & Beckman, J. A. ACC/AHA Versus ESC Guidelines for Diagnosis

- and Management of Peripheral Artery Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 2789–2801 (2018).
68. Conte, S. M. & Vale, P. R. Peripheral Arterial Disease. *Hear. Lung Circ.* **27**, 427–432 (2018).
  69. McDermott, M. M. *et al.* The Ankle Brachial Index Is Associated with Leg Function and Physical Activity: The Walking and Leg Circulation Study. *Ann. Intern. Med.* **136**, 873 (2002).
  70. Hiatt, W. R. *et al.* Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Symposium II. *Circulation* **118**, 2826–2829 (2008).
  71. Criqui, M. H. *et al.* The Ankle-Brachial Index and Incident Cardiovascular Events in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J. Am. Coll. Cardiol.* **56**, 1506–1512 (2010).
  72. Xu, D. *et al.* Diagnostic value of ankle-brachial index in peripheral arterial disease: a meta-analysis. *Can. J. Cardiol.* **29**, 492–8 (2013).
  73. Aboyans, V. *et al.* Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* **126**, 2890–909 (2012).
  74. Frank, U. *et al.* ESVM Guideline on peripheral arterial disease. *Vasa* **48**, 1–79 (2019).
  75. Lawall, H., Luedemann, C. & Fischbach, R. Periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK). *CardioVasc* **14**, 34–40 (2014).
  76. Allan, P. L., Mowbray, P. I., Lee, A. J. & Fowkes, F. G. Relationship between carotid intima-media thickness and symptomatic and asymptomatic peripheral arterial disease. The Edinburgh Artery Study. *Stroke* **28**, 348–53 (1997).
  77. Leiner, T. & Carr, J. C. Noninvasive Angiography of Peripheral Arteries. in *Breast, Heart and Vessels 2019–2022* 223–238 (2019). doi:10.1007/978-3-030-11149-6\_20.
  78. McDermott, M. M. *et al.* Meaningful change in 6-minute walk in people with peripheral artery disease. *J. Vasc. Surg.* **73**, 267-276.e1 (2021).
  79. Kownator, S. *et al.* Prevalence of unknown peripheral arterial disease in patients with coronary artery disease: Data in primary care from the IPSILON study. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **102**, 625–631 (2009).
  80. Lupilov, A., Krause, D., Klaassen-Mielke, R., Trampisch, H. J. & Rudolf, H. Effects of Three Different Methods Defining Onset of Peripheral Artery Disease on the Assessments of Incidence and Important Predictors – Results from the German Epidemiological Trial on Ankle Brachial Index (getABI). *Vasc. Health Risk Manag. Volume 17*, 421–429 (2021).
  81. Hackam, D. G., Goodman, S. G. & Anand, S. S. Management of risk in peripheral artery disease: recent therapeutic advances. *Am. Heart J.* **150**, 35–40 (2005).
  82. Ostergren, J. *et al.* Impact of ramipril in patients with evidence of clinical or subclinical peripheral arterial disease. *Eur. Heart J.* **25**, 17–24 (2004).
  83. Behroozian, A. A. & Beckman, J. A. Asymptomatic peripheral artery disease: Silent but deadly. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **65**, 2–8 (2021).
  84. Kornitzer, M., Dramaix, M., Sobolski, J., Degre, S. & De Backer, G. Ankle/Arm Pressure Index in Asymptomatic Middle-Aged Males: An Independent Predictor of Ten-Year Coronary Heart Disease Mortality. *Angiology* **46**, 211–219 (1995).
  85. Fowkes, G. *et al.* Ankle Brachial Index Combined With Framingham Risk Score to Predict Cardiovascular Events and Mortality. *JAMA* **300**, 197 (2008).
  86. Lawall, H., Huppert, P. & Rümenapf, G. S3-Leitlinie. Periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK), Diagnostik. *Ther. und Nachsorge, Regist.* 3–65 (2015).
  87. Campia, U., Gerhard-Herman, M., Piazza, G. & Goldhaber, S. Z. Peripheral Artery Disease: Past, Present, and Future. *Am. J. Med.* **132**, 1133–1141 (2019).
  88. Kaplovitch, E. *et al.* Rivaroxaban and Aspirin in Patients With Symptomatic Lower Extremity Peripheral Artery Disease. *JAMA Cardiol.* **6**, 21–29 (2020).

89. Anand, S. S. *et al.* Rivaroxaban with or without aspirin in patients with stable peripheral or carotid artery disease: an international, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)* **391**, 219–229 (2018).
90. Espinola-Klein, C. Antithrombotische Therapie bei pAVK und Aortenerkrankungen. *Aktuelle Kardiologie* **11**, 560–564 (2022).
91. Aboyans, V. *et al.* Antithrombotic therapies in aortic and peripheral arterial diseases in 2021: a consensus document from the ESC working group on aorta and peripheral vascular diseases, the ESC working group on thrombosis, and the ESC working group on cardiovascular pharma. *Eur. Heart J.* **42**, 4013–4024 (2021).
92. McDermott, M. M. *et al.* Walking Exercise Therapy Effects on Lower Extremity Skeletal Muscle in Peripheral Artery Disease. *Circ. Res.* **128**, 1851–1867 (2021).
93. Pedersen, B. K. & Saltin, B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **25**, 1–72 (2015).
94. Brown, T. *et al.* Cilostazol for intermittent claudication. *Cochrane database Syst. Rev.* **6**, CD003748 (2021).
95. Meng, Y. *et al.* Cost-effectiveness of cilostazol, naftidrofuryl oxalate, and pentoxifylline for the treatment of intermittent claudication in people with peripheral arterial disease. *Angiology* **65**, 190–7 (2014).
96. Kherallah, R. Y., Khawaja, M., Olson, M., Angiolillo, D. & Birnbaum, Y. Cilostazol: a Review of Basic Mechanisms and Clinical Uses. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **36**, 777–792 (2022).
97. Nordanstig, J. *et al.* Improved Quality of Life After 1 Year With an Invasive Versus a Noninvasive Treatment Strategy in Claudicants. *Circulation* **130**, 939–947 (2014).
98. Karim, S. S. A., Churchyard, G. J., Karim, Q. A. & Lawn, S. D. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* **366**, 1925–1934 (2005).
99. Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Writing Group *et al.* Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication. *J. Vasc. Surg.* **61**, 2S–41S (2015).
100. Patzer, K.-H. PAVK: S3-Leitlinie stärkt konservative Therapie. *MMW - Fortschritte der Medizin* **164**, 26–26 (2022).
101. Cacoub, P. P. *et al.* Cardiovascular risk factor control and outcomes in peripheral artery disease patients in the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *Atherosclerosis* **204**, e86–e92 (2009).
102. Diehm & Trampisch. Definition und Epidemiologie. *Vasa* **38**, 9–12 (2009).
103. Beckman, J. A., Schneider, P. A. & Conte, M. S. Advances in revascularization for peripheral artery disease: revascularization in PAD. *Circ. Res.* **128**, 1885–1912 (2021).
104. Nastasi, D. R. *et al.* The cost-effectiveness of intensive low-density lipoprotein cholesterol lowering in people with peripheral artery disease. *J. Vasc. Surg.* **73**, 1396–1403.e3 (2021).
105. Bonaca, M. P. *et al.* Low-Density Lipoprotein Cholesterol Lowering With Evolocumab and Outcomes in Patients With Peripheral Artery Disease. *Circulation* **137**, 338–350 (2018).
106. Collins, R. *et al.* Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet* **388**, 2532–2561 (2016).
107. Cannon, C. P. *et al.* Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2387–2397 (2015).
108. Ray, K. K. *et al.* Safety and Efficacy of Bempedoic Acid to Reduce LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **380**, 1022–1032 (2019).
109. Ray, K. K. *et al.* Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1430–1440 (2017).
110. Chatterjee, S. *et al.* SGLT-2 Inhibitors and Peripheral Artery Disease: A Statistical

- Hoax or Reality? *Curr. Probl. Cardiol.* **44**, 207–222 (2019).
111. Milton-Laskibar, I., Martínez, J. A. & Portillo, M. P. Current Knowledge on Beetroot Bioactive Compounds: Role of Nitrate and Betalains in Health and Disease. *Foods* **10**, 1314 (2021).
  112. Loffredo, L. *et al.* Dark Chocolate Acutely Improves Walking Autonomy in Patients With Peripheral Artery Disease. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e001072 (2014).
  113. Zankl, A. R. *et al.* Telmisartan improves absolute walking distance and endothelial function in patients with peripheral artery disease. *Clin. Res. Cardiol.* **99**, 787–94 (2010).
  114. McDermott, M. M. *et al.* Effect of Telmisartan on Walking Performance in Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease. *JAMA* **328**, 1315 (2022).
  115. Shah, S. R. *et al.* Canakinumab and cardiovascular outcomes: results of the CANTOS trial. *J. community Hosp. Intern. Med. Perspect.* **8**, 21–22 (2018).
  116. Annex, B. H. & Cooke, J. P. New Directions in Therapeutic Angiogenesis and Arteriogenesis in Peripheral Arterial Disease. *Circ. Res.* **128**, 1944–1957 (2021).
  117. Gao, W., Chen, D., Liu, G. & Ran, X. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 140 (2019).
  118. Gorenoi, V., Brehm, M. U., Koch, A. & Hagen, A. Growth factors for angiogenesis in peripheral arterial disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, (2017).
  119. Forster, R., Liew, A., Bhattacharya, V., Shaw, J. & Stansby, G. Gene therapy for peripheral arterial disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, (2018).
  120. Fung, E. & Helisch, A. Macrophages in collateral arteriogenesis. *Front. Physiol.* **3**, 353 (2012).
  121. Romanelli, M. R., Thayer, J. A. & Neumeister, M. W. Ischemic Pain. *Clin. Plast. Surg.* **47**, 261–265 (2020).
  122. Leaf, A. Cell Swelling. *Circulation* **48**, 455–458 (1973).
  123. Sun, Y., Rawish, E., Nording, H. M. & Langer, H. F. Inflammation in Metabolic and Cardiovascular Disorders-Role of Oxidative Stress. *Life (Basel, Switzerland)* **11**, 672 (2021).
  124. Issberner, U., Reeh, P. W. & Steen, K. H. Pain due to tissue acidosis: a mechanism for inflammatory and ischemic myalgia? *Neurosci. Lett.* **208**, 191–194 (1996).
  125. Hung, C.-H. *et al.* Acidosis-related pain and its receptors as targets for chronic pain. *Pharmacol. Ther.* **247**, 108444 (2023).
  126. Queme, L. F., Ross, J. L. & Jankowski, M. P. Peripheral Mechanisms of Ischemic Myalgia. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 419 (2017).
  127. Cooke, J. P. & Meng, S. Vascular Regeneration in Peripheral Artery Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **40**, 1627–1634 (2020).
  128. Rogacev, K. S. *et al.* CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1512–20 (2012).
  129. Elias, J., Hoebbers, L. P. C., van Dongen, I. M., Claessen, B. E. P. M. & Henriques, J. P. S. Impact of Collateral Circulation on Survival in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention With a Concomitant Chronic Total Occlusion. *JACC Cardiovasc. Interv.* **10**, 906–914 (2017).
  130. Patel, A. A. *et al.* The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* **214**, 1913–1923 (2017).
  131. Choo, G.-H. Collateral Circulation in Chronic Total Occlusions – an interventional perspective. *Curr. Cardiol. Rev.* **11**, 277–284 (2015).
  132. van Royen, N., Piek, J. J., Schaper, W. & Fulton, W. F. A Critical Review of Clinical Arteriogenesis Research. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 17–25 (2009).
  133. Herzog, S., Sager, H., Khmelevski, E., Deylig, A. & Ito, W. D. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **283**, H2012–H2020 (2002).

134. Nording, H. *et al.* The C5a/C5a receptor 1 axis controls tissue neovascularization through CXCL4 release from platelets. *Nat. Commun.* **12**, 3352 (2021).
135. Keeling, A. N. *et al.* Clinical correlates of size and number of collateral vessels in peripheral artery disease. *Vasc. Med.* **17**, 223–230 (2012).
136. Dopheide, J. F. *et al.* Supervised exercise training in peripheral arterial disease increases vascular shear stress and profunda femoral artery diameter. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **24**, 178–191 (2017).
137. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* **9**, 653–660 (2003).
138. Mozaffarian, D. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation* **133**, e38–e48 (2016).
139. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932–936 (2005).
140. Schirmer, S., Royen, N. van, Laufs, U. & Böhm, M. Mechanismen und Möglichkeiten einer therapeutischen Stimulation der Arteriogenese. *DMW - Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **134**, 302–306 (2009).
141. Allahwala, U. K. *et al.* Recruitment and maturation of the coronary collateral circulation: Current understanding and perspectives in arteriogenesis. *Microvasc. Res.* **132**, 104058 (2020).
142. Franck, G. *et al.* Haemodynamic stress-induced breaches of the arterial intima trigger inflammation and drive atherogenesis. *Eur. Heart J.* **40**, 928–937 (2019).
143. Bergmann, C. E. *et al.* Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 59–65 (2006).
144. Ito, W. D. *et al.* Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ. Res.* **80**, 829–37 (1997).
145. Coillard, A. & Segura, E. In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Front. Immunol.* **10**, 1907 (2019).
146. Khan, B., Rangasamy, S., McGuire, P. G. & Howdieshell, T. R. The role of monocyte subsets in myocutaneous revascularization. *J. Surg. Res.* **183**, 963–975 (2013).
147. Silvestre, J.-S., Mallat, Z., Tedgui, A. & Lévy, B. I. Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc. Res.* **78**, 242–9 (2008).
148. Adams, R. H. & Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 464–78 (2007).
149. Silvestre, J.-S. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor-B Promotes In Vivo Angiogenesis. *Circ. Res.* **93**, 114–123 (2003).
150. Ceradini, D. J. *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* **10**, 858–64 (2004).
151. Yoder, M. C. Defining human endothelial progenitor cells. *J. Thromb. Haemost.* **7** **Suppl 1**, 49–52 (2009).
152. Silvestre, J.-S., Smadja, D. M. & Lévy, B. I. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiol. Rev.* **93**, 1743–802 (2013).
153. Meier, P. *et al.* Myocardial salvage through coronary collateral growth by granulocyte colony-stimulating factor in chronic coronary artery disease: a controlled randomized trial. *Circulation* **120**, 1355–63 (2009).
154. Iyer, S. R. & Annex, B. H. Therapeutic Angiogenesis for Peripheral Artery Disease. *JACC Basic to Transl. Sci.* **2**, 503–512 (2017).
155. Mitsos, S. *et al.* Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: basic biological concepts and focus on latest clinical trials. *Angiogenesis* **15**, 1–22 (2012).
156. Bouïš, D., Kusumanto, Y., Meijer, C., Mulder, N. H. & Hospers, G. A. P. A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacol. Res.* **53**, 89–103 (2006).
157. van Royen, N. *et al.* START Trial. *Circulation* **112**, 1040–1046 (2005).
158. Kawamoto, H. & Minato, N. Myeloid cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1374–1379

- (2004).
159. Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327–34 (2014).
  160. Bozhilov, Y. K., Hsu, I., Brown, E. J. & Wilkinson, A. C. In Vitro Human Haematopoietic Stem Cell Expansion and Differentiation. *Cells* **12**, 896 (2023).
  161. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193–7 (2000).
  162. Hassan, H. T. & Zander, A. Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. *Acta Haematol.* **95**, 257–62 (1996).
  163. Doulatov, S. *et al.* Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat. Immunol.* **11**, 585–93 (2010).
  164. Laurenti, E. & Göttgens, B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* **553**, 418–426 (2018).
  165. Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. *Taschenlehrbuch Histologie*. (Georg Thieme Verlag, 2019). doi:10.1055/b-006-163361.
  166. Veglia, F., Sanseviero, E. & Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 485–498 (2021).
  167. Nahrendorf, M. Myeloid cell contributions to cardiovascular health and disease. *Nat. Med.* **24**, 711–720 (2018).
  168. Guilliams, M., Mildner, A. & Yona, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* **49**, 595–613 (2018).
  169. Jakubzick, C. *et al.* Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity* **39**, 599–610 (2013).
  170. Naegeli, O. *Blutkrankheiten und Blutdiagnostik: Lehrbuch der Klinischen Hämatologie*. Springer (1923).
  171. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74–e80 (2010).
  172. Varol, C., Yona, S. & Jung, S. Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol. Cell Biol.* **87**, 30–8 (2009).
  173. Yona, S. & Jung, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 53–9 (2010).
  174. Nossent, A. Y. *et al.* CCR7-CCL19/CCL21 Axis is Essential for Effective Arteriogenesis in a Murine Model of Hindlimb Ischemia. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, e005281 (2017).
  175. Krishnasamy, K. *et al.* Blood vessel control of macrophage maturation promotes arteriogenesis in ischemia. *Nat. Commun.* **8**, 952 (2017).
  176. Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666–70 (2007).
  177. Hamers, A. A. J. *et al.* Human Monocyte Heterogeneity as Revealed by High-Dimensional Mass Cytometry. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 25–36 (2019).
  178. Narasimhan, P. B., Marcovecchio, P., Hamers, A. A. J. & Hedrick, C. C. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 439–456 (2019).
  179. Wong, K. L. *et al.* The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* **53**, 41–57 (2012).
  180. Sharygin, D., Koniaris, L. G., Wells, C., Zimmers, T. A. & Hamidi, T. Role of CD14 in human disease. *Immunology* **169**, 260–270 (2023).
  181. Clarkson, S. B. & Ory, P. A. CD16. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes. *J. Exp. Med.* **167**, 408–420 (1988).
  182. Thomas, G. D. *et al.* Human Blood Monocyte Subsets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 1548–1558 (2017).
  183. Ożańska, A., Szymczak, D. & Rybka, J. Pattern of human monocyte

- subpopulations in health and disease. *Scand. J. Immunol.* **92**, e12883 (2020).
184. Wang, Q. *et al.* Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nat. Med.* **17**, 1674–9 (2011).
  185. Yáñez, A. *et al.* Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity* **47**, 890-902.e4 (2017).
  186. Hackel, A., Aksamit, A., Bruderek, K., Lang, S. & Brandau, S. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  sensitize human MSC for IFN- $\gamma$  signaling and enhance neutrophil recruitment. *Eur. J. Immunol.* **51**, 319–330 (2021).
  187. Goonewardena, S. N. *et al.* Monocyte Subsets and Inflammatory Cytokines in Acute Decompensated Heart Failure. *J. Card. Fail.* **22**, 358–65 (2016).
  188. Tapp, L. D., Shantsila, E., Wrigley, B. J., Pamukcu, B. & Lip, G. Y. H. The CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 1231–41 (2012).
  189. Naicker, S. D. *et al.* Chronic Kidney Disease Severity Is Associated With Selective Expansion of a Distinctive Intermediate Monocyte Subpopulation. *Front. Immunol.* **9**, 2845 (2018).
  190. Grip, O., Bredberg, A., Lindgren, S. & Henriksson, G. Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 566–72 (2007).
  191. Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C. & Wagner, U. The CD14(bright) CD16<sup>+</sup> monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* **64**, 671–7 (2012).
  192. Urra, X. *et al.* Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **29**, 994–1002 (2009).
  193. Tallone, T. *et al.* Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **4**, 211–9 (2011).
  194. Olingy, C. E., Dinh, H. Q. & Hedrick, C. C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J. Leukoc. Biol.* **106**, 309–322 (2019).
  195. Feng, Y., Li, L. & Sun, X.-H. Monocytes and Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* **27**, 115–22 (2011).
  196. Jaipersad, A. S., Lip, G. Y. H., Silverman, S. & Shantsila, E. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 1–11 (2014).
  197. Kapellos, T. S. *et al.* Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
  198. Tacke, F. *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **117**, 185–94 (2007).
  199. van Royen, N. *et al.* Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ. Res.* **92**, 218–25 (2003).
  200. van der Valk, F. M. *et al.* Oxidized Phospholipids on Lipoprotein(a) Elicit Arterial Wall Inflammation and an Inflammatory Monocyte Response in Humans. *Circulation* **134**, 611–24 (2016).
  201. Henein, M. Y., Vancheri, S., Longo, G. & Vancheri, F. The Role of Inflammation in Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 12906 (2022).
  202. Berg, K. E. *et al.* Elevated CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes predict cardiovascular events. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **5**, 122–31 (2012).
  203. Rahman, K. *et al.* Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression. *J. Clin. Invest.* **127**, 2904–2915 (2017).
  204. Li, A. C. & Glass, C. K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat. Med.* **8**, 1235–42 (2002).
  205. de Groot, E. *et al.* Measurement of carotid intima-media thickness to assess

- progression and regression of atherosclerosis. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **5**, 280–8 (2008).
206. Stothers, C. L., Luan, L., Fensterheim, B. A. & Bohannon, J. K. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulation of myeloid cells. *J. Mol. Med.* **96**, 1293–1306 (2018).
  207. Odent Grigorescu, G. *et al.* Synergic effects of VEGF-A and SDF-1 on the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **11**, 3241–3252 (2017).
  208. Kwon, H. M. *et al.* Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* **101**, 1551–6 (1998).
  209. Heil, M. *et al.* Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **283**, H2411–H2419 (2002).
  210. Falero-Diaz, G. *et al.* Ischemic-Trained Monocytes Improve Arteriogenesis in a Mouse Model of Hindlimb Ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **42**, 175–188 (2022).
  211. Ziegelhoeffer, T. *et al.* Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ. Res.* **94**, 230–8 (2004).
  212. von Elm, E. *et al.* The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for reporting observational studies. *Int. J. Surg.* **12**, 1495–1499 (2014).
  213. ROSE, G. A. The diagnosis of ischaemic heart pain and intermittent claudication in field surveys. *Bull. World Health Organ.* **27**, 645–58 (1962).
  214. Criqui, M. H. *et al.* The correlation between symptoms and non-invasive test results in patient referred for peripheral arterial disease testing. *Vasc. Med.* **1**, 65–71 (1996).
  215. Rabin, R. & De Charro, F. EQ-5D: A measure of health status from the EuroQol Group. *Ann. Med.* **33**, 337–343 (2001).
  216. Greiner, W., Claes, C., Busschbach, J. J. V & Graf von der Schulenburg, J.-M. Validating the EQ-5D with time trade off for the German population. *Eur. J. Heal. Econ.* **6**, 124–130 (2005).
  217. Hagströmer, M., Oja, P. & Sjöström, M. The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ): a study of concurrent and construct validity. *Public Health Nutr.* **9**, 755–762 (2006).
  218. McKinnon, K. M. Multiparameter conventional flow cytometry. *Flow Cytom. Protoc.* 139–150 (2018).
  219. Thompson, J. M., Gralow, J. R., Levy, R. & Miller, R. A. The optimal application of forward and ninety-degree light scatter in flow cytometry for the gating of mononuclear cells. *Cytom. J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **6**, 401–406 (1985).
  220. Ogishi, M. *et al.* Multibatch Cytometry Data Integration for Optimal Immunophenotyping. *J. Immunol.* **206**, 206–213 (2021).
  221. Marimuthu, R. *et al.* Characterization of Human Monocyte Subsets by Whole Blood Flow Cytometry Analysis. *J. Vis. Exp.* **2018**, e57941 (2018).
  222. Gan, S. D. & Patel, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1–3 (2013).
  223. Keck, P. J. *et al.* Vascular Permeability Factor, an Endothelial Cell Mitogen Related to PDGF. *Science (80-. )*. **246**, 1309–1312 (1989).
  224. Tyrrell, D. J. & Goldstein, D. R. Ageing and atherosclerosis: vascular intrinsic and extrinsic factors and potential role of IL-6. *Nat. Rev. Cardiol.* **18**, 58–68 (2021).
  225. Badimon, L. *et al.* C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. *Front. Immunol.* **9**, 430 (2018).
  226. Domschke, G. & Gleissner, C. A. CXCL4-induced macrophages in human atherosclerosis. *Cytokine* **122**, 154141 (2019).
  227. De Winter, J. C. F., Gosling, S. D. & Potter, J. Comparing the Pearson and Spearman correlation coefficients across distributions and sample sizes: A tutorial using simulations and empirical data. *Psychol. Methods* **21**, 273 (2016).
  228. Webster, A. C., Nagler, E. V, Morton, R. L. & Masson, P. Chronic Kidney Disease.

- Lancet* **389**, 1238–1252 (2017).
229. Arslan, U. *et al.* The association between different monocyte subsets and coronary collateral development. *Coron. Artery Dis.* **23**, 16–21 (2012).
  230. Georgakis, M. K., Bernhagen, J., Heitman, L. H., Weber, C. & Dichgans, M. Targeting the CCL2-CCR2 axis for atheroprotection. *Eur. Heart J.* **43**, 1799–1808 (2022).
  231. Ruder, A. V, Wetzels, S. M. W., Temmerman, L., Biessen, E. A. L. & Goossens, P. Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* **119**, 2033–2045 (2023).
  232. Zawada, A. M. *et al.* SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* **118**, e50-61 (2011).
  233. Wildgruber, M. *et al.* The ‘Intermediate’ CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. *Sci. Rep.* **6**, 39483 (2016).
  234. Urbanski, K. *et al.* CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> “nonclassical” monocytes are associated with endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Thromb. Haemost.* **117**, 971–980 (2017).
  235. Gautier, E. L., Jakubzick, C. & Randolph, G. J. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1412–8 (2009).
  236. Soehnlein, O. *et al.* Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol. Med.* **5**, 471–81 (2013).
  237. Quintar, A. *et al.* Endothelial Protective Monocyte Patrolling in Large Arteries Intensified by Western Diet and Atherosclerosis. *Circ. Res.* **120**, 1789–1799 (2017).
  238. Gorczyca, W. *et al.* Immunophenotypic Pattern of Myeloid Populations by Flow Cytometry Analysis. in *Methods in cell biology* vol. 103 221–266 (Elsevier, 2011).
  239. Yan, S. *et al.* Identification of ITGAX and CCR1 as potential biomarkers of atherosclerosis via Gene Set Enrichment Analysis. *J. Int. Med. Res.* **50**, 3000605211039480 (2022).
  240. Georgakopoulos, T., Moss, S. T. & Kanagasundaram, V. Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity. *Mol. Immunol.* **45**, 3671–81 (2008).
  241. Wu, H. *et al.* Functional Role of CD11c + Monocytes in Atherogenesis Associated With Hypercholesterolemia. *Circulation* **119**, 2708–2717 (2009).
  242. Dopheide, J. F. *et al.* Change of walking distance in intermittent claudication: impact on inflammation, oxidative stress and mononuclear cells: a pilot study. *Clin. Res. Cardiol.* **104**, 751–63 (2015).
  243. Wong, A. L. *et al.* Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ. Res.* **81**, 567–74 (1997).
  244. Hauer, A. D. *et al.* Vaccination against TIE2 reduces atherosclerosis. *Atherosclerosis* **204**, 365–71 (2009).
  245. Anisimov, A. *et al.* The angiopoietin receptor Tie2 is atheroprotective in arterial endothelium. *Nat. Cardiovasc. Res.* **2**, 307–321 (2023).
  246. Dopheide, J. F. *et al.* Influence of exercise training on proangiogenic TIE-2 monocytes and circulating angiogenic cells in patients with peripheral arterial disease. *Clin. Res. Cardiol.* **105**, 666–676 (2016).
  247. Dopheide, J. F. *et al.* Inflammation is associated with a reduced number of pro-angiogenic Tie-2 monocytes and endothelial progenitor cells in patients with critical limb ischemia. *Angiogenesis* **19**, 67–78 (2016).
  248. Tang, T. *et al.* Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint. *Pharmacol. Ther.* **219**, 107709 (2021).
  249. Dai, J. *et al.* Metabolism-associated danger signal-induced immune response and reverse immune checkpoint-activated CD40<sup>+</sup> monocyte differentiation. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 141 (2017).
  250. Lievens, D., Eijgelaar, W. J., Biessen, E. A. L., Daemen, M. J. A. P. & Lutgens, E.

- The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* **102**, 206–14 (2009).
251. Shu, U. *et al.* Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1125–8 (1995).
  252. Lutgens, E., Lievens, D., Beckers, L., Donners, M. & Daemen, M. CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **17**, 118–23 (2007).
  253. Weber, C. *et al.* Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 699–704 (2000).
  254. Kristiansen, M. *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**, 198–201 (2001).
  255. Guo, L. *et al.* CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 1106–1124 (2018).
  256. Pinet, V., Vergelli, M., Martin, R., Bakke, O. & Long, E. O. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* **375**, 603–6 (1995).
  257. Connaughton, E. P. *et al.* Phenotypic and functional heterogeneity of human intermediate monocytes based on HLA-DR expression. *Immunol. Cell Biol.* **96**, 742–758 (2018).
  258. Deng, H. *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661–666 (1996).
  259. Jones, K. L., Maguire, J. J. & Davenport, A. P. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1453–69 (2011).
  260. Shu, H. *et al.* The role of CD36 in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* **118**, 115–129 (2022).
  261. Silverstein, R. L. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve. Clin. J. Med.* **76 Suppl 2**, S27-30 (2009).
  262. Ackers, I. *et al.* Blocking Wnt5a signaling decreases CD36 expression and foam cell formation in atherosclerosis. *Cardiovasc. Pathol.* **34**, 1–8 (2018).
  263. Bianconi, V., Sahebkar, A., Atkin, S. L. & Pirro, M. The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Curr. Opin. Hematol.* **25**, 44–51 (2018).
  264. Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Gordon, D. & Wilcox, J. N. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.* **88**, 1121–7 (1991).
  265. Georgakis, M. K. *et al.* Monocyte-Chemoattractant Protein-1 Levels in Human Atherosclerotic Lesions Associate With Plaque Vulnerability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **41**, 2038–2048 (2021).
  266. Park, Y. *et al.* Fractalkine induces angiogenic potential in CX3CR1-expressing monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **103**, 53–66 (2018).
  267. Roy-Chowdhury, E. *et al.* Human CD16+ monocytes promote a pro-atherosclerotic endothelial cell phenotype via CX3CR1–CX3CL1 interaction. *Cardiovasc. Res.* **117**, 1510–1522 (2021).
  268. Loh, S. X. *et al.* Fractalkine Signalling (CX3CL1/CX3CR1 Axis) as an Emerging Target in Coronary Artery Disease. *J. Clin. Med.* **12**, 4821 (2023).
  269. Poupel, L. *et al.* Pharmacological Inhibition of the Chemokine Receptor, CX3CR1, Reduces Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2297–2305 (2013).
  270. Olivares, R., Ducimetière, P. & Claude, J. R. Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease? *Am. J. Epidemiol.* **137**, 49–53 (1993).
  271. Waggoner, S. N. Circadian Rhythms in Immunity. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **20**, 2 (2020).
  272. Gower, R. M. *et al.* CD11c/CD18 Expression Is Upregulated on Blood Monocytes During Hypertriglyceridemia and Enhances Adhesion to Vascular Cell Adhesion Molecule-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 160–166 (2011).
  273. BATH, P., GLADWIN, A. & MARTIN, J. Human monocyte characteristics are altered in hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* **90**, 175–181 (1991).

274. Bassuk, S. S., Rifai, N. & Ridker, P. M. High-sensitivity C-reactive protein: clinical importance. *Curr. Probl. Cardiol.* **29**, 439–93 (2004).
275. Ridker, P. M. Anticytokine Agents: Targeting Interleukin Signaling Pathways for the Treatment of Atherothrombosis. *Circ. Res.* **124**, 437–450 (2019).

### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierung myeloider Zellen.....	16
Abbildung 2: Flussschema zur Veranschaulichung der Patientenakquisition asymptomatischer Patienten.....	22
Abbildung 3: Gatingstrategie zur Sicherstellung eines stabilen Flusses sowie zum Ausschluss von Doubletten. ....	29
Abbildung 4: Kompensation am Beispiel von CD 14 und CD16. ....	30
Abbildung 5: Darstellung der Leukozyten-Identifizierung. ....	30
Abbildung 6: Monozyten-Gating und -aufreinigung. ....	31
Abbildung 7: Weitere Aufreinigung der Monozyten mithilfe verknüpfter Gates.....	31
Abbildung 8: Klassisches Monozyten-Gate CD14 vs. CD16 und Lymphozyten-Ausschluss. ....	32
Abbildung 9: Festlegung der Gates zur finalen Analyse anhand charakteristisch auftretender Monozytensubpopulationen.....	32
Abbildung 10: Treeplot aus Kaluza. ....	33
Abbildung 11: Darstellung der Zellzahlen mithilfe von Prism Graph Pad. ....	34
Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der Monozytensubgruppen, hier für CD191high-Monozyten. ....	35
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der visualisierten Subgruppen mit relevanten Unterschieden.. ....	36
Abbildung 14: Beispiel der Auswertung von Monozytensubgruppen in Excel. ....	36
Abbildung 15: Charakterisierung des Patientenkollektivs. ....	42
Abbildung 16: Laborwerte.....	43
Abbildung 17: Angiologisches Profil. ....	45
Abbildung 18: pAVK-Symptomatik. ....	46
Abbildung 19: EQ5D-Index.....	47
Abbildung 20: Ergebnisse des Follow-ups .....	49
Abbildung 21: Verhältnisse der Zellreihen.....	51
Abbildung 22: Monozyten eingeteilt anhand ihrer Oberflächenmarker CD14 und CD16 für asymptomatische und symptomatische pAVK-Patienten, Panel 1 und 2 einzeln dargestellt. ....	52
Abbildung 23: Binäre Gates der Monozyten aus Panel 1 und 2 nach Mittelwertbildung aus den Tubes beider Panels.....	53
Abbildung 24: Relevante Monozytenoberflächenmarker mit Unterschieden zwischen asymptomatischer und symptomatischer Patientengruppe. ....	54
Abbildung 25: Monozyten-Subgruppen, identifiziert anhand aller untersuchten Oberflächenmarker. ....	56
Abbildung 26: ELISA-Messungen. ....	58
Abbildung 27: Korrelationsmatrices.....	62

#### **IV. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Klassifikation der pAVK nach Fontaine und Rutherford.....	9
Tabelle 2: Verwendetes Antikörper-Panel zur Charakterisierung von Immunzellen.....	27
Tabelle 3: Verwendete Materialien und Geräte mit Bezeichnung und Herstellerangabe. ....	28
Tabelle 4: Verwendete Puffer mit Bezeichnung, Zusammensetzung und Bezugsquelle. ....	28
Tabelle 5: Verwendete ELISAs: Bezeichnung, Hersteller, Bestellnummer.....	37
Tabelle 6: Ergebnisse des EQ5D-Fragebogens zur Lebensqualität.....	47
Tabelle 7: Zellzahlen. ....	50
Tabelle 8: Ergebnisse der Korrelationsberechnungen von ELISA-Konzentrationen und Monozytenoberflächenmarkern.....	60

# V. Anhang

## a. Baseline-Fragebogen

<b>Gefäßmedizinische Vorerkrankungen</b> Z.n. endovaskulärer Revaskularisation, Datum		Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Indikation	<input type="checkbox"/> kritische Ischämie (Stadium III/IV)	
<input type="checkbox"/>	Lokalisation	<input type="checkbox"/> symptomatische pAVK (Stadium IIa/b)	
<input type="checkbox"/>	Interventionsart	<input type="checkbox"/> Beckengefäße	
		<input type="checkbox"/> Oberschenkelgefäße	
		<input type="checkbox"/> Unterschenkelgefäße	
		<input type="checkbox"/> Mehretagen (Becken/Ober-/Unterschenkel - einkreisen)	
		<input type="checkbox"/> PTA	
		<input type="checkbox"/> PTA/Stent	
		<input type="checkbox"/> Länge	
Z.n. operativer Revaskularisation, Datum		Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Indikation	<input type="checkbox"/> kritische Ischämie (Stadium III/IV)	
<input type="checkbox"/>	Lokalisation	<input type="checkbox"/> symptomatische pAVK (Stadium IIa/b)	
<input type="checkbox"/>	OP-Art	<input type="checkbox"/> Beckengefäße	
		<input type="checkbox"/> Leistengefäße	
		<input type="checkbox"/> Oberschenkelgefäße	
		<input type="checkbox"/> Unterschenkelgefäße	
		<input type="checkbox"/> Mehretagen (Becken/Ober-/Unterschenkel - einkreisen)	
		<input type="checkbox"/> TEA +/- Patch +/- Bypass	
		<input type="checkbox"/> Bypass (Homograft, PTFE-Bypass)	
		<input type="checkbox"/> Länge	
Z.n. Hybrid-Eingriff, Datum		Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Indikation	<input type="checkbox"/> kritische Ischämie (Stadium III/IV)	
<input type="checkbox"/>	OP-Gebiet	<input type="checkbox"/> symptomatische pAVK (Stadium IIa/b)	
		<input type="checkbox"/> Beckengefäße	
		<input type="checkbox"/> Leistengefäße	
		<input type="checkbox"/> Oberschenkelgefäße	
		<input type="checkbox"/> Unterschenkelgefäße	
		<input type="checkbox"/> Mehretagen Becken/Ober-/Unterschenkel - einkreisen)	
		<input type="checkbox"/> OP-/Interventions-Art	
		<input type="checkbox"/> TEA +/- Patch +/- Bypass	
		<input type="checkbox"/> Bypass (Homograft, PTFE-Bypass)	
Z.n. Schlaganfall, Datum		Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Ischämisch		
<input type="checkbox"/>	Hämorrhagisch		
Z.n. Carotis-TEA		Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>

	<b>LUERPAD – IMMUNO</b>		Seite: 1/6
	<b>Baselinevisite</b>		Version 1.0

Patienten ID:	Einschlussdatum:	
Geschlecht: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	cm	Gewicht: kg

<b>Einschlusskriterien</b>			
Alter ≥18 Jahre	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Vorliegen einer KHK	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Schriftliches Einverständnis liegt vor	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Vorliegen einer pAVK mit ABI < 0,9	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	

<b>Ausschlusskriterien</b>			
dialysepflichtige Niereninsuffizienz	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
aktive Krebstherapie in den letzten 2 Jahren	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
hämatologische Neoplasie	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Autoimmunerkrankungen	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
HIV-/Hepatitis B/C-Infektion	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Immunmodulatorische Therapie inkl. Immunsuppression oder vorherige Organtransplantation	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	

<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren</b>			
Arterielle Hypertonie	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> 3-fach Kombination			
<input type="checkbox"/> > 3-fach Kombination			
Diabetes mellitus	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> Diät			
<input type="checkbox"/> Orale Antidiabetika			
<input type="checkbox"/> Insulin			
Hyperlipidämie	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Aktiver Raucher	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Z.n. Nikotinabusus	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	

Z.n. Carotis-Stent	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Z.n. Herzinfarkt, Datum	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> STEMI		
<input type="checkbox"/> NSTEMI		
Z.n. koronarer Bypass-OP	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Z.n. PCI	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Z.n. Aortensyndrom/-aneurysma, Datum	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Dissektion	<input type="checkbox"/> Aneurysma	
<input type="checkbox"/> Lokalisation (thorakal, abdominal, thorakoabdominell)		
Z.n. Aorten-OP	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Z.n. EVAR	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>

<b>Komorbiditäten</b>		
Niereninsuffizienz	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Vorhofflimmern	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Lebererkrankung	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Chronische Lungenerkrankung	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Hypercalciämie	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>

<b>Medikation</b>		
Plättcheninhibitoren	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> ASS		
<input type="checkbox"/> Clopidogrel		
<input type="checkbox"/> Ticagrelor		
<input type="checkbox"/> Prasugrel		
CSE-Hemmer	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
ACE-Hemmer	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Betablocker	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Orale Antikoagulation	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Vitamin-K Antagonist		
<input type="checkbox"/> Rivaroxaban (NOAK)		
<input type="checkbox"/> Apixaban (NOAK)		
<input type="checkbox"/> Dabigatran (NOAK)		
<input type="checkbox"/> Edoxaban (NOAK)		
	<input type="checkbox"/> normale Dosis	
	<input type="checkbox"/> reduzierte Dosis	

<b>Laborwerte</b>		
Erythrozyten (Tpt/l)		n.d.
Hämoglobin ( <input type="checkbox"/> g/dl oder <input type="checkbox"/> mmol/l)		<input type="checkbox"/>
Hämatokrit (%)		<input type="checkbox"/>
Leukozyten (Gpt/l)		<input type="checkbox"/>
Thrombozyten (Gpt/l)		<input type="checkbox"/>
Partielle Thromboplastinzeit (PTT) (Sec)		<input type="checkbox"/>

Quick (%)	<input type="checkbox"/>
INR	<input type="checkbox"/>
Kreatinin ( <input type="checkbox"/> µmol/l oder <input type="checkbox"/> mg/dl)	<input type="checkbox"/>
Glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) (ml/min)	<input type="checkbox"/>
Harnstoff ( <input type="checkbox"/> µmol/l oder <input type="checkbox"/> mg/dl)	<input type="checkbox"/>
( <input type="checkbox"/> mmol/l)	
Kalium ( <input type="checkbox"/> mmol/l)	<input type="checkbox"/>
C-reaktives Protein ( <input type="checkbox"/> mg/l oder <input type="checkbox"/> mg/dl)	<input type="checkbox"/>
hs Troponin T ( <input type="checkbox"/> ng/l oder <input type="checkbox"/> ng/ml)	<input type="checkbox"/>
( <input type="checkbox"/> µg/l oder <input type="checkbox"/> pg/ml)	
NT-pro-BNP ( <input type="checkbox"/> ng/l oder <input type="checkbox"/> pg/ml)	<input type="checkbox"/>
Hba1c (letzter Wert innerhalb von 90 Tagen vor Interventionsdatum)	
total Chol. (letzter Wert innerhalb von 90 Tagen vor Interventionsdatum)	
HDL Chol. (letzter Wert innerhalb von 90 Tagen vor Interventionsdatum)	
LDL Chol. (letzter Wert innerhalb von 90 Tagen vor Interventionsdatum)	
Glucose	
Wenn Infarkt (Trop pos.), dann CK max.	
Wenn Infarkt (Trop pos.), dann LDH max.	

<b>Funktionseller Status</b>	
Fontaine, Gehstrecke	<input type="checkbox"/> Stadium I, asymptomatisch <input type="checkbox"/> Stadium II <input type="checkbox"/> a (Gehstrecke > 200m) <input type="checkbox"/> b (Gehstrecke < 200m) <input type="checkbox"/> Stadium III, Ruheschmerz <input type="checkbox"/> Stadium IV
Rutherford	<input type="checkbox"/> Grad 0, Kategorie 0, asymptomatisch <input type="checkbox"/> Grad 1 <input type="checkbox"/> Kategorie 1 (leichte CI) <input type="checkbox"/> Kategorie 2 (mittlere CI) <input type="checkbox"/> Kategorie 3 (schwere CI) <input type="checkbox"/> Grad 2, Kategorie 4 <input type="checkbox"/> Grad 3 <input type="checkbox"/> Kategorie 5 (kleine Nekrose) <input type="checkbox"/> Kategorie 6 (große Nekrose)

<b>Klinische Untersuchung</b>		
Kühle Akren im Seitenvergleich		
Seite?	Rechts <input type="checkbox"/>	Links <input type="checkbox"/>
Muskelatrophie im Seitenvergleich		


Zusätzliche Bildgebung	
CT-Angiographie	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
MR-Angiographie	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
Stenose-Nachweis?	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Lokalisation: _____ (AIC, AIE, AFC, AFS, A. pop., US)	
<input type="checkbox"/> Grad: _____ (hoch-/mitte-/leichtgradig)	
Verschluss-Nachweis?	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Lokalisation: _____ (AIC, AIE, AFC, AFS, A. pop., US)	
<input type="checkbox"/> Länge: _____ cm	

Gesundheitsbezogene Lebensqualität (EQ-5D)	
<b>Beweglichkeit/ Mobilität</b>	
Ich habe keine Probleme herumzugehen	<input type="checkbox"/>
Ich habe einige Probleme herumzugehen	<input type="checkbox"/>
Ich bin ans Bett gebunden	<input type="checkbox"/>
<b>Für sich selbst sorgen</b>	
Ich habe keine Probleme, für mich selbst zu sorgen	<input type="checkbox"/>
Ich habe einige Probleme, mich selbst zu waschen oder mich anzuziehen	<input type="checkbox"/>
Ich bin nicht in der Lage, mich selbst zu waschen oder anzuziehen	<input type="checkbox"/>
<b>Allgemeine Tätigkeiten (z.B. Arbeit, Studium, Hausarbeit, Familien oder Freizeitaktivitäten)</b>	
Ich habe keine Probleme, meinen alltäglichen Tätigkeiten nachzugehen	<input type="checkbox"/>
Ich habe einige Probleme, meinen alltäglichen Tätigkeiten nachzugehen	<input type="checkbox"/>
Ich bin nicht in der Lage, meinen alltäglichen Tätigkeiten nachzugehen	<input type="checkbox"/>
<b>Schmerzen/ körperliche Beschwerden</b>	
Ich habe keine Schmerzen oder Beschwerden	<input type="checkbox"/>
Ich habe mäßige Schmerzen oder Beschwerden	<input type="checkbox"/>
Ich habe extreme Schmerzen oder Beschwerden	<input type="checkbox"/>
<b>Angst/ Niedergeschlagenheit</b>	
Ich bin nicht ängstlich oder deprimiert	<input type="checkbox"/>
Ich bin mäßig ängstlich oder deprimiert	<input type="checkbox"/>
Ich bin extrem ängstlich oder deprimiert	<input type="checkbox"/>
Wie schätzen Sie ihren heutigen Gesundheitszustand (GHZ) auf einer Skala zwischen 0% (schlechtester denkbare GHZ) und 100% (bester denkbare GKZ) ein?	<input type="text"/>

Seite?	Rechts <input type="checkbox"/>	Links <input type="checkbox"/>
Trophische Störungen im Seitenvergleich		
Seite?	Rechts <input type="checkbox"/>	Links <input type="checkbox"/>
Art?		
Pulsstatus (+ = vorhanden; - = fehlend)		
A. femoralis communis	Rechts	Links
A. poplitea	Rechts	Links
A. tibialis posterior	Rechts	Links
A. dorsalis pedis	Rechts	Links
Rekapitalisierungszeit in Sekunden		
Digitus I	Rechts	Links
Digitus II	Rechts	Links
Digitus III	Rechts	Links
Digitus IV	Rechts	Links
Digitus V	Rechts	Links

Doppler- und Duplexsonographie		
Flussprofil der A. femoralis communis LINKS		
<input type="checkbox"/> Triphasisch <input type="checkbox"/> Biphasisch <input type="checkbox"/> Monophasisch		
Flussprofil der A. femoralis superficialis LINKS		
<input type="checkbox"/> Triphasisch <input type="checkbox"/> Biphasisch <input type="checkbox"/> Monophasisch		
Flussprofil der A. poplitea (Segmente P1-3) LINKS		
<input type="checkbox"/> Triphasisch <input type="checkbox"/> Biphasisch <input type="checkbox"/> Monophasisch		
Flussprofil der A. femoralis communis RECHTS		
<input type="checkbox"/> Triphasisch <input type="checkbox"/> Biphasisch <input type="checkbox"/> Monophasisch		
Flussprofil der A. femoralis superficialis RECHTS		
<input type="checkbox"/> Triphasisch <input type="checkbox"/> Biphasisch <input type="checkbox"/> Monophasisch		
Flussprofil der A. poplitea (Segmente P1-3) RECHTS		
<input type="checkbox"/> Triphasisch <input type="checkbox"/> Biphasisch <input type="checkbox"/> Monophasisch		
Stenose-Nachweis?	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> Lokalisation: _____ (AIE, AFC, AFS, A. pop.)		
<input type="checkbox"/> Vmax: _____ cm/s		
<input type="checkbox"/> PVR:		
Verschluss-Nachweis?	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> Lokalisation: _____ (AIE, AFC, AFS, A. pop.)		
<input type="checkbox"/> Länge: _____ cm		
Verschlussdruck-Messung in mmHg		
A. tibialis posterior	Rechts	Links
A. dorsalis pedis	Rechts	Links
ABI-Messung		
A. tibialis posterior	Rechts	Links
A. dorsalis pedis	Rechts	Links
Zehenverschlussdruck-Messung in mmHg		
Digitus I	Rechts	Links
Digitus II	Rechts	Links
TBI-Messung		
Digitus I	Rechts	Links
Digitus II	Rechts	Links

## b. pAVK-Symptomatikfragebogen

 Luebeck Cardioimmunology	<b>LUERPAD – IMMUNO -Studie</b>	Datum:
	<b>Fragebogen Symptomatik pAVK</b>	Patient-ID:

Leiden Sie unter folgenden Beschwerden?	J A	NEIN
Schwächegefühl oder Krämpfe in den Beinen, die beim Stehenbleiben abnehmen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Schmerzen in den Beinen, die sie zum Anhalten zwingen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Kühle, marmorierte oder bleiche Beine	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Trockene Beine	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Starke Verhornung der Fußsohlen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sehr langsam wachsende Fußnägel	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sehr spärliche Beinbehaarung	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Schlecht heilende Wunden an Unterschenkeln oder Füßen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

### Fragebogen Claudicatio intermittens:


Bei Antwort mit \* kann Beantwortung beendet werden!

1. Bekommen Sie in einem der Beine Schmerzen beim Laufen?	Ja	Nein*
2. Beginnt dieser Schmerz bereits im Sitzen oder Stillstehen?	Ja*	Nein
3. In welchem Teil des Beins spüren sie Schmerzen?	In den Waden	Nicht in den Waden
3.1 Wenn nicht in den Waden, wo dann?		Nein
4. Bekommen Sie Schmerzen, wenn Sie aufwärts gehen oder sich beeilen?	Ja	
4.1 Ich laufe nie steile Wege hinauf oder gehe besonders eilig.		
5. Bekommen Sie Schmerzen, wenn Sie auf einem ebenen Weg laufen?	Ja	Nein
6. Wenn Frage 4 & 5 mit ja beantwortet wurden: Verschwinden die Schmerzen, während Sie gehen?	Ja*	Nein
7. Was unternehmen Sie, wenn der Schmerz beim Gehen beginnt?	Anhalten	Weitergehen
8. Was passiert mit den Schmerzen, wenn Sie stillstehen?	Schmerz nimmt ab	Schmerz bleibt konstant
8.1 Wie schnell nehmen die Schmerzen ab?	In weniger als 10 Minuten	In mehr als 10 Minuten
Auswertung:		
- Claudicatio-Symptomatik, wenn Schmerzen nach weniger als 10 Minuten abnehmen (Frage 8.1)	Grad 1: „Nein“ zu Frage 5	Grad 2: „Ja“ zu Frage 5
- Keine Claudicatio-Symptomatik, wenn Schmerzen über 10 Minuten andauern (Frage 8.1)		

## c. Auswertung Symptomatikfragebogen

	asymptomatisch [absolute Zahl und (Prozent)]	symptomatisch [absolute Zahl und (Prozent)]
Schwächegefühl/ Krämpfe in den Beinen, die beim Stehenbleiben abnehmen	3 (17,6%)	11 (68,8%)
Schmerzen in den Beinen, die zum Anhalten zwingen	1 (5,9%)	16 (100%)
Kühle, marmorierte oder bleiche Beine	2 (11,8%)	7 (43,8%)
Trockene Beine	5 (29,4%)	8 (50%)
Starke Verhornung der Fußsohlen	3 (17,6%)	1 (6,3%)
Sehr langsam wachsende Fußnägel	2 (11,8%)	1 (6,3%)
Sehr spärliche Beinbehaarung	6 (35,3%)	8 (50%)
Schlecht heilende Wunden an Unterschenkeln oder Füßen	0 (0%)	3 (18,8%)

## d. 6-Minuten-Gehtest

	<b>LUERPAD – IMMUNO -Studie</b>	Datum:
	<b>6-Minuten-Gehtest</b>	Patient-ID:

➤ Blutdruck und Herzfrequenz nach Ruhephase:

Borg-Atemnotskala	vorher	nachher
0 überhaupt keine Atemnot		
0,5 sehr, sehr milde (gerade wahrnehmbar)		
1 sehr milde		
2 milde		
3 mäßig		
4 recht schwer		
5 schwer		
6 schwer bis sehr schwer		
7 sehr schwer		
8 sehr schwer bis sehr, sehr schwer		
9 sehr, sehr schwer (fast maximal)		
10 maximale Atemnot		

Borg-Anstrengungsskala	nachher
6 überhaupt nicht anstrengend	
7 extrem leicht	
8	
9 sehr leicht	
10	
11 leicht	
12	
13 etwas anstrengend	
14	
15 anstrengend, schwer	
16	
17 sehr anstrengend	
18	
19 extrem anstrengend	
20 maximale Anstrengung	

➤ Schmerzfreie Gehstrecke:

➤ Gehstrecke insg.:

➤ Limitierender Faktor:

➤ Pause: nein / ja, wegen:

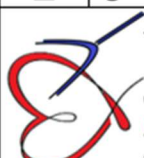
➤ Hilfsmittel: nein / ja:

- Rolltacho(meter)
- Gehhilfe
- Sauerstoffgabe
- Sonstiges:

➤ Abbruch: nein / ja, wegen:

- Angina pectoris
- schwere Atemnot
- Schwindel
- unsicherer Gang
- Wadenkrämpfe
- Claudicatio
- O<sub>2</sub>-Sättigungsabfall unter 80%

## e. Fragebogen zum Gesundheitsverhalten

	<b>LUERPAD – IMMUNO -Studie</b>	Datum:
	<b>Gesundheitsverhalten</b>	Patient-ID:

Physische Aktivität (mind. 10 min ohne Unterbrechung)	Tage pro Woche	Stunden pro Tag
<b>Milde Aktivität</b> (Gehen, Yoga, Tai Chi, leichte Hausarbeit)		
<b>Moderate Aktivität</b> (schnelles Gehen, Joggen, Aerobic, Gartenarbeit, Fahrradfahren, Tanzen, Schwimmen, Putzen)		
<b>Anstrengende Aktivität</b> (Rennen, Heben schwerer Objekte, anstrengender Sport)		

Überwiegende Aktivität während der Arbeitszeit	Überwiegende Aktivität während der Freizeit
<input type="checkbox"/> sitzend	<input type="checkbox"/> sitzend
<input type="checkbox"/> Laufend auf einer Ebene	<input type="checkbox"/> Mildes Training
<input type="checkbox"/> Laufend & Treppen steigend / Objekte hebend	<input type="checkbox"/> Moderates Training
<input type="checkbox"/> Schwere phys. Aktivität	<input type="checkbox"/> Anstrengendes Training
<input type="checkbox"/> Nicht arbeitend	

- Alkoholkonsum: alkoholische Getränke pro Woche

- Ernährung: ALLES / vegetarisch / vegan

## f. Auflistung verwendeter Blutentnahmemonovetten

Anzahl	Zusatz	Volumen	Hersteller	Verwendung
1	EDTA KE	9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Monozyten- und DC-Messung
2	EDTA KE	9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	PBMCs
1	EDTA K	2,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	T-Zell-Messung
1	CPDA	8,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Thrombozyten-Messung
1	PAXgene	2,5 ml	PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Schweiz	Vollblut-RNA
1	EDTA KE	7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Biobanking
1	Serum	7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Biobanking zur Analyse spezifischer Atherosklerose- und Inflammationsmarker
1	Coagulation 9 NC	8,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Biobanking

## g. Hersteller und Bezugsquelle der Antikörper des FACS-Panels

Antikörper	Bestell-Nr.:	Bezugsquelle
anti-human CD16 FITC cl. 3G8	302006	BioLegend, San Diego, USA
anti-human HLA-DR PerCP/Cy5.5 cl. L243	307630	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD191 APC cl. 5F10B29	362908	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD202b Alexa 647 cl. 33.1	334209	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD66b Alexa 700 cl. G10F5	305114	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD3 Alexa 700 cl. OKT3	317340	BioLegend, San Diego, USA
anti-CD56 Alexa 700 cl. 5.1H11	362522	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD19 Alexa 700 cl. HIB19	302226	BioLegend, San Diego, USA
Zombie NIR APC-Cy7	423106	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD192 BV421 cl. K036C2	357210	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD45 BV510 cl. 2D1	368526	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD163 BV605 cl. GHI/61	333616	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD40 BV605 cl.5C3	334336	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD14 BV650 cl. M5E2	301836	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CX3CR1 PE cl. 2A9-1	341604	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CCR5 PE cl. J418F1	359106	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD11c PE/Dazzle 594 cl. Bu15	337228	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD36 PE/Cy7 cl. 5-271	336222	BioLegend, San Diego, USA

## **VI. Danksagung**

Zu allererst danke ich Herrn Prof. Harald Langer für die Bereitstellung dieser Arbeit, den Arbeitsplatz und seine Unterstützung bei der Fokussierung. Ich wertschätzte vor allem die freundliche, respektvolle Zusammenarbeit und die inspirierenden Gespräche bei gutem Kaffee im Labor.

Ein ausgesprochen großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Henry Nording für die kontinuierliche Betreuung dieser Arbeit. Seine Leidenschaft, die unkomplizierte, direkte Kommunikation und ständige Erreichbarkeit vor allem während der klinisch-experimentellen Phase meiner Doktorarbeit, aber auch seine Offenheit für Probleme und Nöte machten Henry zu einem besonderen Betreuer. Ich danke ihm für die umfassende Unterstützung bei der Durchführung, Auswertung und Verschriftlichung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an das gesamte Laborteam der Kardiimmunologie Lübeck, allen voran Frau Anke Constantz und Herrn Jacob von Esebeck für ihre fachliche, aber auch sonstige herzliche Unterstützung, ständige Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft. Durch Sie fühlte ich mich besonders integriert ins Team.

Ich danke von Herzen meinen Eltern dafür, dass sie immer an mich glaubten, mich bestärkt und motiviert haben, hilfreiche Anmerkungen äußerten und mich vor allem mit viel Liebe begleiteten. Meiner gesamten Familie danke ich ebenfalls für die Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank M. J., der mir auch in besonders schwierigen Zeiten größten Halt gab, mir neue Blickwinkel aufzeigte, zur Entspannung verhalf und mich nie Zweifel an meinem Weg spüren ließ.

Ich danke R. L. für die zahlreichen konstruktiven Mittagessen, die gemeinsame Motivation, Unterstützung und erlebnisreichen Auszeiten. L. F. und M. E. danke ich für hilfreiche Anregungen zu meiner Doktorarbeit.

Schließlich möchte ich allen meinen anderen Freundinnen und Freunden für ihre Unterstützung, Motivation, regen Austausch, die wohltuenden Worte und schönen gemeinsamen Momente danken.

## VII. Publikationen

- Henry Nording, Lasse Baron, Manuela Sauter, **Antje Lübken**, Elias Rawish, Rebecca Szepanowski, Jacob von Esebeck, Ying Sun, Hossein Emami, Moritz Meusel, Roza Saraei, Nancy Schanze, Sivahari Prasad Gorantla, Nikolas von Bubnoff, Tobias Geisler, Philipp von Hundelshausen, Konstantinos Stellos, Jens Marquardt, Christian D. Sadik, Jörg Köhl, Daniel Duerschmied, Christoph Kleinschnitz, Harald F. Langer.  
Platelets regulate ischemia-induced revascularization and angiogenesis by secretion of growth factor–modulating factors, *Blood Advances*, Volume 7, Issue 21, 2023, Pages 6411-6427, ISSN 2473-9529, <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006891>.
- Henry Nording, Lasse Baron, **Antje Lübken**, Hossein Emami, Jacob von Esebeck, Moritz Meusel, Christian Sadik, Nancy Schanze, Daniel Duerschmied, Jörg Köhl, Götz Münch, Harald F. Langer.  
The Platelet Anaphylatoxin Receptor C5aR1 (CD88) is a Promising Target for Modulating Vessel Growth in Response to Ischemia, *TH open* 2023; 07(04): e289-e293. Doi: 10.1055/a-2156-8048.
- *Ausstehend: Henry Nording, **Antje Lübken**, (N.N.), Harald F. Langer. Immunological characterization of patients with asymptomatic and symptomatic PAD.*