



Technische Universität München

Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie

Klinikum rechts der Isar

Direktor: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Monozytensubpopulationen als Biomarker der Restenoseentwicklung nach perkutaner transluminaler Angioplastie

Maria Christin Czubba

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Ernst J. Rummeny
2. Prof. Dr. Philipp M. Paprottka

Die Dissertation wurde am 05.11.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.05.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	ii
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Atherosklerose	3
2.1.1 Bedeutung der Atherosklerose	3
2.1.2 Response-to-injury-Theorie	3
2.1.2.1 Atherosklerose als inflammatorische Reaktion	4
2.1.2.2 Inflammation durch zelluläre und nicht-zelluläre Mediatoren	5
2.1.2.3 Schaumzellenbildung	6
2.1.2.4 Plaquebildung	6
2.1.2.5 Plaqueruptur	6
2.2 Monozyten	7
2.2.1 Rolle von Chemokinrezeptoren bei der Monozytenrekrutierung . . .	7
2.2.2 Rolle anderer Mediatoren bei der Monozytenrekrutierung	8
2.3 Monozytensubpopulationen	9
2.3.1 Monozytensubpopulationen im Mausmodell	9
2.3.2 Humane Monozytensubpopulationen	10
2.3.3 Monozytensubpopulationen als potentielle humane Biomarker . . .	11
2.4 Periphere arterielle Verschlusskrankheit	12
2.4.1 Definition	12
2.4.2 Diagnostische Verfahren	13
2.4.3 Therapieoptionen der pAVK	14
2.4.3.1 Konservative Therapieverfahren	14
2.4.3.2 Interventionelle Therapieverfahren	15
2.4.3.3 Operative Therapieverfahren	16
2.5 Restenoseentstehung	16
2.5.1 Restenose	16
2.5.1.1 Prozess der neointimalen Hyperplasie	17
2.5.1.2 Potentielle Rolle von Monozyten für die Restenose	18

3 Fragestellung der Arbeit	20
4 Patienten und Methoden	21
4.1 Patienten	21
4.2 Methoden	22
4.2.1 klinische Datenerhebung	22
4.2.1.1 Anamnese	22
4.2.1.2 Evaluierung der Gehstrecke	22
4.2.1.3 Duplexsonografie und Therapieverfahren	23
4.2.2 Probengewinnung und Probenverarbeitung mittels Dichtegradientenzentrifugation	23
4.2.3 Aufbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie	25
4.2.4 Färbung der Zellen mit Fluoreszenzantikörpern	25
4.2.4.1 Oberflächenmarker	25
4.2.4.2 Intrazelluläre Färbung	26
4.2.4.3 Lebend-tot-Färbung mit Propidiumiodid	27
4.2.5 Durchflusszytometrie	27
4.2.5.1 Durchführung	27
4.2.5.2 Gating	28
4.2.5.3 Auswertung	28
4.3 Statistik	29
5 Ergebnisse	30
5.1 Patienten und Restenose	30
5.2 Monozyten und Restenose	32
5.3 Monozytensubpopulationen und Restenose	32
5.4 MPO-Expression der Monozytensubpopulationen und Restenose	36
5.5 Chemokinrezeptoren CCR2 und CX ₃ CR1 und Restenose	37
5.6 Weitere Biomarker und Restenose	37
6 Diskussion	38
6.1 Patienten und Restenose	38
6.2 Monozyten und Restenose	39
6.3 Monozytensubpopulationen und Restenose	40
6.4 MPO-Expression der Monozytensubpopulationen und Restenose	41
6.5 Chemokinrezeptoren CCR2 und CX ₃ CR1 und Restenose	42
6.6 Weitere Biomarker und Restenose	42
6.6.1 CD11b Intergrin (MAC-1)	42
6.6.2 Selektin Ligand CD162	43
6.6.3 Adhäsionsmolekül CD106	44
6.7 Limitationen der Studie	44
7 Zusammenfassung	46

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	iv
Abbildungsverzeichnis	47
Tabellenverzeichnis	48
Literaturverzeichnis	49
A Publikationsliste	67
B Danksagung	68

Abkürzungsverzeichnis

A. *Arterie*

Abb. *Abbildung*

ABI *Ankle-Brachial-Index*

BMI *Body-Mass-Index*

BMS *Bare-Metal Stent*

CCR2 *Chemokin (C-C motif) Rezeptor 2*

CI *Claudicatio intermittens*

CLI *Kritische Extremitätenischämie*

CTA *Computertomographische Angiographie*

CX₃CR1 *CX3C Chemokin Rezeptor 1*

DSA *Digitale Subtraktionsangiographie*

EDRF *Endothelium Derived Relaxing Factor*

EZM *Extrazelluläre Matrix*

FACS *Fluorescence Activated Cell Sorter*

Fem-pop *Femoro-poplietal*

FITC *Fluorescein-Isothiocyanat*

FKDS *Farbkodierte Duplexsonographie*

FL *Fluorintensität*

FSC *Vorwärtsstreulicht*

HR *Hazard Ratio*

HLA-DR *Human Leukocyte Antigen-DR isotype*

ICAM-1 *Intercellular Adhesion Molecule-1*

IFN *Interferon*

Ig *Immunglobulin*

IL *Interleukin*

KHK *Koronare Herzerkrankung*

KIS *Klinik Informationssystem*

- LDL** *Low Density Lipoprotein*
- LPS** *Lipopolisaccharide*
- M** *Mittelwert*
- MAC-1** *Makrophagen Antigen-1*
- MCP-1** *Monocyte Chemoattractant Proteine-1*
- MHz** *Megahertz*
- MMP** *Matrix-Metalloproteasen*
- MPO** *Myeloperoxidase*
- MPS** *Mononukleäres Phagozyten-System*
- MRA** *Magnetresonanzangiographie*
- NADPH** *Nicotinamidadenindinukleotidphosphat*
- NK** *Natürliche Killerzellen*
- NO** *Stickstoffmonoxid*
- NOX** *NADPH-Oxidase*
- O₂⁻** *Superoxidanionen*
- PAVK** *Periphere arterielle Verschlusskrankheit*
- PBMC** *Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes*
- PBS** *Phosphatgepufferte Salzlösung*
- PDGF** *Platelet-Derived Growth Factor*
- PE** *Phycoerythrin*
- PF-4** *Plättchenfaktor-4*
- PI** *Propidiumiodid*
- PSGL-1** *P-Selektin Glycoprotein Ligand-1*
- PTA** *Perkutane transluminale Angioplastie*
- PTFE** *Polytetrafluorethen*
- Pw Doppler** *Pulsed-wave Doppler*
- ROS** *Reaktive Oxygen Spezies*
- rpm** *Rounds per minute*
- SD** *Standardabweichung*

SEM *Standardfehler*

SR-A *Scavenger Rezeptor-A*

SSC *Seitwärtsstreulicht*

TASC *Trans-Atlantic Inter-Society Consensus*

TEA *Trombendateriektomie*

TFPI *Tissue Factor Pathway Inhibitor*

TNF *Tumornekrosefaktor*

VCAM-1 *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

VHF *Vorhofflimmern*

VLA-4 *Very Late Antigen-4*

WHO *World Health Organization*

Kapitel 1

Einleitung

Mit einer 5 Jahres-Inzidenz von 80 Erkrankungen auf 1000 Personen (Widmer et al., 1983) und einer Gesamtprävalenz von 3-10% der Bevölkerung über 60 Jahre, gehört die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) zu den häufigsten Gefäßerkrankungen. Die Prävalenz ist altersabhängig und steigt nach dem 60. Lebensjahr auf über 10% an (Criqui et al., 1985; Diehm et al., 2004). Männer sind viermal häufiger betroffen als Frauen. Ab dem 75. Lebensjahr zeigt sich allerdings eine höhere Prävalenz in der weiblichen Bevölkerung (Diehm et al., 2004). Die häufigste Ursache für die Erkrankung ist die Entstehung einer Atherosklerose im peripheren Gefäßsystem (Duvall and Vorchheimer, 2004).

In den letzten Jahren entwickelte sich bei der Behandlung der pAVK ein Trend zur „endovascular-first“-Therapie. Das bedeutet, dass auch bei komplizierten Gefäßpathologien eine primär endovaskuläre Therapie angestrebt wird (Norgren et al., 2007a). Das Therapieverfahren der Wahl stellt hierbei die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) dar. Hiermit ist die minimalinvasive Aufdehnung eines atherosklerotisch verschlossenen Gefäßes mit Hilfe eines in Seldinger Technik eingeführten Katheters mit oder ohne Stentimplantation unter radiologischer Kontrolle gemeint (Hirsch et al., 2006). Aufgrund der zunehmenden Erfahrung mit der PTA-Technik können derzeit primäre Erfolgsraten von über 90% erreicht werden (Kandarpa, 2008; Morgenstern et al., 1989). Sowohl die Ballonangioplastie, als auch das Einbringen einer zusätzlichen Gefäßprothese (Stent) in die aufgedehnte Stenose, zeigen je nach Lokalisation, Länge und Art der Obstruktion Offenheitsraten von ca. 70% nach 12 Monaten (Norgren et al., 2007a).

Die Langzeitergebnisse nach erfolgreicher Intervention werden am häufigsten durch die Entstehung einer Restenose limitiert (Rosenfield et al., 2015). Die Restenose ist ein pathologischer Prozess, der in verschiedene Mechanismen unterteilt werden kann (Schillinger et al., 2006). Dazu gehören sowohl das Zusammenspiel elastischer Rückstellkräfte (Recoiling) mit Vasospasmus ca. 24 Stunden nach PTA (Block, 1990), das negative Remodeling und die Neointima-Formation (Mintz et al., 1996; Rosanio et al., 1999; Schillinger et al., 2006). Nach der Aufdehnung eines Gefäßes durch eine PTA besitzt dieses immer noch

eine gewisse Elastizität, was zu einer Lumeneinengung durch Rückstellkräfte (Recoiling) bis hin zur Restenose führen kann (Popma et al., 1991). Unter dem negativen arteriellen Remodeling versteht man den lumenreduzierenden Umbau der externen elastischen Membran (Mintz et al., 1996; Rosanio et al., 1999). Unter der neointimalen Hyperplasie ist eine trauma-induzierte Proliferation glatter Muskelzellen und ihre Migration von der Media in die Intima der Gefäßwand mit darauffolgendem Lumenverlust gemeint (Clagett et al., 1986) (s. Abb. 2.1).

Monozyten akkumulieren und infiltrieren nach PTA durch den Einfluss von Zytokinen wie Monocyte Chemoattractant Proteine-1 (MCP-1), IL-8 und IL-6 in die geschädigte Gefäßwand (Rollins, 1996). Dort sezernieren sie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine, die durch Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in die Intima zu einer neointimalen Hyperplasie und einem Lumenverlust mit Progress bis zur Restenose beitragen (Kling et al., 1995).

Monozyten wurden lange Zeit als eine homogene Population betrachtet. Bei der Maus und beim Menschen konnte jedoch eine eindeutige Heterogenität von im Blut zirkulierenden Monozyten nachgewiesen werden. Sie unterscheiden sich im Phänotyp und spielen verschiedene Rollen in der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen (Libby et al., 2013). Es konnten zwei Monozytensubpopulationen anhand ihrer ungleichen Expression der Oberflächenantigene CD14 und CD16 identifiziert werden. Durch die unterschiedlich starke Expression von CD16 ist noch eine weitere Unterteilung in eine dritte Subpopulation möglich (Libby et al., 2013). In vielen bisherigen Studien wurde bereits ausführlich die Rolle der Monozytensubpopulationen in Bezug zu kardiovaskulären Erkrankungen und der Entstehung eines Myokardinfarktes untersucht (Hristov et al., 2010; Rogacev et al., 2012; Tsujioka et al., 2009a). Ergebnisse von Untersuchungen bei Patienten nach koronarer Stentimplantation weisen auf eine potentielle Rolle zirkulierender Monozyten in der Restenoseentstehung hin (Fukuda et al., 2004). Zusätzlich konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Monozytenzahl und dem Ereignis einer Restenose bei Patienten mit pAVK festgestellt werden (Schillinger et al., 2003). Die Rolle von Monozytensubpopulationen bei der Restenoseentstehung nach peripherer Angioplastie wurde bisher jedoch nicht ausführlich erforscht.

Das Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob Monozyten und ihre Subpopulationen prognostische Biomarker für die Restenoseentwicklung nach einer PTA bei pAVK darstellen. Darüber hinaus wurden weitere Oberflächenmarker (CD11b, MPO, CD106, CD162) und Chemokinrezeptoren (CCR2, CX₃CR1) auf ihre potentielle Rolle im Rahmen der Restenoseentstehung hin untersucht.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Atherosklerose

2.1.1 Bedeutung der Atherosklerose

Unsere heutige Erkenntnis der Atherogenese gründet unter anderem auf der „Response-to-injury“-Theorie von Russel Ross aus den 70-er Jahren. Sie hat bisher die meiste Akzeptanz in der Forschung gefunden (Ross and Glomset, 1976). Daneben gibt es unter anderem noch die „Lipoprotein-induced arteriosclerosis“-Hypothese von Joseph Leonard Goldstein. In ihr wird die Endothelläsion nur als Teilschritt der Atherogenese diskutiert (Steinberg et al., 1989).

2.1.2 Response-to-injury-Theorie

Die Vorstufe der Atherosklerose wird laut Ross als „initial injury“ bezeichnet. Durch eine krankhafte Dysfunktion des Endothels wird die regulatorische Fähigkeit der Gefäßwand beeinträchtigt und die endotheliale Permeabilität gegenüber Plasmabestandteilen erhöht sich (Ross, 1999). Die initiale Phase setzt eine Kaskade von Ereignissen in Gang, die zur Entstehung und Progression der Atherosklerose führt. Als Ursache für die Störung der Endothelfunktion gelten mechanische und funktionelle Schädigungen. Dazu gehören zum Beispiel erhöhte Low Density Lipoprotein (LDL)-Spiegel, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, freie Radikale im Blut durch Nikotinabusus und Infektionen mit Herpes oder Chlamydiae pneumoniae (Ross, 1999). Die erhöhte Endothelpermeabilität führt zu einer vermehrten passiven Diffusion modifizierter (minimal-oxidierter) Lipoproteine über sogenannte „junctions“ der Endothelzellen in die Gefäßintima (Lusis, 2000; Steinberg, 2009). LDL wird durch freie Radikale, die von glatten Muskelzellen der Gefäßintima als Abbauprodukte hergestellt werden oxidiert, sowie unter anderem durch Myeloperoxidase, Ceru-

loplasmin und 15-Lipoxygenase oxidiert (Carr et al., 2000). Das oxidierte LDL kann erst dann über Scavenger-Rezeptoren in Makrophagen aufgenommen werden und aktiviert die Bildung von Schaumzellen (lipidbeladene Phagozyten) (Caligiuri et al., 2002; Li and Glass, 2002).

Im weiteren Verlauf der Atherogenese kommt es in der Intima der Gefäßwand durch Schaumzellen, T-Lymphozyten, und der Proliferation glatter Muskelzellen zur Bildung von sogenannten „fatty streaks“ (Lipidflecken). Sie stellen die früheste Form einer atherosklerotischen Läsion dar (Stary et al., 1994; Thomas et al., 2003). In der menschlichen Aorta können bereits ab der ersten Lebensdekade Schaumzellen und „fatty streaks“ ohne klinische Relevanz festgestellt werden (Napoli et al., 1997). „Fatty streaks“ können sich darüber hinaus zu einem stabilen atheromatösen Plaque mit fibröser Kappe entwickeln (Ross, 1999).

Histologisch betrachtet setzt sich ein atherosklerotischer Plaque aus Cholesterinkristallen, Schaumzellen und extrazellulärer Bindegewebsmatrix zusammen (Stary et al., 1994). Die fibröse Kappe besteht aus einer Ansammlung von glatten Muskelzellen, dichtem Bindegewebe und wenigen Leukozyten. Der Randbereich ist eher zellreich und enthält glatte Muskelzellen, akkumulierte Makrophagen und T-Lymphozyten (Stary et al., 1994; Thomas et al., 2003). Unterhalb der zellreichen Region kann durch die Apoptose von Schaumzellen ein zentraler nekrotischer Kern mit zellulärem Débridement entstehen (Ross and Glomset, 1976).

Eine atherosklerotische Läsion wird als kompliziert bezeichnet, wenn es zu Verkalkungen, einem Defekt der Plaqueoberfläche, Blutungen ins Atherombeet oder einer Thrombenbildung kommt (Ross, 1999). Instabilität und mechanischer Scherstress führen zu einer Ruptur der dünnen fibrösen Kappe (Van Der Wal and Becker, 1999; Zarins et al., 1983). Darauf folgend kommt es zu einer zentralen Einblutung ins Lumen. Kollagenfasern und andere Plasmabestandteile fördern die Thrombozytenadhäsion im Lumen und der entstandene Thrombus verschließt das Gefäß ganz oder teilweise (Davies et al., 1988). Die Minderperfusion distal der Läsion kann zu einem myokardialen Infarkt, Schlaganfall oder einer kritischen Extremitätenischämie führen (Fuster et al., 1992; Lee and Libby, 1997; Van Der Wal and Becker, 1999).

2.1.2.1 Atherosklerose als inflammatorische Reaktion

Der Berliner Pathologe Rudolph Virchow stellte bereits im 19. Jahrhundert die Theorie auf, dass die Atherosklerose ein entzündlicher Prozess sei (Libby, 2012). In bisherigen Studien wurde bestätigt, dass Immunzellen als zelluläre Mediatoren in allen Phasen der Atherogenese beteiligt sind. Russel Ross überarbeitete daraufhin 1986 seine „Response-to-injury“-Hypothese und erkannte die Atherosklerose als eine inflammatorische Erkrankung an (Ross, 1986). Die Inflammationshypothese wurde in den letzten Jahren besonders von

Dr. med. Peter Libby, einem Kardiologen aus Boston weitererforscht und entwickelt (Libby et al., 2002).

2.1.2.2 Inflammation durch zelluläre und nicht-zelluläre Mediatoren

Die inflammatorische Antwort auf eine Endothelläsion beginnt mit der verminderten Produktion des atheroprotektiv wirkenden Stickstoffmonoxids (NO). Zusätzlich kommt es zu einer verstärkten Aktivität von Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH) Oxidase sogenannten (NOX) Enzymen in der Gefäßwand (Channon, 2004). Zu den NOX-Enzymen gehören die NADPH-Oxidase, NO-Synthase und Xanthin-Oxidase. Sie werden auf Neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und Makrophagen exprimiert (Muzaffar et al., 2005). Ihre Aufgabe besteht in der Produktion reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS), insbesondere Superoxidanionen (O_2^-). Besonders Superoxidanionen forcieren durch ihre vasokonstriktive Wirkung und der Proliferation glatter Muskelzellen die Bildung atherosklerotischer Plaques (Muzaffar et al., 2005).

Bevor es zur atherosklerotischen Plaquebildung und Leukozyteninvasion in die Gefäßwand kommt, binden Thrombozyten an das geschädigte Endothel. Dabei stimulieren P-Selektin, Fibrin und Gewebethromboplastin die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten (Massberg et al., 2002; Ross, 1999). Nach der Adhäsion setzen Thrombozyten inflammatorische Faktoren, Proteasen und vasoaktive Substanzen frei. Diese wiederum führen zu einer Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten in die Gefäßwand (Langer and Gawaz, 2008). Außerdem sezernieren Thrombozyten den Plättchenfaktor-4 (PF-4), der für die Bildung von Schaumzellen entscheidend ist (Nassar et al., 2003; Pitsilos et al., 2003). PF-4 induziert innerhalb von 72 Stunden konzentrationsabhängig die Umwandlung von Monozyten in LDL aufnehmende Makrophagen (Scheuerer et al., 2000). Die Differenzierung geschieht durch die Zunahme des Größenwachstums, der Bindekraft und Ausbildung von Pseudopodien von Monozyten unter PF-4 Einfluss und der Hochregulierung von Carboxypeptidase M/MAX1 und dem Transferrin Rezeptor CD71 (Scheuerer et al., 2000).

Die Schädigung des Endothels führt darüber hinaus zu einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen, wie Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) und Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). Adhäsionsmoleküle sind zusammen mit Selektinen für die Leukozytenadhäsion und ihre Invasion in die Gefäßintima zuständig (Huo and Ley, 2001). Monozyten und T-Lymphozyten setzen nach dem Heranreifen in der Intima pro-inflammatorische Chemokine wie MCP-1 frei, welche den Prozess der Atherosklerose fördern (Barlic et al., 2006). Die Chemokinliganden 9, 10 und 11 führen außerdem zur Infiltration und Akkumulation von T-Zellen in die atherosklerotische Läsion (Boring et al., 1998; Gosling et al., 1999). Dort setzen sie pro-inflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (INF- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-1 und IL-2 frei (Tedgui and Mallat, 2006).

2.1.2.3 Schaumzellenbildung

Schaumzellen entstehen mit Hilfe von Wachstumsfaktoren (MCS-F) und Zytokinen (TNF- α und IFN- γ), die die Differenzierung von Monozyten in aktivierte Makrophagen bewirken (Li and Glass, 2002). Beim Heranreifen von Makrophagen kommt es zu einer Expression von Scavenger-Rezeptoren A (SR-A), B1 und CD36. Erst mit Hilfe dieser Rezeptoren können Makrophagen oxidiertes LDL aufnehmen (Li and Glass, 2002; Libby et al., 2002). Schaumzellen können wiederum auch pro-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren freisetzen. Schaumzellen, T-Lymphozyten und glatte Muskelzellen bilden schließlich zusammen „fatty streaks“ (Hansson and Libby, 2006).

2.1.2.4 Plaquebildung

An der Weiterentwicklung von „fatty streaks“ in einen stabilen atherosklerotischen Plaque sind zwei Typen von Makrophagen beteiligt (M1 und M2). Sie werden auch als pro-inflammatorische „klassisch aktivierte“ (M1) und anti-inflammatorische „nicht-klassisch aktivierte“ (M2) Makrophagen bezeichnet. Ihre phänotypische Ausprägung wird sowohl von TH-1 Zytokinen (IFN- γ , IL1- β und Lipopolisaccharide (LPS)), als auch TH-2 Zytokinen (IL-4 und IL-13) induziert (Bouhrel et al., 2007). Makrophagen sind in der Lage ihren Phänotyp zu wechseln und spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose (Bouhrel et al., 2007; Mantovani et al., 2007).

Ein weiterer entscheidender Schritt in der Atherogenese ist die Migration von glatten Muskelzellen von der Media in die Intima. Es kommt außerdem zur Ausbildung einer fibrösen Kappe mit extrazellulärer Matrix (Jonasson et al., 1986). Die Entstehung der fibrösen Kappe wird von „Platelet-derived Growth Factor“ (PDGF), „Fibroblast Growth Factor-2“ (FGF-2) und „Transforming Growth Factor- β “ (TGF- β) beeinflusst, diese werden von Makrophagen, Schaumzellen und Gefäßmuskelzellen sezerniert (George and Beeching, 2006; George and Dwivedi, 2004; Newby, 2006). Inflammatorische Zytokine führen unter anderem zu einer Apoptose von Makrophagen, die daraufhin einen nekrotischen Kern unterhalb der fibrösen Kappe bilden (Van Der Wal and Becker, 1999).

2.1.2.5 Plaqueruptur

Ein Plaque mit hohem Lipidgehalt und einer fehlenden oder sehr dünnen fibrösen Kappe gilt als instabil bzw. vulnerabel (Van Der Wal and Becker, 1999). Die Neovaskularisation und Ausdünnung der fibrösen Kappe gehören dabei zu den Hauptrisikofaktoren der Plaqueruptur. Die Ausdünnung geschieht unter anderem durch die von Makrophagen freigesetzten pro-inflammatorischen Serinproteasen, Cathepsinen und Matrix-Metalloproteasen (MMP) (Lusis, 2000; Shah et al., 1995). Diese extrazellulären Proteasen führen zu einem Abbau von Kollagen im Plaque und der Degeneration extrazellulärer Matrix (Clarke and

Bennett, 2006; Fay et al., 2007). Eine Neovaskularisation an der vulnerablen Schulterregion wird von pro-angiogenetischen Zytokinen der T-Zellen und Mastzellen begünstigt (Norrby, 2002). Für die Plättchenaktivierung und Aggregation hoch thrombogenen Materials nach einer Plaqueruptur sind sowohl kollagene Strukturen als auch Tissue Faktor (TF), von Willebrand-Faktor (vWF), Thrombin, Fibrin/Fibronectin, Laminin und besonders Proteinkinase-C verantwortlich (Harper and Poole, 2007; Monroe and Hoffman, 2006; Penz et al., 2005; Rother et al., 2003; Siess, 1989).

2.2 Monozyten

Monozyten sind ein Bestandteil sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems, genauer gesagt des mononukleären Phagozytensystems (MPS). Sie machen ca. 3-8% der Leukozyten im menschlichen Blut aus (van Furth et al., 1972). Ihre Entwicklung findet über CD34⁺ myeloide Vorläuferzellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark statt. Nach der Bildung im Knochenmark werden Monozyten in die Blutbahn freigesetzt und zirkulieren dort ca. 1-3 Tage, danach migrieren sie sowohl unter homeostatischen als auch inflammatorischen Bedingungen ins Gewebe (Shi and Pamer, 2011; Whitelaw, 1972). Unter dem Einfluss von lokalen Wachstumsfaktoren und pro-inflammatorischen Zytokinen differenzieren sie entweder weiter zu Makrophagen oder reifen zu verschiedenen inflammatorisch-dendritischen Zellen heran (Gordon and Taylor, 2005; Shi and Pamer, 2011). Monozyten spielen eine zentrale Rolle in der Bekämpfung von bakteriellen, viralen, mykotischen und protozoischen Infektionen (Shi and Pamer, 2011). Sie phagozytieren Mikroorganismen mit Hilfe von Enzymen und endosomalen Radikalen wie Stickstoffmonoxid und Wasserstoff. Die Beeinflussung immunologischer Prozesse geschieht unter anderem durch die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Substanzen (Shi and Pamer, 2011). Dank ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation über MHC-II Moleküle nehmen sie außerdem eine Schlüsselrolle zwischen zellulärer und humoraler Immunität ein (Diegelmann et al., 1981).

2.2.1 Rolle von Chemokinrezeptoren bei der Monozytenrekrutierung

Die Rekrutierung von Monozyten im Rahmen der Atherogenese wird von einer Vielzahl von Mediatoren beeinflusst. Der Chemokin (C-C motif) Rezeptor 2 (CCR2) ist unter pro-inflammatorischen Bedingungen auf die Rekrutierung und Chemotaxis von mononukleären Zellen spezialisiert (Ross, 1999). Er wird auf der Oberfläche von Monozyten im Knochenmark exprimiert. Während der Atherogenese schütten Leukozyten MCP-1 aus. Im Mausmodell führte die Bindung von MCP-1 an CCR2 zu einer Emigration von Monozyten in die Blutbahn (Serbina and Pamer, 2006). Mäuse mit einer CCR2-Defizienz und experimentell

induzierter Atherosklerose zeigten eine 64%-ige Reduktion der intimalen Hyperplasie durch eine verminderte Monozytenrekrutierung (Roque et al., 2002).

Beim Menschen exprimieren pro-inflammatorische Monozyten hauptsächlich den membran-gebundenen CX₃C Chemokin-Rezeptor 1 (CX₃CR1) (Galkina and Ley, 2009). Dieser induziert die Chemotaxis von Monozyten in atherosklerotische Läsionen, indem er die Bindung an Fraktalkin Liganden fördert. CX₃CR1 wird außerdem auf glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen gebildet (Mantovani et al., 2007). Interleukin 8 (CX₃CL1) benötigt ebenfalls den CX₃CR1-Rezeptor, um Neutrophile Granulozyten anzulocken, die durch LPS stimulierte Monozyten generiert wurden (Yoshimura et al., 1998). Außerdem aktiviert Interleukin 8 (CX₃CL1) die Monozytenadhäsion an Endothelläsionen und spielt somit eine Rolle in der Monozytenrekrutierung (Gerszten et al., 1999).

2.2.2 Rolle anderer Mediatoren bei der Monozytenrekrutierung

Zu anderen Mediatoren der Monozytenrekrutierung gehört das CD11b/Mac-1 Integrin. Es wird auf der Oberfläche von Monozyten, Granulozyten, Natürlichen Killerzellen und Makrophagen exprimiert (Arnaout, 1990). CD11b/Mac-1 spielt während der Atherogenese durch die Bindung an ICAM-1 und ICAM-2 eine wichtige Rolle als Regulator der Monozytenadhäsion und Migration in die Intima (Shang and Issekutz, 1998).

CD162 bzw. P-Selektin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) ist ein weiterer wichtiger Ligand für Adhäsionsmoleküle. An ihm binden P-Selektine und Glykoprotein 1ba, die von Thrombozyten als Reaktion auf Gefäßschäden ausgeschüttet wurden. Monozyten können dann über PSGL-1 an P-Selektin andocken und in inflammatorisches Gewebe rekrutieren (de Gaetano et al., 1999). Die Expression von CD162 findet auf Leukozyten und Endothelzellen statt, die durch T-Zellen stimuliert wurden (Furie and Furie, 2004; Sarma et al., 2002).

VCAM-1 (CD106) wird unter anderem auf der Oberfläche von kleinen und großen Blutgefäßen exprimiert (Ramana et al., 2004). Es ist ein Zelladhäsionsmolekül, das mit dem Integrin „Very Late Antigen-4“ (VLA-4) auf der Oberfläche von Leukozyten während einer inflammatorischen Reaktion interagieren kann (Elices et al., 1990). Es vermittelt die Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Zusätzlich ist VCAM-1 an der Signaltransduktion zwischen Endothel und Leukozyten beteiligt. Bei Monozyten beeinflusst es das Rollen auf der Gefäßoberfläche und ihre Migration durch das Endothel in die Gefäßintima (Gerszten et al., 1998).

Leukozyten stellen im Rahmen von Entzündungsprozessen außerdem Myeloperoxidase (MPO) her, welches an der Herstellung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) beteiligt ist. Die Fähigkeit von Makrophagen MPO zu bilden, wird in vitro von GM-CSF reguliert (Sugiyama et al., 2001). Superoxidanionen (O_2^-) fördern die Proliferation glatter Muskelzellen und induzieren eine pro-inflammatorische Signalkaskade, die zu einer vermehrten

Monozytenrekrutierung während der Atherogenese führt (Juni et al., 2013). In rupturierten atherosklerotischen Plaques konnte man einen hohen Gehalt von MPO exprimierenden Makrophagen finden. Biasucci et al. (1996) fanden heraus, dass Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) einen signifikant höheren intrazellulären MPO Anteil in Leukozyten zeigen. Hohe MPO Plasma- und Serumlevel stellen des Weiteren Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse dar (Nicholls and Hazen, 2005). Außerdem entwickeln Patienten mit totaler oder subtotaler MPO-Defizienz seltener eine kardiovaskuläre Erkrankung (Nicholls and Hazen, 2005). Somit spielt MPO eine wichtige Rolle bei der Initiation atherosklerotischer Plaques und den daraus folgenden Komplikationen. (Nicholls and Hazen, 2005).

2.3 Monozytensubpopulationen

2.3.1 Monozytensubpopulationen im Mausmodell

Bei der Maus konnte eine eindeutige Heterogenität von im Blut zirkulierenden Monozyten nachgewiesen werden. Im Wesentlichen existieren zwei Monozytensubpopulationen zu mengenmäßig vergleichbaren Anteilen. Sie wurden anhand ihrer unterschiedlichen Expression der Antigene Ly6C/Gr – 1, CX₃CR1 und CCR2 identifiziert (Geissmann et al., 2003; Nahrendorf et al., 2007).

Die Ly6C^{hi}/Gr – 1⁺ Population zeigt eine starke CCR2 und schwache CX₃CR1 Expression (Palframan et al., 2001). Sie ist an Entzündungsprozessen und der Rekrutierung von Monozyten in Gewebeläsionen beteiligt und wird deshalb als pro-inflammatorische Subpopulation eingeordnet (Auffray et al., 2007). Die Ly6C^{low}/Gr – 1⁻ Population, die die Antigene CCR2 schwach, CX₃CR1 und CCR5 verstärkt exprimiert, zirkuliert eher unter homöostatischen Bedingungen im peripheren Blut (Palframan et al., 2001). Sie hat eine längere Lebensspanne, patrouilliert entlang des vaskulären Endothels und wird deshalb als „residential“ (anwohnende) Population klassifiziert (Auffray et al., 2007).

Nahrendorf et al. (2007) untersuchten die Rolle der Monozyten für die Atherogenese im Mausmodell. Sie fanden heraus, dass die frühe Phase der Atherogenese eine besonders hohe Expressionsrate von Ly6C^{hi}/Gr-1⁺ aufweist und in der späten Phase die Ly6C^{low}/Gr – 1⁻ Expression ansteigt. Dies lässt sich durch die heterogene Funktion der Monozyten erklären. Während Ly6C^{hi}/Gr – 1⁺ Monozyten eher auf die Initiation der Atherosklerose durch Phagozytose, Proteolyse und Zytokinfreisetzung spezialisiert sind, fördern Ly6C^{low}/Gr – 1⁻ Monozyten die Angiogenese und die Akkumulation von Kollagen und Myofibroblasten während der Plaquebildung (Nahrendorf et al., 2007).

Bei ApoE^{-/-}, CCR5^{-/-}-Knockout-Mäusen konnte ein milderer Verlauf der Atherosklerose und niedrigere Monozytenlevel festgestellt werden (Braunersreuther et al., 2007). Darüber hinaus zeigte sich nach der Inhibition von MCP – 1, CX₃CR1 und CCR5 in ApoE^{-/-}-Mäusen, eine signifikante Reduktion der Atheroskleroserate (Combadière et al., 2008).

Eine induzierte Hypercholesterinämie bei Mäusen führt außerdem zu einer Störung der Konversion von $\text{Ly6C}^{\text{hi}}/\text{Gr} - 1^+$ zu $\text{Ly6C}^{\text{low}}/\text{Gr} - 1^-$ Monozyten. Die daraus resultierende $\text{Ly6C}^{\text{hi}}/\text{Gr} - 1^+$ Monozytose, fördert eine effektiveren Akkumulation von Monozyten im Plaque und begünstigt die Exazerbation einer bestehenden Atherosklerose (Tacke et al., 2007).

2.3.2 Humane Monozytensubpopulationen

In den 80-er Jahren wurden zwei maßgebliche humane Monozytensubpopulationen anhand ihrer ungleichen Expression der Oberflächenantigene CD14 und CD16 identifiziert (Ziegler-Heitbrock, 2007). CD14 ist ein Glykoprotein, welches über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden ist und zusammen mit Toll-like Receptor-4 (TLR-4) und Lymphozytenantigen 96 einen Lipopolisaccarid (LPS- Receptor bildet. CD16 gehört zur Familie der Ig-G Rezeptoren (Ziegler-Heitbrock, 2007). Ziegler-Heitbrock (2007) zeigten das Monozyten, die den LPS Receptor CD14 exprimieren, aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression des $\text{Fc}\gamma\text{R-III}$ Rezeptors CD16, in nochmals mindestens 2 Subgruppen unterteilt werden können. Eine eindeutige Heterogenität wurde auch aufgrund der verschiedenen Größe, Granularität und nukleären Morphologie der Populationen festgestellt (Ziegler-Heitbrock, 2007).

Die „klassische“ $\text{CD14}^{++}/\text{CD16}^-$ Subpopulation macht im gesunden Zustand 80-90% der im peripheren Blut zirkulierenden Monozyten aus. Sie ähnelt phänotypisch der murinen $\text{Ly6C}^{\text{hi}}/\text{Gr} - 1^+$ Population. „Klassische“ Monozyten exprimieren einen hohen Anteil MCP-1, CCR2 und L-Selektin und einen niedrigen Anteil $\text{CX}_3\text{CR1}$ und MHC-II (Geissmann et al., 2003; Ziegler-Heitbrock et al., 1993). Die in-vitro Stimulation mit LPS führt zu einer vermehrten Produktion von IL-10. Dieser „Zytokin-Synthese-Inhibitor-Faktor“ spielt eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (Belge et al., 2002). Die $\text{CD14}^{++}/\text{CD16}^-$ Monozytensubpopulation hat außerdem eine hohe Phagozytoseaktivität, kann LDL aufnehmen und ROS bilden (Mosig et al., 2009).

Die „nicht-klassische“ $\text{CD14}^+/\text{CD16}^{++}$ Subpopulation macht 10-20% der zirkulierenden Monozyten aus. Sie gleicht phänotypisch der murinen $\text{Ly6C}^{\text{low}}/\text{Gr} - 1^-$ Population. Im Gegensatz zu den $\text{CD14}^{++}/\text{CD16}^-$ Monozyten, exprimiert sie einen hohen Anteil $\text{CX}_3\text{CR1}$ und CCR5 und einen niedrigen CCR2 Anteil (Geissmann et al., 2003). Wenn man die „nicht-klassischen“ Monozyten in-vitro mit LPS stimuliert, überwiegt die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 (Belge et al., 2002). Des Weiteren können „nicht-klassische“ Monozyten in-vivo und in-vitro zu Dendritischen Zellen differenzieren und Human Leukocyte Antigen-DR isotype (HLA-DR) exprimieren (Peters et al., 1991). Folglich spielen sie eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation (Ziegler-Heitbrock, 1996).

Die „intermediären“ $\text{CD14}^{++}/\text{CD16}^{++}$ Monozyten machen die kleinste Subpopulation im peripheren Blut aus (Hristov and Weber, 2011; Ingersoll et al., 2010). Eine wichtige

Funktion der „intermediären“ Subpopulation, ist ihre Fähigkeit, große Mengen des proinflammatorischen TNF- α zu sezernieren (Schlitt et al., 2004).

2.3.3 Monozytensubpopulationen als potentielle humane Biomarker

Humane Monozyten wurden bisher in vielen Studien als Biomarker entzündlicher Prozesse untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, dass sowohl die „klassische“, „intermediäre“ und „nicht-klassische“ Monozytensubpopulation in unterschiedlichem Ausmaß an akuten und chronischen Erkrankungen beteiligt sind (Sánchez-Torres et al., 2001).

Die „klassischen“ CD14⁺⁺/CD16⁻ Monozyten sind bei Patienten mit chronischer Hypercholesterinämie und genetisch bedingter familiärer Prädisposition für eine KHK im peripheren Blut erhöht (Hristov et al., 2010). Außerdem korreliert ihre Expression positiv mit der Größenzunahme atherosklerotischer Plaques (Combadière et al., 2008; Swirski et al., 2007). Eine signifikant negative Korrelation zeigte sich zwischen den CD14⁺⁺/CD16⁻ Monozytenleveln und dem Myocardial Salvage Index (MSI) und der linksventrikulären Ejektionsfraktion 6 Monate nach Myokardinfarkt (Tsujioka et al., 2009b). Eine übermäßige Expression von CD14⁺⁺/CD16⁻-Monozyten ist zudem mit einer höheren Mortalitätsrate und einer erhöhten Anzahl schlaganfallassoziierter Infektionen (SAIs) nach Apoplex verbunden (Hristov and Weber, 2011; Urra et al., 2009).

Die „nicht-klassische“ Monozytensubpopulation dagegen korreliert positiv mit der LDL-, Triglycerid- und Cholesterol-Konzentration im Blut und negativ mit der HDL-Konzentration bei Patienten mit stabiler KHK (Krychtiuk et al., 2015). Weitere Studien ergaben, dass eine übermäßige CD14⁺/CD16⁺⁺ Monozytenexpression mit einem erhöhten Body-Mass-Index (BMI) und erhöhter Intima-Media-Dicke von Gefäßen gesunder Probanden einhergehen (Rogacev et al., 2010).

Bei Dialysepatienten besteht ein Zusammenhang zwischen der „intermediären“ CD14⁺⁺/CD16⁺⁺-Expressionsrate und kardiovaskulären Ereignissen (Heine et al., 2008; Hristov et al., 2010). Hristov et al. (2010) bestätigten zudem eine Korrelation kardiovaskulärer Risikofaktoren und einer vermehrten CD14⁺⁺/CD16⁺⁺ Monozytenexpression bei Patienten mit KHK. Darüber hinaus wurde in einer Studie von Rogacev an Tag 3 und 5 nach Myokardinfarkt eine signifikant erhöhte Expression der „intermediären“ Monozytensubpopulation bei Patienten mit klinisch manifester KHK diagnostiziert (Rogacev et al., 2010). Schlitt et al. (2004) zeigten einen ebenso signifikanten Zusammenhang zwischen CD16⁺⁺ Monozyten und der Vulnerabilität atherosklerotischer Plaques in Koronararterien. In Anbetracht der Datenlage scheinen besonders CD14⁺⁺/CD16⁺⁺-Monozyten unabhängige Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse zu sein.

2.4 Periphere arterielle Verschlusskrankheit

2.4.1 Definition

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) bezeichnet eine okkludierende und stenosierende Veränderung der Extremitätenarterien, seltener auch der Aorta (Lawall et al., 2015). Bei 95% der Patienten ist die Erkrankung durch eine chronisch obliterierende Atherosklerose bedingt (Duvall and Vorchheimer, 2004). Nur 5% der pAVK-Erkrankungen sind entzündlichen, traumatischen oder kongenitalen Ursprungs (ACC/AHA et al., 2006). Beispiele für die entzündliche Genese sind die Thrombangitis obliterans und das Takayasu-Syndrom (Vaskulitis) (ACC/AHA et al., 2006). Mit steigendem Alter rücken arterio- oder kardio-embolische Ereignisse in den Vordergrund (ACC/AHA et al., 2006). Nikotinabusus und Diabetes mellitus spielen eine entscheidende Rolle bei der Atherogenese und tragen deshalb als Hauptrisikofaktoren zur Entstehung einer pAVK bei (Beach et al., 1982). Mehr als 80% der pAVK Patienten sind Raucher oder Ex-Raucher (White, 2007). Arterieller Hypertonus, Dyslipidämie und Hyperhomocysteinämie sind Faktoren, die die Entwicklung einer pAVK begünstigen (ACC/AHA et al., 2006).

Die pAVK präsentiert sich als Variation eines eigentlich generalisierten Krankheitsprozesses der arteriellen Gefäße im Körper. Die Prognose ist abhängig vom Stadium der Erkrankung und die pAVK kann als Indikator für eine niedrigere Lebenserwartung angesehen werden. Mindestens 10% aller pAVK Patienten haben zusätzlich eine zerebrovaskuläre Verschlusskrankheit, 28% leiden an einer koronaren Herzerkrankung (Cetin and Baumgartner, 2004). Im Vergleich zu gesunden Personen ist das Risiko für pAVK Patienten an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben, dreifach erhöht (Cetin and Baumgartner, 2004).

Die Diagnose der pAVK, sowie deren Schweregrad und Lokalisation kann mit Hilfe einer Anamnese und klinischen Untersuchung gestellt werden. Am Anfang der klinischen Untersuchung stehen die Inspektion und Palpation mit dem Augenmerk auf Farbe der Haut, Schweißbildung, Temperatur, Pulsstatus und Deformitäten oder trophische Läsionen der Füße (Jonason and Ringqvist, 1985). Die klinische Symptomatik der pAVK wird in Europa häufig in vier Stadien nach Fontaine (s. Tab. 2.1) eingeteilt. Im angelsächsischen Raum erfolgt die Klassifikation nach einem siebenstufigen System nach Rutherford (s. Tab. 2.1) (ACC/AHA et al., 2006). Als Parameter wird hierbei zunächst das Symptom der Claudicatio intermittens (CI), der sogenannten „Schaufensterkrankheit“ herangezogen. CI ist ein reproduzierbarer ischämischer Muskelschmerz unter Belastung, der in Ruhe bzw. beim Stehenbleiben verschwindet. Weitere Kriterien für die Stadieneinteilung sind der Ischämieschmerz in Ruhe sowie das Auftreten trophischer Läsionen oder einer gestörten Wundheilung der unteren Extremitäten (ACC/AHA et al., 2006).

Die „Schaufensterkrankheit“ tritt bei 40-jährigen Patienten in 3% der Fälle auf und erhöht sich ab dem 60. Lebensjahr auf 6% (Fowkes et al., 1991; Norgren et al., 2007a). Die relativ niedrige Inzidenz der Claudicatio intermittens ist hierbei abhängig von der Länge des

vorhandenen Gefäßverschlusses, der Anzahl der betroffenen Gefäßetagen und der Tatsache ob sich ein Kollateralkreislauf gebildet hat (ACC/AHA et al., 2006).

Fontaine Stadium	Klinik	Rutherford Grad/Kategorie	Klinik
I	Asymptomatisch	0/0	Asymptomatisch
IIa	Gehstrecke >200m	I/1	Leichte Claudicatio
		I/2	Mäßige Claudicatio
IIb	Gehstrecke <200m	I/3	Schwere Claudicatio
III	Ischämischer Ruheschmerz	II/4	Ischämischer Ruheschmerz
IV	Ulkus, Gangrän, Nekrose	III/5	Distal trophische Läsion
		III/6	Über das metatarsale Niveau reichende trophische Läsion

Tabelle 2.1: Fontaine und Rutherfordstadien

2.4.2 Diagnostische Verfahren

Zu den apparativen Basisuntersuchungen gehört die nicht-invasive Messung des arteriellen Dopplerverschlussdruckes über den Arterien (A.) dorsalis pedis und A. tibialis posterior beim liegenden Patienten und die darauffolgende Berechnung des Knöchel-Arm-Index (engl. Ankle-Brachial-Index, ABI) (ACC/AHA et al., 2006). Der ABI ist der systolische Knöcheldruck dividiert durch den systolischen Blutdruck über der A. brachialis. Hierbei wird ein Mittelwert an beiden Armen verwendet, es sei denn die Blutdruckdifferenz ist größer als 10mmHg, dann wird der größere Wert herangezogen. Wenn der ABI in Ruhe <0,9 beträgt, liegt mit einer Sensitivität von 95% und einer Spezifität von 100% eine mindestens 50%-ige Gefäßstenose vor (Bernstein and Fronek, 1982; Lawall et al., 2015; Xu et al., 2013). Als gesichert gilt die pAVK, wenn nach einem Laufbandtest der ABI um 15-20% im Vergleich zum Ruhewert abfällt (Norgren et al., 2007a).

Unter den diagnostisch bildgebenden Verfahren gilt die Farbkodierte Duplexsonografie (FKDS) derzeit als Methode der ersten Wahl, zur Darstellung der Becken und Beinarterien vor einer möglichen Intervention (Boström et al., 2001). Sie ist ein nicht-invasives, untersucherabhängiges Verfahren, welches eine Darstellung der Morphologie und Hämodynamik von Gefäßwänden, Gefäßvolumen und dem umliegenden Gewebe ermöglicht (Collins et al., 2007). Die FKDS kann unabhängig von der Schilddrüse oder Nierenfunktion des Patienten durchgeführt werden, ist uneingeschränkt wiederholbar und weist keine Strahlenbelastung auf.

Die intraarterielle Digitale Subtraktionsangiographie (DSA) gilt als Goldstandard bezüglich der Genauigkeit der Gefäßdarstellung, wurde aber größtenteils von der Magnetresonanztomographie (MRA) abgelöst (Lawall et al., 2015). Nachteile der DSA sind unter anderem die Strahlenbelastung, Invasivität und die Verwendung von jodhaltigem Kontrastmittel. Die DSA gibt die Möglichkeit zur präzisen Evaluierung von In-Stent-Stenosen, wird aber nur noch in Fällen von nicht ausreichender Bilddiagnostik eingesetzt (Norgren et al., 2007a).

Die Magnetresonanztomographie (MRA) und computertomographische Angiographie (CTA) sind weitere nicht-invasive bildgebende Verfahren, die zum Einsatz kommen können und einen Überblick über das gesamte Gefäßsystem verschaffen (Collins et al., 2007). Ein Vorteil der MRA gegenüber dem CTA ist die Verwendung von Kontrastmitteln wie Gadolinium-Chelaten in nicht-nephrotoxischen Dosen. Zusammen mit der FKDS kann die MRA eine optimale Aussage für eine interdisziplinäre Therapieplanung geben.

2.4.3 Therapieoptionen der pAVK

2.4.3.1 Konservative Therapieverfahren

Die Therapie der pAVK wird je nach Stadium in eine konservativ-medikamentöse und eine endovaskulär-operative Säule eingeteilt (ACC/AHA et al., 2006). Das kausale Behandlungsziel der konservativen Therapie besteht besonders im Stadium I nach Fontaine aus der Beseitigung kardiovaskulärer Risikofaktoren. Die Einhaltung einer Nikotinkarenz gehört darunter zu den wichtigsten Maßnahmen. Die Anzahl der „pack years“ (Zahl der Zigarettenspackungen pro Tag multipliziert mit der Anzahl der Raucherjahre) ist mit dem Schweregrad der pAVK, einer erhöhten Amputationsrate und Mortalität verbunden (Hirsch et al., 1997). Des Weiteren wird zur Sekundärprävention eine Senkung des LDL-Cholesterins unter 100mg/dl durch CSE-Hemmer empfohlen. Eine Behandlung zu hoher Triglyzerid- und zu niedriger HDL-Cholesterinwerte sollte mit Fibraten oder Niacin therapiert werden (ACC/AHA et al., 2006; Norgren et al., 2007a).

Bei pAVK Patienten sollte außerdem ein HbA1c von <7% angestrebt werden, da Diabetes mellitus das pAVK Risiko um das 3-4-fache steigert (Adler et al., 2002; Association et al., 2003). Des Weiteren sollte laut Leitlinien bei Patienten mit pAVK und arteriellem Hypertonus ein Zielblutdruckbereich von <140/90 mmHg und bei Diabetikern von <130/80 mmHg angestrebt werden, da hohe Blutdruckwerte das pAVK Risiko verdoppeln (Lawall et al., 2015; Norgren et al., 2007b). Die Einnahme langwirksamer ACE-Hemmer hat dabei laut der HOPE-Studie den meisten Erfolg, auch β -Blocker sind indiziert (Ahimastos et al., 2008; Bendermacher et al., 2005; Mehler et al., 2003). Die Gabe von Thrombozytenfunktionshemmern ist zufolge der CAPRI-Studie und STIMS-Studie sowohl bei asymptomatischen als auch symptomatischen Patienten zur sekundären Prävention kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Ereignisse empfohlen (Bhatt et al., 2006; Sobel and Verhaeghe, 2008; Trialists' Collaboration et al., 2002). Es werden ASS (100-300mg/d) oder bei ASS-Unverträglichkeit Clopidogrel (75mg/d) eingesetzt, da sie die vaskulär ischämischen Ereignisse um ca. 20% verringern können (Clagett et al., 2004).

Im Stadium II nach Fontaine ist die Optimierung der Belastbarkeit, Gehleistung und Lebensqualität von entscheidender Bedeutung (ACC/AHA et al., 2006; Ouriel, 2001). Zur Behandlung der Claudicatio intermittens ist das Gehtraining die konservative Therapie der Wahl (Hiatt, 2001; Steinacker et al., 2002). Es besteht aus einem überwachten selbstständigen ca. 60-minütigem Intervall-Training von 5-15 Minuten, wobei die Intensität

nicht über den Claudicatio Schmerz reichen sollte (Gardner et al., 2001; Steinacker et al., 2002). Kontrollierte Studien konnten bei konsequentem Gehtraining eine Steigerung der Gehstrecke um 200% nach 12 Wochen erheben (Katzel et al., 2001). Die medikamentöse Therapie der Claudicatio mit vasoaktiven Substanzen wie Cilostazol oder Naftidrofuryl wird nur bei Patienten empfohlen, die keine Revaskularisationstherapie erhalten können. In der APIEC-Studie zeigte Naftidrofuryl in der Verumgruppe eine signifikante Steigerung der schmerzfreien, maximalen Gehstrecke um 107% (Boccalon et al., 2001). Die täglich 2-malige Einnahme von 100mg Colistazol über 12 Wochen konnte die Gehstrecke von Patienten mit Claudicatio Beschwerden um 76% verbessern (Ishii et al., 2008; Regensteiner et al., 2002).

Der Erhalt der Extremitäten und die Reduktion von Schmerzen durch Analgetika sind im Stadium III und IV nach Fontaine primäres Ziel der konservativen Therapie (ACC/AHA et al., 2006).

2.4.3.2 Interventionelle Therapieverfahren

Bei Patienten mit symptomatischer pAVK sollte laut Leitlinien unabhängig vom Trans-Atlantic Inter-Society Consensus (TASC)-Stadium eine endovaskuläre Intervention „endovascular-first“-Therapie der operativen vorgezogen werden, wenn die gleiche symptomatische Verbesserung zu erwarten ist (Lawall et al., 2015). Zu den wichtigsten interventionellen Therapieverfahren gehört die perkutane transluminale Angioplastie (PTA). Hiermit ist die minimalinvasive Aufdehnung eines atherosklerotisch verschlossenen Gefäßes mit Hilfe eines in Seldinger-Technik eingeführten Katheters mit oder ohne Stentimplantation unter radiologischer Kontrolle gemeint (Hirsch et al., 2006). Man unterscheidet bei der Angioplastie mit Stentimplantation nochmal unter primären und sekundärem Stenting.

Eine primäre Stentimplantation als initiale Therapie wird bei längeren aorto-iliakalen Stenosen und Verschlüssen empfohlen (Lawall et al., 2015). Sie erweist sich effektiver, als eine Ballonangioplastie mit sekundärem Stenting (Lawall et al., 2015). Femoropoplietale Läsionen mittlerer und größerer Länge sollten primär mit einem Nitinol Stent behandelt werden (Lawall et al., 2015). Bei poplietalen und infrapoplietalen Läsionen sollte laut Leitlinien eine primäre Ballonangioplastie erfolgen und nur bei unzureichenden angiographischen Ergebnissen eine Stentimplantation (Lawall et al., 2015). Die primären und sekundären Offenheitsraten für rekanalisierende endovaskuläre Therapiemaßnahmen haben sich in den letzten Jahren durch eine verbesserte Technik stark erhöht. Nach einem Jahr liegt die Offenheitsrate iliakaler Gefäße nach interventioneller Therapie bei 70-80% (Norgren et al., 2007b).

Bei Stenosen werden bessere Ergebnisse erzielt als bei Verschlüssen (Garasic and Creager, 2001; Wagner, 2002). Die 5-Jahres-Offenheitsrate nach einer Angioplastie von femoropoplietalen Gefäßen durch eine PTA liegt dagegen nur bei 55% (Norgren et al., 2007b).

Eine selektive Stentimplantation nach PTA kann besonders in den Beckenarterien nötig werden, wenn die PTA ein suboptimales Ergebnis zeigt (Hirsch et al., 2006). Unter einem suboptimalen Ergebnis versteht man eine Reststenose $>50\%$, ein elastischer Recoil oder eine flusslimitierende Dissektion (Bosch and Hunink, 1997).

2.4.3.3 Operative Therapieverfahren

Gefäßchirurgische Verfahren werden nur nach erfolgloser oder ungeeigneter endovaskulärer Therapie bei Patienten mit CI und CLI (kritischer Extremitätenischämie) und hohem Leisten- und Beckendruck eingesetzt (Lawall et al., 2015). Aorto-iliakale, femoro-poplietale und infrapoplietale Verschlüsse sollten unabhängig vom TASC-Stadium primär endovaskulär behandelt werden (Lawall et al., 2015). Beim Versagen dieser Therapieformen wird bei hohen Aortenverschlüssen oder Stenosen mit beidseitiger/-m Beckenarterienstenose/-verschluss die Anlage eines aorto-bifemorale bzw. biliacale Y-Bypass empfohlen. Die Prothese besteht hierbei am häufigsten aus Kunststoff wie Polytetrafluorethen (PTFE) oder Dacron-Doppelvelour. Die Offenheitsraten der Y-Prothese nach 10 Jahren liegen bei CI bei $>80\%$ und bei CLI bei $>70\%$ (de Vries and Hunink, 1997).

Verschlussprozesse der Femoralisgabel (A. femoralis communis, profunda-, superficialis-Abgang) sollten gemäß Leitlinien primär operativ behandelt werden (Lawall et al., 2015). Zum Standardverfahren gehört hierbei die Thrombendarteriektomie (TEA) mit Patch-Plastik (Gefäßflicken), bei der der Thrombus inklusive Gefäßintima ausgeschält wird (Kang et al., 2008). Bei Patienten mit hohem perioperativen Risiko wird in diesem Fall auch ein femoro-femorale Crossover-Bypass vorgezogen. Die Offenheitsrate des Crossover-Bypasses liegt nach 5 Jahren bei 70% (Norgren et al., 2007a).

Bei komplexen Mehretagenverschlüssen kann eine Kombination gefäßchirurgischer und endovaskulärer Verfahren sinnvoll sein und das perioperative Risiko senken (sog. Hybrideingriff) (Lawall et al., 2015). Hierbei liegen bisher noch keine Langzeitergebnisse für die Offenheitsraten vor (Lawall et al., 2015).

2.5 Restenoseentstehung

2.5.1 Restenose

Eine Restenose bezeichnet eine erneute über 50% -ige Lumeneinengung eines Gefäßes im Angiogramm nach einer zuvor erfolgreich durchgeführten endovaskulären Intervention (Yoshimura et al., 1998). Die Restenose gilt neben der chronischen Entzündung von Stents und der Spätthrombose als eine der größten Einschränkungen der Revaskularisationstherapie (Califf et al., 1991; Gruberg et al., 2000).

Die Restenose ist ein pathologischer Prozess, der in verschiedene Mechanismen unterteilt werden kann (Schillinger et al., 2006). Dazu gehören sowohl das Zusammenspiel elastischer Rückstellkräfte (Recoiling) mit Vasospasmus ca. 24 Stunden nach PTA (Block, 1990), das negative Remodeling und die Neointima-Formation (Mintz et al., 1996; Rosanio et al., 1999; Schillinger et al., 2006). Nach der Aufdehnung eines Gefäßes durch PTA besitzt dieses immer noch eine gewisse Elastizität, was zu einer Lumeneinengung durch Rückstellkräfte (Recoiling) bis hin zur Restenose führen kann (Popma et al., 1991). Unter dem negativen arteriellen Remodelling versteht man den lumenreduzierenden Umbau der externen elastischen Membran (Mintz et al., 1996; Rosanio et al., 1999). Unter der neointimalen Hyperplasie ist eine trauma-induzierte Proliferation glatter Muskelzellen und ihre Migration von der Media in die Intima der Gefäßwand mit darauffolgendem Lumenverlust gemeint (Clagett et al., 1986) (s. Abb. 2.1).

Man unterscheidet die postangioplastische Restenose nach alleiniger Ballongangioplastie und die In-Stent-Restenose (ISR) nach Stentimplantation. Die In-Stent-Restenose (ISR) tritt mit einer geringeren Häufigkeit als die postangioplastische Restenose auf und ist allein durch die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und der Herstellung extrazellulärer Matrix zur luminalen Seite des Stents bedingt (Mehran et al., 1999).

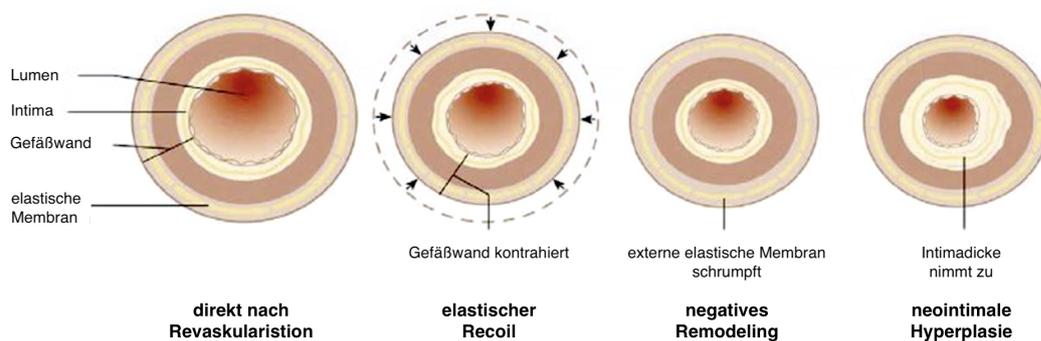


Abbildung 2.1: Restenose, modifiziert nach (Juliard, 2009)

2.5.1.1 Prozess der neointimalen Hyperplasie

Pathophysiologisch kommt es bei der Implantation eines Stents oder bei der Inflation eines Ballons zu einem Barotrauma der Gefäßwand (Devlin, 2015). Die starke Dehnung der Media kann zu einer Dissektion führen (Norton et al., 2012). Das Endothel, als innerste Schicht der Gefäßwand, wird verletzt und es kommt zum Aufbrechen von Zellverbänden und Freisetzung intrazellulärer Bestandteile wie Endothelin (Block et al., 1981; Geary and Clowes, 2007).

Endothelin hat eine vasokonstriktive und blutdruckerhöhende Wirkung (Pearson, 1991). Des Weiteren ist das Endothel nicht mehr in der Lage thrombozytenaggregationshemmende

und vasodilatierende Faktoren wie Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF), Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin zu bilden (Loscalzo and Vita, 2000; Rolland et al., 1984). Folglich fehlen wichtige vasoprotektive Bestandteile und es kann schneller zur Bildung eines Thrombus kommen (Geary and Clowes, 2007; Radomski et al., 1987).

Das entstandene sogenannte Pseudoendothel besteht aus glatten Muskelzellen und ist durchgängig für Makromoleküle (Clowes and Geary, 1994). Endothelin ist außerdem für die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren zuständig. Diese Mediatoren sind für die Rekrutierung von Leukozyten, die Thrombozytenaggregation und Fibrinablagerung in die beschädigte Gefäßwand verantwortlich (Waltham and Harris, 2004). Thrombozyten, glatte Muskelzellen und Leukozyten setzen wiederum Wachstumsfaktoren frei, die für die weitere Proliferation glatter Muskelzellen und ihre Migration von der Media in die Neointima verantwortlich sind (Welt and Rogers, 2002). Eine Schlüsselrolle bei der Lumeneinengung spielt daher die Intimaproliferation durch einwandernde glatte Muskelzellen aus der Media, Proliferation von T-Zellen, Makrophagen und der Produktion extrazellulärer Matrix (Rogers et al., 1993). Die neointimale Hyperplasie entsteht Wochen bis Monate nach der Gefäßintervention durch die Rekrutierung von Monozyten und der Proliferation glatter Muskelzellen in der Intima (Welt and Rogers, 2002).

2.5.1.2 Potentielle Rolle von Monozyten für die Restenose

Monozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Restenoseentwicklung nach PTA (Libby and Ganz, 1997). Studien zeigen sowohl eine Infiltration und Akkumulation von Monozyten in die geschädigte Gefäßwand, als auch eine positive Korrelation der Monozytenlevel im Blut mit der Proliferation glatter Muskelzellen und der Dicke der Neointima (Fukuda et al., 2004). Das Integrin Molekül Mac-1 (CD11b/CD18) ist für die Leukozytenrekrutierung nach vaskulären Verletzungen zuständig und wird auf der Oberfläche von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten gebildet (Furman et al., 1998).

Eine weitere zentrale Rolle für das Anlocken von Leukozyten bei der Restenose spielen die Zytokine MCP-1, IL-8 und IL-6. Sie werden von glatten Muskelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet (Rollins, 1996). Besonders IL-8 und MCP-1 sind für die Monozytenrekrutierung verantwortlich. Monozyten docken über P-Selektin an die geschädigte Gefäßwand an und sezernieren im Verlauf eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Metalloproteinasen. Diese Mediatoren führen zu einer Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in die Intima und einer neointimalen Hyperplasie (Libby et al., 1992).

In Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Blockade der Monozytenrekrutierung durch anti-inflammatorische Mittel zu einer verminderten Verdickung der Neointima führt (Rogers et al., 1993). Eine weitere effektive Möglichkeit zu Unterdrückung der Monozytenrekrutierung stellt die Blockade des MCP-1 Rezeptors dar (Mori et al., 2002). Sowohl bei Patienten mit Restenose nach Koronarangioplastie, als auch bei Patienten mit Restenose-

entwicklung nach peripherer Angioplastie, waren die Plasma-Level von MCP-1 signifikant erhöht (Cipollone et al., 2001; Heider et al., 2006). Man nimmt an, dass MCP-1 die Entstehung einer Restenose fördert, indem es zirkulierende Monozyten zur Produktion von Superoxiden (O_2^-) veranlasst (Cipollone et al., 2001). Die Unterdrückung der Expression von MCP-1 durch Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) zeigte folglich eine verminderte Rekrutierung und Migration von Monozyten in geschädigte Gefäßwände und somit eine merklich reduzierte neointimale Hyperplasie (Kopp et al., 2004).

Kapitel 3

Fragestellung der Arbeit

Bisherige Arbeiten haben gezeigt, dass Monozyten eine wichtige Rolle im inflammatorischen Prozess der Atheroskleroseentwicklung spielen. Durch die Produktion von Matrix-Metalloproteasen und Cathepsinen können Monozyten zudem zu einer Destabilisierung atherosklerotischer Plaques führen. Des Weiteren sind die Monozytenrekrutierung und das Ausschütten von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Metalloproteasen durch Monozyten, für die Restenoseentwicklung nach PTA mitverantwortlich.

Bislang wurde in Studien untersucht, ob die „klassische“, „nicht-klassische“ oder „intermediäre“ Monozytensubpopulation im Blut entzündliche Erkrankungen oder kardiovaskuläre Ereignisse vorhersagen können. Ob Monozytensubpopulationen auch ein prognostischer Biomarker für die Entstehung einer Restenose nach PTA bei pAVK sind, wurde jedoch bisher nicht eingehend untersucht.

Die Hypothese dieser Arbeit ist deshalb, dass Monozyten und ihre Subpopulationen bei Patienten mit pAVK einen Einfluss auf die Entwicklung einer Restenose nach endovaskulärer Rekanalisation haben und einen wichtigen prognostischen Biomarker für die Zukunft darstellen können. Des Weiteren soll gezeigt werden, dass die Oberflächenantigene (CCR2, CX₃CR1, CD11b, CD106, CD162) einen Einfluss auf die Entstehung einer Restenose nach peripherer perkutaner transluminaler Angioplastie haben. Die Expression von Myeloperoxidase der zirkulierenden Monozytensubpopulationen wird zusätzlich im Zusammenhang mit der Entstehung einer Restenose angeschaut.

Ein Ziel für die Zukunft wäre es, mit Hilfe der Bestimmung von Monozytensubpopulationen, Oberflächen- und intrazellulären Markern im Blut, frühzeitiger in den Entstehungsprozess der Restenose bei pAVK Patienten eingreifen zu können. So wäre es möglich einen erneuten Verschluss von Gefäßen nach PTA zu verhindern und die Offenheitsraten von Stents entscheidend zu verlängern.

Kapitel 4

Patienten und Methoden

4.1 Patienten

Bei dem durchgeführten Forschungsprojekt handelte es sich um eine klinisch-experimentelle prospektive Kohorten-Studie. Im Zeitraum von Januar 2012 bis Oktober 2014 wurden 67 Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit mit Indikation zur Angioplastie der Becken-Bein-Gefäße eingeschlossen. Die Rekrutierung fand über die Klinik und Poliklinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München statt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der TU München (Protokollnummer: 5147/11) genehmigt.

Im Rahmen der ambulanten Vorstellung oder der stationären Patientenaufnahme wurden alle Patienten ausführlich über den Sinn und Ablauf des Studienvorhabens informiert. Ihre Einverständniserklärung wurde schriftlich dokumentiert. Bei Aufnahme auf Station oder einer ambulanten Vorstellung fand eine gründliche Anamnese und klinische Untersuchung statt. Die Einteilung der Patienten entsprechend ihrem klinischen Beschwerdebild bzw. Ausprägung der pAVK erfolgte in die Fontaine- und Rutherfordstadien. Eine routinemäßige Duplexsonografie wurde durch den behandelnden Gefäßchirurgen durchgeführt und dokumentiert. Zur Einteilung der Gefäßläsionen in die TASC-Stadien und der weiteren Therapieplanung, erhielt jeder Patient vor der geplanten Intervention eine MRA oder CTA. Außerdem wurde zu jedem Zeitpunkt die schmerzfreie Gehstrecke mittels standardisiertem Laufbandtest evaluiert, der ABI bestimmt und venöses Blut zur Isolierung der Monozyten abgenommen.

Die Monozytensubpopulationen und Biomarker wurden im weiteren Verlauf mit dem Verfahren der Durchflussszytometrie identifiziert und der MPO-Gehalt durch intrazelluläre Färbung festgestellt. Die im Verlauf endovaskulär behandelten Probanden wurden je nach Aufnahmezeitpunkt zu weiteren Follow-up Untersuchungen nach 3, 6 und 12 Monaten inklusive erneuter Anamnese, klinischer Untersuchung und Blutentnahme in das Klini-

kum rechts der Isar einbestellt. Eine Angiographie mit darauffolgender Angioplastie wurde leitliniengerecht durchgeführt. 30 Patienten wurden mittels einfacher Ballonangioplastie behandelt. 37 Patienten benötigten im Bereich der Gefäßverengung zusätzlich eine Nitinol Gefäßprothese (Stent). Während des Eingriffs wurden 5000 Einheiten Heparin zur Antithrombose-Prophylaxe appliziert. Postoperativ wurden für 6 Wochen 75mg/d Clopidogrel und 100mg/d Acetylsalicylsäure lebenslänglich angeordnet.

4.2 Methoden

4.2.1 klinische Datenerhebung

4.2.1.1 Anamnese

Die klinischen Daten wurden während der Anamneseerhebung sowie durch die Einsicht in Krankenakten und elektronische Patientenakten aus dem Klinik Informationssystem (KIS) erhoben. Dazu gehörten die quantitativen Parameter Alter, Hypertonus ($>140/90$), Hyperlipidämie (Gesamtcholesterin $>225\text{mg/dl}$, Triglyceride $>180\text{mg/dl}$, LDL $>180\text{mg/dl}$), BMI und Adipositas ($>30\text{kg/m}^2$). Außerdem wurden die qualitativen Angaben Geschlecht, Risikofaktoren der Atherosklerose, Begleiterkrankungen und Medikamenteneinnahme ermittelt. Einschlusskriterien waren das pAVK Stadium IIa/b bis III nach Fontaine bzw. 1-4 nach Rutherford und ein ABI $<0,9$. Ausschlusskriterien waren die Einnahme antiinflammatorischer Medikamente oder Immunsuppressiva, hämatologische Grunderkrankungen, Vaskulitiden oder instabile Angina Pectoris sowie eine pAVK im Stadium IV nach Fontaine da Letzteres im Rahmen der Strukturdefekte des Weichgewebes die Spiegel der zu messenden Biomarker verfälscht hätte.

4.2.1.2 Evaluierung der Gehstrecke

In der Studie wurde der ABI sowohl vor als auch nach dem Laufbandtest evaluiert. Beim liegenden Patienten wurde zuerst der systolische Blutdruck beider Oberarme in Ruhe gemessen. Dann wurden die Verschlussdrücke der A. tibialis posterior und A. dorsalis pedis beidseits mit Hilfe einer Dopplersonde (5-7 MHz) erfasst. Die Dopplersonde wurde dabei in einem Winkel $<60^\circ$ zum Gefäß gehalten. Der ABI wurde mittels Division des jeweils niedrigsten Knöchelverschlussdruckes durch den jeweiligen systolischen Blutdruckwert berechnet. Nach der Evaluation des ABI mussten die Patienten einen Laufbandtest mit einem standardisierten Programm (3,5km/h und 10% Steigung) absolvieren. Hier wurde die maximale schmerzfreie Gehstrecke erhoben. Wobei die maximale Gehstrecke beim Überschreiten von 1 km beendet wurde. Direkt im Anschluss wurde dann ein weiteres Mal der Knöchelverschlussdruck im Liegen gemessen.

4.2.1.3 Duplexsonografie und Therapieverfahren

Nach der Anamnese und klinischen Untersuchung wurde bei jedem Patienten eine Duplexsonographie durchgeführt. Hier wurden die Gefäße von der Aortenbifurkation bis zu den Becken- und Beinarterien von einem Gefäßchirurgen des Klinikums rechts der Isar beurteilt. Gefäßveränderungen ließen sich durch die Darstellung der Intima-Media-Dicke und dem perivaskulären Gewebe festhalten. Durch den Pulsed-wave-(Pw-)Doppler ließen sich genaue Aussagen über das Flussprofil von Stenosen und Verschlüssen treffen. Bei gesunden Gefäßen zeigte sich in der Duplexsonografie ein triphasisches Flußprofil mit steilem systolischem Anstieg. Bei mittelgradigen (50-60%) und hochgradigen (70%) Stenosen zeigte sich ein biphasischer oder monophasischer Kurvenverlauf, mit einem geringen Rückflussanteil. Das sogenannte Peak Velocity Ratio (PVR) wurde zur Quantifizierung der Stenosen von Studienpatienten angewandt. Dabei wurde die maximale Geschwindigkeit innerhalb der Stenose durch die systolische Maximalgeschwindigkeit vor der Stenose geteilt. Es wurden Stenosen und Verschlüsse der arteriellen Gefäßbahn sowie deren Länge erfasst, um danach über weitere Therapiemaßnahmen entscheiden zu können.

Im weiteren Verlauf der Follow-up Studie wurde ein besonderes Augenmerk auf Restenosen nach Ballonangioplastie mit ggfs. sekundärem Stenting gelegt. Vor jeder Intervention wurde ein MRA oder CTA gemacht. Die Bilder wurden daraufhin im Gefäßboard des Klinikums rechts der Isar besprochen und im Konsens über ein leitliniengerechtes Therapieverfahren entschieden. Das Therapieverfahren bestand aus einer Angiographie mit darauffolgender Angioplastie der Gefäße mittels Ballonkatheter und wenn nötig einer zusätzlichen Stentimplantation eines selbstexpandierenden Nitinol Stents.

4.2.2 Probengewinnung und Probenverarbeitung mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Gewinnung der Monozytensubpopulationen wurden den Probanden zwei NH_4 -Heparin Blutmonovetten abgenommen. Die Proben wurden entweder sofort im Labor aufbereitet oder für maximal 2 Stunden in einem 4°C Kühlschrank auf der Station der Gefäßchirurgie oder dem Gefäßzentrum gelagert und unmittelbar anschließend verarbeitet.

Als Verfahren für die Isolierung der Monozyten wurde die Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Es handelt sich um ein physikalisches Trennverfahren mittels Zentrifuge (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, D).

Bei diesem Verfahren werden Makromoleküle anhand ihrer Dichte durch die Zentrifugalkraft in unterschiedlichen Phasen formiert. Ficoll (Ficoll-Paque TM Plus, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) ist ein stark verzweigtes synthetisches Polysaccharid, dessen Saccharosemonomere über Epichlorhydrin vernetzt sind. Die Ficoll-Hypaque Lösung besitzt eine größere Dichte (1.077g/ml) als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. Daher reichern sich durch Zentrifugation mononukleäre Zellen in der Interphase zwischen Ficoll und

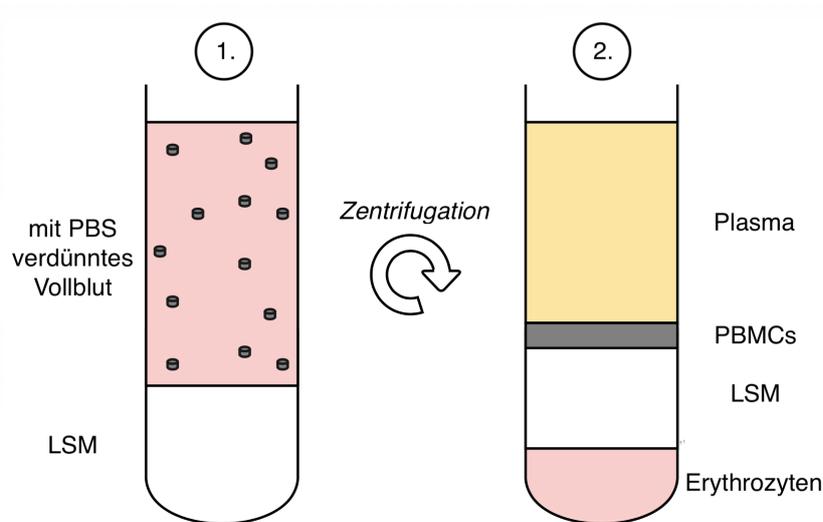


Abbildung 4.1: Dichtegradientenzentrifugation. 1. Mit PBS verdünntes Vollblut auf LSM (Lymphocyte Separation Medium) geschichtet 2. Nach Zentrifugation reichern sich die mononukleäre Zellen in der Interphase zwischen LSM und Plasma an. Erythrozyten lagern sich als Sediment am Boden ab. PBMCs: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, PBS: Phosphate Buffered Saline.

Plasma an. Granulozyten, Erythrozyten und tote Zellen bleiben als Sediment am Boden der Röhrchen zurück. Zu den mononukleären Zellen gehören B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen (NK) und Monozyten. Die Plasmaphase liegt über der Interphase und beinhaltet die Thrombozyten (s. Abb. 4.1).

Das heparinisierte venöse Vollblut wurde zuerst 1:1 in 50ml-Röhrchen mit 15ml DPBS verdünnt. Das antikoagulierte Probenmaterial (30ml) wurde dann langsam auf 15ml eines Separationsmediums (Ficoll-Paque Plus, Dichte 1,077g/ml, GE Healthcare, NJ) pipettiert. Dabei musste beachtet werden, dass sich der Dichtegradient und das Probenmaterial nicht sofort miteinander vermischen. Der Trennungsprozess durch Zentrifugalkräfte erfolgte im Ausschwingrotor ohne Bremse bei 1600rpm für 20 Minuten bei 18°C (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Deutschland). Nach der Zentrifugation zeigte sich folgende Phasenschichtung von oben nach unten: Plasma in der obersten gelblichen Schicht. In der Interphase darunter befanden sich die mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Ganz unten am Boden des Röhrchens sammelten sich Granulozyten und Erythrozyten (s. Abb. 4.1).

Der Interphasenring mit den mononukleären Zellen wurde abpipettiert und in ein neues 50ml Röhrchen mit ca. 10ml PBS überführt und 5 Minuten gewaschen. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in ein Nährmedium mit 500µl DMEM (DMEM, Dulbecco's, PAA, Pasching, Österreich) und 500µl Einfriermedium (80% FCS (FCS, PAA, Pasching, Österreich) und 20% DMSO (DMSO, BioChemika, Buchs, CH) resuspendiert.

Die resuspendierten Zellen wurden mit der Zählkammer nach Neubauer (Heinz Herenz

Medizinbedarf, Hamburg, D) ausgezählt. Die isolierten Monozyten wurden dann zunächst einen Tag bei -20°C eingefroren und den Tag darauf in einen -80°C Gefrierschrank überführt.

4.2.3 Aufbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Die bei -80°C eingefrorenen peripheren mononukleären Zellen wurden für die Durchflusszytometrie in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Jede Probe wurde mit 1ml Medium (90% DMEM, 10% FCS) aufgetaut und danach Tropfen für Tropfen in ein 15ml Falcon-Röhrchen mit demselben 10ml Medium (90% DMEM, 10% FCS) überführt. Wichtig war hierbei, dass das Probenmaterial mit dem Auftaumedium von dem Zeitpunkt an immer in einem 4°C Eisbehälter aufbewahrt wurde. So sollte die Anzahl an toten Zellen so gering wie möglich gehalten werden. Die 15ml Falcon-Röhrchen mit dem Probenmaterial wurden zentrifugiert (9min, 2500rpm, 4°C), der Überstand abgekippt und das zurückbleibende Pellet mit 5ml DPBS/ 2% FCS aufgefüllt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 Minuten bei 2500rpm wurde der Überstand verworfen.

Bei 4 Färbereihen für 10 Patientenproben wurde jedes 15ml Falcon-Röhrchen mit 1,5ml DPBS/ 2%FCS resuspendiert. Eine Kompensationsreihe war zur Überprüfung der Kalibrierung des FACS-Gerätes und Antikörperfärbung gedacht. In einem nächsten Schritt wurde das Probenmaterial in die Röhrchen für die Durchflusszytometrie transferiert und die Färbung der Zellen mit Fluoreszenzantikörpern begonnen.

4.2.4 Färbung der Zellen mit Fluoreszenzantikörpern

4.2.4.1 Oberflächenmarker

Fluoreszenzantikörper sind sogenannte sekundäre Antikörper, die an Konjugate oder Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Fluoreszenzfarbstoffe binden an Fc- oder Fab-Antikörper, die gegen bestimmte Merkmale gerichtet sind (Wessendorf 1993). Durch die fluoreszierende Gruppe werden Signale ausgesendet, die mit Hilfe eines Durchflusszytometers auch Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) genannt, detektiert werden können.

In dieser Studie wurde die Zellsuspension mit an Fluoreszenzen gebundene Antikörper, im Verhältnis 1:100 gefärbt. Alle im Versuch benutzten Antikörper wurden von BD, Biosciences, San Diego, USA bezogen. Bei den monoklonalen Antikörpern handelte es sich um CD11b-V450/ICRF44, CD14-PerCP-Cy5.5/M5E2, CD16-PE-Cy7/3G8, CCR2-Alexa-647/48607, CX3CR1-FITC/2A9-1, MPO-FITC/5B8, CD162-PE/KPL-1 und CD106-PE/51-10C9. Die Buchstaben hinter den Schrägstrichen stehen jeweils für die monoklonalen Antikörper.

Der Versuch bestand aus 4 Färbereihen mit je einem definierten Antikörpermix für jeweils 10 verschiedene Patientenproben. Das in der Dichtegradientenzentrifugation gewonnene Probenmaterial (1,5ml DPBS/ 2% FCS und PBMCs) eines Patienten wurde mit 300 μ l auf 4 FACS Tubes verteilt. Der Antikörpermix wurden dann mit 500 μ l DPBS/2% FCS angesetzt, um später 50 μ l auf 10 FACS Tubes aufteilen zu können.

Die Fluoreszenzantikörper wurden nach einem Färbepplan hinzupipettiert und die Proben für 30 Minuten zur Inkubation in einem auf -4°C eingestellten Kühlschrank gelagert. Im Anschluss folgten der Waschschrift und die Zentrifugation, bei denen zu jeder Probe und jeder Kompensation 1ml DPBS/ 2%FCS hinzugefügt wurde. Der Überstand wurde danach abgekippt und die Proben mit 400 μ l DPBS/2% FCS aufgefüllt. Das Probenmaterial, welches keine intrazelluläre Färbung mit MPO erhalten sollte, wurde mit Hilfe von Cell Strainer Caps gefiltert und bei -4°C gelagert.

4.2.4.2 Intrazelluläre Färbung

Um den Myeloperoxidase (MPO)-Gehalt der Monozytensubpopulationen herauszufinden, wurde eine intrazelluläre Färbemethode angewendet. Bevor das Probenmaterial jedoch intrazellulär gefärbt wurde, musste es mit Formalin (Formaldehyd) permeabilisiert und fixiert werden.

Formalin (4%) wird dabei benutzt, um die ursprüngliche Morphologie der Zelle zu erhalten und das Gewebe zu stabilisieren. Die Proteine werden durch die Aldehydgruppen des Formalins quervernetzt (cross-linking), so ist man in der Lage sowohl intrazelluläre als auch intranukleäre Proteine mit dem Durchflusszytometer zu erfassen. Bei zu langer Fixierung vernetzen die Zellen und Antigene und sind schwer oder gar nicht für Antikörper zugänglich.

Die Proben für die intrazelluläre Färbung wurden in dieser Studie in 250 μ l Formalin (BD Cytotfix/Cytoperm, BD Biosciences, San Diego, USA) resuspendiert und gemischt. Nach 20 Minuten Lagerung in einem 4°C Kühlschrank, wurden die Proben mit 1ml Saponin, PermWash Solution (BD Perm/Wash tm, Buffer, BD Biosciences, San Diego, USA) und einer 1:10 Konzentration Aquadest (Aqua B. Braun, Melsungen, D) für 5 Minuten bei 2500rpm in 4°C gewaschen. Saponin ist ein Detergenz, welches die Zellmembran permeabilisiert und für Antikörper durchgängig macht.

Der Überstand wurde verworfen und die fixierten Zellen mit 300 μ l PermWash Solution gemischt. Im nächsten Schritt wurde MPO-FITC/5B8 mit 500 μ l Permwash Solution angesetzt und mit je 50 μ l auf die FACS Tubes verteilt. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten in einem 4°C Kühlschrank. Im Anschluss wurden die Zellen ein letztes Mal mit einer 1ml Permwash Solution gewaschen und in 400 μ l DPBS/FCS2% resuspendiert.

4.2.4.3 Lebend-tot-Färbung mit Propidiumiodid

Propidiumiodid (PI) ist ein kationischer Farbstoff, der lebende von toten Zellen differenzieren kann. Er markiert die DNA toter Zellen indem er durch die zerstörte Zellmembran toter Zellen dringt und an die doppelsträngige DNA oder rRNA im Zellinneren bindet. Bei Zellen, die vorher mit Formaldehyd fixiert wurden, funktioniert die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen nicht mehr, da durch die Fixierung jede Zellmembran durchlässig für PI wird.

Bei der Lebend-tot-Färbung mit PI wurde im Versuch zu drei der vier Antikörpermische (die intrazelluläre Färbereihe erhielt kein PI) plus Kompensationen jeweils $2\mu\text{l}$ PI hinzupipettiert. Dann folgte die Färbung der Zellen und die Proben wurden für 20 Minuten zur Inkubation in einem auf -4°C eingestellten Kühlschranks gelagert. Im Anschluss folgten der Waschschrift und die Zentrifugation, bei denen zu jeder Probe und jeder Kompensation 1ml DPBS/ 2%FCS hinzugefügt wurde. Der Überstand wurde danach abgekippt und die Proben mit $400\mu\text{l}$ DPBS/2% FCS aufgefüllt. Nach der Färbung erfolgte die FACS Analyse.

4.2.5 Durchflusszytometrie

4.2.5.1 Durchführung

Die Durchflusszytometrie ist eine quantitative und qualitative Analysetechnik zur Charakterisierung von einzelnen Zellen. In diesem Projekt wurde die Durchflusszytometrie unter anderem zur Bestimmung von Monozyten verwendet. Um den Zelltyp der Monozyten zu detektieren wurden die Zellen in einer Spülflüssigkeit einzeln an einem gebündelten monochromatischen Laserstrahl (Argonlaser 488nm blau, He-Ne 633nm rot, Violet 405nm) vorbeigeleitet. Hierbei kommt es zur Streuung des einfallenden Laserstrahls durch die Zellen. Die Lichtstreuung wird dabei von der Querschnittsfläche, Struktur der Membran und den intrazellulären Bestandteilen der Zelle beeinflusst. Das ($3-10^\circ$ Vorwärtsstreulicht (FSC)-Lichtbrechung) erlaubt eine Aussage über die Größe der Zelle, wohingegen das (90° Seitwärtsstreulicht (SSC)-Lichtbrechung) die Granularität der Zelle detektiert. FSC und SSC werden in einem linearen Fluoreszenzsignal über logarithmische Verstärkung aufgenommen.

Durch einen Computer werden dann die digitalen Daten in ein Diagramm aufgetragen (FSC über SSC) und somit die Unterscheidung der Leukozytensubpopulationen möglich gemacht. Mit einer speziellen Software kann man die Ergebnisse entweder als zweidimensionalen Dot Plot oder eindimensionales Histogramm darstellen lassen.

Des Weiteren wurde mit dem Durchflusszytometer die Expression der Oberflächenantigene CD14 und CD16 auf den Monozyten gemessen. Somit war eine Unterscheidung der verschiedenen Monozytensubpopulationen möglich. Hierfür wurden CD14 und CD16 mit monoklonalen Antikörpern markiert. CD14 mit dem Antikörper PerCP-Cy5.5 und CD16 mit PE-

Cy7. PerCP-Cy5.5. wurde zusätzlich an das fluoreszierende Molekül (FITC) Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelt und PE-CY7 an Phycoerthrin (PE). Die Zellen mit den fluoreszenzgekoppelten Oberflächenantigenen wurden wiederum in Suspension einzeln an dem gebündelten monochromatischen Laserstrahl (Argonlaser 488nm blau, He-Ne 633nm rot, Violet 405nm) vorbeigeleitet.

Werden FITC oder PE mit Strahlung einer bestimmten Wellenlänge in diesem Fall einem Argonlaser angeregt emittieren sie Licht in einer charakteristischen Wellenlänge. Die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes ist abhängig von der Zahl der markierten Bindungen auf der Oberfläche der Zelle, und das emittierte Licht korreliert mit der Dichte der Oberflächenantigene (Rezeptoren) der gemessenen Zelle. Das emittierte Fluoreszenzlicht der verschiedenen Fluorochrome wird durch Teilspiegel und farbselektive Bandpassfilter in Fluoreszenzspektren aufgeteilt. Die Photomultiplier (Bildverstärkerröhrchen) detektieren dieses Streulicht und leiten es weiter zu einem Digital-Wandler, der es in elektrische Signale transformiert. Die Expression der Oberflächenantigene CD11b-V450, CCR2-Alexa-647, CX₃CR1-FITC, MPO-FITC, CD162-PE und CD106-PE auf den Monozytensubpopulationen wurde in gleicher Weise mit dem Durchflusszytometer gemessen.

Bei dem in der Studie verwendeten Durchflusszytometer handelte es sich um einen Cyan ADP Analyzer von Beckman Coulter (Cyan ADP Analyzer, Beckman Coulter, Fichtenhain, Deutschland). Mit diesem Durchflusszytometer können 11 verschiedene Fluoreszenzfarben inklusive FSC, SSC und bis zu 10⁸ Events pro Sekunde gemessen werden. Im angewendeten Analysegerät standen 9 Filter (Fluoreszenzkanäle) und 3 Laser (Argon, Violet, HeNe) zur Verfügung: für 488nm (FL1-FL5), 405nm (FL6-FL7) und 633nm (FL8-FL9).

4.2.5.2 Gating

Gating bezeichnet eine wichtige Auswertetechnik der Durchflusszytometrie. Dabei wird nur die Zellpopulation untersucht, die von Interesse ist. In der Studie wurde die Region der Monozyten manuell im Streulichtdiagramm eingezeichnet (siehe Kreis linker Dot Plot) und mit R1 bezeichnet (s. Abb. 4.2). Im Fluoreszenzdotplot wurden dann die Monozytensubpopulationen aus R1 dargestellt (s. Abb. 4.2). In modernen FACS- Programmen können bis zu 16 Gates gesetzt werden. Durch die Gating-Technik konnte in der Studie die Expression der CD14⁺⁺/CD16⁻, CD14⁺/CD16⁺⁺ und CD14⁺⁺/CD16⁺⁺ Subpopulationen und weitere Biomarker bestimmt werden.

4.2.5.3 Auswertung

Die FACS Ergebnisse wurden auf einem Apple Mac Computer mit Hilfe des Software-Programms FlowJo v.8.5.2 (Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA) ausgewertet.

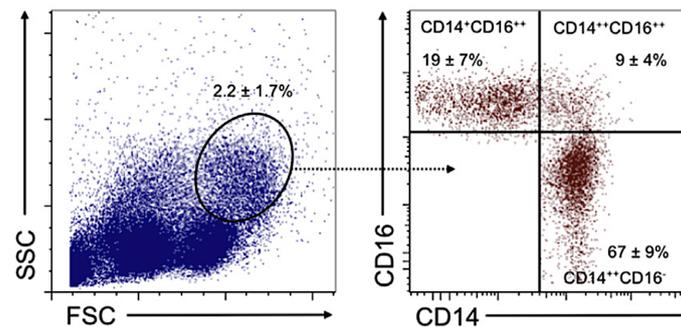


Abbildung 4.2: Gating. Der erste Dot-Plot (links) zeigt die Monozytenpopulation (eingekreist) im Vorwärts/Seitwärtsstreulicht der Durchflusszytometrie. Der zweite Plot (rechts) zeigt die gegateten Monozytensubpopulationen

4.3 Statistik

Für die Statistik wurden die Ergebnisse des gesamten endovaskulär therapierten Studienarms herangezogen. Die gewonnenen Daten wurden zuerst in Excel (Version 13, Microsoft Corporation, Redmond, USA) erfasst und dann mit der Software Prism für Macintosh Version 6.0c (GraphPad, LaJolla, USA) und SPSS (Version 21.0, IBM, Chicago, USA) analysiert. Die statistische Auswertung fand in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Alexander Hapfelmeier vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie (ISME) der TU München statt.

Für alle Daten wurden jeweils der arithmetische Mittelwert (M), die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet. Die Häufigkeit des Vorkommens einer Maßzahl wurde außerdem in Prozent (%) angegeben. Nachdem die Daten auf Normalverteilung getestet wurden, wurde für die Auswertung der klinischen Daten ein univariates Coxregressionsmodell verwendet. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant gewertet. Potentielle Confounder konnten mithilfe einer Stratifizierung ausgeschlossen werden. Zum Vergleich der Monozytengesamtzahl, Monozytensubpopulationen und Biomarker von Patienten mit und ohne Restenoseentwicklung wurde nach der Überprüfung der Normalverteilung ebenfalls ein univariates Coxregressionsmodell zur Berechnung des Hazard Ratios (HR) durchgeführt. Die grafische Darstellung erfolgte mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven, in der die Restenosefreiheit der Patienten in Prozent in Zusammenhang mit der Zeit in Monaten nach der Gefäßintervention abgebildet wurde.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 Patienten und Restenose

Es wurden 67 Patienten mit der Diagnose pAVK in die Studie eingeschlossen (Fontaine Stadium 2a/b und 3, Rutherford 1-4), die im Zeitraum von 2012 bis 2014 mittels einer peripheren transluminalen Angioplastie behandelt wurden. Tabelle 1 zeigt die untersuchten Patientencharakteristika. Die Follow-Up Untersuchungen fanden 3,6 und 12 Monaten nach PTA statt. Es gab 34 Drop-outs aus der Studie (18 nach 3 Monaten, 4 nach 6 Monaten und 12 nach einem Jahr).

Innerhalb von einem Jahr entwickelten 16 Patienten eine Restenose an der primären Stelle der Angioplastie (5 Patienten nach 3 Monaten, 8 Patienten nach 6 Monaten und 3 Patienten nach 12 Monaten). Die Studie machte keine Aussage zur Restenoserate nach alleiniger Ballongangioplastie vs. zusätzlichem Stenting.

Patienten mit einer Hyperlipidämie (Blutwerte des Low Density Lipoprotein (LDL) von $>160\text{mg/dl}$) hatten ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Restenose (HR=1.7, 95% CI 0.7-2.9, $p=0.001$). Bei Patienten mit einem zusätzlich vorhandenen Aortenaneurysma (HR=3.3, 95% CI: 1.0-10.4, $p=0.038$) war das Risiko für die Entstehung einer Restenose ebenfalls signifikant erhöht. Eine Carotisstenose als Nebendiagnose erhöhte das Risiko eine Restenose nach PTA zu bekommen um das 2,2-fache (HR=2.2, 95% CI: 0.7-7.7, $p=0.220$). Die anderen untersuchten demographischen Faktoren wie die TASC-Klassifikation, Vormedikation etc. zeigten keine Korrelation für die Entwicklung einer Restenose (s. Tab. 5.1).

Patienten-Charakteristika ¹	Total (n = 67)	HR	95% CI	p-Wert
Alter (in Jahren)	71,0 ± 10,9	1,0	1,0-1,1	0,725
BMI (in kg/m ²)	26,3 ± 3,8	1,0	0,8-1,1	0,570
Geschlecht		0,9	0,3-2,4	
Männlich	40 (59,7)			
Weiblich	27 (40,3)			
Risiko-Faktoren				
Artieller Hypertonus	58 (86,6)	1,0	0,8-1,2	0,950
Nikotinabusus	20 (29,9)	1,0	0,9-1,2	0,572
Diabetes	21 (31,3)	1,0	0,8-1,2	0,680
Hyperlipidämie	26 (38,8)	1,7	0,7-2,9	0,001
Adipositas	11 (16,4)	1,1	0,9-1,5	0,287
Andere Erkrankungen				
Chronische Erkrankungen	11 (16,4)	0,5	0,1-2,2	0,370
Niereninsuffizienz	18 (26,9)	0,9	0,8-1,1	0,294
Dialyse	25 (37,3)	1,2	0,6-2,6	0,591
Koronare Herzerkrankung	22 (32,8)	0,7	0,2-2,1	0,470
Karotisstenose	7 (10,4)	2,2	0,7-7,7	0,220
Aortenaneurysma	7 (10,4)	3,3	1,0-10,4	0,038
Malignomerkrankung	13 (19,4)	1,0	0,3-3,4	0,960
Medikation				
Statine	43 (64,2)	0,9	0,8-1,1	0,360
ACE-Hemmer	25 (37,3)	1,0	0,9-1,1	0,870
β-Blocker	27 (40,3)	1,0	0,9-1,2	0,460
Cilostazol	2 (3)	0,9	0,7-1,2	0,435
Warfarin	8 (11,9)	1,0	0,9-1,4	0,500
Thrombozytenaggregationshemmer	62 (92,5)	1,0	0,7-1,2	0,680
TASC-Klassifikation				
Iliakal A	26 (38,8)	0,5	0,2-1,5	0,220
Iliakal B	14 (20,9)	1,8	0,6-5,2	0,269
Iliakal C	3 (4,5)	0,1	0,0-1,2	0,550
Iliakal D	2 (3)	0,1	0,0-1,1	0,630
Femoro-popliteal A	24 (35,8)	1,8	0,7-4,8	0,240
Femoro-popliteal B	24 (35,8)	0,6	0,2-1,8	0,360
Femoro-popliteal C	5 (7,5)	0,7	0,1-5,4	0,740
Femoro-popliteal D	9 (13,4)	0,9	0,2-3,8	0,840
Gehstrecke (in m)				
prä-PTA	234 ± 264	1,0	0,9-1,0	0,860
bei Entlassung	750 ± 458	1,0	0,9-1,0	0,100
nach 3 Monaten	575 ± 440	1,0	0,9-1,0	0,043
nach 6 Monaten	534 ± 439	1,0	0,9-1,0	0,020
nach 12 Monaten	467 ± 368	1,0	0,9-1,0	0,073
ABI				
prä-PTA	0,61 ± 0,32	0,1	0-7,1	0,300
bei Entlassung	0,90 ± 0,37	1,4	0,1-24,7	0,800
nach 3 Monaten	0,76 ± 0,28	0,1	0,0-1,1	0,065
nach 6 Monaten	0,64 ± 0,23	0,6	0-44,8	0,810
nach 12 Monaten	0,72 ± 0,28	0,1	0-3,4	0,160

Tabelle 5.1: Patienten-Charakteristika

¹Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung oder als absolute (n) und relative Häufigkeit (in %)

5.2 Monozyten und Restenose

Die Gesamtmonozyten im peripheren Blut der beobachteten Studienpopulation wurden mit Hilfe von Dot Plots im Vorwärtsstreulicht (FSC) gegenüber Seitwärtsstreulicht (SSC) des Durchflusszytometers detektiert. Nach der Markierung der DNA toter Zellen mittels PI wurden nur lebendige Monozyten in Prozent für die Auswertung herangezogen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Forest Plots, in denen die Hazard Ratios für Entstehung einer Restenose zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten zu sehen sind. Zum Untersuchungszeitpunkt vor der Gefäßintervention zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Monozytengesamtzahl (in %) und dem Risiko im Verlauf eine Restenose zu bekommen (HR=4.95, 95% KI: 1.3-8.6, p=0.047). Nach 6 und 12 Monaten war ebenfalls ein positiver Zusammenhang mit einem erhöhtem Hazard Ratio zwischen einer erhöhten Monozytengesamtzahl und dem Restenoserisiko zu erkennen (s. Abb. 5.1).

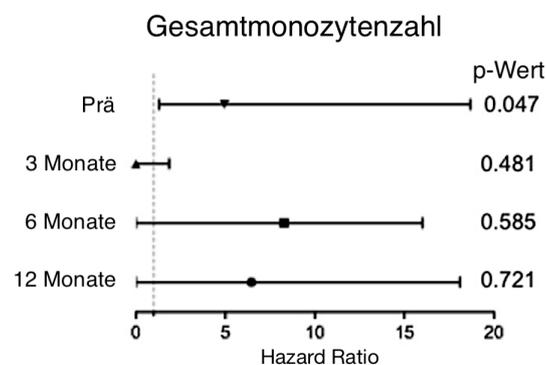


Abbildung 5.1: Gesamtmonozytenzahl und Restenose. Die Abbildung zeigt einen Forest Plot mit den Hazard Ratios auf der x-Achse und den Untersuchungszeitpunkten auf der y-Achse für den Zusammenhang erhöhter Gesamtmonozyten und der Entstehung einer Restenose. Das Forest Plot zeigt den Mittelwert für jedes Hazard Ratio und den zugehörigen 95% Konfidenzintervall mit dem errechneten p-Wert.

In der graphischen Darstellung mittels Kaplan-Meier-Kurve zeigte sich eine deutliche Abnahme der restenosefreien Zeit der Patienten bei erhöhten Gesamtmonozytenzahlen. Über 80% der Patienten hatten 6 Monate nach PTA noch keine Restenose entwickelt, wenn sie eine Gesamtmonozytenzahl von 2% im peripheren Blut hatten. Im Gegensatz dazu, waren zum selben Zeitpunkt nur noch ca. 50% der Patienten restenosfrei bei 6% Gesamtmonozyten im Blut (s.Abb. 5.2).

5.3 Monozytensubpopulationen und Restenose

Nach der Identifizierung der Monozyten mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht im Durchflusszytometer, konnten unterschiedliche Expressierungen der Subpopulationen bei

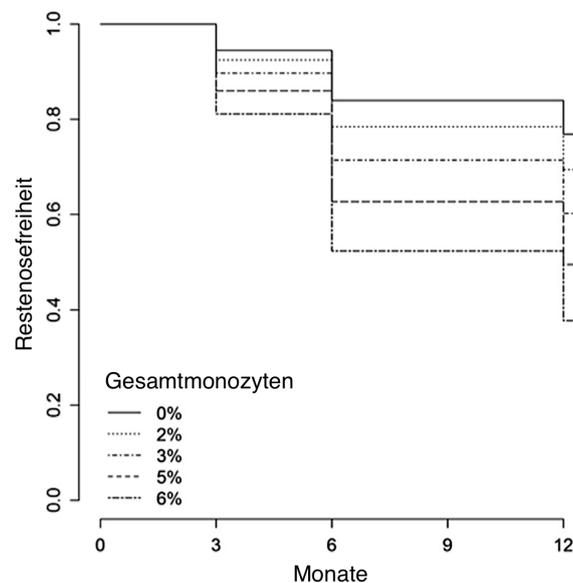


Abbildung 5.2: Gesamtmonozytenzahl und Restenosefreiheit. Die Abbildung zeigt die Restenosefreiheit in % auf der y-Achse in Zusammenhang mit der Gesamtmonozytenzahl in % über den Untersuchungszeitraum von 12 Monaten (x-Achse).

Patienten mit und ohne Restenose festgestellt werden. Die drei bekannten Monozytensubpopulationen wurden je nach Expression ihrer CD14- und CD16-Antikörper und bezüglich ihrer Expression von CCR2 und CX₃CR1 eingeteilt. Die „nicht-klassische“ Subpopulation wurde als CD14⁺/CD16⁺⁺ definiert und lag im oberen linken Quadranten des FACS Dot Plots. Die doppelt positiven CD14⁺⁺/CD16⁺⁺-Monozyten wurden als die „intermediäre“ Subpopulation identifiziert, und lagen im oberen rechten Quadranten des FACS Dot Plots. Im rechten unteren Quadranten lag die „klassische“ Monozytensubpopulation mit charakteristischer CD14⁺⁺/CD16⁻-Expression (s. Abb. 5.3).

Die univariate Cox-Regression ergab, dass ein 3,9-fach erhöhtes signifikantes Risiko für die Entstehung einer Restenose von der Expression der „intermediären“ Monozytensubpopulation vor Angioplastie ausgeht (95% KI: 2.4-6.5, p=0.029) (s. Abb. 5.4). Zudem zeigte sich, dass zum Zeitpunkt 3 Monate (HR=5.7, 95% KI=0.7-44.7, p=0.013), 6 Monate (HR=6.5, 95% KI: 2.5-16.9, p=0.001) und 12 Monate (HR=1.5, 95% KI: 1.4-15.5, p=0.015) nach Gefäßintervention, die CD14⁺⁺CD16⁺⁺-Monozyten das Restenose-Risiko signifikant erhöhen (s. Abb.5.4). Die „nicht-klassischen“ Monozyten zeigten ebenfalls einen Zusammenhang zur Entstehung einer Restenose zum Zeitpunkt 3, 6 und 12 Monate nach PTA, jedoch ohne Signifikanz. Der „klassischen“ Monozytensubpopulation konnte in unserer Studie keinen Einfluss auf das Risiko einer Restenoseentwicklung nachgewiesen werden. Siehe rechten Forest Plot Abbildung 5.4.

Als bessere Veranschaulichung zeigte sich in den Kaplan-Meier-Kurven, dass bei 3% „intermediären“ Monozytengehalt im peripheren Blut zum Zeitpunkt 6 Monate nach PTA

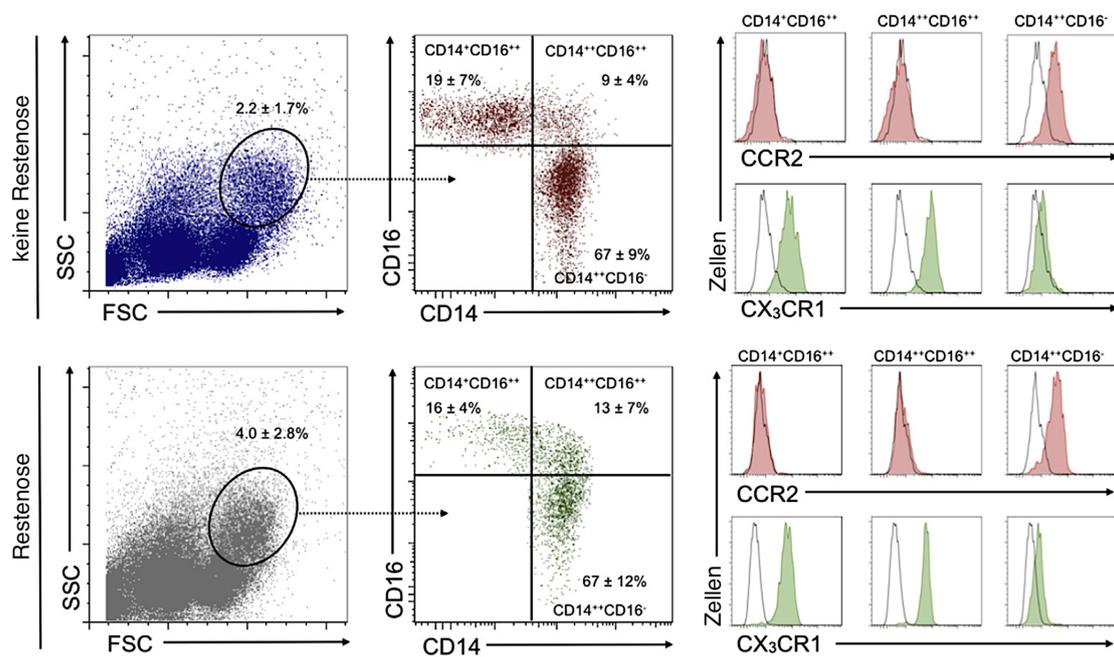


Abbildung 5.3: Monozytensubpopulationen und Restenose im Durchflusszytometer. Die Dot plots in der ersten Reihe zeigen exemplarische Monozytensubpopulationen und Verteilungen bei Patienten ohne Restenoseentwicklung. Die zweite Reihe zeigt die Verteilung der Monozytensubpopulationen bei Patienten mit einer Restenose nach PTA. Die roten Histogramme zeigen die CCR2 und die grünen Histogramme die CX₃CR1 Expression.

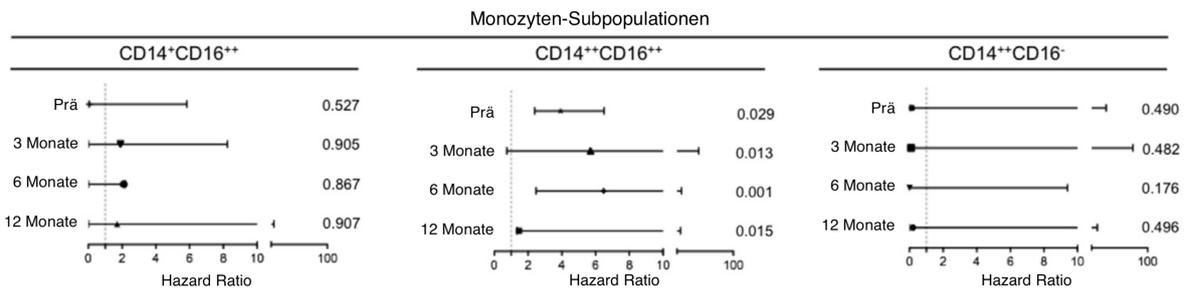


Abbildung 5.4: Monozytensubpopulationen und Restenose. Die Abbildung zeigt für alle Monozytensubpopulationen („nicht-klassisch“, „intermediär“ und „klassisch“) jeweils einen Forest Plot mit den Hazard Ratios auf der x-Achse und den Untersuchungszeitpunkten auf der y-Achse für den Zusammenhang mit der Entstehung einer Restenose. Der Forest Plot zeigt den Mittelwert für jedes Hazard Ratio und das zugehörige 95% Konfidenzintervall mit dem errechneten p-Wert.

80% der Patienten restenosefrei waren. Mit 16% nachgewiesenen „intermediären“ Monozyten im peripheren Blut waren nach demselben Zeitraum nur noch 40% der Patienten restenosefrei (s. Abb. 5.5). Bei den „nicht-klassischen“ und „klassischen“ Monozyten konnte kein signifikanter Zusammenhang mit der Entstehung einer Restenose festgestellt werden, weder zum Zeitpunkt vor Intervention noch zu den anderen Untersuchungszeitpunkten.

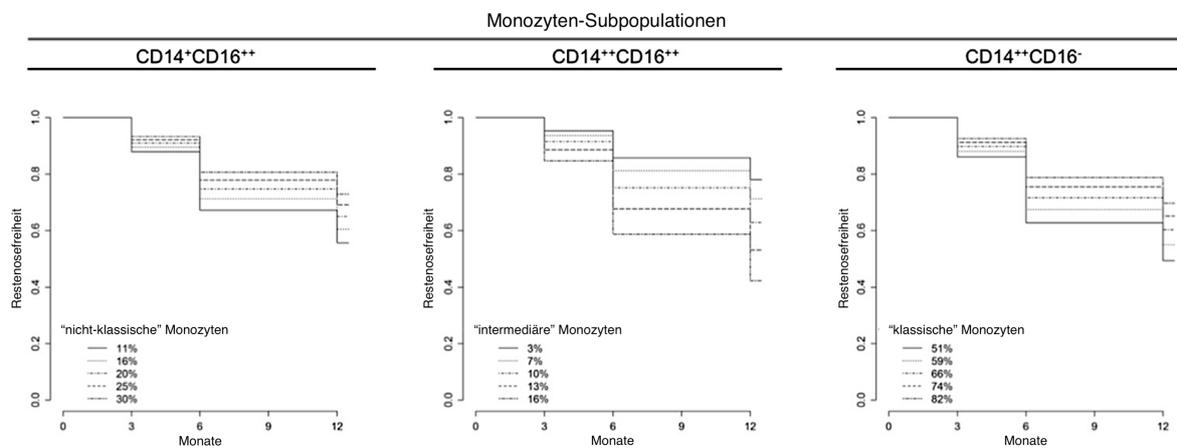


Abbildung 5.5: Monozytensubpopulationen und Restenosefreiheit. Die Abbildung zeigt für alle Monozytensubpopulationen („nicht-klassisch“, „intermediär“ und „klassisch“) Kaplan-Meier-Kurven der restenosefreien Zeit der Patienten im Hinblick auf den Untersuchungszeitraum. Jedes Bild zeigt die Wahrscheinlichkeit der Restenosefreiheit in % auf der y-Achse in Zusammenhang mit den verschiedenen Monozytensubpopulationen in % über den Untersuchungszeitraum von 12 Monaten (x-Achse).

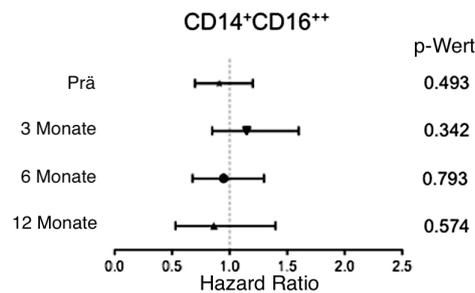


Abbildung 5.6: MPO-Expression und Restenose bei „nicht-klassischen“ Monozyten. Die Abbildung zeigt einen Forest Plot mit den Hazard Ratios auf der x-Achse und den Untersuchungszeitpunkten auf der y-Achse für den Zusammenhang der MPO-Expression der „nicht-klassischen“ Monozyten und der Entstehung einer Restenose. Der Forest Plot zeigt den Mittelwert für jedes Hazard Ratio und das zugehörige 95%-Konfidenzintervall mit dem errechneten p-Wert.

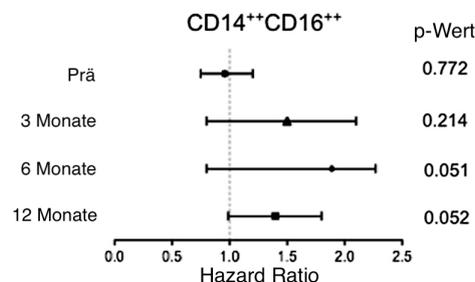


Abbildung 5.7: MPO-Expression und Restenose bei „intermediären“ Monozyten. Analog zu Abb. 5.6 aber für „intermediäre“ Monozyten.

5.4 MPO-Expression der Monozytensubpopulationen und Restenose

Die „klassische“ und „intermediäre“ Monozytensubpopulation zeigte in der Studie einen höheren MPO-Gehalt als die „nicht-klassischen“ Monozyten. Zum Zeitpunkt vor der Gefäßintervention konnte kein Zusammenhang zwischen der MPO-Konzentration mit dem Risiko einer Restenoseentstehung festgestellt werden (s. Abb. 5.6 und Abb. 5.8).

Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass der MPO-Gehalt der „intermediären“ Monozytensubpopulation zum Zeitpunkt 6 Monate (HR=1.9, 95% KI: 0.8-2.3, p=0.051) und 12 Monate (HR=1.4, 95% KI: 1.0-1.8, p=0.052) nach PTA ein signifikantes Risiko für die Entstehung einer Restenose darstellt (s. Abb. 5.7). Die MPO-Expression 3 Monate nach PTA ergab mit einem Hazard Ratio von 1,5 ebenfalls eine positive Korrelation für die Entwicklung einer Restenose (HR=1.5, 95% KI: 0.8-2.1, p=0.214).

Bei der „klassischen“ Monozytensubpopulation zeigte sich zum Zeitpunkt 3 und 12 Monaten ebenfalls ein erhöhtes Hazard Ratio für die Entstehung einer Restenose ohne eindeutige Signifikanz (s. Abb. 5.8).

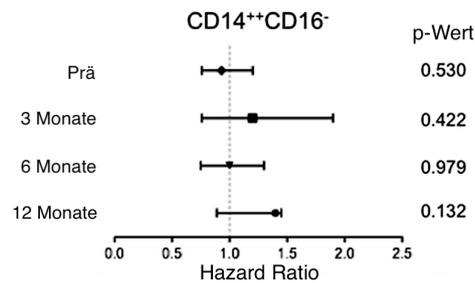


Abbildung 5.8: MPO-Expression und Restenose bei „klassischen“ Monozyten. Analog zu Abb. 5.6 aber für „klassische“ Monozyten.

5.5 Chemokinrezeptoren CCR2 und CX₃CR1 und Restenose

Bei den Chemokinrezeptoren CCR2 und CX₃CR1 konnte kein Zusammenhang zur Entstehung einer Restenose festgestellt werden, weder zum Zeitpunkt vor Intervention noch zu den Follow-Up-Monaten.

5.6 Weitere Biomarker und Restenose

Zusätzlich untersuchte Biomarker wie (CD11b, CD106 und CD162) zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die Restenoseentwicklung der unterschiedlichen Monozytensubpopulationen.

Kapitel 6

Diskussion

6.1 Patienten und Restenose

Für die Entstehung einer Atherosklerose gibt es viele klassische Risikofaktoren wie den Hypertonus, Diabetes mellitus Typ 2 und Hyperlipidämie. Wobei sich in dieser Studie nur bei dem Risikofaktor Hyperlipidämie ein signifikanter Zusammenhang für die Entstehung einer Restenose zeigte.

Generelle Risikofaktoren für die Atherosklerose gelten gleichzeitig auch als Risikofaktoren für die Entstehung einer Restenose nach endovaskulärer Therapie. Dabei wird Diabetes mellitus Typ 2 als einer der Hauptrisikofaktoren angesehen. Bei Diabetes mit Insulintherapie ist das Risiko sogar nochmals erhöht (Gilbert et al., 2004). Eine Hypothese für die Korrelation von Restenose und Diabetes ist, dass Hyperglykämie eine endotheliale Dysfunktion der Gefäßwand und eine Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert. Folglich kommt es zu einem schnelleren Wachstum der Neointima in dem interventionell geschädigten Gefäß (Gilbert et al., 2004).

Ein hohes Alter und männliches Geschlecht sind weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer Restenose (Popma et al., 1993; Weintraub et al., 1993). In dieser Studie bestand das Patientenkollektiv aus mehr Männern (59,7%) als Frauen (40,3%), mit einem Altersdurchschnitt von 71 ± 11 Jahren, welches die Entstehung einer Restenose beeinflussen könnte.

Dass bei Patienten mit einer Restenoseentwicklung in dieser Studie auch signifikant häufiger eine Hyperlipidämie festgestellt wurde, ist nicht verwunderlich. Hyperlipidämie führt zu einem vermehrten Einstrom minimal-oxidierter Lipoproteine in die Gefäßintima. Dort wird LDL mit Hilfe von reaktiven Sauerstoffspezies und Endothelzellen oxidiert und danach über Scavenger-Rezeptoren in zirkulierende Makrophagen aufgenommen, mit konsekutiver Bildung von Schaumzellen (Caligiuri et al., 2002; Li and Glass, 2002). Somit trägt eine Hyperlipidämie zur Atherogenese bei. Dieser Vorgang wurde ebenfalls in einer Studie von

Ferns et al. (1992) untersucht. Hier fand man heraus, dass Antioxidantien bei Kaninchen die Einwirkung von Lipoproteinen auf die Bildung von Schaumzellen unterdrücken können. Fünf Wochen nach der Gabe von Probucol, einem Antioxidanz, kam es bei den Tieren zu einer Verminderung der Intimadicke um 51% und der „Intima-Media Ratio“ (IMR) um 68% (Ferns et al., 1992).

Es wird zudem angenommen, dass Hyperlipidämie einen Einfluss auf die Sekretion von Chemokinen, pro-inflammatorischen Mediatoren und Adhäsionsmolekülen durch Monozyten hat. Hyperlipidämie, besonders aber Hypercholesterinämie wird als ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer Atherosklerose angesehen (Soehnlein et al., 2009). Paudel B. und Kollegen fanden heraus, dass Patienten mit einer Hyperlipidämie nach perkutaner koronarer Intervention (PCI) signifikant häufiger eine Restenose entwickelten, als Patienten ohne Hyperlipidämie (Paudel et al., 2005). Bei Untersuchungen von Patienten mit pAVK, stellte sich die Hyperlipidämie ebenfalls als ein Riskofaktor für eine Restenose nach endovaskulärer Therapie heraus. Gary und Kollegen untersuchten die Plasma Cholesterin-, ApoB- und LDL-Level bei Patienten nach Stenting der A. femoralis superficialis, und bestätigten in Ihrer Arbeit eine signifikante Korrelation von Dyslipidämie und der Entwicklung einer Restenose und Reokklusion von Stents in der Arteria femoralis superficialis (Gary et al., 2011).

6.2 Monozyten und Restenose

Bei der neointimalen Hyperplasie, die nach einer endovaskulären Gefäßintervention wie der PTA entstehen kann, spielen Monozyten und Makrophagen eine große Rolle (Chaabane et al., 2013). Die Monozytenrekrutierung beeinflusst dabei die Entstehung einer neointimalen Hyperplasie (Cipollone et al., 2001; Heider et al., 2006; Mori et al., 2002). Rekrutierte Mononukleäre Phagozyten unterstützen den Inflammationsprozess an der Stelle der Gefäßverletzung, indem sie Mediatoren freisetzen. Diese Mediatoren wiederum beeinflussen die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in die Intima. Die Vermehrung glatter Muskelzellen in der Intima kann dann zu einer Lumeneinengung des Gefäßes nach Angioplastie führen.

Unsere Ergebnisse bestätigen, dass ein erhöhter Gesamtmonozytengehalt bei Patienten mit einer pAVK ein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung einer Restenose nach PTA ist und ein Prädiktor für das Ereignis einer Restenose darstellt (Schillinger et al., 2003).

Andere Studien konnten ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl zirkulierender Monozyten bei Restenosepatienten mit pAVK und KHK beweisen (Fukuda et al., 2004; Schillinger et al., 2003). In der 2003 veröffentlichten Studie von Schillinger et al. wurden endovaskulär behandelte Patienten mit pAVK untersucht. 55% der mit PTA therapierten Probanden und 70% der Probanden mit zusätzlicher Stenttherapie entwickelten nach 6 Monaten eine Restenose. Ihre Auswertung der Monozytenlevel vor Intervention zeigt

te einen starken signifikanten Zusammenhang mit der Entwicklung einer Restenose nach PTA und Stentimplantation. Patienten mit Monozytenleveln von $> 0.4 \times 10^9/L$ hatten ein 2,3-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Restenose (Schillinger et al., 2003). Fukuda et al. bestätigten diesen Zusammenhang, indem sie die Monozytenlevel bei Patienten nach Koronarstentimplantation mit dem Volumen der neointimalen Hyperplasie verglichen. Die maximale Monozytengesamtzahl zum Zeitpunkt 6 Monate korrelierte signifikant mit dem Volumen der Neointima im Stent (Fukuda et al., 2004).

6.3 Monozytensubpopulationen und Restenose

Monozyten werden in der Literatur als potentielle Biomarker bei der Entwicklung einer Restenose betrachtet und nehmen eine wichtige Schlüsselrolle ein. Sie sind jedoch nicht als homogene Population zu sehen, da eine eindeutige Heterogenität anhand ihrer Expression der Oberflächenantigene CD14 und CD16, sowohl in Mäusen als auch Menschen festgestellt werden konnte (Libby et al., 2013; Weber et al., 2008).

Die murinen $Ly6C^{hi}/Gr-1^+$ Monozyten entsprechen phänotypisch am ehesten der humanen $CD14^{++}/CD16^-$ Subpopulation, funktionell jedoch partiell den humanen $CD14^{++}/CD16^{++}$ -Monozyten (Ingersoll et al., 2010; Ziegler-Heitbrock, 1996). $CD14^+/CD16^{++}$ -Monozyten dagegen ähneln phänotypisch zwar der murinen $Ly6C^{low}/Gr-1^+$ Population, übernehmen aber eher pro-inflammatorische Aufgaben. Die Rolle der „intermediären“ Monozytensubpopulation $CD14^{++}/CD16^{++}$ wurde bisher wenig erforscht.

Einige Studien brachten diese Monozytengruppe mit der Entstehung verschiedener atherosklerotischer Erkrankungen in Zusammenhang (Heine et al., 2008; Rogacev et al., 2012; Tsujioka et al., 2009a). Im Jahr 2004 untersuchten Schlitt, Heine et al. die Korrelation von $CD14^{++}/CD16^{++}$ -und $TNF-\alpha$ -Leveln bei 247 Patienten mit Atherosklerose der Koronararterien (Schlitt et al., 2004). Die Hypothese, dass Patienten mit KHK erhöhte $CD14^{++}/CD16^{++}$ -Level im Blut zeigen würden und die „intermediäre“ Monozytensubpopulation für die Herstellung von inflammatorischen Zytokinen wie $TNF-\alpha$ zuständig sei, konnte dabei bestätigt werden (Schlitt et al., 2004). Darüber hinaus fanden Rogacev, Cremers et al. (2012) heraus, dass $CD14^{++}/CD16^{++}$ -Monozyten unabhängige Prädiktoren für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit KHK sind (Rogacev et al., 2012). Berg und seine Kollegen dagegen zeigten in einer Studie mit 700 Patienten, dass die „klassische“ Monozytensubpopulation kardiovaskuläre Ereignisse vorhersagt (Berg et al., 2012).

Im Hinblick auf die Differenzierung der Rolle von Monozytensubpopulationen in der Entstehung einer Restenose und neointimalen Hyperplasie hat man bisher noch keine große Erkenntnis gewinnen können. 2010 veröffentlichten Liu et al. eine Studie über den Zusammenhang von Monozytensubpopulationen bei Patienten mit einer In-Stent Restenose

(ISR) der Koronarien nach Therapie eines St-Hebungs-Infarkts (Liu et al., 2010). Sie fanden heraus, dass Patienten 9 Monate nach Bare-Metal Stent (BMS) Implantation signifikant erhöhte CD14⁺/CD16⁺- Monozytenlevel zeigten, wenn sie auch gleichzeitig eine ISR entwickelt hatten. Allerdings wurde in dieser Studie nicht zwischen der „intermediären“ und „nicht-klassischen“ Monozytensubpopulation differenziert.

Unsere Daten zeigen, dass die „intermediären“ Monozyten zu allen Untersuchungszeitpunkten das Risiko für eine Restenose nach peripherer PTA signifikant erhöhen.

Wir konnten in unserer Studie keinen signifikanten prognostischen Charakter der „klassischen“ Monozyten bestätigen und es bleibt ungeklärt, warum sich die Ergebnisse der Studien von Berg et al. und unserer Studie unterscheiden. Eine Grund könnte sein, dass sowohl die „klassische“ als auch „intermediäre“ Monozytensubpopulation eine pro-inflammatorische Wirkung haben. Des Weiteren ist bisher nicht geklärt, ob diese beiden Monozytensubpopulationen von unterschiedlichen Vorläuferzellen ausgehen oder die eine Population aus der anderen heraus entsteht. Ein tiefgründigeres Verständnis über die heterogene Rolle der verschiedenen Monozyten könnte in Zukunft mehr Klarheit darüber bringen.

6.4 MPO-Expression der Monozytensubpopulationen und Restenose

Von Makrophagen stammendes MPO (Myeloperoxidase) spielt eine wichtige Rolle bei der Progression atherosklerotischer Läsionen (Sugiyama et al., 2001). Außerdem beeinflusst MPO durch die Produktion von ROS das Wachstum der Neointima und die Entwicklung einer Restenose (Sugiyama et al., 2001). Juni, Duckers et al. fanden heraus, dass reaktive Sauerstoffspezies, wie Superoxidanionen O₂⁻, durch die Proliferation glatter Muskelzellen und die Induktion pro-inflammatorischer Signalkaskaden einen entscheidenden Einfluss im Voranschreiten der neointimalen Hyperplasie haben (Juni et al., 2013).

In unserer Studie stellte sich heraus, dass die CD14⁺⁺/CD16⁺⁺-Monozyten bei Patienten mit Restenoseentwicklung eine vermehrte MPO-Expression zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate nach PTA aufwiesen. Der MPO-Gehalt der „intermediären“ Monozyten zeigte zu den Zeitpunkten 6 und 12 Monate nach PTA einen signifikanten Zusammenhang mit der Entstehung einer Restenose. Somit war bei Patienten mit einer Hyperlipidämie die Expression der „intermediären“ Monozyten signifikant erhöht und die CD14⁺⁺/CD16⁺⁺-Monozytose führte wiederum zu einer vermehrten MPO-Expression. Dies könnte für die inflammatorische Reaktion in der geschädigten Gefäßwand nach PTA verantwortlich gewesen sein und so den Prozess der neointimalen Hyperplasie und den späteren Lumenverlust gefördert haben. Da MPO als Katalysator für die LDL-Modifikation gilt und die Aufnahme von LDL in Makrophagen vereinfacht, bestätigen unsere Daten den Zusammenhang zwi-

schen den beiden Faktoren der Hyperlipidämie und Myeloperoxidase und der Entwicklung einer Restenose (Exner et al., 2006).

Der MPO-Gehalt war zu den Zeitpunkten 3 und 12 Monate nach PTA auch bei der „klassischen“ Monozytensubpopulation prozentual erhöht. Diese Beobachtung würde auch mit anderen Studien übereinstimmen, die zeigen konnten, dass „klassische“ Monozyten im Gegensatz zu „nicht-klassischen“ Monozyten besonders reich an MPO sind (Wildgruber et al., 2009).

6.5 Chemokinrezeptoren CCR2 und CX₃CR1 und Restenose

Obwohl in unserer Studie ein signifikanter Zusammenhang der „intermediären“ Monozytensubpopulation und der Entwicklung einer Restenose zu beobachten war, und die CD14⁺⁺/CD16⁺⁺-Monozyten am häufigsten CX₃CR1 auf ihrer Oberfläche exprimieren, zeigte CX₃CR1 keine signifikanten Veränderungen im Hinblick auf eine Restenose.

Der Chemokinrezeptor CCR2 wird am häufigsten auf der Oberfläche von „klassischen“ Monozyten exprimiert (Geissmann et al., 2003; Ziegler-Heitbrock et al., 1993). In unserer Studie konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CCR2-Expression und Entwicklung einer Restenose festgestellt werden. Ein Grund könnte sein, dass auch die „klassischen“ Monozyten keine signifikante Veränderung in dieser Studie zeigten, und dementsprechend auch CCR2 keine wirkliche Korrelation mit einer Restenose erkennen ließ.

Jerath et al. (2010) fanden heraus, dass CX₃CR1 und CCR2 eine wichtige Rolle in der Entstehung einer Restenose spielen. CX₃CR1-Knockout-Mäuse zeigten zum Beispiel eine 58%-ige Reduktion der intimalen Hyperplasie nach vaskulärem Schaden. Sie entdeckten auch, dass sein Antagonist MRL-677 in der Lage ist, die Monozytenmigration durch CCR2 zu verhindern. Laut Jerath et al. (2010) sei deshalb CCR2 ein gutes Targetziel um eine Restenose nach Angioplastie zu verhindern. Die gleichzeitige Blockade von CCR2 und CX₃CR1 sollte dabei den größten protektiven Effekt auf das inflammatorische Geschehen bei endoluminaler Schädigung der Femoralarterien haben.

6.6 Weitere Biomarker und Restenose

6.6.1 CD11b Intergrin (MAC-1)

In einer experimentellen Studie an Kaninchen von Rogers et al. (1998) wurde die Hypothese belegt, dass CD11b (Mac-1) als Biomarker für das Restenosorisiko nach Angioplastie

angesehen werden kann. In angioplastierten Gefäßen ist das Endothel zerstört, woraufhin sich reichlich Fibrinogen und Thrombozyten ablagern (Rogers et al., 1998). Die Mac-1 abhängige Adhäsion von Leukozyten an Fibrinogen ist deshalb ein entscheidender Faktor für die Rekrutierung von Leukozyten in die Intima. Unter dem Einfluss von Zytokinen wie IL-8 und IL-6 kommt es via GP1ba zu einer engen Bindung von Leukozyten an das Leukozytenintegrin CD11b (Mac-1).

Die Einwanderung von Leukozyten über die Plättchen und Fibrinogenschicht in die Intima findet dann unter dem weiteren Einfluss von Zytokinen und einem chemischen Gradienten statt (Welt and Rogers, 2002). Die experimentelle Blockade von Mac-1 durch M1/70 zeigte bei Kaninchen, deren iliakale Gefäße mittels Ballonangioplastie therapiert worden waren, eine 60-70%-ige Reduktion des Wachstums der Neointima (Rogers et al., 1998). Rahimi et al. (2003) bestätigten in einer Pilotstudie von 2003 mit 24 Patienten nach Koronarangioplastie die Ergebnisse von Rogers et al.. Auch hier zeigte sich die CD11b-Expression besonders auf Monozyten und Neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit Restenoseentwicklung prädiktiv erhöht.

Bei der Auswertung des CD11b-Antigens in unserer Studie ergab sich kein signifikanter Zusammenhang für die Entwicklung einer Restenose. Trotzdem scheint CD11b als Regulator der Leukozytenadhäsion eine prädiktive Rolle in der Entstehung einer Restenose zu spielen.

6.6.2 Selektin Ligand CD162

CD162 ist ein Ligand für die Rekrutierung von Leukozyten in inflammatorisches Gewebe. Bei Gefäßschäden, die durch Angioplastie oder Stentimplantation entstehen, schütten aktivierte Thrombozyten P-Selektin und Glykoprotein Iba aus, die über den PSGL Ligand zirkulierende Leukozyten binden und rekrutieren können (de Gaetano et al., 1999).

Bienvenu et al. (2001) zeigten in einer Studie, dass sich der P-Selektin Antagonist rPSGL-Ig dazu eignet, die Restenoserate bei Schweinen nach doppelter Karotisangioplastie zu reduzieren. Dies geschieht durch eine Blockade von CD162 und einer daraus resultierenden Verminderung der Zelladhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an die geschädigte Gefäßwand (Bienvenu et al., 2001). Die Blockade der Leukozytenadhäsion durch anti-P-Selektin Antikörper oder PSGL-1 Immunglobulin erwies sich bereits in anderen Forschungsprojekten über die tiefe Beinvenenthrombose und Entwicklung einer neointimalen Hyperplasie nach Angioplastie als sehr effektiv (Barron et al., 1997).

Bei der Untersuchung der CD162 (PSGL-1) Expression in unserer Studie ergaben sich keine signifikanten Veränderungen bei Patienten mit einer Restenose.

6.6.3 Adhäsionsmolekül CD106

CD106 (VCAM-1) ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches bei Monozyten das Rollen auf der Gefäßoberfläche und ihre Migration durch das Endothel in die Gefäßintima beeinflusst (Gerszten et al., 1998). Bayata et al. (2010) untersuchten die VCAM-1 und ICAM-1 Level von Patienten vor und nach koronarer Bare-Metal Stent-(BMS-)Implantation mittels Durchflusszytometrie. Nach 6 Monaten zeigte sich ein signifikanter Anstieg der VCAM-1 Level im Gegensatz zu den ICAM-1 Leveln bei Patienten mit neu aufgetretener Restenose. Des Weiteren ergaben andere Studien, dass die Blockade von VCAM-1 durch bestimmte Antikörper die Formation der Neointima und die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die verletzte Gefäßwand reduziert (Foster, 1996; Ramos et al., 1999). Unsere Studie konnte diesen Zusammenhang nicht bestätigen.

6.7 Limitationen der Studie

Die vorliegende Studie weist eine Anzahl von Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Da die Studie aus einem relativ kleinen Patientenkollektiv bestand ($n = 67$), herrscht eine gewisse Einschränkung der Repräsentativität der Stichprobe. Bei einer Gesamtzahl von 67 Patienten hatten 16 Patienten eine Restenose und 51 blieben frei von Restenose. Die Möglichkeit zur Aufdeckung von Gruppenunterschieden war somit eingeschränkt. Außerdem muss zusätzlich die relative hohe Anzahl von Patienten berücksichtigt werden, die im Beobachtungszeitraum von 12 Monaten aus unterschiedlichen Gründen aus der Studie ausschieden. Alleine 4 Patienten starben und 9 waren im Verlauf nicht mehr bereit, zu einem Follow-up-Termin zu erscheinen.

Eine weitere Einschränkung könnte gewesen sein, dass das Verfahren der Duplexsonografie zur Diagnose einer Restenose nach PTA von unterschiedlichen Ärzten der Gefäßchirurgie durchgeführt und beurteilt wurde. Obwohl eine Restenose immer leitliniengerecht nach den gleichen Kriterien diagnostiziert wurde, ist die Methode der Duplexsonografie stark untersucherabhängig. Diese Tatsache könnte zu Fehldiagnosen geführt haben und zu einer falschen Einteilung von Patienten in die Gruppen mit oder ohne Restenose. Die Definition einer Restenose in dieser Studie war eine erneute Lumeneinengung eines Gefäßes von $> 50\%$. Das heisst alle Patienten die nur wenige Prozent davon abwichen wurden jeweils untersucherabhängig einem Kollektiv zugeteilt, obwohl sie die gleichen pathophysiologischen Prozesse zeigten.

Entnommene Blutproben für die weitere Untersuchung mittels Dichtegradientenzentrifugation und Durchflusszytometrie im Labor waren möglicherweise auch limitierenden Faktoren ausgesetzt. Obwohl die Proben in den meisten Fällen so schnell wie möglich im Labor

verarbeitet wurden, kann eine Beeinträchtigung der Proben durch eine zwischenzeitlich stattfindende Hämolyse nicht ausgeschlossen werden.

Zwischen den Patienten mit alleiniger PTA und denen, die ein sekundäres Stenting erhielten, wurde nicht unterschieden. Somit konnte die Studie die Entstehung einer Restenose nach Stenting versus Ballon-PTA nicht differenzieren.

Letztlich ist auch zu erwähnen, dass neben Monozyten viele andere zelluläre wie auch nicht-zelluläre Mediatoren einen signifikanten Einfluss auf den Prozess der Restenoseentwicklung haben, in unserer Studie aber nur ein kleiner zellulärer Anteil betrachtet wurde.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Unter Berücksichtigung der bereits existierenden Datengrundlage könnte man die Ergebnisse dieser Studie wie folgt interpretieren. Patienten mit Hyperlipidämie exprimieren hohe Level der „intermediären“ CD14⁺⁺/CD16⁺⁺-Monozyten, die über aktivierte Endothelzellen in die Gefäßwand nach PTA oder Stentimplantation rekrutieren. Die vermehrte Expression von Myeloperoxidase (MPO) auf CD14⁺/CD16⁺⁺- Monozyten, verstärkt die Herstellung reaktiver Sauerstoffspezies. Superoxidanionen (O₂⁻) fördern die Proliferation glatter Muskelzellen und induzieren eine pro-inflammatorische Signalkaskade, die zu einer vermehrten Monozytenrekrutierung während der Restenoseentwicklung führt. Durch die Induktion einer pro-inflammatorischen Signalkaskade hat die Myeloperoxidase einen entscheidenden Einfluss auf die Stimulation der neointimalen Hyperplasie und könnte so zu einem Versagen der endovaskulären Therapie durch eine Restenose beitragen.

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Ergebnisse, dass Monozyten und speziell ihre intermediäre Subpopulation als potentielle Biomarker für die Entstehung einer Restenose nach PTA geeignet sind. Eine Hyperlipidämie stellt sich dabei als ein unabhängiger Risikofaktor für den Prozess der Restenose heraus. Da sie ein Trigger für die Rekrutierung von Monozyten in geschädigte Gefäßwände zu sein scheint und für den Ablauf einer inflammatorischen Antwort nach Gefäßverletzungen mitverantwortlich ist.

Potentiell sind somit erhöhte intermediäre Monozytenlevel und ihre MPO-Expression ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt für die Prävention einer Restenose nach endovaskulärer Therapie. Dies sollte in weiteren Studien experimentell untersucht werden. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob es sich bei den Ergebnissen um reproduzierbare Beobachtungen handelt, die in einem größeren Kollektiv bestätigt werden können.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Restenose, modifiziert nach (Juliard, 2009)	17
4.1	Dichtegradientenzentrifugation.	24
4.2	Gating.	29
5.1	Gesamtmonozytenzahl und Restenose.	32
5.2	Gesamtmonozytenzahl und Restenosefreiheit.	33
5.3	Monozytensubpopulationen und Restenose im Durchflusszytometer.	34
5.4	Monozytensubpopulationen und Restenose.	35
5.5	Monozytensubpopulationen und Restenosefreiheit.	35
5.6	MPO-Expression und Restenose bei „nicht-klassischen“ Monozyten.	36
5.7	MPO-Expression und Restenose bei „intermediären“ Monozyten.	36
5.8	MPO-Expression und Restenose bei „klassischen“ Monozyten.	37

Tabellenverzeichnis

2.1	Fontaine und Rutherfordstadien	13
5.1	Patienten-Charakteristika	31

Literaturverzeichnis

- ACC/AHA, Hirsch, A. T., Haskal, Z. J., Hertzler, N. R., Bakal, C. W., Creager, M. A., Halperin, J. L., Hiratzka, L. F., Murphy, W. R., Olin, J. W., Puschett, J. B., Rosenfield, K. A., Sacks, D., Stanley, J. C., Taylor, L. M., J., White, C. J., White, J., White, R. A., Antman, E. M., Smith, S. C., J., Adams, C. D., Anderson, J. L., Faxon, D. P., Fuster, V., Gibbons, R. J., Halperin, J. L., Hiratzka, L. F., Hunt, S. A., Jacobs, A. K., Nishimura, R., Ornato, J. P., Page, R. L., Riegel, B., American Association for Vascular, S., Society for Vascular, S., Society for Cardiovascular, A., Interventions, Society for Vascular, M., Biology, Society of Interventional, R., Guidelines, A. A. T. F. o. P., American Association of, C., Pulmonary, R., National Heart, L., Blood, I., Society for Vascular, N., TransAtlantic Inter-Society, C., and Vascular Disease, F. (2006). Acc/aha 2005 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): executive summary a collaborative report from the american association for vascular surgery/society for vascular surgery, society for cardiovascular angiography and interventions, society for vascular medicine and biology, society of interventional radiology, and the acc/aha task force on practice guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease) endorsed by the american association of cardiovascular and pulmonary rehabilitation; national heart, lung, and blood institute; society for vascular nursing; transatlantic inter-society consensus; and vascular disease foundation. *J Am Coll Cardiol*, 47(6):1239–312.
- Adler, A. I., Stevens, R. J., Neil, A., Stratton, I. M., Boulton, A. J. M., and Holman, R. R. (2002). Ukpds 59: hyperglycemia and other potentially modifiable risk factors for peripheral vascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes care*, 25(5):894–9.
- Ahimastos, A. A., Dart, A. M., Lawler, A., Blombery, P. A., and Kingwell, B. A. (2008). Reduced arterial stiffness may contribute to angiotensin-converting enzyme inhibitor induced improvements in walking time in peripheral arterial disease patients. *Journal of hypertension*, 26(5):1037–1042.
- Arnaout, M. A. (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecules cd11/cd18. *Blood*, 75(5):1037–1050.

- Association, A. D. et al. (2003). Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes care*, 26(12):3333–3341.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cushman, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science's STKE*, 317(5838):666–670.
- Barlic, J., Zhang, Y., Foley, J. F., and Murphy, P. M. (2006). 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(8):807–819.
- Barron, M. K., Lake, R. S., Buda, A. J., and Tenaglia, A. N. (1997). Intimal hyperplasia after balloon injury is attenuated by blocking selectins. *Circulation*, 96(10):3587–92.
- Bayata, S., Arıkan, E., Yeşil, M., Postacı, N., Taş, A., and Köseoğlu, M. (2010). An important role for *vcam-1*, but not for *icam-1* in restenosis following coronary stent implantation. *Anadolu kardiyoloji dergisi : AKD = the Anatolian journal of cardiology*, 10(5):405–9.
- Beach, K. W., Brunzell, J. D., and Strandness, D. E. (1982). Prevalence of severe arteriosclerosis obliterans in patients with diabetes mellitus. relation to smoking and form of therapy. *Arteriosclerosis*, 2(4):275–280.
- Belge, K.-U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., and Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory *cd14+cd16+dr++* monocytes are a major source of *tnf*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(7):3536–3542.
- Bendermacher, B. L. W., Willigendael, E. M., Teijink, J. A. W., and Prins, M. H. (2005). Medical management of peripheral arterial disease. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 3(8):1628–1637.
- Berg, K. E., Ljungcrantz, I., Andersson, L., Bryngelsson, C., Hedblad, B., Fredrikson, G. N., Nilsson, J., and Björkbacka, H. (2012). Elevated *cd14++ cd16-* monocytes predict cardiovascular events. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 5(1):122–131.
- Bernstein, E. F. and Fronek, A. (1982). Current status of noninvasive tests in the diagnosis of peripheral arterial disease. *The Surgical clinics of North America*, 62(3):473–87.
- Bhatt, D. L., Fox, K. A. A., Hacke, W., Berger, P. B., Black, H. R., Boden, W. E., Cacoub, P., Cohen, E. A., Creager, M. A., Easton, J. D., Flather, M. D., Haffner, S. M., Hamm, C. W., Hankey, G. J., Johnston, S. C., Mak, K.-H., Mas, J.-L., Montalescot, G., Pearson, T. A., Steg, P. G., Steinhubl, S. R., Weber, M. A., Brennan, D. M., Fabry-Ribaudo, L., Booth, J., and Topol, E. J. (2006). Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *The New England journal of medicine*, 354(16):1706–1717.

- Biasucci, L. M., D'Onofrio, G., Liuzzo, G., Zini, G., Monaco, C., Caligiuri, G., Tommasi, M., Rebuzzi, A. G., and Maseri, A. (1996). Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and acute myocardial infarction, but its reduction is not related to ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*, 27(3):611–616.
- Bienvenu, J. G., Tanguay, J. F., Théorêt, J. F., Kumar, A., Schaub, R. G., and Merhi, Y. (2001). Recombinant soluble p-selectin glycoprotein ligand-1-ig reduces restenosis through inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation*, 103(8):1128–34.
- Block, P. C. (1990). Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty— anatomic and pathophysiological mechanisms. strategies for prevention. *Circulation*, 81(3 Suppl):IV2–4.
- Block, P. C., Myler, R. K., Stertz, S., and Fallon, J. T. (1981). Morphology after transluminal angioplasty in human beings. *The New England journal of medicine*, 305(7):382–5.
- Boccalon, H., Lehert, P., and Mosnier, M. (2001). [effect of naftidrofuryl on physiological walking distance in patients with intermittent claudication]. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 50(3):175–182.
- Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I. F. (1998). Decreased lesion formation in *ccr2*^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394(6696):894–897.
- Bosch, J. L. and Hunink, M. G. (1997). Meta-analysis of the results of percutaneous transluminal angioplasty and stent placement for aortoiliac occlusive disease. *Radiology*, 204(1):87–96.
- Boström, A., Karacagil, S., Löfberg, A.-M., Ljungman, C., Nyman, R., Logason, K., and Hellberg, A. (2001). Selection of patients with lower limb arterial occlusive disease for endovascular treatment of the iliac arteries with duplex scanning. *Vascular Surgery*, 35(6):437–442.
- Bouhrel, M., Derudas, B., Rigamonti, E., Dièvert, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., et al. (2007). Ppar *gamma* activation primes human monocytes into alternative m2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell metabolism*, 6(2):137–143.
- Braunersreuther, Vincent and, A., Arnaud, C., Liehn, E. A., Steffens, S., Shagdarsuren, E., Bidzhekov, K., Burger, F., Pelli, G., Luckow, B., Mach, F., and Weber, C. (2007). *Ccr5* but not *ccr1* deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(2):373–379.
- Califf, R. M., Fortin, D. F., Frid, D. J., Harlan, W. R., Ohman, E. M., Bengtson, J. R., Nelson, C. L., Tcheng, J. E., Mark, D. B., and Stack, R. S. (1991). Restenosis after coronary angioplasty: an overview. *Journal of the American College of Cardiology*, 17(6 Suppl B):2B–13B.

- Caligiuri, G., Nicoletti, A., Poirier, B., and Hansson, G. K. (2002). Protective immunity against atherosclerosis carried by b cells of hypercholesterolemic mice. *The Journal of clinical investigation*, 109(6):745–753.
- Carr, A. C., McCall, M. R., and Frei, B. (2000). Oxidation of ldl by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(7):1716–1723.
- Cetin, C. and Baumgartner, I. (2004). Die periphere arterielle verschlusskrankheit, curriculum, schweiz med. forum. 4:216–223.
- Chaabane, C., Otsuka, F., Virmani, R., and Bochaton-Piallat, M.-L. (2013). Biological responses in stented arteries. *Cardiovascular research*, 99(2):353–63.
- Channon, K. (2004). Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends in cardiovascular medicine*, 14(8):323–327.
- Cipollone, F., Marini, M., Fazia, M., Pini, B., Iezzi, A., Reale, M., Paloscia, L., Materazzo, G., D’Annunzio, E., Conti, P., et al. (2001). Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(3):327–334.
- Clagett, G. P., Robinowitz, M., Youkey, J. R., Fisher, D. F., Fry, R. E., Myers, S. I., Lee, E. L., Collins, G. J., and Virmani, R. (1986). Morphogenesis and clinicopathologic characteristics of recurrent carotid disease. *Journal of vascular surgery*, 3(1):10–23.
- Clagett, G. P., Sobel, M., Jackson, M. R., Lip, G. Y. H., Tangelder, M., and Verhaeghe, R. (2004). Antithrombotic therapy in peripheral arterial occlusive disease: the seventh accp conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest*, 126(3 Suppl):609S–626S.
- Clarke, M. and Bennett, M. (2006). The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *American journal of nephrology*, 26(6):531–535.
- Clowes, A. W. and Geary, R. (1994). Kinmonth memorial lecture. vascular surgical society of great britain and northern ireland. london, november 1992. vascular biology—the new frontier. *Cardiovascular surgery (London, England)*, 2(3):301–7.
- Collins, R., Burch, J., Cranny, G., Aguiar-Ibáñez, R., Craig, D., Wright, K., Berry, E., Gough, M., Kleijnen, J., and Westwood, M. (2007). Duplex ultrasonography, magnetic resonance angiography, and computed tomography angiography for diagnosis and assessment of symptomatic, lower limb peripheral arterial disease: systematic review. *BMJ (Clinical research ed.)*, 334(7606):1257.
- Combadière, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of ccl2, cx3cr1, and ccr5 abrogates ly6chi and ly6clo monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 117(13):1649–1657.

- Criqui, M. H., Fronek, A., Barrett-Connor, E., Klauber, M. R., Gabriel, S., and Goodman, D. (1985). The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation*, 71(3):510–515.
- Davies, M. J., Woolf, N., Rowles, P. M., and Pepper, J. (1988). Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *British heart journal*, 60(6):459–464.
- de Gaetano, G., Cerletti, C., and Evangelista, V. (1999). Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis*, 29(1):41–49.
- de Vries, S. O. and Hunink, M. G. (1997). Results of aortic bifurcation grafts for aortoiliac occlusive disease: a meta-analysis. *Journal of vascular surgery*, 26(4):558–569.
- Devlin, P. M. (2015). *Brachytherapy: applications and techniques*. Springer Publishing Company.
- Diegelmann, R. F., Cohen, I. K., and Kaplan, A. M. (1981). The role of macrophages in wound repair: a review. *Plastic and reconstructive surgery*, 68(1):107–113.
- Diehm, C., Schuster, A., Allenberg, J. R., Darius, H., Haberl, R., Lange, S., Pittrow, D., von Stritzky, B., Tepohl, G., and Trampisch, H.-J. (2004). High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis*, 172(1):95–105.
- Duvall, W. L. and Vorchheimer, D. A. (2004). Multi-bed vascular disease and atherothrombosis: scope of the problem. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 17(1):51–61.
- Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. E., and Lobb, R. R. (1990). Vcam-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin vla-4 at a site distinct from the vla-4/fibronectin binding site. *Cell*, 60(4):577–584.
- Exner, M., Minar, E., Mlekusch, W., Sabeti, S., Amighi, J., Lalouschek, W., Maurer, G., Bieglmayer, C., Kieweg, H., Wagner, O., and Schillinger, M. (2006). Myeloperoxidase predicts progression of carotid stenosis in states of low high-density lipoprotein cholesterol. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(11):2212–8.
- Fay, W. P., Garg, N., and Sunkar, M. (2007). Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(6):1231–1237.
- Ferns, G. A., Forster, L., Stewart-Lee, A., Konneh, M., Nourooz-Zadeh, J., and Anggaard, E. E. (1992). Probucol inhibits neointimal thickening and macrophage accumulation after balloon injury in the cholesterol-fed rabbit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(23):11312–6.
- Foster, C. A. (1996). Vcam-1/alpha 4-integrin adhesion pathway: therapeutic target for allergic inflammatory disorders. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 98(6 Pt 2):S270–7.

- Fowkes, F. G., Housley, E., Cawood, E. H., Macintyre, C. C., Ruckley, C. V., and Prescott, R. J. (1991). Edinburgh artery study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. *International journal of epidemiology*, 20(2):384–392.
- Fukuda, D., Shimada, K., Tanaka, A., Kawarabayashi, T., Yoshiyama, M., and Yoshikawa, J. (2004). Circulating monocytes and in-stent neointima after coronary stent implantation. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(1):18–23.
- Furie, B. and Furie, B. C. (2004). Role of platelet p-selectin and microparticle psgl-1 in thrombus formation. *Trends in molecular medicine*, 10(4):171–178.
- Furman, M. I., Benoit, S. E., Barnard, M. R., Valeri, C. R., Borbone, M. L., Becker, R. C., Hechtman, H. B., and Michelson, A. D. (1998). Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 31(2):352–8.
- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J., and Chesebro, J. H. (1992). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *The New England journal of medicine*, 326(5):310–318.
- Galkina, E. and Ley, K. (2009). Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annual review of immunology*, 27:165–197.
- Garasic, J. M. and Creager, M. A. (2001). Percutaneous interventions for lower-extremity peripheral atherosclerotic disease. *Reviews in cardiovascular medicine*, 2(3):120–5.
- Gardner, A. W., Katzel, L. I., Sorkin, J. D., Bradham, D. D., Hochberg, M. C., Flinn, W. R., and Goldberg, A. P. (2001). Exercise rehabilitation improves functional outcomes and peripheral circulation in patients with intermittent claudication: a randomized controlled trial. *Journal of the American Geriatrics Society*, 49(6):755–762.
- Gary, T., Rief, P., Stojakovic, T., Froehlich, H., Scharnagl, H., Hafner, F., Pilger, E., and Brodmann, M. (2011). Lipoproteins and the development of restenosis after stent implantation in the superficial femoral artery in patients with peripheral artery disease. *Cardiovascular and interventional radiology*, 34(4):739–43.
- Geary, R. L. and Clowes, A. W. (2007). Epidemiology and pathogenesis of restenosis. In *Essentials of restenosis*, pages 7–28. Springer.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19(1):71–82.
- George, S. J. and Beeching, C. A. (2006). Cadherin:catenin complex: a novel regulator of vascular smooth muscle cell behaviour. *Atherosclerosis*, 188(1):1–11.
- George, S. J. and Dwivedi, A. (2004). Mmps, cadherins, and cell proliferation. *Trends in cardiovascular medicine*, 14(3):100–105.

- Gerszten, R., Garcia-Zepeda, E., Lim, Y., Yoshida, M., Ding, H., Gimbrone, M., Luster, A., Lusinskas, F., and Rosenzweig, A. (1999). Mcp-1 and il-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 398(6729):718–723.
- Gerszten, R. E., Lim, Y. C., Ding, H. T., Snapp, K., Kansas, G., Dichek, D. A., Cabañas, C., Sánchez-Madrid, F., Gimbrone, M. A., Rosenzweig, A., and Lusinskas, F. W. (1998). Adhesion of monocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human endothelial cells: implications for atherogenesis. *Circulation research*, 82(8):871–878.
- Gilbert, J., Raboud, J., and Zinman, B. (2004). Meta-analysis of the effect of diabetes on restenosis rates among patients receiving coronary angioplasty stenting. *Diabetes care*, 27(4):990–4.
- Gordon, S. and Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*, 5(12):953–964.
- Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C. H., Young, S. G., Rollins, B. J., and Charo, I. F. (1999). Mcp-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein b. *The Journal of clinical investigation*, 103(6):773–778.
- Gruberg, L., Waksman, R., Satler, L. F., Pichard, A. D., and Kent, K. M. (2000). Novel approaches for the prevention of restenosis. *Expert opinion on investigational drugs*, 9(11):2555–78.
- Hansson, G. and Libby, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 6(7):508–519.
- Harper, M. T. and Poole, A. W. (2007). Isoform-specific functions of protein kinase c: the platelet paradigm. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 5):1005–1008.
- Heider, P., Wildgruber, M. G., Weiss, W., Berger, H. J., Eckstein, H. H., Henning, E. H., and Wolf, O. (2006). Role of adhesion molecules in the induction of restenosis after angioplasty in the lower limb. *Journal of vascular surgery*, 43(5):969–77; discussion 977.
- Heine, G. H., Ulrich, C., Seibert, E., Seiler, S., Marell, J., Reichart, B., Krause, M., Schlitt, A., Köhler, H., and Girndt, M. (2008). Cd14(++)cd16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney international*, 73(5):622–629.
- Hiatt, W. R. (2001). Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med*, 344(21):1608–1621.
- Hirsch, A. T., Haskal, Z. J., Hertzner, N. R., Bakal, C. W., Creager, M. A., Halperin, J. L., Hiratzka, L. F., Murphy, W. R., Olin, J. W., Puschett, J. B., et al. (2006). Acc/aha guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic). *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 47(6):1239–1312.

- Hirsch, A. T., Treat-Jacobson, D., Lando, H. A., and Hatsukami, D. K. (1997). The role of tobacco cessation, antiplatelet and lipid-lowering therapies in the treatment of peripheral arterial disease. *Vascular medicine (London, England)*, 2(3):243–51.
- Hristov, M., Leyendecker, T., Schuhmann, C., von Hundelshausen, P., Heussen, N., Kehmeier, E., Krötz, F., Sohn, H.-Y., Klauss, V., and Weber, C. (2010). Circulating monocyte subsets and cardiovascular risk factors in coronary artery disease. *Thrombosis and haemostasis*, 104(2):412–414.
- Hristov, M. and Weber, C. (2011). Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*, 106(5):757–762.
- Huo, Y. and Ley, K. (2001). Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta physiologica Scandinavica*, 173(1):35–43.
- Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., Habenicht, A. J., Ziegler-Heitbrock, L., and Randolph, G. J. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*, 115(3):e10–e19.
- Ishii, H., Kumada, Y., Toriyama, T., Aoyama, T., Takahashi, H., Yamada, S., Yasuda, Y., Yuzawa, Y., Maruyama, S., Matsuo, S., Matsubara, T., and Murohara, T. (2008). Cilostazol improves long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in hemodialysis patients with peripheral artery disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3(4):1034–1040.
- Jerath, M. R., Liu, P., Struthers, M., Demartino, J. A., Peng, R., Peterson, L. B., Cumiskey, A.-M., Yang, L., Rojas, M., Patel, D. D., and Fong, A. M. (2010). Dual targeting of *ccr2* and *cx3cr1* in an arterial injury model of vascular inflammation. *Thrombosis journal*, 8:14.
- Jonason, T. and Ringqvist, I. (1985). Factors of prognostic importance for subsequent rest pain in patients with intermittent claudication. *Acta medica Scandinavica*, 218(1):27–33.
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., and Hansson, G. K. (1986). Regional accumulations of t cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, 6(2):131–138.
- Juliard, J.-M. (2009). Les stents pharmacoactifs. *STV*, pages 373–383.
- Juni, R. P., Duckers, H. J., Vanhoutte, P. M., Virmani, R., and Moens, A. L. (2013). Oxidative stress and pathological changes after coronary artery interventions. *Journal of the American College of Cardiology*, 61(14):1471–1481.
- Kandarpa, K. (2008). Peripheral vascular interventions.
- Kang, J. L., Patel, V. I., Conrad, M. F., Lamuraglia, G. M., Chung, T. K., and Cambria, R. P. (2008). Common femoral artery occlusive disease: contemporary results following surgical endarterectomy. *Journal of vascular surgery*, 48(4):872–877.

- Katzel, L. I., Sorkin, J. D., Powell, C. C., and Gardner, A. W. (2001). Comorbidities and exercise capacity in older patients with intermittent claudication. *Vascular medicine (London, England)*, 6(3):157–162.
- Kling, D., Fingerle, J., Harlan, J. M., Lobb, R. R., and Lang, F. (1995). Mononuclear leukocytes invade rabbit arterial intima during thickening formation via cd18-and vla-4-dependent mechanisms and stimulate smooth muscle migration. *Circulation research*, 77(6):1121–1128.
- Kopp, C. W., Hölzenbein, T., Steiner, S., Marculescu, R., Bergmeister, H., Seidinger, D., Mosberger, I., Kaun, C., Cejna, M., Horvat, R., Wojta, J., Maurer, G., Binder, B. R., Breuss, J. M., Ecker, R. C., de Martin, R., and Minar, E. (2004). Inhibition of restenosis by tissue factor pathway inhibitor: in vivo and in vitro evidence for suppressed monocyte chemoattraction and reduced gelatinolytic activity. *Blood*, 103(5):1653–61.
- Krychtiuk, K. A., Kastl, S. P., Pfaffenberger, S., Lenz, M., Hofbauer, S. L., Wonnerth, A., Koller, L., Katsaros, K. M., Pongratz, T., Goliasch, G., Niessner, A., Gaspar, L., Huber, K., Maurer, G., Dostal, E., Wojta, J., Oravec, S., and Speidl, W. S. (2015). Association of small dense ldl serum levels and circulating monocyte subsets in stable coronary artery disease. *PLoS One*, 10(4).
- Langer, H. F. and Gawaz, M. (2008). Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thrombosis and haemostasis*, 99(3):480–486.
- Lawall, H., Huppert, D., and Rümenapf, G. (2015). S3-leitlinie zur diagnostik, therapie und nachsorge der peripheren arteriellen verschlusskrankheit.
- Lee, R. and Libby, P. (1997). The unstable atheroma. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17(10):1859–1867.
- Li, A. C. and Glass, C. K. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature medicine*, 8(11):1235–1242.
- Libby, P. (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9):2045–2051.
- Libby, P. and Ganz, P. (1997). Restenosis revisited—new targets, new therapies. *The New England journal of medicine*, 337(6):418–9.
- Libby, P., Nahrendorf, M., and Swirski, F. K. (2013). Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. In *Seminars in immunopathology*, volume 35, pages 553–562.
- Libby, P., Ridker, P., and Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Nature*, 420(6917):868–874.
- Libby, P., Schwartz, D., Brogi, E., Tanaka, H., and Clinton, S. K. (1992). A cascade model for restenosis. a special case of atherosclerosis progression. *Circulation*, 86(6 Suppl):III47–52.

- Liu, Y., Imanishi, T., Ikejima, H., Tsujioka, H., Ozaki, Y., Kuroi, A., Okochi, K., Ishibashi, K., Tanimoto, T., Ino, Y., Kitabata, H., and Akasaka, T. (2010). Association between circulating monocyte subsets and in-stent restenosis after coronary stent implantation in patients with st-elevation myocardial infarction. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 74(12):2585–91.
- Loscalzo, J. and Vita, J. A. (2000). *Nitric oxide and the cardiovascular system*. Springer Science & Business Media.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407:233–241.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2007). New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol*, 37:14–16.
- Massberg, S., Brand, K., Grüner, S., Page, S., Müller, E., Müller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B., and Gawaz, M. (2002). A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine*, 196(7):887–896.
- Mehler, P. S., Coll, J. R., Estacio, R., Esler, A., Schrier, R. W., and Hiatt, W. R. (2003). Intensive blood pressure control reduces the risk of cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease and type 2 diabetes. *Circulation*, 107(5):753–6.
- Mehran, R., Dangas, G., Abizaid, A. S., Mintz, G. S., Lansky, A. J., Satler, L. F., Pichard, A. D., Kent, K. M., Stone, G. W., and Leon, M. B. (1999). Angiographic patterns of in-stent restenosis: classification and implications for long-term outcome. *Circulation*, 100(18):1872–8.
- Mintz, G. S., Popma, J. J., Pichard, A. D., Kent, K. M., Satler, L. F., Chiu Wong, S., Hong, M. K., Kovach, J. A., and Leon, M. B. (1996). Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation*, 94(1):35–43.
- Monroe, D. M. and Hoffman, M. (2006). What does it take to make the perfect clot? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(1):41–48.
- Morgenstern, B. R., Getrajdman, G. I., Laffey, K. J., Bixon, R., and Martin, E. C. (1989). Total occlusions of the femoropopliteal artery: high technical success rate of conventional balloon angioplasty. *Radiology*, 172(3 Pt 2):937–40.
- Mori, E., Komori, K., Yamaoka, T., Tanii, M., Kataoka, C., Takeshita, A., Usui, M., Egashira, K., and Sugimachi, K. (2002). Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*, 105(24):2905–10.
- Mosig, S., Rennert, K., Krause, S., Kzhyshkowska, J., Neunübel, K., Heller, R., and Funke, H. (2009). Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia:

- potential function of cd14+ cd16+ monocytes in detoxification of oxidized ldl. *The FASEB Journal*, 23(3):866–874.
- Muzaffar, S., Shukla, N., and Jeremy, J. Y. (2005). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase: a promiscuous therapeutic target for cardiovascular drugs? *Trends in cardiovascular medicine*, 15(8):278–282.
- Nahrendorf, M., Swirski, F., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine*, 204(12):3037–3047.
- Napoli, C., D’Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G., and Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced maternal, hypercholesterolemia. intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation*, 100(11):2680–2690.
- Nassar, T., Sachais, B. S., Akkawi, S., Kowalska, M. A., Bdeir, K., Leitersdorf, E., Hiss, E., Ziporen, L., Aviram, M., Cines, D., Poncz, M., and Higazi, A. A.-R. (2003). Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(8):6187–93.
- Newby, A. C. (2006). Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovascular research*, 69(3):614–624.
- Nicholls, S. J. and Hazen, S. L. (2005). Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(6):1102–1111.
- Norgren, L., Hiatt, W. R., Dormandy, J. A., Nehler, M. R., Harris, K. A., and Fowkes, F. G. R. (2007a). Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (tasc ii). *Journal of vascular surgery*, 45 Suppl S:S5–67.
- Norgren, L., Hiatt, W. R., Dormandy, J. A., Nehler, M. R., Harris, K. A., Fowkes, F. G. R., and Rutherford, R. B. (2007b). Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*, 26(2):81–157.
- Norrby, K. (2002). Mast cells and angiogenesis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 110(5):355–371.
- Norton, J., Bollinger, R. R., Chang, A. E., and Lowry, S. F. (2012). *Surgery: basic science and clinical evidence*. Springer.
- Ouriel, K. (2001). Peripheral arterial disease. *Lancet*, 358(9289):1257–1264.
- Palframan, R. T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D. R., Rollins, B. J., Zweerink, H., Rot, A., and von Andrian, U. H. (2001). Inflammatory

- chemokine transport and presentation in hev: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *The Journal of experimental medicine*, 194(9):1361–1373.
- Paudel, B., Xuan, G. j., and Chun, Z. f. (2005). Analysis of clinical factors affecting the restenosis following percutaneous coronary intervention. *Nepal Medical College journal : NM CJ*, 7(2):101–6.
- Pearson, J. D. (1991). Endothelial cell biology. *Radiology*, 179(1):9–14.
- Penz, S., Reininger, A. J., Brandl, R., Goyal, P., Rabie, T., Bernlochner, I., Rother, E., Goetz, C., Engelmann, B., Smethurst, P. A., et al. (2005). Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein vi. *The FASEB journal*, 19(8):898–909.
- Peters, J. H., Ruppert, J., Gieseler, R. K., Najjar, H. M., and Xu, H. (1991). Differentiation of human monocytes into cd14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 59(3):122–126.
- Pitsilos, S., Hunt, J., Mohler, E. R., Prabhakar, A. M., Poncz, M., Dawicki, J., Khalapyan, T. Z., Wolfe, M. L., Fairman, R., Mitchell, M., Carpenter, J., Golden, M. A., Cines, D. B., and Sachais, B. S. (2003). Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thrombosis and haemostasis*, 90(6):1112–1120.
- Popma, J. J., Califf, R. M., and Topol, E. J. (1991). Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*, 84(3):1426–1436.
- Popma, J. J., De Cesare, N. B., Pinkerton, C. A., Kereiakes, D. J., Whitlow, P., King, S. B., Topol, E. J., Holmes, D. R., Leon, M. B., and Ellis, S. G. (1993). Quantitative analysis of factors influencing late lumen loss and restenosis after directional coronary atherectomy. *The American journal of cardiology*, 71(7):552–7.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M., and Moncada, S. (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British journal of pharmacology*, 92(3):639–46.
- Rahimi, K., Maerz, H. K., Zotz, R. J., and Tárnok, A. (2003). Pre-procedural expression of mac-1 and lfa-1 on leukocytes for prediction of late restenosis and their possible correlation with advanced coronary artery disease. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 53(1):63–9.
- Ramana, K. V., Bhatnagar, A., and Srivastava, S. K. (2004). Inhibition of aldose reductase attenuates tnf-alpha-induced expression of adhesion molecules in endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(11):1209–1218.
- Ramos, C. L., Huo, Y., Jung, U., Ghosh, S., Manka, D. R., Sarembock, I. J., and Ley,

- K. (1999). Direct demonstration of p-selectin- and vcam-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation research*, 84(11):1237–44.
- Regensteiner, J. G., Ware, J. E., McCarthy, W. J., Zhang, P., Forbes, W. P., Heckman, J., and Hiatt, W. R. (2002). Effect of cilostazol on treadmill walking, community-based walking ability, and health-related quality of life in patients with intermittent claudication due to peripheral arterial disease: meta-analysis of six randomized controlled trials. *Journal of the American Geriatrics Society*, 50(12):1939–1946.
- Rogacev, K. S., Cremers, B., Zawada, A. M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., Große-Dunker, G., Heisel, I., Hornof, F., Jeken, J., Rebling, N. M., Ulrich, C., Scheller, B., Böhm, M., Fliser, D., and Heine, G. H. (2012). Cd14++cd16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(16):1512–1520.
- Rogacev, K. S., Ulrich, C., Blömer, L., Hornof, F., Oster, K., Ziegelin, M., Cremers, B., Grenner, Y., Geisel, J., Schlitt, A., Köhler, H., Fliser, D., Girndt, M., and Heine, G. H. (2010). Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *European heart journal*, 31(3):369–376.
- Rogers, C., Edelman, E. R., and Simon, D. I. (1998). A mab to the beta2-leukocyte integrin mac-1 (cd11b/cd18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17):10134–9.
- Rogers, C., Karnovsky, M. J., and Edelman, E. R. (1993). Inhibition of experimental neointimal hyperplasia and thrombosis depends on the type of vascular injury and the site of drug administration. *Circulation*, 88(3):1215–21.
- Rolland, P. H., Jouve, R., Pellegrin, E., Mercier, C., and Serradimigni, A. (1984). Alteration in prostacyclin and prostaglandin e2 production. correlation with changes in human aortic atherosclerotic disease. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, 4(1):70–78.
- Rollins, B. J. (1996). Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Molecular medicine today*, 2(5):198–204.
- Roque, M., Kim, W. J. H., Gazdoin, M., Malik, A., Reis, E. D., Fallon, J. T., Badimon, J. J., Charo, I. F., and Taubman, M. B. (2002). Ccr2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(4):554–559.
- Rosanio, S., Tocchi, M., Patterson, C., and Runge, M. S. (1999). Prevention of restenosis after percutaneous coronary interventions: the medical approach. *Thrombosis and haemostasis*, 82(S 01):164–170.
- Rosenfield, K., Jaff, M. R., White, C. J., Rocha-Singh, K., Mena-Hurtado, C., Metzger, D. C., Brodmann, M., Pilger, E., Zeller, T., Krishnan, P., Gammon, R., Muller-Hulsbeck,

- S., Nehler, M. R., Benenati, J. F., Scheinert, D., and Investigators, L. (2015). Trial of a paclitaxel-coated balloon for femoropopliteal artery disease. *The New England journal of medicine*, 373(2):145–153.
- Ross, R. (1986). The pathogenesis of atherosclerosis—an update. *The New England journal of medicine*, 314(8):488–500.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, 340(2):115–126.
- Ross, R. and Glomset, J. A. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *The New England journal of medicine*, 295(8):420–425.
- Rother, E., Brandl, R., Baker, D. L., Goyal, P., Gebhard, H., Tigyi, G., and Siess, W. (2003). Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation*, 108(6):741–747.
- Sánchez-Torres, C., Garcia-Romo, G. S., Cornejo-Cortés, M. A., Rivas-Carvalho, A., and Sánchez-Schmitz, G. (2001). Cd16+ and cd16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate cd4+ t cells. *International immunology*, 13(12):1571–1581.
- Sarma, J., Laan, C. A., Alam, S., Jha, A., Fox, K. A. A., and Dransfield, I. (2002). Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation*, 105(18):2166–2171.
- Scheuerer, B., Ernst, M., Dürrbaum-Landmann, I., Fleischer, J., Grage-Griebenow, E., Brandt, E., Flad, H. D., and Petersen, F. (2000). The cxc-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood*, 95(4):1158–1166.
- Schillinger, M., Exner, M., Mlekusch, W., Haumer, M., Sabeti, S., Ahmadi, R., Schwarzing, I., Wagner, O., and Minar, E. (2003). Restenosis after femoropopliteal pta and elective stent implantation: predictive value of monocyte counts. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*, 10(3):557–565.
- Schillinger, M., Sabeti, S., Loewe, C., Dick, P., Amighi, J., Mlekusch, W., Schlager, O., Cejna, M., Lammer, J., and Minar, E. (2006). Balloon angioplasty versus implantation of nitinol stents in the superficial femoral artery. *The New England journal of medicine*, 354(18):1879–1888.
- Schlitt, A., Heine, G. H., Blankenberg, S., Espinola-Klein, C., Dopheide, J. F., Bickel, C., Lackner, K. J., Iz, M., Meyer, J., Darius, H., and Rupprecht, H. J. (2004). Cd14+cd16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum tnf-alpha levels. *Thrombosis and haemostasis*, 92(2):419–424.

- Serbina, N. and Pamer, E. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor ccr2. *Nature immunology*, 7(3):311–317.
- Shah, P. K., Falk, E., Badimon, J. J., Fernandez-Ortiz, A., Mailhac, A., Villareal-Levy, G., Fallon, J. T., Regnstrom, J., and Fuster, V. (1995). Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*, 92(6):1565–1569.
- Shang, X. Z. and Issekutz, A. C. (1998). Contribution of cd11a/cd18, cd11b/cd18, icam-1 (cd54) and -2 (cd102) to human monocyte migration through endothelium and connective tissue fibroblast barriers. *European journal of immunology*, 28(6):1970–1979.
- Shi, C. and Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 11(11):762–774.
- Siess, W. (1989). Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiological reviews*, 69(1):58–178.
- Sobel, M. and Verhaeghe, R. (2008). Antithrombotic therapy for peripheral artery occlusive disease: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition). *Chest*, 133(6 Suppl):815S–843S.
- Soehnlein, O., Drechsler, M., Hristov, M., and Weber, C. (2009). Functional alterations of myeloid cell subsets in hyperlipidaemia: relevance for atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(11-12):4293–4303.
- Strydom, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., and Wissler, R. W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. a report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, american heart association. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*, 14(5):840–856.
- Steinacker, J. M., Liu, Y., and Hanke, H. (2002). Körperliche Bewegung bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit. *Dtsch Arztebl International*, 99(45):A-3018–.
- Steinberg, D. (2009). The ldl modification hypothesis of atherogenesis: an update. *Journal of lipid research*, 50(Supplement):S376–S381.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L. (1989). Beyond cholesterol. modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England journal of medicine*, 320(14):915–924.
- Sugiyama, S., Okada, Y., Sukhova, G. K., Virmani, R., Heinecke, J. W., and Libby, P. (2001). Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-

- stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *The American journal of pathology*, 158(3):879–891.
- Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R., Pittet, M. J., et al. (2007). Ly-6chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytoysis and give rise to macrophages in atheromata. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1):195–205.
- Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T. J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., et al. (2007). Monocyte subsets differentially employ ccr2, ccr5, and cx3cr1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1):185–194.
- Tedgui, A. and Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological reviews*, 86(2):515–581.
- Thomas, C., F, F., Mennel, H.-D., Schmid, K. W., and Schmitz-Moormann, P. (2003). Allgemeine pathologie.
- Trialists' Collaboration, A. et al. (2002). Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Bmj*, 324(7329):71–86.
- Tsujioka, H., Imanishi, T., Ikejima, H., Kuroi, A., Takarada, S., Tanimoto, T., Kitabata, H., Okochi, K., Arita, Y., Ishibashi, K., et al. (2009a). Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(2):130–138.
- Tsujioka, H., Imanishi, T., Ikejima, H., Kuroi, A., Takarada, S., Tanimoto, T., Kitabata, H., Okochi, K., Arita, Y., Ishibashi, K., Komukai, K., Kataiwa, H., Nakamura, N., Hirata, K., Tanaka, A., and Akasaka, T. (2009b). Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(2):130–138.
- Urra, X., Cervera, A., Obach, V., Climent, N., Planas, A. M., and Chamorro, A. (2009). Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 40(4):1262–1268.
- Van Der Wal, A. and Becker, A. (1999). Atherosclerotic plaque rupture—pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovascular research*, 41(2):334–344.
- van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., and Langevoort, H. L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 46(6):845–852.
- Wagner, H. J. (2002). [current status of endovascular therapy in the femoropopliteal vas-

- cular segment in chronic peripheral arterial occlusive disease]. *VASA. Zeitschrift für Gefäßkrankheiten*, 31(3):153–61.
- Waltham, M. and Harris, J. (2004). Intimal hyperplasia: the nemesis of cardiovascular intervention. *ANZ journal of surgery*, 74(9):719–20.
- Weber, C., Zerneck, A., and Libby, P. (2008). The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nature Reviews Immunology*, 8(10):802–815.
- Weintraub, W. S., Kosinski, A. S., Brown, C. L., and King, S. B. (1993). Can restenosis after coronary angioplasty be predicted from clinical variables? *Journal of the American College of Cardiology*, 21(1):6–14.
- Welt, F. G. P. and Rogers, C. (2002). Inflammation and restenosis in the stent era. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(11):1769–76.
- White, C. (2007). Clinical practice. intermittent claudication. *N Engl J Med*, 356(12):1241–1250.
- Whitelaw, D. M. (1972). Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell and tissue kinetics*, 5(4):311–317.
- Widmer, L. K., Biland, L., Delley, A., and da Silva, A. (1983). [the importance of peripheral-arterial occlusive diseases in medical practice. conclusions from the basel study]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*, 113(49):1824–7.
- Wildgruber, M., Lee, H., Chudnovskiy, A., Yoon, T.-J., Etzrodt, M., Pittet, M. J., Nahrendorf, M., Croce, K., Libby, P., Weissleder, R., and Swirski, F. K. (2009). Monocyte subset dynamics in human atherosclerosis can be profiled with magnetic nano-sensors. *PloS one*, 4(5):e5663.
- Xu, D., Zou, L., Xing, Y., Hou, L., Wei, Y., Zhang, J., Qiao, Y., Hu, D., Xu, Y., Li, J., and Ma, Y. (2013). Diagnostic value of ankle-brachial index in peripheral arterial disease: a meta-analysis. *The Canadian journal of cardiology*, 29(4):492–8.
- Yoshimura, S., Kaku, Y., Ueda, T., Hayashi, K., Nishimura, Y., Andoh, T., and Sakai, N. (1998). Results and problems in percutaneous transluminal angioplasty for internal carotid artery stenosis. *Interventional neuroradiology : journal of peritherapeutic neuroradiology, surgical procedures and related neurosciences*, 4 Suppl 1:37–40.
- Zarins, C. K., Giddens, D. P., Bharadvaj, B. K., Sottiurai, V. S., Mabon, R. F., and Glagov, S. (1983). Carotid bifurcation atherosclerosis. quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circulation research*, 53(4):502–514.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. (1996). Heterogeneity of human blood monocytes: the cd14+ cd16+ subpopulation. *Immunology today*, 17(9):424–428.

- Ziegler-Heitbrock, H. W., Fingerle, G., Ströbel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schütt, C., Passlick, B., and Pforte, A. (1993). The novel subset of cd14+/cd16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *European journal of immunology*, 23(9):2053–2058.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The cd14+ cd16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 81(3):584–592.

Anhang A

Publikationsliste

- Wildgruber, M., Czubba, M., Aschenbrenner, T., Wendorff, H., Hapfelmeier, A., Glinzer, A., Schiemann, M. (2016). Increased intermediate CD14⁺⁺CD16⁺⁺ monocyte subset levels associate with restenosis after peripheral percutaneous transluminal angioplasty. *Atherosclerosis*, 253: S.128-134.

Anhang B

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir bei meiner Dissertation zur Seite standen und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Ein ausdrücklicher Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. E. J. Rummeny und meinen Betreuer Herrn Prof. Dr. Moritz Wildgruber für die Vergabe dieses Dissertationsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie durchzuführen. Ganz herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Eckstein und Herrn Dr. Wendorff und dem ganzen Team der gefäßchirurgischen Abteilung des Klinikum rechts der Isar sowie Teresa Aschenbrenner für die Mithilfe bei der Rekrutierung der Patienten und der Durchführung dieser Studie. Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Alexander Hapfelmeier für die Betreuung des statistischen Teils meiner Arbeit.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für die stetige liebevolle Unterstützung danken, sowie meinem Verlobten Martin Stämmler, der mir besonders in der letzten Phase dieser Arbeit immer mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.