

Aus dem Zentrum für Kardiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung zirkulierender Biomarker von Endotheldysfunktion, Inflammation
und Angiogenese bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Janina Krug
aus Mainz

Mainz, 2023

Für meinen Opa,
der meine größte Motivation beim Anfertigen dieser Arbeit darstellte
und stets geduldig darauf wartete, seine Enkelin endlich „Frau Dr.“ nennen zu
dürfen

Für Oma, Mama und Papa,
die mich bei meinem Medizinstudium und auf dem Weg zur Promotion immer
unterstützt haben

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

13. Oktober 2023

Teile der vorliegenden Arbeiten wurden publiziert in:

EPCR-PAR1 biased signaling regulates perfusion recovery and neovascularization in peripheral ischemia

Publiziert in
JCI Insight

Publikationsdatum
22. Juli 2022

Referenzinformationen
JCI Insight.2022;7(14):e157701.
[https://doi: 10.1172/jci.insight.157701](https://doi.org/10.1172/jci.insight.157701).
PMID: 35700057 Free article.

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	IV
II. Abbildungsverzeichnis	VI
III. Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	1
2 Literaturdiskussion	4
2.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK).....	4
2.1.1 Definition	4
2.1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	5
2.1.3 Diagnostik.....	5
2.1.4 Therapie.....	7
2.1.5 Verlauf und Prognose	9
2.2 Endothelfunktion und -dysfunktion und ihre Bedeutung für Atherosklerose, Thrombose und Angiogenese	9
2.2.1 Pathomechanismus der Atherosklerose - Response-to-Injury-Hypothese	10
2.2.2 Die Wirkung von Endothelzellen auf die Thrombozytenaktivierung und Blutgerinnung / Funktion von Thrombin	11
2.2.3 Endothelzellen und Gefäßneubildung (Neoangiogenese).....	12
2.3 Endothelialer-Protein-C-Rezeptor (EPCR).....	13
2.3.1 Endothelialer-Protein-C-Rezeptor (EPCR) Signalweg und Aktiviertes Protein C (APC).....	13
2.3.2 EPCR <i>Shedding</i> und sEPCR.....	14
2.4 Andere potentielle Biomarker der pAVK	15
2.4.1 Biomarker für Endothelfunktion (E-Selectin) und Inflammation (hsCRP, TNF α und Interleukin1 β)	15
2.4.2 Biomarker für Angiogenese (VEGF, Tie2 und Notch) und Fibrose (TGF β).....	18
3 Materialien und Methoden	22
3.1 Verwendete Materialien.....	22
3.1.1 Materialienliste	22
3.1.2 Kits	23
3.1.3 Geräte und Programme	23
3.2 Studiendesign	24
3.3 Ethikvotum	25
3.4 Patientenkollektiv	26
3.4.1 Patientenrekrutierung.....	26
3.4.2 Einschlusskriterien	27
3.4.3 Ausschlusskriterien	27
3.4.4 Abbruchkriterien.....	27
3.5 Studienablauf	28
3.5.1 Maßnahmen	28

3.5.2 Erfassungen der Zielgrößen	29
3.6 Klinische Endpunkte	32
3.6.1 Primäre und sekundäre Zielgrößen	32
3.7 Probengewinnung, Verarbeitung, Lagerung.....	33
3.8 Biomarker Analysen.....	33
3.8.1 <i>Enzym-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	33
3.8.2 Griess Reagent.....	37
3.9 Statistische Auswertung.....	39
4 Ergebnisse	40
4.1 Klinische und laborchemische Charakteristika der untersuchten Patienten- und Probandenkollektive.....	40
4.1.1 Patientenkollektiv pAVK Stadium II	40
4.1.2 Patientenkollektiv Gruppe pAVK Stadium III und 4	42
4.1.3 Probandenkollektiv GHS Untergruppen.....	44
4.1.4 Probandenkollektiv < 35 Jahre	46
4.1.5 Übersichtstabelle klinische Charakteristika aller untersuchten Patienten- und Probandenkollektive.....	48
4.2 Quantitative Proteinbestimmung mittels ELISA: Vergleich mit gesunden, jungen sowie alters- und geschlechts-gematchten Kontrollprobanden	50
4.2.1 Bestimmung der sEPCR Konzentrationen im Plasma.....	51
4.2.2 Bestimmung der ADAM17 Konzentrationen im Plasma	53
4.2.3 Bestimmung von Protein C Aktivität	54
4.2.4 Bestimmung von NO.....	56
4.2.5 Plasma-Konzentration von NO 1.....	56
4.2.6 Plasma-Konzentration von NO 2.....	57
4.2.7 Bestimmung von E-Selectin im Plasma	58
4.2.8 Bestimmung von hsCRP	60
4.2.9 Bestimmung von TNF α	62
4.2.10 Bestimmung von IL1 β	63
4.2.11 Bestimmung von VEGF.....	65
4.2.12 Bestimmung von Tie2	66
4.2.13 Bestimmung von Notch.....	68
4.2.14 Bestimmung von TGF β	70
4.2.15 Zusammenfassung.....	71
4.3 Quantitative Proteinbestimmung mittels ELISA: Vergleich verschiedener pAVK Stadien	76
4.3.1 Bestimmung von sEPCR: pAVK Stadium II vs. pAVK Stadium III/4	76
4.4 Korrelationen der gemessenen Parameter untereinander	78
4.4.1 Korrelationen von sEPCR mit weiteren Biomarkern	78
4.4.2 Korrelationen sEPCR mit weiteren klinischen Parametern	79
4.4.3 sEPCR und cw-Doppler- bzw. elektronische Oszillografiedaten.....	79
4.4.4 sEPCR und Geschlecht.....	80
4.4.5 Weitere Korrelationen	82
4.5 Subgruppen-Analysen	82
4.5.1 sEPCR und Rauchverhalten.....	82
4.5.2 sEPCR und Diabetes	83
4.5.3 sEPCR und stattgehabter Myokardinfarkt	84
4.5.4 sEPCR und stattgehabte Thrombosen.....	84
5 Diskussion	86

5.1	Die pAVK ist mit reduzierten sEPCR Plasmaspiegeln assoziiert.....	86
5.2	Die ADAM17 Aktivität ist komplex und wird durch die Endothel-funktion beeinflusst.....	90
5.3	Die pAVK ist mit reduzierten NO-Plasmaspiegeln und erhöhten Biomarkern für eine Endotheldysfunktion assoziiert	91
5.4	Die pAVK geht mit erhöhten bereits etablierten Biomarkern für Entzündung und Angiogenese einher.....	92
5.5	Korrelation von sEPCR mit klinischen Parametern und weiteren Biomarkern	95
5.6	Limitationen und Ausblick.....	97
6	Zusammenfassung.....	99
7	Literaturverzeichnis	101
IV.	Anhang	IX
V.	Danksagung	XXI
VI.	Lebenslauf	XXIII

I. Abkürzungsverzeichnis

ABI	Knöchel-Arm-Index – <i>Ankle Brachial Index</i>
ADAM17	<i>A disintegrin and metalloprotease 17</i>
AG	Arbeitsgruppe
APC	Aktiviertes Protein C
ASS	Acetylsalicylsäure
CANTOS	<i>Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study</i>
CI	<i>Claudicatio intermittens</i>
CLI	Kritische Extremitätenischämie – <i>critical limb ischemia</i>
CRP	C-reaktives Protein
ddH ₂ O	<i>Double-distilled water</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EndMT	<i>Endothelial-to-mesenchymal transition</i>
EPCR	<i>Endothelial Protein C Receptor</i>
sEPCR	<i>Soluble Endothelial Protein C Receptor</i>
F I-XIII	Gerinnungsfaktor I-XIII
HRP	<i>Horseradish Peroxidase,</i> Meerrettichperoxidase
IL1 β	Interleukin1 β
MTA	Medizinisch-Technische*r Assistent*in
NED	N-1-Naphthylethylenediamine
NO	Stickstoffmonoxid – <i>nitric oxide</i>
oxLDL	Oxidiertes Low-Density Lipoprotein
PAR1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PC	Protein C
RBC	Erythrozyten – <i>red blood cells</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SAP	Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung

SET	Strukturiertes Gehtraining – <i>supervised exercise training</i>
STD	Standard
Std.	Stadium
STEMI	ST-Hebung Myokardinfarkt
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Tie2	<i>Tunica Interna Endothelial Cell Kinase</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vWF	Von Willebrand Faktor
WBC	Leukozyten – <i>white blood cells</i>

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pro- und antikoagulatorische Wirkungen von Thrombin	12
Abbildung 2: Pipettierschema Standardreihe sEPCR ELISA.....	34
Abbildung 3: Chemische Reaktionsgrundlage des Griess Reagent	37
Abbildung 4: Pipettierschema Standardreihe Griess Reagent.....	38
Abbildung 5: sEPCR im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre	51
Abbildung 6: sEPCR im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive	52
Abbildung 7: sEPCR im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre	52
Abbildung 8: ADAM17 im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre	53
Abbildung 9: ADAM17 im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive	53
Abbildung 10: Protein C Aktivität im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre	55
Abbildung 11: Protein C Aktivität im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive	56
Abbildung 12: NO im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre	57
Abbildung 13: NO im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive	58
Abbildung 14: E-Selectin im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre	59
Abbildung 15: E-Selectin im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive	59
Abbildung 16: hsCRP im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre	61
Abbildung 17: hsCRP im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive	61
Abbildung 18: TNF α im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre	62
Abbildung 19: TNF α im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive	63
Abbildung 20: IL1 β im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre.....	64
Abbildung 21: IL1 β im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive.....	64
Abbildung 22: VEGF im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre	65
Abbildung 23: VEGF im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive	66
Abbildung 24: Tie2 im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre.....	67
Abbildung 25: Tie2 im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive.....	67
Abbildung 26: Notch im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre	69
Abbildung 27: Notch im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive	69
Abbildung 28: TGF β im Plasma pAVK Std. II und < 35 Jahre.....	70
Abbildung 29: TGF β im Plasma pAVK Std. II und GHS Kollektive	71
Abbildung 30: sEPCR im Plasma pAVK Std. II und Std. III/IV	77

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der pAVK.....	4
Tabelle 2: ABI Kategorien zur Abschätzung des pAVK-Schweregrads	6
Tabelle 3: Übersicht der stadiengerechten Behandlung der pAVK.....	8
Tabelle 4: Übersicht verwendete Materialien	22
Tabelle 5: Übersicht verwendete KITS.....	23
Tabelle 6: Übersicht verwendete Geräte und Programme.....	23
Tabelle 7: Graphische Darstellung der verschiedenen Studiengruppen.....	25
Tabelle 8: Übersicht durchgeführte Maßnahmen in den Untergruppen.....	28
Tabelle 9: Übersicht der erfassten laborchemischen Parameter	30
Tabelle 10: Klassifizierung der klinischen Parameter	30
Tabelle 11: Konzentrationsgefälle der Standardreihe des sEPCR ELISAs.	34
Tabelle 12: Unterschiede der ELISAs für die einzelnen Biomarker	35
Tabelle 13: Unterschiede der ELISAs für die einzelnen Biomarker	36
Tabelle 14: Konzentrationsgefälle der Standardreihe des Griess Reagent.	38
Tabelle 15: Allgemeine Charakteristika der pAVK Std. II Untergruppe.....	40
Tabelle 16: Allgemeine Charakteristika der pAVK Std. II Untergruppe.....	41
Tabelle 17: Häufigkeit kardiovaskuläre Risikofaktoren der pAVK Std. II Untergruppe....	41
Tabelle 18: Laborchemische Basisdiagnostik der pAVK Std. II Untergruppe..	41
Tabelle 19: Medikation der pAVK Std. II Untergruppe	42
Tabelle 20: Allgemeine Charakteristika der pAVK Std. III/IV Untergruppe.	43
Tabelle 21: Häufigkeit kardiovaskuläre Risikofaktoren der pAVK Std. III/IV Untergruppe	43
Tabelle 22: Laborchemische Basisdiagnostik der pAVK Std. III/IV Untergruppe.....	43
Tabelle 23: Medikation der pAVK Std. III/IV Untergruppe.....	44
Tabelle 24: Allgemeine Charakteristika der GHS Untergruppen.....	45
Tabelle 25: Häufigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren der GHS Untergruppen.	45
Tabelle 26: Laborchemische Basisdiagnostik der GHS Untergruppen.....	45
Tabelle 27: Medikation der GHS Untergruppe	46
Tabelle 28: Allgemeine Charakteristika der < 35 Jahre Untergruppe	47
Tabelle 29: Häufigkeit kardiovaskuläre Risikofaktoren der pAVK Std. III/IV Untergruppe	47
Tabelle 30: Laborchemische Basisdiagnostik der < 35 Jahre Untergruppe.....	47
Tabelle 31: Übersichtstabelle klinische Charakteristika aller Untergruppen	48
Tabelle 32: Bestimmung von sEPCR im Plasma der Gruppen.....	51
Tabelle 33: Bestimmung von ADAM17 im Plasma der Gruppen	53

Tabelle 34: Bestimmung der Protein C Aktivität im Plasma der Gruppen.....	54
Tabelle 35: Bestimmung von NO im Plasma der Gruppen (1).....	56
Tabelle 36: Bestimmung von NO im Plasma der Gruppen (2).....	57
Tabelle 37: Bestimmung von E-Selectin im Plasma der Gruppen.	58
Tabelle 38: Bestimmung von hsCRP im Plasma der Gruppen	60
Tabelle 39: Bestimmung von TNF α im Plasma der Gruppen	62
Tabelle 40: Bestimmung von IL1 β im Plasma der Gruppen.....	63
Tabelle 41: Bestimmung von VEGF im Plasma der Gruppen.....	65
Tabelle 42: Bestimmung von Tie2 im Plasma der Gruppen.....	66
Tabelle 43: Bestimmung von Notch im Plasma der Gruppen	68
Tabelle 44: Bestimmung von TGF β im Plasma der Gruppen	70
Tabelle 45: Zusammenfassung der ELISA Ergebnisse für die Untergruppen	71
Tabelle 46: Bestimmung von sEPCR pAVK Std. II vs. pAVK Std. III/IV.....	76
Tabelle 47: Korrelation von sEPCR und weiteren Biomarkern	78
Tabelle 48: Korrelation von sEPCR und Alter	79
Tabelle 49: Bestimmung von sEPCR in den cw-Doppler- und Oszillografieuntergruppen des pAVK Std. II Kollektivs	79
Tabelle 50: Bestimmung von sEPCR bei weiblichen Patienten	80
Tabelle 51: Bestimmung von sEPCR bei männlichen Patienten	80
Tabelle 52: Korrelation von sEPCR und ABI.....	81
Tabelle 53: Korrelation von sEPCR und objektivierbarer Laufstrecke	81
Tabelle 54: Korrelation von VEGF und ABI.....	82
Tabelle 55: Korrelation von VEGF und objektivierbarer Laufstrecke	82
Tabelle 56: sEPCR und Rauchverhalten in der pAVK Std. II Untergruppe.....	82
Tabelle 57: sEPCR und Diabetes in der pAVK Std. II Untergruppe.....	83
Tabelle 58: sEPCR und Diabetes in der pAVK Std. III/IV Untergruppe	83
Tabelle 59: sEPCR und Diabetes kumuliert für beide pAVK Stadien.	83
Tabelle 60: sEPCR und Myokardinfarkt in der pAVK Std. III/IV Untergruppe	84
Tabelle 61: sEPCR und Thrombose in der pAVK Std. III/IV Untergruppe	84

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) bezeichnet eine durch fortschreitende Stenosierung eingeschränkte Durchblutung der arteriellen Gefäße, wobei in > 90 % der Fälle die untere Extremität betroffen ist. Weltweit leiden ca. 202 Millionen Menschen an einer pAVK, ungefähr 40 Millionen davon leben in Europa [1]. Die Prävalenz der Gefäßerkrankung ist altersabhängig und tritt zumeist nach dem 50. Lebensjahr auf, mit einer exponentiellen Zunahme ab einem Alter von 65 Jahren. Zu Zeiten des demografischen Wandels und einer zunehmenden Prävalenz von Patienten mit Diabetes mellitus, einem Hauptrisikofaktor für die pAVK, steigt die Relevanz dieser Gefäßerkrankung in Deutschland aktuell stetig [1].

Die pAVK lässt sich in ein stabiles Stadium der *Claudicatio intermittens* (CI) und instabiles Stadium der kritischen Extremitätenischämie (*critical limb ischemia*: CLI) unterteilen [2]. Bei der CI kommt es durch Minderdurchblutung zu einer vorübergehenden Ischämie der Extremität bei Belastung. Dies äußert sich klinisch in einer durch Schmerzen eingeschränkten Gehstrecke, einer reduzierten Schrittgeschwindigkeit und einer von den individuellen Begleitumständen und Komorbiditäten abhängigen Einschränkung der Lebensqualität. Im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium der CLI kommt es zu ischämischen Ruheschmerzen sowie zu Haut- und Gewebeläsionen.

Grundlage der pAVK ist eine chronische Entzündungsreaktion auf dem Boden atherosklerotischer Gefäßveränderungen. Atherogene Risikofaktoren (z.B. arterielle Hypertonie oder Rauchen) bewirken eine Endothelzellschädigung und Intimaläsion von Blutgefäßen, was unter dem Einfluss von Chemokinen zu einer Einwanderung von Immunzellen führt [3-5]. Durch die Einlagerung von Lipoproteinen in die verletzte Arterienwand werden aus Monozyten, welche sich subendothelial zu Makrophagen differenzieren, die sogenannten Schaumzellen. Letztere bilden mit den umliegenden Lymphozyten die „fatty streaks“ [6-9], welche sich durch Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen zu komplexen, okklusiven Läsionen, den „fibrösen Plaques“ organisieren. Diese können aufgrund der zunehmenden Lumeneinengung mit (in-)komplettem Gefäßverschluss eine Mangel durchblutung bewirken [10] und prädisponieren zur Thrombenbildung (Atherothrombose).

Einen wichtigen Schritt für die Entstehung der Atherosklerose stellt die Endotheldysfunktion dar. So besitzen gesunde Endothelzellen wichtige antikoagulatorische Eigenschaften, die unter anderem durch Thrombomodulin vermittelt und durch den endothelialen Protein C Rezeptor (EPCR) augmentiert werden. EPCR fördert durch die Bindung von Thrombomodulin die durch Thrombin katalysierte

Umwandlung von Protein C (PC) zu aktiviertem Protein C (APC), welches die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa irreversibel hemmt [11, 12]. Durch die bestehende Bindung von APC an EPCR werden über die Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs), speziell PAR1, neben antikoagulatorischen Wirkungen auch antiinflammatorische, antiapoptotische und endothelprotektive Signalwege aktiviert [13].

Ob und wie der endotheliale EPCR Signalweg die Neoangiogenese beeinflusst, ist weniger gut erforscht: Experimentelle Studien konnten bisher zeigen, dass APC die Gefäßneubildung nach Durchblutungsstörung und Ischämie in Herz [14], Niere [15] und Gehirn [16] stimuliert. Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe im Mausmodell einer peripher-arteriellen Ischämie ergaben, dass das Fehlen von EPCR auf Endothelzellen mit einer Störung der Gefäßneubildung nach Ischämie verbunden ist. Experimentell konnte die Arbeitsgruppe um Professor Schäfer bereits im Mausmodell zeigen, dass der Verlust des EPCR-PAR1 Signalwegs eine verstärkte Expression von Hämoglobin in Endothelzellen zur Folge hat, welches über ein verstärktes Stickstoffmonoxid (NO) *Scavenging* die Neubildung von Gefäßen und damit die Wiederherstellung der Durchblutung reduziert [17].

Neben endothelgebundenem EPCR zirkuliert auch eine lösliche Form des Rezeptors (*soluble* EPCR oder sEPCR) im Blutplasma, welche durch *A disintegrin and metalloprotease 17* (ADAM17) [18] von der Endotheloberfläche abgespalten wird (*Shedding*). Im Falle eines vermehrten *Sheddings* des Rezeptors resultiert eine geringere PC Aktivierung, wodurch sich die hämostatische Balance zu einer vermehrten prothrombotischen Aktivität verlagert.

Für den Ko-Rezeptor von EPCR, Thrombomodulin, konnte bereits gezeigt werden, dass die im Blut zirkulierenden Proteinspiegel bei gesunden Personen die Menge des auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimierten Rezeptors widerspiegeln, wohingegen eine endotheliale Dysfunktion seine proteolytische Ablösung verstärkt [19]. Passend dazu wurden signifikant erhöhte Plasmaspiegel löslichen Thrombomodulins bei Patienten mit pAVK [20] oder nach Myokardinfarkt [21] gefunden und als Biomarker einer endothelialen Dysfunktion vorgeschlagen. Im Gegensatz zu Thrombomodulin wurde der Einfluss einer endothelialen Dysfunktion auf die Expression von EPCR auf Endothelzellen oder die zirkulierenden löslichen EPCR-Spiegel bislang kaum untersucht. Zwar ist bekannt, dass die ADAM17-vermittelte Abspaltung EPCRs von der Endothelmembran durch Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor-alpha ($\text{TNF}\alpha$), Interleukin1 β (IL1 β) oder Thrombin verstärkt wird [22, 23], inwieweit Entzündungsprozesse, z.B. im Rahmen einer pAVK das Vorkommen von sEPCR im menschlichen Körper beeinflussen, wurde bisher allerdings noch nicht untersucht.

Zur Erhaltung bzw. Wiederherstellung des Blutflusses wird stadienabhängig unterschiedlich vorgegangen. Während zur Therapie der CI neben der optimalen Einstellung von kardiovaskulären Risikofaktoren das konservative Gehtraining einen großen Stellenwert einnimmt, um die Gefäßkollateralisierung zu fördern, werden bei der CLI interventionelle bzw. chirurgisch rekanalisierende Methoden gewählt. Eine begleitende medikamentöse Therapie erfolgt leitliniengerecht mit Thrombozytenaggregationshemmern. Diese wirken jedoch nicht primär auf die Endotheldysfunktion, sondern vielmehr auf deren Folgeerscheinungen, wie die Thrombozytenaggregation bzw. die Aktivierung der Gerinnungskaskade. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wollten wir evaluieren, inwieweit EPCR und der Erhalt der Endothelfunktion alternative therapeutische Ansatzpunkte darstellen könnten.

Zu diesem Zweck sollen bei pAVK Patienten und alters- sowie geschlechts-gematchten Kontrollgruppen die zirkulierenden Spiegel von sEPCR sowie von Faktoren, die an dessen proteolytischer Ablösung von der Endothelzelloberfläche (ADAM17) bzw. als Maß für die EPCR Funktionalität (Protein C Aktivität) dienen, gemessen werden. Weiterhin wollen wir Proteine, die als Biomarker für eine gesunde Endothelfunktion (NO, E-Selectin), Inflammation (hsCRP, TNF α , IL1 β), Angiogenese/Rekanalisation (VEGF, Tie2, Notch) bzw. Fibrose (TGF β) bereits etabliert sind, bestimmen. Anhand der Ergebnisse sollen mögliche neue Biomarker zur objektiven Diagnostik, Verlaufs- und Therapiekontrolle der pAVK diskutiert und daraus resultierende mögliche neue Therapieansätze abgeleitet werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

Dieser Abschnitt gibt einen kurzen Überblick zu den für diese Dissertation wichtigsten Aspekten der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit.

Daten zur Epidemiologie, koinzidenten Erkrankungen, Verlauf und Prognose sollen deren zunehmende Bedeutung darlegen. Um das Krankheitsbild zu vervollständigen, erfolgt abschließend eine Übersicht zu den stadienabhängigen Therapiemöglichkeiten.

2.1.1 Definition

Die pAVK bezeichnet eine verminderte Perfusion der Extremitätenarterien oder der Aorta. Ursache hierfür kann eine stenosierende (inkompletter Verschluss) oder okkludierende (kompletter Verschluss) Gefäßveränderung sein.

Unterschieden werden die Durchblutungsstörungen in eine *chronische* (häufig) und *akute* (selten) Form. Der Fokus dieser Dissertation liegt vor allem auf der *chronischen* pAVK, die in mehr als 95 % der Fälle durch atherosklerotische Gefäßveränderungen [24], wie sie in ähnlicher Weise auch an den Koronararterien oder Zerebralarterien auftreten können, bedingt ist [25]. Weniger häufig (<5 %) sind embolische Verschlüsse (z.B. kardiogen oder arterio-arteriell), entzündliche Gefäßveränderungen oder Traumata ursächlich.

Akute periphere Durchblutungsstörungen sind selten und treten bei akuten embolischen oder atherothrombotischen Verschlüssen, meist auf dem Boden bereits bestehender Gefäßläsionen, auf [26].

Klinisch wird die pAVK in Deutschland anhand ihrer Symptomatik nach der Klassifikation von Fontaine in 4 Stadien eingeteilt. Im angelsächsischen Raum und in der internationalen Wissenschaft hat sich die Rutherford-Klassifikation etabliert, welche die pAVK in 3 Grade bzw. 6 Kategorien unterteilt.

Prinzipiell kann man ein stabiles Stadium der *Claudicatio intermittens* (CI) (Abnahme der schmerzfreien Gehstrecke) von einem instabilen Stadium der kritischen Extremitätenischämie (*critical limb ischemia*: CLI) und zuletzt dem Gewebsuntergang (Amputation) unterscheiden [27].

Fontaine		Rutherford		
Stadium	Klinisches Bild	Grad	Kategorie	Klinisches Bild
I	Asymptomatisch	0	0	asymptomatisch

II a	Gehstrecke > 200 m	I	1	Leichte <i>Claudicatio intermittens</i>
II b	Gehstrecke < 200 m	I	2	Mäßige <i>Claudicatio intermittens</i>
		I	3	Schwere <i>Claudicatio intermittens</i>
III	Ischämischer Ruheschmerz	II	4	Ischämischer Ruheschmerz
IV	Ulkus, Gangrän	III	5	Kleinflächige Nekrose
		III	6	Großflächige Nekrose

Tabelle 1: Klassifikation der pAVK nach Fontaine-Stadien und Rutherford-Kategorien

2.1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

Die pAVK ist eine Erkrankung des zunehmenden Alters, so erkranken selten Menschen vor dem 50. Lebensjahr, jedoch liegt ihre Prävalenz ab einem Alter von 80 Jahren bei ca. 20 % [27]. Grund hierfür ist das vermehrte Auftreten atherogener Risikofaktoren wie z.B. Rauchen, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus mit steigendem Alter. Im Jahr 2010 wurde mithilfe eines systematischen Reviews und mathematischen Methoden die absolute Zahl der pAVK Erkrankungen auf 202 Millionen Menschen geschätzt, mit einer weltweit steigenden Tendenz [27]. Insgesamt steigt die Zahl aller Erkrankten deutlich, mit einem Wachstum von 23 % zwischen 2000 und 2010 [27], so dass die pAVK neben der koronaren Herzkrankheit und zerebrovaskulären Erkrankungen die dritthäufigste Folgeerkrankung der Atherosklerose darstellt [28, 29].

Fast 75 % der Patienten mit pAVK zeigen unabhängig vom Erkrankungsalter keine Symptome [30], was eine genaue Erfassung der Häufigkeit erschwert. Insgesamt weist die Erkrankung eine hohe Dunkelziffer auf [28, 31, 32]. Ein generelles pAVK Screening asymptomatischer Patienten wird nach aktueller Datenlage nicht empfohlen [33].

2.1.3 Diagnostik

Einen hohen Stellenwert in der Diagnostik der pAVK, unabhängig vom Stadium der Erkrankung, hat die Messung des Knöchel-Arm-Index (*Ankle Brachial Index: ABI*). Bei

dieser werden die arteriellen Verschlussdrücke der *A. tibialis anterior* und der *A. tibialis posterior* am liegenden Patienten gemessen. Im Anschluss wird der Quotient aus dem niedrigsten Knöchelarteriendruck und den gemittelten Blutdrücken der Arme gebildet. Ein ABI-Wert von $< 0,9$ beweist das Vorliegen einer pAVK. Dabei gilt die Größe des ABI als Maß für die Schweregrad der Erkrankung (s. Tabelle 2). Bei Patienten mit einer proximalen Gefäßverengung und gut ausgebildeten Kollateralkreisläufen, kann der ABI trotz Gefäßverengung normal bleiben, in diesem Fall bestätigt sein Abfall um $> 20\%$ bei Belastung die Diagnose [34].

Darüber hinaus stellt der ABI einen unabhängigen Indikator für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar [35]. Diesbezüglich besteht eine direkte Korrelation: es gilt je niedriger der ABI, desto höher die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität [36].

ABI-Wert	Schweregrad der pAVK
$> 1,3$	Falsch hohe Werte (Verdacht auf Mediasklerose)
$> 0,9$	Normalbefund
0,75-0,9	Leichte pAVK
0,5-0,75	Mittelschwere pAVK
$< 0,5$	Schwere pAVK

Tabelle 2: ABI Kategorien zur Abschätzung des pAVK-Schweregrads nach der S3 Leitlinie pAVK [26]

Durch die Bestimmung des ABI kann eine Aussage getroffen werden, ob und in welchem Ausmaß ein Gefäßverschluss vorliegt. Für die genaue Lokalisation der Stenosen ist jedoch die farbkodierte Duplexsonographie die Methode der Wahl.

Wenn sich der betroffene Gefäßabschnitt in der Duplexsonografie ausreichend beurteilen lässt, bedarf es für den Beginn einer konservativen Therapie keiner weiteren Diagnostik. Bei ungenügender Aussagekraft der Duplexsonografie können MR-Angiografie, CT-Angiografie oder die digitale Subtraktionsangiographie als weitere Diagnostik herangezogen werden.

Bei einer diagnostizierten pAVK ist es wichtig, die klinischen Beschwerden zu objektivieren und regelmäßige Verlaufskontrollen durchzuführen. Hierzu ist bei Patienten mit *Claudicatio intermittens* neben der Messung des ABIs auch eine Untersuchung der Gehfähigkeit der Patienten erforderlich. Diese kann z.B. bei einer Laufbanduntersuchung mit 3,2 km/h bei 10-12 % Steigung erfolgen (*Constant Load Protokoll*). Hierbei werden die Gehstrecke bis zum Auftreten von CI, die Gesamtgehstrecke und -zeit sowie der Knöcheldruck nach Belastung erfasst.

2.1.4 Therapie

Das Therapiekonzept der pAVK beinhaltet abhängig vom Stadium der Erkrankung und den subjektiven Beschwerden der Patienten konservative, medikamentöse, interventionelle und chirurgische Ansätze. Auch die Therapieziele sind stadienabhängig. Während im Stadium I nach Fontaine die Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren im Vordergrund steht, liegt der Fokus bei Fortschreitung der Erkrankung auf der Besserung der schmerzfreien Gehstrecke (Stadium II nach Fontaine) und der Extremitätenerhaltung (Stadium III und IV nach Fontaine).

2.1.4.1 Asymptomatische pAVK

Eine wichtige Therapiesäule für alle Krankheitsstadien der pAVK stellt die Reduktion bzw. Behandlung kardiovaskulärer Risikofaktoren dar, was sich nicht nur positiv auf die Progression der Erkrankung auswirkt, sondern auch zu einer Senkung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität insgesamt beiträgt. Zu den therapierbaren Risikofaktoren zählen vor allem das Übergewicht, der Nikotinkonsum, die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus und die Hypercholesterinämie [37-45].

Weiterhin wird zur Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse der Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern (Acetylsalicylsäure (ASS) oder Clopidogrel) sowie Statinen [46-48] ab Stadium I nach Fontaine empfohlen. Revaskularisierende Maßnahmen sind nach aktuellen Leitlinien bei asymptomatischer pAVK nicht indiziert [26].

2.1.4.2 Claudicatio intermittens (CI)

Neben den bereits dargestellten Maßnahmen zur Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren ist die wichtigste Säule zur Therapie der CI das strukturierte Gehtraining (*supervised exercise training*: SET) [49, 50]. Dies ist ein auf die individuelle Belastbarkeit der Patienten zugeschnittenes Training, welches unter ärztlicher und physiotherapeutischer Aufsicht durchgeführt wird. Studien konnten belegen, dass ein konsequent durchgeführtes SET (mindestens 3x wöchentlich für 30-60 Minuten über mindestens 3 Monate) wesentlich zu einer Zunahme der Gehstrecke auf dem Laufband und einer Minderung der CI Beschwerden beiträgt [51-53]. So konnte bei Patienten mit CI eine Steigerung der Gehstrecke um ca. 200 % innerhalb von 2 Wochen erzielt werden [54]. Neben der erhöhten schmerzfreien Gehstrecke zählen zu den Erfolgen der SET vor allem fallende Entzündungsmarker, eine verzögerte Krankheitsprogredienz und eine Verbesserung der Gefäßneubildung [55] sowie der Lebensqualität [56].

Auch Statine, welche primär zur Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen bei pAVK Patienten eingesetzt werden, haben zu einer signifikanten Verlängerung der schmerzfreien Gehstrecke bei Patienten mit CI beigetragen [57-59].

2.1.4.3 Revaskularisierende Verfahren

Revaskularisierende Maßnahmen, endovaskulär oder offen chirurgisch, stellen eine symptomatische Therapie der CI Beschwerden dar, dennoch bleibt mit der Atherosklerose die Ursache der Erkrankung weiterhin bestehen. Bei asymptomatisch Erkrankten ist diese Art der Therapie nicht anzuwenden, und auch bei CI Patienten sollte eine strenge Indikationsstellung erfolgen, da das Langzeitergebnis einer Revaskularisation nicht signifikant besser ist, als das einer konservativen Therapie kombiniert mit SET [60, 61].

Die Entscheidung für eine interventionelle Therapie soll daher interdisziplinär und angepasst auf die individuellen Erkrankungsumstände erfolgen. Trotz dieser Empfehlungen einer strengen Indikationsstellung werden revaskularisierende Interventionen im klinischen Alltag immer häufiger angewendet, ohne vorher die konservativen Therapiemöglichkeiten auszuschöpfen [62, 63].

Bei einer CLI (ab Stadium III nach Fontaine) ist das Ziel der Therapie eine zeitnahe Reperfusion der extremitätenversorgenden Arterien, um einer Amputation vorzubeugen und Wunden zum Abheilen zu bringen. Revaskularisierende Maßnahmen sollen so schnell wie möglich durchgeführt werden und können interventionell (z.B. *Stent*) oder operativ (z.B. *Bypass*) erfolgen, wobei sowohl Ort, Länge und Komplexität der Läsion als auch individuelle Risiken und Präferenzen der Patienten für die Art der Therapie entscheidend sind. Zudem ist im Anschluss an eine Revaskularisation nach Abheilen der Wunden eine Kombination mit einer SET anzustreben [61].

Maßnahme	Fontaine Stadium			
	I	II	III	IV
Beeinflussung von Risikofaktoren Nikotin, Diabetes, Lipide, RR	+	+	+	+
Thrombozytenaggregationshemmer	(+)	+	+	+
Physikalische Therapie Strukturiertes Gehtraining	+	+		
Interventionelle Therapie		+*	+	+
Operative Therapie		+*	+	+

*Tabelle 3: Übersicht der stadiengerechten Behandlung der pAVK in Abhängigkeit der Stadien nach Fontaine I-IV nach der S3 Leitlinie pAVK [26], + Empfehlung, * bei hohem individuellen Leidensdruck und geeigneter Gefäßmorphologie*

Trotz der vorhandenen Übersterblichkeit ist es vielfach belegt, dass die pAVK im Vergleich zu anderen kardiovaskulären Erkrankungen deutlich untertherapiert ist. So zeigt die getABI Studie, dass zwei Drittel der Patienten mit KHK, aber nur die Hälfte der Patienten mit pAVK einen Thrombozytenaggregationshemmer als Sekundärprophylaxe erhielten

[67]. Aktuelle Daten zeigen, dass die Mortalität bei pAVK Patienten durch ein multimodales Therapiekonzept gesenkt werden kann. In Hausarztpraxen wurden in den letzten Jahren vermehrt Thrombozytenaggregationshemmer, Statine und ACE-Inhibitoren verschrieben [68, 69] und die Optimierung klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren rückte in den Europäischen [70] und U.S. Leitlinien [71] mehr in den Vordergrund. Mit diesen Fortschritten bezüglich der Sekundärprävention stellt sich die Frage, ob Biomarker dazu beitragen könnten, das Restrisiko für kardiovaskuläre Ereignisse zu minimieren.

2.1.5 Verlauf und Prognose

Bei Patienten mit CI Beschwerden bleiben die Symptome in 50 % stabil, in 25 % verschlechtert sich die schmerzfreie Laufstrecke weiter [72]. Die CLI ist mit 2 % eine vergleichsweise seltene Komplikation [73].

Insbesondere muss in allen Erkrankungsstadien aber das Augenmerk auf die zerebralen und kardialen Ereignisse gerichtet werden. Häufig weisen Erkrankte weitere atherosklerotische Läsionen in den koronaren oder zerebralen Gefäßsystemen auf. Ein ABI < 0,9 ist mit einer mehr als doppelt so hohen 10-Jahres Rate von koronaren Ereignissen, kardiovaskulärer und totaler Mortalität assoziiert [74]. Innerhalb von 5 Jahren erleiden 20 % der Patienten mit CI-Beschwerden einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall, die 5-Jahres Mortalität liegt bei 10-15 % [75]. So wird die Prognose der Patienten maßgeblich von kardialen und zerebralen Ereignissen bestimmt. Es kommt eher selten zu einer Progression zur CLI [76].

Insgesamt zeigen weltweite Gesundheitsdaten, dass pAVK Patienten vor allem in Bezug auf ihr erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Begleiterkrankungen, das auch bei Reduktion ihrer kardiovaskulären Risikofaktoren häufig bestehen bleibt [77], aktuell immer noch nicht ausreichend behandelt werden [78].

2.2 Endothelfunktion und -dysfunktion und ihre Bedeutung für Atherosklerose, Thrombose und Angiogenese

Wie oben bereits erwähnt, sind atherosklerotische Gefäßwandveränderungen das pathologische Korrelat der pAVK und ihre Entstehung soll daher hier kurz skizziert werden. Das Frühstadium der Atherosklerose ist durch eine Endotheldysfunktion gekennzeichnet, die unter anderem durch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen sowie pro- und antithrombotischen Mechanismen gekennzeichnet ist [79].

2.2.1 Pathomechanismus der Atherosklerose - Response-to-Injury-Hypothese

Russell Ross, amerikanischer Professor der Pathologie, war einer der ersten, der sich mit der Pathogenese der Atherosklerose auseinandersetzte. Bereits 1973 postulierte er die *Response-to-Injury*-Hypothese, welche in weiterentwickelter Form bis heute als Erklärungsmodell der Erkrankung dient.

Ross beschreibt die Atherosklerose weniger als eine für sich allein stehende Erkrankung, sondern vielmehr als einen Prozess, der die Hauptursache für viele kardiovaskuläre Erkrankungen wie z.B. den Myokardinfarkt oder die pAVK darstellt. Unter normalen Umständen ist sie als schützende Zellantwort auf Verletzungen des Endothels, die Zellen, welche die innerste Schicht der Blutgefäße auskleiden und die sogenannte Intima bilden, anzusehen. Ausgeprägte atherosklerotische Läsionen hingegen, die zu einem krankhaften Prozess fortschreiten können, resultieren aus einer exzessiven inflammatorischen Reaktion auf verschiedene Formen der Zellschädigung [80].

Grundlage der *Response-to-Injury*-Hypothese ist eine durch atherosklerotische Risikofaktoren (z.B. chronische Hyperlipidämie, chemische und mechanische Faktoren, Infektionen) hervorgerufene Intimaläsion (*Injury*). Letztere geht mit einer Endotheldysfunktion einher und führt zur vermehrten Durchlässigkeit und nachfolgenden Einlagerung von Lipoproteinen in die Arterienwand [81]. Weiterhin führt eine verstärkte Expression von Glykoproteinen auf den Endothelzellen zur Anlagerung von Monozyten und T-Lymphozyten. Durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren und Chemokinen, welche von dem veränderten Endothel freigesetzt werden, migrieren die angelagerten Immunzellen zwischen die Endothelzellen in die Gefäßwand [3-5, 82]. Unter der Wirkung von oxidiertem Low-Density Lipoprotein (oxLDL) werden aus Monozyten aktivierte Makrophagen. Durch die Einlagerung von Lipiden entwickeln sich diese zu Schaumzellen und bilden gemeinsam mit den umliegenden Lymphozyten die sogenannten „*fatty streaks*“, welche die frühesten erkennbaren Läsionen der Atherosklerose darstellen [6-9, 83]. Weitere Zelleinwanderung und Proliferation führt schließlich zur Bildung komplexer, okklusiver Läsionen, den „fibrösen Plaques“. Diese gewinnen mit der Zeit an Größe, ragen in das Lumen der Gefäße und beeinträchtigen so den Blutfluss. Sie sind von Bindegewebe bedeckt und bestehen aus lipidreichen und nekrotischen Zelltrümmern. Besonders der Rand der bindegeweblichen Bedeckung ist den größten Scherkräften ausgesetzt und neigt zum Einreißen, was Einblutungen in die Plaques, Thrombenbildung (Atherothrombose) und Arterienverschlüssen zur Folge haben kann [10].

2.2.2 Die Wirkung von Endothelzellen auf die Thrombozytenaktivierung und Blutgerinnung / Funktion von Thrombin

Endothelzellen bilden die innere Zellauskleidung von Blutgefäßen und spielen eine wichtige Rolle bei der Hämostase, Regulation von Gefäßtonus sowie der Gewebepfusion. Es ist vielfach wissenschaftlich belegt, dass eine endotheliale Dysfunktion, bei der all jene Funktionen gestört sind, die Grundlage für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Bluthochdruck, die koronare Herzkrankheit oder pAVK darstellt.

Gesunde Endothelzellen exprimieren negativ geladene Heparansulfat-Proteoglykane, welche die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten kontrollieren [84]. Die Interaktion von Thrombozyten mit den Endothelzellen führt zur Freisetzung von Prostazyklin I_2 und Prostaglandin E_2 , zwei Thrombozytenantagonisten [85]. Ein weiterer Weg der Endothelzellen, die Gewebepfusion zu verbessern und einer übermäßigen Thrombozytenaktivierung und -adhäsion entgegenzuwirken, ist die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) [86, 87]. NO, das von der endothelialen NO-Synthase produziert und freigesetzt wird, bewirkt über die Aktivierung der Guanylatcyclase eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen, und die dadurch erzielte Vasodilatation trägt zu einer Reduktion der akuten Folgen eines thrombotischen Gefäßverschlusses und des Ischämiebedingten Gewebeschadens bei [88].

Zudem verhindert das Endothel eine überschüssige Thrombin-Generation. Thrombin ist ein wichtiges Schlüsselenzym der Blutgerinnungskaskade, das sowohl pro- als auch antikoagulatorische Wirkungen besitzt. Es katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, welches sich zu unlöslichen Fibrinpolymeren zusammenlagert und einen Thrombus bildet. Zudem aktiviert es die Gerinnungsfaktoren V, VIII, XI und XIII. Weiterhin wird die prokoagulatorische Wirkung von Thrombin auf das Endothel durch den Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR1) vermittelt [89]. Die Aktivierung von PAR1 auf Endothelzellen durch Thrombin induziert unter anderem die Freisetzung des von Willebrand Faktors (vWF) [90]. Der vWF ist ein prokoagulatorisch wirkendes Glykoprotein, das seine Wirkung zum einen durch die Initiierung der Thrombozytenadhäsion und zum anderen durch Schutz des Faktor VIII vor Proteolyse entfaltet. Die Aktivierung des PAR1 Signalwegs über den EPCR/APC (*Activated Protein C*: APC) Komplex führt hingegen zu antikoagulatorischen und zytoprotektiven Effekten [13] (s.1.4.1).

Die antikoagulatorische Wirkung von Thrombin wird vor allem durch Thrombomodulin und Protein C (PC) vermittelt. Thrombomodulin, das an EPCR der Endothelzellen gebunden ist, bindet die Serinprotease Thrombin und verändert dadurch Thrombins

Substratspezifität von der Fibrinogenspaltung zu einer verstärkten Aktivierung von Protein C. APC wirkt antikoagulatorisch, indem es die Gerinnungsfaktoren FVa und FVIIIa durch Proteolyse inaktiviert [11, 12]. Durch negative Rückkopplung kommt es zudem zur Inhibierung der Thrombingeneration [91].

Die Inaktivierung von endothelialem Thrombomodulin, z.B. als Reaktion auf einen Überschuss von $\text{TNF}\alpha$, trägt zur verstärkten Blutgerinnung und Thrombusbildung bei [92]. Moore KL et al. konnten zeigen, dass bei Patienten mit ST-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI) die Plasmaspiegel von gelöstem (und damit inaktivem) Thrombomodulin erhöht waren [93]. Für sEPCR (s. 1.4.1), welches Thrombomodulin bindet und daher maßgeblich an dessen antikoagulatorischen Wirkung beteiligt ist, gibt es diesbezüglich noch keine Studiendaten.

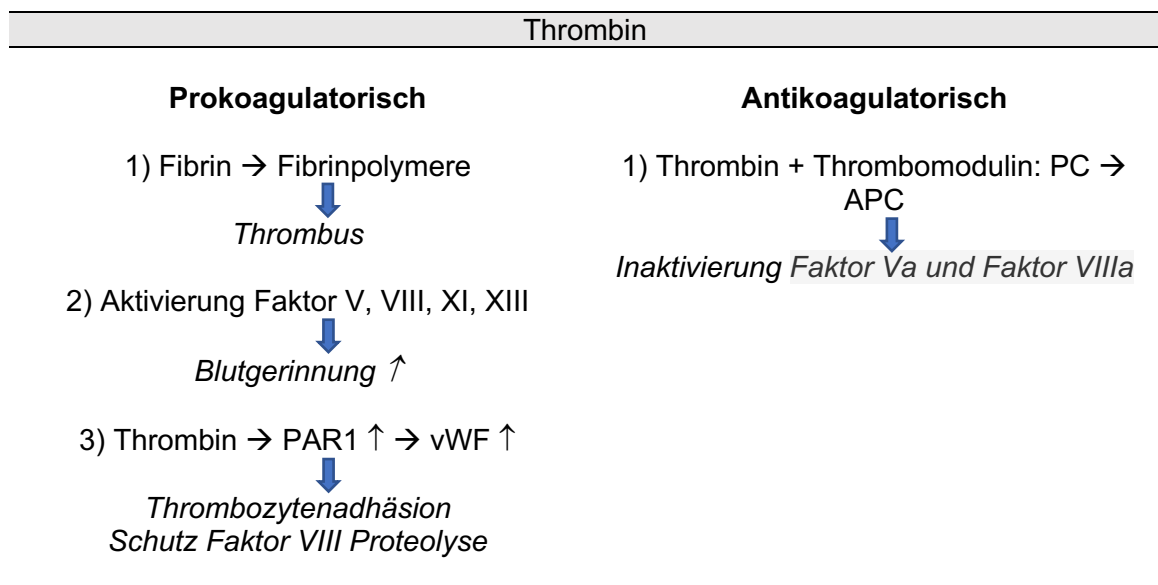


Abbildung 1: Pro- und antikoagulatorische Wirkungen von Thrombin

2.2.3 Endothelzellen und Gefäßneubildung (Neoangiogenese)

Die akute oder chronische Obstruktion von arteriellen Blutgefäßen bewirkt lokale Gewebeischämie und bildet die Grundlage der typischen CI Beschwerden bei pAVK Patienten. So stellt die Wiederherstellung der Perfusion das wichtigste Therapieziel dar, was zum einen durch eine endovaskuläre Revaskularisierung des verengten Gefäßabschnitts, zum anderen durch die Förderung der Neubildung (kollateraler) Blutgefäße und Umgehungskreisläufe erzielt werden kann. Für letztere bilden Endothelzellen einen essenziellen Bestandteil, die neben den oben beschriebenen antikoagulatorischen (s. 2.3.1) vor allem durch ihre Angiogenese-fördernden Eigenschaften Einfluss auf die Wiederherstellung des Blutflusses nehmen.

Unter der Wirkung von Wachstumsfaktoren, die nach Thrombozytenaktivierung oder im Rahmen von Hypoxie verstärkt von aktivierten Endothelzellen freigesetzt werden [94], [95], unterstützen sie die Bildung neuer Blutgefäße. Dieser Mechanismus spielt auch für die Revaskularisation von Thromben im venösen System eine wichtige Rolle: So bewirkte ein Gefäßverschluss der Vena cava inferior und die damit einhergehende Hypoxie eine vermehrte Expression des proangiogenetischen Transkriptionsfaktors HIF1 α und des *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), während die Hemmung von VEGF oder seines Rezeptors die Auflösung venöser Thromben verlangsamte [96]. Auch eine Ischämiebedingte verstärkte parakrine Stimulation von benachbarten Endothelzellen soll zur Formation neuer Gefäße beitragen [97].

Weiterhin untersuchten mehrere Studien das Potential Endothelialer Progenitorzellen (*endothelial progenitor cells*: EPCs), die Revaskularisierung nach arterieller Gefäßschädigung zu verbessern. So wurden EPCs vermehrt an Orten der Neovaskularisierung rekrutiert, wie z.B. im ischämischen Skelettmuskel oder Myokard, wo sie sich in Endothelzellen differenzierten, woraufhin ihnen eine Rolle bei der postnatale Vaskulogenese zugeschrieben wurde.

Neuste Erkenntnisse der eigenen Arbeitsgruppe beschreiben außerdem einen im Rahmen des EPCR-PAR1 Signalwegs vermittelten Einfluss von endotheliale NO auf die Neovaskularisierung und Störungen dieses Pathomechanismus bei Patienten mit pAVK [98] was die Bedeutung von Endothelzellen und ihr mögliches Potential für die Verbesserung der therapeutischen Angiogenese weiter unterstreicht (s. 2.4.1).

2.3 Endothelialer-Protein-C-Rezeptor (EPCR)

2.3.1 Endothelialer-Protein-C-Rezeptor (EPCR) Signalweg und Aktiviertes Protein C (APC)

EPCR ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches vornehmlich auf Endothelzellen großer Gefäße exprimiert wird [99]. Die Hauptfunktion des Rezeptors besteht darin, seinen Liganden die Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (*protease-activated receptors*: PARs), vornehmlich PAR1, zu ermöglichen. Dadurch kann EPCR ligandenabhängig sowohl zytoprotektive als auch inflammatorische Effekte vermitteln. Seine Aktivierung erfolgt durch die Proteasen Thrombin und APC, welche den extrazellulären N-Terminus des Rezeptors abspalten und dadurch eine Proteindomäne freilegen, die als gebundener Ligand (*tethered ligand*) fungiert [100]. Mosnier et al. führten die unterschiedliche Wirkweisen EPCRs darauf zurück, dass PAR1 zwei verschiedene Spaltstellen besitzt: eine kanonische Arg41 Spaltstelle für Thrombin, die durch die Aktivierung von G-Proteinen und RhoA sowie die Induktion des MAPK Signalwegs

inflammatorische und die Endothelbarriere störende Effekte bewirkt, und eine nicht-kanonische Arg46 Spaltstelle, an welche ausschließlich APC binden kann und die zur Aktivierung des zytoprotektiven β -arrestin-2 Signalwegs führt [101] und antiinflammatorische, antiapoptotische und endothelprotektive Aktivitäten [102-108] zur Folge hat.

EPCR hat somit eine wichtige Schlüsselfunktion in dem durch APC vermittelten zytoprotektiven Signalweg von PAR1, welcher unabhängig von APCs antikoagulatorischer Wirkung ist. Für die Aktivierung von PC bindet dieses gemeinsam mit Thrombin und Thrombomodulin (s. 2.3.1) an EPCR und vermittelt neben den genannten antikoagulatorischen Wirkungen (s. 2.3.1), die es nach der Dissoziation von EPCR entfaltet, zusätzlich zytoprotektive Signalkaskaden durch die bestehende Bindung an EPCR [109].

Neueste Erkenntnisse im Mausmodell legen einen weiteren APC unabhängigen Stellenwert des Rezeptors und seiner nachfolgenden Signalkaskaden für die Neoangiogenese bei arterieller Ischämie nahe. So zeigten Daten der eigenen Arbeitsgruppe, dass Ischämie eine verstärkte Expression des Rezeptors zur Folge hatte, während die Deletion von EPCR-PAR1 im Mausmodell zu einer reduzierten postischämischen Reperfusion und Angiogenese führte [98]. Als ursächlich für diese Effekte konnte eine aus dem Defekt der EPCR-PAR1 Signalkaskade resultierende vermehrte Hämoglobin-Expression in Endothelzellen gezeigt werden, welche ein verstärktes Hb-vermitteltes NO *Scavenging* bewirkte. Verminderte Angiogenese und verstärkte Fibrosebildung waren die Folge. Weiterhin konnte durch die Gabe eines NO-Donors (DETA-NO) die angiogenetischen Eigenschaften von Endothelzelle in vitro gefördert werden, wohingegen NO *Scavenging* die Expression mesenchymaler Marker auf Endothelzellen von Mensch und Maus verstärkte [98]

2.3.2 EPCR *Shedding* und sEPCR

Neben endothelgebundenem EPCR zirkuliert auch eine lösliche Form des Rezeptors (sEPCR) im Blutplasma [110]. Die Abspaltung wird durch eine Metalloprotease [111], [112], vermutlich *A disintegrin and metalloprotease 17* (ADAM17) [18], vermittelt, obwohl nicht auszuschließen ist, dass an diesem Prozess noch andere Proteasen oder Membranproteine beteiligt sind [113].

Auch wenn der EPCR Signalweg in den letzten Jahren intensiv beforscht wurde, ist bisher wenig über das *Shedding* und die Funktion des gelösten Rezeptors bekannt. So weiß

man, dass der Prozess des EPCR Sheddings kontinuierlich stattfindet und durch Thrombin oder inflammatorische Zytokine ($\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL1}\beta$) [113-115] verstärkt wird. Zudem moduliert sEPCR die Entzündungsaktivität durch die Bindung an neutrophile Granulozyten [116, 117]. Im Falle von hohen sEPCR Spiegel verbleibt weniger EPCR auf den Endothelzellen, woraus theoretisch eine geringere PC Aktivierung und damit eine vermehrte prokoagulatorische Aktivität resultiert. Zusätzlich behält sEPCR seine Bindungsaffinität zu PC/APC bei [118], in hohen Konzentrationen konkurriert es daher mit membrangebundenen EPCR um die PC Bindung, was die PC Aktivierung zusätzlich verringert.

Passend dazu wiesen Patienten mit gesteigerter Thrombingeneration im Rahmen einer Koronararterienkrankung erhöhte sEPCR Spiegel auf [116, 119], während bei Patienten unter antikoagulatorischer Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten niedrigere sEPCR Spiegel vorlagen [117].

Diese Daten legen nahe, dass sEPCR eine prokoagulatorische Rolle einnimmt, indem es antithrombotische und antiinflammatorische Effekte reduziert. Dennoch sind die Daten zu den sEPCR Plasma Spiegel und einem verstärkten Risiko für thrombotische Erkrankungen gering und oftmals widersprüchlich. So zeigten Uitte de Willige et al., dass erhöhte sEPCR Spiegel mit einem erhöhten Risiko für eine venöse Thrombose einhergehen [120], wohingegen eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie zeigte, dass Patienten mit erhöhten sEPCR Spiegel ein reduziertes Risiko für einen Myokardinfarkt aufwiesen [121]. In Bezug auf die pAVK unterlegen eigene Daten die Wichtigkeit des membrangebundenen Rezeptors in Bezug auf die ischämische bedingte arterielle Neovaskularisierung [98], welche Rolle die lösliche Form des Rezeptors in Bezug auf die pAVK darstellt, ist bisher jedoch ungeklärt.

2.4 Andere potentielle Biomarker der pAVK

2.4.1 Biomarker für Endothelfunktion (E-Selectin) und Inflammation (hsCRP, $\text{TNF}\alpha$ und Interleukin1 β)

Der bei einer pAVK bestehende chronische Entzündungsprozess wird durch im Blut zirkulierende Immunzellen, die in das Gewebe einwandern, hervorgerufen und aufrechterhalten. Diese Einwanderung wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und Endothelzellen gesteuert. [122, 123]. Eine für das Endothel sehr spezifische Adhäsionsmolekül ist **E-Selectin**, welches von aktivierten Endothelzellen freigesetzt wird. Nach seiner Freisetzung bindet E-Selectin locker an die im Blut zirkulierenden Leukozyten und steuert diese in Richtung Endothel, wo sie langsam

auf dessen Oberfläche „entlangrollen“ [124, 125]. ICAM1 (*intercellular adhesion molecule*) und VCAM1 (*vascular adhesion molecule-1*), weitere Adhäsionsproteine auf der Oberfläche von Endothelzellen, interagieren mit Integrinen auf der Oberfläche der Leukozyten und bewirken deren feste Bindung an die Endotheloberfläche [124, 126]. Sobald diese feste Bindung erfolgt ist, transmigrieren die Leukozyten vom Blut in die Arterienwand [122].

Für die koronare Herzerkrankung konnte in mehreren Studien bereits gezeigt werden, dass im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen vermehrt endotheliale Adhäsionsmoleküle im Blut zirkulieren [127, 128]. Außerdem stellen erhöhte E-Selectin Werte bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung einen negativen prognostischen Marker bezüglich des Todes aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse dar [128, 129]. Auch bei scheinbar gesunden Menschen ist eine Erhöhung von endothelialen Adhäsionsmolekülen mit einem erhöhten Risiko für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert [125, 130, 131]. Eine positive Korrelation konnte für E-Selectin und die kardiovaskulären Risikofaktoren BMI, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyzeride und Raucherjahre (*pack years*) gezeigt werden. Ein signifikant negativer Zusammenhang stellte sich für die körperliche Aktivität dar [130].

Salvatore Santo Signorelli et al. konnten zeigen, dass auch bei pAVK Patienten ($ABI < 0,9$) signifikant erhöhte E-Selectin Werte im Vergleich zu gesunden Probanden ($1,4 > ABI > 0,9$) vorliegen. Ihr Vorschlag, E-Selectin als einen möglichen Screening Parameter für eine pAVK zu etablieren, fand allerdings bis heute keine Verwirklichung [132]. Eine weitere Studie belegt, dass strukturiertes Gehtraining für einen Zeitraum von 8 Wochen die Plasmaspiegel von E-Selectin signifikant reduziert [133].

Neben E-Selectin sind auch die Inflammationsmarker $TNF\alpha$ und *high sensitive C-reactive protein* (hsCRP) mit atherosklerotischen Erkrankungen assoziiert. $TNF\alpha$ wird als eines der ersten Zytokine in der Signalkaskade aktivierter Makrophagen freigesetzt und ist an nahezu allen Entzündungsreaktion im menschlichen Körper beteiligt. Daher gilt $TNF\alpha$ als unspezifischer Entzündungsmarker, der auch in einer Kohortenstudie mit 80 pAVK Patienten eine signifikante Erhöhung von $TNF\alpha$ ($p < 0,0001$) im Vergleich zu 72 gesunden Vergleichsprobanden aufwies [133]. Neben $TNF\alpha$ gilt auch **hsCRP** als Indikator atherosklerotischer Erkrankungen, welcher, anders als die meisten Entzündungsparameter bereits mit einer subklinischen atherosklerotischen Erscheinungsbildern, wie bspw. einer erhöhten Intima-Media Dicke der Carotiden assoziiert ist. So zeigen Ridker PM et al., dass hsCRP den stärksten Prädiktionsmarker

für kardiovaskuläre Erkrankung sowie die pAVK darstellt. Weiterhin wird diskutiert, inwieweit erhöhte hsCRP Werte mit einem verstärkten Risiko für eine Plaque-Ruptur einhergehen [133].

Interleukin1 β nimmt eine weitere zentrale Rolle bei der atherosklerotischen Entzündungsreaktion ein, wobei es je nach Stadium der Erkrankung unterschiedliche Wirkungen entfaltet.

IL1 β wird u.a. von den Schaumzellen freigesetzt, was die Entstehung *früher* atherosklerotischer Plaques fördert. So gilt der Biomarker als ein potenter Induktor der ICAM-1 und VCAM-1 Expression, wodurch die Einwanderung von inflammatorischen Zellen wie Monozyten und neutrophilen Leukozyten in die Gefäßwand begünstigt und die Entstehung atherosklerotischer Läsionen gefördert wird [134]. Kiri et al. zeigten, dass Mäuse, denen IL1 β fehlte, kleinere atherosklerotische Läsionen aufwiesen [135]. Eine weitere Art der Freisetzung von IL1 β erfolgt durch das NLRP3 Inflammasom, einen Multiproteinkomplex, der über die Aktivierung von Caspase 1 zur Ausschüttung von IL1 β führt [135]. Cholesterinkristalle in frühen atherosklerotischen Läsionen aktivieren das NLRP3 Inflammasom und begünstigen somit die Ausschüttung von IL1 β [136, 137].

Im Gegensatz dazu, lassen aktuelle Studien vermuten, dass IL1 β positive Effekte auf eine *fortgeschrittene* pAVK hat. Mäuse mit stark vorangeschrittener pAVK wurden mit IL1 β Antikörpern behandelt, was eine signifikante Reduktion glatter Muskelzellen und Kollagen sowie eine steigende Zahl an Makrophagen in den fibrösen Läsionen zur Folge hatte [138]. So vermutet man, dass sich IL1 β schädlich auf die Entstehung und Progression, aber vorteilhaft auf die fortgeschrittene pAVK auswirkt.

In der Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Studie (CANTOS) wurde Canakinumab, ein monoklonaler Antikörper gegen IL1 β , an Patienten mit bereits stattgehabtem Myokardinfarkt, getestet. Die Gabe von 150 mg Canakinumab führte zu einer signifikanten Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen und gleichzeitig einer Reduktion von hsCRP und IL-6 [139, 140]. Die Produktion dieser beiden Moleküle wird durch IL1 β induziert und beide sind mit einem erhöhten Risiko zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert [141, 142].

Bei pAVK Patienten hingegen hatte Canakinumab in einer randomisierten, Plazebo-kontrollierten Studie keinen Einfluss auf die Plaquegröße, die schmerzfreie und maximale Gehstrecke konnten durch die Antikörpertherapie jedoch verbessert werden [143].

2.4.2 Biomarker für Angiogenese (VEGF, Tie2 und Notch) und Fibrose (TGF β)

Rekanalisierende Maßnahmen im Rahmen einer pAVK werden immer häufiger eingesetzt, dennoch gibt es eine große Anzahl von Patienten, die z.B. aufgrund von Komorbiditäten ungeeignet für eine perkutane oder operative Rekanalisationsmaßnahme sind. Daher gewinnen alternative Therapiemethoden bei Patienten mit CLI immer mehr an Bedeutung, wobei hier vor allem die therapeutische Induktion/Förderung der Angiogenese zu nennen ist.

VEGF hat chemotaktische und mitogene Wirkung auf vaskuläre Endothelzellen [144], [145] und spielt als einer für die Angiogenese mit Abstand wichtigster Wachstumsfaktor eine essentielle Rolle bei natürlichen rekanalisierenden Prozessen. Infolge von Ischämie initiiert das Endothel die Wiederherstellung seiner eigenen Integrität. Dabei kommt es zur Freisetzung von angiogenetischen Wachstumsfaktoren, wie VEGF oder Angiopoietin-1, aber auch anti-angiogenetischen Faktoren, wie Angiopoietin-2.

Im arteriellen Gefäßsystem wird VEGF bereits als Therapiemittel eingesetzt um die Neovaskularisierung im ischämischen Gewebe zu fördern [146, 147]. In der VIVA Studie wurden 178 Patienten mit stabiler Angina pectoris, die Kontraindikationen für eine standardmäßige koronare Revaskularisierung (PTCA) aufwiesen, im Rahmen einer „therapeutischen Angiogenese“ mit rekombinantem VEGF (rhVEGF) therapiert. Unter dieser Therapie kam es zu einer signifikanten Reduktion der Angina pectoris Beschwerden [148].

Für den Einsatz von VEGF zur Behandlung einer pAVK gibt es hingegen bisher wenig Evidenz. Iris Baumgartner et al. nutzen den intramuskulären Gentransfer von Plasmid DNA, welche für VEGF kodiert, um dessen therapeutischen Effekt bei 10 Patienten mit kritischer Extremitätenischämie zu zeigen. Hierbei kam es zu einer signifikanten Steigerung des ABI, neuen sichtbaren kollateralen Blutgefäßen in der Angiografie bei 7 von 10 Patienten und in 8 Fällen zu einem verbesserten Blutfluss in den Extremitäten [149]. Trotz dieser erfolgsversprechenden Ergebnisse zeigte eine darauffolgend durchgeführte RAVE Phase-II-Studie an 105 Patienten mit CLI und intramuskulärer adVEGF121 Therapie keinen Unterschied zwischen Placebo und Verum bezüglich der maximalen Gehstrecke und Lebensqualität [150]. Somit bedarf es weiterer klinischer Studien, um mögliche Langzeitschäden, die optimale Dosierung sowie alternative Applikationsmethoden besser beurteilen zu können.

Einen weiteren wichtigen Signalweg für die Angiogenese stellt das *Angiopoietin-Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains* (Ang-Tie) System dar.

Angiopoietine sind Wachstumsfaktoren, die an endotheliale *Tunica Interna Endothelial Cell Kinase (Tie) Rezeptoren* (am besten erforscht ist Tie2) binden und dadurch das Wachstum von Blut- und Lymphgefäßen, die Gefäßpermeabilität und Inflammation beeinflussen. So zeigen aktuelle Studien, dass Angiopoetin1 (Ang1) das Endothel von Blutgefäßen stabilisiert [151], indem es die angiogenetische Zellantwort und Fibrosebildung limitiert [152] und anti-inflammatorische Funktionen vermittelt [153]. Sein Gegenspieler Angiopoetin2 (Ang2) hingegen fördert insbesondere in ischämischen Geweben vaskuläre Plastizität [154], Gefäßneubildung und laut neusten Erkenntnissen auch Inflammation [155, 156], wobei seine Funktion kontextbezogen zu variieren scheint. Die meisten therapeutischen Strategien in Bezug auf das Ang-Tie System fokussieren sich auf die Blockade der Bildung neuer pathologischer Blutgefäße bei Tumor- oder Augenerkrankungen [157, 158].

Während die meisten Studien sich vor allem auf die autokrinen Effekte, die Ang2 über den endothelgebundenen Tie2 Rezeptor vermittelt, auseinandersetzen, zeigt die aktuelle Literatur zudem parakrine Effekte des Wachstumsfaktors. So wirkt Ang2 als chemischer Lockstoff auf **Tie2** exprimierende Monozyten (TEM) [159, 160]. TEMs werden durch Hypoxie/Ischämie sowie proangiogenetische Zytokine (z.B. VEGF oder Ang2) aktiviert [159, 160]. Zudem wirken sie durch die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen, welche das Immunsystem unterdrücken, antiinflammatorisch [161]. Jörn F. Dopheide et al. untersuchten die Menge der zirkulierenden TEMs in Abhängigkeit des pAVK Stadiums. Die Autoren konnten zeigen, dass im Blut von CLI Patienten (Fontaine 3 und 4) im Vergleich zu anderen weniger fortgeschrittenen Krankheitsstadien die größten Mengen von Entzündungsmarkern (z.B. *C-reactive protein*: CRP), jedoch am wenigsten Tie2 vorlag. Nach durchgeführten Rekanalisationsmaßnahmen konnten sie einen signifikanten Anstieg von Tie2 im Blut feststellen, was eine mögliche Relevanz dieses Parameters zur Therapiekontrolle nahelegt [162]. Daraus schlossen sie, dass Gewebshypoxie zwar einen der stärksten Stimuli der TEMs darstellt, eine über einen längeren Zeitraum persistierende chronische Inflammation jedoch zu deren Verminderung führt. Weniger starke Inflammation hingegen könnte eine stärkere Expression von TEMs und damit vermehrte Angiogenese zur Folge haben. So spielt Inflammation vermutlich eine Doppelrolle bei der Pathogenese der pAVK, abhängig von der Dauer und Intensität des Entzündungsstadiums.

Auch das Transmembranprotein **Notch**, welches eine Zell-Zell-Interaktion benachbarter Zellen ermöglicht und dadurch Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose moduliert [163], ist ein essenzieller Bestandteil angiogenetischer Signalwege. Diese Funktion ist zum einen durch seine direkte Interaktion mit proangiogenetischen Liganden wie Delta-

like Ligand 4 (DLL4) [17], zum anderen durch dessen indirekte Wechselwirkungen mit dem VEGF Rezeptor zurückzuführen [164, 165]. Zudem hat der Notch Signalweg einen wichtigen Stellenwert bei der Arteriogenese, also der Bildung von kollateralen Arterien ausgehend von vorbestehenden Gefäßanastomosen [166]. Der Einfluss auf die Arteriogenese wird insbesondere durch die bevorzugte Expression von DLL4 auf arteriellen Endothelzellen betont [167, 168].

Neben den o.g. angiogenetischen Wirkungen auf vaskuläre Endothelzellen (z.B. durch VEGF) bewirken Wachstumsfaktoren wie bspw. *Transforming growth factor beta (TGFβ)* die Umwandlung von Endothelzellen in mesenchymale Zellen (*Endothelial-to-mesenchymal transition: EndMT*) [169]. EndMT ist mit der Entstehung von Fibrose in Herz [170], Niere [171], Haut [172], Gefäß(re)stenose [173] sowie Lunge [174] assoziiert, neueste Studien brachten EndMT auch mit der Atheroskleroseentstehung in Verbindung [175-178].

Interessanterweise konnten Duy M Ha et al. bei pAVK Patienten erhöhte TGFβ Konzentrationen in Biopsien des *M. gastrocnemicus* nachweisen, die positiv mit der Kollagenablagerung in den Gefäßwänden des Muskels korrelierten. Sie beschrieben eine Zunahme der vaskulären TGFβ Expression und vermehrte Kollagenablagerungen mit Fortschreiten des Erkrankungsstadiums sowie eine starke negative Korrelation des Biomarkers mit dem ABI [179].

Therapeutisch konnte ein TGFβ Antikörper im Mausmodell bereits erfolgreich eingesetzt werden, um EndMT im Rahmen einer kardiovaskuläre Fibrose zu unterbinden [170, 180]. Zudem gelang es, neutralisierende Antikörper gegen Endothelproliferation und dadurch bedingte Restenosen bei gefäßkranken Patienten einzusetzen [181-183]. Ähnliche Ansätze zur Therapie atherosklerotischer Gefäßläsionen im Rahmen einer pAVK wurden bisher noch nicht unternommen.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war, Veränderungen von sEPCR und Faktoren, welche die Expression und Freisetzung von EPCR auf dem Gefäßendothel regulieren (ADAM17) oder mit dem Signalweg in Verbindung stehen (Protein C-Aktivität), im Blut von Patienten mit pAVK zu bestimmen und mit bereits etablierten Biomarkern für endotheliale (Dys-)funktion (NO, E-Selectin), Inflammation (hsCRP, TNF α , IL1 β) und Gefäßneubildung (VEGF, Tie2, Notch) bzw. Fibrose (TGFβ) zu vergleichen. Auf diese Weise sollten Ergebnisse der Arbeitsgruppe im Tiermodell und kultivierten Endothelzellen bezüglich der

Funktion von EPCR für die Wiederherstellung der Gewebepfusion und Angiogenese auf ihre mögliche Bedeutung für die Erkrankung beim Menschen überprüft werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Materialienliste

Artikel	Artikelnummer	Hersteller
Desinfektionsspray	118211	SCHÜLKE & MAYR GmbH
0,5 ml Eppendorf Tubes	0030121023	Eppendorf AG; Hamburg
1,5 ml Eppendorf Tubes	0030120086	Eppendorf AG; Hamburg
2,0 ml Eppendorf Tubes	0030120094	Eppendorf AG; Hamburg
Eis		Hausintern
Eisbox		Hausintern
Light Duty Tissue Wipers	82003-820	VWR International GmbH; Darmstadt
Pasteurpipetten	612-1701	VWR International GmbH; Darmstadt
Pipettenspitzen, verschiedene Größen		STARLAB GmbH; Hamburg
S-Monovette Citrat	125311	Sarstedt; Nürnberg
S-Monovetten mit Kalium- EDTA, 2,7 ml	125312	Sarstedt; Nürnberg
S-Monovetten Lithium- Heparin	135469	Sarstedt; Nürnberg
S-Monovette Serum	125310	Sarstedt; Nürnberg
Safety-Multifly®R-Kanüle 21G	85.1638.235	Sarstedt; Nürnberg
Stauschlauch	430105	
Stift, wasserfest	311-5	Schreibwarenladen
Tesa	327544	Scotch
Vasco Nitril Handschuhe S	PET 9207716	B. Braun Melsung AG; Melsungen
Wischtücher, 1-lagig	115-0202	VWR International GmbH; Darmstadt

Tabelle 4: Übersicht verwendete Materialien

3.1.2 Kits

Artikel	Artikelnummer	Hersteller
ADAM 17 ELISA Kit	EHADAM17	ThermoFisher Scientific; Frederick, USA
E-selectin ELISA Kit	DSLE00	R&D Systems, Inc; Minneapolis, USA
Griess Reagent Kit	G2930	Promega Corporation; Madison, USA
IL1 β ELISA Kit	DLB50	R&D Systems, Inc; Minneapolis, USA
Notch ELISA Kit	EHNOTCH1	ThermoFisher Scientific; Frederick, USA
sEPCR ELISA Kit	MBS703733	MyBioSource; San Diego, USA
TGF β ELISA Kit	TGFBR3	ThermoFisher Scientific; Frederick, USA
Tie2 ELISA Kit	BMS2042	ThermoFisher Scientific; Frederick, USA
TNF α ELISA Kit	DTA00D	R&D Systems, Inc; Minneapolis, USA
VEGF ELISA Kit	DVE00	R&D Systems, Inc; Minneapolis, USA

Tabelle 5: Übersicht verwendete KITS

3.1.3 Geräte und Programme

Artikel	Hersteller
EndNote ^{x9}	Clarivate Analytics; Boston USA
Excel Version 16.56	Microsoft Corporation; Redmond, USA
GraphPad Prism Version 9.0	Graph Pad Software, Inc; La Jolla, USA
Homogenisator und Dispensierwerkzeug (D-1)	MICCRA GmbH; Mühlheim
LAURIS Client	NEXUS SWISSLAB GmbH; Berlin, Deutschland
Plattenphotometer (Infinite $^{\circ}$ C 200 Pro)	Tecan Group AG; Männedorf, Schweiz
Powerpoint Version 16.56	Microsoft Corporation; Redmond, USA

Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung (SAP) der Uniklinik Mainz	SAP SE; Walldorf, Deutschland
Spektrophotometer „Biophotometer“	Eppendorf AG; Hamburg
Word Version 16.56	Microsoft Corporation; Redmond, USA
Kleine Zentrifuge (5424R) mit Festwinkelrotor	Eppendorf AG; Hamburg

Tabella 6: Übersicht verwendete Geräte und Programme

3.2 Studiendesign

Die Datengewinnung erfolgte im Rahmen einer klinisch-experimentellen prospektiven monozentrischen Beobachtungsstudie, die im Zentrum für Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz (Leitung der Studie: ...; AG Translationale Vaskuläre Biologie; Zentrum für Kardiologie / Kardiologie I; sowie ...; Zentrum für Kardiologie / Kardiologie III-Angiologie) zwischen Oktober 2019 und März 2021 durchgeführt wurde.

Primärziel der Studie war es bei Patienten mit pAVK, die aufgrund eines (in)kompletten Verschlusses peripherer Arterien eine Extremitätenischämie aufweisen, die Konzentration des löslichen EPCR (sEPCR) im Blut zu bestimmen. Zudem suchte man nach weiteren Faktoren, die an der proteolytischen Ablösung von EPCR von der Endothelzelloberfläche beteiligt oder als Biomarker für eine Endotheldysfunktion bereits etabliert sind. Diese wurden bei Patienten mit pAVK bestimmt und mit den Werten im Blut verschiedener Kontrollgruppe verglichen:

Über die angiologische Ambulanz der Universitätsmedizin Mainz wurden 20 Patienten mit einer stabilen pAVK (*Claudicatio intermittens*) im Stadium II a oder b nach Fontaine in die Studie eingeschlossen (pAVK Stadium (Std.) II).

Die Rekrutierung zweier Vergleichskollektive mit jeweils 20 Probanden (GHS+RF und GHS-RF) erfolgte in Kooperation mit der Gutenberg-Gesundheitsstudie (GHS) der Universitätsmedizin Mainz. Diese Kollektive bestanden aus Personen ohne pAVK-typische Beschwerden in einer ähnlichen Altersgruppe und Geschlechtsverteilung wie die Gruppe pAVK Std. II. In eine dieser Gruppen wurden Personen ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren eingeschlossen (GHS-RF), in die andere Probanden mit zwei oder mehr solcher Risikofaktoren (GHS+RF).

20 Patienten mit einer pAVK im Stadium III-IV nach Fontaine (pAVK Std. III/IV) und 20 gesunde freiwillige Probanden < 35 Jahren (< 35-Jährige) bildeten zwei weitere Vergleichskollektive.

Die Patientenrekrutierung erfolgte in einem Zeitraum von 1,5 Jahren (Oktober 2019 bis März 2021).

Finanziert wurde die Studie durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF 01EO1503; TRP X32).

Gruppe	Beschreibung	Anzahl	Charakteristika
pAVK Std. II	Stabile pAVK Stadium II a oder b nach Fontaine	n=20	Patienten mit einem <i>Ankle-Brachial Index</i> < 0,9 und einem Verschlussdruckabfall bei der Laufbandergometrie
GHS-RF	Alters- und geschlechts-gematchte gesunde Probanden (GHS Kontrollgruppe 1)	n=20	Personen ohne pAVK-typische Beschwerden und ohne bzw. mit bereits therapierten kardiovaskulären Risikofaktoren
GHS+RF	Alters- und geschlechts-gematchte gesunde Probanden (GHS Kontrollgruppe 2)	n=20	Personen ohne pAVK-typische Beschwerden und mit kardiovaskulären Risikofaktoren
< 35-Jährige	Gesunde Probanden < 35 Jahre	n=20	Personen < 35 Jahren ohne pAVK-typische Beschwerden und ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren
pAVK Std. III/IV	pAVK Stadium III oder IV nach Fontaine	n=20	Patienten mit Ruheschmerzen (Fontaine III) oder/und Ulzerationen/Nekrosen an den Extremitäten (Fontaine IV)

Tabelle 7: Graphische Darstellung der verschiedenen Studiengruppen. Dargestellt sind jeweils die Gruppennummer, Beschreibung, Patientenzahl pro Gruppe und Charakteristika.

3.3 Ethikvotum

Genehmigt wurde die Studie durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Mainz (Antragsnummer: 2019-14205-Klinische Forschung; Genehmigung vom 03.05.2019).

Während der gesamten Studiendauer wurden sämtliche Richtlinien der Deklaration von Helsinki (2004) eingehalten.

Alle Patienten wurden über Ziele, Nutzen und Risiko der Studienteilnahme (s. Patienteninformation) informiert. Sie wurden vor Studieneinschluss darüber aufgeklärt, dass sie jederzeit ihre Teilnahme an der Studie ohne negative Konsequenz zurückziehen können.

Die Belehrung der Patienten wurde mit Hilfe eines Aufklärungsbogens schriftlich durchgeführt und dokumentiert.

3.4 Patientenkollektiv

3.4.1 Patientenrekrutierung

Die Rekrutierung der 20 pAVK Std. II Patientinnen und Patienten erfolgte über die angiologischen Ambulanz der Universitätsmedizin Mainz. Patienten mit einer bekannten pAVK im Stadium II a oder II b erhalten dort jährlich eine Kontrolluntersuchung, im Rahmen welcher der Studieneinschluss erfolgte.

Der Probandeneinschluss für die Gruppen GHS-RF und GHS+RF fand bei einer regulären Follow-Up Untersuchung von Teilnehmer*innen der Gutenberg-Gesundheitsstudie (GHS) statt.

Frau ..., die leitende wissenschaftliche Dokumentarin der GHS, erhielt für die Auswahl von passenden Patienten eine Übersicht über die 20 bereits eingeschlossenen pAVK Std. II Patienten, sodass bei der Zusammenstellung der beiden GHS Kollektive ein geschlechts- und altersbezogenes Matching zu den Menschen mit pAVK durchgeführt werden konnte.

Die Gruppe der < 35-Jährigen bestand aus Mitarbeiter*innen der Arbeitsgruppe (AG) Schäfer und Kommilitonen, die sich zu einer Studienteilnahme bereit erklärten.

Die Rekrutierung der Gruppe pAVK Std. III/IV erfolgte im Rahmen eines (geplanten) stationären Aufenthalts in der Universitätsmedizin Mainz. Personen, die aufgrund ihrer fortgeschrittenen pAVK (Stadium III oder IV nach Fontaine) eine endovaskuläre Revaskularisation erhielten, wurden am Tag nach der Intervention in die Studie eingeschlossen.

3.4.2 Einschlusskriterien

In die pAVK Std. II Gruppe wurden Menschen mit einer stabilen pAVK (*Claudicatio intermittens*) im Stadium II a oder b nach Fontaine eingeschlossen. Bei der Laufbandergometrie mit 12 % Steigung und einer Geschwindigkeit von 3,2 km/h musste innerhalb von 300 m eine *Claudicatio intermittens* auftreten. Die pAVK typischen Beschwerden sollten seit mindestens einem Jahr bestehen bei einem über diesen Zeitraum stabilen Krankheitsstadium.

Für die Gruppen GHS-RF und GHS+RF wurden gesunde Probanden ohne pAVK-typische Beschwerden, die eine ähnliche Alters- und Geschlechtsverteilung wie die pAVK Std. II Gruppe besaßen, ausgewählt. Während Mitglieder*innen von GHS-RF kein kardiovaskuläres Risikoprofil besitzen durften, mussten die der GHS+RF mindestens 2 kardiovaskuläre Risikofaktoren aufweisen.

Für die Gruppe der < 35-Jährigen wurden Probanden entsprechenden Alters ausgewählt, die keine Vorerkrankungen besaßen und einen gesunden Lebensstil führten.

In die Gruppe pAVK Std. III/IV wurden Erkrankte mit fortgeschrittener peripherer Gefäßerkrankung (pAVK Stadium III oder IV nach Fontaine) eingeschlossen. Es musste eine kritische Durchblutungsstörung der unteren Extremität sowie eine ähnliche Alters- und Geschlechtsverteilung wie die pAVK Std. II Gruppe vorliegen.

Es wurden nur einwilligungsfähige Menschen zwischen 18 und 85 Jahren in die Studie eingeschlossen.

3.4.3 Ausschlusskriterien

Als Ausschlusskriterien galten: Alter unter 18 Jahren; eine fehlende Einwilligung; eine maligne Erkrankung mit Limitation der Lebenserwartung auf weniger als 12 Monate; Patienten, die einer Immunsuppression unterzogen werden, fieberhafte Infektionskrankheit innerhalb der letzten 4 Wochen; eine eingeschränkte Nierenfunktion (Kreatinin-Clearance < 30 ml/min) sowie das Vorliegen einer Schwangerschaft.

3.4.4 Abbruchkriterien

Die Teilnahme an der Studie konnte jederzeit mündlich oder schriftlich und ohne Angabe von Gründen widerrufen werden. In diesem Fall wären die gewonnenen

Probenmaterialien vernichtet und die personenbezogenen Daten gelöscht worden. Dieser Fall ist jedoch nicht eingetreten.

3.5 Studienablauf

3.5.1 Maßnahmen

Bei allen Gruppen erfolgte eine Blutentnahme zur Durchführung der einzelnen Labortests: Von jedem Studienpatienten wurden 9 ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (für die Bestimmung von IL1 β , NO, Notch, TGF β und VEGF), 4 ml Natriumzitrat (für die Bestimmung der Protein C Aktivität) und 4 ml Lithium-Heparin (für alle anderen Messungen) abgenommen, aufbereitet und bei -80°C gelagert (insgesamt 17 ml).

Zusätzlich fand bei den Patienten der Gruppen pAVK Std. II und pAVK Std. III/IV eine Befragung zu erkrankungstypischen Beschwerden, kardiovaskulären Risikofaktoren, Vorerkrankungen und der Familienanamnese (s. Patientenfragebogen) statt.

Ausschließlich bei den Patienten mit pAVK Std. II wurde im Rahmen der Routine-Untersuchung eine nicht-invasive funktionelle angiologische Basisdiagnostik durchgeführt. Diese umfasste die Bestimmung des *Ankle-Brachial-Index*, eine cw-Dopplersonographie und elektronische Oszillographie. Zusätzlich wurde eine Laufbandergometrie bei 3,2 km/h und 12 % Steigung durchgeführt. Bei Probanden der GHS Kollektive und die < 35-Jährigen waren diese Untersuchungen nicht indiziert und wurden daher auch nicht zusätzlich durchgeführt. Bei Patienten in den pAVK Std. III/IV Gruppe war diese Untersuchung kontraindiziert.

	pAVK Std. II	GHS-RF	GHS+RF	< 35- Jährige	pAVK Std. III/IV
Angiologische Untersuchung	x				
Patienten- fragebogen	x				x
Blutentnahme	x	x	x	x	x

Tabelle 8: Übersicht über die durchgeführten Maßnahmen in den einzelnen Untergruppen.

3.5.2 Erfassungen der Zielgrößen

3.5.2.1 Angiologische Untersuchungen

Bei allen Patienten der Gruppe pAVK Std. II erfolgte eine funktionelle angiologische Diagnostik mit Bestimmung des *Ankle-Brachial-Index* (ABI), cw-Dopplersonographie und elektronischer Oszillographie. Zusätzlich wurde eine Laufbandergometrie bei 3,2 km/h und 12 % Steigung durchgeführt.

3.5.2.2 Bestimmung der Biomarker im Plasma

Die Plasma-Konzentrationen von ADAM17, E-Selectin, Notch, sEPCR, TGF β , Tie2 und VEGF wurden unter Verwendung von im Handel erhältlichen *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISAs) (ADAM17: ThermoFisher EHADAM17, E-Selectin: R & D System DSLE00, Notch: Thermofisher EHNOTCH1, sEPCR: MyBioSource MBS703733, TGF β : ThermoFisher TGFBR3, Tie 2: ThermoFisher BMS2042, VEGF: R & D System DVE00) bestimmt.

Spezifische ELISA-Tests wurden auch zur Bestimmung der Plasmaspiegel der inflammatorischen Marker IL1 β (R & D Systems DLB50) und TNF α (R & D Systems DTA00D) verwendet.

Für Angaben zu Nachweisgrenzen sowie Sensitivität und Spezifität der ELISA-Tests s. Kapitel 1.8.1.3.

Der Nitrit Nachweis erfolgte mittels Griess Reagent (Promega G2930).

Die Plasmaprotein-C-Aktivität wurde als Maß für die EPCR-Funktionalität, die Plasmas-hsCRP-Spiegel als Biomarker für Entzündungen gemessen. Die Bestimmung dieser beiden Parameter erfolgten im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz.

Zur Beseitigung der Interassay-Variabilität wurden Plasmaproben aliquotiert, bei -80°C gelagert und gleichzeitig untersucht. Um je 20 Proben aller 4 Gruppen gleichzeitig auf einer ELISA-Platte messen zu können, wurden alle Analysen in Einzelbestimmung durchgeführt.

3.5.2.3 Bestimmung laborchemischer Parameter

Bei allen Patienten erfolgte neben der Bestimmung der Biomarker für Gefäßneubildung mittels ELISA zusätzlich auch die Erfassung von Laborparametern der klinischen Chemie. Hierfür wurden für jeden Patienten ein kleines Blutbild, Cholesterinwerte, Blutfette,

Nierenretentionsparameter (Kreatinin) und Entzündungsmarker (CRP) bestimmt. Die Bestimmung dieser Parameter erfolgte routinemäßig im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz.

Erhobene Parameter	Einheit
Leukozyten	*10 ³ /μl
Erythrozyten	*10 ³ /μl
Thrombozyten	*10 ³ /μl
Hämatokrit	%
Hämoglobin	g/dl
Gesamtcholesterin	mg/dl
LDL-Cholesterin	mg/dl
HDL-Cholesterin	mg/dl
Triglyzeride	mg/dl
CRP	mg/l
Kreatinin	mg/dl

Tabelle 9: Übersicht der erfassten laborchemischen Parameter. Dargestellt sind die jeweiligen Parameter und die dazugehörige Messeinheit.

Dabei muss das zur Routinediagnostik bestimmte CRP von dem später aufgeführten hsCRP unterschieden werden. Hierbei wird das klassische C-reaktive Protein (CRP) als hochsensitives C-reaktives Protein (hsCRP) bezeichnet, wenn durch empfindliche Messmethoden Konzentrationen < 5 mg/l detektiert werden können.

3.5.2.4 Patientenfragebogen

Bei den allen Patienten mit pAVK (Gruppen pAVK Std. II und pAVK Std. III/IV) wurde eine Anamnese bezüglich kardiovaskulärer Risikofaktoren, Vorerkrankungen und Familienanamnese erhoben. Ebenso erfolgte eine Medikamentenanamnese. Für die statistische Datenauswertung wurden die erhobenen klinischen Angaben wie folgt klassifiziert:

Erhobene Parameter	Klassifizierung
Geschlecht	1=männlich 2=weiblich
Alter	In Jahren
Größe	In Meter
Gewicht	In Kilogramm

BMI	In kg/m ²
Schmerzen in den Beinen	0=nein 1=ja, bei Belastung 2=ja, in Ruhe 3=Nekrosen, Ulzera
Laufstrecke bis zum Auftreten von <i>Claudicatio intermittens</i>	0=mehr als 200 m 1=weniger als 200 m
Nikotinabusus	0=Nie-Raucher 1=Raucher 2=Exraucher 3=Passivraucher
Bluthochdruck	0=keine arterielle Hypertonie 1=arterielle Hypertonie (systolischer RR >140 mmHg und/oder diastolisch >90 mmHg bzw. Einnahme von anti-hypertensiver Medikation)
Diabetes mellitus	0=kein Diabetes mellitus 1=Diabetes mellitus (Nüchtern-Glukose >126 mg/dl; HbA1c >6,5% bzw. Einnahme von Anti-Diabetika / Insulin)
Dyslipidämie	0=keine Dyslipidämie 1=Dyslipidämie (LDL >115 mg/dl, HDL <40 mg/dl und/oder Triglyzeride >190 mg/dl bzw. Einnahme lipidsenkender Medikamente)
Metabolisches Syndrom	Nach Kriterien der <i>International Diabetes Federation</i> (IDF, 2005) 1. BMI \geq kg/m ² 2. Zusätzlich zwei der vier folgenden Faktoren - Erhöhte Triglyzeride: \geq 150 mg/dL - Erniedrigtes HDL-Cholesterin: Frauen < 50 mg/dl Männer < 40 mg/dl - Erhöhter Blutdruck Systolisch \geq 130 mmHg oder Diastolisch \geq 85 mmHg

	- Nüchternblutzucker \geq 100 mg/dl oder Diabetes mellitus Typ 2
Kardiovaskuläre Vorerkrankungen	0=keine 1=pAVK, Schlaganfall, Myokardinfarkt 2=arterielle/venöse Thrombose, Embolie
Familienanamnese	0=keine 1=positive Fam.-anamnese (Schlaganfall, Myokardinfarkt, pAVK, plötzlicher Herztod bei Verwandten 1. Grades <55 J (m) <65 J (w)) 2=arterielle/venöse Thrombose, Embolie (s.o.)
Medikamentenanamnese	ACE Hemmer / AT1 Antagonisten ASS β -Blocker Calcium Antagonisten Fibrate Marcumar/OAKs Nitrate P2Y12-Inhibitor Statine 0=keine Einnahme 1=Einnahme

Tabelle 10: Klassifizierung der klinischen Parameter. Die Datenerhebung erfolgte mittels Patientenfragebogen.

3.6 Klinische Endpunkte

3.6.1 Primäre und sekundäre Zielgrößen

Primäre Zielgröße der Studie war die im Plasma der Patienten bzw. Probanden gemessene zirkulierende Konzentration von sEPCR.

Sekundäre Zielparameter waren: ADAM17, E-Selectin, Notch, TGF β und VEGF. Weiterhin fielen hierunter die inflammatorischen Marker IL1 β und TNF α , hsCRP als Entzündungsmarker und die Plasma Protein-C-Aktivität.

Als weitere sekundäre Zielgrößen wurden die Zellzahlen im Vollblut, die Beschwerdesymptomatik (*Claudicatio intermittens*), die Gehstrecke (anamnestisch und

per Laufband ermittelt), der Blutdruck an Arm und Knöchel sowie der daraus errechnete ABI erfasst.

3.7 Probengewinnung, Verarbeitung, Lagerung

Bei jedem Patienten wurde eine venöse Blutentnahme durchgeführt. Diese umfasste 9 ml EDTA-, 4 ml Lithium-Heparin- und 4 ml Citrat Blut. Im Anschluss an die Blutentnahme erfolgte die zügige Aufbereitung des Blutes im Labor der AG Schäfer. Hierfür wurden die Monovetten für 10 Minuten bei 3.000 *revolutions per minute* (rpm) und 20 °C zentrifugiert. Nachfolgend wurde der klare Plasmaüberstand in 1,5 ml Aliquots pipettiert (500 µl Plasma pro Gefäß) und zur Aufbewahrung bei -80 °C Grad eingefroren.

3.8 Biomarker Analysen

3.8.1 Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.8.1.1 Prinzip des ELISAs

Alle durchgeführten ELISAs wurden nach der „Sandwich“ Technik durchgeführt. Für die ELISA Technik werden zwei Antikörper verwendet, die spezifisch an die nachzuweisenden Biomarker binden. Jeder Antikörper hat seine eigene Bindungsstelle (Epitop) am Substrat.

Der erste Antikörper ist auf einer Mikroplatte in den sogenannten *wells* fixiert, er ist der *Capture Antikörper*. In einem 1. Schritt werden die Probenstandards und die einzelnen Blutseren der Patienten in die *wells* der Mikroplatte pipettiert. Während der Inkubationszeit erfolgt die Bindung der Antigene an den *Capture Antikörper*. Ungebundene Bestandteile der Probe werden durch anschließendes Waschen der Mikroplatte entfernt.

Im Anschluss erfolgt das Zufügen des zweiten Antikörpers, der als *Detection Antikörper* das Sandwich vervollständigt. In einem erneuten Waschvorgang werden alle ungebundenen Substanzen von der Platte entfernt.

Der *Detection Antikörper* ist an ein Enzym gekoppelt (z.B. Meerrettichperoxidase), das nach Zugabe seines passenden Substrates eine Farbreaktion katalysiert, mithilfe derer die photometrische Quantifizierung des Ergebnisses erfolgt.

Das Ergebnis wird mit dem Mikroplattenreader ausgelesen, dabei wird mithilfe der aufgetragenen Standardreihen eine Kalibrierungskurve erzeugt. Die photometrische Auswertung der Proben erfolgt durch Vergleich der Extinktion der Proben mit der Kalibrierungskurve.

3.8.1.2 Durchführung der ELISAs

Alle ELISAs wurden nach der Produktbeschreibung des Herstellers durchgeführt. Die Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit ... (Medizinisch-Technische Assistentin (MTA) der AG Schäfer. Im Folgenden wird die Durchführung beispielhaft anhand des sEPCR ELISAs beschrieben, Abweichungen für die einzelnen ELISAs werden in einem eigenen Kapitel behandelt.

Die auszuwertenden Blutproben wurden aus dem -80 °C Gefrierfach entnommen und langsam auf Eis aufgetaut.

Es erfolgte die Verdünnung der im ELISA Kit enthaltenen Standardlösung für die Herstellung der Probenstandards nach folgendem Verdünnungsschema:

Standard	Konzentration [ng/ml]
STD 0	0
STD 1	7,8
STD 2	15,6
STD 3	31,2
STD 4	62,5
STD 5	125
STD 6	250
STD 7	500

Tabelle 11: Konzentrationsgefälle der Standardreihe des sEPCR ELISAs.

Die unverdünnte Ausgangskonzentration des Probenstandards (STDs) betrug 500 ng/ml (STD 7), in alle weiteren 7 Eppendorf Gefäße (STD 1-6) wurden jeweils 250 µl *double-distilled water* (ddH₂O) vorgelegt und folgendes Pipettierschema kam zur Anwendung:

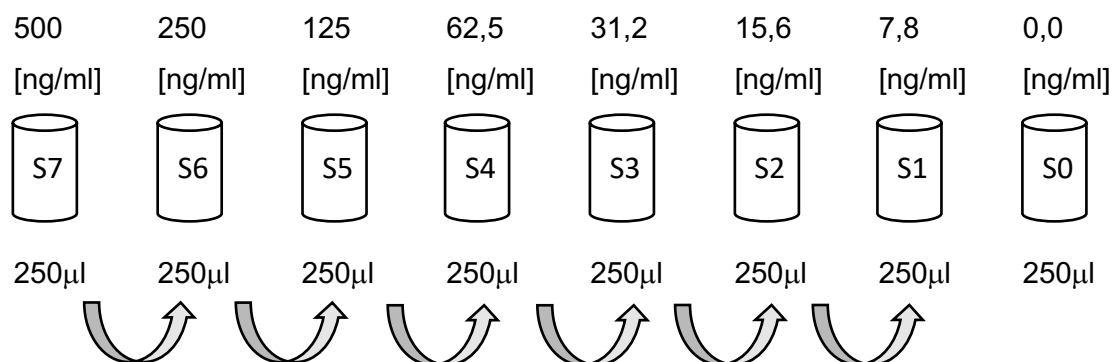


Abbildung 2: Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe des sEPCR ELISAs.

Im Anschluss wurden jeweils 100 µl der vorbereiteten Probenstandards und der aufgetauten Proben in die wells pipettiert analog zum vorher festgelegten Plattenbelegungsplan.

Die befüllten wells wurden mit einer Lichtschutzfolie abgedeckt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die überstehende Flüssigkeit vorsichtig entfernt.

Anschließend erfolgten die Zugabe von 100 µl Biotin-Antikörper (*Detection Antikörper*) zu jedem well, das erneute Abdecken der Platte mit einer Lichtschutzfolie und eine weitere Inkubation von einer Stunde bei 37 °C. Für das anschließende Waschen der Platte wurden in jeden well 200 µl Waschpuffer hinzugefügt und nach einer zweiminütigen Inkubation wieder entfernt. Der Waschvorgang wurde insgesamt 3x wiederholt.

Nach dem Waschen wurden 100 µl von Meerrettichperoxidase-Avidin (*Horseradish Peroxidase: HRP*) in die wells hinzugefügt, es erfolgte eine erneute Inkubation für eine Stunde bei 37 °C. Nach dem anschließenden Waschvorgang wurden jedem well 90 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Substrat der HRP) zugefügt. Es folgte eine Inkubation für 15-30 min bei 37 °C bevor durch die Zugabe von 50 µl Stopplösung eine weitere Farbreaktion unterbunden wurde. Die quantitative Auswertung der Farbreaktion erfolgte mit einem Mikroplattenreader bei 450 nm.

3.8.1.3 Unterschiede der ELISAs

Die quantitative Messung der in der Tabelle dargestellten Marker erfolgte mittels ELISA. Je nach Marker wurden unterschiedliche Blutproben (Citrat, EDTA oder Lithium-Heparin) verwendet.

Die ELISA unterschieden sich weiterhin in den Angaben zu Sensitivität, Detektionsbereich und Verdünnung.

Art und Menge der Blutprobe	ELISA	Sensitivität	Grenzwerte	Verdünnung
ADAM17				
100 µl Lithium-Heparin	ThermoFisher EHADAM17	70 pg/ml	78-5.000 pg/ml	keine
E-Selectin				
20 µl Lithium-Heparin	R&D Systems DSLE00	0,027 pg/ml	0,1-8 ng/ml	10-fach

IL1 β				
200 μ l	R&D Systems	1 pg/ml	3,9-250 pg/ml	keine
EDTA	DLB50			
Notch				
100 μ l	ThermoFisher	20 pg/ml	28,67-7000	keine
EDTA	EHNOTCH1		pg/ml	
sEPCR				
100 μ l	MyBioSource	1,95 ng/ml	7,8 – 500	keine
Lithium-Heparin	MBS703733		ng/ml	
TGF β				
100 μ l	OriGene	< 10 pg/ml	62,5-4.000	keine
EDTA	EA100707		pg/ml	
TNF α				
50 μ l	R&D Systems	6,23 pg/ml	15,6-1.000	keine
Lithium-Heparin	DTA00D		pg/ml	
Tie2				
25 μ l	R&D Systems	0,066 ng/ml	0,2-10,0 ng/ml	10-fach
Lithium-Heparin	DTE200			
VEGF				
100 μ l	R&D Systems	5-9 pg/ml	31,3-2.000	keine
EDTA	DVE00		pg/ml	

Tabelle 12: Unterschiede der ELISAs für die einzelnen Biomarker. Dargestellt sind jeweils ELISA Hersteller, Sensitivität, Grenzwerte und Verdünnung.

Zudem unterschieden sich die Inkubationszeiten und Rezeptorenenzyme der ELISAs

Inkubationszeit mit Capture Antikörper	Inkubationszeit mit Detektionsantikörper	Rezeptorenenzyme
	ADAM17	
2,5 h	1 h	Streptavidin-HRP
	E-selectin	
2 h	2h	HRP
	IL1 β	
2,5 h	1 h	Streptavidin-HRP
	Notch	
2,5 h	1 h	Streptavidin-HRP

sEPCR		
1 h	1 h	Avidin-HRP
TGFβ		
2,5 h	1	Avidin-HRP
TNFα		
2 h	2 h	HRP
Tie2		
2 h	2 h	HRP
VEGF		
2 h	2 h	unbekannt

Tabella 13: Unterschiede der ELISAs für die einzelnen Biomarker. Dargestellt sind jeweils die verschiedenen Inkubationszeiten und Rezeptorenenzyme. HRP: horseradish peroxidase.

3.8.2 Griess Reagent

3.8.2.1 Methode des Griess Reagents

Der Detektion von Stickstoffmonoxid (NO) dient das Griess Reagent. Hierbei erfolgt der Nachweis indirekt über die Messung von NO_2^- und NO_3^- , den stabilen Zwischenprodukten von NO.

Das Griess Reagent beinhaltet 2 Komponenten, die in einer sauren Lösung vorliegen: Sulfonamid und N-1-Naphthylethylenediamine (NED).

Die Nitriten reagieren mit dem Sulfonamid zu einem Diazoniumsalz, welches wiederum mit NED eine rötliche Azoverbindung bildet.

Mithilfe eines Spektrometers erfolgt die Quantifizierung der Nitritkonzentration.

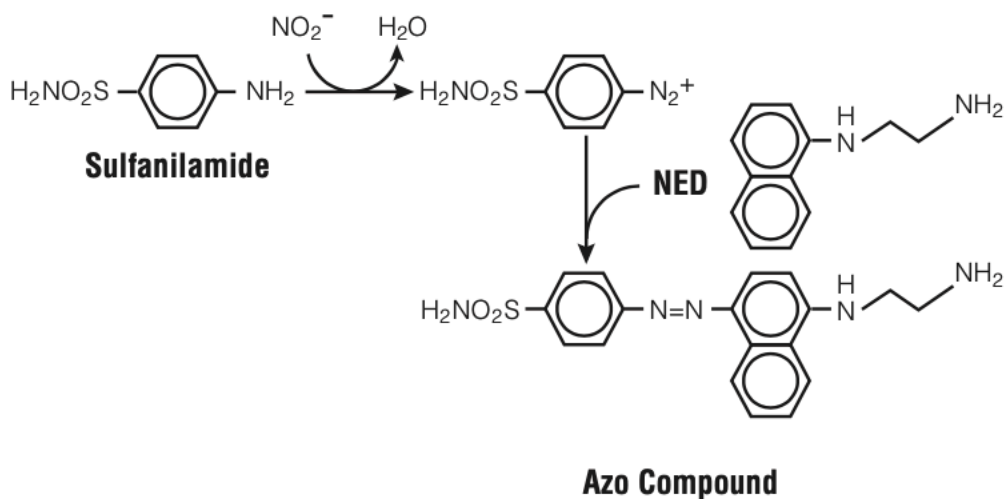


Abbildung 3: Chemische Reaktionsgrundlage des Griess Reagent für den Nachweis von NO_2^-

3.8.2.2 Durchführung NO Messung

1. Vorbereitung einer Nitrit Standardkurve

Die auszuwertenden Blutproben wurden aus dem -80 °C Gefrierfach entnommen und langsam auf Eis aufgetaut.

Es erfolgte die Herstellung von 1 ml einer 100 µM Nitrit Lösung durch 1:1.000 Verdünnung des im Kit enthaltenen 0,1 M Nitrit Standards. Anschließend fand folgendes Verdünnungsschema Anwendung.

Standard	Konzentration [µM]
STD 0	0
STD 1	1,56
STD 2	3,13
STD 3	6,25
STD 4	12,5
STD 5	25
STD 6	50
STD 7	100

Tabella 14: Konzentrationsgefälle der Standardreihe des Griess Reagent.

Die unverdünnte Ausgangskonzentration des Probenstandards betrug 100 µM (STD 7), in alle weiteren 7 Eppendorf Gefäße (STD 1-6) wurden jeweils 50 µl ddH₂O vorgelegt und folgendes Pipettierschema kam zur Anwendung:

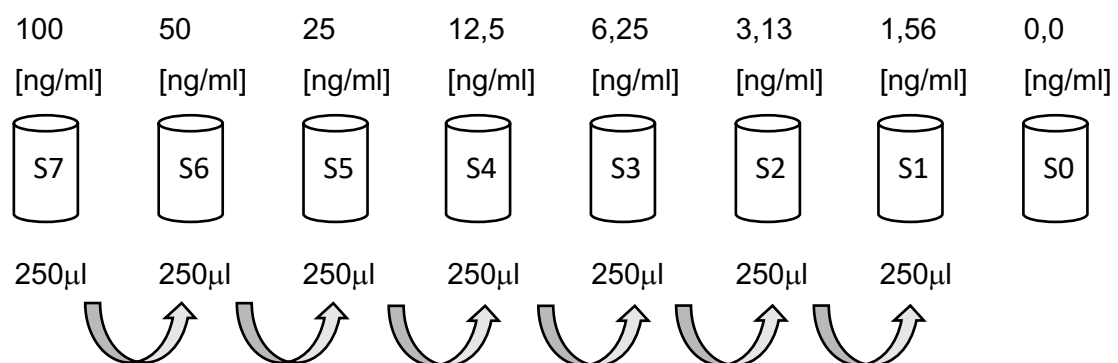


Abbildung 4: Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe des Griess Reagent.

2. Griess Reaktion

Die Proben wurden á 50 µl analog dem vorbereiteten Plattenbelegungsplan in die wells pipettiert. Es erfolgte die Zugabe von 50 µl Sulfenamid Lösung in alle wells. Nach einer

Inkubation von 5-10 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz wurden 50 µl NED Lösung zu allen *wells* zugegeben. Anschließend erfolgte einer erneute 5-10-minütige Inkubation, bei ablaufender Griess-Reaktion bildete sich eine lila/magenta Verfärbung der Proben. Die Quantifizierung des Ergebnisses erfolgte innerhalb von 30 min mithilfe eines Spektrometers bei 520-550 nm.

3.9 Statistische Auswertung

In einem ersten Schritt erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung der erhobenen Messwerte. Diese erfolgte mit Hilfe des Shapiro-Wilk Tests. Nicht vorhandene Proben, aufgrund von nicht in ausreichender Menge vorhandenem Probenmaterial, wurden als fehlend gewertet.

Für die beschreibende Statistik wurden bei Normalverteilung der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) bzw. bei Nicht-Normalverteilung der Median und die oberen und untere Perzentile (25% und 75%) bestimmt.

Bei Normalverteilung der Werte verwendeten wir für den Vergleich der 3 Gruppen pAVK Std. II Gruppe, GHS-RF, GHS+RF den *One-way ANOVA*, gefolgt von *Sidak's multiple comparisons* Test (jeweils 3 *post-hoc* Tests: pAVK Std. II vs. GHS-RF, pAVK Std. II vs GHS+RF und GHS-RF vs. GHS+RF). Beim Vergleich von zwei Untergruppen kam der *Unpaired t-Test* zur Anwendung.

Für den Fall, dass die Werte in mindestens einer der Gruppen nicht normalverteilt waren, wurden für den Vergleich der drei o.g. Untergruppen der *Kruskal-Wallis* Test, gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* Test (jeweils 3 *post-hoc* Tests s.o.), und für den Einzelgruppenvergleich der *Mann-Whitney* Test angewendet.

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde ab einem p-Wert von <0,05 angenommen, Unterschiede mit $p < 0,01$ wurden als hoch-signifikant bewertet.

Der Korrelationsanalyse zweier stetiger normalverteilter Variablen diene der *Pearson* Test, bei nicht-normalverteilten Werten wurde die *Spearman* Korrelation angewendet.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde GraphPad Prism Version 9.0 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische und laborchemische Charakteristika der untersuchten Patienten- und Probandenkollektive

4.1.1 Patientenkollektiv pAVK Stadium II

Hauptziel der vorliegenden klinischen Studie war es, bei pAVK Patienten die Spiegel des löslichen endothelialen Protein C Rezeptors (sEPCR) im Plasma zu messen und mit ADAM17 als möglichen Mediator des endothelialen EPCR *Sheddings*, der Protein C Aktivität sowie mit anderen, teilweise etablierten Biomarkern der Endothelfunktion (NO, E-Selectin), Inflammation (hsCRP, TNF α , IL1 β) bzw. Angiogenese (VEGF, Tie2, Notch) oder Fibrose (TGF β) zu vergleichen. Hierfür wurden im Zeitraum von Oktober 2019 bis März 2021 20 pAVK Fontaine Stadium IIa oder II b in die Studie eingeschlossen, von denen 19 in die abschließende Analyse einfließen. Grund für den Ausschluss eines Patienten (weiblich, 62 Jahre, keine anamnestischen Besonderheiten) war, dass die gemessene sEPCR Konzentration (primäre Zielgröße) im Plasma von GraphPad Prism als Ausreißer identifiziert wurde. Daher wurde auch alle anderen, im Blut dieser Patientin gemessenen Biomarker und auch die Daten aller mit dieser Patientin gematchten Vergleichsprobanden (jeweils ein Proband der Gruppen < 35 Jahre, GHS-RF, GHS+RF, pAVK Std. III/IV) nicht in die Analysen einbezogen. Somit liegen für jeden durchgeführten ELISA in allen Untergruppen grundsätzlich jeweils 19 Werte für die Analyse vor, falls nicht aufgrund von Materialknappheit an Plasma weitere Messungen nicht durchgeführt werden konnten. In den folgenden Tabellen sind die klinischen Charakteristika der pAVK Std. II Gruppe beschrieben, die nachfolgenden Kapitel zeigen eine analoge Charakterisierung der weiteren Untergruppen.

Eine Übersichtstabelle, welche die Charakteristika aller eingeschlossenen Patienten- und Probandenkollektive gegenüberstellt, findet sich in Kapitel 4.1.5.

Allgemeine Charakteristika	Absolutzahl (N) und prozentualer Anteil (%) am Gesamtkollektiv
Zahl der Patienten	19
männlich	9 (47,4 %)
weiblich	10 (52,6 %)

Tabelle 15: Allgemeine Charakteristika der pAVK Std. II Untergruppe. Dargestellt sind die Absolutzahlen (N) sowie der prozentuale Anteil (%) am Gesamtkollektiv.

Aufgrund des geschlechtsspezifischen Matchings der Untergruppen ist der prozentuale Anteil von männlichen und weiblichen Patienten bzw. Probanden in Tabelle 15 auch auf alle weiteren Kollektive übertragbar.

Allgemeine Charakteristika	Mittelwert und Standardabweichung (SD)
Zahl der Patienten	19
Alter männlich und weiblich	67,4 ± 8,1
Alter männlich	58,4 ± 22,1
Alter weiblich	69,6 ± 7,4

Tabelle 16: Allgemeine Charakteristika der pAVK Std. II Untergruppe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Absolutzahl (N) und prozentualer Anteil (%) am Gesamtkollektiv bzw. Mittelwert und Standardabweichung (SD)
Zahl der Patienten	19
Nikotinabusus (aktuell)	7 (36,8 %)
Ex-Raucher	10 (52,6 %)
Nie-Raucher	2 (10,5 %)
Arterielle Hypertonie	16 (84,2 %)
Diabetes mellitus Typ 2	6 (31,6 %)
Dyslipidämie	14 (73,7 %)
Body-Mass-Index (kg/m ²)	27,6 ± 4,8
Metabolisches Syndrom	8 (42,1 %)
Positive Familienanamnese	2 (10,5%)

Tabelle 17: Anamnestische Häufigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren der pAVK Std. II Untergruppe. Dargestellt sind die Absolutzahlen (N) sowie der prozentuale Anteil (%) am Gesamtkollektiv bzw. Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Blutwerte	Mittelwert und Standardabweichung (SD)
Zahl der Patienten	19
Gesamtcholesterin (mg/dl)	192,7 ± 34,7
LDL Cholesterin (mg/dl)	101,4 ± 30,9
HDL Cholesterin (mg/dl)	59,1 ± 16,8
Triglyzeride (mg/dl)	161,0 ± 70,4
Glukose (mg/dl)	102,3 ± 13,8
Kreatinin (mg/dl)	0,9 ± 0,1
CRP (mg/l)	2,6 ± 1,6

Leukozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	$7,9 \pm 1,4$
Erythrozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	$4,6 \pm 0,6$
Hämatokrit (%)	$42,6 \pm 4,3$
Hämoglobin (g/dl)	$14,2 \pm 1,3$
Thrombozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	$263,0 \pm 58,3$

Tabelle 18: Übersicht über die laborchemische Basisdiagnostik im Blut der pAVK Std. II Untergruppe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Die Bestimmung der hier aufgelisteten CRP Werte erfolgte als Routinediagnostik aus einer Serummonovette im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz und muss von den später aufgeführten hsCRP Konzentrationen (vgl. 4.2.7), die nach Aufarbeitung der Blutproben im Labor der AG Schäfer (Zentrifugation, Lagerung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$) ebenfalls im im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt wurde, unterschieden werden.

Medikation	Absolutzahl (N) und prozentualer Anteil (%) am Gesamtkollektiv
Zahl der Patienten	19
ACE-Hemmer/AT1-Rezeptorantagonisten	12 (63,2 %)
ASS	17 (89,5 %)
β -Blocker	10 (52,6 %)
Calcium-Antagonisten	11 (57,9 %)
Fibrate	1 (5,3 %)
Marcumar/OAKs	2 (10,5 %)
Nitrate	0 (0,0 %)
P2Y12-Antagonisten	2 (10,5 %)
Statine	15 (78,9 %)

Tabelle 19: Medikation der pAVK Std. II Untergruppe. Dargestellt sind die Absolutzahlen (N) sowie der prozentuale Anteil (%) am Gesamtkollektiv.

Somit war das untersuchte Kollektiv klinisch und laborchemisch im Mittel typisch für Patienten mit pAVK im Std. II a oder II b nach Fontaine.

4.1.2 Patientenkollektiv Gruppe pAVK Stadium III und IV

In den folgenden Tabellen sind die klinischen Charakteristika der pAVK Std. III/IV Untergruppe beschrieben.

Allgemeine Charakteristika	Mittelwert und Standardabweichung (SD)
Zahl der Patienten	19
Alter männlich und weiblich	68,9 ± 10,8
Alter männlich	65,3 ± 9,9
Alter weiblich	72,1 ± 10,9

Tabelle 20: Allgemeine Charakteristika der pAVK Std. III/IV Untergruppe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Absolutzahl (N) und prozentualer Anteil (%) am Gesamtkollektiv bzw. Mittelwert und Standardabweichung (SD)
Zahl der Patienten	19
Nikotinabusus (aktuell)	1 (5,2 %)
Ex-Raucher	13 (68,4 %)
Nie-Raucher	5 (26,3 %)
Arterielle Hypertonie	11 (57,9 %)
Diabetes mellitus Typ 2	8 (42,1 %)
Dyslipidämie	9 (47,3 %)
Body-Mass-Index (kg/m ²)	26,8 ± 4,3
Metabolisches Syndrom	4 (21,1 %)
Positive Familienanamnese	4 (21,1 %)

Tabelle 21: Anamnestiche Häufigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren der pAVK Std. III/IV Untergruppe. Dargestellt sind die Absolutzahlen (N) sowie der prozentuale Anteil (%) am Gesamtkollektiv bzw. Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Blutwerte	Mittelwert und Standardabweichung (SD)
Zahl der Patienten	19
Gesamtcholesterin (mg/dl)	178,1 ± 53,9
LDL Cholesterin (mg/dl)	100,9 ± 43,8
HDL Cholesterin (mg/dl)	53,3 ± 17,3
Triglyzeride (mg/dl)	120,4 ± 46,5
Kreatinin (mg/dl)	1,0 ± 0,4
Glucose (mg/dl)	134,2 ± 51,8
CRP (mg/l)	18,9 ± 21,0
Leukozyten, WBC (x10 ³ /μl)	11,7 ± 7,6
Erythrozyten, RBC (x10 ³ /μl)	4,3 ± 0,6
Hämatokrit (%)	41,8 ± 13,5

Hämoglobin (g/dl)	14,1 ± 6,0
Thrombozyten (x10 ³ /μl)	285,4 ± 113,8

Tabelle 22: Übersicht über die laborchemische Basisdiagnostik im Blut der pAVK Std. III/IV Untergruppe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Medikation	Absolutzahl (N) und prozentualer Anteil (%) am Gesamtkollektiv
Zahl der Patienten	19
ACE-Hemmer/AT1-Rezeptorantagonisten	9 (47,4 %)
ASS	11 (57,9 %)
β-Blocker	6 (31,6 %)
Calcium-Antagonisten	3 (15,8 %)
Fibrate	0 (0,0 %)
Marcumar/OAKs	5 (26,3 %)
Nitrate	1 (5,3 %)
P2Y12-Antagonisten	8 (42,1 %)
Statine	9 (47,4 %)

Tabelle 23: Medikation der pAVK Std. III/IV Untergruppe. Dargestellt sind die Absolutzahlen (N) sowie der prozentuale Anteil (%) am Gesamtkollektiv.

Somit war das untersuchte Kollektiv klinisch und laborchemisch im Mittel typisch für Patienten mit pAVK im Std. III und IV nach Fontaine.

Auffällig sind bei diesen Patienten deutlich erhöhte Entzündungswerte (Leukozyten sowie CRP) im Vergleich zum pAVK Std. II, was die fortschreitende Entzündungsreaktion im Rahmen der progressiven Atheroskleroseerkrankung verdeutlicht.

4.1.3 Probandenkollektiv GHS Untergruppen

Im Anschluss an die Rekrutierung der pAVK Std. II Patienten erfolgte der Einschluss von Probanden der beiden GHS Kollektive. Diese wurden alters- und geschlechtsspezifisch mit dem Patientenkollektiv der pAVK Patienten gematcht und verteilten sich gleichmäßig auf die Gruppen GHS-RF (n=19) und GHS+RF (n=19).

In den folgenden Tabellen sind die klinischen Charakteristika der GHS-Kollektive beschrieben.

4.1.3.1 Probandenkollektiv GHS-RF

Das alters- und geschlechtsspezifische Matching der GHS Probanden zu den pAVK Patienten und die Einteilung in –RF (keine kardiovaskulären Risikofaktoren oder

Erkrankungen) bzw. +RF (mindestens 2 kardiovaskulären Risikofaktoren, keine pAVK) wurde von Mitarbeiter*innen der GHS durchgeführt. Die Charakteristika der beiden Probandenkollektive ist in die nachfolgenden Tabellen dargestellt:

Allgemeine Charakteristik	Mittelwert und Standardabweichung (SD)	
	GHS-RF	GHS+RF
Zahl der Probanden	19	19
Alter männlich und weiblich	66,1 ± 9,5	67,2 ± 7,3
Alter männlich	62,2 ± 10,8	65,0 ± 8,3
Alter weiblich	69,1 ± 7,4	69,1 ± 6,1

Tabelle 24: Allgemeine Charakteristika der GHS Untergruppen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Absolutzahl (N) und prozentualer Anteil (%) am Gesamtkollektiv bzw. Mittelwert und Standardabweichung (SD)	
	GHS-RF	GHS+RF
	Zahl der Probanden	19
Nikotinabusus (aktuell)	0 (0,0 %)	1 (5,3 %)
Ex-Raucher	10 (52,6 %)	8 (42,1 %)
Nie-Raucher	9 (47,4 %)	10 (52,6 %)
Arterielle Hypertonie	0 (0,0 %)	14 (73,7 %)
Diabetes mellitus Typ 2	0 (0,0 %)	2 (10,5 %)
Dyslipidämie	0 (0,0 %)	6 (31,2 %)
Body-Mass-Index (kg/m ²)	25,7 ± 3,8	26,7 ± 3,1
Metabolisches Syndrom	1 (5,3 %)	4 (21,1 %)
Positive Familienanamnese	2 (10,5 %)	6 (31,2 %)

Tabelle 25: Anamnestiche Häufigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren den GHS Untergruppen. Dargestellt sind die Absolutzahlen (N) sowie der prozentuale Anteil (%) am Gesamtkollektiv bzw. Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Blutwerte	Mittelwert und Standardabweichung (SD)	
	GHS-RF	GHS+RF
Zahl der Probanden	19	19
Gesamtcholesterin (mg/dl)	234,0 ± 36,0	242,0 ± 39,0
LDL Cholesterin (mg/dl)	151,0 ± 31,0	153,0 ± 38,0
HDL Cholesterin (mg/dl)	65,0 ± 13,0	65,0 ± 18,0
Triglyzeride (mg/dl)	86,9 ± 28,6	118,0 ± 62,0

Glucose (mg/dl)	87,7 ± 5,5	90,5 ± 6,2
Kreatinin (mg/dl)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
CRP (mg/l)	1,4 ± 1,4	1,2 ± 0,7
Leukozyten, <i>WBC</i> (x10 ³ /μl)	6,2 ± 1,9	6,0 ± 1,4
Erythrozyten, <i>RBC</i> (x10 ³ /μl)	4,7 ± 0,5	4,6 ± 0,4
Hämatokrit (%)	43,2 ± 4,4	42,9 ± 2,7
Hämoglobin (g/dl)	14,3 ± 1,5	14,2 ± 1,0
Thrombozyten (x10 ³ /μl)	229,0 ± 33,0	264,0 ± 51,0

Tabelle 26: Übersicht über die laborchemische Basisdiagnostik im Blut der GHS Untergruppen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Medikation	Absolutzahl (N) und prozentualer Anteil (%) am Gesamtkollektiv	
	GHS-RF	GHS+RF
Zahl der Probanden	19	19
ACE-Hemmer/AT1-Rezeptorantagonisten	0 (0,0 %)	13 (68,4 %)
ASS	0 (0,0 %)	3 (15,8 %)
β-Blocker	0 (0,0 %)	4 (21,1 %)
Calcium-Antagonisten	0 (0,0 %)	5 (26,3 %)
Fibrate	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Marcumar/OAKs	0 (0,0 %)	1 (5,3 %)
Nitrate	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
P2Y12-Antagonisten	0 (0,0 %)	1 (5,3 %)
Statine	0 (0,0 %)	4 (21,1 %)

Tabelle 27: Medikation der GHS Untergruppe. Dargestellt sind die Absolutzahlen (N) sowie der prozentuale Anteil (%) am Gesamtkollektiv.

Die GHS+RF Gruppe weist im Vergleich zu den GHS-RF Probanden erwartungsgemäß ein kardiovaskuläres Risikoprofil auf (insbesondere arterielle Hypertonie, Dyslipidämie und Metabolisches Syndrom), während sich die Laborwerte beider Gruppen nicht wesentlich unterscheiden. Zudem zeigt das GHS+RF Kollektiv ein für das Vorliegen der genannten kardiovaskulären Risikofaktoren typisches Medikationsprofil auf.

4.1.4 Probandenkollektiv < 35 Jahre

Außerdem wurden 19 geschlechts-gematchte Personen mit einem Lebensalter < 35 Jahre und ohne bekannte kardiovaskuläre Risikofaktoren oder Erkrankungen mit in die Studie eingeschlossen.

Allgemeine Charakteristika	Mittelwert und Standardabweichung (SD)
Zahl der Probanden	19
Alter männlich und weiblich	23,7 ± 4,0
Alter männlich	25,9 ± 4,7
Alter weiblich	21,7 ± 1,6

Tabelle 28: Allgemeine Charakteristika der < 35 Jahre Untergruppe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Absolutzahl (N) und prozentualer Anteil (%) am Gesamtkollektiv bzw. Mittelwert und Standardabweichung (SD)
Zahl der Patienten	19
Nikotinabusus (aktuell)	0 (0,0 %)
Ex-Raucher	0 (0,0 %)
Nie-Raucher	19 (100 %)
Arterielle Hypertonie	0 (0,0 %)
Diabetes mellitus Typ 2	0 (0,0 %)
Dyslipidämie	0 (0,0 %)
Body-Mass-Index (kg/m ²)	21,6 ± 2,9
Metabolisches Syndrom	0 (0,0 %)
Positive Familienanamnese	0 (0,0 %)

Tabelle 29: Anamnestiche Häufigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren der pAVK Std. III/IV Untergruppe. Dargestellt sind die Absolutzahlen (N) sowie der prozentuale Anteil (%) am Gesamtkollektiv bzw. Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Blutwerte	Mittelwert und Standardabweichung (SD)
Zahl der Probanden	19
Gesamtcholesterin (mg/dl)	193,6 ± 23,7
LDL Cholesterin (mg/dl)	104,8 ± 15,7
HDL Cholesterin (mg/dl)	65,0 ± 21,4
Triglyzeride (mg/dl)	119,4 ± 60,2
Glucose (mg/dl)	86,1 ± 11,6
Kreatinin (mg/dl)	0,9 ± 0,1
CRP (mg/l)	1,3 ± 1,4
Leukozyten, WBC (x10 ³ /μl)	5,9 ± 1,0
Erythrozyten, RBC (x10 ³ /μl)	4,7 ± 0,3

Hämatokrit (%)	42,2 ± 3,1
Hämoglobin (g/dl)	14,2 ± 1,4
Thrombozyten (x10 ³ /μl)	245,0 ± 45,4

Tabelle 30: Übersicht über die laborchemische Basisdiagnostik im Blut der < 35 Jahre Untergruppe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (SD).

Alle Probanden der < 35 Jahre Gruppe nahmen erwartungsgemäß keine Medikamente ein und wiesen keine kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen auf.

4.1.5 Übersichtstabelle klinische Charakteristika aller untersuchten Patienten- und Probandenkollektive

In der nachfolgenden Darstellung sind die o.g. und bereits diskutierten Charakteristika der 5 Untergruppen zum direkten Vergleich in einer Übersichtstabelle zusammengefasst.

Allgemeine Charakteristika	Absolutzahl (N) und prozentualer Anteil (%) am Gesamtkollektiv				
	Bzw. Mittelwert und Standardabweichung (SD)				
	pAVK Std. II	pAVK Std. III/IV	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Zahl der Patienten			19		
Männlich			9 (47,4 %)		
Weiblich			10 (52,6 %)		
Alter männlich und weiblich	67,4 ± 8,1	68,9 ± 10,8	23,7 ± 4,0	66,1 ± 9,5	67,2 ± 7,3
Alter männlich	58,4 ± 22,1	65,3 ± 9,9	25,9 ± 4,7	62,2 ± 10,8	65,0 ± 8,3
Alter weiblich	69,6 ± 7,4	72,1 ± 10,9	21,7 ± 1,6	69,1 ± 7,4	69,1 ± 6,1
Kardiovaskuläre Risikofaktoren					
Nikotinabusus (aktuell)	7 (36,8 %)	1 (5,2 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (5,3 %)
Ex-Raucher	10 (52,6 %)	13 (68,4 %)	0 (0,0 %)	10 (52,6 %)	8 (42,1 %)
Nie-Raucher	2 (10,5 %)	5 (26,3 %)	19 (100 %)	9 (47,4 %)	10 (52,6 %)
Arterielle Hypertonie	16 (84,2 %)	11 (57,9 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	14 (73,7 %)

Diabetes mellitus Typ 2	6 (31,6 %)	8 (42,1 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	2 (10,5 %)
Dyslipidämie	14 (73,7 %)	9 (47,3 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	6 (31,2 %)
Body-Mass-Index (kg/m ²)	27,6 ± 4,8	26,8 ± 4,3	21,6 ± 2,9	25,7 ± 3,8	26,7 ± 3,1
Metabolisches Syndrom	8 (42,1 %)	4 (21,1 %)	0 (0,0 %)	1 (5,3 %)	4 (21,1 %)
Positive Familienanamnese	2 (10,5%)	4 (21,1 %)	0 (0,0 %)	2 (10,5 %)	6 (31,2 %)
Blutwerte					
Gesamtcholesterin (mg/dl)	192,7 ± 34,7	178,1 ± 53,9	193,6 ± 23,7	234,0 ± 36,0	242,0 ± 39,0
LDL Cholesterin (mg/dl)	101,4 ± 30,9	100,9 ± 43,8	104,8 ± 15,7	151,0 ± 31,0	153,0 ± 38,0
HDL Cholesterin (mg/dl)	59,1 ± 16,8	53,3 ± 17,3	65,0 ± 21,4	65,0 ± 13,0	65,0 ± 18,0
Triglyzeride (mg/dl)	161,0 ± 70,4	120,4 ± 46,5	119,4 ± 60,2	86,9 ± 28,6	118,0 ± 62,0
Glukose (mg/dl)	102,3 ± 13,8	1,0 ± 0,4	86,1 ± 11,6	87,7 ± 5,5	90,5 ± 6,2
Kreatinin (mg/dl)	0,9 ± 0,1	134,2 ± 51,8	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
CRP (mg/l)	2,6 ± 1,6	18,9 ± 21,0	1,3 ± 1,4	1,4 ± 1,4	1,2 ± 0,7
Leukozyten (x10 ³ /μl)	7,9 ± 1,4	11,7 ± 7,6	5,9 ± 1,0	6,2 ± 1,9	6,0 ± 1,4
Erythrozyten (x10 ³ /μl)	4,6 ± 0,6	4,3 ± 0,6	4,7 ± 0,3	4,7 ± 0,5	4,6 ± 0,4
Hämatokrit (%)	42,6 ± 4,3	41,8 ± 13,5	42,2 ± 3,1	43,2 ± 4,4	42,9 ± 2,7
Hämoglobin (g/dl)	14,2 ± 1,3	14,1 ± 6,0	14,2 ± 1,4	14,3 ± 1,5	14,2 ± 1,0
Thrombozyten (x10 ³ /μl)	263,0 ± 58,3	285,4 ± 113,8	245,0 ± 45,4	229,0 ± 33,0	264,0 ± 51,0

Medikation					
ACE-Hemmer/ AT1-Rezeptor- antagonisten	12 (63,2 %)	9 (47,4 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	13 (68,4 %)
ASS	17 (89,5 %)	11 (57,9 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	3 (15,8 %)
β-Blocker	10 (52,6 %)	6 (31,6 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	4 (21,1 %)
Calcium- Antagonisten	11 (57,9 %)	3 (15,8 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	5 (26,3 %)
Fibrate	1 (5,3 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Marcumar/ OAKs	2 (10,5 %)	5 (26,3 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (5,3 %)
Nitrate	0 (0,0 %)	1 (5,3 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
P2Y12- Antagonisten	2 (10,5 %)	8 (42,1 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (5,3 %)
Statine	15 (78,9 %)	9 (47,4 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	4 (21,1 %)

Tabelle 31: Übersichtstabelle Allgemeine Charakteristika, Anamnestische Häufigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren, Laborchemische Basisdiagnostik und Medikation aller Untergruppen. Dargestellt sind Absolutzahlen (N) sowie der prozentuale Anteil (%) am Gesamtkollektiv bzw. Mittelwert und Standardabweichung (SD).

4.2 Quantitative Proteinbestimmung mittels ELISA: Vergleich mit gesunden, jungen sowie alters- und geschlechts-gematchten Kontrollprobanden

Für die Analyse der im Blut zirkulierenden Biomarker in den verschiedenen Untergruppen erfolgte deren quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung mittels ELISA. Zunächst haben wir in einer ersten Analyse die Werte der pAVK Std. II Gruppe dem gesunden Vergleichskollektiv der < 35-Jährigen gegenübergestellt.

Da der Altersunterschied der für den obigen Vergleich verwendeten Kollektive und das Fehlen von kardiovaskulären Risikofaktoren in der Gruppe der < 35-Jährigen als mögliche Confounder die Ergebnisse beeinflusst haben könnten, wählten wir für einen zweiten Vergleich zwei GHS-Kollektive aus: Hierbei handelt sich zum einen um alters- & geschlechtsgematchte Personen ohne kardiovaskuläres Risikoprofil (GHS-RF). Dem weiteren Vergleich dienten alters- & geschlechtsgematchte Probanden mit mindestens 2 vorliegenden kardiovaskulären Risikofaktoren (GHS+RF), was insbesondere zur Beantwortung der Fragestellung diente, inwieweit kardiovaskuläre Risikofaktoren (zusätzlich zum Alter) Einfluss auf die Plasmaspiegel von sEPCR und anderen Biomarkern nehmen.

4.2.1 Bestimmung der sEPCR Konzentrationen im Plasma

EPCR wird von Endothelzellen exprimiert und ist maßgeblich an der Aktivierung von Protein C beteiligt. Aktiviertes Protein C vermittelt sowohl antikoagulatorische als auch zytoprotektive Effekte, welche grundlegend für den Erhalt einer intakten Endothelfunktion sind. Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte die Messung des von der Endothelmembran abgespaltenen löslichen EPCRs (*soluble EPCR*; sEPCR) als möglicher Biomarker einer endothelialen Dysfunktion im Rahmen einer pAVK.

4.2.1.1 Plasma-Konzentration von sEPCR

sEPCR (ng/ml)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	19	19
Prozent (%)	100	100	100	100
Normalverteilung	nein	nein	nein	nein
Median	23,8	15,4	22,2	35,0
Quartile	(11,9; 34,1)	(5,4; 27,7)	(8,8; 58,9)	(27,4; 53,1)

Tabelle 32: Bestimmung von sEPCR im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der Median und 25. bzw. 75. Quartil.

Die Gruppe der pAVK Std. II Patienten wies im Mittel höhere sEPCR Konzentrationen im Plasma auf als die < 35-Jährigen. Dieser Konzentrationsunterschied war jedoch im *Mann-Whitney* Test statistisch nicht signifikant ($p=0,1458$).

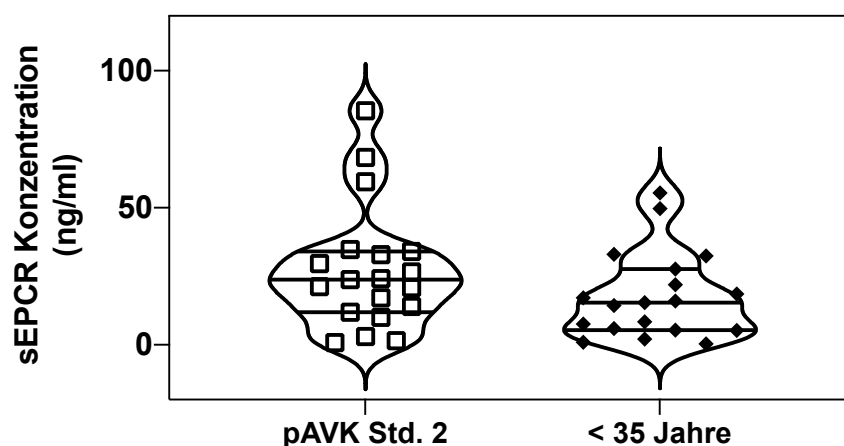


Abbildung 5: sEPCR im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Mann-Whitney Test. $p=0,1458$

Der *Kruskal-Wallis* Test für die 3 Untergruppen GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II, gefolgt vom *Dunn's multiple comparisons* Test, bestätigte das Fehlen signifikanter Unterschiede von sEPCR für den Vergleich von pAVK Std. II Patienten mit den beiden

GHS-Kollektiven (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p > 0,9999$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p = 0,2898$). Auch die beiden GHS-Kollektive unterschieden sich nicht signifikant voneinander (GHS-RF vs. GHS+RF $p = 0,8210$).

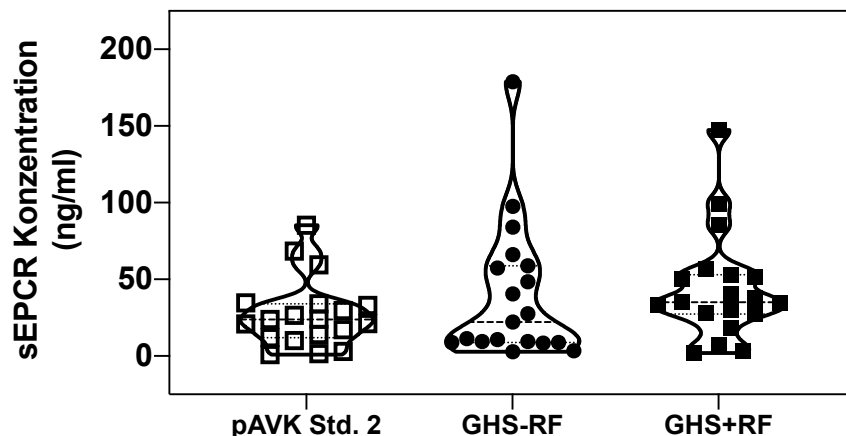


Abbildung 6: sEPCR im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Kruskal-Wallis Test, gefolgt von Dunn's multiple comparisons Test. pAVK Std. II vs. GHS-RF $p > 0,9999$; pAVK Std.2 vs. GHS+RF $p = 0,2898$; GHS-RF vs. GHS+RF $p = 0,8210$

Im Einzelgruppenvergleich mittels *Mann-Whitney* Test hingegen konnten wir einen signifikanten Konzentrationsunterschied der pAVK Std. II Patienten gegenüber dem GH+RF Kollektiv nachweisen ($p = 0,0400$). Alle weiteren Zweier-Vergleiche mit diesem statistischen Test blieben ohne statistische Signifikanz (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p = 0,8853$; GHS-RF vs. GHS+RF $p = 0,5063$).

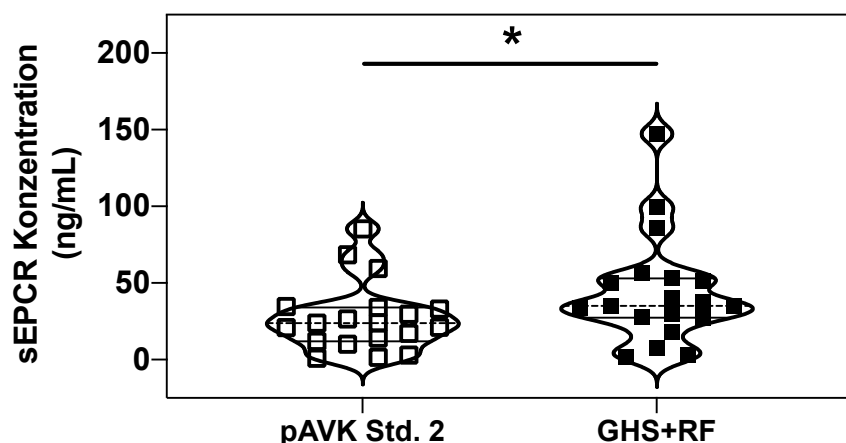


Abbildung 7: sEPCR im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Mann-Whitney Test. $p = 0,0400$

Im Vergleich aller 4 Untergruppen miteinander im *Kruskal-Wallis* Test gefolgt vom *Dunn's multiple comparisons* Test konnten wir zudem einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen dem GHS+RF Kollektiv und den < 35 -Jährigen detektieren ($p = 0,0176$).

4.2.2 Bestimmung der ADAM17 Konzentrationen im Plasma

ADAM17 ist als Metalloprotease maßgeblich am EPCR *Shedding* von der Endothelzellmembran beteiligt. Seine Bestimmung diene der Beantwortung der Fragestellung, inwieweit mögliche Unterschiede in der sEPCR Plasmakonzentration auf Veränderungen von ADAM17 und des ADAM17-vermittelten EPCR *Sheddings* zurückzuführen sein könnten.

4.2.2.1 Plasma-Konzentration von ADAM17

ADAM17 (pg/ml)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	19	19
Prozent (%)	100	100	100	100
Normalverteilung	nein	nein	nein	nein
Median	196,4	267,1	204,2	186,8
Quartile	(184,8; 248,7)	(176,2; 464,2)	(188,9; 370,3)	(166,2; 263,2)

Tabelle 33: Bestimmung von ADAM17 im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der der Median und 25. bzw. 75. Quartil.

Zwar lagen für ADAM17 bei der pAVK Std. II Patienten im Mittel niedrigere Werte vor als bei den < 35-Jährigen, statistisch war dieser Konzentrationsunterschied jedoch im *Mann-Whitney* Test nicht signifikant ($p=0,1720$). Bezüglich einer möglichen Korrelation der beiden Biomarker untereinander, siehe Kapitel 4.4.1.

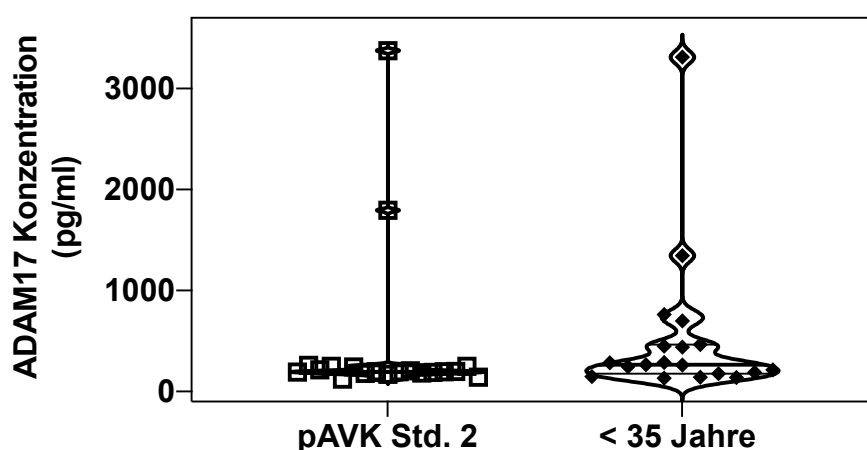


Abbildung 8: ADAM17 im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Mann-Whitney Test. $p=0,1720$

Der *Kruskal-Wallis* Test für die 3 Untergruppen GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II, gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* Test, zeigte auch für den Vergleich von pAVK

Std. II Patienten mit den GHS-Kollektiven keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von ADAM17 (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p > 0,9999$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p > 0,9999$). Auch die beiden GHS-Kollektive unterschieden sich nicht signifikant voneinander (GHS-RF vs. GHS+RF $p = 0,3536$).

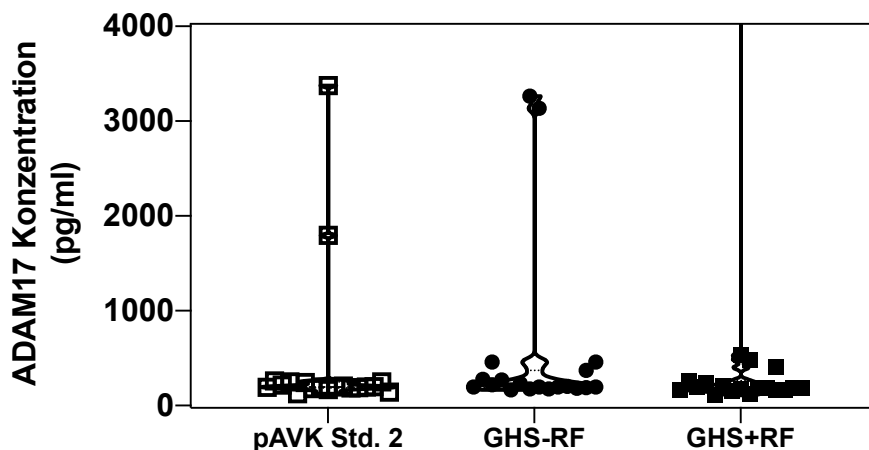


Abbildung 9: ADAM17 im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Kruskal-Wallis Test, gefolgt von Dunn's multiple comparisons Test. pAVK Std. II vs. GHS-RF $p > 0,9999$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p > 0,9999$; GHS-RF vs. GHS+RF $p = 0,3536$

Auch im Einzelgruppenvergleich mittels *Mann-Whitney* Test konnten wir keine signifikanten Konzentrationsunterschiede detektieren (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p = 0,3813$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p = 0,4181$; GHS-RF vs. GHS+RF $p = 0,1438$).

4.2.3 Bestimmung von Protein C Aktivität

Protein C ist eine Protease, die nach Aktivierung zu Aktiviertem Protein C (APC) sowohl antikoagulatorische als auch zytoprotektive Wirkungen vermittelt. Die Aktivierung der Protease erfolgt durch die Bindung von Thrombin und Thrombomodulin an EPCR, wodurch über die nachfolgende Aktivierung des PAR1 Signalwegs zytoprotektive Signalkaskaden eingeleitet werden. APCs antikoagulatorische Wirkung erfolgt nach der Dissoziation vom EPCR Rezeptor durch die Proteolyse und damit Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa.

4.2.3.1 Plasma-Konzentration von der Protein C Aktivität

Protein C Aktivität (%)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	18	18
Prozent (%)	100	100	94,7	94,7
Normalverteilung	nein	ja	ja	nein
Median	121,0			130,0

Mittelwert		110,8	120,8
Quartile	(110,0;		(102,0;
	140,0)		141,5)
SD		$\pm 15,1$	$\pm 13,9$

Tabelle 34: Bestimmung der Protein C Aktivität im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der Median bzw. Mittelwert und 25. sowie 75. Quartil bzw. Standardabweichung (SD).

Die Gruppe der pAVK Std. II Patienten wies im Mittel höhere Protein C Aktivität auf als die Gruppe der < 35-Jährigen. Im Vergleich durch den *Mann-Whitney* Test war dieser Konzentrationsunterschied mit einem p-Wert von 0,0783 jedoch statistisch nicht signifikant.

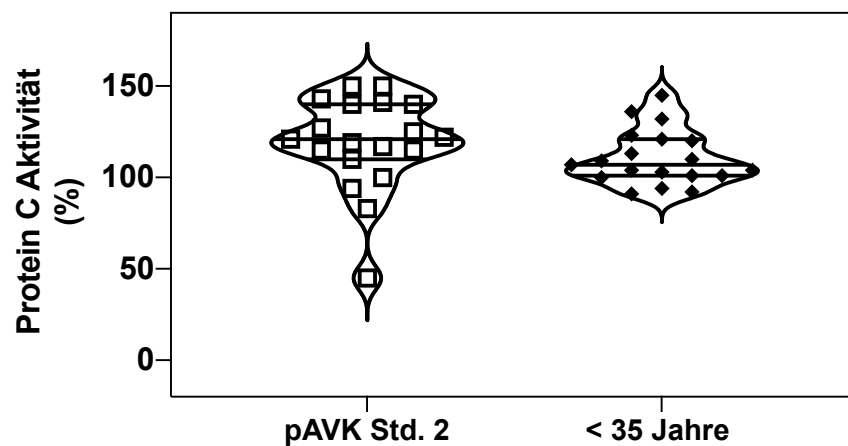


Abbildung 10: Protein C Aktivität im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Mann-Whitney Test. $p=0,0783$

Der *Kruskal-Wallis* Test für die 3 Untergruppen GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II, gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* Test, ergab auch für den Vergleich von pAVK Std. II Patienten mit den GHS-Kollektiven keine signifikanten Unterschiede für die Protein C Aktivität (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p>0,9999$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p>0,9999$). Auch die beiden GHS-Kollektive unterschieden sich nicht signifikant voneinander (GHS-RF vs. GHS+RF $p>0,9999$).

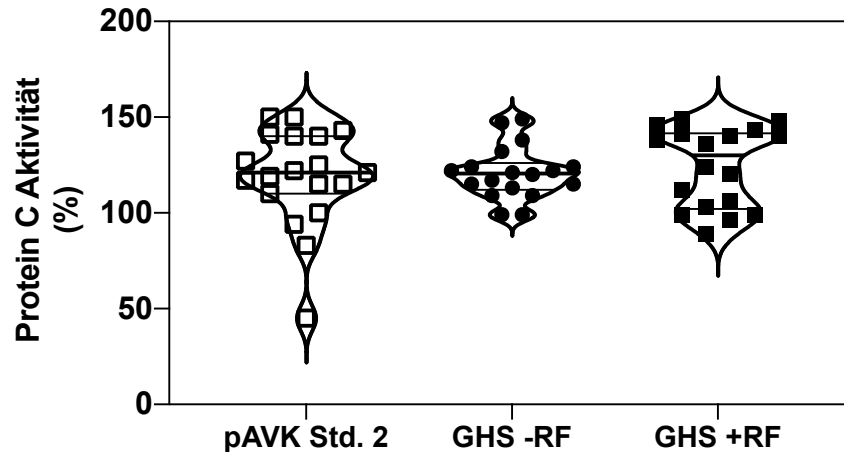


Abbildung 11: Protein C Aktivität im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Kruskal-Wallis Test, gefolgt von Dunn's multiple comparisons Test. pAVK Std. II vs. GHS-RF $p > 0,9999$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p > 0,9999$; GHS-RF vs. GHS+RF $p > 0,9999$

Auch im Einzelgruppenvergleich mittels *Mann-Whitney* Test konnten wir keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zeigen (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p = 0,7466$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p = 0,7695$; GHS-RF vs. GHS+RF $p = 0,6555$).

4.2.4 Bestimmung von NO

Das Griess Reagent diente der Messung von NO (bzw. seiner stabilen Metaboliten Nitrit/Nitrat) im Plasma der Probanden. Die Freisetzung von NO durch das Endothel vermittelt diverse Prozesse, die unter anderem an der Angiogenese und der Regulation der Gefäßweite beteiligt sind. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten im Mausmodell zeigen, dass eine erhöhte Expression von Hämoglobin in Endothelzellen von Mäusen mit genetischem Defekt des EPCR Signalweges zu einem vermehrten Hb-vermittelten NO *Scavenging* und einer Beeinträchtigung angiogenetischer Prozesse führen.

4.2.5 Plasma-Konzentration von NO 1

Griess Reagent (ng/ml)	pAVK Std. II	< 35 Jahre
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19
Prozent (%)	100	100
Normalverteilung	nein	nein
Median	7,7	6,9
Quartile	(5,5; 16,3)	(4,4; 13,5)

Tabelle 35: Bestimmung von NO im Plasma der Gruppen (1). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der Median und 25. sowie 75. Quartil.

Die Durchführung des Griess Reagents erfolgte in einer ersten Analyse für die beiden Gruppen pAVK Std. II und < 35 Jahre. In einer zweiten Analyse erfolgte die

Konzentrationsbestimmung von NO für GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II. Die Messwerte der Analyse 1 und 2 erscheinen deswegen in getrennten Tabellen und können nicht direkt miteinander verglichen werden.

Die Gruppe der pAVK Std. II Patienten wies ähnliche NO Spiegel auf wie die der < 35-Jährigen, was der *Mann-Whitney Test* bestätigte ($p=0,4392$).

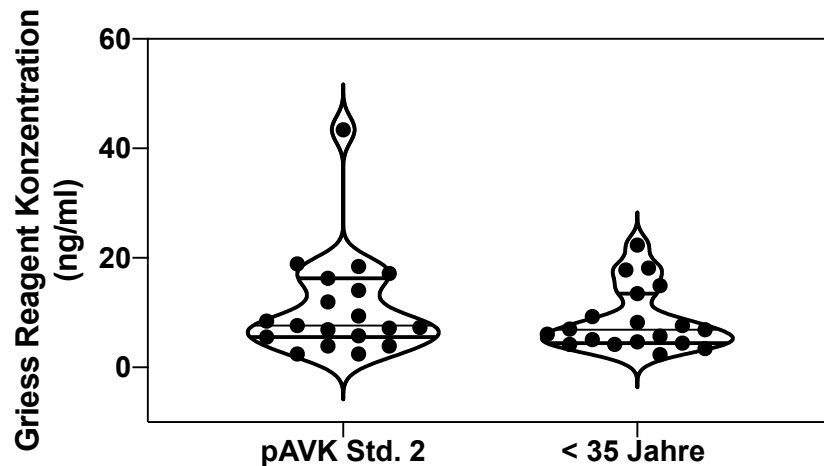


Abbildung 12: NO im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels Griess Reagent gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Mann-Whitney Test*. $p=0,4392$

4.2.6 Plasma-Konzentration von NO 2

Griess Reagent (ng/ml)	pAVK Std. II	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	18	17
Prozent (%)	100	94,7	89,5
Normalverteilung	nein	ja	ja
Median	12,0		
Mittelwert		61,2	58,7
Quartile	(8,3; 24,7)		
SD		$\pm 39,2$	$\pm 41,8$

Tabelle 36: Bestimmung von NO im Plasma der Gruppen (2). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels *Shapiro-Wilk Test*) sowie der Median bzw. Mittelwert und 25. sowie 75. Quartil bzw. Standardabweichung (SD).

In einer zweiten Messung wurden nur die Konzentrationen der 3 Untergruppen pAVK Std. II, GHS-RF und GHS+RF gemessen. Hierbei waren die NO-Spiegel im Plasma der pAVK Std. II deutlich niedriger als die im Plasma der Probanden der GHS-RF und GHS+RF Kollektive. Der *Kruskal-Wallis Test*, gefolgt von *Dunn's multiple comparisons Test*, bestätigte das Vorliegen signifikanter Konzentrationsunterschiede (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,0321$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,0239$). Der Vergleich der GHS-Kollektive untereinander hingegen blieb ohne Signifikanz ($p>0,9999$).

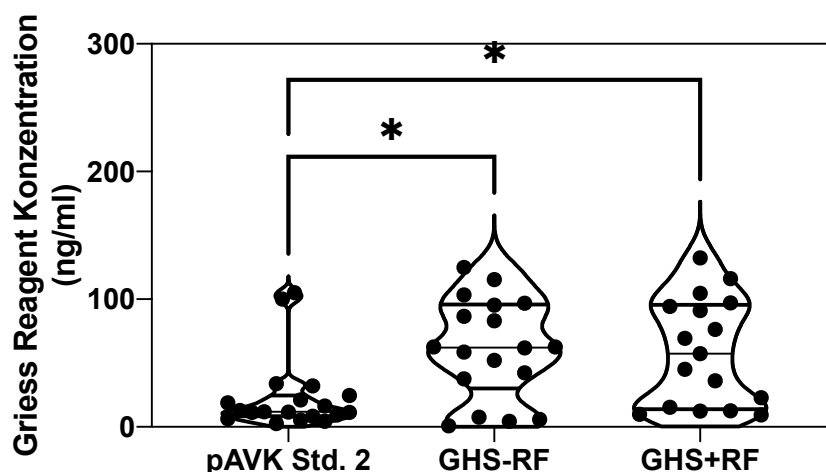


Abbildung 13: NO im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels Griess Reagent gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Kruskal-Wallis Test, gefolgt von Dunn's multiple comparisons Test. pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,0321$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,0239$; GHS-RF vs. GHS+RF $p>0,9999$

Auch im Einzelgruppenvergleich mittel *Mann-Whitney* Test konnten signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen pAVK Std. II Patienten und Probanden der GHS Kohorten bestätigt werden (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,0134$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,0054$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Detektion relevanter Unterschiede zwischen den Gruppen möglich ist. Für GHS-RF vs. GHS+RF ergab der *Unpaired t-Test* einen p-Wert von 0,8550.

4.2.7 Bestimmung von E-Selectin im Plasma

E-Selectin ist ein von Endothelzellen exprimiertes Zelladhäsionsmolekül, welches eine zentrale Rolle bei der Anhaftung und Einwanderung von Immunzellen in die Gefäßwand spielt, ein Pathomechanismus, welcher die Grundlage atherosklerotischer Gefäßveränderungen darstellt. Sein Vorkommen im Plasma ist ein etablierter Biomarker für das Vorliegen einer Endotheldysfunktion.

4.2.7.1 Plasma-Konzentration von E-Selectin

E-Selectin (ng/ml)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	19	19
Prozent (%)	100	100	100	100
Normalverteilung	ja	ja	ja	ja
Mittelwert	37,5	29,7	24,9	30,8
SD	± 12,2	± 11,3	± 8,6	± 9,8

Tabelle 37: Bestimmung von E-Selectin im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der Mittelwert und die Standardabweichung (SD).

Die Gruppe der pAVK Std. II Patienten wies im Mittel höhere E-Selectin Konzentrationen auf als die der < 35-Jährigen. Im Vergleich durch den *Unpaired t-Test* war dieser Konzentrationsunterschied statistisch signifikant ($p=0,0485$).

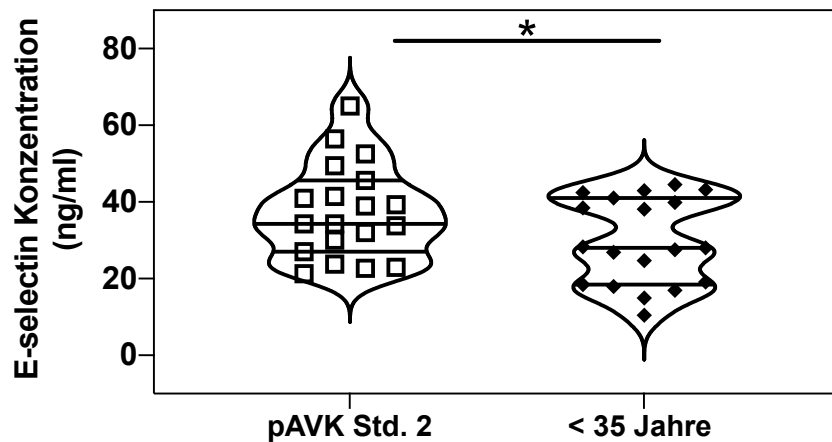


Abbildung 14: E-Selectin im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Unpaired t-Test*. * $p<0,0485$

Darüber hinaus wiesen pAVK Patienten im Std. II im Vergleich mit den beiden GHS Kohorten erhöhte E-Selectin Konzentrationen im Plasma auf, allerdings ergab die statistische Analyse (mittels *One-way ANOVA Test* gefolgt von *Sidak's multiple comparisons Test* für die 3 Untergruppen GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II) nur für den Vergleich mit der GHS-RF Untergruppe hoch-signifikante Unterschiede ($p=0,0012$), während die E-Selectin Plasmakonzentration sich nicht von der in der GHS+RF Kohorte unterschieden ($p=0,1455$). Auch der Unterschied zwischen den beiden GHS Kollektiven war nicht signifikant ($p=0,2278$).

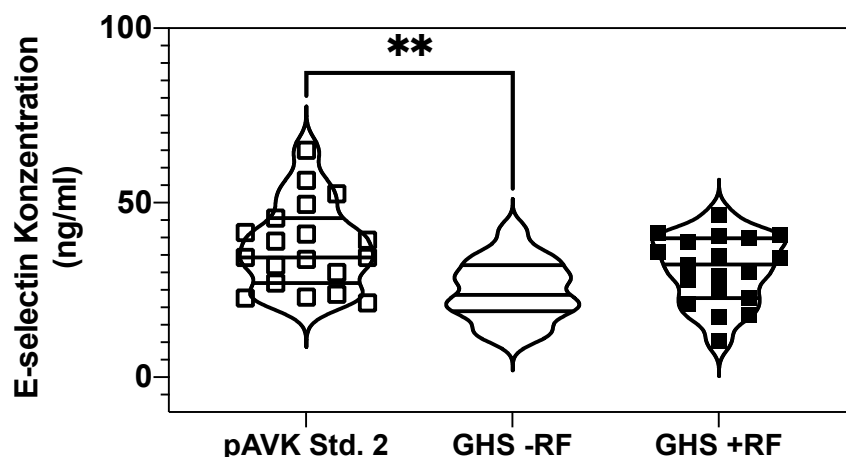


Abbildung 15: E-Selectin im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *One-way ANOVA*, gefolgt von *Sidak's multiple comparisons Test*. ** pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,0012$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,1455$; GHS-RF vs. GHS+RF $p=0,2278$

Auch die Einzelgruppenvergleiche mittels *Unpaired t-Test* zeigten im Vergleich von pAVK Std. II und GHS-RF einen hoch-signifikanten Konzentrationsunterschied ($p=0,0008$). Im Vergleich mit der GHS+RF Kohorte war der Unterschied mittels *Unpaired t-Test* grenzwertig signifikant ($p=0,0713$), ebenso wie der Vergleich der GHS-Kollektive untereinander ($p=0,0553$).

4.2.8 Bestimmung von hsCRP

Der klassische Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) wird als hochsensitives C-reaktives Protein (hsCRP) bezeichnet, wenn durch empfindliche Messmethoden sehr kleine Konzentrationen (< 5 mg/l) gemessen werden können. CRP wird als Entzündungsmediator eine kausale Rolle bei der atherosklerotischen Plaquebildung zugeschrieben. Zudem nimmt es eine wichtige Funktion in der Diagnostik der Arteriosklerose, der Koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts ein und gilt als einer der stärksten Indikatoren für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse bei genannten Erkrankungen.

4.2.8.1 Plasma-Konzentration von hsCRP

hsCRP (mg/L)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	18	19
Prozent (%)	100	100	94,7	100
Normalverteilung	ja	nein	nein	ja
Median		0,7	1,3	
Mittelwert	2,5			1,2
Quartile		(0,3; 1,9)	(0,4; 1,7)	
SD	$\pm 1,7$			$\pm 0,8$

Tabelle 38: Bestimmung von hsCRP im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der Median bzw. Mittelwert und 25. sowie 75. Quartil bzw. Standardabweichung (SD).

Die pAVK Std. II Patienten wiesen im Mittel höhere hsCRP Konzentrationen auf als die Gruppe der < 35-Jährigen. Im Vergleich mittels *Mann-Whitney Test* war dieser Konzentrationsunterschied statistisch hoch-signifikant ($p=0,0027$).

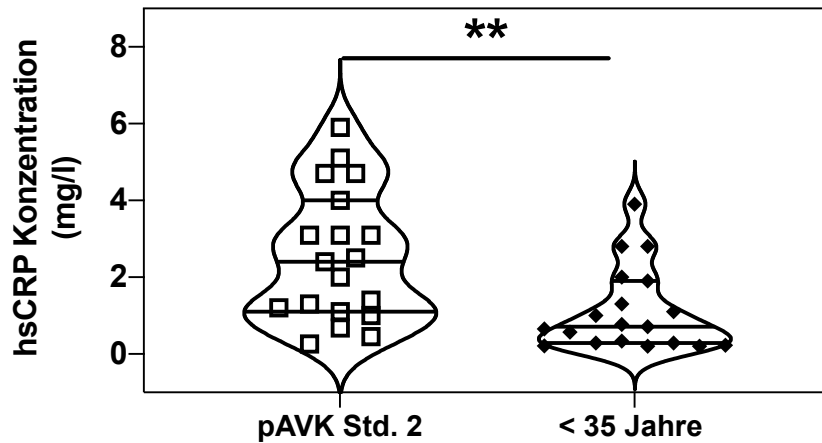


Abbildung 16: hsCRP im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Mann-Whitney Test. ** $p < 0,0027$

Auch im Vergleich zu beiden GHS Kollektiven wiesen die pAVK Std. II Patienten höhere hsCRP Spiegel auf. Dabei bestätigte der *Kruskal-Wallis* Test für die 3 Untergruppen GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II, gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* Test, für den Vergleich von pAVK Std. II vs. GHS-RF einen signifikanten Konzentrationsunterschied ($p=0,0428$), der Vergleich von pAVK Std. II vs. GHS+RF war dabei grenzwertig signifikant ($p=0,0558$). Der Unterschied der beiden GHS Kollektive war nicht signifikant ($p > 0,9999$).

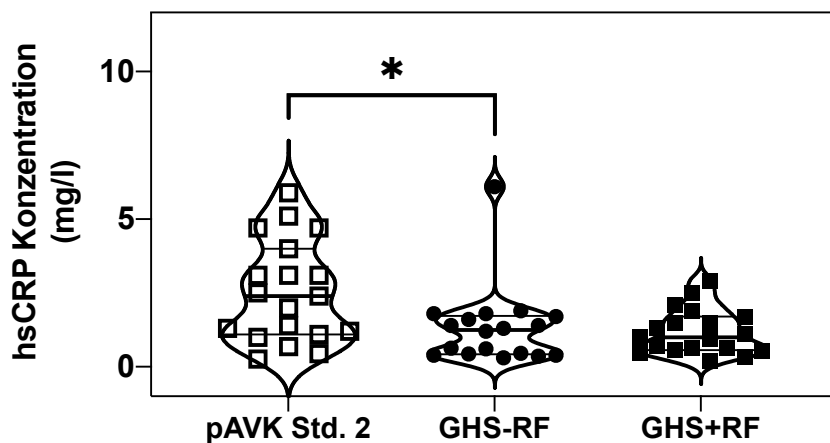


Abbildung 17: hsCRP im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Kruskal-Wallis* Test, gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* Test.. * pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,0428$; ** pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,0558$; GHS-RF vs. GHS+RF $p > 0,9999$

Ebenso bestätigte der Einzelgruppenvergleich mittels *Mann-Whitney* Test die signifikanten Konzentrationsunterschiede für hsCRP (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,0236$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,0106$). Der Vergleich der GHS-Kollektive untereinander blieb ohne Signifikanz ($p=0,7582$).

4.2.9 Bestimmung von TNF α

TNF α zählt zu den inflammatorischen Zytokinen, die im Rahmen von Entzündungsprozessen von Leukozyten freigesetzt werden. Es ist verantwortlich für die Aktivierung diverser intrazellulärer Signalkaskaden und beeinflusst sowohl die EPCR Aktivierung als auch dessen *Shedding*.

4.2.9.1 Plasma-Konzentration von TNF α

TNF α (pg/ml)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	19	19
Prozent (%)	100	100	100	100
Normalverteilung	ja	ja	ja	ja
Mittelwert	3,7	4,7	3,8	4,5
SD	$\pm 2,2$	$\pm 2,8$	$\pm 2,2$	$\pm 1,5$

Tabelle 39: Bestimmung von TNF α im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der Mittelwert und die Standardabweichung (SD).

Die Gruppe der pAVK Std. II Patienten wies ähnliche TNF α Konzentrationen auf wie die < 35-Jährigen, was der *Unpaired t-Test* bestätigte ($p=0,2405$).

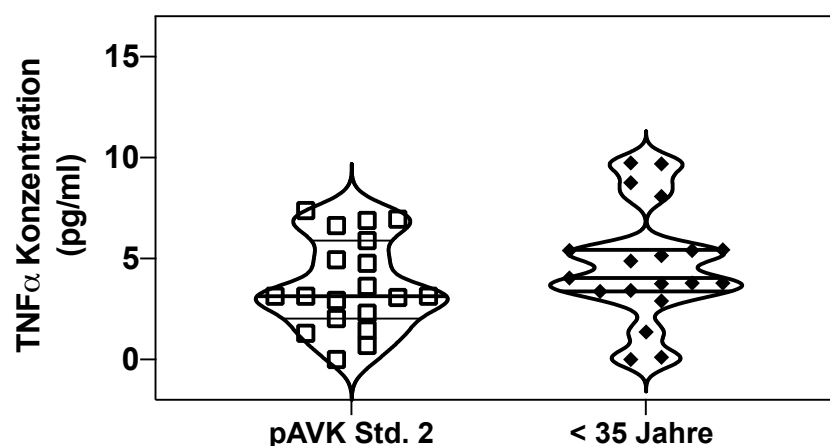


Abbildung 18: TNF α im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Unpaired t-Test*. $p=0,2405$

Auch im Vergleich mit den beiden GHS-Kollektiven zeigte der *One-way ANOVA* für die 3 Untergruppen GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II, gefolgt von *Sidak's multiple comparisons Test*, keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,9994$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,5726$; GHS-RF vs. GHS+RF $p=0,6458$).

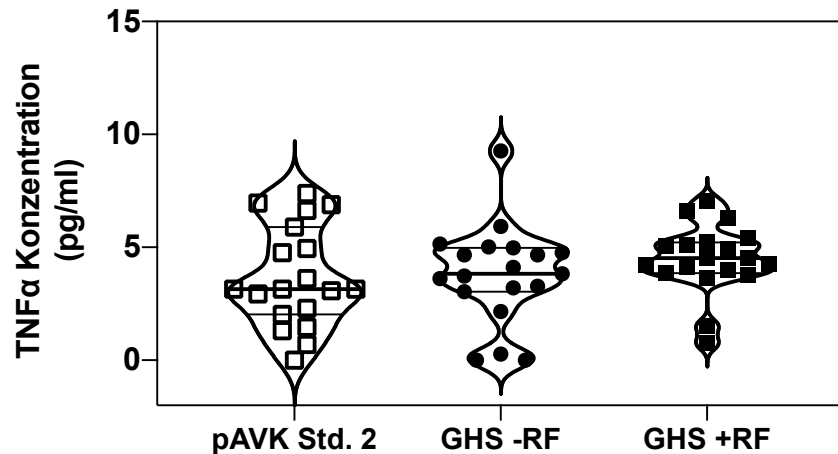


Abbildung 19: TNF α im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der One-way ANOVA, gefolgt von Sidak's multiple comparisons Test. pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,9994$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,5726$; GHS-RF vs. GHS+RF $p=0,6458$

Auch die Einzelgruppenvergleiche mittels *Unpaired t-Test* zeigten im Vergleich mit den GHS Kollektiven keine signifikanten Konzentrationsunterschiede für TNF α (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,9226$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,2263$; GHS-RF vs. GHS+RF $p=0,2643$).

4.2.10 Bestimmung von IL1 β

IL1 β ist ein Zytokin aus der Familie der Interleukine. Es wird u.a. von den Schaumzellen freigesetzt und fördert die Entstehung einer atherosklerotischer Entzündungsreaktion, wohingegen in späten Stadien auch antiinflammatorische Effekte von IL1 β beschrieben wurden.

4.2.10.1 Plasma-Konzentration von IL1 β

IL1 β (pg/ml)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	19	19
Prozent (%)	100	100	100	100
Normalverteilung	nein	nein	nein	nein
Median	0,3	0,0	0,2	0,0
Quartile	(0,0; 0,7)	(0,0; 0,5)	(0,0; 0,6)	(0,0; 0,6)

Tabelle 40: Bestimmung von IL1 β im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der der Median und 25. bzw. 75. Quartil.

Die Gruppe der pAVK Std. II Patienten wies im Mittel höhere IL1 β Konzentrationen auf als die der < 35-Jährigen, bei denen IL1 β vielfach nicht messbar war. Im Vergleich durch den *Mann-Whitney* Test war dieser Konzentrationsunterschied jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,2912$).

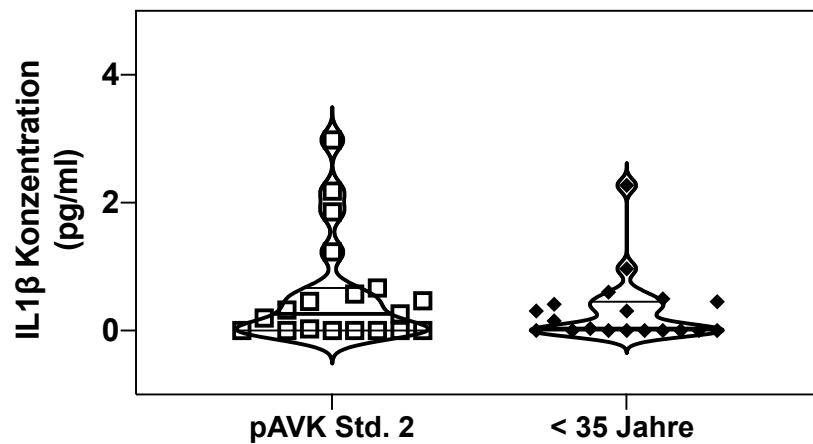


Abbildung 20: IL1 β im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Mann-Whitney* Test. $p=0,2912$

Auch im Vergleich der pAVK Std. II Kohorte mit beiden GHS-Kollektiven gab es keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von IL1 β , was der *Kruskal-Wallis*, gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* Test im Vergleich der 3 Untergruppen bestätigte (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p>0,9999$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,6353$). Der Vergleich der GHS-Kollektive untereinander blieb ebenfalls ohne Signifikanz ($p=0,9359$).

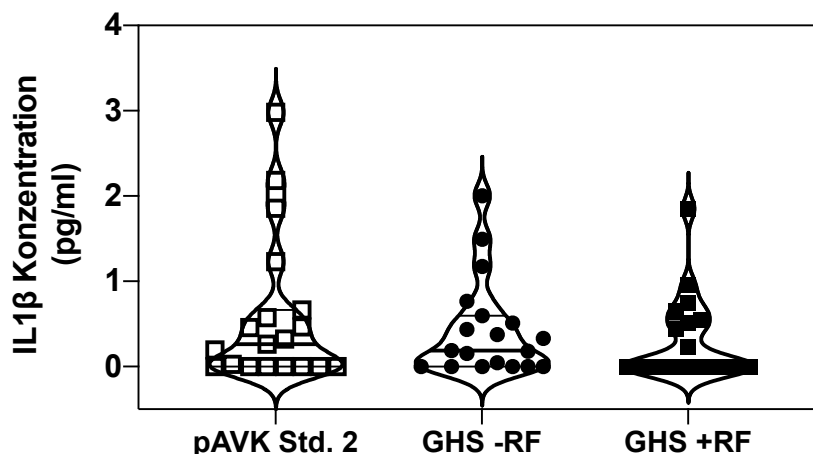


Abbildung 21: IL1 β im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Kruskal-Wallis* Test, gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* Test. pAVK Std. II vs. GHS-RF $p>0,9999$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,6353$; GHS-RF vs. GHS+RF $p=0,9359$

Auch die Einzelgruppenvergleiche mittels *Mann-Whitney* Test zeigten im Vergleich mit den GHS Kollektiven keine signifikanten Konzentrationsunterschiede für IL1 β zwischen

den Gruppen (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,8317$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,2120$; GHS-RF vs. GHS+RF $p=0,3198$).

4.2.11 Bestimmung von VEGF

Der Wachstumsfaktor VEGF spielt durch seine mitogene Wirkung auf Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Neubildung von Blutgefäßen und fördert die Neovaskularisierung in ischämischen Geweben. Im Rahmen von (bislang noch experimentellen Formen einer) Revaskularisationstherapie bei pAVK Patienten, der sogenannten therapeutischen Angiogenese, ist VEGF der am häufigsten eingesetzte Wachstumsfaktor.

4.2.11.1 Plasma-Konzentration von VEGF

VEGF (pg/ml)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	19	19
Prozent (%)	100	100	100	100
Normalverteilung	nein	ja	nein	nein
Median	38,1		23,2	18,5
Mittelwert		22,5		
Quartile	(20,1;		(13,1;	(7,3; 26,0)
SD	60,1)	$\pm 16,3$	29,5)	

Tabelle 41: Bestimmung von VEGF im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der Median bzw. Mittelwert und 25. sowie 75. Quartil bzw. Standardabweichung (SD).

Die Gruppe der pAVK Std. II Patienten wies im Mittel höhere VEGF Konzentrationen auf als die Gruppe der < 35-Jährigen. Im Vergleich erwies sich dieser Konzentrationsunterschied im *Mann-Whitney Test* als statistisch signifikant ($p=0,0168$).

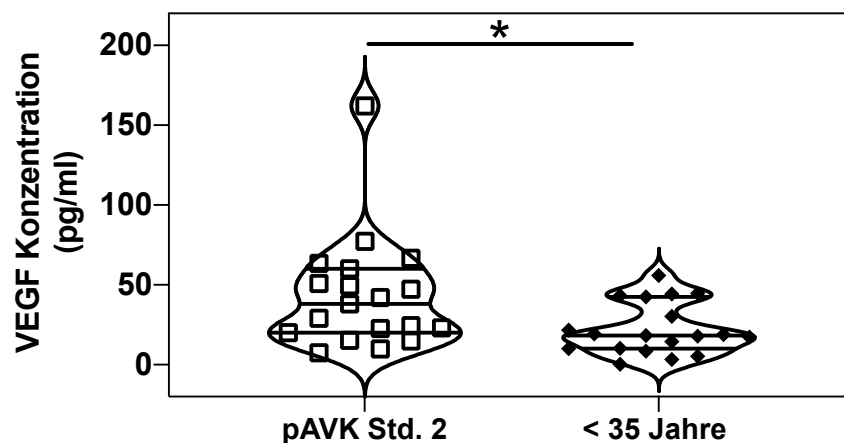


Abbildung 22: VEGF im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Mann-Whitney Test*. * $p=0,0168$

Auch im Vergleich zu den beiden GHS Kollektiven wiesen pAVK Std. II Patienten im Mittel höhere VEGF Spiegel auf, allerdings war im *Kruskal-Wallis* Test für die 3 Untergruppen GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II, gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* Test nur der Unterschied zwischen pAVK und GHS+RF statistisch signifikant ($p=0,0198$), für den Vergleich GHS-RF ergab sich ein p-Wert von 0,1838, für GHS-RF vs. GHS+RF zeigte sich keine Signifikanz ($p>0,9999$).

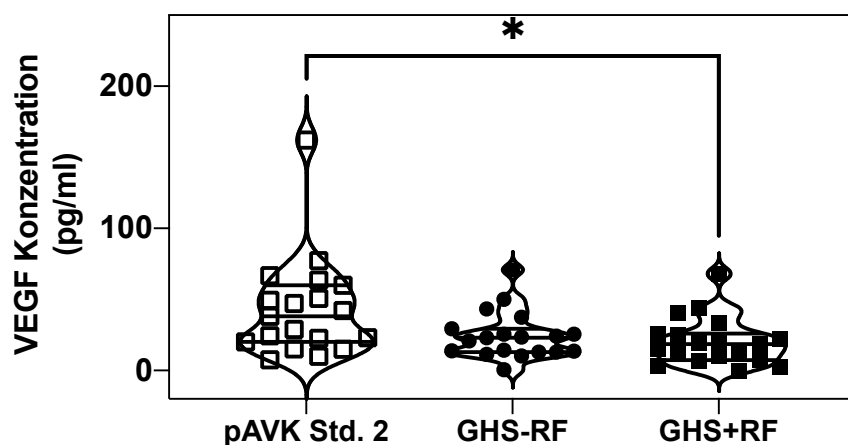


Abbildung 23: VEGF im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Kruskal-Wallis* Test gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* Test. pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,1838$; * pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,0198$; GHS-RF vs. GHS+RF $p>0,9999$

Im Einzelgruppenvergleich mittels *Mann-Whitney* Test konnten wir den signifikanten Konzentrationsunterschied von pAVK Std. II vs. GHS+RF bestätigen ($p=0,0070$), für pAVK Std. II vs. GHS-RF zeigte sich ein p-Wert von 0,0561. Der Vergleich der GHS-Kollektive untereinander blieb erneut ohne Signifikanz ($p=0,3813$).

4.2.12 Bestimmung von Tie2

Tie2 ist ein auf Endothelzellen exprimierter Tyrosinkinase-Rezeptor, der durch die Bindung von Angiopoietin 1 und 2 sowohl pro- als auch anti-angiogenetische Wirkungen entfaltet, in Abhängigkeit von der Konzentration der Liganden. Gewebeschämie stellt einen der stärksten Stimuli für die Aktivierung des Tie2 Signalwegs dar, während der Einfluss von Inflammation noch nicht endgültig geklärt ist.

4.2.12.1 Plasma-Konzentration von Tie2

Tie2 (ng/ml)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	19	19
Prozent (%)	100	100	100	100

Normalverteilung	ja	ja	ja	ja
Mittelwert	8,4	9,7	9,0	8,2
SD	± 1,2	± 1,7	± 1,8	± 1,5

Tabelle 42: Bestimmung von Tie2 im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der Mittelwert und die Standardabweichung (SD).

Die Gruppe der pAVK Std. II Patienten wies im Mittel niedrigere Tie2 Konzentrationen auf als die < 35-Jährigen. Im Vergleich mittels *Unpaired t-Test* war dieser Konzentrationsunterschied statistisch hoch-signifikant ($p=0,0099$).

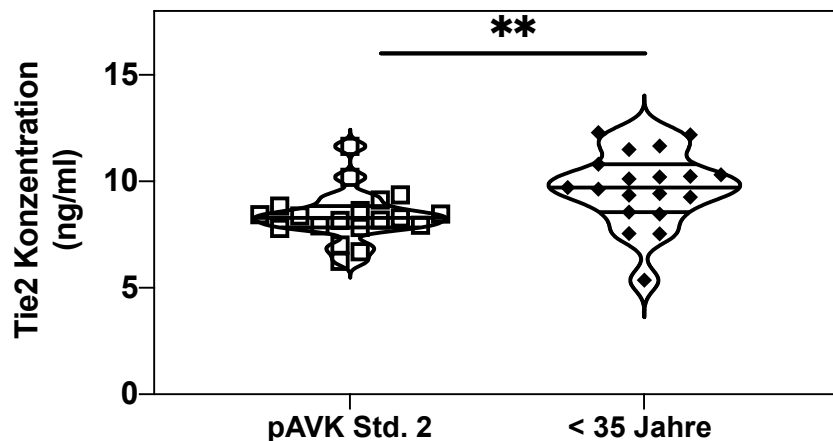


Abbildung 24: Tie2 im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Unpaired t-Test*. ** $p<0,0099$

Die erweiterte Analyse mittels *One-way ANOVA* für die 3 Untergruppen GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II, gefolgt von *Sidak's multiple comparison Test*, ergab für die pAVK Std. II Kohorte ähnlich hohe Tie2 Spiegel wie in Probanden des GHS-RF ($p=0,5911$) und des GHS+RF ($p=0,9614$) Kollektivs. Auch der Vergleich der GHS-Kollektive untereinander war statistisch nicht signifikant ($p=0,3167$).

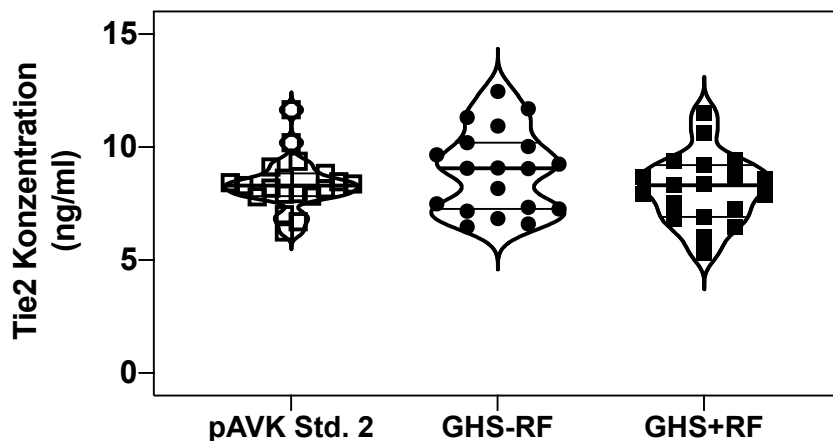


Abbildung 25: Tie2 im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *One-way ANOVA*, gefolgt von *Sidak's multiple comparison Test*. pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,5911$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,9614$; GHS-RF vs. GHS+RF $p=0,3167$

Auch die Einzelgruppenvergleiche mittels *Unpaired t-Test* zeigten für den Vergleich von pAVK Std. II Patienten mit den GHS Kollektiven keine signifikanten Konzentrationsunterschiede für Tie2 (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,2609$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,6263$). Auch der Vergleich der GHS-Kollektive untereinander war statistisch nicht signifikant (GHS-RF vs. GHS+RF $p=0,1564$).

4.2.13 Bestimmung von Notch

Der Notch Signalweg hat vielfältige Funktionen und ermöglicht unter anderem die Zell-Zell-Kommunikation benachbarter Zellen. Somit ist er für die Differenzierung und das Wachstum von Zellen, wie es im Rahmen der Gefäßneubildung vorkommt, wichtig. Durch seine Wirkung auf Endothelzellen spielt Notch eine wichtige Rolle für die Gefäßintegrität und die Angiogenese.

4.2.13.1 Plasma-Konzentration von Notch

Notch (pg/ml)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	18	19
Prozent (%)	100	100	94,7	100
Normalverteilung	nein	ja	ja	nein
Median	261,9			270,0
Mittelwert		296,3	306,7	
Quartile	(216,5, 356,2)			(228,9; 388,1)
SD		$\pm 120,5$	$\pm 109,8$	

Tabelle 43: Bestimmung von Notch im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der Median bzw. Mittelwert und 25. sowie 75. Quartil bzw. Standardabweichung (SD).

Die Gruppe der pAVK Std. II Patienten wies im Mittel ähnlich hohe Notch Konzentrationen auf wie die Gruppe der < 35-Jährigen und im Vergleich mittels *Mann-Whitney Test* war dieser Konzentrationsunterschied statistisch nicht signifikant ($p=0,8007$).

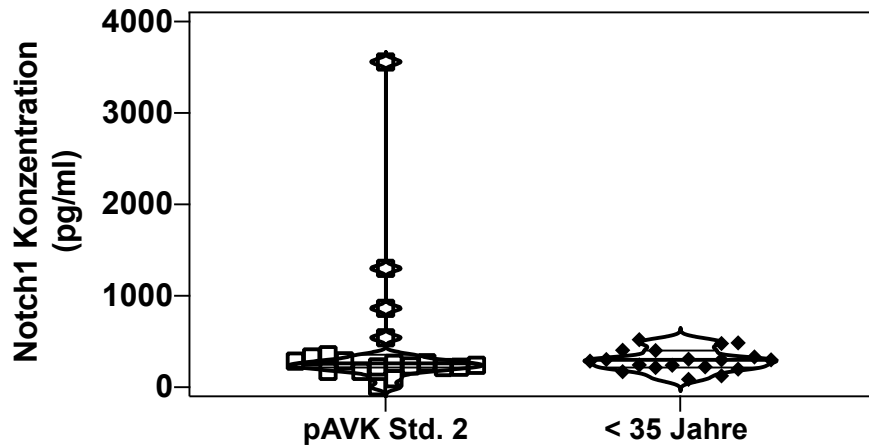


Abbildung 26: Notch im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Mann-Whitney Test. $p=0,8007$

Auch im Vergleich mit den beiden GHS-Kollektiven zeigte der *Kruskal-Wallis* Test für die 3 Untergruppen GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II, gefolgt von *Dunn's multiple comparisons* Test, keine signifikanten Konzentrationsunterschiede (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,9571$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p>0,9999$). Die beiden GHS-Kollektive unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander (GHS-RF vs. GHS+RF $p>0,9999$).

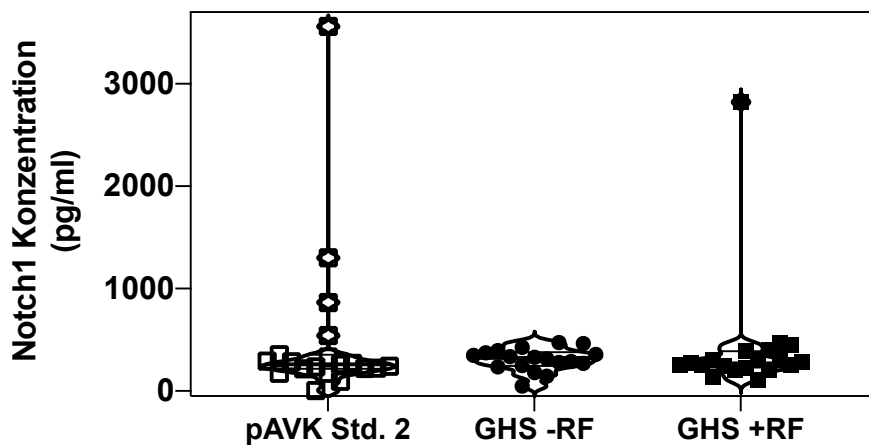


Abbildung 27: Notch im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Kruskal-Wallis* Test, *Dunn's multiple comparisons* Test. pAVK Std. II vs. GHS-RF $0,9571$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p>0,9999$; GHS-RF vs. GHS+RF $p>0,9999$

Auch die Einzelgruppenvergleiche mittels *Mann-Whitney* Test zeigten im Vergleich von pAVK Std. II Patienten mit den GHS Kollektiven keine signifikanten Konzentrationsunterschiede für Notch (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,3624$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,7130$; GHS-RF vs. GHS+RF $p=4659$).

4.2.14 Bestimmung von TGFβ

TGFβ ist ein Wachstumsfaktor, welcher unter anderem die Umdifferenzierung von Endothelzellen in mesenchymale Zellen fördert und eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Fibrose spielt und auch der Angiogenese entgegenwirkt. Untersuchungen der Arbeitsgruppe in Mausmodell konnten zeigen, dass die Induktion einer Hinterlaufischämie mit einer vermehrten TGFβ Expression verbunden ist, insbesondere in Tieren mit fehlender Expression von EPCR in Tie2-positiven Zellen.

4.2.14.1 Plasma-Konzentration von TGFβ

TGFβ (µg/ml)	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19	19	18
Prozent (%)	100	100	100	94,7
Normalverteilung	ja	ja	ja	ja
Mittelwert	2,5	1,6	1,7	2,7
SD	± 1,2	± 0,7	± 1,0	± 1,2

Tabelle 44: Bestimmung von TGFβ im Plasma der Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test) sowie der Mittelwert und die Standardabweichung (SD).

Die Gruppe der pAVK Std. II Patienten wies im Mittel höhere TGFβ Konzentrationen auf als die < 35-Jährigen. Im Vergleich mittels *Unpaired t-Test* war dieser Konzentrationsunterschied statistisch hoch-signifikant ($p=0,0087$).

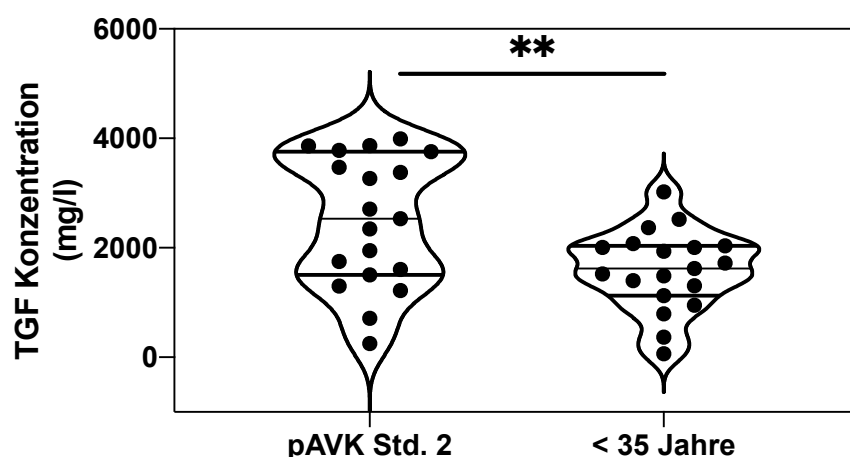


Abbildung 28: TGFβ im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der *Unpaired t-Test*. ** $p<0,0087$

Im Vergleich mit den GHS Kollektiven wiesen pAVK Std. II Patienten außerdem höhere TGFβ Spiegel als die Probanden der GHS-RF und der GHS+RF Kohorte auf. Der *One-*

way ANOVA für die 3 Untergruppen GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II, gefolgt von Sidak's multiple comparisons Test, ergab allerdings keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen (pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,1119$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,9586$. Ein signifikanter p-Werte lag hingegen für den Vergleich von GHS+RF vs. GHS-RF ($p=0,0454$) vor.

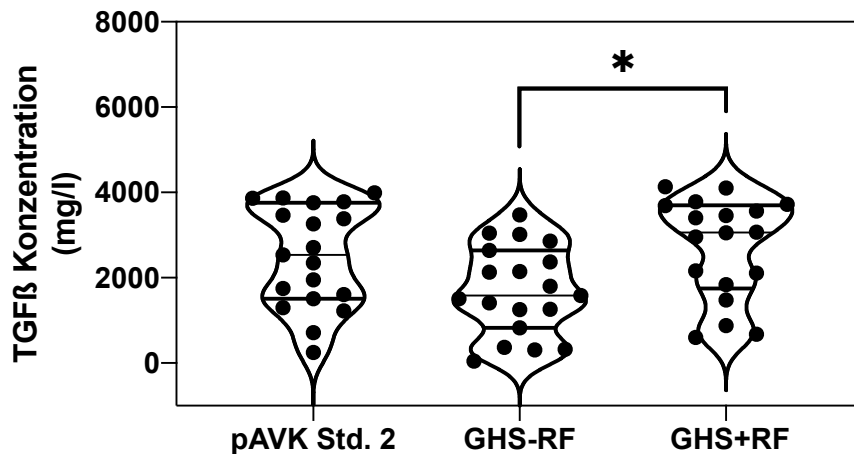


Abbildung 29: TGF β im Plasma der Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der One-way ANOVA, gefolgt von Sidak's multiple comparisons Test. pAVK Std. II vs. GHS-RF $p=0,1119$; pAVK Std. II vs. GHS+RF $p=0,9586$; * GHS-RF vs. GHS+RF $p=0,0454$

Im Einzelgruppenvergleich mittels *Unpaired t-Test* erwies sich hingegen auch der Konzentrationsunterschied zwischen pAVK Std. II und GHS-RF als signifikant ($p=0,0369$), während für pAVK Std. II vs. GHS+RF auch hier keine bedeutenden Konzentrationsunterschiede vorlagen ($p=0,6668$)—Der *Unpaired t-Test* bestätigte die Signifikanz von GHS-RF vs. GHS+RF mit einem p-Wert von 0,0156.

4.2.15 Zusammenfassung

Die in Tabelle 39 angegebene Signifikanzen (p-Werte) beziehen sich immer auf den Vergleich der jeweiligen Gruppe (< 35-Jährige, GHS-RF, GHS+RF) zum pAVK Std. II Kollektiv, und zwar bei Vergleich von jeweils nur zwei Gruppen (mittels *Mann-Whitney Test* bzw. *Unpaired t-Test*) oder der 3 Kollektive GHS-RF, GHS+RF und pAVK Std. II (mittels *Kruskal-Wallis* bzw. *One-Way ANOVA*).

	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
sEPCR (ng/ml)	23,8	15,0	22,2	35,0
<i>Mann-Whitney Test</i>		$p=0,1458$	$p=0,8853$	$p=0,0400$
		n.s.	n.s.	*

<i>Kruskal-Wallis Test</i>			p>0,9999 n.s.	p=0,2898 n.s.
ADAM17 (pg/ml)	196,4	267,1	204,2	186,8
<i>Mann-Whitney Test</i>		p=0,1720 n.s.	p=0,3813 n.s.	p=0,4181 n.s.
<i>Kruskal-Wallis Test</i>			p>0,9999 n.s.	p>0,9999 n.s.
Protein C Aktivität (%)	121,0	110,8	120,8	130,0
<i>Mann-Whitney Test</i>		p=0,0783 n.s.	p=0,7466 n.s.	P=0,7695 n.s.
<i>Kruskal-Wallis Test</i>			p>0,9999 n.s.	p>0,9999 n.s.
NO (ng/ml)	7,7 (1)	6,9	61,2	58,7
<i>Mann-Whitney Test</i>	bzw. 12,0 (2)	p=0,4392 n.s.	p=0,0134 *	p=0,0054 **
<i>Kruskal-Wallis Test</i>			p=0,0321 *	p=0,0239 *
E-Selectin (ng/ml)	37,5	29,7	24,9	30,8
<i>Unpaired t-Test</i>		p=0,0485 *	p=0,0008 ***	p=0,0713 n.s.
<i>One-way ANOVA</i>			p=0,0012 **	p=0,1455 n.s.
hsCRP (mg/l)	2,5	0,7	1,3	1,2
<i>Mann-Whitney Test</i>		p=0,0027 *	p=0,0236 *	p=0,0106 *
<i>Kruskal-Wallis Test</i>			p=0,0428 *	p=0,0558 n.s.
TNF α (pg/ml)	3,7	4,7	3,8	4,5
<i>Unpaired t-Test</i>		p=0,2405 n.s.	p=0,9226 n.s.	p=0,2263 n.s.

<i>One-way ANOVA</i>			p=0,9994 n.s.	p=0,5726 n.s.
IL1 β (pg/ml)	0,3	0,0	0,2	0,0
<i>Mann-Whitney Test</i>		p=0,2912 n.s.	p=0,8317 n.s.	p=0,2120 n.s.
<i>Kruskal-Wallis Test</i>			p>0,9999 n.s.	p=0,6353 n.s.
VEGF (pg/ml)	38,1	22,5	23,2	18,5
<i>Mann-Whitney Test</i>		p=0,0168 *	p=0,0561 n.s.	p=0,0070 **
<i>Kruskal-Wallis Test</i>			p=0,1838 n.s.	p=0,0198 *
Tie2 (ng/ml)	8,4	9,7	9,0	8,2
<i>Unpaired t-Test</i>		p=0,0099 **	p=0,2609 n.s.	p=0,6263 n.s.
<i>One-way ANOVA</i>			p=0,5911 n.s.	p=0,9614 n.s.
Notch (pg/ml)	261,9	296,3	306,7	270,0
<i>Mann-Whitney Test</i>		p=0,8007 n.s.	p=0,3624 n.s.	p=0,7130 n.s.
<i>Kruskal-Wallis Test</i>			p=0,9571 n.s.	p>0,9999 n.s.
TGF β (μ g/ml)	2,5	1,6	1,7	3,1
<i>Mann-Whitney- bzw. Unpaired t-Test</i>		p=0,0087 **	p=0,0375 *	p=0,6632 n.s.
<i>One-way ANOVA</i>			p=0,1119 n.s.	p=0,9586 n.s.

*Tabelle 45: Zusammenfassung der ELISA Ergebnisse für die Untergruppen. Dargestellt sind jeweils der Median bzw. der Mittelwert, sowie das Ergebnis der statistischen Analyse mittels Mann-Whitney Test bzw. Unpaired t-Test oder Kruskal-Wallis Test bzw. One-way ANOVA. Als Referenzgruppe für die angegebenen p-Werte dient das pAVK Std. II Kollektiv. *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05; n.s. p>0,05. Für NO wurden 2 getrennte Analysen durchgeführt s. 4.2.4*

Vergleicht man die Konzentrationen von sEPCR im Plasma von Patienten mit pAVK Std. II jeweils einzeln mit denen in den drei anderen Probandengruppen (< 35-Jährige, GHS-RF, GHS+RF), so wurden bei Patienten mit Gefäßerkrankung zwar tendenziell niedrigere Werte für sEPCR gemessen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Nur für den direkten Vergleich der pAVK Std. II Patienten mit alters- und geschlechts-gematchten Probanden der GHS mit kardiovaskulären Risikofaktoren (GHS+RF) ergaben sich signifikant reduzierte Konzentrationen von sEPCR im Plasma ($p=0,0400$).

Passend dazu war auch die Protein C Aktivität im Plasma von pAVK Std. II Patienten im Vergleich zu den GHS+RF Probanden erniedrigt (121 vs. 130 %), allerdings erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz.

Hingegen waren die Plasmaspiegel der Metalloprotease ADAM17, welche maßgeblich am EPCR *Shedding* von der Endotheloberfläche beteiligt ist, bei Patienten mit pAVK Std. II (nicht signifikant) höher als die in Probanden der GHS+RF Kohorte. Interessanterweise wurden die höchsten Werte im Plasma der gesunden < 35-jährigen Personen gefunden.

Die Analyse von Biomarkern für eine Endotheldysfunktion ergab eine signifikante Erhöhung der E-Selectin Konzentrationen bei den pAVK Std. II Patienten im Vergleich zu den < 35-Jährigen ($p=0,0485$) und insbesondere auch zur GHS-RF Gruppe ($p=0,0008$), und auch grenzwertig signifikant erhöhte Werte im Vergleich mit dem GHS+RF Kollektiv ($p=0,0713$). Hingegen waren die Plasmaspiegel von NO in den pAVK Std. II Patienten signifikant im Vergleich zu den alters- und geschlechts-gematchten Probanden der GHS-RF ($p=0,0134$) und GHS+RF ($p=0,0054$) Kohorten reduziert. Diese Befunde bestätigten das Vorliegen einer Endotheldysfunktion in Patienten mit pAVK Std. II.

Darüber hinaus waren die im Plasma gemessenen hsCRP Werte bei den pAVK Std. II Patienten im Vergleich zu allen anderen Gruppen (hoch-)signifikant erhöht (< 35-Jährige $p=0,0027$, GHS-RF $p=0,0236$, GHS+RF $p=0,0106$). Keine statistisch signifikanten Konzentrationsunterschiede wurden hingegen für die proinflammatorischen Zytokine $TNF\alpha$ und $IL1\beta$ gefunden. Diese waren in allen Gruppen in sehr niedrigen Konzentrationen im Plasma vorhanden bzw. oftmals nicht nachweisbar.

Betrachtet man die im Rahmen unserer Studie bestimmten möglichen Biomarker für Gefäßneubildung, so zeigte sich bei den pAVK Patienten im Vergleich zu allen anderen Gruppen erhöhte Plasmaspiegel von VEGF, im Vergleich zu den < 35-Jährigen ($p=0,0168$) und der GHS+RF Gruppe ($p=0,0070$) war dieser Konzentrationsunterschied statistisch signifikant, im Vergleich mit GHS-RF grenzwertig signifikant ($p=0,0561$). Die

Plasmaspiegel von Tie2, des Rezeptors für Angiopoetin, waren bei den pAVK Std. II Patienten im Vergleich zu den < 35-Jährigen hingegen hoch-signifikant vermindert ($p=0,0099$), für Notch wurden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede gefunden. Die Plasmaspiegel von des profibrotischen Wachstumsfaktors TGF β waren bei den pAVK Patienten im Vergleich zu den < 35-Jährigen ($p=0,0087$) sowie der GHS-RF Gruppe ($p=0,0375$) signifikant erhöht.

Insgesamt könnten die vorliegenden Ergebnisse dadurch erklärt werden, dass die EPCR Expression im Gefäßendothel von pAVK Std. II Patienten aufgrund des Vorliegens einer Endotheldysfunktion möglicherweise bereits so stark reduziert ist, dass ein vermehrtes ADAM17-vermitteltes Shedding und messbare Veränderung der sEPCR Spiegel im Plasma nicht mehr erfolgen konnte.

4.3 Quantitative Proteinbestimmung mittels ELISA: Vergleich verschiedener pAVK Stadien

Um die Dynamik der sEPCR Spiegel in Abhängigkeit vom Stadium der Gefäßerkrankung zu beurteilen, wurden diese bei Patienten im pAVK Stadium II bzw. III/IV nach Fontaine miteinander verglichen. Aufgrund der limitiert verfügbaren Plätze auf einer ELISA Platte (80 wells = 4*20 Proben), welche für die Analyse aller 5 Studienuntergruppen (5*20 Proben) auf einer einzelnen ELISA Platte nicht ausreichte, wurden der sEPCR ELISA daher nur mit Proben der pAVK Std. III/IV Kohorte gemeinsam mit den Proben der pAVK Std. II Kohorte als Referenzgruppe wiederholt, so dass die Ergebnisse nicht in den direkten Vergleich mit den oben aufgeführten Gruppen (GHS+RF, GHS-RF, < 35-Jährige) einfließen.

4.3.1 Bestimmung von sEPCR: pAVK Stadium II vs. pAVK Stadium III/IV

4.3.1.1 Konzentration von sEPCR in den beiden pAVK Untergruppen

sEPCR (ng/ml)	pAVK Std. II	pAVK Std. III/IV
Anzahl verarbeitete Proben (N)	19	19
Prozent (%)	100	100
Normalverteilung	nein	nein
Median	20,9	6,7
Quartile	(13,5; 36,2)	(0,0; 12,9)

Tabelle 46: Bestimmung von sEPCR im Plasma beider Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test), der Median und 25. bzw. 75. Quartil.

Diese Untersuchung ergab signifikant niedrigere sEPCR-Werte im Plasma von Patienten von pAVK Std. III/IV Patienten im Vergleich zu Patienten der pAVK Std. II Gruppe ($p=0,0138$).

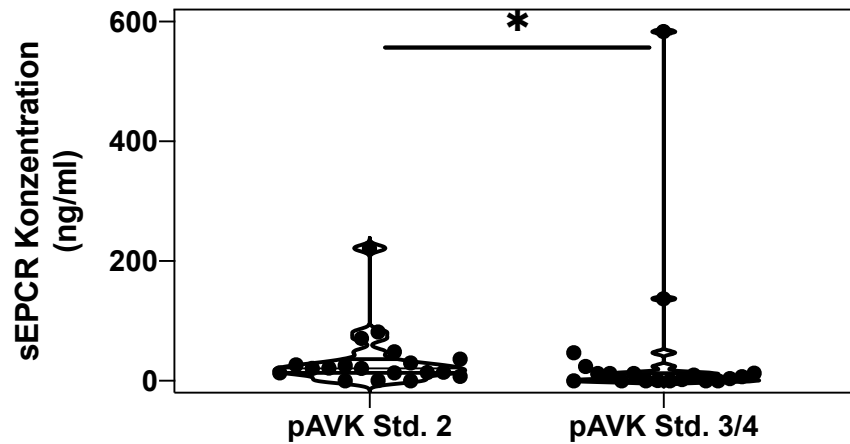


Abbildung 30: sEPCR im Plasma beider Gruppen. Violinplot zur Darstellung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen. Zum Vergleich diente der Mann-Whitney Test. * $p=0,0138$

Die Ergebnisse dieser Analysen können somit als Hinweis darauf verwendet werden, dass die EPCR Expression auf dem Endothel mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung abnimmt und somit auch die Plasmaspiegel des vom Endothel abgelösten Proteins.

4.4 Korrelationen der gemessenen Parameter untereinander

4.4.1 Korrelationen von sEPCR mit weiteren Biomarkern

Korrelation	pAVK Std. II	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
ADAM17				
r	-0,3072	-0,2648	-0,2656	0,5815
p	0,2007	0,2733	0,2718	0,0090
Protein C Aktivität				
r	0,0980	0,0332	0,2031	0,1029
p	0,6898	0,8926	0,4189	0,6750
NO				
r	0,0667	-0,2062	-0,2614	-0,2019
p	0,7863	0,3970	0,2797	0,4071
E-Selectin				
r	-0,2035	0,1193	-0,2140	0,3877
p	0,4034	0,6266	0,3789	0,1010
hsCRP				
r	0,0980	0,0332	0,2031	0,1029
p	0,6898	0,8926	0,4189	0,6750
TNF α				
r	-0,1489	0,2288	-0,3249	-0,1755
p	0,5428	0,3591	0,1748	0,4722
IL1 β				
r	0,3964	0,3484	0,0465	0,2069
p	0,0930	0,1438	0,8500	0,3954
VEGF				
r	-0,2825	0,2053	0,3607	0,1842
p	0,2413	0,3992	0,1293	0,4503
Tie2				
r	0,1281	0,3860	0,0983	0,1105
p	0,6013	0,1027	0,6891	0,6525
Notch				
r	-0,1754	0,0386	-0,3106	-0,1561
p	0,4725	0,8753	0,2096	0,5233
TGF β				
r	-0,2368	0,0544	-0,0010	0,0564

p	0,3289	0,8250	0,9968	0,8315
---	--------	--------	--------	--------

Tabelle 47: Übersicht der Korrelation von sEPCR und weiteren Biomarkern in den Untergruppen. Dargestellt sind jeweils der Korrelationskoeffizient r und der Signifikanzwert p.

Eine hoch-signifikante gleichgerichtete Korrelation für sEPCR konnte lediglich mit ADAM17 in der GHS+RF Gruppe nachgewiesen werden ($r=0,5815$; $p=0,0090$). Diese Ergebnisse unterstützen indirekt unsere Hypothese eines erhöhten, ADAM17 vermittelten EPCR Sheddings beim Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren.

4.4.2 Korrelationen sEPCR mit weiteren klinischen Parametern

4.4.2.1 Korrelation von sEPCR und Alter

Korrelation	pAVK	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
r	0,2340	0,0189	0,0862	-0,2582
p	0,3350	0,9406	0,7257	0,2859

Tabelle 48: Übersicht der Korrelation von sEPCR und Alter in den Untergruppen. Dargestellt sind jeweils der Korrelationskoeffizient r und der Signifikanzwert p.

Für keine der Untergruppen bestand eine signifikante Korrelation zwischen sEPCR und Alter.

4.4.3 sEPCR und cw-Doppler- bzw. elektronische Oszillografiedaten

Cw-Doppler- und elektronische Oszillografiedaten dienen der bildlichen Darstellung von Strombahnhindernissen und Stenosen in der Gefäßbahn. Anhand dieser Daten konnte für das pAVK Std. II Kollektiv eine Differenzierung vorgenommen werden, ob eine hämodynamisch relevante Beeinträchtigung des Blutflusses vorlag oder nicht.

4.4.3.1 Konzentration von sEPCR (pAVK Stadium II aufgeteilt nach Blutflussbeeinträchtigung)

sEPCR (ng/ml)	pAVK Std. II		
	k.a.	positiv*	negativ**
Anzahl verarbeitete Proben (N)	5	12	2
Prozent (%)	26,3	68,4	10,5
Normalverteilung		nein***	nein
Median		22,5	35,7
Quartil		(14,8; 34,6)	(11,9; 59,5)

*Tabelle 49: Bestimmung von sEPCR in den cw-Doppler- und Oszillografieuntergruppen des pAVK Std. II Kollektivs. * hämodynamisch relevante Stenose nachgewiesen, ** keine hämodynamisch relevante Stenose nachgewiesen, *** Gruppe zu klein. Dargestellt sind jeweils Anzahl (N), die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test), Median und 25. Bzw. 75. Quartil.*

Im Vergleich wiesen pAVK Std. II Patienten mit einer morphologisch dargestellten Strombahnbehinderung tendenziell niedrigere sEPCR Spiegel auf, statistisch ist dieser Unterschied mittels *Mann-Whitney* Test jedoch nicht signifikant ($p > 0,9999$). Weiterhin ist die statistische Aussagekraft aufgrund der kleinen Gruppengröße (cw-Doppler- und Oszillografiedaten negativ: $n=2$) stark eingeschränkt.

4.4.4 sEPCR und Geschlecht

4.4.4.1 Konzentration von sEPCR im Plasma weiblicher Patienten

sEPCR (ng/ml)	pAVK Std. II	pAVK Std. III/IV	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	10 52,6	10 52,6	10 52,6	10 52,6	10 52,6
Prozent (%)					
Normalverteilung	ja	nein	ja	nein	nein
Median		8,1		11,6	32,2
Mittelwert	19,8		23,2		
Quartile		(0,0; 52,3)		(5,6; 73,5)	(12,6; 64,9)
Standardabweichung (SD)	± 15,6		± 18,2		

Tabelle 50: Bestimmung von sEPCR in den Untergruppen bei weiblichen Patienten. Dargestellt sind jeweils Anzahl (N), die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test), Median bzw. Mittelwert und 25. bzw. 75. Quartil bzw. Standardabweichung (SD).

4.4.4.2 Konzentration von sEPCR im Plasma männlicher Patienten

sEPCR (ng/ml)	pAVK Std. II	pAVK Std. III/IV	< 35 Jahre	GHS-RF	GHS+RF
Anzahl verarbeitete Proben (N)	9 47,4	9 47,4	9 47,4	9 47,4	9 47,4
Prozent (%)					
Normalverteilung	nein	nein	ja	nein	ja
Median	21,1	3,9		8,8	
Mittelwert			11,8		23,8
Quartile	(13,5; 76,3)	(0,1; 12,4)		(5,7; 32,2)	

Standardabweichung (SD)	± 10,6	± 22,2
-------------------------	--------	--------

Tabelle 51: Bestimmung von sEPCR in den Untergruppen bei männlichen Patienten. Dargestellt sind jeweils Anzahl (N), die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test), Median bzw. Mittelwert und 25. bzw. 75. Quartil bzw. Standardabweichung (SD).

Im Vergleich wiesen weibliche Probanden in den Gruppen pAVK Std. III/IV, < 35-Jährige, GHS-RF und GHS+RF tendenziell höhere mediane bzw. mittlere Konzentrationen von sEPCR auf als Männer (pAVK Std. III/IV: 8,1 vs. 3,9; < 35 Jahre: 23,2 vs 11,8; GHS-RF: 11,6 vs. 8,8; GHS+RF: 32,2 vs. 23,8 ng/ml). Statistisch war dieser Konzentrationsunterschied im *Mann-Whitney* Test (pAVK Std. II $p=0,4967$; pAVK Std. III/IV $p=0,7312$, GHS-RF $p=0,8633$; GHS+RF $p=0,2755$) bzw. *Unpaired t-Test* (< 35 Jahre $p=0,1175$) jedoch für keine dieser Subgruppen signifikant.

4.4.4.3 Korrelation von sEPCR und ABI

Der ABI wurde für die pAVK Std. II sowie Std. III/IV Untergruppen und die GHS-Kollektive bestimmt.

Korrelation	pAVK Std. II	pAVK Std. III/IV	GHS-RF	GHS+RF
r	0,1895	0,3158	-0,1462	-0,2790
p	0,4372	0,3703	0,5626	0,2473

Tabelle 52: Übersicht der Korrelation von sEPCR und ABI. Dargestellt sind der Korrelationskoeffizient r und der Signifikanzwert p.

Es bestand für keine der Untergruppen eine signifikante Korrelation zwischen sEPCR und dem ABI.

4.4.4.4 Korrelation von sEPCR und objektivierbarer Laufstrecke

Die Laufdistanz bezieht sich auf die absolvierte Gesamtstrecke der Laufbandergometrie. Sie wurde nur für das pAVK Std. II Kollektiv bestimmt.

Korrelation	pAVK Std. II
r	0,0422
p	0,8638

Tabelle 53: Übersicht der Korrelation von sEPCR und objektivierbarer Laufstrecke. Dargestellt sind der Korrelationskoeffizient r und der Signifikanzwert p.

Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen sEPCR und der objektivierbaren Laufstrecke.

4.4.5 Weitere Korrelationen

4.4.5.1 Korrelation von VEGF und ABI

Die gleichzeitige Bestimmung von VEGF und ABI erfolgte für die pAVK Std. II Untergruppe und die GHS-Kollektive. Für das pAVK Std. III/IV Kollektiv wurden VEGF und die anderen mittels ELISA gemessenen Biomarker (ausgenommen sEPCR) nicht bestimmt.

Korrelation	pAVK Std. II	GHS-RF	GHS+RF
r	-0,0070	-0,0063	-0,1660
P	0,9773	0,9803	0,4970

Tabelle 54: Übersicht der Korrelation von VEGF und ABI. Dargestellt sind der Korrelationskoeffizient r und der Signifikanzwert p.

Nicht nur für sEPCR, sondern auch für andere, etablierte Mediatoren von Angiogenese wie VEGF bestand keine signifikante Korrelation zwischen VEGF und ABI.

4.4.5.2 Korrelation von VEGF und objektivierbarer Laufstrecke

Die Laufdistanz bezieht sich auf die absolvierte Gesamtstrecke der Laufbandergometrie. Sie wurde nur für das pAVK Std. II Kollektiv bestimmt.

Korrelation	pAVK Std. II
r	-0,2005
P	0,4104

Tabelle 55: Übersicht der Korrelation von VEGF und objektivierbarer Laufstrecke. Dargestellt sind der Korrelationskoeffizient r und der Signifikanzwert p.

Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen VEGF und der objektivierbaren Laufstrecke beim pAVK Std. II Kollektiv.

4.5 Subgruppen-Analysen

4.5.1 sEPCR und Rauchverhalten

4.5.1.1 sEPCR und Rauchverhalten (pAVK Stadium II)

	Raucher	Nicht-Raucher/Ex Raucher
Anzahl (N)	7	12
Normalverteilung	ja	ja
Mittelwert	24,5	29,0
Standardabweichung (SD)	± 23,0	± 23,1

Tabelle 56: sEPCR und Rauchverhalten in der pAVK Std. II Untergruppe. Dargestellt sind jeweils Anzahl (N) die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test), der Mittelwert und die Standardabweichung (SD).

Im pAVK Std. II Kollektiv wiesen die Nicht-Raucher leicht niedrigere sEPCR Spiegel auf als die Raucher. Dieser Konzentrationsunterschied war im *Unpaired t*-Test jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,6845$).

Eine Analyse des Rauchverhaltens im pAVK Std. III/IV Kollektiv war nicht möglich, da hier lediglich 1 Raucher eingeschlossen worden war.

4.5.2 sEPCR und Diabetes

4.5.2.1 sEPCR und Diabetes (pAVK Stadium II)

	Diabetiker	Nicht-Diabetiker
Anzahl (N)	6	13
Normalverteilung	ja	nein
Median		20,8
Mittelwert	29,8	
Quartile		(11,0; 30,4)
Standardabweichung (SD)	$\pm 19,1$	

Tabelle 57: sEPCR und Diabetes in der pAVK Std. II Untergruppe. Dargestellt sind jeweils Anzahl (N), die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test), Median bzw. Mittelwert und 25. bzw. 75. Quartil bzw. Standardabweichung (SD).

4.5.2.2 sEPCR und Diabetes (pAVK Stadium III/IV)

	Diabetiker	Nicht-Diabetiker
Anzahl (N)	8	11
Normalverteilung	nein	nein
Median	1,1	12,0
Quartile	(0,0; 10,6)	(0,6; 24,0)

Tabelle 58: sEPCR und Diabetes in der pAVK Std.3/4 Untergruppe. Dargestellt sind jeweils Anzahl (N), die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test), Median und 25. bzw. 75. Quartil.

4.5.2.3 sEPCR und Diabetes (alle pAVK Stadien)

	Diabetiker	Nicht-Diabetiker
Anzahl (N)	14	24
Normalverteilung	nein	nein
Median	8,4	13,2
Quartile	(0,2; 33,4)	(7,4; 26,0)

Tabelle 59: sEPCR und Diabetes kumuliert für beide pAVK Stadien. Dargestellt sind jeweils Anzahl (N), die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test), Median und 25. bzw. 75. Quartil.

Im pAVK Std. II Kollektiv wiesen Patienten mit Diabetes höhere und im pAVK Std. III/IV Kollektiv niedrigere sEPCR Spiegel auf als die Nicht-Diabetiker in den jeweiligen Gruppen.

In beiden Fällen waren die Konzentrationsunterschiede jedoch im *Mann-Whitney* Test statistisch nicht signifikant (pAVK Std. II p=0,4155; pAVK Std. III/IV p=0,2970). Auch der Vergleich der sEPCR Spiegel im Plasma von Diabetikern vs. Nicht-Diabetikern beider Gruppen gemeinsam (s. 1.5.2.3) zeigte im *Mann-Whitney* Test keinen signifikanten Unterschied.

4.5.3 sEPCR und stattgehabter Myokardinfarkt

4.5.3.1 sEPCR und Myokardinfarkt (pAVK Stadium III/IV)

	Z.n. Myokardinfarkt	Kein Myokardinfarkt
Anzahl (N)	4	15
Normalverteilung	nein*	nein
Median	9,4	3,8
Quartile	(1,7; 38,3)	(0,0; 12,9)

*Tabelle 60: sEPCR und Myokardinfarkt in der pAVK Std. III/IV Untergruppe. Dargestellt sind jeweils Anzahl (N), die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test), Median und 25. bzw. 75. Quartil. * Bei einer Kollektivgröße von N<5 wird von einer Nicht-Normalverteilung der Daten ausgegangen.*

Im pAVK Std. III/IV Kollektiv wiesen Personen mit stattgehabtem Myokardinfarkt höhere mediane sEPCR Spiegel auf als solche ohne Myokardinfarkt. Der Konzentrationsunterschied war im *Mann-Whitney* Test jedoch statistisch nicht signifikant (p=0,7131).

4.5.4 sEPCR und stattgehabte Thrombosen

4.5.4.1 sEPCR und Thrombose (pAVK Stadium III/IV)

	Z.n. Thrombose	Keine Thrombose
Anzahl (N)	4	15
Normalverteilung	nein*	nein
Median	0,24	11,5
Quartile	(1,9; 24,0)	(0,0; 6,5)

*Tabelle 61: sEPCR und Thrombose in der pAVK Std. III/IV Untergruppe. Dargestellt sind jeweils Anzahl (N), die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung (mittels Shapiro-Wilk Test), Median und 25. bzw. 75. Quartil. * Bei einer Kollektivgröße von N<5 wird von einer Nicht-Normalverteilung der Daten ausgegangen.*

Im pAVK Std. III/IV Kollektiv wiesen Personen mit stattgehabter Thrombose niedrigere sEPCR Spiegel auf als solche ohne Thrombose, was auf eine Minderaktivierung des antikoagulatorisch wirkenden Protein Cs durch eine Verringerung des membranständigen EPCR Rezeptors bei den Thrombosepatienten hindeuten könnte. Der

Konzentrationsunterschied war im *Mann-Whitney* Test jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,1204$).

5 Diskussion

Es ist wissenschaftlich gut belegt, dass eine Endotheldysfunktion die Grundlage für atherosklerotische Gefäßveränderungen und damit auch für die Entstehung der pAVK darstellt. Einen integralen Bestandteil für die Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität stellt der endotheliale Protein C Rezeptor (EPCR) dar, dessen antiapoptotische [184, 185], antiinflammatorische [186] und endothelprotektive [187] Wirkungsweisen und Signalwege bereits das Objekt mehrerer Forschungsarbeiten waren. Obwohl unklar ist, ob und in welcher Weise die Höhe der Expression von EPCR auf dem Gefäßendothel mit den im Plasma messbaren Spiegeln seiner löslichen Form korreliert, wurden für den Myokardinfarkt signifikant erhöhte sEPCR Werte beobachtet [188], und die Bedeutung der durch EPCR vermittelten APC Aktivierung für die Gefäßneubildung nach stattgehabter Durchblutungsstörung beschrieben [189]. Voruntersuchungen der AG Schäfer im Mausmodell einer peripher-arteriellen Ischämie zeigten, dass das Fehlen von EPCR auf Endothelzellen mit einer Störung der Gefäßneubildung nach Ischämie verbunden ist und stellen die Basis für die vorliegende klinische Studie dar. Zudem brachten sie den Verlust des EPCR-PAR1 Signalwegs mit einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit und einer daraus resultierenden verringerten Angiogenese in Verbindung. In welchem Ausmaß diese im Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse auch für die Ischämie-bedingte peripher-arterielle Verschlusskrankheit des Menschen von Bedeutung sein könnten und ob die im Plasma messbaren sEPCR Spiegel Auskunft über das Vorhandensein oder den Schweregrad einer pAVK liefern können, wurde mithilfe unserer klinischen Studie erstmals untersucht. Hierbei wurden die sEPCR Spiegel im Blut von Patienten mit pAVK in unterschiedlichen Schweregraden bestimmt und mit denen im Blut junger gesunder Probanden bzw. Personen gleichen Alters mit und ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren verglichen. Weiterhin analysierten wir das Vorkommen von Biomarkern, die an der Ablösung des Rezeptors vom Endothel beteiligt sind (ADAM17), unmittelbar mit dem EPCR Signalweg in Verbindung stehen (Protein C Aktivität), oder bereits als Indikatoren für eine endotheliale (Dys)-funktion (NO, E-Selectin), Inflammation (hsCRP, TNF α , IL1 β), Angiogenese (VEGF, Tie2, Notch) und Fibrose (TGF β) etabliert sind.

5.1 Die pAVK ist mit reduzierten sEPCR Plasmaspiegeln assoziiert

Der antikoagulatorische Protein C Signalweg nimmt eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle von thrombotischen und inflammatorischen Aktivitäten ein [114, 190]. EPCR ist als endothelgebundener Rezeptor maßgeblich an der PC Aktivierung beteiligt, wodurch aufgrund der Hemmung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa antikoagulatorische und durch die Aktivierung des PAR1 Signalwegs zytoprotektive Signalkaskaden aktiviert

werden. Neben dem membrangebundenen Rezeptor zirkuliert auch eine lösliche Form, sog. sEPCR, im Blut, welche durch die Metalloprotease ADAM17 von der Endotheloberfläche abgespalten wird. Hohe Spiegel von sEPCR wurden bei verschiedenen prothrombotischen Krankheitsbildern wie der koronaren Herzkrankheit [116, 119] und erniedrigte Mengen bei Patienten unter antikoagulatorischer Therapie [117] gefunden.

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals die im Blut zirkulierenden Mengen sEPCRs bei Patienten mit pAVK. Als Grundlage hierfür dienten Daten der eigenen Arbeitsgruppe im Mausmodell, die zeigten, dass EPCR auf Endothelzellen nach Induktion einer Hinterlaufischämie verstärkt exprimiert wird. Gleichzeitig war die Reperfusion bei Tieren mit genetischer Deletion von EPCR in Tie2-exprimierenden Zellen signifikant reduziert, woraus auf eine wichtige Rolle des Rezeptors bei der Neovaskularisierung nach Ischämie rückgeschlossen wurde. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass der Verlust des EPCR-PAR1 Signalwegs mit einer verstärkten Hämoglobinexpression im Gefäßendothel assoziiert war, welche eine Verminderung der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit und eine Reduktion der angiogenetischen Gefäßbildung nach sich zog.

Insgesamt flossen die Daten von 19 pAVK Patienten im Stadium II nach Fontaine in die Analyse ein, die mit einem Altersdurchschnitt von 67 Jahren (58 Jahre männlich, 70 Jahre weiblich) und einem entsprechenden kardiovaskulären Risikoprofil (32 % Nikotinabusus, 79 % arterielle Hypertonie, 37 % Diabetes mellitus Typ 2, 68 % Dyslipidämie), ein typisches Kollektiv der pAVK Erkrankten in diesem Krankheitsstadium repräsentierten.

Der Altersdurchschnitt des aus 19 Probanden bestehenden pAVK Stadium III/IV Kollektivs lag mit 69 Jahren etwas höher, wohingegen kardiovaskuläre Risikofaktoren abgesehen vom Diabetes mellitus (pAVK Std. II: 31,6 % vs. pAVK Std III/IV: 42,1 %) im Vergleich zu dem niedrigeren Krankheitsstadium seltener anzutreffen waren (pAVK Std. II vs. pAVK Std III/IV: Nikotinabusus: 36,8 % vs. 5,2 %, Hypertonie: 84,2 % vs. 58 %, Dyslipidämie: 73,7 % vs. 47 %).

Die GHS Kollektive waren mit einem durchschnittlichen Alter von 67 (GHS+RF) bzw. 66 (GHS-RF) Jahren und einer identischen Geschlechtsverteilung dem pAVK Stadium II Kollektiv *gematcht*, wobei die GHS+RF Kohorte mindestens zwei kardiovaskuläre Risikofaktoren und somit ein erhöhtes Risiko für die zukünftige Entstehung einer Gefäßerkrankung aufwies.

In einem ersten Schritt verglichen wir die sEPCR Spiegel im Plasma von pAVK Patienten im Stadium II mit denen einer jungen gesunden Vergleichskohorte ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren für die Gefäßerkrankung (< 35-Jährige). Im Vergleich wiesen hierbei die

pAVK Patienten tendenziell höhere Konzentrationen von sEPCR auf, allerdings war dieser Konzentrationsunterschied statistisch nicht signifikant. Zunächst nahmen wir an, dass diese erhöhten Werte des Biomarkers durch ein mit der Endotheldysfunktion einhergehendes erhöhtes EPCR *Shedding* erklärbar sei. Das für das *Shedding* verantwortlich Enzym ADAM17 lag bei den pAVK Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollkohorte jedoch unverändert vor, wodurch wir diese anfängliche Hypothese nicht bestätigen konnten. Allerdings haben wir lediglich die Konzentration des Proteins und nicht seine Aktivität bestimmt. Darüber hinaus ist nicht nur ADAM17, sondern auch andere Proteasen an der Abspaltung beteiligt [113]. Zudem gilt es zu beachten, dass aufgrund der weitreichenden Unterschiede der beiden Kollektive zueinander (Alter, Medikamenteneinnahmen, kardiovaskuläre Risikofaktoren) viele Störfaktoren auf die sEPCR Werte einwirkten, weshalb wir die Kohorte der < 35-Jährigen letztlich für die EPCR Analyse nicht als die passende Vergleichsgruppe erachteten. Besonders zu beachten ist in diesem Zusammenhang der große Altersunterschied der beiden Kollektive, wobei das Alter einen eigenen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt, welches alleine bereits das Risiko einer endothelialen Dysfunktion deutlich erhöht. Eine Korrelation von sEPCR mit dem Patientenalter konnten wir in unseren Patientenkollektiven jedoch nicht nachweisen, hierfür wäre ggf. eine Erhöhung der Fallzahl in den Untergruppen sinnvoll. Somit entschlossen wir uns, zwei weitere, dem pAVK Kollektiv durch ein ähnliches Alter (GHS-RF) und kardiovaskuläres Risikoprofil (GHS+RF) besser übereinstimmende Vergleichskohorten für die Bestimmung der sEPCR Spiegel heranzuziehen.

Hierbei wiesen die pAVK Std. II Patienten ähnlich hohe sEPCR Spiegel auf, wie die Probanden des GHS-RF Kollektivs, während ihre Plasma sEPCR Spiegel im Vergleich zu Probanden des GHS+RF Kollektivs signifikant erniedrigt waren. Im Vergleich zu den unter 35-Jährigen wies das GHS+RF Kollektiv signifikant erhöhte sEPCR Konzentrationen auf. Die erhöhten sEPCR Spiegel beim GHS+RF Kollektiv im Vergleich zu den < 35-Jährigen gesunden Probanden lassen sich möglicherweise durch das höhere Alter (jedoch anhand unserer Daten nicht nachweisbar s.o.) sowie das Vorhandensein kardiovaskulärer Risikofaktoren zurückführen. Es ist denkbar, dass bei diesen Probanden aufgrund ihres kardiovaskulären Risikoprofils bereits eine Endotheldysfunktion im Anfangsstadium vorlag, die sich aufgrund fehlender Beschwerden bisher klinisch noch nicht manifestiert hatte. Die Annahme eines im Rahmen einer beginnenden Endotheldysfunktion vermehrten EPCR *Sheddings* würde durch die signifikant positive Korrelation von sEPCR und ADAM17, welche wir ausschließlich im GHS+RF Kollektiv nachweisen konnten, bestärkt werden. Weiterhin gilt es die Frage zu klären, warum beim Vorliegen einer klinisch gesicherten pAVK mit manifester Endotheldysfunktion (pAVK Std. II) die sEPCR Konzentrationen im Vergleich zum GHS+RF Kollektiv nicht weiter zu-

sondern abnehmen: Die in unserem Fall signifikant erniedrigten Werte des Biomarkers bei den Gefäßkrankten im Vergleich zu dem alters- und risikogematchten GHS+RF Vergleichskollektiv führen wir auf die *chronische* Endothelschädigung im Rahmen der Gefäßkrankung und eine damit in Zusammenhang stehende verringerte Expression des *membrangebundenen* Rezeptors zurück. Passend hierzu wurde im Gefäßkorrelat von pAVK Patienten der EPCR Rezeptor entsprechend verringert nachgewiesen [17]. Während beim GHS+RF Kollektiv noch genügend endothelgebundener Rezeptor für das *Shedding* zur Verfügung zu haben, fehlt in einem manifesten pAVK Krankheitsstadium (pAVK Std. II) das Substrat für die Metalloprotease. Folglich sind die Mengen des löslichen Rezeptors vermindert und die Funktion von ADAM17 im Rahmen einer Endotheldysfunktion bei pAVK scheint an Bedeutung zu verlieren (s.u.). Passend dazu waren die mit einer Endothelschädigung assoziierten E-Selectin Spiegel bei den pAVK Patienten im Stadium II hoch-signifikant erhöht. Aus der verminderten Expression des endothelgebundenen Rezeptors resultieren eine geringere Aktivierung des antikoagulatorisch wirkenden Protein Cs [118] sowie die Reduktion der EPCR vermittelten zytoprotektiven, antiinflammatorischen und endothelprotektiven Signalkaskaden [103-108]. Diese Effekte begünstigen die Atheroskleroseentstehung und -fortschreitung. Passend dazu konnten wir bei den pAVK Patienten im Vergleich zum GHS+RF Kollektiv eine Verminderung der Protein C Aktivität detektieren, allerdings ohne statistische Signifikanz, sodass wir an dieser Stelle eine Wiederholung der Messungen bei einem größeren Patientenkollektiv als sinnvoll erachten.

Im Gegensatz zu den von uns gemessenen verminderten sEPCR Konzentrationen bei den pAVK Stadium II Patienten waren die Konzentrationen des löslichen Rezeptors bei anderen mit einer Endotheldysfunktion assoziierten Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt und auch im Mausmodell mit Hinterlaufischämie erhöht. Auch hierbei kommt der Aspekt der chronischen Endothelschädigung bei den pAVK Patienten zum Tragen, wohingegen es sich sowohl beim Myokardinfarkt als bei den *in vitro* Ergebnisse um eher akute Ereignisse handelt, bei denen die Menge des membrangebundenen Rezeptors vermutlich nicht beeinträchtigt ist.

Der weiteren Überprüfung unseres Erklärungsansatzes diene die Bestimmung der sEPCR Dynamik im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium. Laborchemisch wiesen die pAVK Patienten im Stadium II im Vergleich zu denjenigen in einem höheren Krankheitsstadium (pAVK Std. III/IV) deutlich erniedrigte Entzündungswerte (CRP) auf, wodurch die verstärkte Entzündungsreaktion im Rahmen einer fortschreitenden Endotheldysfunktion bei zunehmenden Erkrankungsstadium bestätigt wird. So lag im pAVK Stadium II im Vergleich zu dem Erkrankungsstadium III/IV eine signifikant erhöhte Konzentration von sEPCR im Blut der Probanden vor. Im Vergleich zu allen anderen

Gruppen war bei den pAVK Std. III/IV die geringsten Mengen des Biomarkers detektierbar. Somit konnten wir unsere Hypothese weiter stützen: Eine Fortschreitung der endothelialen Dysfunktion mit zunehmenden Erkrankungsstadium hat eine damit einhergehende progressiv verringerte Expression des membrangebundenen Rezeptors zur Folge. Ähnliches wurde von Jörn F. Dopheide et al. für die Menge der zirkulierenden TEMs in Abhängigkeit vom pAVK Stadium dargelegt, deren Menge mit fortschreitender Erkrankung abnahm. [191].

Ein möglicher Erklärungsansatz für die verminderte Expression des membrangebundenen EPCRs bei den pAVK Patienten, ist eine durch Hypoxie induzierte Internalisierung des Rezeptors, wie sie an kultivierten Endothelzellen nachgewiesen wurde [17].

5.2 Die ADAM17 Aktivität ist komplex und wird durch die Endothelfunktion beeinflusst

Qu et al zeigten, dass die Abspaltung EPCRs von der Endothelmembran durch die Metalloproteinase **ADAM17** vermittelt wird [192], weswegen eine Bestimmung dieses Biomarkers auch im Rahmen unserer Studie erfolgte. In 3 der 4 untersuchten Untergruppen konnten wir keine signifikante Korrelation von sEPCR und ADAM17 nachweisen, lediglich für das GHS+RF Kollektiv zeigte sich eine signifikante positive Korrelation beider Biomarker. Dies könnte darauf hindeuten, dass nur in dieser Untergruppe biologische Prozesse stattfinden und geeignete Bedingungen vorherrschen, die die Detektion von Unterschieden erlauben, während das ADAM17-vermittelte EPCR Shedding bei gesunden oder in fortgeschrittenen Stadien der pAVK von geringerer Bedeutung ist. Auch könnten die für Patienten mit KHK gefundenen Prozesse [189] für Patienten mit pAVK weniger wichtig sein oder durch andere Proteasen vermittelt werden. Wie in 5.1 erläutert, gehen wir davon aus, dass bei Gefäßpatienten EPCR bereits vermindert auf den Endothelzellen der Blutgefäße vorliegt (z.B. aufgrund von verstärkter Internalisierung), das somit dann auch nicht für ein *Shedding* zur Verfügung steht, woraus folglich verminderte sEPCR Spiegel resultieren. Denkbar wäre zudem, dass das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion direkten Einfluss auf die Metalloprotease hat und zu einer Reduktion der Enzymaktivität führt, letztere haben wir im Rahmen unserer klinischen Studie jedoch nicht bestimmt. Desweiteren gilt ADAM17 zwar als Mediator des EPCR *Sheddings*, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass hierbei noch weitere Enzyme beteiligt sind bzw. dass EPCR mehrere Spaltstellen für unterschiedliche Metalloproteinasen aufweist. Inwieweit die *Shedding*-Enzyme bei unterschiedlicher Gefäßlokalisierung (Koronargefäße vs. periphere Arterien) variieren und so bei der pAVK

nicht ADAM17, sondern eine andere Metalloprotease das EPCR *Shedding* vermittelt, gilt es in Zukunft weiter zu erforschen.

5.3 Die pAVK ist mit reduzierten NO-Plasmaspiegeln und erhöhten Biomarkern für eine Endotheldysfunktion assoziiert

Desweiteren wollten wir mit unseren Untersuchungen den im Mausmodell erhobenen Befund eines mit der Endotheldysfunktion einhergehenden erhöhten **NO Scavengings** und einer daraus resultierenden verminderten NO Bioverfügbarkeit überprüfen.

Hierbei wiesen die pAVK Std. II Patienten im Vergleich zu beiden GHS-Kollektiven (hoch-)signifikant erniedrigte Nitrit/Nitrat Spiegel auf. Die erniedrigten Spiegel dieses Surrogatmarkers für die NO-Bioverfügbarkeit bei den Gefäßpatienten stehen mit den Ergebnissen des Mausmodells im Einklang und bestätigen, dass ein defekter EPCR Signalweg eine Reduktion der NO Bioverfügbarkeit zur Folge hat. So wiesen alle eingeschlossenen pAVK Patienten *Claudicatio* Beschwerden auf, die belegen, dass die Reperfusion des durch Ischämie geschädigten Gewebes nicht ausreichend über Kollateralen sichergestellt werden konnte. Eine Bestimmung der endothelialen Hämoglobin-Expression konnte im Rahmen dieser klinischen Studie aus technischen und ethischen Gründen nicht erfolgen, sodass der im Mausmodell erhobene Befund einer erhöhten endothelialen Hämoglobin-Expression bei defektem EPCR Signalweg nicht überprüft werden konnte.

Somit bekräftigen unsere klinischen Daten die These, dass chronische Ischämie durch die Internalisierung von EPCR zu dessen funktionellen Inaktivierung führt, woraus eine Reduktion der NO Spiegel und somit eine eingeschränkte Angiogenese resultiert. So steuert NO nicht nur mit der Regulation der Gefäßweite sondern auch durch die Beteiligung an der Bildung neuer Blutgefäße die Gewebepfusion. Weiterhin geben unsere Daten Anlass zu Überlegungen, inwieweit eine therapeutische Protektion des EPCR Signalwegs über eine verstärkte NO Expression einen Beitrag zur Gefäßneubildung bei Patienten mit pAVK darstellen könnte.

Neben NO spielt das Adhäsionsmolekül **E-Selectin** eine entscheidende Rolle für die Endothelfunktion. So ist E-Selectin maßgeblich an der Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßwand verantwortlich und zeigte sich bei Patienten der pAVK Stadium II Gruppe im Vergleich zu den < 35-Jährigen und dem GHS-RF Kollektiv (hoch-)signifikant- bzw. grenzwertig signifikant im Vergleich zur GHS+RF Kohorte erhöht, was das Vorliegen einer Endotheldysfunktion bei den pAVK Patienten bestätigte. Diese Ergebnisse passen zu den bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen bezüglich E-Selectins Beteiligung an der

Plauebildung z.B. bei der koronaren Herzerkrankung [127, 128]. Das Adhäsionsmolekül ist insbesondere für den Beginn des Atheroskleroseprozesses essenziell, da es als Zielstruktur auf Endothelzellen für die im Blut zirkulierende Immunzellen dient, die im Rahmen des entzündlichen Prozesses in die Gefäßwand migrieren und die Grundlage für die spätere Plauebildung darstellen. Unsere Daten sind daher im Einklang mit bisherigen Studien [193], dass E-Selectin nicht nur maßgeblich an der Krankheitsentstehung der koronaren Herzkrankheit, sondern auch an der Pathogenese der pAVK beteiligt ist. Mit unseren Ergebnissen stärken wir zudem die Relevanz von E-Selectin als möglichen Biomarker für die pAVK. Interessant für die Differenzierung, inwieweit der Biomarker vornehmlich an der Initiierung des atherosklerotischen Prozesses oder auch für dessen Aufrechterhaltung notwendig ist, wären Erkenntnisse, ob die Werte in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien weiter zunehmen. Eine Bestimmung E-Selectins bei fortgeschrittenem Erkrankungsstadium ist im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht erfolgt und muss in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden.

5.4 Die pAVK geht mit erhöhten bereits etablierten Biomarkern für Entzündung und Angiogenese einher

HsCRP und **TNF α** wurden als Entzündungsmarker im Rahmen der Atherosklerose bestimmt. Während sich **TNF α** als inflammatorisches Zytokin bei pAVK Patienten im Vergleich zu den Vergleichsgruppen unverändert zeigte, lagen die Spiegel von hsCRP bei den gefäßerkrankten Patienten signifikant über denen aller Vergleichskollektive. Diese Ergebnisse sind mit hsCRPs Stellenwert als empfindliche Nachweismethode von Entzündungsprozessen, welche immer häufiger zur Diagnostik und Prognose von Herzerkrankungen wie der KHK eingesetzt wird, sehr gut vereinbar. Zudem konnten wir in den durch das Zentrallabor der Uniklinik Mainz bestimmten Blutwerten mit Fortschreitung des pAVK Erkrankungsstadiums steigende CRP Spiegel detektieren (pAVK Std. II vs. Std. III/IV), was den möglichen Stellenwert des Biomarkers zur Therapiekontrolle darlegt, der sich bisher zur Verlaufskontrolle einer pAVK noch nicht etabliert hat. Dennoch muss für eine CRP Erhöhung auch die Infektion von Hautwunden, welche mit einer verminderten Extremitätendurchblutung in höheren pAVK Stadien einhergeht und zu einer systemischen Inflammation führt, in Betracht gezogen werden. Der Entzündungsmarker wird daher vielfältig beeinflusst und seiner Spezifität für das Ausmaß atherosklerotischer Prozesse sind Grenzen gesetzt.

Die Konzentration des Entzündungsmediators **IL1 β** im Plasma war insgesamt bei allen Vergleichskollektiven ähnlich niedrig, was Anlass zu der Überlegung gibt, ob das Zytokin

im Gegensatz zu anderen atherosklerotischen Gefäßerkrankungen, wie z.B. dem Myokardinfarkt, für die Bildung der Gefäßplaques bei der pAVK weniger Bedeutung hat. So gewann IL1 β in den letzten Jahren vor allem im Rahmen einer Antikörpertherapie bei atherosklerotischen Prozessen an Bedeutung. Substanzen wie Canakinumab dienen der gezielten Antikörperblockade des Zytokins. Trotz wissenschaftlicher Evidenz, dass der Einsatz von Canakinumab das kardiovaskuläre Risiko nach stattgehabtem Myokardinfarkt signifikant senkte, ist der Gebrauch des Antikörpers bei atherosklerotischen Gefäßerkrankungen weiterhin jedoch keine Standardtherapie. Um den Stellenwert von IL1 β im Rahmen der pAVK besser zu verstehen, ist in Zukunft weitere Forschung notwendig, nicht zuletzt auch deshalb, weil erste positive Effekte von Canakinumab im Sinne einer vergrößerten Gehstrecke bei pAVK Patienten bereits beschrieben wurden [143].

VEGFs proangiogenetische und revaskularisierende Funktion ist mehrfach wissenschaftlich belegt [194, 195]. So wurde dieser Wachstumsfaktor bereits in verschiedenen Studien erfolgreich als Arzneimittel zur therapeutischen Angiogenese eingesetzt (z.B. bei stabiler Angina pectoris [148]), während sein Effekt auf den Therapieerfolg der pAVK in Studien bisher eher ambivalent beschrieben wurde [149, 150]. Dabei war VEGF bei unseren pAVK Patienten im Stadium II im Vergleich zu allen anderen Kollektiven deutlich erhöht, was die für dieses Erkrankungsstadium dominierende kollaterale Gefäßneubildung, bedingt durch intermittierende Ischämie, unterstreicht. Darüber hinaus zeigen unsere Daten eine positive Korrelation zwischen VEGF und der gemessenen objektivierbaren Laufstrecke der Patienten. Eine Korrelation des etablierten Angiogenesemarkers VEGF und dem ABI, welcher aktuell die Grundlage für die Diagnosestellung der pAVK bildet, können wir mit unseren Daten jedoch nicht zeigen. Warum die erhöhten VEGF-Werte nicht mit einer vermehrten Gefäßneubildung einhergehen, kann nicht so einfach im Rahmen einer klinischen Studie geklärt werden. Möglicherweise sind die lokalen Konzentrationen im ischämischen Gebiet und nicht die systemischen Konzentrationen oder die Expression seines Rezeptors (VEGFR2) auf Endothelzellen von größerer Bedeutung. Dadurch bleibt VEGFs Relevanz für die Kollateralbildung und Neoangiogenese zwar unumstritten, die Einführung als möglicher Screening Parameter oder seine zusätzliche Gabe zur Förderung der Angiogenese kann jedoch anhand unserer Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Der endothelspezifische Tyrosinkinase-Rezeptor **Tie2** entfaltet durch die Bindung seiner Liganden Angiopoetin 1 und 2 Wirkungen im Rahmen der Gefäßneubildung, die je nach Verhältnis untereinander und der Konzentration von VEGF angiogenese-fördernd oder -

hemmend sein können. Während nach stattgehabtem Myokardinfarkt erhöhte Tie2 Spiegel berichtet wurden [196], gibt es für den Einfluss von Tie2 auf die pAVK bisher wenig Evidenz. Eine Studie, die sich mit Tie2 exprimierenden Monozyten in Abhängigkeit vom pAVK Stadium auseinandersetzte, zeigte, dass die Konzentration von Tie2 mit zunehmendem Erkrankungsstadium sank, weshalb die Autoren die These postulierten, dass Gewebischämie zwar einen starken Stimulus für die Freisetzung von Tie2 darstelle, gleichzeitig jedoch eine chronische Inflammation zur Verminderung des Biomarkers z.B. im Sinne eines erhöhten Verbrauches führe. Wir konnten bei den pAVK Stadium II Patienten nur im Vergleich zu jungen gesunden Probanden < 35 Jahren hoch-signifikant reduzierte Tie2 Plasmaspiegel detektieren. Da Tie2 auf Endothelzellen exprimiert wird, ist dieses Ergebnis möglicherweise ebenfalls Ausdruck der Endotheldysfunktion mit zunehmendem Alter, unabhängig von kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen. Da die Gefäßneubildung das Ergebnis des Zusammenspiels mehrerer pro- und anti-angiogenetischer Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren ist, liefern diese Ergebnisse möglicherweise auch einen Erklärungsansatz, warum trotz hoher VEGF-Spiegel eine klinisch manifeste pAVK vorliegt (siehe oben).

Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob die Tie2 Spiegel auch bei uns analog zu den Daten von Jörn F. Dopheide et al. bei pAVK Erkrankten im Stadium IV weiter verringert sind, bzw. ob unmittelbar bei Erkrankungsbeginn erhöhte Tie2 Spiegel vorliegen. Eine Bestimmung bei Krankheitsstart ist jedoch schwierig durchführbar, da man diesen aufgrund der langsamen Progression der atherosklerotischen Gefäßveränderungen, die sich meist erst bei einem kritischen Stenosegrad der Gefäße klinisch manifestieren, erst verzögert bemerkt. Zudem wäre eine ergänzende Bestimmung der Tie2 Liganden, insbesondere des pro-angiogenetisch wirkenden Ang-2 sinnvoll, um den Stellenwert des Rezeptors im Rahmen der pAVK besser einschätzen zu können.

Der **Notch** Signalweg nimmt eine Schlüsselfunktion in der Zell-Zell-Kommunikation ein und spielt somit eine wichtige Rolle für die Gefäßintegrität von Endothelzellen sowie die Angiogenese. Studien führen seine angiogenetische Wirkungen sowohl auf dessen Interaktion mit spezifischen Liganden (z.B. Delta-like Ligand 4) [17] als auch auf eine ausgeprägte Vernetzung mit anderen, die Bildung neuer Blutgefäße fördernden Signalwegen, wie z.B. VEGF zurück [164]. Unsere Daten zeigen jedoch keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen.

TGF β ist ein Wachstumsfaktor, welcher die Umwandlung von Endothelzellen in mesenchymale Zellen fördert (EndMT), ein Prozess, dessen Bedeutung auch für die Progression atherosklerotischer Plaques diskutiert wird [175-178]. Darüber hinaus weist

TGF β auch anti-angiogenetische Eigenschaften auf [17]. Passend zu diesen bisherigen Erkenntnissen wiesen pAVK Patienten im Stadium II im Vergleich zu gesunden Vergleichprobanden (< 35 Jahre) und auch den GSH-RF Probanden (hoch-)signifikant erhöhte Konzentrationen des Biomarkers auf. Zudem wiesen die pAVK Std. II Patienten ähnlich hohe TGF β Spiegel auf wie das GSH+RF Kollektiv, was auf eine klinisch noch nicht sichtbare vaskuläre Dysfunktion auch bei diesen Probanden sprechen würde. Eine TGF β vermittelte mesenchymale Umwandlung der Endothelzellen in Blutgefäßen bei pAVK Patienten könnte ähnlich wie die reduzierten Tie2 Spiegel dazu beitragen, dass diese trotz erhöht vorliegender Werte des Wachstumsfaktors VEGF eine symptomatische Erkrankung aufweisen. Es bleibt zu überprüfen, ob eine TGF β Neutralisation bei pAVK Patienten ein möglicher zukünftiger Therapieansatz der Erkrankung darstellen könnte.

5.5 Korrelation von sEPCR mit klinischen Parametern und weiteren Biomarkern

Methode der Wahl zur Diagnosesicherung der pAVK stellt aktuell die Messung des **ABI** dar. Diese Art der Diagnostik ist einfach durchführbar, wird jedoch durch verschiedene Parameter, wie die Ausprägung der Gefäßkollateralbildung [191] oder das Vorliegen einer Mönckeberg-Mediasklerose, beeinflusst. Zudem ist seine Bestimmung abhängig von der Expertise des Untersuchers [197]. Den Vorschlag, sEPCR als objektivierbaren Screening Parameter für die Gefäßerkrankung zu etablieren oder ergänzend zur ABI Messung einzusetzen, können wir mit unseren Daten jedoch nicht ausreichend stützen: so bestand zwar eine positive Korrelation zwischen ABI und sEPCR, diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Jedoch konnten wir auch für VEGF, einen bereits etablierten Mediator für Angiogenese, keine signifikante Korrelation mit dem ABI detektieren, weswegen vermutlich eine höhere Zahl an Patienten notwendig ist, um diese Assoziation abschließend zu klären.

Anders als erwartet konnten wir mit unseren Daten nicht bestätigen, dass eine Endotheldysfunktion im Rahmen mit einer pAVK mit einem verstärkten EPCR *Shedding* einhergeht. Passend dazu konnten wir auch die in mehreren Studien beschriebene Verstärkung des EPCR *Sheddings* durch Entzündungsmediatoren wie **TNF α** und **IL1 β** [113, 115] nicht nachweisen. Ebenso wenig bestand für die signifikant veränderten Biomarker bei den pAVK Patienten (NO, E-Selectin, hsCRP, VEGF, Tie2 und TGF β) eine Korrelation mit sEPCR.

Der Einfluss einer **Diabetes** Erkrankung, welche einen wichtigen Risikofaktor für die pAVK darstellt, auf den EPCR Signalweg wurde in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten bereits untersucht. Choumou Kallel et al. beschrieben erhöhte Werte von sEPCR bei KHK Patienten, bei denen gleichzeitig eine Diabetes Erkrankung vorlag. [189]. Gleichzeitig wurde bei Diabetikern ein erhöhtes EPCR *Shedding* beschrieben [198]. Während bei unseren Analysen Diabetiker im pAVK Stadium II tendenziell höhere sEPCR Spiegel aufwiesen als Nicht-Diabetiker, waren es im höheren Erkrankungsstadium die Nicht-Diabetiker, bei denen vermehrt sEPCR vorlag. Neben der Tatsache, dass keine signifikanten Unterschiede vorlagen ist hierbei jedoch zu bedenken, dass die Krankheitsdauer des Diabetes einen Einfluss auf die sEPCR Spiegel zu haben scheint [199], sodass die alleinigen sEPCR Werte ohne Erfassung der Krankheitsdauer des Diabetes für eine endgültige Schlussfolgerung nicht aussagekräftig genug sind.

Weitere, bereits in mehreren Studien beschriebene Einflussfaktoren auf die Menge von im Blut zirkulierendem sEPCR wie eine **geschlechtsabhängige** Verteilung mit höheren Konzentrationen bei Männern bzw. bei Rauchern können wir in unserem Studienkollektiv nicht bestätigen. Eine Korrelation zwischen Rauchverhalten und sEPCR wird insbesondere daher erschwert, dass es bisher keine Daten gibt, die belegen, inwieweit der Ex-Nikotinabusus, welcher in unserem Patientenkollektiv mit 58 % im pAVK Stadium II Kollektiv stark vertreten ist, die Konzentrationen im Blut beeinflusst.

5.6 Limitationen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals im Blut zirkulierende sEPCR Spiegel bei Patienten mit pAVK. Unsere Daten zeigen eine pAVK Stadien-abhängige signifikant verringerte Konzentrationen von sEPCR im Blut der Gefäßpatienten, was auf einen Verlust des EPCR Signalwegs bei Patienten mit pAVK hindeutet. Anders als beim Myokardinfarkt lässt sich der Verlust von EPCR nicht durch ein erhöhtes EPCR *Shedding* z.B. durch die Metalloprotease ADAM17 erklären, vielmehr gehen wir (analog zu histologischen Analysen s.u.) von einer reduzierten Expression des membrangebundenen Rezeptors im Rahmen einer chronischen Endotheldysfunktion bei den pAVK Patienten aus. Letztere wird auch durch den Befund signifikant erhöhter E-Selectin Spiegel im Plasma bekräftigt. Ebenso wie die reduzierten sEPCR Konzentrationen erwiesen sich die NO-Spiegel bei Patienten mit pAVK als vermindert, was die im Tiermodell postulierte Steigerung des NO-*Scavengings* bei defektem EPCR Signalweg bekräftigt. Eine eingeschränkte Gefäßneubildung, die sich klinisch in Claudicatio Beschwerden äußert, trotz signifikant erhöhter bereits etablierter Biomarker für Angiogenese wie VEGF sind die Folge. Inwieweit die Reduktion der NO-Spiegel durch eine Steigerung des endothelialen Hämoglobins bedingt ist, können wir anhand des uns zur Verfügung stehenden Biomaterials nicht endgültig darlegen. Histologische Analysen der Arbeitsgruppe, die nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, in denen wir eine reduzierte Expression von EPCR und erhöhte Hämoglobin-Expression im Endothel von Gewebeproben von Patienten mit pAVK zeigen konnten, legen dies aber nahe.

Zur Bestätigung unserer Ergebnisse wäre eine Wiederholung der Messungen mit einer größeren Fallkohorte empfehlenswert, um die statistische Aussagekraft der Analysen zu erhöhen und weitere Einflussfaktoren (neben Alter und kardiovaskulären Risikofaktoren) besser detektieren zu können. Möglicherweise fließt auch die bisher unzureichende Erkenntnis bezüglich der Halbwertszeit des löslichen EPCR Rezeptors als Fehlerquelle in unsere Auswertungen ein, da wir geringe zeitliche Unterschiede in der Probenverarbeitung nicht ausschließen und dadurch bedingte Auswirkungen auf die Rezeptorkonzentration nicht einschätzen können. Ebenso ist es uns nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob bei einigen Probanden des GHS+RF Kollektivs bereits eine beginnende subklinische pAVK vorlag.

Unsere Studie diene als Pilotstudie insbesondere zur Beantwortung der Fragestellung, welche Rolle sEPCR im Rahmen der Endotheldysfunktion bei Patienten mit klinisch dokumentierter Störung der Gefäßneubildung im Rahmen einer pAVK einnimmt. In Zukunft bedarf es weiterer klinischer Forschung, um diesen Biomarker als möglichen

diagnostischen Parameter oder als pharmakologischen Therapieansatzpunkt zu evaluieren. Insbesondere gilt es die Fragen zu beantworten, inwieweit eine Internalisierung des membrangebundenen EPCR Rezeptors auch *in vivo* als Ursache für verminderte sEPCR Plasmaspiegel in Betracht gezogen werden kann. Unsere Daten bezüglich verringerten NO Spiegel bei den pAVK Patienten rücken die therapeutische Applikation von NO, welche *in vitro* bereits erfolgreich erprobt wurde, in Zukunft weiter in den Vordergrund. Weiterhin können wir die Bedeutung der bereits etablierten Biomarker für endotheliale Dysfunktion (E-Selectin) sowie Neoangiogenese (VEGF und TGF β) anhand eigener signifikanter Studienergebnisse bestätigen. Zukünftig ist in Bezug auf diese Faktoren weitere klinische Forschung im Sinne einer therapeutischen Angiogenese (VEGF) oder gezielter Blockade durch Antikörper (TGF β) notwendig, insbesondere in Aussicht auf mögliche alternative Therapiemethoden der pAVK.

6 Zusammenfassung

Die pAVK ist eine Erkrankung des alternden Menschen, deren Prävalenz mit dem demographischen Wandel, einer steigenden Anzahl an Diabetikern und Nikotinkonsum bei rund einem Viertel der erwachsenen Bevölkerung in Deutschland stetig zunimmt. Grundlage der Gefäßerkrankung stellt eine Endotheldysfunktion dar, welche die Entstehung atherosklerotischer Plaques begünstigt.

Der auf intakten Endothelzellen exprimierte endotheliale Protein C Rezeptor (EPCR) vermittelt durch die Aktivierung von Protein C antikoagulatorische- sowie über den PAR1 Signalweg antiinflammatorische, antiapoptotische und endothelprotektive Effekte, wodurch er der Entstehung atherosklerotischer Gefäßläsionen entgegenwirkt und die Gefäßneubildung nach Ischämie fördert. Im Mausmodell wurde bei Tieren mit Hinterlaufischämie eine verstärkte Expression des Rezeptors auf Endothelzellen beschrieben, während der Verlust des Rezeptors eine Störung der Gefäßneubildung bewirkte, welche auf eine mit Verlust des PAR1 Signalwegs gesteigerte endotheliale Expression des NO-Scavengers Hämoglobin zurückgeführt werden konnte [189].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die im Tiermodell gewonnen Erkenntnisse bezüglich EPCR auf ihre mögliche Relevanz für Patienten mit pAVK oder kardiovaskulären Risikofaktoren zu überprüfen. Hierzu wurde im Blut von Patienten mit *Claudicatio intermittens* (pAVK Stadium II a oder II b nach Fontaine) die Konzentration sEPCRs sowie weitere Biomarker endothelialer (Dys-)funktion (NO, E-Selectin), Inflammation (hsCRP, $TNF\alpha$, $IL1\beta$), Angiogenese (VEGF, Tie2, Notch) und Fibrose ($TGF\beta$) bestimmt. Anhand erhöhter Marker für Endotheldysfunktion (E-Selectin) sowie Inflammation (hsCRP) konnten wir die klinisch manifeste pAVK der Patienten laborchemisch bestätigen. Weiterhin zeigten unsere Daten eine bei den pAVK Patienten im Stadium II signifikante Reduktion sEPCRs im Vergleich zu alters- und geschlechtsgematchten Kontrollprobanden, was einen Verlust des EPCR Signalwegs bei den gefäßkranken Patienten nahelegt, der anders als z.B. beim Myokardinfarkt jedoch nicht auf ein erhöhtes Shedding durch Metalloproteasen wie ADAM17 zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf einer verringerten Expression des membranständigen Rezeptors beruht, wie histologisch in Gewebeproben von pAVK Patienten gezeigt werden konnte. Die sEPCR Plasmaspiegel im Plasma von Patienten mit pAVK Stadium III/IV waren nochmals signifikant niedriger, was für eine stadienabhängige Verstärkung des EPCR Verlusts spricht. Obwohl ein Trend vorlag, konnten wir eine signifikante Verminderung der EPCR-abhängigen Protein C Aktivität in der relativ kleinen Fallkohorte jedoch nicht nachweisen.

In direktem Zusammenhang mit dem EPCR Signalweg steht die Angiogenese. Der für die Verknüpfung dieser beider Aspekte erforderliche Mediator Stickstoffmonoxid (NO), zeigte sich beim Menschen analog zum Mausmodell als signifikant reduziert. Reduzierte Angiogenese und eine klinisch manifeste Gefäßerkrankung trotz anderer signifikant erhöhter Wachstumsfaktoren (VEGF) sind die Folge. Signifikant erhöhte Konzentrationen des pro-fibrotisch wirkenden Biomarkers TGF β bei den pAVK Patienten belegen zudem den Stellenwert von fibrotischen Umbauprozessen als möglichen Mechanismus der unzureichenden Angiogenese bei Patienten mit peripherer Gefäßerkrankung.

Schlussfolgernd unterstützen unserer Ergebnisse die im Mausmodell postulierte Relevanz des EPCR Signalwegs für die Aufrechterhaltung der endothelialen Gefäßintegrität sowie die Angiogenese auch für Patienten mit pAVK, in denen wir eine Stadien-abhängige Reduktion der sEPCR Spiegel im Plasma sowie reduzierte Plasma-NO-Bioaktivität zeigen konnten. Unsere Daten rücken den Erhalt des EPCR Signalwegs in den Fokus alternativer Therapieansätze insbesondere in Bezug auf die Bildung von kollateralen Blutgefäßen und die damit einhergehende Symptomreduktion der Patienten. Aufgrund seiner Dynamik im Rahmen der verschiedenen Krankheitsstadien gilt es die Relevanz des Biomarkers als Parameter einer Verlaufs- oder Therapiekontrolle in Zukunft weiter zu evaluieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Fowkes FG, R.D., Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, Sampson UK, Williams LJ, Mensah GA, Criqui MH., Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*, 2013. 382: p. 1329–1340.
2. Espinola-Klein C, S.S., Peripheral arterial disease: epidemiology, symptoms and diagnosis. *Internist (Berl)*, 2009. 50(8) p. 919-26.
3. Gerrity. R G" Goss. J. A. & Soby, L., Control of monocyte recruitment by chemotactic factor(s) in lesion-prone areas of swine aorta. *Arteriosclerosis* 1985. 5: p. 55-66.
4. F., D.P., Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab. Invest.*, 1986. 55: p. 5-24.
5. J., N., Growth factors and the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1986. 62: p. 185-199.
6. L, F.A.R.R.H., Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis*, 1984. 4: p. 323-340.
7. R, F.A.R., Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*, 1984. 4: p. 341-356.
8. Rosenfeld, M.E.e.a., Fatty streak expansion and maturation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis*, 1987. 7: p. 24-34.
9. R, M.J.R., Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation. *Arteriosclerosis*, 1990. 10: p. 164-177.
10. Davies, M.J.T., A. N. , Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *Engl. J Med.*, 1984. 310: p. 1137-1140.
11. Van de Wouwer M, C.D., Conway EM, Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004.
12. Loghmani H, C.E., Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood*, 2018. 132(02): p. 148–158.
13. Bouwens EA, S.F., Mosnier LO, Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost* 2013;11(Suppl 1):242–253. *J Thromb Haemost*, 2013. 11(Suppl 1): p. 242–253.
14. Wang J, Y.L., Rezaie AR, Li J. , Activated protein C protects against myocardial ischemic/reperfusion injury through AMP-activated protein kinase signaling. *J Thromb Haemost*, 2011. 9(7): p. 1308-17.
15. Dong W, W.H., Shahzad K, Bock F, Al-Dabet MM, Ranjan S, et al. , Activated Protein C Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Restricting Y-Box Binding Protein-1 Ubiquitination. *J Am Soc Nephrol*, 2015. 26(11): p. 2789-99.
16. Shibata M, K.S., Amar A, Fernandez JA, Hofman F, Griffin JH, et al. , Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation*, 2001. 103(13): p. 1799-805.
17. Benedito, R., Roca, C., Sørensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., et al. , The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 2009. 137: p. 1124–1135.
18. Qu D, W.Y., Esmon NL, et al, Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost*, 2007. 5: p. 395–402.
19. Wu KK, A.N., Ballantyne CM, Ahn C, Juneja H, Boerwinkle E., Interaction between soluble thrombomodulin and intercellular adhesion molecule-1 in predicting risk of coronary heart disease. *Circulation*, 2003. 107(13): p. 1729-32.
20. Seigneur M, D.P., Conri C, Constans J, Mercie P, Pruvost A, et al., Levels of plasma thrombomodulin are increased in atheromatous arterial disease. *Thrombosis research*, 1993. 71(6): p. 423-31.

21. Blann AD, A.J., McCollum CN., Prognostic value of increased soluble thrombomodulin and increased soluble E-selectin in ischaemic heart disease. *Eur J Haematol*, 1997. 59(2): p. 115-20.
22. Gu JM, K.Y., Ferrell GL, Grammas P, Esmon CT., Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo. *Blood*, 2000. 95(5): p. 1687-93.
23. Qu D, W.Y., Esmon NL, Esmon CT., Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost*, 2007. 5(2): p. 395-402.
24. Duvall WL, V.D., Multi-bed vascular disease and atherothrombosis: scope of the problem. *J Thromb Thrombolysis*, 2004. 17: p. 51-61.
25. Gerhard-Herman MD, G.H., Barrett C, Barshes NR, Corriere MA, Drachman DE, et al. , AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 2017. 135(12): p. e686-e725.
26. Dr. H. Lawall, P.D.P.H., Prof Dr.G. Rūmenapf, S3-LEITLINIE ZUR DIAGNOSTIK, THERAPIE UND NACHSORGE DER PERIPHEREN ARTERIELLEN VERSCHLUSSKRANKHEIT. AWMF-Register Nr. 065/003 Entwicklungsstufe 3, 2015.
27. Fowkes FG, R.D., Rudan I, et al. , Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*, 2013. 382: p. 1329-1340.
28. Fowkes FG, R.D., Rudan I, et al., Comparison of global estimators of prevalence and risk factors for peripheral arterial disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*, 2013. 382: p. 1329–40.
29. Alberts MJ, B.D., Mas JL, et al., Three-year follow-up and event rates in the international reduction of atherothrombosis for continued health registry. *Eur Heart J*, 2009. 30: p. 2318–26.
30. Alahdab F, W.A., Elraiyah TA, et al.: , A systematic review for the screening for peripheral arterial disease in asymptomatic patients. *J Vasc Surg*, 2015. 61: p. 42–53.
31. Lange S, D.C., Darius H, et al., High prevalence of peripheral arterial disease and low treatment rates in elderly primary care patients with diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2004. 112: p. 566–73.
32. T, H., Peripheral patients? a call to action on peripheral arterial disease. *LSE Enterprise* 2017.
33. Alahdab F, W.A., Elraiyah TA, et al. , A systematic review for the screening for peripheral arterial disease in asymptomatic patients *J Vasc Surg*, 2015. 61: p. 42S-53S.
34. SC., R., Noninvasive vascular laboratory for evaluation of peripheral arterial occlusive disease: Part II--clinical applications: chronic, usually atherosclerotic, lower extremity ischemia. *J Vasc Interv Rad*, 2000. 11: p. 1257-1275.
35. Ankle Brachial Index C, F.F., Murray GD, et al., Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA Surg*, 2008. 300: p. 197-208.
36. Grondal N, S.R., Lindholt JS., Baseline prevalence of abdominal aortic aneurysm, peripheral arterial disease and hypertension in men aged 65–74 years from a population screening study (VIVA trial). *Br J Surg*, 2015. 102: p. 902–6.
37. Hirsch AT, C.M., Treat-Jacobson D, et al. , Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA Surg*, 2001. 286: p. 1317-1324.
38. K., O., Peripheral arterial disease. *Lancet* 2001. 358: p. 1257-1264.
39. Bendermacher BL, W.E., Teijink JA, Prins MH. , Medical management of peripheral arterial disease. *J Thromb Haemost*, 2005. 3: p. 1628-1637.
40. European Association for Cardiovascular P, R., Reiner Z, et al., ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the

- management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011. 32: p. 1769-1818.
41. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes. *Diab Care*, 2014. 37: p. 14-80.
 42. Authors/Task Force M, R.L., Grant PJ, et al. , ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2013. 34: p. 3035-3087.
 43. Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter. <http://www.diabetes.versorgungsleitlinien.de>. AWMF_NVL., 2011. Version 1.2.
 44. Mancia G, F.R., Narkiewicz K, et al., ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 2013. 34: p. 2159-2219.
 45. Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ 2 Diabetes. <http://www.diabetes.versorgungsleitlinien.de>. . 2008.
 46. Group, H.P.S.C., MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2003. 360: p. 7-22.
 47. G., H.P.S.C., MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002. 360: p. 7-22.
 48. G., H.P.S.C., Randomized trial of the effects of cholesterol-lowering with simvastatin on peripheral vascular and other major vascular outcomes in 20,536 people with peripheral arterial disease and other high-risk conditions. *J Vasc Surg*, 2007. 45: p. 645-654; discussion 653-644.
 49. Lawall H, H.P., Espinola-Klein C, Rümenapf G, The diagnosis and treatment of peripheral arterial vascular disease. *Dtsch Arztebl Int*, 2016. 113: p. 729–36.
 50. Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Writing Group and P.F. Conte MS, Clair DG, et al., Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication. *J Vasc Surg*, 2015. 61: p. 2S–41S.
 51. Lane R, E.B., Watson L, Leng GC., Exercise for intermittent claudication. *Cochrane Database Sys Rev*, 2014. 7: p. CD000990.
 52. Fakhry F, v.d.L.K., Bax L, et al. , Supervised walking therapy in patients with intermittent claudication. *J Vasc Surg*, 2012. 56: p. 1132-1142.
 53. Bendermacher BL, W.E., Tejjink JA, Prins MH. , Supervised exercise therapy versus non-supervised exercise therapy for intermittent claudication. *Cochrane Database Sys Rev*, 2006. 2: p. CD005263.
 54. Katzel LI, S.J., Powell CC, Gardner AW. , Comorbidities and exercise capacity in older patients with intermittent claudication. *Vasc Med* 2001. 6: p. 157-162.
 55. Gardner AW, F.L., Smith GV: , Altered gait profile in subjects with peripheral arterial disease. *Vasc Med.*, 2001. 6: p. 31-4.
 56. Lane R, E.B., Watson L, Leng GC: , Exercise for intermittent claudication. *Cochrane Database Sys Rev*, 2014. 7.
 57. Aronow WS, N.D., Woodworth S, Ahn C. , Effect of simvastatin versus placebo on treadmill exercise time until the onset of intermittent claudication in older patients with peripheral arterial disease at six months and at one year after treatment. *Am J Cardiol*, 2003. 92: p. 711-712.
 58. Mohler ER, r., Hiatt WR, Creager MA. , Cholesterol reduction with atorvastatin improves walking distance in patients with peripheral arterial disease. *Circulation*, 2003. 108: p. 1481-1486.

59. Momsen AH, J.M., Norager CB, Madsen MR, Vestersgaard-Andersen T, Lindholt JS. , Drug therapy for improving walking distance in intermittent claudication: a systematic review and meta-analysis of robust randomised controlled studies. *Eur J Vasc Endo Surg*, 2009. 38: p. 463-474.
60. Ashimastos AA, P.E., Buttner PG, Walker PJ, Kingwell BA, Golledge J A: , Meta-analysis of the outcome of endovascular and noninvasive treatment of intermittent claudication. *J Vasc Surg*, 2011. 54: p. 1511–21.
61. Nordanstig J, G.J., Hensater M, Taft C, Osterberg K, Jivegard L: , Walking performance and health-related quality of life after surgical or endovascular invasive versus non-invasive treatment for intermittent claudication—a prospective randomised trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2011. 42: p. 220–7.
62. Tendera M, A.V., Bartelink ML, et al.: , ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 2011. 32: p. 2851–906.
63. Rooke TW, H.A., Misra S, et al., 2011 ACCF/AHA Focused update of the Guideline for the Management of Patients With Peripheral Artery Disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*, 2011. 58: p. 2020–45.
64. Dormandy J, M.M., Ascady G, Balsano F, De Leeuw P, Blombery P, Bousser MG, Clement D, Coffman J, Deutschinoff A, Bletry O, Hampton J, Hahler F, Ohlin P, Rieger H, Strandén E, Turpie AGG, Urai L, Verstraete M. , Fate of the patient with chronic leg ischaemia. 1, 1989. *J Cardiovasc Surg*: p. 50–57.
65. Rutherford RB, F.D., Gupta SK, Johnston KW, Karmondy A, Whittemore AD, Baker D, Ernst CB, Jamieson C, Mehta S. , Suggested standards for reports dealing with lower extremity ischemia. Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery/North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg*, 1986. 4: p. 80 –94.
66. Albers M, F.A., DeLuccia N., Assessment of quality of life of patients with severe ischemia as a result of infrainguinal arterial occlusive disease. *J Vasc Surg*, 1992. 16: p. 54 –59.
67. Diehm C, A.J.-R., Haberl R, et al. , High All-Cause Mortality in Patients with Peripheral Arterial Disease in Primary Care: Five-Year Results of the getABI Study. *Circulation*, 2007. 116: p. 841.
68. Hussain MA, A.-O.M., Mamdani M, et al. , Efficacy of a guide- line-recommended risk-reduction program to improve cardio- vascular and limb outcomes in patients with peripheral arterial disease. *JAMA Surg*, 2016. 151(08): p. 742–750.
69. Höbaus C, H.C., Obendorf F, et al. , Center-based patient care enhances survival of elderly patients suffering from peripheral arterial disease. *Ann Med*, 2017. 49(04): p. 291–298.
70. Aboyans V, R.J., Bartelink MEL, et al; , ESC Scientific Document Group. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering athero- sclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries endorsed by: the European Stroke Organization (ESO), The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*, 2018. 39(09): p. 763–816.
71. Gerhard-Herman MD, G.H., Barrett C, et al. , AHA/ACC guideline on the management of patients with lower extremity peripheral artery disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart

- Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 2017. 135(12): p. 686–725.
72. Norgren L, H.W., Dormandy JA, et al., Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J Vasc Surg*, 2007. 45: p. S5–S67.
 73. Golomb BA, D.T., Criqui MH. , Peripheral arterial disease: morbidity and mortality. *Circulation* 2006. 114: p. 688–699.
 74. Fowkes FG, M.G., Butcher I, Heald CL, Lee RJ, Chambless LE, Folsom AR, Hirsch AT, Dramaix M, deBacker G, Wautrecht JC, Kornitzer M, Newman AB, Cushman M, Sutton-Tyrrell K, Fowkes FG, Lee AJ, Price JF, d’Agostino RB, Murabito JM, Norman PE, Jamrozik K, Curb JD, Masaki KH, Rodriguez BL, Dekker JM, Bouter LM, Heine RJ, Nijpels G, Stehouwer CD, Ferrucci L, McDermott MM, Stoffers HE, Hooi JD, Knottnerus JA, Ogren M, Hedblad B, Witteman JC, Breteler MM, Hunink MG, Hofman A, Criqui MH, Langer RD, Fronck A, Hiatt WR, Hamman R, Resnick HE, Guralnik J, McDermott MM., Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA*, 2008. 300: p. 197–208.
 75. Conte MS, P.F., Clair DG, Geraghty PJ, McKinsey JF, Mills JL, Moneta GL, Murad MH, Powell RJ, Reed AB, Schanzer A, Sidawy AN. , Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication. *J Vasc Surg*, 2015. 61 (3 Suppl): p. 2s–41s.
 76. Golomb BA, D.T., Criqui MH. , Peripheral arterial disease: morbidity and mortality. *Circulation*, 2006. 114: p. 688–699.
 77. V., C.M.A., Epidemiology of peripheral arterial disease. *Circ Res*, 2015. 116: p. 1509-1526.
 78. Reinecke H, U.M., Freisinger E, et al.: , Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence. *Eur Heart J*, 2015. 36: p. 932–8.
 79. Bochenek, M.L. and K. Schafer, Role of Endothelial Cells in Acute and Chronic Thrombosis. *Hamostaseologie*, 2019.
 80. N, R.R., The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *Engl. J Med.*, 1986. 314: p. 488-500.
 81. Mora, R., Lupu. F. & Simionescu. N. A, Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis*, 1987. 67: p. 143-154.
 82. S., M.J.M.C.R., The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab. Invest.*, 1988. 58: p. 249-261.
 83. Rosenfeld. M. E.. Tsukada, T.G.A.M.R., R Fatty streak initiation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis*, 1987. 7: p. 9-23
 84. Colburn P, B., Anti-clotting activity of endothelial cell cultures and heparan sulfate proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* 1982.
 85. Moncada S, G.R., Bunting S, Vane JR, An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 1976.
 86. Mellion, B.T., et al., Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood*, 1981. 57(5): p. 946-55.
 87. Radomski MW, P.R., Moncada S, Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 1987: p. 2(8567):1057–1058.
 88. Yau JW, T.H., Verma S, Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord*, 2015.
 89. O'Brien PJ, P.N., Molino M, et al., Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin- cleaved PAR1. *J Biol Chem* 2000. 275(18): p. 13502–13509.

90. Storck J, K.B., Zimmermann ER, The tethered ligand receptor is the responsible receptor for the thrombin induced release of von Willebrand factor from endothelial cells (HUVEC). *Thromb Res*, 1995. 77(03): p. 249–258.
91. Stearns-Kurosawa DJ, K.S., Mollica JS, Ferrell GL and Esmon CT. , The 23 endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-24 thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1996. 93: p. 10212-6.
92. Moore KL, E.C., Esmon NL, Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. . *Blood*, 1989. 73(01): p. 159–165.
93. Frydland M, O.S., Møller JE, et al. , Plasmaconcentration of biomarkers reflecting endothelial cell- and glycocalyx damage are increased in patients with suspected ST-Elevation myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. *Shock* 2018. 50 (05): p. 538–544.
94. Walsh TG, M.P., Berndt MC, The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis. *Platelets*, 2015. 26 (03): p. 199–211.
95. Ribes JA, N.F., Wagner DD, Francis CW., Mediation of fibrin-induced release of von Willebrand factor from cultured endothelial cells by the fibrin beta chain. *J Clin Invest*, 1989. 84(02): p. 435–442.
96. Evans CE, H.J., Waltham M, et al. , Upregulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha in local vein wall is associated with enhanced venous thrombus resolution. *Thromb Res*, 2011. 128(04): p. 346–351.
97. Arderiu G, P.E., Badimon L. , Angiogenic microvascular endothelial cells release microparticles rich in tissue factor that promotes postischemic collateral vessel formation *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015. 35(02): p. 348–357
98. Bochenek ML, G.R., Großmann S, Krug J, Orth J, Reyda S, Georgiadis GS, Spronk HM, Konstantinides S, Münzel T, Griffin JH, Wild P, Espinola-Klein C, Ruf W, Schäfer K, EPCR-PAR1 biased signaling regulates perfusion recovery and neovascularization in peripheral ischemia. *JCI Insight*, 2022. 7(14).
99. Laszik Z, M.A., Taylor FB Jr, et al, Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation*, 1997. 96: p. 3633–3640.
100. Zlokovic BV, G.J., Cytoprotective protein C pathways and implications for stroke and neurological disorders. *Trends Neurosci*, 2011. 34: p. 198–209.
101. Mosnier LO, S.R., Burnier L, et al., Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46. *Blood*, 2012.
102. Joyce DE, G.L., Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. , Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*, 2001. 276: p. 11199-11203.
103. Cheng T, L.D., Griffin JH, et al. , Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med.*, 2003. 9: p. 338-342.
104. Riewald M, P.R., Donner A, Mueller BM, Ruf W., Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. . *Science*, 2002. 296: p. 1880-1882.
105. Riewald M, R.W., Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem*, 2005. 280: p. 19808-19814.
106. Guo H, L.D., Gelbard H, et al. , Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron*, 2004. 41: p. 563- 572.
107. Joyce DE, G.B., Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med*, 2002. 30: p. S288-S293.
108. Francini N, B.E., Blau N, et al., Gene expression profiling of inflamed human endothelial cells and influence of activated protein C. *Circulation*, 2004. 110: p. 2903-2909.

109. Laurent O, Mosnier¹, B.V.Z., and John H. Griffin¹, Cytoprotective-selective activated protein C therapy for ischemic stroke. 2014. 112(5): p. 883–892.
110. Kurosawa S, S.-K.D., Hidari N, Esmon CT, Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma. *J Clin Invest*, 1997. 100: p. 411-8.
111. CT, E., Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. *Crit Care Med* 2004. 32: p. S298–S301.
112. Xu J, Q.D., Esmon NL, et al: , Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem*, 2000. 275: p. 6038–6044.
113. Xu J, Q.D., Esmon NL, Esmon CT., Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem*, 1999. 275: p. 6038–44.
114. Menschikowski M, H.A., Eisenhofer G, et al, Regulation of endothelial protein C receptor shedding by cytokines is mediated through differential activation of MAP kinase signaling pathways. *Exp Cell Res*, 2009. 315: p. 2673–2682.
115. Qu D, W.Y., Esmon NL, et al, Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost*, 2007. 5: p. 395–402.
116. Kurosawa S, E.C., Stearns-Kurosawa DJ, The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18. *J Immunol*, 2000. 165: p. 4697–4703.
117. Stearns-Kurosawa DJ, S.K., D'Angelo A, et al, Plasma levels of endothelial protein C receptor respond to anticoagulant treatment. *Blood*, 2002. 99: p. 526–530.
118. Regan LM, M.J., Rezaie AR, Esmon CT, The interaction between the endothelial cell protein C receptor and protein C is dictated by the Gla domain of protein C. *J Biol Chem*, 1997. 272: p. 26279–84.
119. Kurosawa S, S.-K.D., Carson CW, et al, Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood*, 1998. 91: p. 725–727.
120. Uitte De Willige S, V.M.V., Rosendaal FR, et al, Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2004, 2:1305–1310. *J Thromb Haemost*, 2004. 2: p. 1305–1310.
121. Medina P, N.S., Corral J, et al, Endothelial protein C receptor polymorphisms and risk of myocardial infarction. *Haematologica* 2008. 93: p. 1358–1363.
122. R, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-809. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 801-809.
123. Adams DH, S.S., Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet*, 1994. 343(8901): p. 831-836.
124. Bevilacqua, M.P., Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annual Review Immunology*, 1993. 11: p. 767± 804.
125. Rohde LE, H.C., Ridker PM, Cross-sectional study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and cardiovascular risk factors in apparently healthy men *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(7): p. 1595-1599.
126. Tedder, T.F., Steeber, D. A., Chen, A., and Engel, P., The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB Journal*, 1995. 9: p. 866±873.
127. Haught WH, M.M., Rothlein R, et al. , Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am Heart J*, 1996. 132(1 pt 1): p. 1-8.
128. Hwang SJ, B.C., Sharrett AR, et al. , Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*. *Circulation*, 1997. 96(12): p. 4219-4225.
129. Blankenberg S, R.H., Bickel C, et al. , Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation*. *Circulation*, 2001. 104(12): p. 1336-1342.

130. Demerath E, T.B., Blangero J, Siervogel RM., The relation- ship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women. *Ann Hum Biol*, 2001. 28(6): p. 664-678.
131. Ridker PM, H.C., Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. , Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*, 1998. 351(9096): p. 88-92.
132. Salvatore Santo Signorelli a, Massimiliano Anzaldi a, Valerio Fiore a, Massimo Simili a, Giuseppe Puccia a, Massimo Libra c, Graziella Malaponte c, Sergio Neri b, Patients with unrecognized peripheral arterial disease (PAD) assessed by ankle-brachial index (ABI) present a defined profile of proinflammatory markers compared to healthy subjects. *Cytokine*, 2012. 59: p. 294-298.
133. T. Saetre, M., PhD1, E. Enoksen, PhD2, T. Lyberg, MD, PhD3, E. Strandén, PhD1,4, J. J. Jørgensen, MD, PhD1,4, J. O. Sundhagen, MD1, and J. Hisdal, PhD1, Supervised Exercise Training Reduces Plasma Levels of the Endothelial Inflammatory Markers E-Selectin and ICAM-1 in Patients With Peripheral Arterial Disease. *Angiology*, 2011. 62(4): p. 301-305.
134. X Wang, G.Z.F., J L Gu, P G Lysko, T L Yue, Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1995. 115(1): p. 89-98.
135. Kirii, H., et al., Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003. 23(4): p. 656–660.
136. Duewell, P., et al. , NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 2010. 464(7293): p. 1357–1361.
137. Rajamäki, K., et al., Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One*, 2010. 5(7): p. 11765.
138. al, D.G.e., Interleukin-1 β has atheroprotective effects in advanced atherosclerotic lesions of mice. *Nature Medicine*, 2018.
139. Ridker, P.M., et al. , Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *New England Journal of Medicine.*, 2017.
140. Ridker, P.M., et al., Modulation of the interleukin-6 signal- ling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all- cause mortality: analyses from the canakinumab anti-inflammatory thrombosis outcomes study (CANTOS). *European Heart Journal*, 2018. 39(38): p. 3499–3507.
141. Ridker, P.M., Rifai, N., Stampfer, M. J., & Hennekens, C. H., Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 2000.
142. al., S.K.e., Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *European Heart Journal*, 2014.
143. Kerry S Russell, D.P.Y., Christopher M Kramer, Andrea Feller, Ping Mahling, Laurence Colin, Timothy Clough, Tianke Wang, Lucy LaPerna, Alpa Patel, Holger Lawall, Mustafa M Shennak, James Fulmer, Sigrid Nikol, William B Smith, Oliver J Müller, Elizabeth V Ratchford, Craig T Basson, A randomized, placebo-controlled trial of canakinumab in patients with peripheral artery disease. *Vasc Med*, 2019. 24(5): p. 414-421.
144. Ferrara, N., and W. J. Henzel., Pituitary follicular cells secrete anovel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989. 161: p. 851-855.
145. Ishikawa, F., K. Miyazono, U. Hellman, H. Drexler, C. Westernedt, K. Hagiwara, K. Usuki, F. Takaku, W. Risau, and C-H. Heldin. , Identification ofangiogenic activity and the cloning and expression ofplatelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature (Lond.)*, 1989. 338: p. 557-561.

146. Isner JM, B.I., Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S, Symes JF, Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg*, 1998. 28: p. 964–973.
147. Makinen K, M.H., Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, Yla-Herttuala S, Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther*, 2002. 6: p. 127–133.
148. Henry TD, A.B., McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER., The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*. *Circulation*, 2003. 107: p. 1359–1365.
149. Iris Baumgartner, M.A.P., RN; Orit Manor, PhD; Richard Blair, MD; Marianne Kearney, BS; Kenneth Walsh, PhD; Jeffrey M. Isner, MD, Constitutive Expression of phVEGF165 After Intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients With Critical Limb Ischemia. *Circulation*, 1998. 97: p. 1114-1123.
150. Rajagopalan S, M.E.r., Lederman RJ, et al. , Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003. 108: p. 1933–8.
151. Mammoto, S.M.P., A. Mammoto, D. Gallagher, B. Chan, G. Mostoslavsky, D.E. Ingber, V.P. Sukhatme, Angiopoietin-1 requires p190 RhoGAP to protect against vascular leakage in vivo. *J. Biol. Chem*, 2007. 282: p. 23910–23918.
152. M. Jeansson, A.G., G. Anderson, C. Li, D. Kerjaschki, M. Henkelman, S.E. Quaggin, Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *J. Clin. Invest.*, 2011. 121: p. 2278–2289.
153. F. Baffert, T.L., G. Thurston, D.M. McDonald, Angiopoietin-1 decreases plasma leakage by reducing number and size of endothelial gaps in venules. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 2006. 290: p. H107–118.
154. Y. Xue, R.C., D. Nilsson, S. Chen, R. Westergren, E.M. Hedlund, C. Martijn, L. Rondahl, P. Krauli, E. Walum, S. Enerback, Y. Cao, FOXC2 controls Ang-2 expression and modulates angiogenesis, vascular patterning, remodeling, and functions in adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008. 105: p. 10167–10172.
155. S.P. Tabruyn, K.C., T. Morisada, J. Fuxe, S.J. Wiegand, and A.J.C. G. Thurston, J. Connor, D.M. McDonald, Angiopoietin-2-driven vascular remodeling in airway inflammation. *Am. J. Pathol.* , 2010. 177: p. 3233–3243.
156. Alexander Scholz, K.H.P., Yvonne Reis, Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2015. 1347: p. 45-51.
157. Y.J. Koh, H.Z.K., S.I. Hwang, J.E. Lee, N. Oh, K. Jung, M. Kim, and H.K. K.E. Kim, N.K. Lim, C.J. Jeon, G.M. Lee, B.H. Jeon, D.H. Nam, H.K. Sung, A. Nagy, O.J. Yoo, G.Y. Koh, Double antiangiogenic protein, DAAP, targeting VEGF-A and angiopoietins in tumor angiogenesis, metastasis, and vascular leakage. *Cancer Cell.* , 2010. 18: p. 171–184.
158. N.W. Gale, G.T., S.F. Hackett, R. Renard, Q. Wang, and C.M. J. McClain, C. Witte, M.H. Witte, D. Jackson, C. Suri, P.A. Campochiaro, S.J. Wiegand, G.D. Yancopoulos, Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev. Cell*, 2002. 3: p. 411–423.
159. Murdoch C, T.S., Webster S, Lewis CE, Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol* 2007. 178(11): p. 7405–7411.

160. Venneri MA, D.P.M., Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, Mazziere R, Doglioni C, Naldini L Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood*, 2007. 109(12): p. 5276–5285.
161. Coffelt SB, C.Y., Muthana M, Welford AF, Tal AO, Scholz A, Plate KH, Reiss Y, Murdoch C, De Palma M, Lewis CE Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to promote regulatory T cell expansion. *J Immunol*, 2011. 186(7): p. 4183–4190.
162. Jo`rn F. Dopheide, P.G., Jennifer Rubrech, Amelie Trumpp, Geraldine C. Zeller², Karsten Bock, Bernhard Dorweiler, Friedrich Dünschede, Thomas Münzel, Markus P. Radsak, Christine Espinola-Klein, Inflammation is associated with a reduced number of pro-angiogenic Tie-2 monocytes and endothelial progenitor cells in patients with critical limb ischemia. *Angiogenesis*, 2016. 19: p. 67–78.
163. Siebel C, L.U., Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiol Rev.* , 2017. 97: p. 1235–94.
164. Garcia, A., and Kandel, J. J. , Notch: a key regulator of tumor angiogenesis and metastasis. *Histol. Histopathol.*, 2012. 27: p. 151.
165. Luo, Z., Shang, X., Zhang, H., Wang, G., Massey, P. A., Barton, S. R., et al., Notch signaling in osteogenesis, osteoclastogenesis, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2019. 189: p. 1495–1500.
166. Heil, M., Eitenmüller, I., Schmitz–Rixen, T., and Schaper, W., Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J. Cell. Mole. Med.*, 2006. 10: p. 45–55.
167. Shutter, J.R., Scully, S., Fan, W., Richards, W. G., Kitajewski, J., Deblandre, G. A., et al. , Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Devel.*, 2000. 14: p. 1313–1318.
168. Liu, Z.-J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G. P., et al. , Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mole. Cell. Biol.*, 2003. 23: p. 14–25.
169. van Meeteren LA, t.D.P., Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell Tissue Res*, 2012. 347: p. 177–186.
170. Zeisberg EM, T.O., Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, . Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, . Kalluri R. , Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med*, 2007. 13: p. 952–961.
171. Zeisberg EM, P.S., Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. , Fibroblasts in kidney . fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*, 2008. 19: p. 2282–2287.
172. Manetti M, R.E., Rosa I, Guiducci S, Bellando-Randone S, De Paulis A, Ibba- . Manneschi L, Matucci-Cerinic M., Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, 2017. 76: p. 924–934.
173. JT., B., Vascular endothelium-derived cells containing smooth muscle actin are . present in restenosis. *Lab Invest*, 1995. 72: p. 771.
174. Ranchoux B, A.F., Rucker-Martin C, Hautefort A, Pechoux C, Bogaard HJ, . Dorfmuller P, Remy S, Lecerf F, Plante S, Chat S, Fadel E, Houssaini A, Anegon I, . Adnot S, Simonneau G, Humbert M, Cohen-Kaminsky S, Perros F., Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation*, 2015. 131: p. 1006–1018.
175. Moonen JA, L.E., Schmidt M, Maleszewska M, Koerts JA, Brouwer LA, Van . Kooten TG, Van Luyn MJ, Zeebregts CJ, Krenning G, Harmsen MC, Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to fibro-proliferative vascular disease and is . modulated by fluid shear stress. *Cardiovasc Res*, 2015. 108: p. 377–386.
176. Mahmoud MM, S.-C.J., Feng S, Souilhol C, Xing R, Hsiao S, Mammoto . A, Chen J, Ariaans M, Francis SE, Van der Heiden K, Ridger V, Evans PC. , Shear stress

- induces endothelial-to-mesenchymal transition via the transcription factor. *Snail Sci Rep*, 2017. 7: p. 3375.
177. Chen PY, Q.L., Baeyens N, Li G, Afolabi T, Budatha M, Tellides G, Schwartz MA, Simons M. , Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *J Clin Invest* 2015. 125: p. 4514–4528.
 178. Evrard SM, L.L., Michelis KC, Nomura-Kitabayashi A, Pandey G, Purushothaman KR, D'Escamard V, Li JR, Hadri L, Fujitani K, Moreno PR, Benard L, Rimmelé P, Cohain A, Mecham B, Randolph GJ, Nabel EG, Hajjar R, Fuster V, Boehm M, Kovacic JC. , Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 11853.
 179. Duy M. Ha, L.C.C., Panagiotis Koutakis, Stanley A. Swanson, Zhen Zhu, Mina Hanna, Holly K. DeSpiegelaere, Iraklis I. Pipinos and George P. Casale, Transforming growth factor-beta 1 produced by vascular smooth muscle cells predicts fibrosis in the gastrocnemius of patients with peripheral artery disease. *J Transl Med*, 2016. 14(39).
 180. Medici D, S.E., Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. , Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med*, 2010. 16: p. 1400.
 181. Wolf YG, R.L., Ruoslahti E. , Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest*, 1994. 93: p. 1172–1178.
 182. Merrilees M, B.B., Scott L, et al. , Effect of TGF-beta(1) antisense S-oligonucleotide on synthesis and accumulation of matrix proteoglycans in balloon catheter-injured neointima of rabbit carotid arteries. *J Vasc Res* 2000. 37: p. 50–60.
 183. Yamamoto K, M.R., Tomita N, et al., Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor-beta inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model: potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease. *Circulation*, 2000. 102: p. 1308–1314.
 184. Mohan Rao LV, E.C., Pendurthi UR, Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood*, 2014. 124: p. 1553 – 1562.
 185. Mosnier LO, Z.B., Griffin JH, The cytoprotective protein C pathway. *Blood*, 2007. 109: p. 3161–3172.
 186. AR, R., Protease-activated receptor signalling by coagulation proteases in 2 endothelial cells. *Thromb Haemost*, 2014. 112: p. 876–82.
 187. Rao, U.R.P.a.L.V.M., Endothelial cell protein C receptor-dependent signaling. 2018.
 188. Tanalp AC, O.V., Erkol A, Gozubuyuk G, Ozveren O, Dundar C, et al. , Soluble endothelial protein C receptor levels and protein C activity in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Coron Artery Dis.*, 2013. 24(3): p. 209-16.
 189. Choumous Kallel, W.C., Noémie Saut, Stefan Blankenberg, Renate Schnabel, Hans J Rupprecht, Christoph Bickel, Thomas Munzel, David-Alexandre Tregouet and Pierre-Emmanuel Morange, Association of soluble endothelial protein C receptor plasma levels and PROCR rs867186 with cardiovascular risk factors and cardiovascular events in coronary artery disease patients: The Athero Gene Study. *BMC Medical Genetics* 2012. 13: p. 103.
 190. Castellino FJ, P.V., The protein C pathway and pathologic processes. *J Thromb Haemost*, 2009. 7: p. 140–145.
 191. Boucher J, G.T., Liaw L. , Molecular pathways of notch signaling in vascular smooth muscle cells. *Front Physiol.* , 2012. 3: p. 81.
 192. D. QU, Y.W., * N. L. ESMON* and C. T. ESMON, Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost* 2007. 5: p. 395–402.
 193. Salvatore Santo Signorelli, M.A., Massimo Libra, Patrick M Navolanic, Graziella Malaponte, Katia Mangano, Cinzia Quattrocchi, Roberto Di Marco, Valerio Fiore,

- Sergio Neri, Plasma Levels of Inflammatory Biomarkers in Peripheral Arterial Disease: Results of a Cohort Study. *Angiology*, 2016. 67(9): p. 870.
194. Brill A, E.H., Varon D, Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2004. 63(02): p. 226–235.
 195. Waltham M, B.K., Collins M, McGuinness CL, Singh I, Smith A., Vascular endothelial growth factor enhances venous thrombus recanalisation and organisation. . *Thromb Haemost*, 2003. 89(01): p. 169–176.
 196. Kaeng W Lee 1 , G.Y.H.L., Andrew D Blann, Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes. *Circulation*, 2004. 110(16): p. 2355-60.
 197. Tim Holland-Letz, H.G.E., Stefanie Biedermann, Matthias Mahn, Joachim Kunert, Sabine Groh, David Pittrow, Peter von Bilderling, Reinhardt Sternitzky, Curt Diehm, Reproducibility and reliability of the ankle-brachial index as assessed by vascular experts, family physicians and nurses. *Vasc Med.* , 2007. 12(2): p. 105-12.
 198. Anastasia Kyselova, A.E., Ilka Wittig, Juliana Heidler, Alexander W. Mann, Wolfram Ruf, Ingrid Fleming, Voahanginirina Randriamboavonjy, Platelet-derived calpain cleaves the endothelial protease-activated receptor 1 to induce vascular inflammation in diabetes. *Basic Research in Cardiology*, 2020. 115: p. 75.
 199. Ireland H, K.C., Cooper JA, et al, EPCR Ser219Gly: elevated sEPCR, prothrombin F1+2, risk for coronary heart disease, and increased sEPCR shedding in vitro. *Atherosclerosis*, 2005. 183: p. 283–292.

IV. Anhang

EPCR pAVK

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie sind wegen (bzw. zum Ausschluss) einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) an der Universitätsmedizin Mainz in Behandlung.

Wir führen eine klinische Studie durch, in der wir den Zusammenhang zwischen im Blut zirkulierenden Faktoren und dem Vorliegen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit untersuchen.

Wir möchten Sie daher fragen, ob Interesse besteht, an einer wissenschaftlichen Studie teilzunehmen, welche von der Abteilung Kardiologie I (Allgemeine Kardiologie, interventionelle Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin) in Zusammenarbeit mit dem Centrum für Thrombose und Hämostase an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt wird?

ZIEL DER STUDIE

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) ist eine chronisch fortschreitende Einschränkung der Durchblutung aufgrund von Verengungen oder Verschlüssen von Blutgefäßen (Arterien) in Bein und/oder Arm. Für den Patienten macht sich die pAVK in einer eingeschränkten Gehstrecke und/oder reduzierten Schrittgeschwindigkeit bemerkbar und kann zu einer Einschränkung der Lebensqualität führen.

Auslöser der Erkrankung ist meist eine Störung der alle Blutgefäße auskleidenden Innenhaut (Endothel), meist aufgrund von Risikofaktoren für Herz-Kreislaufkrankungen wie erhöhter Blutdruck, erhöhter Blutzucker oder Rauchen. Diese Funktionsstörung des Endothels geht mit einer vermehrten Einwanderung von Entzündungszellen und einer vermehrten Neigung zu Blutgerinnseln einher. Ob sie auch die Fähigkeit des Körpers zur Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) einschränkt, ist bisher nicht genau bekannt. Eine funktionierende Fähigkeit zur Neubildung von Blutgefäßen trägt dazu bei, Gefäßeinengungen zu reparieren oder zu umgehen und unterstützt damit den Heilungsprozess.

Ziel der geplanten klinischen Studie ist zu bestimmen, ob die Konzentration eines an der Abwehr von Blutgerinnseln und Neubildung von Blutgefäßen beteiligten Faktors (*soluble Endothelial Protein Receptor C*) sowie von Faktoren, die an seiner Ablösung von der Gefäßinnenhaut beteiligt sind, zu bestimmen und festzustellen, ob Unterschiede zwischen Erkrankten und gesunden Personen bestehen. Darüber hinaus sollen Faktoren im Blut bestimmt werden, die bereits als Biomarker für eine Endothelfehlfunktion etabliert sind.

Ein besseres Verständnis der Ursachen der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit trägt dazu bei, die Diagnose und Behandlung der Erkrankung zu verbessern und eventuelle Folgeerkrankungen, wie einen akuten Herzinfarkt oder eine chronische Herzinsuffizienz, zu verhindern.

EPCR pAVK

ABLAUF DER STUDIE

Untersuchungsumfang:

Die Teilnahme an der Studie ist für Sie mit minimalem zusätzlichem Aufwand verbunden:

Im Rahmen einer angiologischen („gefäßmedizinischen“) Diagnostik ist eine funktionelle arterielle Untersuchung (Knöchel-Arm-Index, cw-Dopplersonographie, elektronische Oszillographie, Laufbanduntersuchung) notwendig. Diese Untersuchungen zur Feststellung der Diagnose werden nicht studienbedingt durchgeführt, sondern sind aufgrund Ihrer Krankheit im Rahmen der üblichen Heilfürsorge sowieso vorgesehen.

Bei Studienteilnahme werden Ihnen einmalig 17 ml Blut aus der Armvene abgenommen und daraus Plasma gewonnen.

Die an der Universitätsmedizin Mainz zur Abklärung der Diagnose der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit durchgeführten Untersuchungen werden für die Studie ausgewertet. Klinische Routedaten, die grundsätzlich immer dokumentiert werden (z.B. Symptome, Untersuchungsergebnisse, Therapie und gegebenenfalls mit der Behandlung einhergegangene Komplikationen), werden ebenfalls wissenschaftlich ausgewertet.

Außerdem werden mittels eines Fragebogens Informationen über Ihr Alter, Gewicht, Körpergröße, kardiovaskuläre Vorerkrankungen, Risikofaktoren und Medikamente eingeholt.

Die Durchführung der angiologischen Untersuchung (Messung des Blutdrucks an Armen und Beinen, Laufbandergometrie) sowie die Blutentnahme dauert für jeden Patienten insgesamt etwa 70 Minuten.

Es sind keine zusätzlichen Untersuchungstermine vorgesehen.

NUTZEN UND RISIKEN IHRER STUDIENTEILNAHME

Ihr Gesundheitsnutzen

Bei dieser Beobachtungsstudie unterscheidet sich die Behandlung von Studienteilnehmern nicht von der Behandlung von Patienten, die nicht daran teilnehmen. Alle Teilnehmer werden, ebenso wie die Nicht-Teilnehmer, nach nationalen und internationalen Leitlinien für die Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit an der Universitätsmedizin Mainz behandelt.

Für Sie entsteht damit kein gegenwärtiger Nutzen aus Ihrer Teilnahme. Die Informationen aus der Analyse der Beobachtungsstudie leisten aber einen wichtigen Beitrag zu neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen, um die Diagnose und Behandlung von Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit zu verbessern.

Ihr Risiko

Durch die Teilnahme an dieser Studie entstehen keine weiteren Risiken, da die Untersuchungen und Behandlungen sich nicht zwischen Teilnehmern und Nicht-Teilnehmern

EPCR pAVK

der Studie unterscheiden.

Bei der Blutentnahme kann es sein, dass Sie sich schwach fühlen oder dass leichte Schmerzen, ein Bluterguss, eine Reizung oder Rötung an der Entnahmestelle auftreten. In seltenen Fällen kann es zu einer Infektion kommen, oder Nerven können geschädigt werden.

Die Teilnahme ist freiwillig. Bei einer Nicht-Teilnahme entstehen Ihnen keinerlei Nachteile.

HINWEIS

Eine Aufwandsentschädigung oder Fahrtkostenerstattung ist nicht vorgesehen.

UMGANG MIT STUDIENDATEN

Die Studiendaten werden am Klinikum der Universitätsmedizin Mainz ausgewertet. Jedem Studienteilnehmer wird im Rahmen dieser Beobachtungsstudie eine Studienidentifikationsnummer zugeordnet. Unter der Studienidentifikationsnummer werden die im Rahmen der Studie erhobenen Daten getrennt von den persönlichen Daten gespeichert. Die Zuordnung der Studiennummer zum jeweiligen Studienteilnehmer ist nur der Studienleitung sowie von ihr bestimmten, eigens für die Betreuung der Studienteilnehmer eingesetzten Studienmitarbeitern bekannt.

Der Umgang mit den im Rahmen der Studie erhobenen persönlichen Daten und Studienergebnissen entspricht den Vorgaben der geltenden Datenschutzgesetze. Die erfassten Daten werden *pseudonymisiert*, also ohne Ihre persönlichen Daten (Name, Initialen, Anschrift und Geburtsdatum), und nur mit einer verschlüsselten Codenummer versehen in einer Studiendatenbank gespeichert, bearbeitet und ausgewertet. Die Zuordnung der Daten oder Proben zu einer Person ist nur möglich, wenn hierfür der Schlüssel verwendet wird, mit dem die Daten pseudonymisiert wurden. Die personenbezogenen Daten/Proben werden unter besonderen Schutzvorkehrungen getrennt von den pseudonymisierten Daten aufbewahrt. Die Entschlüsselung ist nur durch die verantwortlichen Studienärzte möglich.

Alle Datenbanken der Studie haben einen gesicherten Zugriff, der eine Anmeldung mit einem Passwort erfordert. Datenzugriff zu den personenbezogenen Daten hat nur die Studienleitung und deren unmittelbare und befugte wissenschaftliche Mitarbeiter. Sonstige Mitarbeiter der Studie erhalten nur Zugriff auf die für ihre speziellen Aufgaben erforderlichen pseudonymisierten Daten.

Die personenbezogenen Daten werden noch 10 Jahre nach Beendigung der klinischen Studie gespeichert, soweit gesetzliche Vorgaben nicht längere Fristen vorsehen, bevor sie unwiderruflich gelöscht und danach nur noch die anonymisierten klinischen Daten verwendet werden.

EPCR pAVK

Das Studienprotokoll wurde vor Beginn der Studie von der unabhängigen Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz begutachtet und zustimmend bewertet. Es werden die ethischen Prinzipien der Deklaration von Helsinki sowie die Leitlinien für "Gute klinische Praxis" (GCP) und "Gute epidemiologische Praxis" (GEP) eingehalten. Alle Mitarbeiter der Studie unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und/oder der Verpflichtung zur Geheimhaltung nach Artikel 42 EGStB (Verpflichtungsgesetz) und sind schriftlich zur Einhaltung des Datengeheimnisses verpflichtet worden.

Dritte Personen erhalten keinen Einblick in Originalunterlagen. Außerdem haben Sie die Möglichkeit, die Löschung Ihrer Daten zu verlangen.

Die Blutprobe wird in der Universitätsmedizin bei -80°C in für Dritte unzugänglichen Gefrierschränken zur Erforschung von Herz-Kreislaufkrankungen gelagert (für einen Zeitraum von maximal 10 Jahren). Die Proben werden nicht an Dritte weitergegeben. Ein zusätzliches Risiko ist dadurch nicht zu erwarten.

EINWILLIGUNG IN DIE TEILNAHME AN DER STUDIE

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Aufgenommen in die Studie werden nur Personen, die eine schriftliche Einwilligungserklärung unterschrieben haben. Die Einwilligung in die Studienteilnahme beinhaltet die Entbindung des Hausarztes bzw. der behandelnden Ärzte von der Schweigepflicht hinsichtlich studienrelevanter Erkrankungen.

Die Details zur Einwilligung zu den einzelnen Studienbestandteilen finden Sie in der Einwilligungserklärung. Wenn Sie sich zur Teilnahme an der Studie entschließen, bitten wir Sie, Ihre Einwilligung durch Ihre Unterschrift zu erklären. Die Einwilligungserklärung muss von Ihnen persönlich datiert und unterschrieben werden. Von der Einwilligungserklärung wird Ihnen eine Kopie ausgehändigt, das Original verbleibt im Studienzentrum.

Die Projektleiter und Studienärzte Univ.-Prof. Dr. med. Christine Espinola-Klein (Kontakt: espinola@uni-mainz.de) und Univ.-Prof. Dr. med. Katrin Schäfer (Kontakt: katrin.schaefer@unimedizin-mainz.de) sind für die Datenverarbeitung und Wahrung der sog. Betroffenenrechte verantwortlich.

WIDERRUF DER STUDIENTEILNAHME

Sie können Ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie jederzeit und ohne Angabe von Gründen schriftlich und/oder mündlich zurückziehen, ohne dass Ihnen daraus Nachteile entstehen.

Für den Fall, dass Sie von Ihrem Recht Gebrauch machen, Ihre Einwilligung an der

EPCR pAVK

Studienteilnahme zurückzuziehen beziehungsweise die Studie vorzeitig zu beenden, wird in der Personendatenbank ein Eintrag vorgenommen, der die Rücknahme der Einwilligung und das vorzeitige Studienende kenntlich macht. Die personenbezogenen Daten werden während der Datenerhebungsphase zunächst nicht gelöscht, um zu vermeiden, dass Sie nachfolgend erneut zwecks Studienteilnahme kontaktiert werden.

Mit Abschluss der Datenerhebungsphase werden Ihre personenbezogenen Daten schließlich vollständig aus der Datenbank gelöscht. Ihre bis dahin erhobenen und anonymisierten Analysedaten verbleiben in der Studiendatenbank und können weiterhin verwendet werden.

GEFÄHRDUNGSHAFTUNG

Vorsorglich werden Sie darauf hingewiesen, dass eine Versicherung für nicht schuldhaft verursachte Schäden, die im Zusammenhang mit der Studie auftreten können, nicht abgeschlossen wurde. Ein Versicherungsschutz besteht damit nur, wenn den Arzt oder einen anderen Mitarbeiter der Prüfstelle der Vorwurf eines schuldhaften Fehlverhaltens trifft. Zugunsten des Studienteilnehmers können dabei in bestimmten Fällen Beweiserleichterungen eintreten (Bürgerliches Gesetzbuch, § 630h: zur Beweislast bei Haftung für Aufklärungs- oder Behandlungsfehler).

Wegeunfälle sind eben ebenfalls nicht versichert.

Für die studienbedingten Blutentnahmen Versicherungsschutz über die Unfallkasse des Landes Rheinland-Pfalz (Orensteinstr. 10, 56626 Andernach, Tel. 02632 960-0, Fax 02632 960-1000).

INFORMATIONEN ZUM DATENSCHUTZ

Mit Inkrafttreten der Datenschutzverordnung (DSGVO) am 25. Mai 2018 sind wir verpflichtet, Ihnen Informationen im Zusammenhang mit der Verarbeitung Ihrer Daten an der Universitätsmedizin Mainz zu geben.

Kontaktdaten Verantwortliche für den Datenschutz:

Universitätsmedizin Mainz
Stabsstelle Datenschutz, Informationssicherheit und Digitale Transformation
Langenbeckstr. 1
55131 Mainz

Datenschutzbeauftragter:

Dr. Johannes Peter Fritsch
Telefon: 06131 17-4652
E-Mail: datenschutz@unimedizin-mainz.de

EPCR pAVK

Sie haben das Recht, Auskunft über die Sie betreffenden personenbezogenen Daten zu erhalten.

Auch können Sie die Berichtigung unrichtiger Daten verlangen. Darüber hinaus stehen Ihnen unter bestimmten Voraussetzungen das Recht auf Löschung von Daten, das Rechts auf Einschränkung der Datenverarbeitung sowie das Recht auf Widerspruch gegen die Verarbeitung und das Recht auf Datenübertragbarkeit zu.

Sie haben auch das Recht, sich bei der Aufsichtsbehörde für den Datenschutz zu beschweren, wenn Sie der Ansicht sind, dass die Verarbeitung Ihrer personenbezogenen Daten nicht rechtmäßig erfolgt. Die entsprechenden Kontaktdaten sind am Anfang dieses Abschnittes genannt.

KONTAKT BEI FRAGEN

Für weitere Fragen zu der Studie stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung, und zwar telefonisch unter:

Telefon 06131 17-4221
Adresse Langenbeckstrasse 1 in 55131 Mainz

Mit herzlichem Dank für Ihre Unterstützung,

Univ.-Prof. Dr. Christine Espinola-Klein
Projektleiterin/Prüfärztin

Univ.-Prof. Dr. Katrin Schäfer
Projektleiterin/Prüfärztin

PATIENTENEINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Untersuchung zirkulierender Biomarker von Endotheldysfunktion, Thrombose und Inflammation bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit

Studienzentrum:

Universitätsmedizin Mainz
Zentrum für Kardiologie / Kardiologie I
Allgemeine Kardiologie, interventionelle Kardiologie, Angiologie und internistische
Intensivmedizin
Langenbeckstrasse 1
55131 Mainz
Telefon: 06131 / 17-4221
Telefax: 06131 / 17-8047

Studienleiter und Studienärzte:

- Univ.-Prof. Dr. med. Christine Espinola-Klein**
- Univ.-Prof. Dr. med. Katrin Schäfer**
- Univ.-Prof. Dr. med. Stavros Konstantinides**
- Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Münzel**
- Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Wild**
- Sonstige/r Studienärztin / Studienarzt:**

Titel, Vor- und Nachname – in Druckbuchstaben

Zentrum für Kardiologie / Kardiologie I
Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg Universität Mainz
Langenbeckstrasse 1, 55131 Mainz

Seite 2/4

Hinweis: Bitte zutreffende/n Studienärztin / Studienarzt, die/der die Aufklärung des Patienten durchführt, ankreuzen. Diese(r) wird im Weiteren als behandelnde Ärztin / behandelnder Arzt bezeichnet.

Seite 2 von 4

Einwilligungserklärung

Ich erkläre mich bereit an der oben genannten Studie freiwillig teilzunehmen. Ich bin in einem persönlichen Gespräch ausführlich und verständlich über Inhalt, Bedeutung, Risiken und Tragweite der Studie aufgeklärt worden. Ich hatte die Gelegenheit zu einem Beratungsgespräch. Alle meine Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet, ich kann jederzeit neue Fragen stellen. Ich habe darüber hinaus den Text der Studienaufklärung gelesen und verstanden.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Ich habe verstanden und bin damit einverstanden, dass meine studienbezogenen Gesundheitsdaten pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angabe von Namen, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) erhoben, auf Datenträgern gespeichert und vom Auftraggeber der Studie ausgewertet werden. Die Daten werden 10 Jahre gespeichert und anschließend gelöscht.

Die Weitergabe an Dritte einschließlich Publikation erfolgt ausschließlich in anonymer Form, d.h. kann nicht meiner Person zugeordnet werden.

Für den Fall, dass ich die Studienteilnahme widerrufe, werden meine bereits erhobenen personenbeziehbaren Daten zum frühestmöglichen Zeitpunkt anonymisiert.

Ich habe weiterhin verstanden und bin damit einverstanden, dass nur die Studienleitung und deren unmittelbare und befugte wissenschaftliche Mitarbeiter Zugriff auf meine personenbezogenen Daten haben.

Ein Exemplar der Studieninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten, gelesen und verstanden.

(Datum – vom Patienten einzutragen)

(Unterschrift des Patienten)

(Name des Patienten in Druckbuchstaben)

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Teilnehmers eingeholt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift des aufklärenden Arztes)

(Institution des aufklärenden Arztes)

(Name des aufklärenden Arztes in Druckbuchstaben)

EPCR pAVK

Fragebogen

Pseudonymierungscode: _____ (wird vom Arzt ausgefüllt)

Bitte ankreuzen

Welcher ist der Grund für Ihren stationären Aufenthalt:

- Bei mir soll eine periphere arterielle Verschlusskrankheit ausgeschlossen werden.
- Bei mir wurde eine periphere arterielle Verschlusskrankheit bereits diagnostiziert.
- andere Gründe:
-

Geschlecht: männlich <input type="checkbox"/> weiblich <input type="checkbox"/>
Alter (Jahre):
Größe (m):
Gewicht (kg):
Welche Medikamente nehmen Sie momentan ein?
.....
.....
.....

Haben Sie Schmerzen in den Beinen oder Armen

-nur bei Belastung Ja Nein
-auch in Ruhe Ja Nein
- Ich habe keine Beschwerden Ja Nein

Wie lange können Sie normal laufen, bis Schmerzen auftreten?

- mehr als 200 m weniger als 200 m

EPCR pAVK

- | | | |
|---|-----------------------------|-------------------------------|
| Rauchen Sie aktuell? | Ja <input type="checkbox"/> | Nein <input type="checkbox"/> |
| Haben Sie hohen Blutdruck oder werden deshalb behandelt? | Ja <input type="checkbox"/> | Nein <input type="checkbox"/> |
| Leiden Sie an der Blutzuckerkrankheit (Diabetes mellitus)? | Ja <input type="checkbox"/> | Nein <input type="checkbox"/> |
| Haben Sie erhöhte Blutfette oder werden deshalb behandelt? | Ja <input type="checkbox"/> | Nein <input type="checkbox"/> |
| Hatten Sie schon einmal eine Thrombose (Blutgerinnsel)? | Ja <input type="checkbox"/> | Nein <input type="checkbox"/> |
| Hatten Sie schon einmal einen Herzinfarkt/Schlaganfall? | Ja <input type="checkbox"/> | Nein <input type="checkbox"/> |
| | | |
| Hat ein Familienmitglied eine periphere arterielle Verschlusskrankheit? | Ja <input type="checkbox"/> | Nein <input type="checkbox"/> |
| Hatte ein Familienmitglied eine Thrombose (Blutgerinnsel)? | Ja <input type="checkbox"/> | Nein <input type="checkbox"/> |
| Hatte ein Familienmitglied einen Herzinfarkt/Schlaganfall? | Ja <input type="checkbox"/> | Nein <input type="checkbox"/> |

V. Danksagung

Die Projektplanung, Patientenrekrutierung und Durchführung der experimentellen Analysen wäre ohne die Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei all denjenigen zu bedanken, die mir hierbei sowohl fachlichen als auch mentalen Beistand geleistet haben:

Mein größter Dank gilt ..., die mich seit Beginn der Promotionsarbeit zu jeder Zeit mit ihrer wissenschaftlichen Expertise fachlich hervorragend betreut hat. Weiterhin danke ich Ihnen für die gute menschliche Zusammenarbeit und die zahlreichen Gespräche mit stets bereicherndem und konstruktivem Austausch. Vielen Dank für Ihre ausdauernde Unterstützung und die stets zuverlässige Zusammenarbeit. Ich danke Ihnen für die Hilfestellung bei der Verfassung wissenschaftlicher Texte sowie die Möglichkeit, an einer Publikation teilhaben zu dürfen. An unsere Zusammenarbeit werde ich immer gerne zurückdenken.

Weiterhin möchte ich ... danken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses Projekt zu bearbeiten und mich bei der Patientenrekrutierung sowie dem gesamten klinischen Teil der Arbeit unterstützt hat. Vielen Dank für Ihre fachliche Kompetenz, mit der Sie diese Arbeit bereichert haben.

Ganz besonders danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Translationale Vaskuläre Biologie für die immer hilfsbereite und lehrreiche gemeinsame Zeit. Vielen Dank an ... und ... für die Anleitung und Durchführung der experimentellen Analysen. Ebenso danke ich ... und ... für die Beantwortung jeglicher Fragen und die Weitergabe ausgezeichneter Fachkompetenz.

Ebenso gilt mein Dank dem Ärzte- und Pflegeteam der angiologischen Ambulanz der Universitätsmedizin Mainz für die zuvorkommende Unterstützung bei der Patientenaufklärung und allen organisatorischen Belangen.

Auch ... möchte ich danken, welche die Zusammenarbeit mit der GHS ermöglichte und damit die Analysen dieser Arbeit um wertvolle Vergleichsdaten bereicherte.

Zudem danke ich der Robert Müller-Stiftung, welche diese Arbeit 2019 mit einem Promotionsstipendium auszeichnete und somit das Forschungsvorhaben fachlich und finanziell unterstützte.

Mein besonderer Dank geht an ... und meine ..., die ihrer Enkelin jederzeit unermüdlich beigestanden haben und mich nicht nur beim Anfertigen der Dissertation, sondern auch bei allen anderen Vorhaben meines Lebensweges immer ermutigt und gefördert haben. Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für die unersetzliche, liebevolle Unterstützung danken, die mich während des gesamten Studiums, der Promotion und weit darüber hinaus immer begleitet haben.

VI. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Krug
Vorname: Janina
Geburtsdatum: 15.05.1997
Geburtsort: Mainz
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/2003 bis 07/2007 Marc-Chagall-Grundschule Mainz-Drais
08/2007 bis 01/2011 Frauenlob-Gymnasium Mainz
01/2011 bis 11/1011 Auslandsaufenthalt in Neuseeland an der Whangarei Girls' High School
11/2011 bis 02/2012 Frauenlob-Gymnasium Mainz
03/2016 Abitur am Schloss-Gymnasium Mainz
Abschlussnote: 1,0

Hochschulausbildung:

10/2016 Beginn Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
08/2018 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2021 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2022 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktika und Famulaturen:

07/2017 bis 10/2017 Pflegepraktikum auf der Wahlleistungsstation im Katholischen Klinikum Mainz
02/2019 bis 04/2019 Kinderarzt Gonsenheim
02/2020 bis 03/2020 Gynäkologie im Katholischen Klinikum Mainz
07/2020 bis 08/2020 Gynäkologie im Katholischen Klinikum Mainz
03/2021 bis 04/2021 Zentrale Notaufnahme im Katholischen Klinikum Mainz

Praktisches Jahr:

11/2021 bis 03/2022

Innere Medizin, Klinikum St. Marienwörth,
Bad Kreuznach

03/2022 bis 06/2022

Diagnostische und Interventionelle Radiologie,
Uniklinik Mainz

06/2022 bis 09/2022

Chirurgie, Klinikum St. Marienwörth,
Bad Kreuznach

Promotion:

08/2019

Beginn der Promotion

Arbeitsgruppe: Translationale Vaskuläre Biologie

Kooperation: Angiologische Ambulanz und

Gutenberg-Gesundheitsstudie der

Universitätsmedizin Mainz

Thema: „Untersuchung zirkulierender Biomarker

von Endotheldysfunktion, Inflammation und

Angiogenese bei Patienten mit peripherer arterieller

Verschlusskrankheit“

Stipendium:

10/2019 bis 10/2020

Promotionsstipendium der Robert-Müller-Stiftung

Nebenjobs:

12/2018 bis 06/2021

Wissenschaftliche Hilfskraft im Angiologischen
Studienzentrum der Uniklinik Mainz