

Identifizierung des Verteilungs- und Expressionsmusters von Monozyten-Subtypen während der Progression der Atherosklerose bei Patienten mit pAVK im Stadium IIb-IV

Viktoria Peters

Angaben zur Veröffentlichung / Publication details:

Peters, Viktoria. 2025. "Identifizierung des Verteilungs- und Expressionsmusters von Monozyten-Subtypen während der Progression der Atherosklerose bei Patienten mit pAVK im Stadium IIb-IV." Augsburg: Universität Augsburg.

Nutzungsbedingungen / Terms of use:

licgercopyright

Dieses Dokument wird unter folgenden Bedingungen zur Verfügung gestellt: / This document is made available under these conditions:

Deutsches Urheberrecht

Weitere Informationen finden Sie unter: / For more information see:

<https://www.uni-augsburg.de/de/organisation/bibliothek/publizieren-zitieren-archivieren/publiz/>



Aus der Klinik für Gefäßchirurgie und endovaskuläre Chirurgie des
Universitätsklinikums Augsburg

**Identifizierung des Verteilungs- und
Expressionsmusters von
Monozyten-Subtypen während der
Progression der Atherosklerose bei
Patienten mit pAVK im Stadium IIb–IV**

Dissertation¹

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

eingereicht an der

Medizinischen Fakultät der Universität Augsburg

von

Viktoria Peters

Augsburg, 11.07.2024

¹ Kumulative Dissertation sollten die Bezeichnung „Kumulative Dissertation“ tragen.

Eidesstattliche Versicherung und Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Zudem wurden keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet. Außerdem versichere ich, dass die Dissertation keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde und ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

Statutory declaration and statement

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources/resources. As well I declare that I have not submitted a dissertation without success and not passed the oral exam. The present dissertation (neither the entire dissertation nor parts) has not been presented to another examination board.

Augsburg, 11.07.2024

Dissertation eingereicht am: 11.07.2024

Erstgutachter (Hauptbetreuer): Prof. Dr. med. Alexander Hyhlik-Dürr

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Rainer Claus

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2025

Widmung

An meinen lieben Ehemann und meine wunderbaren Eltern, die mich stets unterstützt und ermutigt haben auf meinem beruflichen und wissenschaftlichen Weg.

1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose und periphere arterielle Verschlusskrankheit aus heutiger Sicht	1
1.1.1	Definition, Stadien und Stellenwert der pAVK	3
1.1.2	Immunologische Erkenntnisse und offene Fragen	4
1.2	Bedeutung von Monozyten bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose	8
1.2.1	Monozytensubtypen – Definition und Eigenschaften	10
1.2.2	Monozytensubtypen in kardiovaskulären Erkrankungen	12
1.2.3	Biomarker für die Aktivierung von Monozyten	15
2	Problemstellung und Zielsetzung	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Studienpopulation, Ein- und Ausschlusskriterien	19
3.2	Materialien.....	20
3.2.1	Geräte	20
3.2.2	Verbrauchsmaterialien	20
3.2.3	Medien und Reagenzien	21
3.2.4	Antikörper	21
3.3	Methoden	22
3.3.1	Isolation mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation	22
3.3.2	Bestimmung von Zellzahl- und Vitalität	23
3.3.3	Anfärbung mit Antikörpern	24
3.3.4	Kryokonservierung.....	25
3.3.5	Auftauen von eingefrorenen PBMC.....	25
3.3.6	Isolation von Monozyten aus PBMC und Vollblut in verschiedenen Medien ..	26
3.3.7	FACS- Analyse	26
3.3.8	Auswertung.....	33
4	Ergebnisse	35
4.1	Charakteristik des Patientenkollektivs	35
4.2	Korrelation zwischen Baseline-Parameter und Monozyten-Werte	39
4.3	Einfluss des Zellisolationsmedium auf die Bestimmung von	

Monozyten im peripheren Blut.....	41
4.4 Einfluss der Kryokonservierung auf die Vitalität und Erhalt der Zellen.....	43
4.5 Einfluss der Kryokonservierung auf die Detektion von CD14, CD16 und CD163 auf Monozyten	46
4.6 Monozyten-Anteile bei Patienten mit pAVK und gesunden Probanden	48
4.7 Verteilungsmuster der Monozytensubtypen bei pAVK-Stadium II, III, IV und bei Gesunden	52
4.8 Expression von CD163 auf Monozyten-Subtypen	56
4.9 Zusammenfassung der Ergebnisse	58
5 Diskussion.....	59
6 Zusammenfassung.....	68
7 Abstract	69
8 Literaturverzeichnis	70
Appendix.....	78

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose und periphere arterielle Verschlusskrankheit aus heutiger Sicht

Die obstruktive Atherosklerose ist eine langsam über die Lebensspanne hinweg fortschreitende Erkrankung der Blutgefäße, die den gesamten Gefäßbaum betreffen kann. Meist manifestiert sich die Atherosklerose als subakutes oder akutes ischämisches Ereignis, infolge von totalem Verlust des Gefäßlumens oder Ruptur der instabil gewordenen atherosklerotischen Plaque (1). Hinter dieser, auf mechanischer Funktionsstörung implizierender Pathologie, verbirgt sich ein komplexes Zusammenspiel aus multiplen individuellen Faktoren: familiärer Belastung, Lebensstil, Stoffwechselstörungen, Umwelteinflüssen, koexistierenden Erkrankungen, Hämostase, und, wie immer mehr klar wird, der immunologischen Ausstattung des Organismus (2). Die Atherosklerose-Prävention kann aus einer Reihe von Gründen versagen. Dazu gehören soziale und wirtschaftliche Determinanten, wie mangelndes Wissen und Verständnis für die Faktoren, die zum kardiovaskulären Risiko beitragen (3), Armut (4), Barrieren des Gesundheitssystem (5), aber auch psychosoziale Stressfaktoren in Hochlohnländern (6). Die allgegenwärtigen Auswirkungen von koronarer Herzerkrankung (KHK), Schlaganfall und peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) zeigen die dringende Notwendigkeit fortgesetzter und intensiver Forschungsanstrengungen, um die Behandlungskonzepte und Therapieansätze für die Betroffenen zu verbessern.

Aus chirurgischer Sicht, wurden die Therapieoptionen für vaskuläre Erkrankungen, insbesondere in den letzten zwei Jahrzehnten so weit entwickelt, dass die Behandlung der atherosklerotischen Läsionen in nahezu jedem wichtigen anatomischen Segment technisch möglich, und in hochentwickelten Industriestaaten wie Deutschland, breit verfügbar ist. Dennoch bleibt die alltägliche Versorgungsrealität ernüchternd – während immer mehr auf Qualität der ärztlichen Ausbildung und Zusammenarbeit akzentuiert wird (7), immer neue und bessere Materialien und Devices für die Revaskularisation von atherosklerotischen Läsionen zur Verfügung stehen (8, 9), scheint uns die Krankheit in den meisten Fällen einen Schritt voraus zu sein. Es handelt sich um multimorbide Patienten, die oft ubiquitär und irreversibel von den Folgen der Atherosklerose im Körper betroffen sind und die trotz optimaler chirurgischer und

medikamentöser Behandlung kurz- oder mittelfristig an derselben oder zusätzlichen Gefäßlokalisationen progressive de novo atherosklerotische Läsionen oder Re-Stenosen entwickeln (10, 11).

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit und verursachen etwa 17,9 Millionen Todesfälle pro Jahr, was über ein Drittel aller Todesfälle entspricht (12). In Europa sind atherosklerotische Erkrankungen die Ursache für 45% der Todesfälle (13). Die erhebliche sozioökonomische Problematik, verursacht durch kardiovaskuläre Erkrankungen, ergibt sich jedoch vor allem aus der Morbidität, dem Verlust an Lebensqualität, dem vorzeitigen Fehlen am Arbeitsplatz und im sozialen Leben, sowie den enormen medizinischen Ausgaben, bestehend sowohl aus direkten Gesundheitskosten, als auch aus indirektem Produktivitätsverlust und Pflegeaufwand für die Betroffenen (14, 15).

Trotz ähnlicher pathogenetischer Mechanismen und Risikoprofil der atherosklerotischen Erkrankungen, impliziert die unterschiedliche klinische Manifestation auf signifikante Variationen der zugrundeliegenden Prozesse.

So sind Rauchen und Diabetes als Risikofaktoren stärker mit der Entstehung und dem Schweregrad der pAVK assoziiert, als mit Manifestation der Atherosklerose im Herz- und im zerebrovaskulären Bereich (16, 17). Arterieller Hypertonus und Dyslipidämie als klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren, wurden in zahlreichen Studien als Indikatoren für das erhöhte pAVK-Risiko bestätigt. Der arterielle Hypertonus hat dabei ein höheres attributives Risiko bei pAVK von bis zu 40% in Vergleich zu 17% für die Hypercholesterinämie (18, 19).

Während ältere Studien vor allem die Assoziation zwischen pAVK und erhöhtem Gesamtcholesterinwert untersuchten (20), liefern neuere Studien den Beweis für weitere Produkte des Lipidstoffwechsels, wie z.B. das Restcholesterol als stark atherogenen Teil von VLDL (*very low density lipoprotein*), welches mit einem fünffach erhöhtem Risiko für pAVK assoziiert wurde (21). Des Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass erhöhte Plasma-Spiegel an Triglyceride eine besondere Rolle im Krankheitsverlauf der pAVK haben und mit dem früheren Auftreten von kritischer Ischämie korrelieren (22). Insgesamt sind alle Lipoproteine, die ApoB enthalten mit Arteriosklerose-Entwicklung assoziiert, diese Partikel unterscheiden sich jedoch in ihrem Apolipoprotein- und Triglycerid-Gehalt. Der große Effekt der Behandlung von pAVK-Patienten mit PCSK9- Inhibitor in der FOURIER Studie, in welcher eine signifikante Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen insgesamt und von schwerwiegender Ausprägung von pAVK an den unteren Extremitäten erreicht werden

konnte, betont die Bedeutung von LDL (*low density lipoprotein*) in der Pathogenese von pAVK. Die Studie zeigte zudem einen Vorteil der aggressiven LDL-Senkung von <10 mg/dL (23), was deutlich unterhalb der aktuell empfohlenen Grenze von <55mg/dL liegt. In den fachspezifischen Kreisen ist der Paradigma-Wechsel entstanden, dass ein individuell formuliertes LDL-Ziel (analog zu HbA1c-Ziel), unter Berücksichtigung von LDL-Ausgangswert, Alter und Medikamenteninteraktionen, eine sinnvolle Option darstellt (24).

Ein weiteres Zukunftsziel der Präzisionsmedizin beinhaltet die Bestimmung und Senkung der Lp(a)- Isoformen. Erhöhte Lp(a)- Plasmaspiegel tragen wesentlich zu kardiovaskulärer Morbidität bei (25), insbesondere zu erhöhter pAVK-Inzidenz, sowie damit verbundenen Hospitalisierungsrate und Mortalität (26). Der atherogene Effekt von Lp(a) wird nach heutigem Wissensstand zum einen durch den LDL-ähnlichen Anteil des Moleküls, zum anderen durch die physiologische Fähigkeit oxidierte Phospholipide zu binden, und zusätzlich durch den Plasminogen- ähnlichen Domäne auf Apo(a) erklärt (27). Die Mechanismen, über die, die identifizierten „Risikostrukturen“ zu kardiovaskulären Komplikationen führen, haben gemeinsam, dass Veränderungen der Immunantwort entstehen. So kann beispielsweise durch neue in-vivo-Bildgebungstechniken gezeigt werden, dass Lp(a) zu Monozytenaktivierung und Migration in der Arterienwand führt (28).

Selbst nach gelungener Kontrolle der Risikofaktoren, wird das Restrisiko für kardiovaskuläre Ereignisse hauptsächlich den inflammatorischen Prozessen zugeschrieben (29, 30). Die Erforschung von Zielstrukturen und die Erarbeitung von Strategien zur Modulation der in der Atherosklerose-Progression bzw. Stabilisierung beteiligten Immunantworten gilt somit als eine der wichtigen Aufgaben für die Zukunft, um die Entwicklung von komplementären Therapien und effiziente Sekundärprophylaxe zu erreichen.

1.1.1 Definition, Stadien und Stellenwert der pAVK

Die pAVK ist eine durch Stenosen oder Okklusion peripherer Arterien verursachte verminderte Durchblutung der Extremitäten (in den meisten Fällen der unteren Extremität) auf dem Boden von Atherosklerose (31) .

Die Quantifizierung der pAVK erfolgt mittels ABI (ankle brachial Index = Knöchel-Arm-Index) Messungen. Dieser errechnet sich als Quotient aus dem niedrigsten systolischen Wert des betroffenen Beins, gemessen an der Arteria dorsalis pedis,

Arteria tibialis posterior und A. fibularis mit einer Doppler-Sonde, und dem mittleren systolischen Blutdruck, gemessen an der rechten und linken Arteria brachialis. Als Pathologisch gilt ein Wert $<0,9$ (32).

Der ABI-Index ist der Goldstandard als diagnostischer Test für die pAVK und wird seit Ende der 1960er Jahre eingesetzt (33). Die Schweregrad-Einteilung nach ABI-Messwerte lautet: 0,75-0,9 leichte pAVK, 0,5 – 0,75 mittelschwere pAVK und $< 0,5$ schwere pAVK, mit $\text{ABI} < 0,4$ kritische Ischämie, definiert als chronische (≥ 2 Wochen) ischämische Ruheschmerzen, nicht heilende Wunden oder Gangrän (34).

Der besondere Stellenwert der pAVK besteht darin, dass diese im Gegensatz zu Myokardinfarkt und Schlaganfall in der Gesellschaft wesentlich weniger beachtet und als weniger bedrohlich wahrgenommen wird (26). Sie ist deutlich unterdiagnostiziert (27, 28), besitzt jedoch eine wichtige Bedeutung als Marker für die atherosklerotische Krankheitslast. Es gibt eine Reihe von Beweisen, dass die periphere arterielle Verschlusskrankheit ein starker Prädiktor für zukünftige Myokardinfarkte und Schlaganfälle darstellt (35, 36). Der Schweregrad nach ABI-Kriterien korreliert mit der allgemeinen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität der Patienten (37, 38).

1.1.2 Immunologische Erkenntnisse und offene Fragen

Seit der ersten, vom russischen Wissenschaftler Anichkov Anfang des 20. Jahrhunderts beschriebenen Theorie der Atherosklerose-Entstehung durch aus Makrophagen stammenden „Cholesterinesterphagozyten“ (39), die heute als Schaumzellen bekannt sind, ist die Pathogenese des chronisch-inflammatorischen Prozess der Atherosklerose in zahlreichen Studien identifiziert.

Der atherosklerotische Prozess beginnt mit der Ansammlung zirkulierender LDL - Partikel in der Intima, wo sie durch oxidative Modifikationen in Auto-Antigene verwandelt werden (40). Die Produktion von oxidiertem LDL (oxLDL) ist eine Kombination aus der Exposition des Endothels oxidativer Noxen (41) und Signaltransduktionskaskaden, die im Zusammenhang mit hämodynamisch-strukturellen Schädigungen des Endothels stehen (42). Die oxidative Dysbalance bei pAVK Patienten wurde sowohl anhand den erhöhten Konzentrationen von oxLDL und oxLDL-Antikörpern (43), als auch anhand von direkt erhöhten reaktiven Sauerstoffmetaboliten (44) im Blut nachgewiesen.

Wie die modifizierte LDL-Partikel als Antigene agieren und das Immunsystem aktivieren ist am Beispiel des ApoB100, ein wichtiger Bestandteil von LDL, gut erforscht. Dendritische Zellen nehmen modifiziertes ApoB100 aus dem Endothel als

Antigen auf. Einige wandern in den Lymphknoten, wo sie naiven T-Zellen dieses Antigen präsentieren. Nach der Aktivierung entwickeln sich diese Zellen zu Effektor-T-Zellen, die in den Blutkreislauf gelangen. Wenn Effektor-T-Zellen in atherosklerotische Plaques rekrutiert werden, werden sie durch dieses Antigen reaktiviert, das von lokalen Makrophagen und dendritischen Zellen präsentiert wird. Des Weiteren löst die Internalisierung der modifizierten LDL-Partikel durch Makrophagen intrazelluläre Signalkaskaden aus, die zur Expression einer Reihe von Genen führt, die für proinflammatorische Moleküle kodieren. Es entsteht eine „Zytokin-Explosion“, ähnlich wie bei Autoimmunerkrankungen, welche die Entzündungsreaktion kaskadenartig vorantreibt (45).

Der konstante inflammatorische Prozess spiegelt sich in den erhöhten Plasmakonzentrationen von CRP (C-reaktives Protein), IL-6, IL1-Rezeptorantagonist und Fibrinogen im Blut von pAVK-Patienten in einer populationsbasierten Studie wider, in der eine Erhöhung der inflammatorischen Marker unabhängig vom Stadium und den klassischen Risikofaktoren vorlag (46).

Die oxidativ degradierten Epitope auf Lipoproteine und Phospholipide agieren also als sog. PAMPs – pathogen associated molecular patterns. Scavenger Rezeptoren, sowie Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf Makrophagen erfüllen die Rolle von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs).

Makrophagen verfügen ebenso über intrazelluläre PRRs, die bekanntesten davon sind die zytoplasmatischen Proteinkomplexe sogenannte Inflammasome, insbesondere das NLRP3-Inflammasom. Das NLRP3-Inflammasom wird durch phagozytierte Cholesterinkristalle oder CD36-vermittelte oxLDL-Aufnahme aktiviert, wodurch eine IL-1 β -vermittelte Inflammation in Gang gesetzt wird. Verschiedene Medikamente mit inhibierender Wirkung auf das NLRP3-Inflammasom, wie Metformin, Dapagliflozin und Colchicin haben potentiell günstige Auswirkung auf die über diesen Weg getriggerte Schaumzellaktivierung (47). In der CANTOS Studie wurde die Wirkung des monoklonalen IL-1 β -Antikörper Canakinumab, welches für die Therapie von rheumatischen Erkrankungen zugelassen ist, auf das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen geprüft. Es zeigte sich zwar einen wesentlichen Vorteil für die mit kardiovaskulären Erkrankungen verbundenen Gesamtmorbidität, bei jedoch gleichzeitig erhöhtem Risiko für fatale Sepsis (48). Selbst wenn es dadurch nicht möglich war eine Immuntherapie für Atherosklerose zu etablieren, setzte die Studie Meilensteine für die weitere therapeutische Forschung.

Die Erforschung der Rolle verschiedener Inflammasomen und die damit verbundenen

Auswirkungen auf die Krankheit, sind ein aktuelles Forschungsziel. Eine experimentelle Studie aus Spanien zeigt, dass bei pAVK-Patienten eine erhöhte Transkription des NLRP1-Infammasom direkt in Endothelzellen vorliegt, und dass die Intensität der NLRP-1 Expression mit der Schwere der endothelialen Dysfunktion korreliert (49). Somit könnte das NLRP1-Infammasom, welches vor allem aus inflammatorischen Hauterkrankungen (50) und aus der Alzheimer-Forschung bekannt ist (51), eine Rolle bei den Prozessen spielen, die zu Umbau und Dysfunktion des Endothels führen. Die am häufigsten in der Gefäßwand vorkommenden Immunzellen sind aus Monozyten stammenden Makrophagen. Sie sind auch und diejenigen, die bisher am meisten durch epigenetische und metabolische Reprogrammierung verändert werden können (52). Makrophagen werden grundsätzlich in einen klassischen, M1-Phänotyp und einen nicht-klassischen, M2-Phänotyp unterteilt. M1-Makrophagen sind mit Sekretion inflammatorischer Signalmoleküle wie IL-6, IL-12 und Tumornekrosefaktor (TNF) assoziiert, während dem M2 Phänotyp entzündungshemmende Immunantworten und Gewebereparaturmechanismen zugeschrieben werden. Die Polarisierung zu den Subtypen ist von kostimulatorischen Signalen und Zytokinen des Micromillieu abhängig. Eine aktive Induktion der zwei verschiedenen Phänotypen wird zunehmend in vitro, sowie in vivo erprobt (53).

Die Vorstellung ist, dass eine M1/ M2 - dominante Programmierung beeinflussen kann, ob eine T-Helfer Typ 1 (TH1) oder Typ 2 (TH2) Antwort oder andere Arten von adaptiven Entzündungsreaktionen auftreten (54). Diese prototypische Nomenklatur ist zwar sehr verbreitet, aber es ist auch klar, dass reine M1 oder M2 Makrophagen, in dem dynamischen, vielen Stimuli ausgesetztem Milieu des menschlichen Körpers, wahrscheinlich nicht existieren. Neuere Studien ergänzen die Erkenntnisse und die Klassifizierung der Plaque-Makrophagen nach dem ontogenetischen Konzept (55). Demnach ist bei der Atherosklerose-Entwicklung das Gleichgewicht zwischen den Adventitia-residenten, Homöostase regulierenden und den aus Monozyten-rekrutierten, inflammatorischen Makrophagen gestört.

Zwei Studien liefern Beweise, dass im Blut von Patienten mit atherosklerotischer Erkrankung Monozyten von einem Lipid-geprägten Phänotyp zirkulieren, die über erhöhte Zytokin Produktionskapazität (56), verstärkte Endothelbindung- und transendothelialen Migrationsfähigkeit verfügen (28) und den Pool an atherosklerotische Makrophagen auffüllen.

Neben Monozyten und Makrophagen, sind Vertreter des adaptiven Immunsystems, in erster Linie die CD4 positive (CD4+) T- Zellen für die atherosklerotischen Läsionen

wichtig. Die wichtigste Gruppe davon, TH1-Zellen produzieren IFN γ (Interferon gamma), was die Aktivierung von Makrophagen fördert und den Kollagenabbau verstärkt (57). TH2-Zellen sind in atherosklerotischen Plaques viel seltener als TH1-Zellen. Die TH2-spezifische Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 wurden in experimentellen Studien als solcher mit atheroprotektiven Wirkung identifiziert, aber die zugrundeliegenden Mechanismen sind weitgehend ungeklärt (58). Bekannt ist jedoch, dass die TH1- und TH2-Signalwege sich gegenseitig kontrollieren, indem sie Zytokine (IFN- γ bzw. IL-10) produzieren, die den anderen Signalweg hemmen, und dass die Verschiebung der TH1- zu-TH2 Zelldifferenzierung, durch Ausschalten der TH1-Transkriptionsfaktor T-bet, und die damit verbundenen Antikörperproduktion, zu einer Reduktion der Atherosklerose im Mausmodell führt (59). Ob diese Mechanismen in den menschlichen Plaques stattfinden, ist unbekannt. Die bisherigen Untersuchungen von TH1- und TH2-spezifischen Interleukine im Blut von Patienten mit pAVK zeigte keine prognostische Aussagekraft. Statt eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen TH1 und TH2 Zellen zu Gunsten der TH1 Zellen, welche in murinen Studien gezeigt wurde, wurde bei Patienten mit kritischer Ischämie eine signifikant hohe Aktivierung des TH2-Signalwegs durch die Expression von IL-10 nachgewiesen, möglicherweise als reflektorische Antwort auf die TH1-gesteuerte Inflammation (60). Genauso kontrovers in bisherigen Studien ist die Rolle von TH17 Zellen mit ihren Markern, die Zytokine IL-17 und IL-22. In Immun-, Endothel- und Stromazellen induziert IL-17 die Sekretion proinflammatorischer Chemokine. Studien an Mausmodellen für Atherosklerose haben jedoch gezeigt, dass IL-17 die Plaque-Stabilität fördern kann, indem es die Produktion von Typ I-Kollagen durch VSMCs erhöht. In menschlichen Studien über KHK wurde eine niedrige Konzentration an IL-17 mit höherem Risiko für Myokardinfarkt und Tod assoziiert, was den positiven modulatorischen Effekt der TH17-Antwort vermuten lässt (61). Aus der pAVK-Forschung liegen bisher keine Daten zur Bedeutung des TH17-Signalwegs vor. Genauso wenig ist über die Th22-IL-22 und Th9-IL9 Signalwege in kardiovaskulären Erkrankungen bekannt. Es gibt Hinweise dafür, dass sowohl Th22- als auch Th9-Lymphozyten an dem Prozess des akuten Koronarsyndroms und des Myokardinfarkts beteiligt sind, da die entsprechende Zytokinplasmaspiegel bei den betroffenen Patienten signifikant erhöht sind (62), aber es liegen keine weiteren Untersuchungen zu den zugrundeliegenden Mechanismen und den Zusammenhängen bei anderen ischämischen atherosklerotischen Ereignissen, bspw. akuter Extremitätenischämie vor. Insgesamt ist in der Atherosklerose-Forschung bisher die Identifizierung der spezifischen Antigene, die zu

Differenzierung in den verschiedenen T-Effektorzellen führen, nicht gelungen. Dass ein Priming stattgefunden hat und dass T-Lymphozyten „Atherosklerose-spezifisch“ proliferieren, haben T-Zellrezeptor-Sequenzierungsstudien, anhand des oligoklonalen Profil der T-Zell-Populationen gezeigt (63). Neben der gut erforschten Aktivierung durch Epitope von oxLDL (64), wurden, bis auf wenige weitere Peptide, wie *heat shock protein* (HSP), welches auf geschädigten Endothelzellen exprimiert wird (65), wenig bekannte spezifische Pathogene entdeckt, die T-Zellen in der Pathogenese der Atherosklerose erkennen. Dass es solche geben muss, zeigt jedoch zum einen die große Variation an T-Zellsubtypen, die in atherosklerotische Plaques gefunden wurden (66) und zum anderen die starke Komorbidität von Atherosklerose mit anderen systemischen inflammatorischen Erkrankungen wie Psoriasis und HIV (67, 68). Die Hypothese, dass bei Atherosklerose, ähnlich wie bei Autoimmunerkrankungen ein Ungleichgewicht zwischen regulatorischer und pathogener Immunität besteht, ist anhand von Studien der regulatorischen T-Zell-Population (Treg) gezeigt worden (69). Tregs, CD25+CD4+-Zellen, welche die Aktivierung und Expansion selbstreaktiver CD4+ T-Zellen kontrollieren und bei Gesunden den Zusammenbruch der natürlichen Selbsttoleranz und die Entwicklung von chronischen Autoimmunerkrankungen verhindern (70), scheinen in Atherosklerose-Modell vermindert und verändert zu sein (71). In Gegenwart von oxLDL verlieren Tregs ihre Suppressor-Funktion auf Effektor CD4+ Zellen (72), was das Fortschreiten der Plaque begünstigt. Ein Transfer von natürlich vorkommenden, nicht durch das atherosklerotische Milieu geprägten, expandierten Tregs in Mäusen führte zu einer signifikanten Verringerung der atherosklerotischen Läsionen (72). An humanen Studien wurde dieser Zusammenhang bisher anhand der verminderten, kleinsten, besonders potenten Population doppelt negativer regulatorischer V δ 1-T-Zellen im Blut von Patienten mit symptomatischer A. carotis interna (ACI) Stenose gezeigt, wobei die Verminderung der Zahl an V δ 1 T-Zellen mit dem Schweregrad der Symptome der Patienten korrelierte. Auch hier zeigte sich die Apoptose der regulatorischen Zellen oxLDL- abhängig (73). Die technisch schwierige Isolation, Expansion und Antigen-Spezifität in vitro verhindert bisher die Gewinnung an Erkenntnisse über die pathophysiologische Funktion von regulatorischen T-Zellen bei der pAVK.

1.2 Bedeutung von Monozyten bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose

Aus dem dargestellten Überblick der Akteure und Trigger der atherosklerotischen

Inflammation geht hervor, dass der Atherosklerose-Forschung noch viele unvollständig geklärte und unerforschte Mechanismen und Zielstrukturen bevorstehen.

Neben der Bedeutung von Blutmonozyten als Vorläuferzelltyp der Schaumzellen und anderen Plaque-Makrophagen (74), wird zunehmend auch die Rolle von zirkulierenden Monozyten als aktive Verstärker der Migration von T-Lymphozyten und Tregs via potenter Chemokinrezeptoren in die atherosklerotische Plaque diskutiert (75).

Eine weitere Rolle der Monozyten bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Inflammation bei der Arteriosklerose besteht in der Plaque Angiogenese: Monozyten werden einerseits als Antwort auf die hypoxische Umgebung in der Arterienwand über die Hochexpression von spezifischen Integrinrezeptoren (Makrophagen-Adhäsionsligand- Mac-1) rekrutiert, andererseits übernehmen aktivierte Monozyten Neorevaskularisation-Reparaturmechanismen und fördern, durch Stimulation der Migration glatter Muskelzellen und Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) – Rezeptoren die Bildung von Vasa vasorum und eine anschließend veränderte Endothelfunktion in Richtung der neuen Bedürfnissen des entstandenen Milieus (76). Über diesen Mechanismen wird der entscheidende Beitrag von Monozyten für die Destabilisierung der Plaque vermutet. Im Vergleich zu stabilen Plaques ist in vulnerablen und rupturierten Plaques die Anzahl der Vasa vasorum um das 2- bis 4-fache erhöht (77).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Personen mit erhöhten Monozytenzahlen im Blut ein höheres Risiko haben, Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu entwickeln, unabhängig von traditionellen Risikofaktoren. Erhöhte Monozytenzahlen können das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse vorhersagen, sowohl in der Allgemeinbevölkerung (78), als auch bei Personen mit vorbestehenden kardiovaskulären Erkrankungen (79).

Monozyten-Parameter, die viel einfacher als Makrophagenwerte im Blut bestimmt werden können, könnten zukünftig wertvolle prognostische Marker bei der Atherosklerose Forschung liefern. Die dafür geeigneten Monozytenwerte müssen jedoch noch definiert und validiert werden.

1.2.1 Monozytensubtypen – Definition und Eigenschaften

Monozyten machen ca. 10% der Leukozyten im menschlichen peripheren Blut aus; sie entwickeln sich im Knochenmark aus einem gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelltyp für Monozyten und neutrophile Granulozyten und werden ins periphere Blut freigesetzt, wo deren Halbwertszeit ca. 3 Tage beträgt. Blutmonozyten sind 10-20µm messende Zellen mit großem, nierenförmigem, teils gelapptem Zellkern. Als Teil des angeborenen Immunabwehr vermitteln sie direkte Endozytose von Pathogenen mittels lytischer und zytotoxischer Enzyme (Peroxidase, Esterase 1 u.a.) (80).

Ein besonders wichtiges Ausstattungsmerkmal von Monozyten sind deren Fc-Rezeptoren (FcR), die auf der Monozyten-Oberfläche gehäuft vorkommen und die Phagozytose und Elimination von IgG-Antikörper-opsonierten Antigenen ermöglichen (81). Am Beispiel des akuten Koronarsyndrom wurde gezeigt, dass der Fc-vermittelte Weg möglicherweise ein wichtiger Aufnahme-Mechanismus von Autoantikörper-gebundenen oxLDL durch Blutmonozyten und Plaque-assoziierte Makrophagen in der Atherosklerose darstellt (82).

Eine weitere von Monozyten präsentierte Brückenfunktion zwischen angeborene und adaptive Immunantwort ist deren Fähigkeit, als professionelle antigenpräsentierende Zellen MHC-II-abhängig mit Lymphozyten zu interagieren. In zahlreichen Tiermodelle für infektiöse, virale, bakterielle oder nicht-infektiöse Inflammation wurde gezeigt, dass Monozyten Antigene erwerben, in den Lymphknoten wandern und dort Antigen-spezifische CD4+T-Zellen stimulieren, wobei die Immunantwort vom TH1, TH2 oder TH17-Typ sein kann (83-85).

Monozyten werden seit mindestens 30 Jahren nicht mehr als eine homogene Zellgruppe definiert, sondern als eine Zellpopulation, die heterogene Eigenschaften hat. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung von Homöostase und tragen in gesundem Zustand zur Gewebereparatur bei. Monozyten weisen enorme Plastizität auf und differenzieren sich je nach Mikroumgebung in Makrophagen oder dendritischen Zellen. Durch krankheitsassoziierte Signale führt ihre Fehlregulation zu chronischen Entzündungen, Gewebeschäden, Fibrosierung, Progress von Krebserkrankungen (86).

Menschliche Monozyten werden anhand der Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 nach einem aktuell weltweiten Konsens in drei Subtypen unterteilt: den

„klassischen“ Typ: CD14⁺⁺CD16⁻, welcher durch hohe Expression an CD14 und fehlende Expression an CD16 charakterisiert wird und ca. 90% der Monozyten ausmacht, den „intermediären“ Subtyp: CD14⁺⁺CD16⁺, welcher starke Expression an CD14 und zusätzlich Expression an CD16 aufweist, sowie den „nicht-klassischen“: CD14⁺CD16⁺⁺ Subtyp, welcher ca. 5-10% der zirkulierende Monozyten ausmacht und durch hohe Expression an CD16 charakterisiert wird. Dieser Nomenklatur ging die Identifizierung von verschiedenen Monozyten-Subtypen im Mausmodell voraus, welche anhand der Expression des Antigen Ly6C und verschiedenen Chemokinrezeptoren zu Unterscheidung der zwei Subtypen Ly6C-low und Ly6C-high führte. Ly6C-high gelten als die „klassischen“ oder inflammatorischen Monozyten und exprimieren hohe Konzentrationen der Chemokinrezeptoren CX3CR1 und CCR2, durch welche sie zum Ort der Inflammation migrieren und in entzündlichen Makrophagen differenzieren. Deren Analog sind die menschlichen CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten. Ly6C-low-Monozyten hingegen werden als „patrouillierende“ Monozyten angesehen, exprimieren niedrige Level an Ly6C, aber hohe Level an CX3CR1, sind an Homöostase beteiligt und können in nicht-entzündliche Makrophagen oder dendritische Zellen differenzieren – Funktionen, die entsprechend den menschlichen CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten zugeschrieben werden. Die Monozyten-Untergruppe, die mittlere Ly6C-Spiegel exprimiert und von der angenommen wird, dass sie einen Übergangszustand zwischen Ly6C-high und Ly6C-low darstellt, hat als Äquivalent den menschlichen „intermediären“ Subtyp: CD14⁺⁺CD16⁺ (87-89).

Die Unterschiede in der Zirkulationshalbwertszeit zwischen den Monozyten-Untergruppen sind in Studien mit Verwendung von deuterierter Glukose als Tracer erforscht. Unter physiologischen Bedingungen entstehen aus den Vorläuferzellen zunächst klassische Monozyten. Sobald sie sich in der Zirkulation befinden, werden diese zum Ort der Entzündungsreaktion rekrutiert und nach ungefähr 24 Stunden sterben diese Zellen entweder ab, migrieren oder erwerben CD16, um zu intermediären Monozyten zu differenzieren, welche 3-4 Tage im Blut zirkulieren. Die intermediären Monozyten entwickeln eine reduzierte CD14-Expression, um zu nicht-klassischen Monozyten zu werden, welche ca. 7 Tage im Blut überdauern (90, 91). Monozyten-Subtypen stellen somit einerseits verschiedene Stadien des Lebenszyklus einer Zellpopulation dar, andererseits ist es bekannt, dass sie Subpopulationen mit signifikanten funktionellen Unterschieden repräsentieren.

Die funktionellen Besonderheiten der Monozyten-Untergruppen hängen stark mit deren Ausstattung an Chemokinrezeptoren und Zytokinproduktion zusammen, die für die

Migration in verschiedenen Geweben und Interaktion mit weiteren Effektor-Zellen wichtig sind. Klassische Monozyten exprimieren höhere CCR2-Spiegel, die an ihre Migration zu entzündlichen Geweben beteiligt sind, während nicht klassische Monozyten höhere CX3CR1-Spiegel exprimieren, was für die Patrouillenfunktion und Migration zu nicht-entzündetem Gewebe wichtig ist (92). Klassische Monozyten zeigen sich stark erhöht im Blut von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Asthma (88, 89). Verminderte Zahlen nicht-klassischer Monozyten, in Kombination mit unterregulierter Expression von MHC-II Molekülen wurde mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Sepsis in Verbindung gebracht und als prognostischen Marker dafür vorgeschlagen (91). Intermediäre Monozyten dominieren in Autoimmunprozesse wie bei rheumatoider Arthritis (90).

Die funktionelle Heterogenität von Monozyten lässt vermuten, dass weitere spezifische Marker für die Unterscheidung der Subtypen bestehen, deren Identifikation ist jedoch bisher nicht gelungen. Die aktuell bestehende Einteilung der drei Subtypen, an welche Jahrzehnte gearbeitet wurde, wurde im Jahr 2019 im Rahmen eines weltweiten Konsenses des menschlichen myeloischen Zellkompartiments im peripheren Blut offiziell bestätigt und weltweit anerkannt (93).

1.2.2 Monozytensubtypen in kardiovaskulären Erkrankungen

In Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen ist die bisher beschriebene funktionelle Bedeutung einzelnen Monozyten-Untergruppen widersprüchlich. Verschiedene klinische Studien bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit oder Myokardinfarkt haben Untergruppen von Monozyten untersucht und zeigten eine Korrelation zwischen deren erhöhten Anzahl und kardiovaskulären Ereignissen. In einer Fallgruppe aus 700 Probanden wies die Subpopulation, bei der kardiovaskuläre Ereignisse auftraten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Prozentsätze sowie absolute Zahlen klassischer CD14++CD16– Monozyten auf, so dass die Studie klassische Monozyten als Prädiktor für das kardiovaskuläre Risiko, unabhängig von anderen Risikofaktoren in einer zufällig ausgewählten Population identifizieren konnte (94).

Ähnlich zeigte die PHAMOS-Studie mit 994 kardiologisch erkrankten Patienten die Korrelation zwischen höherer Anzahl klassischer Monozyten und dem höheren Risiko für das Auftreten von kardiovaskulärem Tod (95). Diese Beobachtung konnte jedoch bei Patienten mit hochgradiger Stenose der A. carotis interna nicht bestätigt werden: weder die Assoziation zur Vulnerabilität der Karotis-Plaque, noch zum Auftreten von

sekundären kardiovaskulären Ereignissen im 3-jahres Follow-up konnte zum klassischen Monozytensubtyp verlinkt werden (96).

In einer großen prospektiven Studie mit 951 Patienten zeigten sich intermediäre Monozyten als unabhängiger prädikativer Marker für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen, unabhängig von Begleiterkrankung und Raucherstatus der Patienten (97). In Bezug auf In-Stent-Stenose nach koronarer Stent-Implantation zeigte sich die Anzahl der intermediären Monozyten bei Patienten mit Restenose signifikant höher als bei Patienten ohne Restenose und es konnte eine signifikante Korrelation zwischen intermediärer Monozytenzahlen und dem angiographischen Lumenverlust nachgewiesen werden. Dabei unterschieden sich die Zahlen klassischer Monozyten zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant (98). Intermediäre Monozyten wurden ebenso positiv mit der erhöhten Intima-Media-Dicke (IMD) in der Arteria Karotis korreliert – ein Surrogatparameter für die Evaluierung der Früharteriosklerose und Marker für erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (99). Darüber hinaus zeigte der intermediäre Monozytensubtyp eine starke Korrelation mit kalzifizierten Koronarstenosen und somit mit schwerer koronarer Herzkrankheit bei einer Kohorte von 588 asymptomatischen Patienten, was den prädikativen Wert dieser Monozytensubpopulation erneut betont (100).

Gleichzeitig liegen Untersuchungen vor, die eine pathologische Funktion des nicht-klassischen Subtyps vermuten: die endotheliale Dysfunktion, gemessen an der Bioverfügbarkeit für Stickstoffmonoxid (NO) in der A. mammaria bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit korreliert positiv mit erhöhten Zahlen an nicht-klassischen und niedrigen Zahlen an klassischen Monozyten (101).

In Bezug auf die Ausprägung der Atherosklerose an den Beinarterien existieren deutlich weniger Daten. Die Studie von Wildgruber et al. untersuchte die Verteilung der Monozytensubtypen bei pAVK-Patienten und die Assoziationen mit verschiedenen Stadien der pAVK nach der Rutherford-Klassifikation. Die klassischen Monozyten zeigten dabei keine relevanten Veränderungen zwischen den verschiedenen Stadien der pAVK. Der Anteil nicht-klassischer Monozyten zeigte eine Abnahme bei Patienten mit fortgeschrittener pAVK und blieb besonders niedrig bei Patienten mit Rutherford-Stadium V und VI. Die intermediären Monozyten nahmen mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien stark zu, besonders mit Erkrankung im Stadium IV (ischämischer Ruheschmerz) im Vergleich zu Patienten mit Rutherford-Stadium III (102).

Aus tierexperimentellen Studien entsteht die Erkenntnis, dass alle drei Monozyten-Subtypen an dem Atherosklerose-Prozess beteiligt sind. Die Blockade aller drei

Chemokinrezeptoren CCR5, CCR2 und CX3CR1 führt zur Reduktion atherosklerotischer Plaques (103).

Während bei vielen Erkrankungen unklar ist, zu welchem Anteil das Gewebemakrophagenkompartiment von Monozyten- Blutpool aufgefüllt wird, und ob in einem chronischen Zustand Monozyten wesentlich zur Entstehung krankheitsassoziierten Makrophagen beitragen (104), ist es in der Atherosklerose-Forschung gelungen, durch Intravitalmikroskopie zu zeigen, dass Monozyten sowohl im chronischen Zustand, als auch nach akuter Schädigung des Endothels aktive pro- und antiinflammatorische Aktivität aufweisen: nach der Entstehung eines akuten Reizes neigen klassische Monozyten im Gefäßlumen zu bleiben, extravasieren und wandern zum Entzündungsreiz, während nicht-klassische Monozyten an die Endothel-Oberfläche „wandern“ und an der Reinigung des Endothels nach einer Schädigung beteiligt sind (105, 106) (Abb. 1).

Dabei ist die Vorstellung der Rolle intermediärer Monozyten schematisch und basierend auf Erkenntnissen über ihre antigenpräsentierende Funktion in verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Die stark an Interesse gewinnende, definitive Separation dieser Subpopulation in vivo, ist immer noch ein Objekt der Forschung.

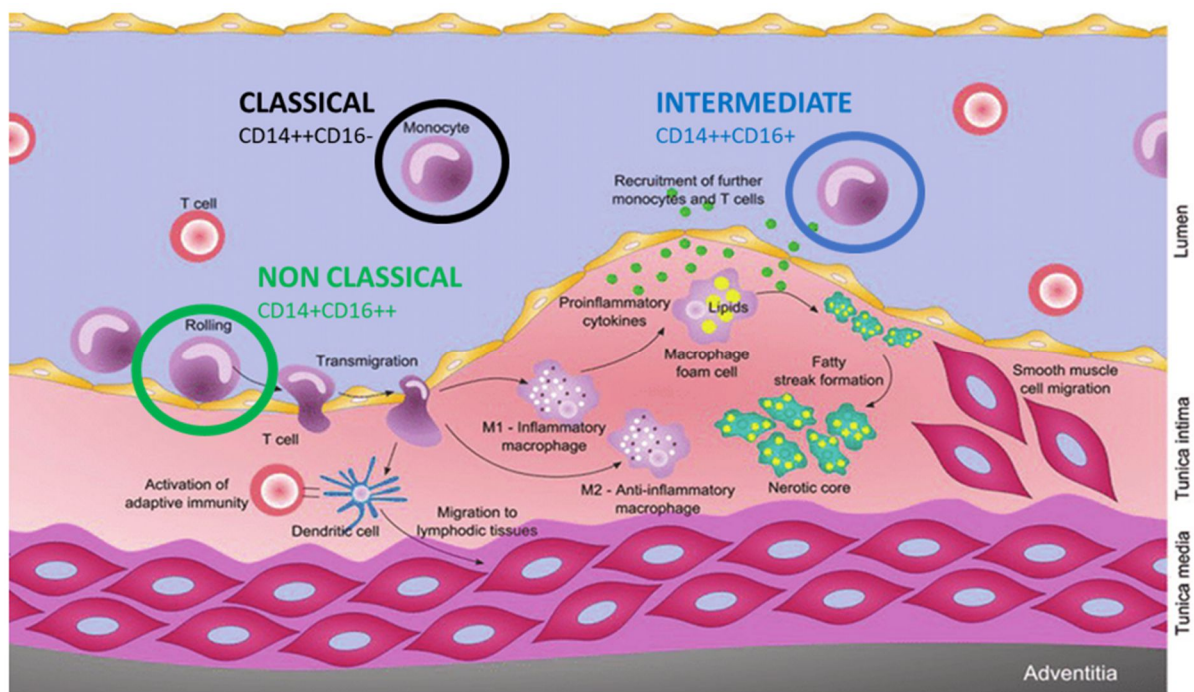


Abbildung 1. Rolle der Monozytensubtypen bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose

modifiziert und genehmigt nach Heine et al. 2012 (106)

1.2.3 Biomarker für die Aktivierung von Monozyten

Monozyten können durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden, darunter mikrobielle Produkte, Zytokine und andere Entzündungsmediatoren. Die Aktivierung der Monozyten ist mit Veränderungen in der Expression bestimmter Zelloberflächenmarker und der Sekretion spezifischer Zytokine und Chemokine verbunden. Zu den Biomarkern, die üblicherweise zur Messung der Aktivierung von Monozyten verwendet werden, gehören:

CD14 als Zelloberflächenrezeptor und gleichzeitiger PRR ist entscheidend für die Phagozytose von viralen, bakteriellen und weiteren Pathogenen. Es fungiert als Co-Rezeptor für den Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4) und bindet an Lipopolysaccharide (LPS), die sich auf der äußeren Membran gramnegativer Bakterien befinden. Der CD14-TLR4-Komplex initiiert eine Signalkaskade, die die Produktion von Zytokinen und Chemokinen auslöst, die helfen, andere Immunzellen an den Infektionsort zu rekrutieren und zu aktivieren. Daher spielt CD14 eine wichtige, von Monozyten-vermittelten Rolle bei der angeborenen Immunantwort (107).

CD16, auch bekannt als FcγRIIIa, ist ein Rezeptor mit niedriger Affinität für den Fc-Teil von IgG-Antikörpern und spielt eine entscheidende Rolle bei der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität, in dem es an der Beseitigung von opsonierten Pathogenen und Immunkomplexen beteiligt ist. Die Bindung von CD16 an Monozyten durch IgG-Antikörper löst verschiedene nachgeschaltete Signalereignisse aus, die zur Aktivierung der Monozyten führen und ihre Fähigkeit das opsonierte Ziel zu phagozytieren ermöglicht. Diese Funktion des CD16 Rezeptors ist eine mögliche Erklärung, dass CD16-exprimierende Monozyten mit der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wurden (108).

CD163 ist ein erstmalig im Jahr 1991 entdeckte spezifische Epitop auf Monozyten und Makrophagen, welches auf keinem anderen Zelltyp vorkommt. Dieses Molekül stellt ein Scavenger-Rezeptor dar, der freigesetztes Hämoglobin „fängt“, in dem er mit seinem extrazellulären Teil Hämoglobin-Haptoglobin Komplexe bindet und deren Endozytose vermittelt. Nach proteolytischer Spaltung kann CD163 von der Zellmembran abgegeben werden, wodurch das lösliche CD163-Molekül (sCD163) entsteht. Diese lösliche Form von CD163 kann im Blut bestimmt werden und als Biomarker für die Aktivierung von Monozyten verwendet werden (109, 110).

Die Studienlage zeigt, dass sowohl an der Zelloberfläche gebundenes, als auch lösliches CD163 eine Rolle bei der Regulation entzündlicher Prozesse spielen könnte.

Das Expressionsniveau von CD163 ist beispielsweise erhöht auf Makrophagen, während akuten Entzündungsreaktionen, aber auch während Wundheilungsphasen. Andererseits führt die CD163-vermittelte intrazelluläre Signalübertragung nach Hämoglobin-Bindung zur Sekretion von entzündungshemmenden Zytokinen und das lösliche CD163 kann direkt die T-Zell-Proliferation hemmen (111).

Die CD163-Expression auf Makrophagen wurde in Karotis-Plaques von Patienten mit und ohne zerebrovaskulären Symptome verglichen und es zeigte sich dabei, dass CD163 in Läsionen symptomatischer Patienten signifikant höher als bei asymptomatischen Patienten reguliert ist, und dass die CD163-exprimierenden Makrophagen vor allem in Bereichen mit Plaque-Einblutungen auftreten, welche zur Plaque-Progression und -Destabilisierung beitragen (112).

Andere Autoren identifizieren die Expression von CD163 auf Monozyten als antiinflammatorische Eigenschaft (113), so dass die Bedeutung der CD163-Expression weiterhin kontrovers bleibt.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Monozyten gelten als wichtige Akteure und Trigger der atherosklerotischen Inflammation. Humane Monozyten werden in klassischen, intermediären und nicht-klassischen Subtyp unterteilt. Für die verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen (KHK, Karotisstenose, pAVK) zeigen die bisherigen Studien erhebliche Widersprüche bezüglich der Untergruppenverteilung der Monozyten im Blut. Eine mögliche Erklärung dieser Inkongruenz der Ergebnisse könnte in der unterschiedlichen Methodik der Zellisolation und Verarbeitung durch die verschiedenen Studiengruppen begründet sein. Die wenigen, bisher vorliegenden Ergebnisse über die Monozytenverteilung bei pAVK wurden mithilfe von kryokonservierter Blutroben gewonnen.

➤ Primäre Ziele dieser Forschungsarbeit sind:

1. Die Verteilung der Monozyten-Subtypen bei pAVK-Patienten in den verschiedenen Stadien (nach der Fontaine-Klassifikation) zu untersuchen.
Hypothese: Die Verteilung der Monozyten-Untergruppen bei Patienten mit pAVK unterscheidet sich zwischen den pAVK- Stadien.
2. Die Verteilung der Monozyten-Subtypen bei pAVK-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen zu untersuchen.
Hypothese: Die Verteilung der Monozyten-Untergruppen bei Patienten mit pAVK unterscheidet sich von der Verteilung bei gesunden Personen.
3. Zu untersuchen, ob die Intensität des gemessenen CD14- und CD16-Signals von kryokonservierten Monozyten, sich von frisch angefärbten Zellen derselben Probanden unterscheidet.
Hypothese: Die Isolationsmethode und Verarbeitung der Proben hat einen Einfluss auf die Bestimmung der Monozyten-Subpopulationen.

➤ Als sekundäre Ziele gelten:

- 1) Die Expression von dem Scavenger Rezeptor CD163 zu untersuchen, um dessen mögliche Bedeutung als Biomarker für die Entwicklung des inflammatorischen Prozesses bei pAVK zu identifizieren.
Hypothese: Die Expression von CD163 unterscheidet sich zwischen den Monozyten- Subpopulationen und zwischen pAVK-Patienten und gesunden Probanden.
- 2) Durchführung eines Methodenvergleich zwischen der Isolation von Monozyten aus PBMC und aus Vollblut in verschiedenen Antikoagulantien.
Hypothese: Die Zellisolationsmethode- und das verwendete Medium haben

einen Einfluss auf die Bestimmung von Monozytenparametern
(Monozytenzahlen und Expression von Oberflächenmarkern)

- 3) Die Korrelation zwischen Monozytenzahlen und Subtypen-Anteil und patientenspezifische Risikofaktoren wie Nikotinkonsum (packyears), Lipidwerte und HbA1c zu ermitteln.

Hypothese: Es besteht ein Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und der Monozyten-Zahl und -Verteilung.

3 Material und Methoden

3.1 Studienpopulation, Ein- und Ausschlusskriterien

Die Studie erfolgte im Rahmen des Projekt Nr.: 20-205, welches das Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München am 02.07.2020 erhalten hat.

In der Studie wurden nach mündlicher und schriftlicher Einwilligung die Blutproben von Patienten mit pAVK Stadium IIb-IV (mind. 20 Patienten/Gruppe) und einer Kontrollgruppe (10 Probanden) ohne pAVK gesammelt.

Die Patienten mit pAVK Stadium IIb-IV wurden am Tag der stationären Aufnahme oder der ambulanten Vorstellung, vor einer operativen/interventionellen Behandlung eingeschlossen. Im Rahmen der routinemäßigen Blutabnahme erfolgte die Abnahme von zwei Natrium-Heparin-Röhrchen à 8,5ml.

Die Kontrollgruppe besteht aus gesunden Probanden im Alter von 50-60 Jahren ohne Hinweis auf atherosklerotische Erkrankung in der Anamnese. Eine apparative Untersuchung zum Ausschluss von pAVK wurde bei den Probanden nicht durchgeführt.

Ausschlusskriterien für Patienten und Probanden waren:

- Tumordiagnose
- Patienten mit Sepsis-Kriterien oder begleitender Infektion wie z.B. Harnwegsinfektion, Pneumonie, Phlegmone, offene Wunde mit Phlegmone; Erkältung/grippaler Infekt
- chronisch-entzündliche Erkrankungen
- Immunsuppression bzw. Einnahme immunsupprimierender Medikamente
- Z.n. Impfung in den letzten drei Monaten

In der Studie wurden nur geschäftsfähige Patienten und Probanden eingeschlossen, die schriftlich und mündlich über die Studie aufgeklärt wurden und der Teilnahme zugestimmt haben. Die Datenerhebung erfolgte pseudonymisiert und umfasste demographische, klinische und laborchemische, sowie weitere therapieassoziierte Parameter, die in dem CRF-Bogen erfasst sind.

3.2 Materialien

3.2.1 Geräte

Zentrifuge 5810R	Eppendorf SE, DE
Pipet Controller Pump	Corning Falcon, USA
Sicherheitswerkbank eco safe Comfort Plus	Envair Deutschland GmbH
NucleoCounter® NC-202™	Chemometec, Dänemark
Durchflusszytometer CytoFlex	Beckmann Coulter, DE
Inkubator	Binder, DE

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Heparin-Natrium Monovetten 9ml	Greiner Bio-One GmbH, DE
Serologische Pipetten 10ml, 25ml	Greiner Bio-One GmbH, DE
Falcon Tubes 15, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, DE
SepMate 50ml Tubes	Stemcell Technologies, DE
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5ml	Sarstedt AG, DE
Via2-Cassette	Chemometec, Dänemark
Aspirationspipette 2ml	Greiner Bio-One GmbH, DE
Pipettenspitzen Optifit Tips 10, 200, 1000 µl	Integra Biosciences, DE
CryoPure Gefäße	Sarstedt AG, DE
X5 Cryogenic Rack, 81-well	Fisher Scientific, DE
X10 Fisherbrand Cardboard CryoBox	Fisher Scientific, DE

3.2.3 Medien und Reagenzien

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline DPBS	Gibco Thermo Fisher Scientific, DE
Ficoll Paque PLUS	Cytiva Europe GmbH, DE
EDTA	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, DE
Bovine Serum Albumin BSA	Sigma-Aldrich, DE
FACS Buffer = PBS+0,5%BSA	
MACS Buffer = EDTA-FACS-Puffer 2x gefiltert (D-PBS 500ml, EDTA 2 ml, BSA 2,5 g)	
FBS, Qualified (hitzeinaktiviert)	Gibco Thermo Fisher Scientific, DE
DMSO	Thermo Fisher Scientific, DE
R10	Thermo Fisher Scientific, DE
Lyse-Buffer	BD Pharma, USA

3.2.4 Antikörper

anti-human CD14	Beckmann Coulter, DE
FITC anti-human CD16 Clone 3G8	Bio Legend, Netherlands
BV421 anti-human CD163	Bio Legend, Netherlands



**Abbildung 2.
Arbeitsplatz:
Sicherheitswerkbank**

**Universitäres Zentrum für Gesundheitswissenschaften am Klinikum
Augsburg – UNIKA-T** **Quelle: Eigene Darstellung**

3.3 Methoden

Die Monozyten wurden aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) isoliert. Die PBMC wurden entweder direkt nach der Isolation oder nach mindestens 28 Tagen Kryokonservierung mit Anti-CD14 und Anti-CD16 Antikörpern markiert. Der Anteil an klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten wurde anschließend am Durchflusszytometer bestimmt. Die PBMC-Isolation erfolgte unverzüglich (1-3Std.) nach Blutabnahme. Die Methoden wurden mehrfach bis zur vollständigen Reproduzierbarkeit optimiert und validiert.

3.3.1 Isolation mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

1. Das peripher venöse Blut von Patienten und gesunden Probanden aus zwei Heparin-Na Monovetten wird in 50ml Falcon Tube überführt und das Blutvolumen notiert
2. Das Vollblut wird 1:1 mit PBS verdünnt
3. 15ml Ficoll-Paque PLUS werden in einem SepMate 50 pipettiert
4. Das PBS-verdünnte Blut wird langsam auf das Ficoll beschichtet
5. Das Ficoll-beschichtete Blut wird bei 1200 RCF (=g) 20 min, ohne Bremse und mit einer Beschleunigung von 3 U / min bei Raumtemperatur zentrifugiert
6. Die Interphase (mononukleäre Zellen beinhaltende Schicht) wird aufgenommen und in ein neues 50 ml Falcon überführt (Abb.3)
7. Ein Teil vom Überstand (=Plasma) wird in 2 x 1,8 ml CryoPure Gefäße aufgenommen, und bei -70 °C gelagert
8. Nach Aufnahme der PBMCs in 30ml PBS+2%FBS werden diese bei 350g 8 min, mit Bremse und voller Beschleunigung bei Raumtemperatur zentrifugiert
9. Der Zentrifugationsschritt wird nach Verwerfen des Überstands und Aufnahme des Pellets in 15ml MACS-Puffer mit gleicher Einstellung einmal wiederholt
10. Nach Verwerfen des Überstand werden die Zellen in 1ml EDTA-FACS-Puffer in ein 50 ml Falcon überführt

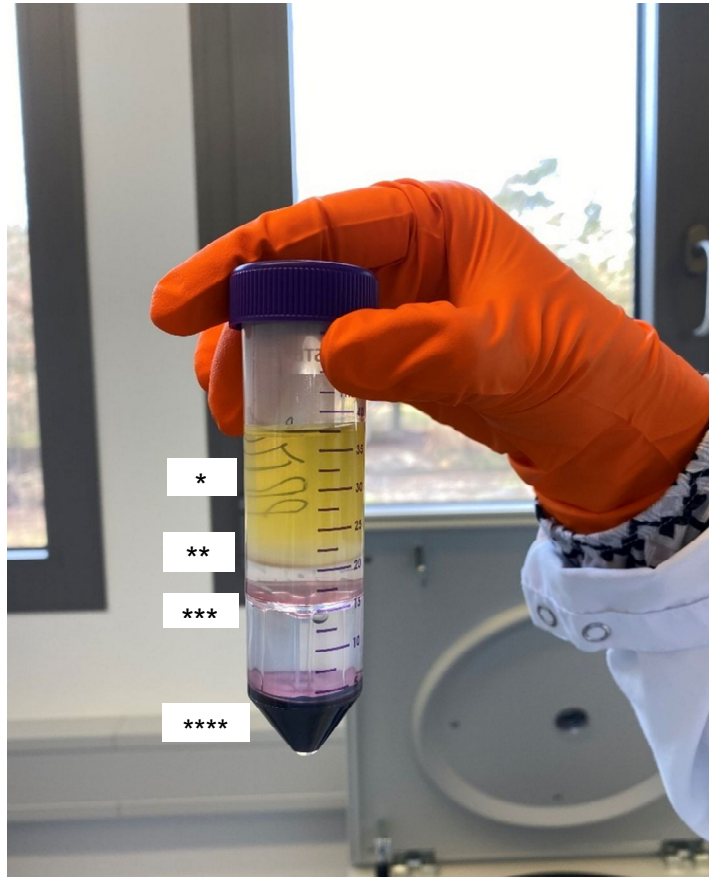


Abbildung 3. Zellseparation nach Dichtegradientenzentrifugation

An der Oberfläche verbleibt das Plasma-Phosphatpuffer-Gemisch (*);
in der dichten, milchigen Interphase befinden sich die mononukleäre Zellen (PBMC) (**),
separiert durch die Ficoll-Paque (***) von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen (****)

Quelle: Eigene Darstellung

3.3.2 Bestimmung von Zellzahl- und Vitalität

Die Zellzahl und Vitalität wurden mit dem hochpräzisen, individuell kalibrierten, automatischen Zellzähler *NucleoCounter® NC-202™* bestimmt.

1. Nachdem das Zellpellet in 1ml EDTA-FACS-Puffer resuspendiert und homogenisiert wird, werden 10µl entnommen und in 990 µl MACS-Puffer in einem 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt und homogenisiert

2. Aus der Zellsuspension wird mit der Spitze der Via2-Cassette™ ein Aliquot entnommen, indem man auf dem Kassettenknopf drückt
3. Im Inneren der Via2-Cassette™ werden die Zellen mit zwei Farbstoffen gefärbt: Acridinorange (AO) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI).
DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an die DNA bindet und somit nach Eindringen durch die Zellmembran alle kernhaltigen Zellen in einer Suspension markiert (114). Für die Färbung der Kerne bei intakten (lebenden) Zellen eignet sich DAPI jedoch nicht.
Acridinorange als Vitalfarbstoff (115) gelangt in den Zellkern auch bei lebenden Zellen.
Somit werden mit der Kassette die Gesamt- bzw. die nicht lebensfähigen Zellpopulationen kennzeichnet:
AO+ DAPI- Zellen sind lebendig. (grüner Kanal)
AO+ DAPI+ Zellen sind tot. (gelber und roter Kanal)
4. Die geladene Via2-Cassette™ wird in den NucleoCounter® NC-202™ eingesetzt, „PBMC“-Protokoll und der Verdünnungsfaktor (1:100) werden gewählt und die Analyse mit drücken auf „RUN“ gestartet
Nach ca. 30 Sekunden werden die Zellkonzentration und Vitalität der Probe angezeigt. Die verfügbaren Ergebnisse sind: Zellen/ml, Lebende Zellen/ml, Tote Zellen/ml, Vitalität in %, Aggregate in %; Durchmesser der Zellen (µm), Debris Index und Status
➤ $\text{Zellzahl} = \text{Zellkonzentration [1/ml]} \times \text{Volumen [ml]}$

3.3.3 Anfärbung mit Antikörpern

Nach Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden für die Antikörperfärbung 500 000 Zellen in 100 µl EDTA-FACS-Puffer resuspendiert

1. Um unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden, erfolgt zunächst eine FcR-Blockade für 10 Min bei 4°C
2. Anfärbung der PBMC mit Antikörpern bei 4°C für 15 Minuten

FcR	CD14 PC7	CD16 FITC	CD163 BV421	CD 204 PE	206
2ul	2ul	4ul	2,5ul	2,5ul	2ul

3. Die Zellen werden im 2ml EDTA-FACS-Puffer aufgenommen und mit 1500rpm 5 min, mit Bremse und voller Beschleunigung bei 4°C zentrifugiert (Schritt wird zweimal durchgeführt)
4. Überstand wird abgekippt und das Pellet in 150 µl EDTA-FACS-Puffer resuspendiert
5. Die Probe wird sofort am Durchflusszytometer gemessen oder bei 4°C im Dunklen bis zur Messung gelagert

3.3.4 Kryokonservierung

1. Die verbliebene Zellsuspension wird bei 350 rcf für 8 min, mit Bremse und voller Beschleunigung bei Raumtemperatur zentrifugiert.
2. Verwerfen des Überstands
3. ~10 Mio Zellen werden in je 500µl FBS (heat inactivated) resuspendiert und in ein CryoPure Gefäß überführt
4. Zugabe von 500µl ml FBS + 15% DMSO (langsam und tropfenweise) pro Gefäß. Die Freezing Solution wird vorher aus 8,5ml FBS+1,5ml DMSO (85% FBS +15% DMSO) hergestellt
5. CryoPure Gefäße invertieren
6. CryoPure Gefäße bei – 80 °C im Kryoinkubator einlagern

3.3.5 Auftauen von eingefrorenen PBMC

1. Aufwärmen des R10 Mediums (RPMI+10% FBS) in Wasserbad bei 37°C
2. Eingefrorenen PBMC werden langsam, mit schwenkenden Bewegungen im Wasserbad aufgetaut
3. Die Zellen werden auf 30ml vorgewärmtes Zellmedium beschichtet
4. Zentrifugation mit 350g 8 min mit Bremse bei Raumtemperatur
5. Überstand mit Aspirationspipette abnehmen und in 1ml EDTA-FACS-Puffer aufnehmen
6. Zellzahl und Vitalität, anschließend Antikörper-Färbung nach dem o.g. Protokoll

3.3.6 Isolation von Monozyten aus PBMC und Vollblut in verschiedenen Medien

Wir führten einen Methodenvergleich des etablierten PBMC-Protokolls in verschiedenen Medien, sowie im Vergleich zur direkten Vollblutisolation aus dem Blut von demselben Probanden durch.

1. PBMC-Isolation aus Heparin-Natrium, aus 2,7ml EDTA (verdünnt mit 2,7ml PBS) und aus 5ml Citrat (verdünnt mit 5ml PBS) nach dem o.g. PBMC-Isolationsprotokoll
2. Jeweils 100µl Vollblut aus den drei verschiedenen Medien wird in je eine FACS-Tube überführt
3. 900µl eines zweifach konzentriertes Lyse-Puffer (die Originallösung mit zehnfacher Konzentration wird 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt) werden zum Blut dazugegeben
4. Inkubation der Proben für 20min bei Raumtemperatur
5. Zentrifugation mit 200g 5 min mit Bremse und voller Beschleunigung bei Raumtemperatur
6. Da das Pellet nicht weniger gut sichtbar ist, als bei der SepMate-Isolation, wird der Überstand vorsichtig abpipettiert
7. Pellet aus Vollblutisolation wird in 100µl aufgenommen, Zellzahl- und Vitalität Bestimmung mit dem *NucleoCounter® NC-202™*, Fortfahren mit der Färbung nach Protokoll

3.3.7 FACS- Analyse

Die Monozyten wurden anhand ihrer gut bekannten morphologischen Eigenschaften unter den PBMCs mittels durchflusszytometrische Analyse (FACS) identifiziert. Dazu wird die Zellsuspension durch die motorbetriebene Kolben-Pumpe des Durchflusszytometer zunächst in einem Flüssigkeitsstrom (sheath fluid) eingespritzt, was dazu führt, dass die Zellen entlang eines Konzentrationsgefälle einzeln durch den Messbereich geführt werden. Während die Zellen einzeln den Messpunkt passieren, werden sie gerichtetem, monochromatischen Laserlicht ausgesetzt und an dem entsprechenden Detektor werden verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften gemessen.

Das Ausmaß der Streuung des Lichtes im Vorwärts-Streulicht-Kanal (FSC) korreliert mit der Zellgröße. Die gemessene Streuung des Lichtes im Seitwärts-Streulicht-Kanals wird durch Zelloberfläche und Kern erzeugt und korreliert mit der Komplexität des Zellaufbaus, mit der Zell-Granularität. Aus der FSC/SSC Verhältnis ergibt sich die erste semiquantitative Zellanalyse (116) (Abb.4).

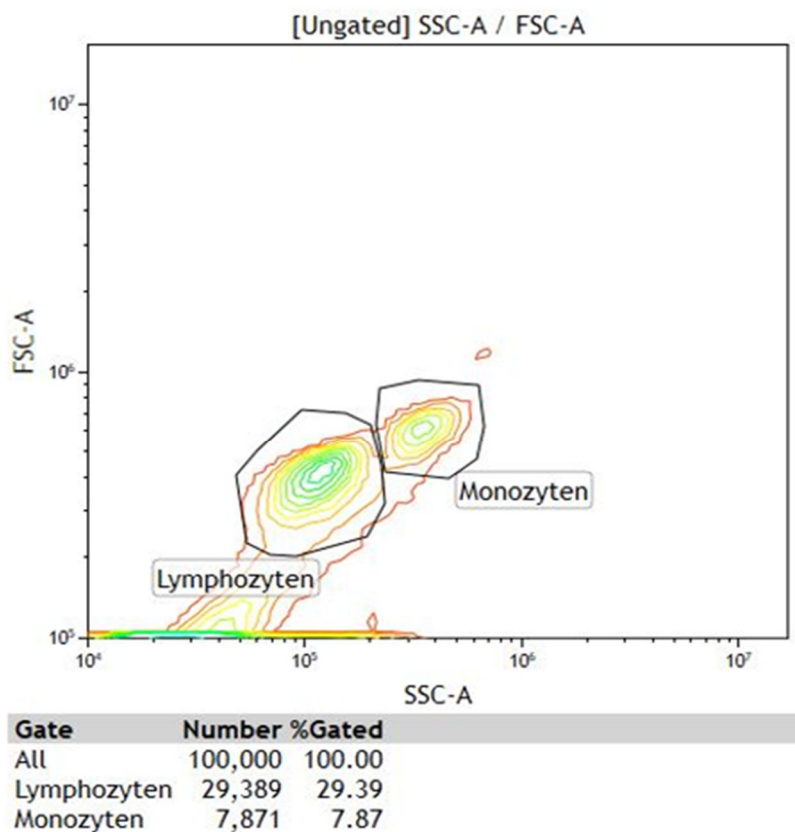


Abbildung 4. Identifizierung von Monozyten in FSC/SSC

FSC= forward scatter SSC= side scatter

Das Vorwärts- versus Seitenstreu-Gating (FSC vs. SSC) wurde verwendet, um die PBMC anhand ihrer Größe und Granularität zu identifizieren.

Diese Gating-Strategie wurde zum Unterscheiden vom Lymphozyten (6 -15 µm) und Monozyten (20-25 µm), sowie zum Ausschließen von Debris verwendet. Diese weisen eine geringere Vorwärtsstreuung auf und befinden sich in der unteren linken Ecke.

Die oben beschriebene hydrodynamische Fokussierung wird durch das Druckdifferenz-System des Durchflusszytometer erzeugt. Dieses hat zwei Komponente: den Sheath-Druck (Mantel-Strom-Durchflussrate) und den Proben-Druck. Während der Sheath-Druck stets konstant bleibt, ist der Proben-Druck vom Anwender regulierbar: low, medium oder high. Dadurch wird die Größe des Sample-Cores (Messbereich der Probe) definiert. Ein hoher Durchsatz an Volumen ermöglicht die Analyse von vielen Zellen, aber die hohe Durchflussrate sorgt gleichzeitig für höhere Streuung. Ein möglichst dünner Sample Core ist wichtig für die Konsistenz der Messungen. (117) Um ausreichende Zellmenge für statistische Signifikanzen zu analysieren und möglichst wenig Variabilität bei den Messungen zu erzeugen, analysierten wir 100 000 Events mit medium Geschwindigkeit.

Im nächsten Schritt erfolgt üblicherweise die Eliminierung von zusammenklebenden Zellen, sogenannten Dubletten. Dies ist notwendig, denn wenn ein Dublett, welches eine fluoreszenzpositive und -negative Zelle enthält, den Laser passiert, wird das Signal als positiv gewertet und führt zu falschen Ergebnissen. Die Dubletten- Eliminierung wurde durch Gating von FSC-Höhe gegen die FSC-Fläche durchgeführt (Abb.5).

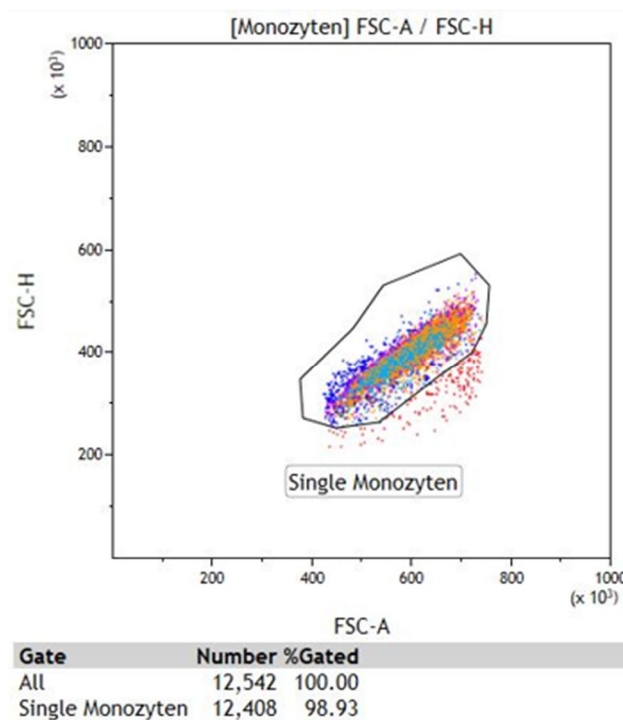


Abbildung 5. Eliminierung von Dubletten

Dubletten (rot) können von einzelnen Zellen unterschieden werden, indem FSC-height gegen die FCS-area aufgetragen wird. Dubletten haben eine vergrößerte Fläche, während sie ähnlich hoch sind wie einzelne Zellen.

Als Nächstes wurde eine eigene Gating-Strategie, welche sich an die offizielle Definition der Monozyten-Subtypen orientiert, an der Kaluza-Software manuell etabliert (Abb.6).

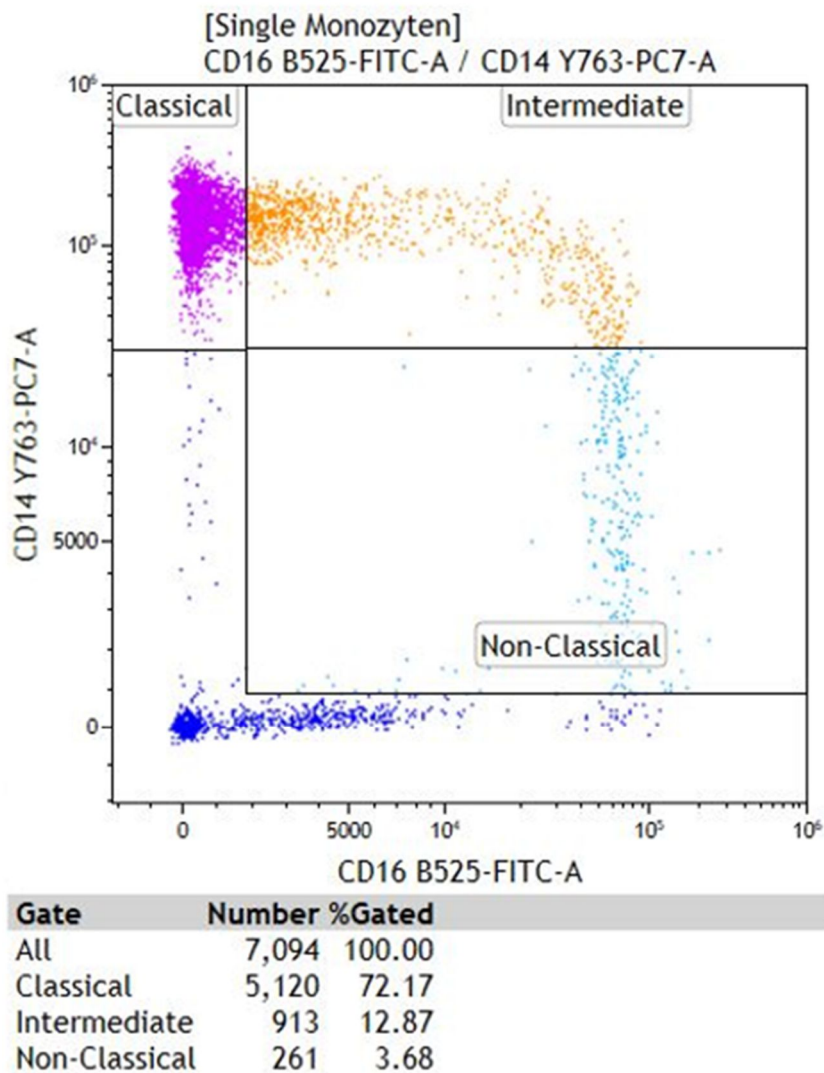


Abbildung 6. Durchflusszytometrische Dot plot Analyse

Drei Monozyten-Untergruppen wurden identifiziert: CD14++CD16– (oberer linker Quadrant), CD14++CD16+ (oberer rechter Quadrant) und CD14+CD16++ (unterer rechter Quadrant). Unterer linker Quadrant stellt die Doppelnegativen Zellen dar.

Nach Bestimmung der Zellen basierend auf SSC und FSC, Eliminierung von Dubletten und Gating der Monozyten- Subtypen, wurde die Intensität der einzelnen Monozyten-Oberflächenmarker auf die Monozyten-Subtypen visualisiert.

Die Intensitätsverschiebung zwischen negativer Kontrolle und einer positiven Probe dient zur Ermittlung der Unterschiede (Abb.7).

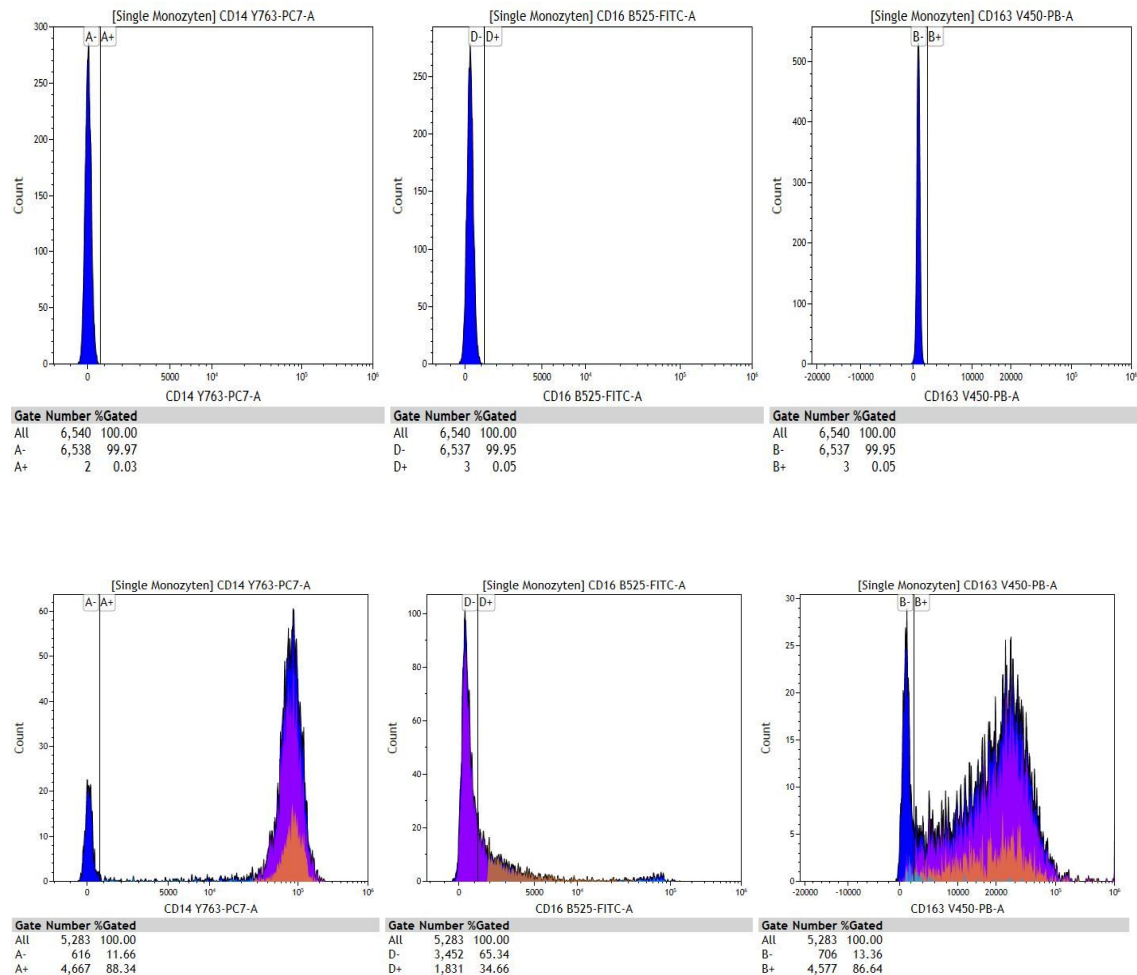


Abbildung 7. Fluoreszenzintensitätsmessungen für ein negatives und positives Ergebnis

Die Histogramme zeigen die Intensitätsmessung des CD14 und CD16 Signals. Das links gezeigte negative Ergebnis weist keine Färbung und viele Ereignisse bei niedriger Fluoreszenzintensität auf. Rechts ist ein positives Ergebnis dargestellt, dieses weist eine große Anzahl von Ereignissen bei hoher Fluoreszenzintensität auf. Die erste Reihe zeigte die ungefärbte (unstained) Kontrolle, die zweite Reihe zeigt mit Antikörpern markierte Probe (full staining).

Um genaue Analyse und Interpretation der Durchflusszytometriedaten zu gewährleisten, verwendeten wir Fluoreszenz-Minus-One (FMO) Kontrollen. FMO-Kontrollen helfen dabei, echte positive Signale vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden und den Grad des Fluoreszenz-Spillovers zwischen verschiedenen Fluorochromen zu beurteilen. Eine FMO-Kontrolle umfasst alle in einem Experiment verwendeten Fluorochromen mit Ausnahme eines der interessierenden Fluorochromen (Abb.8 und Abb.9).

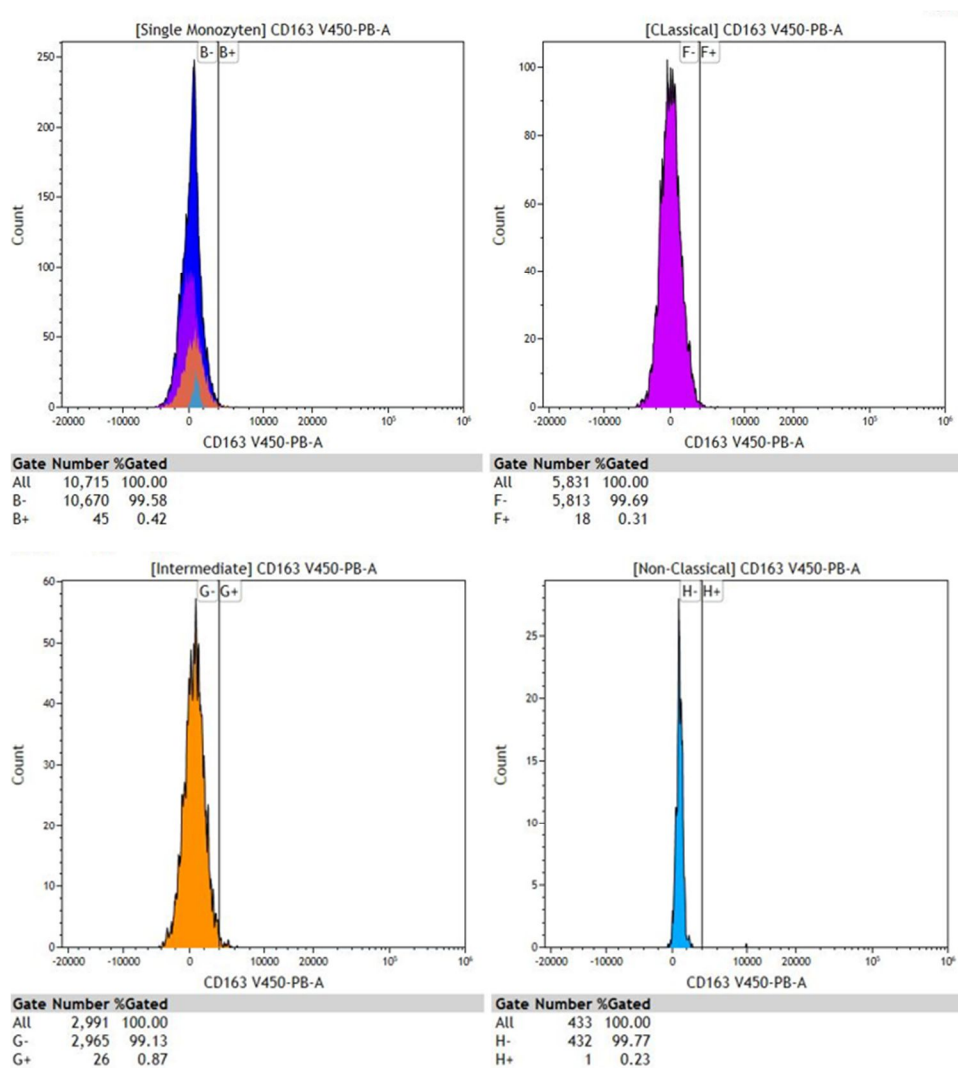


Abbildung 8. Erfolgreiche FMO-Kontrolle

Eine erfolgreiche FMO-Kontrolle am Beispiel von CD163 zeigt eine klare Trennung zwischen positive und negative Zellpopulation. Dies stellt sicher, dass das interessierte Signal richtig identifiziert wird und ermöglicht eine genaue Interpretation der Daten.

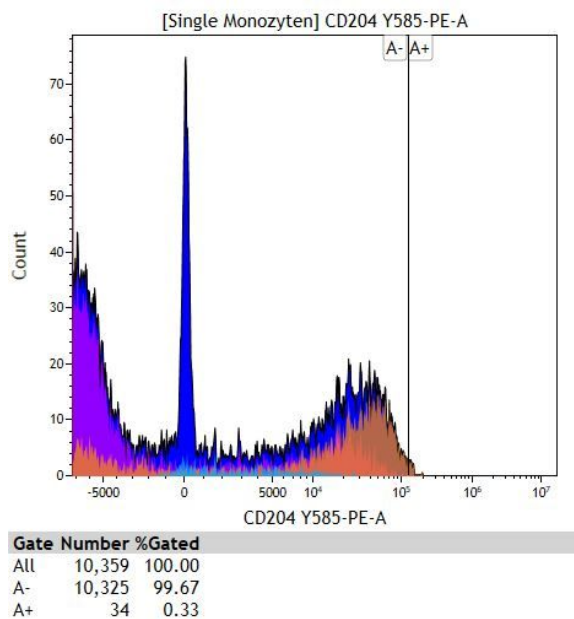


Abbildung 9. Nicht erfolgreiche FMO-Kontrolle

Am Beispiel der FMO-Kontrolle bei einem weiteren untersuchten Marker CD204 zeigt sich eine überlappende Population. Dies kann zu falschen Schlussfolgerungen hinsichtlich der Anwesenheit und Intensität des Markers führen. Die Auswertung dieses Markers wurde deshalb aus den Analysen ausgeschlossen.

In einem Fall, welcher aus der Analyse ausgeschlossen wurde, konnte die Verarbeitung der Probe aus Zeit- und Kapazitätsgründen nicht unmittelbar nach der Blutabnahme erfolgen, sondern die Probe wurde für 10 Stunden bei 4°C gelagert. Die PBMC-Isolation zeigte in diesem Fall einen starken Verlust der Monozyten und ein Aneinanderkleben der Zellen, was an dem hohem Duplettenanteil sichtbar ist (Abb.10). Die Anfärbung mit Antikörpern war schließlich nicht verwertbar.

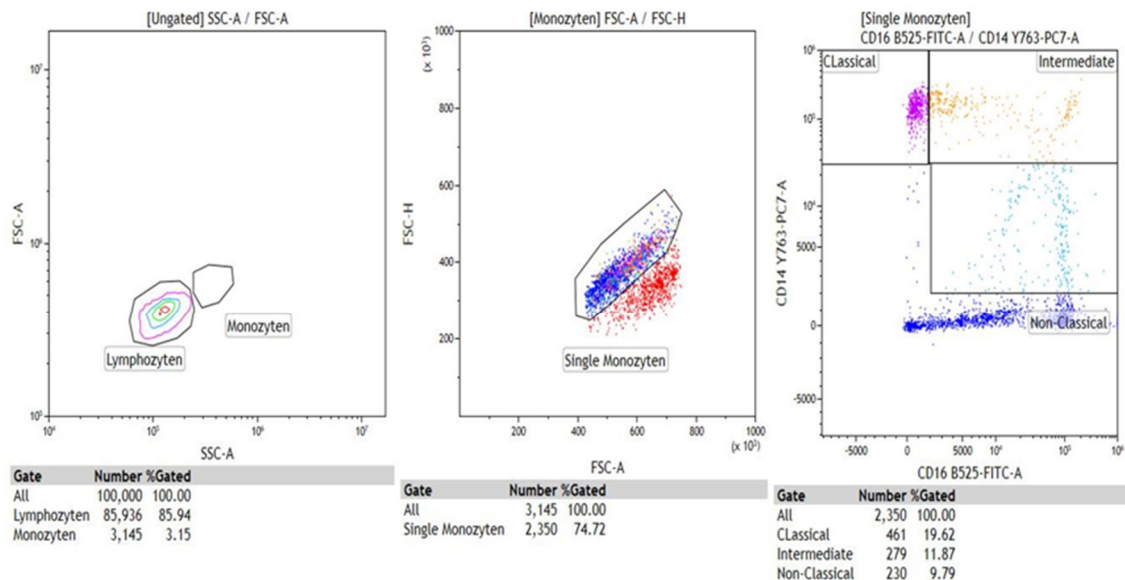


Abbildung 10. Einfluss der Probenverarbeitung auf die Isolation von Monozyten

Bereits in dem Vorwärts- versus Seitenstreu-Gating zeigt sich das Fehlen der typischerweise gut sichtbaren Monozyten-Population. In dem FSC-height versus FCS-area Gating zeigt sich ein ungewöhnlich hoher Anteil an Dubletten. In der Quadranten-basierten Gating-Schema ist die übliche lineare Verteilung der Monozyten aufgehoben.

3.3.8 Auswertung

Die durchflusszytometrischen Daten wurden analysiert und dargestellt mittels *Kaluzza-Analysesoftware 2.0* (Beckman Coulter Life Sciences, Brea, Kalifornien).

Für die Datenorganisation und die ersten Berechnungen wurde als Software das Programm Excel von Microsoft Office Professional Plus 2016 für Windows (Microsoft 365) angewandt.

Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit *GraphPad Prism 9.5.1*. (GraphPad San Diego, USA). Für die statistische Prüfung von Unterschieden zwischen zwei unabhängigen Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die Prüfung abhängiger Daten (frisch vs. kryokonserviert) wurde der Wilcoxon matched-pairs signed rank Test verwendet (*GraphPad Prism 9.5.1*). Bei mehr als zwei zu untersuchenden voneinander unabhängigen Gruppen wurde die einfaktorielle ANOVA in Kombination mit ungepaartem t-Test angewendet. Ein Signifikanzlevel von 5%

wurde standartgemäß für die statistische Interpretation der Daten festgelegt. Für die deskriptive Analyse wurde die Daten mittels *IBM SPSS Statistics für Windows, Version 29.0.0* (IBM Corp., Armonk, NY) durch den Shapiro-Wilk-Test auf Normalität überprüft. Da alle nominalen Variablen nicht normalverteilt waren, wurde der nicht parametrische Kruskal-Wallis Rank Sum Test zur Testung der Signifikanz und der Interquartilsabstände gewählt. Die Analyse der metrischen Variablen erfolgte mit dem Fischer's exact Test.

Die Zusammenhänge zwischen metrisch skalierten Variablen wurden mittels dem Software *JASP 0.17.1.0* (University of Amsterdam) untersucht und dargestellt.

Die statistischen Analysen wurden selbstständig durch mich durchgeführt, nach Beratung durch Dr. rer. biol. hum. Dennis Freuer M.Sc. vom Lehrstuhl für Epidemiologie.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristik des Patientenkollektivs

In der Pilot-Studie wurden die Daten von 66 pAVK-Patienten (Stadium IIb n=23, Stadium III n=20, Stadium IV n=23) sowie von gesunden Probanden (n=10) ausgewertet. Das mittlere Alter der Patienten betrug $70,5 \pm 8,3$ und 71,2% davon waren Männer.

Die Patienten im pAVK St. IV hatten am häufigsten einen fortgesetzten Nikotinkonsum (56,2%) und die meisten pack years: 56,1.

44% der Patienten hatten Diabetes mellitus als Begleiterkrankung, 22,7% davon Insulin-pflichtig. In der Gruppe der Patienten im St. IV der pAVK waren es nahezu 40% insulinpflichtige Diabetiker.

In der gesamten Patientenpopulation wiesen 42,4% der Patienten einen arteriellen Hypertonus mit dreifacher antihypertensiver Therapie auf. 45% der Patienten wurden bereits mit koronarer Herzerkrankung diagnostiziert, darunter hatten 26% der Patienten im Stadium IV Myokardinfarkte in der Vorgeschichte.

Des Weiteren hatten 13% der Patienten mit fortgeschrittener pAVK im St. IV einen Schlaganfall erlitten jedoch keiner im Stadium IIb und III.

(Tabelle 1)

Der ABI-Index lag bei 10% der Fälle über 1,3; in der Gruppe Stadium IV bei 20% und ist damit nicht verwertbar bei Verdacht auf Mediasklerose.

Hinsichtlich der laborchemischen Parameter zeigte sich im Stadium IV, selbst nach Ausschluss florider Infektion, ein erhöhter CRP-Wert ($p=0.001$), und ein signifikant niedrigerer Hb-Wert ($p=0.002$), letzterer am ehesten im Sinne einer chronischen Anämie. Der HbA1c Wert zeigte sich im Stadium IV ebenso signifikant erhöht. Die restlichen laborchemischen Parameter, einschließlich der Leukozyten- und Monozytenzahl unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Stadien.

Bei allen Patienten befanden sich die Cholesterinwerte hinsichtlich des bestehenden Risikoprofils nicht in dem empfohlenen Zielbereich, welcher für LDL $<70\text{mg/dl}$ bzw. $>50\%$ Reduktion, für Gesamtcholesterin $<150\text{mg/dl}$, für Triglyceride $<130\text{mg/dl}$ und für HDL $>50\text{mg/dl}$ liegt (118). Die Lp(a)-Serumkonzentration zeigte einen Mittelwert von 106nmol/L und lag in allen drei pAVK Gruppen über den empfohlenen Zielbereich von 75nmol/L (119).

(Tabelle 2)

In Bezug auf die Medikamenteneinnahme unterschieden sich die Patienten in den verschiedenen Stadien der pAVK nicht signifikant. Auffällig ist, dass ca. 40% der Patienten bei Einschluss kein Statin als Dauermedikation einnahmen, 10% nahmen Ezetimib ein, die Mehrheit davon als zweites lipidsenkendes Medikament neben einem Statin.

Metformin gehört zur Dauermedikation bei 20% der Patienten.

Insgesamt sind sieben der 66 Studien Patienten (10,6%) im Beobachtungszeitraum von 1,5 Jahre verstorben. Darunter war bei sechs Fällen die Todesursache als kardiovaskulärer Tod und bei einem Patienten eine schwere intrazerebrale Blutung nach Sturz unter doppelter Thrombozytenaggregationshemmung eruiert (Tabelle 1).

Tabelle 1. Patienten- Charakteristika

Abkürzungen: AP = Angina pectoris

DM = Diabetes mellitus

KHK= koronare Herzkrankheit

TIA = transitorische ischämische Attacke

Verwendete Tests: Fisher's Exact Test for Count Data;

Kruskal-Wallis Rank Sum Test

Patienten- Charakteristika	Stadium			p Wert
	IIb	III	IV	
Alter (Median, 25/75 Quartile)	70 (65.5; 76)	69 (65.75; 75)	74 (67; 78)	0.414
Geschlecht (Median, 25/75 Quartile)				0.79
- männlich	15 (0.652)	15 (0.75)	17 (0.739)	
- weiblich	8 (0.348)	5 (0.25)	6 (0.261)	
Raucherstatus (Median, 25/75 Quartile)				0.294
- kein Nikotin	5 (0.217)	2 (0.1)	9 (0.391)	
- aktives Rauchen	9 (0.391)	8 (0.4)	7 (0.304)	
- Ex-Nikotin	9 (0.391)	10 (0.5)	7 (0.304)	
pack years (Median, 25/75 Quartile)	40 (23.75; 57.5)	40 (30; 55)	55 (40; 70)	0.255
Diabetes (Median, 25/75 Quartile)				0.142
- kein Diabetes	16 (0.696)	13 (0.65)	8 (0.348)	
- DM Typ II, nicht insulinpflichtig	4 (0.174)	4 (0.2)	5 (0.217)	
- DM Typ II, insulinpflichtig	3 (0.13)	3 (0.15)	9 (0.391)	
- Diabetes, bisher ohne Therapie	0 (0)	0 (0)	1 (0.043)	
arterieller Hypertonus (Median, 25/75 Quartile)				0.845
- kein Hypertonus	3 (0.13)	2 (0.1)	3 (0.13)	
- 1-fache antihypertensive Therapie	9 (0.391)	6 (0.3)	5 (0.217)	
- 2-fache antihypertensive Therapie	4 (0.174)	3 (0.15)	3 (0.13)	
- >3-fache antihypertensive Therapie	7 (0.304)	9 (0.45)	12 (0.522)	
KHK (n, %)				
- nicht bekannt	14 (60,8%)	10 (50%)	12 (52,2%)	
- stabile AP	1 (4,3%)	0 (0%)	2 (8,69%)	
- koronarer Bypass	3 (13,04%)	1 (5%)	2 (8,69%)	
- Z.n. Herzkatheter	3 (13,04%)	9 (45%)	2 (8,69%)	
- Myokardinfarkt	2 (8,6%)	1 (5%)	6 (26,08%)	
zerebrovaskuläre Erkrankung (n; %)	4 (17,4%)	3 (15%)	2 (8,6%)	
- TIA (n; %)	3 (13%)	2 (10%)	1 (4,3%)	
- Schlaganfall (n; %)	0 (0%)	0 (0%)	3 (13,04%)	
Tod (n; %)	1 (4,3%)	2 (10%)	4 (17,4%)	

Tabelle 2. Baseline- Parameter

Abkürzungen: ABI = anke brachial Index CRP = C-reaktives Protein
 CM=klassische Monozyten DOAK = direkte orale Antikoagulation
 Hb= Haemoglobin HDL= high density lipoprotein
 IM= intermediäre Monozyten LDL= low density lipoprotein
 Lp(a) = Apolipoprotein a NC= nicht-klassische Monozyten

Verwendete Tests: Kruskal-Wallis Rank Sum Test

Baseline-Parameter	IIb	III	IV	p Wert
ABI				
>1,3 (n; %)	1 (4,3%)	1 (5%)	5 (21%)	
0,75-0,9 (n; %)	3 (13,04%)	0 (0%)	0 (0%)	
0,5-0,75 (n; %)	13 (56,5%)	5 (25%)	5 (21%)	
<0,5 (n; %)	5 (21,7%)	13 (65%)	13 (56,5%)	
Blutverdünnende Medikamente (n; %)				
- keine	2 (8,7%)	3 (15%)	2 (8,7%)	
-ASS oder Clopidogrel	15 (65,2%)	6 (30%)	12 (52,2%)	
- ASS + DOAK	4 (17,4%)	1 (5%)	3 (13,04%)	
-ASS+Clopidogrel	1 (4,3%)	3 (15%)	1 (4,3%)	
- DOAK	1 (4,3%)	7 (35%)	4 (17,4%)	
- Marcumar	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,3%)	
Metformin (n; %)	4 (17,4%)	3(15%)	7 (30,4%)	
Statin (n; %)	12 (52,2%)	13 (65%)	15 (65,2%)	
Neuroleptika (n; %)	2 (8,7%)	1 (5%)	1 (4,3%)	
Allopurinol (n; %)	2 (8,7%)	1 (5%)	1 (4,3%)	
Ezetimib (n; %)	3 (13,04%)	2 (10%)	2 (8,7%)	
CRP mg/dl (Median, 25/75 Quartile)	0.2 (0.12; 0.3)	0.315 (0.22; 0.745)	1.45 (0.4; 3.2)	0.001
Hb g/l (Median, 25/75 Quartile)	143 (134; 149.5)	132 (120.5; 144.75)	115 (106; 129)	0.002
Leukozyten /nl (Median, 25/75 Quartile)	7.61 (6.785; 9.07)	7.6 (6.282; 8.362)	8.99 (7.115; 10.115)	0.215
Thrombozyten/nl (Median, 25/75 Quartile)	194 (157; 268.5)	194.5 (141.25; 257)	229 (196; 283.5)	0.276
Kreatinin mg/dl (Median, 25/75 Quartile)	0.9 (0.77; 1.14)	1.065 (0.79; 1.258)	1.04 (0.865; 1.33)	0.337
HbA1c % (Median, 25/75 Quartile)	5.5 (4.3; 5.8)	5.8 (5.3; 6.4)	6.6 (6.25; 7.45)	0
Cholesterin mg/dl (Median, 25/75 Quartile)	186 (129; 242)	153 (122; 187)	153 (121; 199.25)	0.275
LDL mg/dl (Median, 25/75 Quartile)	106 (68.5; 142.5)	69.5 (54; 107)	85 (55.5; 107.25)	0.186

Baseline-Parameter	IIb	III	IV	p Wert
HDL mg/dl (Median, 25/75 Quartile)	49 (37; 58.5)	52.5 (44.5; 57.5)	41 (38.5; 48.5)	0.084
Triglyceride mg/dl (Median, 25/75 Quartile)	117 (81.5; 184.5)	98 (82.75; 172)	123 (101; 178.5)	0.638
Lpa nmol/L (Median, 25/75 Quartile)	22 (7; 135.5)	56 (12.25; 160)	63 (35; 210)	0.205
CM (Median, 25/75 Quartile)	72.705 (66.145; 82.522)	72.447 (57.831; 79.567)	67.892 (54.556; 78.67)	0.275
IM (Median, 25/75 Quartile)	21.021 (12.513; 30.385)	20.876 (14.874; 34.54)	29.015 (16.875; 35.578)	0.122
NC (Median, 25/75 Quartile)	5.481 (3.127; 8.669)	5.155 (3.633; 6.826)	3.63 (2.394; 5.036)	0.109
Monozyten/ml (Median, 25/75 Quartile)	2201274 (1043234; 4181024)	2036360 (1154850; 3708282.5)	1754060 (1176725; 2743025.5)	0.562

4.2 Korrelation zwischen Baseline-Parameter und Monozyten-Werte

Es wurden die Zusammenhänge zwischen Monozyten-Subtypen und klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Nikotinkonsum überprüft, soweit ordinalen Daten vorhanden waren (z.B. Anzahl an pack years). Es zeigte sich eine Tendenz zu Verringerung der Anteile klassischer CD14++CD16– und nicht-klassischer CD14+CD16++ Monozyten mit steigender Anzahl an pack years, zugunsten von einem erhöhten Anteil des intermediären CD14++CD16+ Subtyps.

Zwischen Monozyten-Subtypen und Cholesterin-Spiegel/ LDL-Spiegel zeigte sich eine Abnahme des Anteils an intermediären und nicht-klassischen Monotypen mit steigenden Cholesterin- und LDL-Werte, während der Anteil an klassischen Monozyten zunahm. Die Korrelationen waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Lp(a)-Werte zeigten in unserer Population eine hohe Variation $106,03 \pm 113,7 \text{ nmol/L}$ und keine signifikante Korrelation zu einem bestimmten Monozytensubtyp.

Abbildung 11. zeigt die Korrelationen zwischen Monozyten-Subtypen und dem HbA1c-Wert. Es zeigt sich eine Verringerung des Anteils sowohl an klassischen als auch an nicht-klassischen Monozyten mit steigendem HbA1c-Wert, während der Anteil an intermediären Monozyten zunimmt. Hierbei zeigt sich eine mittlere/moderate Korrelation für die Variablen intermediäre Monozyten vs. HbA1c und nicht-klassische Monozyten vs. HbA1c, sowie eine geringe Korrelation zwischen klassische Monozyten und HbA1c (Abb.11).

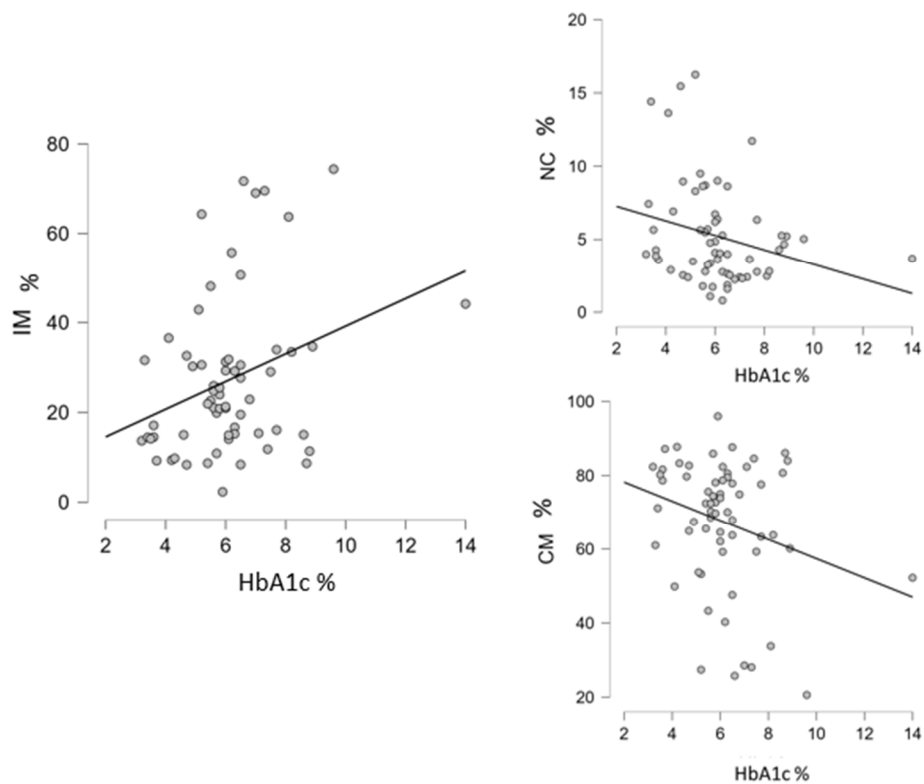


Abbildung 11. Korrelation zwischen HbA1c und Monozytensubtypen

Abkürzungen:

IM = intermediäre Monozyten CM = klassische Monozyten

NC = nicht-klassische Monozyten

Verwendeter Test: Korrelationskoeffizient nach Spearman ρ

HbA1c vs. IM: Spearman's $\rho = 0,268^*$ ($p=0,033$)

HbA1c vs CM: Spearman's $\rho = - 0,193$ ($p=0,130$)

HbA1c vs NC: Spearman's $\rho = - 0,290^*$ ($p=0,021$)

4.3 Einfluss des Zellisolationsmedium auf die Bestimmung von Monozyten im peripheren Blut

Um die Auswirkung des Antikoagulans- Mediums und der Zellisolationemethode auf die Isolationseffizienz und Überlebensfähigkeit von Monozyten im peripheren Blut zu bewerten, wurde das Blut von einem Probanden unmittelbar nach der Blutabnahme in drei Röhrchen aufgeteilt: EDTA, Heparin und Natrumcitrat. Aus dem jeweiligen Medium wurde ein Teil des Blutes unter Verwendung des Ficoll-Paque-Zentrifugationsverfahren bearbeitet und ein Teil der Monozyten direkt aus Vollblut bestimmt.

Die Vitalität der Zellen aus der Vollblutprobe betrug im Heparin-Medium 81,8%, in Citrat 93,7% und in EDTA 100%. Die Vitalität der PBMC unterschied sich in den verschiedenen Medien nicht und betrug im Heparin 99,4%, in Citrat 99,2% und in EDTA 98,8%. In Bezug auf die Bestimmung der Monozytensubtypen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Heparin- und Citrat- Blut (Abb. 12).

Die Isolation aus EDTA ergab einen signifikant höheren Anteil an intermediären Monozyten (Abb. 13) mit Reduktion sowohl des klassischen als auch des nicht-klassischen Subtyp.

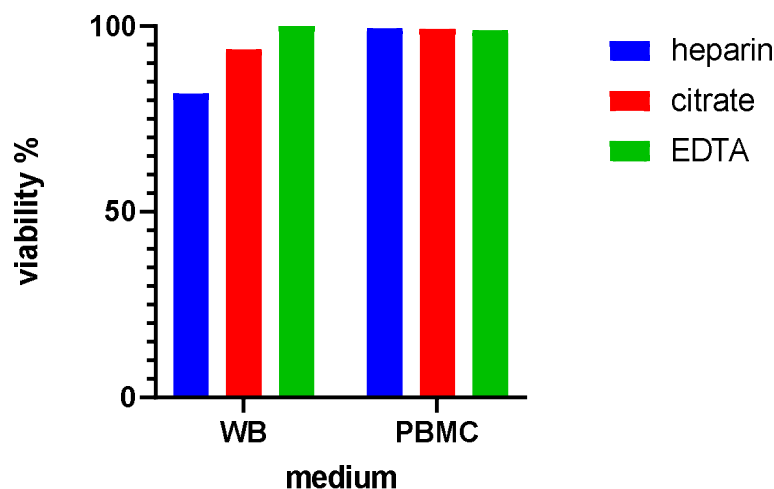


Abbildung 12. Auswirkung der Isolationsmethode auf die Vitalität der Zellen

Abkürzungen: WB = Whole Blood (Vollblut)

PBMC= peripheral mononuclear blood cells

Die niedrigste Vitalität zeigte sich nach Isolation von Vollblut in Heparin-Natrium (81,8%). Die Zellen zeigten die höchste Vitalität nach Isolation von EDTA-Vollblut (100%). Die Isolation von PBMC mit der Ficoll-Paque PLUS -Methode ergab unabhängig von den Antikoagulantien stets hohe Vitalität (98,8-99,4%).

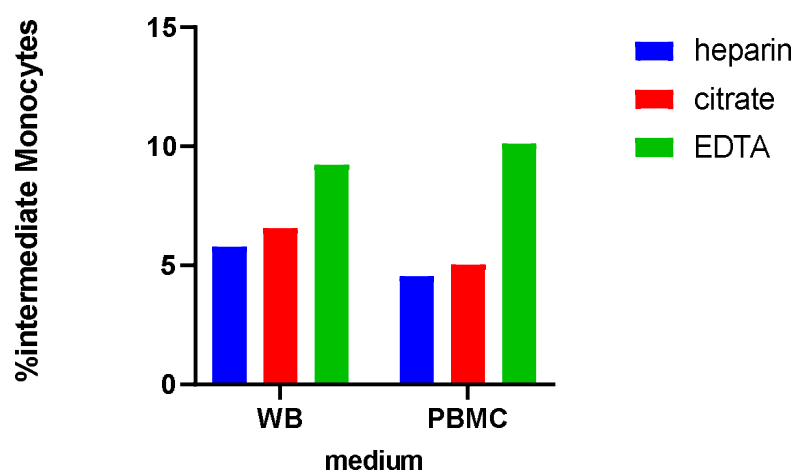


Abbildung 13. Auswirkung der Isolationsmethode auf die Bestimmung von intermediären Monozyten

Abkürzungen: WB = Whole Blood (Vollblut)

PBMC= peripheral mononuclear blood cells

Der Anteil an intermediären Monozyten ist signifikant höher nach Isolation aus EDTA, sowohl aus Vollblut, als auch aus PBMC.

Verwendeter Test: unpaired t-test: Citrat vs. Heparin (p value =0,666)
 EDTA vs. Heparin (p value =0,027*)
 EDTA vs. Citrat (p value = 0,049*)

4.4 Einfluss der Kryokonservierung auf die Vitalität und Erhalt der Zellen

Die Vitalität und Ausbeute der aus kryokonservierten Proben isolierten PBMCs waren im Vergleich zu denen aus frischen Blutproben signifikant geringer.

Die mittlere Vitalität von PBMC aus frischen Proben betrug 97,10%, während die mittlere Vitalität von PBMC aus kryokonservierten Proben 81,50% betrug. (Abb.14)

Die mittlere Ausbeute an PBMC aus frischen Proben betrug $29,4 \times 10^6$ Zellen.

Von den 10^6 /Proband eingefrorenen Zellen konnten nach Kryokonservierung $7,98 \times 10^6$ Zellen gefärbt und untersucht werden. Die absolute Ausbeute betrug $1,35 \times 10^9$ Zellen bei frischen Proben und $3,83 \times 10^8$ Zellen in den kryokonservierten Proben (Abb.15).

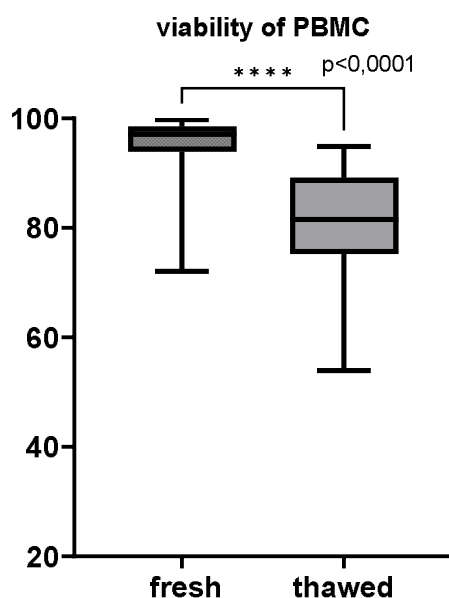


Abbildung 14. Einfluss der Kryokonservierung auf die Vitalität von PBMC

Frisch isolierte und kryokonservierte Zellen wurden unter Verwendung der Viability Assay von NucleoCounter® NC-202™ auf ihr Überleben untersucht.

Es wurde das Verhältnis zwischen dem Median beider Gruppen untersucht:

Der Median frisch isolierter Proben 97,05% (n=62) vs. Median kryokonservierter Proben 81,60% (n=49) unterschieden sich signifikant (p-Wert<0,0001).

Statistik: Wilcoxon-Test und Mann-Whitney-Test

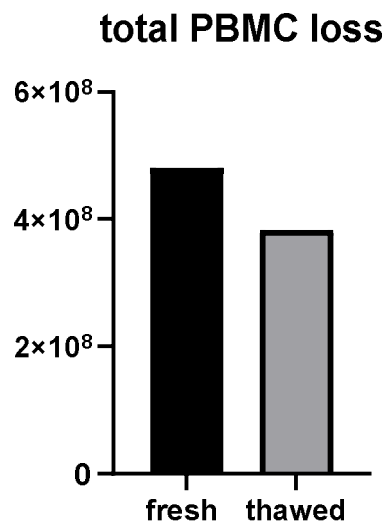


Abbildung 15. Einfluss der Kryokonservierung auf die Ausbeute von PBMC

Die Anzahl frisch isolierter und kryokonservierter Zellen wurde mittels NucleoCounter® NC-202™ bestimmt.

Verwendete Formel: Zellzahl = Zellkonzentration [1/ml] x Volumen [ml]

Die Grafik zeigt die Reduktion der absoluten Zellzahl in gepaarten Proben (n=48), diese betrug 97 Mio. Zellen oder ca. 20% der frisch isolierten Zellen.

Die Kryokonservierung zeigte in unserer Analyse eine signifikante Auswirkung auf den Erhalt von Monozyten. Nach dem Auftauen der kryokonservierten Proben zeigte sich eine starke Reduktion der Monozytenzahl, von $1,40 \times 10^8$ Monozyten kumulativ in den frischen Proben auf $4,80 \times 10^7$ Monozyten kumulativ in kryokonservierten Proben der gleichen Patienten (Abb.16).

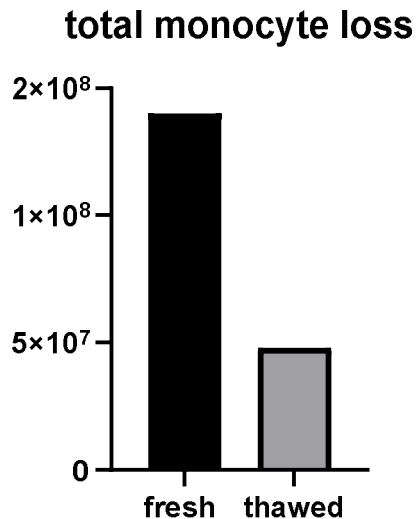


Abbildung 16. Einfluss der Kryokonservierung auf den Erhalt von Monozyten

Die Anzahl frisch isolierter und kryokonservierter PBMC wurde mittels NucleoCounter® NC-202™ bestimmt.

Der Anteil an Monozyten an den Gesamtleukozyten wurde nach Gating mittels Kaluza Analysis Software ermittelt.

Davon wurden die absoluten Monozytenzahlen nach der Formel:

$\text{Monozyten/ml} = \text{lebende Zellen/ml} \times \text{Monozyten\% [FACS]}$ ermittelt.

Die Grafik zeigt die Reduktion der absoluten Monozytenzahl in gepaarten Proben.

Diese betrug 92 Mio. Zellen oder ca. 65,7% der frisch isolierten Zellen.

4.5 Einfluss der Kryokonservierung auf die Detektion von CD14, CD16 und CD163 auf Monozyten

Um zu eruieren, ob die Kryokonservierung die Subtypen-Charakterisierung beeinflusst, wurde die Intensität des gemessenen Signals an CD16 und CD14 auf Monozyten in frischen und in kryokonservierten Proben untersucht. Hierbei zeigte sich die Expression von CD14 und CD16 in unseren Proben, im Rahmen der Messungenauigkeit, konstant (Abb.17 und 18).

Die Intensität des CD163-Signals, als Parameter für die Expression des inflammatorischen CD163-Moleküls auf Monozyten wurde dagegen durch Kryokonservierung signifikant verändert (Abb.17 und 19).

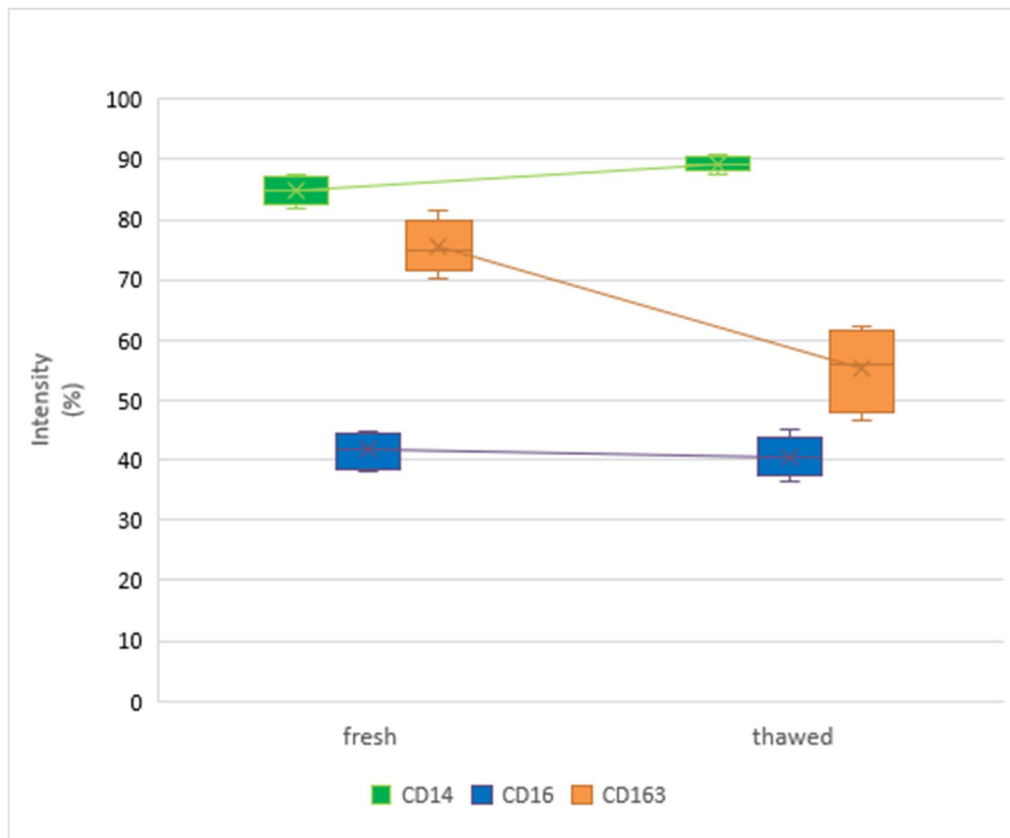


Abbildung 17. Einfluss der Kryokonservierung auf die Intensität der gemessenen Oberflächenmarker-Signale

Die Intensität der gemessenen Signale an CD14, CD16 und CD163 ist in Prozent angegeben. Die Kryokonservierung verändert nicht signifikant die Intensität des CD14 und CD16 Signals auf Monozyten. Die Kryokonservierung führt zu einer signifikanten Reduktion ($p=0,0057$) der Intensität des CD163-Signals (paired t-test).



Abbildung 18. Quantitative Messung der CD14 und CD16 Signale

Die Intensität der gemessenen Signale an CD14 und CD16 ist in Prozent angegeben. Die prozentuale Änderung (%-change) in den aufgetauten Proben im Vergleich zu den frischen Proben wurde mit Excel berechnet. Die Signifikanz der Veränderungen wurde mit paired t Test überprüft. Die Veränderungen in den kryokonservierten Proben sind nicht statistisch signifikant.

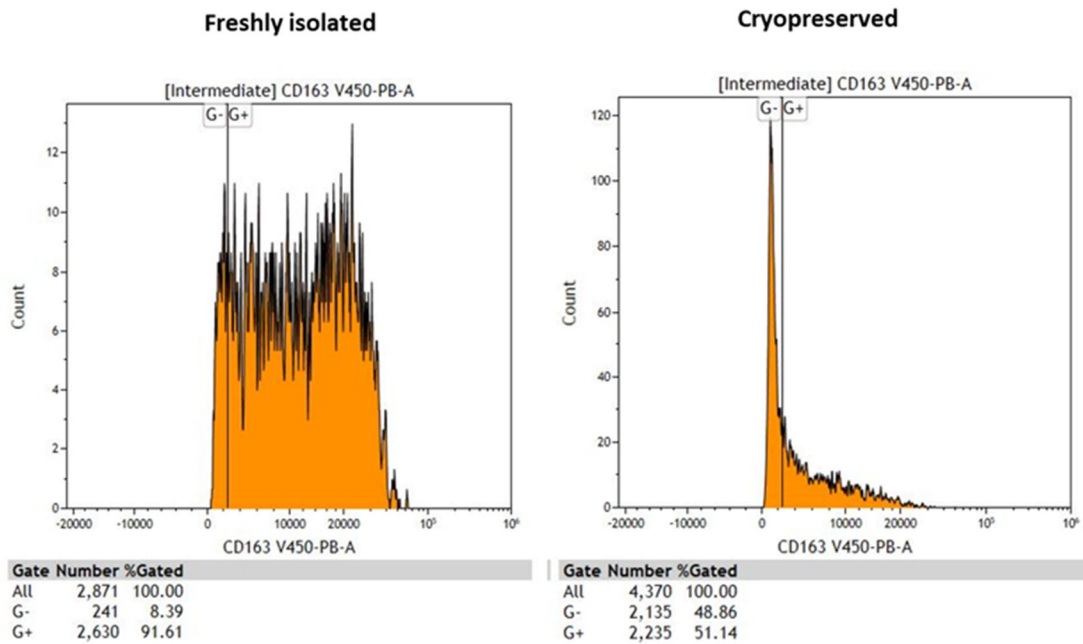


Abbildung 19. Fluoreszenz-Intensitätsmessung von CD163

Innerhalb des Monozyten-Gate, am Beispiel des intermediären Subtyps, zeigt sich einen starken Verlust des gemessenen CD163-Signals nach dem Auftauen der gleichen Blutprobe.

4.6 Monozyten-Anteile bei Patienten mit pAVK und gesunden Probanden

Sowohl der Monozyten Anteil an Gesamtleukozyten, als auch die absoluten Monozyten-Zahlen zeigten sich bei Patienten im St. III signifikant erhöht. Allerdings konnten wir diesen Effekt nur bei den frisch isolierten Proben zeigen (Abb.20 und 21).

Die Kryokonservierung veränderte in unserer Analyse den Monozyten-Anteil an Gesamtleukozyten signifikant, mit der Tendenz, dass die Monozyten-Anteile bei Gesunden und bei pAVK im St. IV in den kryokonservierten Proben erhöht waren, während die Monozyten-Anteile bei pAVK im St. IIb und III verringert waren (Abb.22).

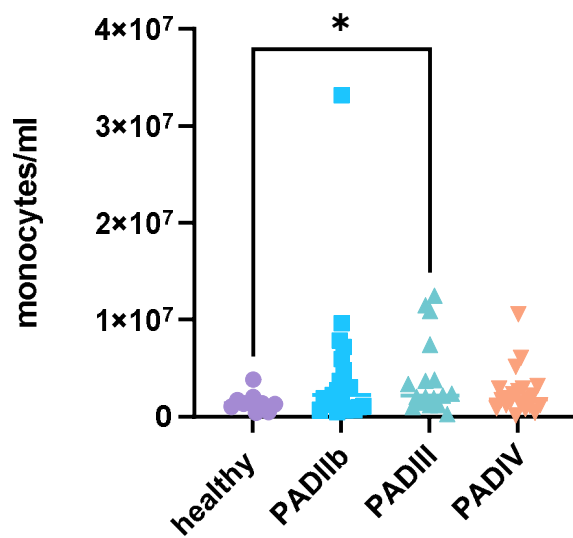


Abbildung 20. Monozyten-Zahlen bei pAVK vs. gesunden Probanden

Die absoluten Monozytenzahlen wurden nach der Formel:

Monozyten/ml = lebende Zellen/ml x Monozyten% [FACS] berechnet.

Die Grafik zeigt die absoluten Monozytenzahl pro ml in frisch isolierten Proben

bei n = 62 Patienten in unterschiedlichen pAVK-Stadien (St. IIb n=23, St. III n=17, St. IV n=22) nach Fontaine und bei n=10 gesunden Probanden.

Messungen und Ausreißer werden als einzelne Punkte dargestellt.

Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung des Monozyten-Anteils, insbesondere bei pAVK im Stadium III ($p=0,0355$) im Vergleich zum gesunden Kollektiv in den frisch isolierten Proben.

Statistik: Kruskal-Wallis Test mit Mann-Whitney Test

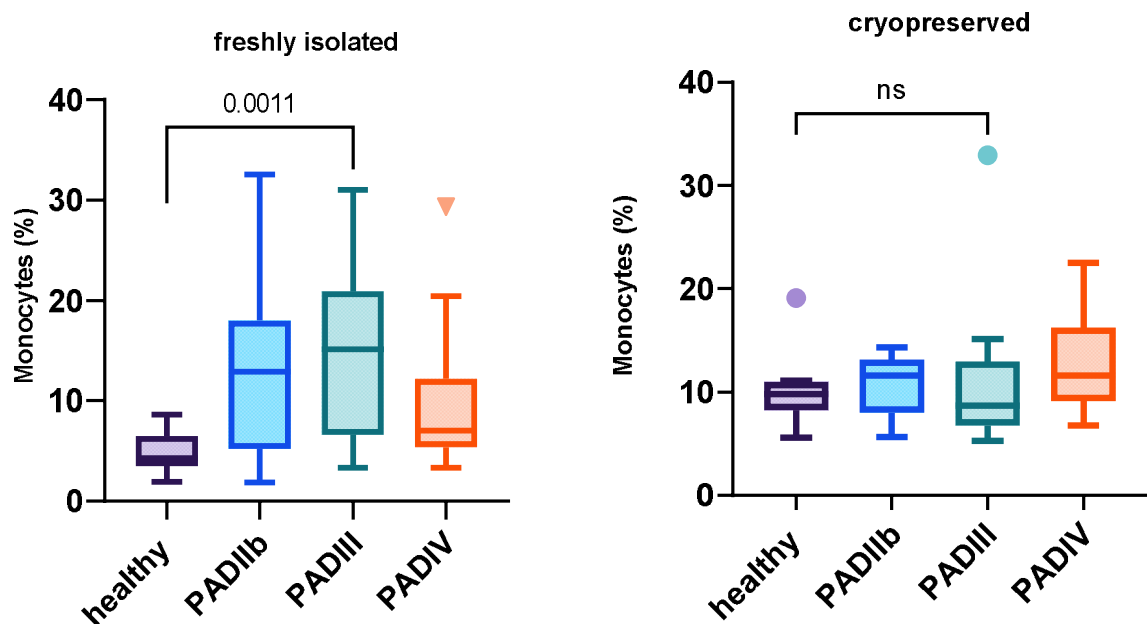


Abbildung 21. Monozyten-Anteile bei pAVK vs. Gesunden

Monozyten-Anteile (Monozyten% [FACS]) unter den Gesamtleukozyten wurden bei n = 64 Patienten in unterschiedlichen pAVK-Stadien nach Fontaine (St. IIb n=23, St. III n=18, St. IV n=23) und bei n=10 gesunden Probanden aus frisch isolierten Proben, sowie bei n= 44 Patienten (St. IIb n=12, St. III n=15 und St. IV n=17) und n=10 gesunden Probanden aus kryokonservierten Proben ermittelt.

Die Ergebnisse von frisch isolierten und kryokonservierten Proben wurden verglichen. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung des Monozyten-Anteils, insbesondere bei pAVK Stadium III ($p=0,0011$) im Vergleich zum gesunden Kollektiv in den frisch isolierten Proben und kein signifikanter Unterschied zwischen den pAVK-Stadien und Gesunden in den kryokonservierten Proben.

Statistik: Kruskal-Wallis Test mit Mann-Whitney Test

Der beobachtete Effekt auf die Monozytenpopulationen nach dem Auftauen der Blutproben war ungleich in den vier verschiedenen untersuchten Gruppen: Gesunden, pAVK IIb, III und IV (Abb.22).

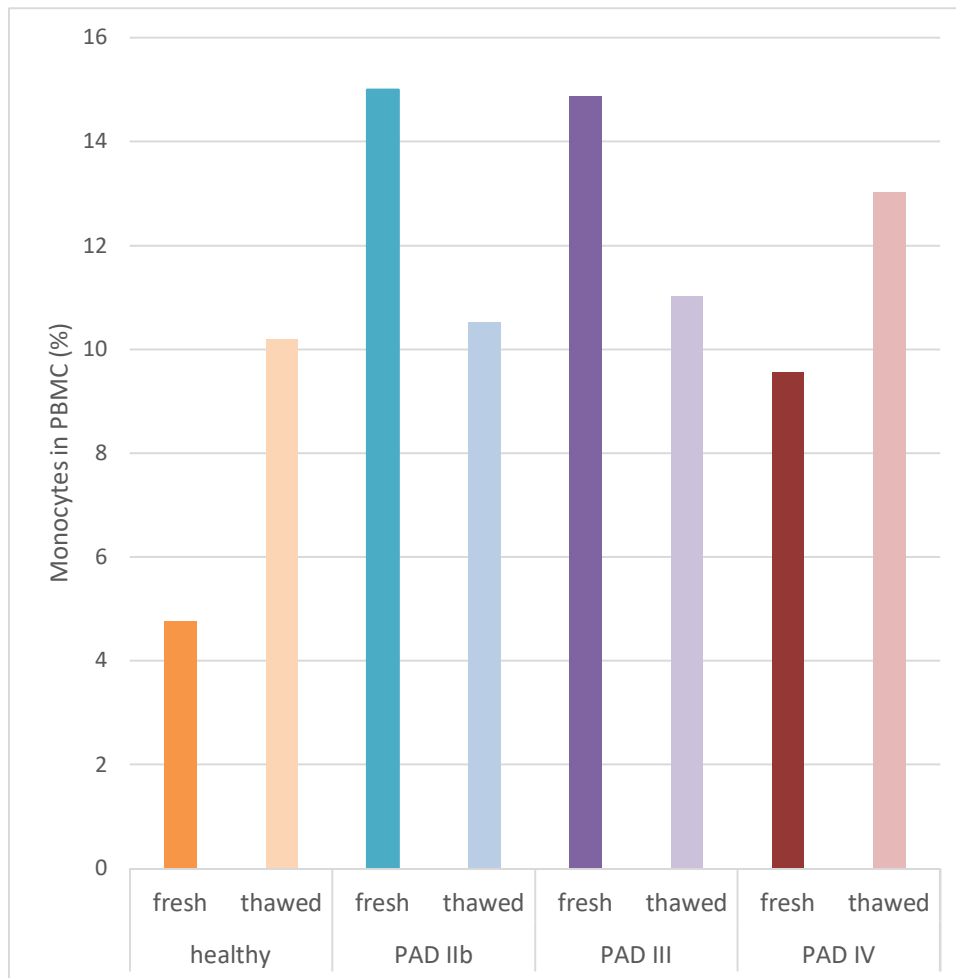


Abbildung 22. Monozyten-Anteile an PBMC gesamt in frischen vs. kryokonservierten Proben

Dargestellt sind die Monozyten-Anteile in Prozent von PBMC aus frischen und kryokonservierten Proben.

Die Grafik demonstriert, dass die Kryokonservierung von PBMC signifikanten Effekt auf die Bestimmung des Anteils an Monozyten hat. Nach dem Auftauen erhöhten sich die Monozyten-Anteile von PBMC in den Proben von Gesunden und von pAVK St. IV; im St. IIb und St. III. verringerten sich die Anteile.

4.7 Verteilungsmuster der Monozytensubtypen bei pAVK-Stadium II, III, IV und bei Gesunden

Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede in den Anteilen klassischer Monozyten weder in den pAVK-Stadien, noch im Vergleich zum gesunden Kollektiv. Der Anteil an intermediären Monozyten war signifikant erhöht mit Progression der pAVK von St. IIb zum Stadium IV. Es zeigte sich gleichzeitig eine Tendenz zur Verminderung des Anteils an nicht-klassischen Monozyten bei pAVK im St. IV, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb.23).

Der signifikante Anstieg an intermediären Monozyten konnte anhand der frisch isolierten, aber nicht anhand der kryokonservierten Proben nachgewiesen werden (Abb.24).

Der Anteil an nicht-klassischen Monozyten zeigt sich in der untersuchten pAVK-Population im St. IIb tendenziell am höchsten und höher als bei Gesunden (Abb. 25).

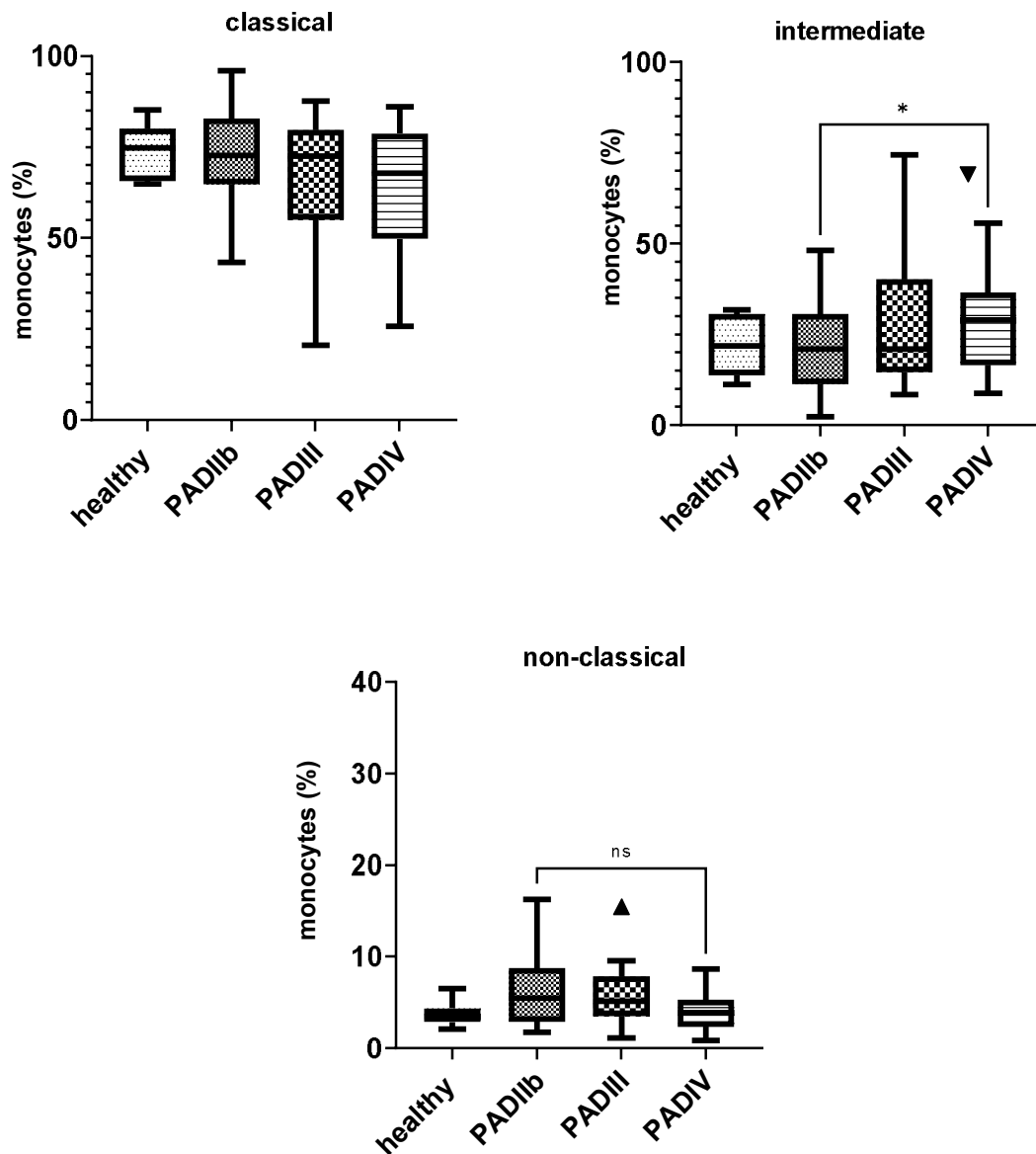


Abbildung 23. Verteilung der Monozytensubtypen bei pAVK und bei Gesunden

Die Grafik zeigt die ermittelten Anteile der Monozyten-Subtypen unter den Gesamtmonozyten bei n = 64 Patienten in unterschiedlichen pAVK-Stadien nach Fontaine (St. IIb n=23, St. III n=18, St. IV n=23) und bei n=10 gesunden Probanden aus frisch isolierten Blutproben.

Zu verzeichnen ist ein signifikanter Anstieg des Anteils an intermediären Monozyten von pAVK St. IIb zu pAVK St. IV ($p=0,0293$)

Statistik: unpaired t-Test mit Mann-Whitney Test

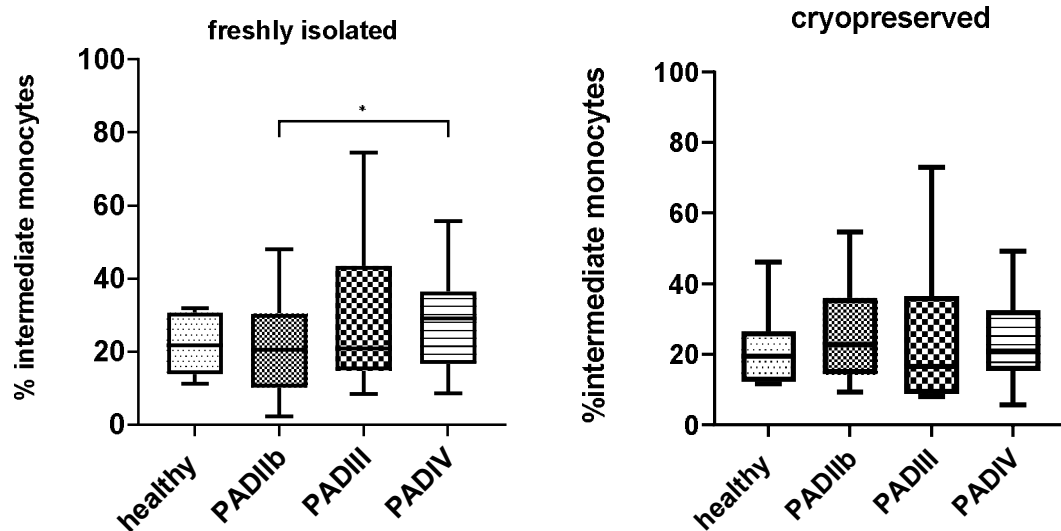


Abbildung 24. Intermediäre Monozyten in frischen vs. kryokonservierten Proben

Die Grafik zeigt die ermittelten Anteile der Monozyten-Subtypen unter den Gesamtmonozyten bei n = 64 Patienten in unterschiedlichen pAVK-Stadien nach Fontaine (St. IIb n=23, St. III n=18, St. IV n=23) und bei n=10 gesunden Probanden aus frisch isolierten Proben und bei n= 44 Patienten (St. IIb n=12, St. III n=15 und St. IV n=17) und n=10 gesunden Probanden aus kryokonservierten Proben.

Im Gegensatz zum signifikanten Anstieg des Anteils an intermediären Monozyten von pAVK St. IIb zu pAVK St. IV in den frischen Proben ($p=0,0293$), konnte dieser Effekt in den kryokonservierten Proben nicht beobachtet werden

Statistik: unpaired t-Test mit Mann-Whitney Test

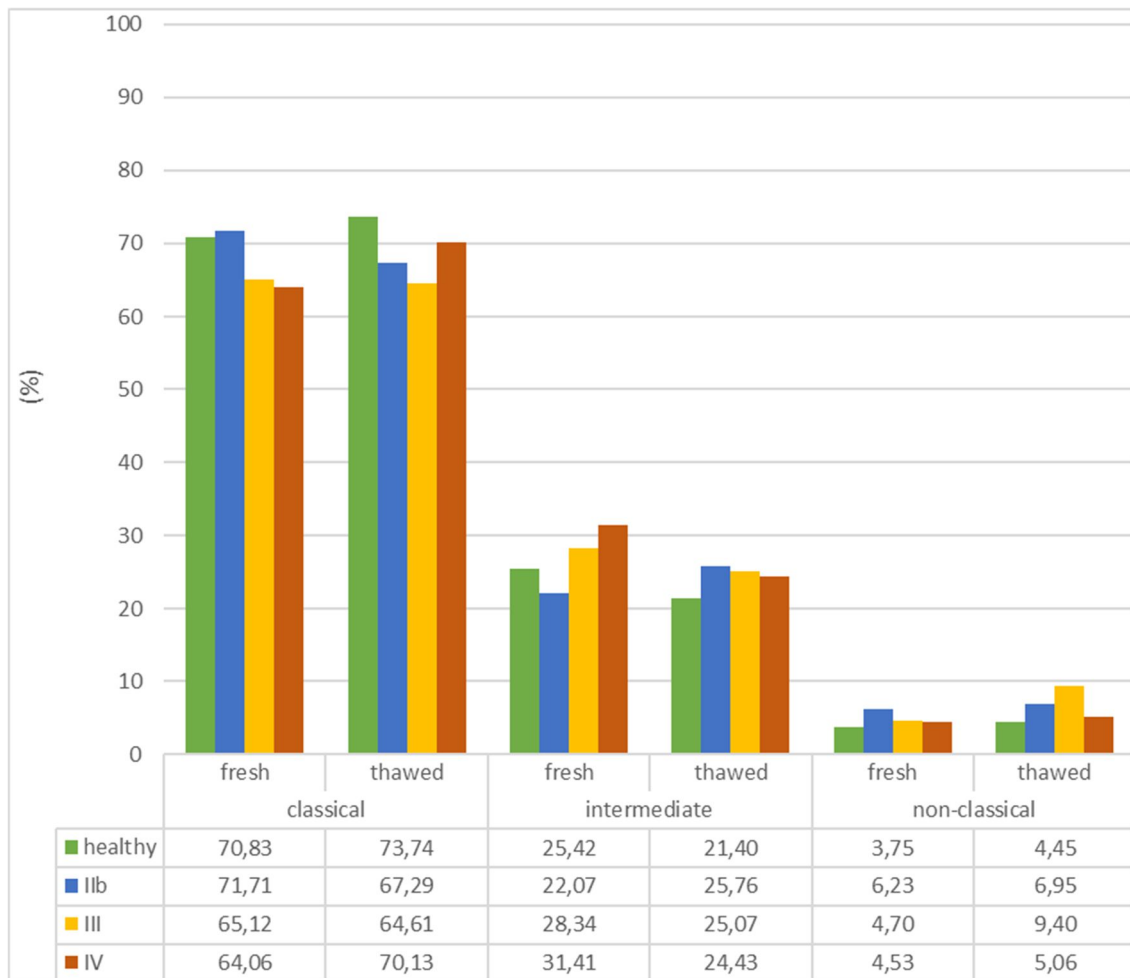


Abbildung 25. Monozyten-Subtypen bei pAVK und bei Gesunden in frischen und in kryokonservierten Proben

Die Grafik zeigt die ermittelten Anteile der drei Monozyten-Subtypen bei n=66 Patienten (Stadium IIb n=23 frischen und n=12 kryokonservierten Proben, Stadium III n=19 frischen und n=15 kryokonservierten Proben, Stadium IV n=23 frischen und n=17 kryokonservierten Proben), sowie von gesunden Probanden (n=10 frischen und n=10 kryokonservierten Proben).

Es zeigt sich eine Tendenz zur Abnahme der klassischen, zugunsten von intermediären Monozyten mit Progression der pAVK zum Stadium IV, wobei dieser Effekt am ehesten in den frischen Proben zu verzeichnen ist. Der Anteil an nicht-klassischen Monozyten ist im Stadium IIb nach Fontaine am höchsten.

4.8 Expression von CD163 auf Monozyten-Subtypen

Wir beobachteten, dass die Fluoreszenzintensität von CD163 bei klassischen und intermediären Monozyten am höchsten und bei nicht-klassischen Monozyten am niedrigsten war (Abb.26).

Die Signalintensität von CD163 war bei den Probanden ohne pAVK am höchsten und verringerte sich nach dem Auftauen der Proben am stärksten bei pAVK im Stadium IIb (Abb.27).

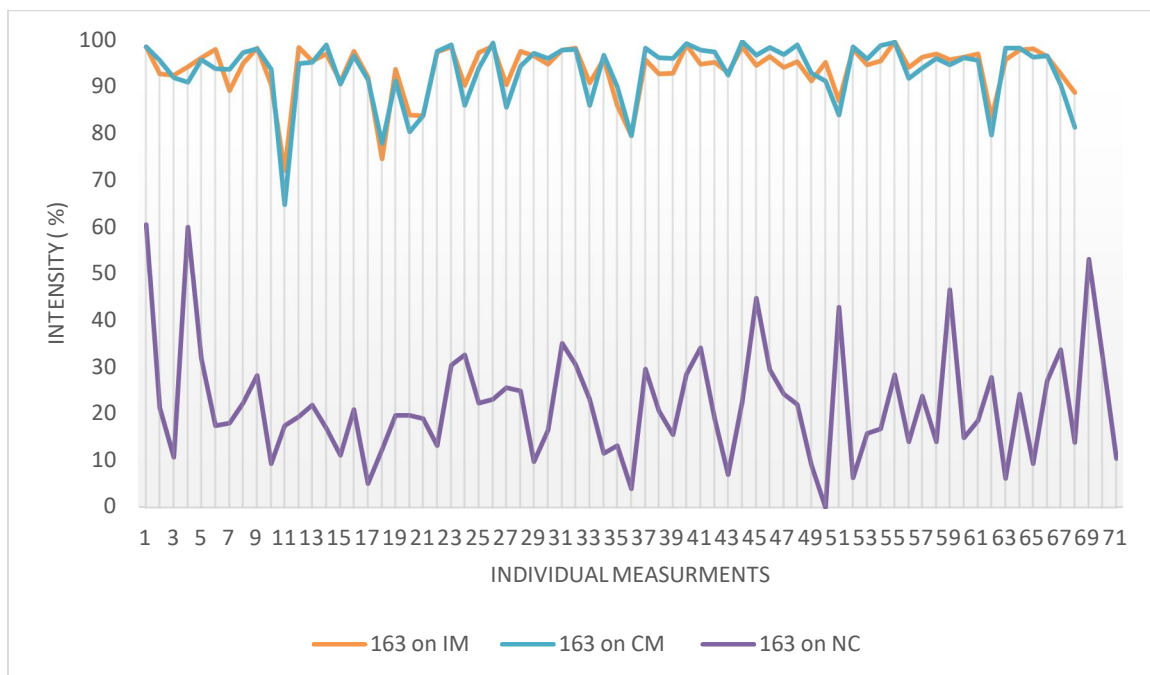
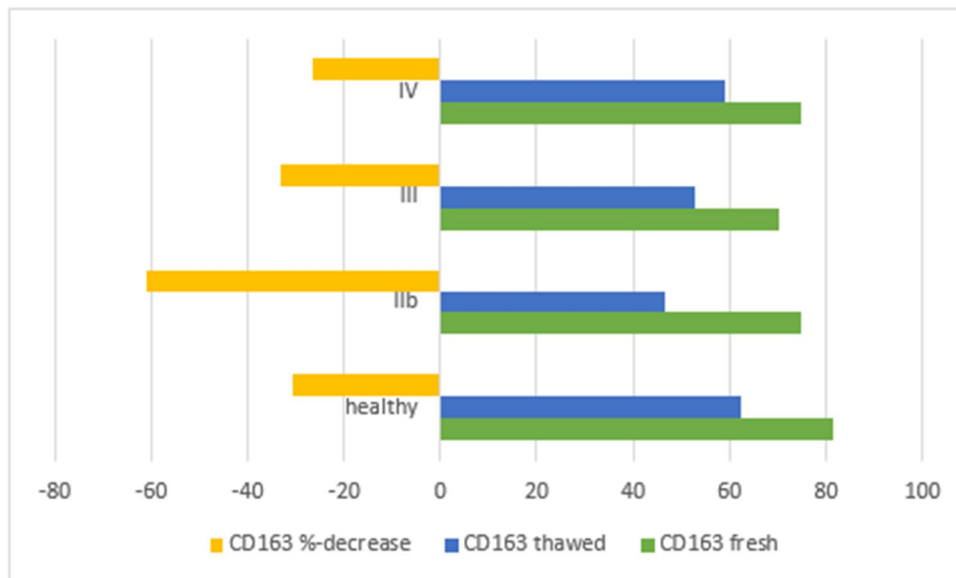


Abbildung 26. Intensität des CD163-Signals auf Monozytensubtypen

Abkürzungen: CM = classical monocytes IM= intermediate monocytes

NC= non-classical monocytes

Die Intensität des gemessenen Signals an CD163 ist in Prozent angegeben, als Anteil der Ereignisse, die im Histogramm zu einem positiven Ergebnis zählen. Die Intensität des CD163-Signals blieb in allen frisch isolierten Blutproben (pAVK und gesund) auf klassischen und intermediären Monozyten hoch und deutlich niedriger auf nicht-klassischen Monozyten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Intensität der CD163-Expression zwischen klassische und intermediäre Monozyten (Mann-Whitney-Test).



CD163			
	fresh	thawed	%-decrease
healthy	81,44	62,39	-30,54
IIb	74,91	46,55	-60,92
III	70,33	52,88	-33,01
IV	74,86	59,19	-26,46

Abbildung 27. Unterschiede CD163- Signalverlust zwischen den untersuchten Subpopulationen

Die Intensität des gemessenen Signals an CD163 ist in Prozent angegeben
 Die prozentuale Änderung in den aufgetauten Proben im Vergleich zu den frischen Proben wurde mit Excel berechnet. Die größte Verringerung des CD163-Signals bei kryokonservierten Proben ist bei Patienten mit pAVK St. IIb zu verzeichnen.

4.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Bei der untersuchten Population von Patienten mit pAVK zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der intermediären Monozyten mit Progression der Erkrankung von Stadium IIb zu Stadium IV.
2. Keine der Monozyten-Untergruppen (klassisch, intermediär, nicht-klassisch) zeigte statistisch signifikanten prozentualen Unterschied bei pAVK-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen.
3. Die Intensität des gemessenen CD14- und CD16-Signal von kryokonservierten Monozyten unterschied sich nicht signifikant von den frisch angefärbten Zellen derselben Probanden. Die Kryokonservierung hatte jedoch einen signifikanten Einfluss auf den Erhalt von PBMC und Monozyten.
4. Die Kryokonservierung hatte einen Einfluss auf die Bestimmung der CD163-Expression auf Monozyten. Das gemessene CD163-Signal verringerte sich signifikant nach dem Auftauen der Proben.
5. Die CD163 Expression zeigte sich hoch auf intermediären und klassischen Monozyten und niedrig auf nicht-klassischen Monozyten.
6. Die Zellisolationmethode- und das Medium haben einen Einfluss auf die Bestimmung von Monozytenparametern. Die Auswahl an Zellmedium und Antikoagulans zeigte einen Einfluss auf die Vitalität von PBMC und auf die Bestimmung von Monozyten-Subtypen.
7. Von den untersuchten klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren zeigte sich lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen HbA1c Wert und Monozyten-Subtypen. Der Anteil an intermediären Monozyten nahm mit steigendem HbA1c-Wert zu, während sich die Anteile sowohl an klassischen als auch an nicht-klassischen Monozyten verringerten.

5 Diskussion

In den frisch isolierten Proben war, in Kongruenz mit den von Wildgruber et al.(102) publizierten Ergebnissen, ein signifikanter Anstieg des Anteils intermediärer Monozyten während des Progress der Erkrankung von pAVK IIb zu pAVK IV zu verzeichnen (Abb.23). Anhand der kleinen Probanden Zahl zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Monozytensubtypen-Verteilung zwischen den Probanden ohne pAVK und den Patienten. Auffällig ist, dass innerhalb der pAVK-Gruppen eine hohe Streuung der Ergebnisse bestand, was möglicherweise mit dem unterschiedlichen Aktivierungszustand der Monozyten und entsprechend Krankheitsaktivität zusammenhängen kann, wie dies am Beispiel der rheumatoiden Arthritis gezeigt werden konnte (120). Eine pAVK im Stadium IIb kann von gut kompensiert mit chronischen Beschwerden bis hin zu kurz vor Übergang zu Stadium III variieren und ein Stadium III kann ebenso chronisch oder akut exazerbiert sein. Der Anstieg des Anteils an intermediären Monozyten von Stadium IIb zum Stadium IV weist möglicherweise auf einen stärker aktivierten Zustand der Monozyten hin, in dem klassische Monozyten schneller zur intermediären „reifen“, um antigenpräsentierenden Funktionen zu erfüllen und Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren. Bei der rheumatoiden Arthritis wurde eine solche erhöhten Aktivität des CD16-Rezeptors durch IL-10 induziert (120). Weitere Forschung ist erforderlich, um die Mechanismen zu analysieren, durch die intermediären Monozyten zum Fortschreiten der Atherosklerose bei pAVK beitragen könnten, und ob das Targeting dieser Zellen eine potentielle therapeutische Strategie für pAVK sein könnte.

Das zweite Kernziel dieser Arbeit war, zu zeigen, ob die Kryokonservierung vor allem die Monozyten-Subtypen-Charakterisierung, bezogen auf die drei Subtypen: klassisch, intermediär und nicht-klassisch beeinflusst. Unseres Wissens nach, wurde diese Fragestellung in der bisherigen publizierten Literatur nicht behandelt.

Die Kryokonservierung ist eine weit verbreitete Methode zur Langzeitlagerung von biologischem Material, einschließlich peripherer Blutzellen und ein großer Teil der Daten über Monozyten stammen aus kryokonservierten Proben (94, 102). Gleichzeitig ist bekannt, dass die Kryokonservierung rein physikalisch große Auswirkungen auf die Zelle hat (121). Deshalb war ein wichtiges Ziel, zu untersuchen, ob die Ergebnisse zwischen eingefrorenen und frischen Proben vergleichbar sind, und ob die bisherigen

Erkenntnisse aus der genannten pAVK-Studie von Wildgruber et al.(102), bei der nur kryokonserviertes Blut untersucht wurde, auf die Patientenpopulation an unserer Klinik, nach Analyse frisch isolierter Blutproben, reproduzierbar sind.

Die Expression der zwei von uns verwendeten Monozyten- definierenden Rezeptoren, CD14 und CD16 blieb nach dem Auftauen der Proben stabil (Abb.17).

Der CD16 Rezeptor gilt als niedrig affiner und als für in vitro-Zell Kulturen instabiler Rezeptor (122). Frühere Studien haben eine höhere CD16-Rezeptor-Intensität auf frisch angefärbten im Vergleich zu kryokonservierten Monozyten gezeigt (123). Unsere Ergebnisse zeigten eine geringe, statistisch nicht signifikante Verringerung des CD16-Signals bei Probanden ohne pAVK und bei Patienten mit pAVK St. IV und eine konstante CD16-Expression bei pAVK-PatientInnen im Stadium IIb und III (Abb.18).

Eine Studie liefert Hinweise dafür, dass die CD14-Expression auf Monozyten bei Abwesenheit von inflammatorischen Stimuli signifikant reduziert wird (124). Anstatt eine Reduktion des CD14-Signals nach Auftauen, konnten wir eine höhere Intensität bei kryokonservierten Proben nachweisen. Diese Änderung war ebenso nicht statistisch signifikant (Abb.18).

Trotz der im Rahmen der Messungenauigkeit konstanten Expression von CD14 und CD16 erhielten wir leicht unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf das Subtypen-Verteilungsmuster zwischen frischen und kryokonservierten Proben: In den frischen Proben wurde eine Abnahme des Anteils an klassischen, zugunsten von intermediären Monozyten mit Progression der pAVK zum Stadium IV gemessen, während in der kryokonservierten Proben dieses Muster nicht erkennbar war (Abb.25).

Die Änderung der Monozytenexpressionsmarker durch die Kryokonservierung könnte somit, abhängig von der Größe der untersuchten Population, eine Auswirkung auf die Forschungsergebnisse in Studien haben, die das Verteilungsmuster von Monozyten-Subtypen untersuchen.

Die Auswirkung der Kryokonservierung auf die Bestimmung der Monozytenzahl und -anteile war eindeutig (statistische Signifikanz $P < 0,0001$). Die mittlere Monozytenzahl aus gepaarten Proben betrug in frisch isolierten PBMC $2,69E+06$ ($SD \pm 2,55E+06$) Zellen, während kryokonservierte PBMC eine mittlere Monozytenzahl von $9,24E+05$ ($SD \pm 7,15E+05$) Zellen aufwiesen (Abb.16).

Die Ergebnisse implizieren, dass die Kryokonservierung von PBMC zu einem signifikant geringeren Erhalt von Monozyten führen kann und dadurch ein Einfluss auf Anzahl und prozentuale Verteilung der Monozyten innerhalb der Zellpopulation der PBMC besitzt.

Die Untersuchung des Einflusses der Kryokonservierung auf die gesamten Zellpopulation ergab bezogen auf die Vitalität kryokonservierter PBMC in dieser Analyse 81,6% (Abb.14), dabei konnte eine signifikante Reduktion im Vergleich zu frisch isolierten PBMC dargestellt werden, was in Übereinstimmung mit bisherigen Daten steht (125). Die signifikante und uneinheitliche Veränderung der Monozyten-Anteile an den Gesamtleukozyten (Erhöhung bei Gesunden und pAVK IV, Verminderung bei pAVK IIb und III) bei kryokonservierten Proben (Abb.22) zeigt jedoch, dass der Kryokonservierungsprozess eine wesentliche Auswirkung auf die Zusammensetzung von PBMC haben könnte.

Mehrere Faktoren können zu diesem Effekt beitragen. Der Gefrier-Tau-Prozess verursacht bekannterweise Zellschäden durch Dehydrierung, osmotisches Ungleichgewicht und Membranschäden (121). Es ist bekannt, dass bestimmte Zellpopulationen anfälliger für diese Veränderungen sind und spezielle Zusätze und Kühlraten beim Einfrieren erfordern, um ihre Lebensfähigkeit und Funktion aufrechtzuerhalten (126). Desweiteren haben PBMC und Vollblut- Proben unterschiedliche Apoptoserate, abhängig von Gefriermedium- und Temperatur (127). Da PBMCs eine heterogene Mischung aus T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen (NK), Monozyten und dendritische Zellen darstellen, stellt sich die Frage, ob die Kryokonservierung den Anteil dieser verschiedenen Immunzelltypen ungleichermaßen reduziert. Einige Studien berichten, dass der Prozentsatz der T-Zellen in PBMCs durch Kryokonservierung nicht beeinflusst wird (128, 129), während der Prozentsatz der B-Zellen verringert werden kann (125). Andere Studien zeigen kontroverse Ergebnisse, die Lebensfähigkeit von eingefrorenen T-Zellen ist dabei maßgeblich von ihrem Phänotyp abhängig (130). Über NK-Zellen und Monozyten gibt es Evidenz, dass diese als adhärenente Zellen durch die Manipulation und Kryokonservierung stärker beeinträchtigt sind, als andere Immunzellen, aber diese Effekte wurden ebenso als dynamisch und uneinheitlich beschrieben (131, 132). Die meisten bisherigen Studien zu Auswirkung der Kryokonservierung auf die Isolation von Monozyten haben sich jedoch mit den funktionellen Eigenschaften von eingefrorenen Monozyten beschäftigt und haben gezeigt, dass die Aktivierungsfähigkeit auf verschiedene Stimuli und die chemotaktischen Eigenschaften nach dem Auftauen erhalten bleiben, so dass aus eingefrorenen Proben gewonnene Monozyten als geeignet für funktionelle Assays gelten (133, 134).

Da aber Monozytenzahlen und Monozyten-Anteile selbst als wichtige prognostische Biomarker für kardiovaskuläre Ereignisse gelten (77), sollten diese Werte zuverlässig,

mit geringen methodischen Bias, bestimmt werden.

Das von uns als Kryoprotektant verwendete DMSO (Dimethylsulfoxid) gilt als Goldstandard-Gefrierschutzmittel für die Kryokonservierung von Zellen und ist dafür bekannt, die Bildung von Eiskristallen zu reduzieren, die zu Zellschäden führen können; kann jedoch trotz seiner Vorteile für die Zellen schädlich sein (135). Trotz maximal standardisiertem Gefrier-Tau-Protokoll, Lagerbedingungen, sowie verwendeten Antikörpern und Durchflusszytometer-Einstellungen, ergab die durchflusszytometrische Analyse unterschiedliche Veränderung der Monozyten-Anteile an Gesamtleukozyten in frischen und kryokonservierten Proben. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die für die Beobachtung verantwortlich sind, dass sich die Monozyten-Anteile von PBMC in den Proben von Gesunden und von pAVK St. IV erhöhten, während sich diese im St. IIb und St. III. verringerten (Abb.22), lassen sich nicht eruieren. Wir vermuten, dass dieser Effekt am Ehesten auf die unterschiedliche Zellzahlreduktion verschiedener Zelltypen des PBMC-Gemisches zurückzuführen ist. Es ist unklar, ob funktionelle Eigenschaften, wie Aktivierungsstatus der Monozyten von Patienten mit pAVK im Stadium IIb und III dazu beigetragen haben. Aufgrund der beobachteten Effekte der Kryokonservierung postulieren wir, dass der signifikante Zellverlust nach dem Auftauen von PBMC in unterschiedlichem Ausmaß ebenso das Monozytenverteilungsmuster beeinflussen könnte.

Der Anstieg sowohl absoluter Monozytenzahlen als auch der Monozyten Anteile an Gesamtleukozyten bei pAVK-Patienten im Vergleich zu Gesunden in den frisch isolierten Proben konnte mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden (Abb.20 und 21), so dass die Bedeutung von Monozytenzahlen und Anteilen als Surrogat-Parameter für kardiovaskuläre Erkrankungen in Übereinstimmung mit der bisherigen Literatur anhand von frisch isolierten Proben bestätigt wurde (78). Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren insbesondere die Monozytenzahlen von pAVK-Patienten im Stadium III, welches die kritische Ischämie entspricht, erhöht. Dieses Ergebnis spiegelt die Beobachtungen aus früheren Studien wider (136).

Der Anstieg der Monozytenzahlen bei pAVK-Patienten impliziert, dass Monozyten mutmaßlich zur Pathogenese und Fortschreiten der pAVK beitragen könnten. Es ist bekannt, dass Monozyten aus dem Knochenmark – und Milzreservoir rekrutiert werden und ihre Funktion sowohl im Blut als auch als Modifikatoren der Markophagen Zusammensetzung eines gegebenen Gewebes entfalten (137, 138). Es liegt somit nahe, dass sie den akuten Bedarf des geschädigten Endothels bei pAVK regulieren.

Das erste sekundäre Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Expression des die Inflammation beeinflussenden Rezeptors CD163. Frühere Studien haben gezeigt, dass CD163 als Reaktion auf Entzündungen hochreguliert wird und eine Rolle bei der Dämpfung der Immunantwort spielt (139, 140). Unsere Untersuchungen zeigten eine hohe Expression des CD163-Rezeptors sowohl bei pAVK-Patienten, unabhängig vom Stadium, als auch bei den Probanden ohne pAVK. Bei den gesunden Probanden war die gemessene Intensität des CD163-Signals am höchsten (Abb.27).

Die Intensität des CD163-Rezeptors war hoch bei klassischen und intermediären Monozyten, ohne signifikante Unterschiede, und niedrig bei den nicht-klassischen Monozyten (Abb.26).

Die unterschiedliche Fluoreszenzintensität von CD163 auf klassischen und intermediären Monozyten verglichen mit nicht-klassischen Monozyten widerspiegelt in unserer Arbeit am ehesten die funktionellen Unterschiede zwischen den verschiedenen Monozyten-Subpopulationen. Der CD163 Rezeptor hat die Funktion der Beseitigung von Haptoglobin-Hämoglobin-Komplexe aus dem Blutstrom und die hohe Expression dieses Rezeptors auf klassischen und intermediären Monozyten kann mit ihrer Rolle bei der Verhinderung von oxidativen Endothelschäden zusammenhängen. Nicht-klassische Monozyten sind möglicherweise an dieser Funktion nicht beteiligt. Da die CD163-Expression auf klassischen und intermediären Monozyten von Probanden ohne pAVK ebenso hoch war, kann die hohe Expression von CD163 auf klassischen und intermediären Monozyten mit ihrer physiologischen Funktion für Clearance von Haptoglobin-Hämoglobin-Komplexe zusammenhängen und nicht nur bei akuter Inflammation vorliegen.

Die deutliche Abnahme des CD163-Signals bei allen Proben nach dem Auftauen zeigt, dass die Kryokonservierung möglicherweise nicht geeignet ist, um funktionelle Assays mit dem CD163-Rezeptor durchzuführen.

Unser zweites sekundäre Ziel bestand darin, die Isolation von Monozyten aus PBMC und aus Vollblut zu vergleichen, um einen weiteren Einfluss der Isolationsmethode auf die Bestimmung von Monozytenparametern zu überprüfen.

Bisherige Studien implizieren, dass die Wahl der Monozyten-Isolationsmethode erheblich die Ausbeute, die Reinheit und den resultierenden Phänotyp beeinflussen kann (141, 142). Das Heparin-Natrium Antikoagulans zeigte sich als zuverlässigster Antikoagulans für die Quantifizierung der Oberflächenexpression von CD14 (142), gilt

jedoch nicht als Goldstandard. In vielen Studien wird EDTA als bevorzugtes Antikoagulans verwendet und die Isolation von Monozyten wird meist aus Vollblutproben durchgeführt (143, 144). Die Vollblutprobenanalyse wird bevorzugt aufgrund der Schnelligkeit des Verfahrens und der minimalen ex-vivo-Manipulation, wodurch das Potential für aktivierungsbedingte Veränderungen und Stressreaktionen in den Zellen verringert wird. Außerdem ermöglicht die Analyse der Zelluntergruppen direkt aus Vollblut bessere Erhaltung der zellulären Interaktionen und des physiologischen Kontexts. Andererseits ist die Komplexität der Zellmischung größer und erfordert geeignete Gating- und Fluoreszenzkompressionsstrategien, um das Hintergrundrauschen und die spektrale Überlappung zu überwinden. Die unspezifische Antikörperbindung im Vollblut kann die genauere Identifizierung der Monozyten beeinflussen(138). In unserer Forschungsarbeit wählten wir die PBMC-Isolationemethode aufgrund der höheren Zellausbeute und Anreicherung von mononukleären Zellen, damit die Charakterisierung der Monozyten-Untergruppen innerhalb der mononukleären Zellfraktion erleichtert wird. Mit dem von uns etablierten PBMC-Isolationsprotokoll, welches sich an standardisierte Protokolle orientiert, konnten wir eine große Anzahl von Zellen isolieren und prinzipiell ausreichend Material (Zellen und Plasma) für zukünftige experimentelle Fragestellungen gewinnen. Die Konsistenz und Reproduzierbarkeit des Protokolls bestätigte sich durch seine Anwendung mit verschiedenen Antikoagulanzen (Abb.12). Die Ausbeute von Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Medien nach Isolation aus PBMC. Nach Isolation aus Vollblut war eine größere Variation der Ergebnisse zu verzeichnen: die Kompatibilität von Vollblut und Heparin zeigte sich niedriger in Bezug auf den Erhalt der Zellvitalität als der von Vollblut und EDTA. Wir untersuchen ebenso die Auswirkung der Antikoagulantien und der Isolationsmethode auf die Bestimmung des intermediären Monozyten-Anteil. Hierbei unterscheiden sich Vollblut und PBMC nur gering, während das EDTA-Medium bei beiden Isolationsmethoden zu dem Ergebnis eines höheren Anteiles an intermediären Monozyten führte, verglichen mit Heparin-Na und Citrat (Abb.13). Diese Beobachtung zeigt, dass die Wahl der Antikoagulantien, durch die Beeinflussung der Lebensfähigkeit, Aktivierung oder Expression von Oberflächenmarker, eine Auswirkung auf die Bestimmung vom Monozyten-Untergruppen haben könnte. Untersuchungen zu den spezifischen Auswirkungen jedes Antikoagulans während der Isolierung von Monozyten, beispielsweise durch die Bestimmung der Intensität von Oberflächenmarker, könnten weitere Erkenntnisse liefern. Die Untersuchungen wurden im Rahmen dieses Projektes nicht weiter vertieft.

Das Experiment, Monozyten, 10 Stunden nach der Blutabnahme zu charakterisieren (Abb.10) zeigte, dass sich Monozyten als adhärenente Zellen verhalten und deren Bestimmung signifikant von der Zellisolationmethode und Lagerung abhängig ist.

Das dritte sekundäre Ziel des Projektes bestand in der Ermittlung der Korrelation zwischen Monozytenzahlen und Subtypen-Anteile und patientenspezifische Risikofaktoren wie Nikotinkonsum, gemessen in pack years, Lipidwerte und HbA1c. Die Nikotinexposition wurde in bisherigen Studien mit einem Anstieg zirkulierender Monozyten in Verbindung gebracht (145, 146). Es konnten, durch E-Zigaretten induzierte Atherosklerose-fördernde funktionelle Veränderungen auf klassische Monozyten beobachtet werden (147). In unserer Population zeigte sich eine Tendenz zum Anstieg des Anteils an intermediären Monozyten und Verringerung des Anteils an nicht-klassischen Monozyten bei Patienten mit besonders hoher Anzahl an pack years. Dieses Phänomen könnte auf das Ungleichgewicht zwischen entzündungsfördernde und entzündungshemmende Monozyten-Antworten bei Rauchern hindeuten. Die Korrelation war jedoch nicht statistisch signifikant.

Wir konnten eine positive Korrelation zwischen den proinflammatorischen intermediären Monozyten und höhere HbA1c-Werte zeigen (Abb.11). Es ist unklar, ob die erhöhten HbA1c-Spiegel, als Ausdruck von schlechterer Glukosekontrolle, per se im Rahmen der low-grade Inflammation durch den gestörten Glukosestoffwechsel zum erhöhten inflammatorischen Monozyten-Phänotyp beitragen, oder ob ein direkter Zusammenhang zwischen pAVK-triggernde Monozyten und HbA1c-Werte vorliegt. Der Anteil an klassischen Monozyten war höher bei den Probanden mit höheren Cholesterin- und LDL-Spiegel, während der Anteil an intermediären Monozyten mit steigenden Cholesterin- und LDL-Werte abnehmende Tendenz zeigte. Der Anteil an intermediäre Monozyten nahm bei höherem HDL-Spiegel ab, was die modulatorische Auswirkung von einem optimierten Lipid-Profil auf das Gleichgewicht der Monozyten-Untergruppen hindeutet. Diese inverse Korrelation zwischen inflammatorischen Monozyten und HDL-Werten wurde in mehreren Studien bereits beschrieben (148, 149).

Diese Zusammenhänge waren in unseren Untersuchungen jedoch nur angedeutet und nicht von statistischer Signifikanz.

Limitationen der Arbeit:

1. Subjektivität beim Gating:

Aufgrund der nicht standardisierten Grenzfestlegung zwischen den Populationen von klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten in durchflusszytometrischen Untersuchungen, musste mit Hilfe einer ungefärbten Kontrolle eine möglichst unvoreingenommene Grenze zwischen den Monozytensubtypen festgelegt werden. Die daraus folgende manuelle Grenzfestlegung macht es realistisch, dass Abweichungen zwischen mehreren Analysten zustande kommen. Solche Abweichungen sind durch die Auswertung durch nur einen Analysten minimiert.

2. Eingeschränkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse studienübergreifend:

Wir verwendeten keine zusätzlichen Marker für den Ausschluss von nicht-Monozytären Populationen in der CD14-CD16-Zellpopulation. Unsere Gating-Strategie richtet sich nur an der Definition der Subtypen anhand der Expression von CD14 und CD16. Weitere Differenzierungsmarker werden aktuell nicht vorgeschrieben und bleiben deshalb eine Entscheidung der jeweiligen Arbeitsgruppe (150).

Dennoch ist es bekannt, dass die Verwendung von weiteren monozytären und nicht monozytären Markern zur wesentlich besseren Unterscheidung der Subpopulationen beitragen kann (151). Von anderen Autoren wurden beispielsweise ergänzend die Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1, von denen häufig berichtet wurde, dass sie unterschiedliche Verbindungen zu Monozyten-Untergruppen aufweisen, ergänzend für das Gating verwendet (95, 103). Alternativ werden von verschiedenen Arbeitsgruppen die Monozyten- und Makrophagenspezifische Fc-Rezeptor CD64 oder das HLA-DR-Rezeptor (91, 123) zur Unterscheidung zwischen Monozyten und dendritischen Zellen oder CD16-positive NK-Zellen verwendet. In manchen Studien werden die nicht-klassischen Monozyten zusätzlich anhand der Expression von 6-sulfo LacNAc (SLAN) charakterisiert (150). Eine im Jahr 2019 publizierte Studie verglich die in verschiedenen Gating-Strategien verwendeten Marker in Bezug auf ihre Bedeutung und Reproduzierbarkeit für die Unterscheidung der drei Monozytensubtypen. Nach Ausschluss von unspezifischen, schwach exprimierten oder nicht-Mehrwert-bringende Marker schlug die Arbeitsgruppe die Verwendung von 3 zusätzlichen Marker CD64, CD86 und CD33 zum Ausschluss von nicht-Monozyten vor (122). Andere Autoren fanden jedoch, dass der CD33 Marker, welcher die Zugehörigkeit zu der myeloischen Zellreihe bezeichnet, nicht geeignet ist, um zwischen Monozyten und dendritischen

Zellen im Blut zu unterscheiden (150). Das kostimulatorische Molekül CD86 hat möglicherweise ein Zusammenhang mit dem Aktivierungsstatus von Monozyten (143), ist bisher jedoch für die Unterscheidung einer bestimmten Monozyten-Untergruppe nicht etabliert. Das Fehlen von klaren Vorschriften für die Identifizierung der Monozyten-Untergruppen gibt somit eine gewisse Forschungsfreiheit und kann gleichzeitig prinzipiell mit Bias behaftet sein. Da wir nur die klassischen Monozytenmarker verwendet haben, wäre eine korrektere Bezeichnung der definierten Zellen „Monozyten-ähnliche“ Zellen.

3. Variabilität der Ergebnisse:

Bei der kleinen untersuchten Stichprobe können individuelle Variationen innerhalb der Gruppe einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Um diese Bias zu minimieren, erfolgte eine sorgfältige Berücksichtigung des klinischen Settings der Patienten, die Ein- und Ausschlusskriterien wurden streng befolgt. Aufgrund des mehrfach beschriebenen Phänomen einer Erhöhung der inflammatorischen Monozyten-Fraktion bei Patienten mit reduzierter Nierenfunktion (152), wurden, obwohl initial nicht als Ausschlusskriterium aufgenommen, nur Patienten mit normaler Nierenfunktion in der Analyse aufgenommen.

Unsere Studie weist im Vergleich zur Studie von Wildgruber et al. (102) eine geringere Probandenzahl auf. Allerdings ist zu beachten, dass in unserer Studie der Einschluss gleichmäßiger Anzahl an Probanden in den verschiedenen Gruppen erfolgte, während in der Vergleichsstudie eine erhebliche Variabilität in der Probandenzahl innerhalb der Gruppen vorliegt.

Desweiteren ist anzumerken, dass unsere Studie eine begrenzte Anzahl an gesunden Probanden einschloss. Es ist eine Herausforderung, ausreichend große Anzahl an gesunden gleichaltrigen Probanden zu rekrutieren. Dennoch konnten wir, trotz dieser Einschränkung, eine Gruppe von gesunden Probanden erfolgreich einbeziehen, was in der Vergleichsstudie nicht der Fall war.

Zusammenfassend ermöglichte uns diese Forschungsarbeit, erste Erfahrungen in der experimentellen Untersuchung von Monozytenparameter in kardiovaskulären Erkrankungen zu gewinnen. Angesichts des zunehmenden Interesses an der Funktion und dem Verhalten von Monozyten, ist es wichtig, ein klares Verständnis darüber zu haben, wie unterschiedliche Protokolle und technische Hintergründe diesen stark heterogenen Zelltyp ex vivo verändern können und wie unterschiedliche Analysestrategien die Ergebnisse beeinflussen können.

6 Zusammenfassung

Die Bedeutung der Monozytenzahlen und Subpopulationen bei Atherosklerose in den Beinarterien ist wenig erforscht. In dieser Studie wurden Blutproben von pAVK-Patienten und gesunden Spendern untersucht. Monozyten wurden aus PBMC isoliert, ein Teil wurden kryokonserviert. Hauptziel war, die Verteilung der Monozyten-Subtypen in verschiedenen pAVK-Stadien und im Vergleich zu Gesunden zu bestimmen. Wir konnten die Daten von Wildgruber et al. (102) bestätigen, welche gezeigt haben, dass der Anteil an intermediären Monozyten mit Progression der pAVK steigt. In der Patientenpopulation zeigte sich ein signifikanter Anstieg des intermediären Subtyps von pAVK im St. IIb zu pAVK im St. IV. Jedoch unterschieden sich die Verteilungsmuster nicht signifikant zwischen Patienten und Gesunden, möglicherweise aufgrund geringer Probandenzahl. Als zweites Hauptziel galt, zu überprüfen, ob die Kryokonservierung eine Auswirkung auf die Bestimmung von Monozytenzahlen und Subtypen hat. Die CD14 und CD16 Signale wurden wenig verändert, jedoch war die Identifizierung der Subtypen beeinflusst. Der Anstieg des intermediären Subtyps konnte in den aufgetauten Proben nicht mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden. In den kryokonservierten Proben konnten wir außerdem keinen signifikanten Anstieg des Monozyten-Anteils bei pAVK-Patienten im Vergleich zu Gesunden feststellen, was in den frischen Proben, in Übereinstimmung mit der bisherigen Literatur (94, 153), der Fall war. Diese Effekte erklären wir mit der ungleichmäßigen Zellverlust von verschiedenen Zellpopulationen des PBMC-Gemisches während des Gefrier-Tau-Prozesses.

Als Sekundärziel wurde die Expression des entzündungshemmenden Rezeptors CD163 untersucht. Es zeigte sich hohe Expression bei pAVK-Patienten und gesunden Probanden. Die Intensität war bei klassischen und intermediären Monozyten hoch, niedrig bei nicht-klassischen. Diese Unterschiede könnten funktionelle Unterschiede zwischen den Monozyten-Subpopulationen widerspiegeln.

Die Abnahme des CD163-Signals nach dem Auftauen deutet darauf hin, dass die Kryokonservierung möglicherweise nicht für funktionelle Assays mit diesem Rezeptor geeignet ist. Weiteres Ziel war der Vergleich der Monozytenisolationmethoden aus PBMC und Vollblut, um deren Einfluss auf die Monozytenparameter zu prüfen. Die Konsistenz des PBMC-Isolationsprotokolls wurde bestätigt. Unterschiede zeigten sich in der Zellvitalität und der intermediären Monozyten-Anteil je nach Antikoagulans. Die Wahl des Antikoagulans könnte die Bestimmung der Monozyten-Untergruppen beeinflussen.

7 Abstract

The significance of monocyte counts and subpopulations in peripheral artery disease (PAD) remains understudied. This study examined blood samples from PAD patients and healthy donors, isolating monocytes from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). One part of the cells was freshly isolated, whereas the rest of them were cryopreserved using a standardized approach. The primary aim was to determine the distribution of monocyte subtypes across different PAD stages and in comparison to healthy individuals. Consistent with published literature (102), we observed a significant increase in the percentage of intermediate monocytes subtype with the progression of PAD from stage IIb to stage IV. However, distribution patterns did not significantly differ between patients and healthy individuals, possibly due to limited sample size. A secondary goal was to assess the impact of cryopreservation on monocyte counts and subtypes. While CD14 and CD16 signals remained largely unchanged, subtype identification was affected. The increase in intermediate subtype was not statistically significant in thawed samples. Additionally, no significant increase in monocyte proportion was observed in cryopreserved samples from PAD patients compared to healthy controls, contrary to fresh samples and existing literature (94, 153). These effects are possibly attributed to uneven cell loss of different cell populations of the PBMC mixture during the freeze-thaw process. As a secondary objective, we investigated the expression of the anti-inflammatory receptor CD163. High expression was observed in both PAD patients and healthy donors, particularly in classical and intermediate monocytes, and lower in non-classical monocytes. This disparity may reflect functional differences among monocyte subpopulations. The decrease in CD163 signal post-thaw suggests cryopreservation may not be suitable for functional assays involving this receptor. Further, we compared monocyte isolation methods from PBMCs and whole blood to assess their impact on monocyte parameters. The consistency of the PBMC isolation protocol was confirmed. Variations in cell viability and intermediate monocyte proportion were observed depending on the anticoagulant used, potentially influencing subtype determination.

8 Literaturverzeichnis

1. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-66.
2. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circulation Research*. 2019;124(2):315-27.
3. Jayasinghe UW, Harris MF, Parker SM, Litt J, van Driel M, Mazza D, et al. The impact of health literacy and life style risk factors on health-related quality of life of Australian patients. *Health Qual Life Outcomes*. 2016;14:68.
4. Hamad R, Penko J, Kazi DS, Coxson P, Guzman D, Wei PC, et al. Association of Low Socioeconomic Status With Premature Coronary Heart Disease in US Adults. *JAMA Cardiology*. 2020;5(8):899-908.
5. Mendis S, Abegunde D, Oladapo O, Celletti F, Nordet P. Barriers to management of cardiovascular risk in a low-resource setting using hypertension as an entry point. *Journal of Hypertension*. 2004;22(1):59-64.
6. Clark AM, DesMeules M, Luo W, Duncan AS, Wielgosz A. Socioeconomic status and cardiovascular disease: risks and implications for care. *Nature Reviews Cardiology*. 2009;6(11):712-22.
7. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity 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(9):763-816.
8. Teßarek J, Oberhuber A. [Innovations in the endovascular treatment of peripheral arterial disease]. *Gefasschirurgie*. 2021;26(5):347-58.
9. Beckman JA, Schneider PA, Conte MS. Advances in Revascularization for Peripheral Artery Disease: Revascularization in PAD. *Circ Res*. 2021;128(12):1885-912.
10. Vidakovic R, Schouten O, Kuiper R, Hoeks SE, Flu WJ, van Kuijk JP, et al. The prevalence of polyvascular disease in patients referred for peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009;38(4):435-40.
11. Gutierrez JA, Mulder H, Jones WS, Rockhold FW, Baumgartner I, Berger JS, et al. Polyvascular Disease and Risk of Major Adverse Cardiovascular Events in Peripheral Artery Disease: A Secondary Analysis of the EUCLID Trial. *JAMA Netw Open*. 2018;1(7):e185239.
12. World Health Organisation. Cardiovascular diseases (CVDs) 2021 [Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))].
13. Timmis A, Vardas P, Townsend N, Torbica A, Katus H, De Smedt D, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *European Heart Journal*. 2022;43(8):716-99.
14. Murray CJ, Barber RM, Foreman KJ, Abbasoglu Ozgoren A, Abd-Allah F, Abera SF, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition. *Lancet*. 2015;386(10009):2145-91.
15. Timmis A, Vardas P, Townsend N, Torbica A, Katus H, De Smedt D, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021: Executive Summary. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*. 2022;8(4):377-82.
16. Fowkes FG, Housley E, Riemersma RA, Macintyre CC, Cawood EH, Prescott RJ, et al. Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for

- peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study. *Am J Epidemiol*. 1992;135(4):331-40.
17. Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. ESC guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD - summary. *Diab Vasc Dis Res*. 2014;11(3):133-73.
 18. Joosten MM, Pai JK, Bertoia ML, Rimm EB, Spiegelman D, Mittleman MA, et al. Associations between conventional cardiovascular risk factors and risk of peripheral artery disease in men. *Jama*. 2012;308(16):1660-7.
 19. Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res*. 2015;116(9):1509-26.
 20. Murabito JM, D'Agostino RB, Silbershatz H, Wilson WF. Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1997;96(1):44-9.
 21. Wadström BN, Wulff AB, Pedersen KM, Jensen GB, Nordestgaard BG. Elevated remnant cholesterol increases the risk of peripheral artery disease, myocardial infarction, and ischaemic stroke: a cohort-based study European Heart Journal. 2021;43(34):3258-69.
 22. Smith I, Franks PJ, Greenhalgh RM, Poulter NR, Powell JT. The influence of smoking cessation and hypertriglyceridaemia on the progression of peripheral arterial disease and the onset of critical ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1996;11(4):402-8.
 23. Bonaca MP, Nault P, Giugliano RP, Keech AC, Pineda AL, Kanevsky E, et al. Low-Density Lipoprotein Cholesterol Lowering With Evolocumab and Outcomes in Patients With Peripheral Artery Disease: Insights From the FOURIER Trial (Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition in Subjects With Elevated Risk). *Circulation*. 2018;137(4):338-50.
 24. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, et al. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY GUIDELINES FOR MANAGEMENT OF DYSLIPIDEMIA AND PREVENTION OF CARDIOVASCULAR DISEASE. *Endocr Pract*. 2017;23(Suppl 2):1-87.
 25. Luc G, Bard JM, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, et al. Lipoprotein (a) as a predictor of coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis*. 2002;163(2):377-84.
 26. Gurdasani D, Sjouke B, Tsimikas S, Hovingh GK, Luben RN, Wainwright NW, et al. Lipoprotein(a) and risk of coronary, cerebrovascular, and peripheral artery disease: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(12):3058-65.
 27. Tsimikas S, Witztum JL. The role of oxidized phospholipids in mediating lipoprotein(a) atherogenicity. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(4):369-77.
 28. van der Valk FM, Bekkering S, Kroon J, Yeang C, Van den Bossche J, van Buul JD, et al. Oxidized Phospholipids on Lipoprotein(a) Elicit Arterial Wall Inflammation and an Inflammatory Monocyte Response in Humans. *Circulation*. 2016;134(8):611-24.
 29. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis. *Circ Res*. 2018;123(10):1118-20.
 30. Pradhan AD, Aday AW, Rose LM, Ridker PM. Residual Inflammatory Risk on Treatment With PCSK9 Inhibition and Statin Therapy. *Circulation*. 2018;138(2):141-9.
 31. pAVK SL. https://register.awmf.org/assets/guidelines/065-003I_S3_PAVK_periphere_arterielle_Verschlusskrankheit_2020-05.pdf.
 32. Xu D, Zou L, Xing Y, Hou L, Wei Y, Zhang J, et al. Diagnostic value of ankle-brachial index in peripheral arterial disease: a meta-analysis. *Can J Cardiol*. 2013;29(4):492-8.
 33. Yao ST, Hobbs JT, Irvine WT. Ankle systolic pressure measurements in arterial disease affecting the lower extremities. *Br J Surg*. 1969;56(9):676-9.

34. Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, Barshes NR, Corriere MA, Drachman DE, et al. 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2017;135(12):e726-e79.
35. Agnelli G, Belch JJF, Baumgartner I, Giovass P, Hoffmann U. Morbidity and mortality associated with atherosclerotic peripheral artery disease: A systematic review. *Atherosclerosis*. 2020;293:94-100.
36. Golomb BA, Dang TT, Criqui MH. Peripheral arterial disease: morbidity and mortality implications. *Circulation*. 2006;114(7):688-99.
37. McKenna M, Wolfson S, Kuller L. The ratio of ankle and arm arterial pressure as an independent predictor of mortality. *Atherosclerosis*. 1991;87(2-3):119-28.
38. Papamichael CM, Lekakis JP, Stamatelopoulos KS, Papaioannou TG, Alevizaki MK, Cimponeriu AT, et al. Ankle-brachial index as a predictor of the extent of coronary atherosclerosis and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2000;86(6):615-8.
39. Konstantinov IE, Mejevoi N, Anichkov NM, Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis. *Texas Heart Institute journal*. 2006;33(4):417-23.
40. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WG, Linton EF, Song WL, et al. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. Copyright © 2000-2024, MDText.com, Inc.; 2000.
41. Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(3):509-15.
42. Ungvari Z, Wolin MS, Csiszar A. Mechanosensitive production of reactive oxygen species in endothelial and smooth muscle cells: role in microvascular remodeling? *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(7-8):1121-9.
43. Andican G, Seven A, Uncu M, Cantasdemir M, Numan F, Burçak G. Oxidized LDL and anti-oxLDL antibody levels in peripheral atherosclerotic disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(6):473-8.
44. Loffredo L, Carnevale R, Cangemi R, Angelico F, Augelletti T, Di Santo S, et al. NOX2 up-regulation is associated with artery dysfunction in patients with peripheral artery disease. *Int J Cardiol*. 2013;165(1):184-92.
45. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*. 2011;12(3):204-12.
46. McDermott MM, Guralnik JM, Corsi A, Albay M, Macchi C, Bandinelli S, et al. Patterns of inflammation associated with peripheral arterial disease: the InCHIANTI study. *Am Heart J*. 2005;150(2):276-81.
47. Poznyak AV, Melnichenko AA, Wetzker R, Gerasimova EV, Orekhov AN. NLRP3 Inflammasomes and Their Significance for Atherosclerosis. *Biomedicines*. 2020;8(7).
48. Everett BM, MacFadyen JG, Thuren T, Libby P, Glynn RJ, Ridker PM. Inhibition of Interleukin-1 β and Reduction in Atherothrombotic Cardiovascular Events in the CANTOS Trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;76(14):1660-70.
49. Bleda S, de Haro J, Varela C, Esparza L, Ferruelo A, Acin F. NLRP1 inflammasome, and not NLRP3, is the key in the shift to proinflammatory state on endothelial cells in peripheral arterial disease. *Int J Cardiol*. 2014;172(2):e282-4.
50. Fenini G, Karakaya T, Hennig P, Di Filippo M, Beer HD. The NLRP1 Inflammasome in Human Skin and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13).
51. Yap JKY, Pickard BS, Chan EWL, Gan SY. The Role of Neuronal NLRP1 Inflammasome in Alzheimer's Disease: Bringing Neurons into the Neuroinflammation

- Game. *Mol Neurobiol*. 2019;56(11):7741-53.
52. Yang H, Sun Y, Li Q, Jin F, Dai Y. Diverse Epigenetic Regulations of Macrophages in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:868788.
 53. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019;10:1084.
 54. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-73.
 55. Park MD, Silvén A, Ginhoux F, Merad M. Macrophages in health and disease. *Cell*. 2022;185(23):4259-79.
 56. Bekkering S, van den Munckhof I, Nielen T, Lamfers E, Dinarello C, Rutten J, et al. Innate immune cell activation and epigenetic remodeling in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans in vivo. *Atherosclerosis*. 2016;254:228-36.
 57. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1991;11(5):1223-30.
 58. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(7):387-401.
 59. Buono C, Binder CJ, Stavrakis G, Witztum JL, Glimcher LH, Lichtman AH. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(5):1596-601.
 60. Chaparala RP, Orsi NM, Lindsey NJ, Girn RS, Homer-Vanniasinkam S. Inflammatory profiling of peripheral arterial disease. *Ann Vasc Surg*. 2009;23(2):172-8.
 61. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis: subtle and contextual roles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):258-64.
 62. Lin YZ, Wu BW, Lu ZD, Huang Y, Shi Y, Liu H, et al. Circulating Th22 and Th9 levels in patients with acute coronary syndrome. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:635672.
 63. Lin Z, Qian S, Gong Y, Ren J, Zhao L, Wang D, et al. Deep sequencing of the T cell receptor β repertoire reveals signature patterns and clonal drift in atherosclerotic plaques and patients. *Oncotarget*. 2017;8(59):99312-22.
 64. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(9):3893-7.
 65. Wick C. Tolerization against atherosclerosis using heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(2):201-11.
 66. Park S, Lee IK. Progression of Multifaceted Immune Cells in Atherosclerotic Development. *J Lipid Atheroscler*. 2019;8(1):15-25.
 67. Poznyak AV, Bezsonov EE, Borisov EE, Grechko AV, Kartuesov AG, Orekhov AN. Atherosclerosis in HIV Patients: What Do We Know so Far? *Int J Mol Sci*. 2022;23(5).
 68. Armstrong AW, Voyles SV, Armstrong EJ, Fuller EN, Rutledge JC. Angiogenesis and oxidative stress: common mechanisms linking psoriasis with atherosclerosis. *J Dermatol Sci*. 2011;63(1):1-9.
 69. Kuan R, Agrawal DK, Thankam FG. Treg cells in atherosclerosis. *Mol Biol Rep*. 2021;48(5):4897-910.
 70. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
 71. Maganto-García E, Tarrio ML, Grabie N, Bu DX, Lichtman AH. Dynamic changes in regulatory T cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation*. 2011;124(2):185-95.
 72. Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A, Metzger S, Chajek-Shaul T, et al. Role of

- naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):893-900.
73. Fan Z, Gu C, Wu Y. Changes of peripheral blood V δ 1 T cells in patients with atherosclerotic cerebral infarction. *Int J Clin Exp Pathol.* 2017;10(8):9052-60.
 74. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol.* 1981;103(2):181-90.
 75. Li J, Ley K. Lymphocyte migration into atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(1):40-9.
 76. Jaipersad AS, Lip GY, Silverman S, Shantsila E. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology.* 2014;63(1):1-11.
 77. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10):2054-61.
 78. Waterhouse DF, Cahill RA, Sheehan F, McCreery C. Prediction of calculated future cardiovascular disease by monocyte count in an asymptomatic population. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(1):177-87.
 79. Zeynalova S, Bucksch K, Scholz M, Yahiaoui-Doktor M, Gross M, Löffler M, et al. Monocyte subtype counts are associated with 10-year cardiovascular disease risk as determined by the Framingham Risk Score among subjects of the LIFE-Adult study. *PLoS One.* 2021;16(3):e0247480.
 80. van Furth R, Raeburn JA, van Zwet TL. Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood.* 1979;54(2):485-500.
 81. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 2012;119(24):5640-9.
 82. Calverley DC, Varteresian T, Brass E, Tsao-Wei DD, Groshen S, Mack WJ, et al. Association between monocyte Fc γ subclass expression and acute coronary syndrome. *Immun Ageing.* 2004;1(1):4.
 83. Flores-Langarica A, Marshall JL, Bobat S, Mohr E, Hitchcock J, Ross EA, et al. T-zone localized monocyte-derived dendritic cells promote Th1 priming to Salmonella. *Eur J Immunol.* 2011;41(9):2654-65.
 84. Plantinga M, Guillems M, Vanheerswynghele M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, et al. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity.* 2013;38(2):322-35.
 85. Ko HJ, Brady JL, Ryg-Cornejo V, Hansen DS, Vremec D, Shortman K, et al. GM-CSF-responsive monocyte-derived dendritic cells are pivotal in Th17 pathogenesis. *J Immunol.* 2014;192(5):2202-9.
 86. Guillems M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity.* 2018;49(4):595-613.
 87. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current Opinion in Hematology.* 2010;17(1):53-9.
 88. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2035.
 89. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74-80.
 90. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med.* 2017;214(7):1913-23.
 91. Patel AA, Ginhoux F, Yona S. Monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophils: an update on lifespan kinetics in health and disease. *Immunology.*

2021;163(3):250-61.

92. Fu MS, Drummond RA. The Diverse Roles of Monocytes in Cryptococcosis. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(3).
93. Günther P, Cirovic B, Baßler K, Händler K, Becker M, Dutertre CA, et al. A rule-based data-informed cellular consensus map of the human mononuclear phagocyte cell space. *bioRxiv*; 2019.
94. Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, Bryngelsson C, Hedblad B, Fredrikson GN, et al. Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(1):122-31.
95. Höpfner F, Jacob M, Ulrich C, Russ M, Simm A, Silber RE, et al. Subgroups of monocytes predict cardiovascular events in patients with coronary heart disease. The PHAMOS trial (Prospective Halle Monocytes Study). *Hellenic J Cardiol*. 2019;60(5):311-21.
96. Meeuwse JAL, de Vries JJ, van Duijvenvoorde A, van der Velden S, van der Laan SW, van Koeve-den ID, et al. Circulating CD14⁽⁺⁾CD16⁽⁻⁾ classical monocytes do not associate with a vulnerable plaque phenotype, and do not predict secondary events in severe atherosclerotic patients. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2019;127:260-9.
97. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, et al. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(16):1512-20.
98. Liu Y, Imanishi T, Ikejima H, Tsujioka H, Ozaki Y, Kuroi A, et al. Association between circulating monocyte subsets and in-stent restenosis after coronary stent implantation in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2010;74(12):2585-91.
99. SahBandar IN, Ndhlovu LC, Saiki K, Kohorn LB, Peterson MM, D'Antoni ML, et al. Relationship between Circulating Inflammatory Monocytes and Cardiovascular Disease Measures of Carotid Intimal Thickness. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2020;27(5):441-8.
100. Lo SC, Lee WJ, Chen CY, Lee BC. Intermediate CD14⁺⁺CD16⁽⁺⁾ monocyte predicts severe coronary stenosis and extensive plaque involvement in asymptomatic individuals. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2017;33(8):1223-36.
101. Urbanski K, Ludew D, Filip G, Filip M, Sagan A, Szczepaniak P, et al. CD14⁽⁺⁾CD16⁺⁺ "nonclassical" monocytes are associated with endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Thrombosis and haemostasis*. 2017;117(5):971-80.
102. Wildgruber M, Aschenbrenner T, Wendorff H, Czubba M, Glinzer A, Haller B, et al. The "Intermediate" CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. *Scientific Reports*. 2016;6(1):39483.
103. Combadière C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C^(hi) and Ly6C^(lo) monocytes and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2008;117(13):1649-57.
104. Williams M, Scott CL. Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nat Rev Immunol*. 2017;17(7):451-60.
105. Rua R, McGavern DB. Elucidation of monocyte/macrophage dynamics and function by intravital imaging. *J Leukoc Biol*. 2015;98(3):319-32.
106. Heine GH, Ortiz A, Massy ZA, Lindholm B, Wiecek A, Martínez-Castelao A, et al. Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(6):362-9.
107. Wu Z, Zhang Z, Lei Z, Lei P. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019;48:24-31.

108. Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(5):1457-67.
109. Backé E, Schwarting R, Gerdes J, Ernst M, Stein H. Ber-MAC3: new monoclonal antibody that defines human monocyte/macrophage differentiation antigen. *J Clin Pathol*. 1991;44(11):936-45.
110. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001;409(6817):198-201.
111. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(17):2352-63.
112. Bengtsson E, Hultman K, Edsfeldt A, Persson A, Nitulescu M, Nilsson J, et al. CD163+ macrophages are associated with a vulnerable plaque phenotype in human carotid plaques. *Sci Rep*. 2020;10(1):14362.
113. Yamashita M, Utsumi Y, Yamauchi K. S100A9/CD163 Expression in Circulating Classical Monocytes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Copd*. 2020;17(5):587-94.
114. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem*. 1995;70(5):220-33.
115. Contier L. [Vital fluorescent staining of human blood and bone marrow with acridine orange]. *Blut*. 1956;2(4):277-86.
116. Sack U TrA, Rothe G. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie: Gregor Rothe; 2007.
117. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Abrignani S, Addo R, Akdis M, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol*. 2021;51(12):2708-3145.
118. Reiner Ž, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen M-R, Wiklund O, 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). *European Heart Journal*. 2011;32(14):1769-818.
119. Reuser A, Koenig W, Laufs U. [Lp(a) and its role in cardiovascular diseases]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2022;147(23):1564-70.
120. Tsukamoto M, Seta N, Yoshimoto K, Suzuki K, Yamaoka K, Takeuchi T. CD14(bright)CD16+ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):28.
121. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2007;368:39-57.
122. Ong SM, Teng K, Newell E, Chen H, Chen J, Loy T, et al. A Novel, Five-Marker Alternative to CD16-CD14 Gating to Identify the Three Human Monocyte Subsets. *Front Immunol*. 2019;10:1761.
123. Appleby LJ, Nausch N, Midzi N, Mduluzi T, Allen JE, Mutapi F. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol Lett*. 2013;152(1):32-41.
124. Bosshart H, Heinzelmann M. Spontaneous decrease of CD14 cell surface expression in human peripheral blood monocytes ex vivo. *J Immunol Methods*. 2011;368(1-2):80-3.
125. Ticha O, Moos L, Bekeredjian-Ding I. Effects of long-term cryopreservation of PBMC on recovery of B cell subpopulations. *J Immunol Methods*. 2021;495:113081.
126. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009;5(3):90-6.
127. Fowke KR, Behnke J, Hanson C, Shea K, Cosentino LM. Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods*. 2000;244(1-2):139-44.

128. Weinberg A, Song LY, Wilkening C, Sevin A, Blais B, Louzao R, et al. Optimization and limitations of use of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for functional and phenotypic T-cell characterization. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(8):1176-86.
129. Costantini A, Mancini S, Giuliodoro S, Butini L, Regnery CM, Silvestri G, et al. Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function. *J Immunol Methods*. 2003;278(1-2):145-55.
130. Pi CH, Hornberger K, Dosa P, Hubel A. Understanding the freezing responses of T cells and other subsets of human peripheral blood mononuclear cells using DMSO-free cryoprotectants. *Cytotherapy*. 2020;22(5):291-300.
131. Martí F, Miralles A, Peiró M, Amill B, de Dalmases C, Piñol G, et al. Differential effect of cryopreservation on natural killer cell and lymphokine-activated killer cell activities. *Transfusion*. 1993;33(8):651-5.
132. Li B, Yang C, Jia G, Liu Y, Wang N, Yang F, et al. Comprehensive evaluation of the effects of long-term cryopreservation on peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry. *BMC Immunol*. 2022;23(1):30.
133. Koryakina A, Frey E, Bruegger P. Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. *J Immunol Methods*. 2014;405:181-91.
134. Pardali E, Schmitz T, Borgscheiper A, Iking J, Stegger L, Waltenberger J. Cryopreservation of primary human monocytes does not negatively affect their functionality or their ability to be labelled with radionuclides: basis for molecular imaging and cell therapy. *EJNMMI Res*. 2016;6(1):77.
135. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*. 1986;23(1):1-13.
136. Magri D, Vasilas P, Muto A, Fitzgerald TN, Fancher TT, Feinstein AJ, et al. Elevated monocytes in patients with critical limb ischemia diminish after bypass surgery. *J Surg Res*. 2011;167(1):140-50.
137. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81(3):584-92.
138. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325(5940):612-6.
139. Moestrup SK, Møller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Annals of medicine*. 2004;36(5):347-54.
140. Franzè E, Caruso R, Stolfi C, Sarra M, Cupi ML, Caprioli F, et al. Lesional accumulation of CD163-expressing cells in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2013;8(7):e69839.
141. Houthuys E, Movahedi K, De Baetselier P, Van Ginderachter JA, Brouckaert P. A method for the isolation and purification of mouse peripheral blood monocytes. *J Immunol Methods*. 2010;359(1-2):1-10.
142. Ibeagha-Awemu EM, Ibeagha AE, Zhao X. The influence of different anticoagulants and sample preparation methods on measurement of mCD14 on bovine monocytes and polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *BMC Res Notes*. 2012;5:93.
143. Nguyen CTH, Kambe N, Yamazaki F, Ueda-Hayakawa I, Kishimoto I, Okamoto H. Up-regulated expression of CD86 on circulating intermediate monocytes correlated with disease severity in psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2018;90(2):135-43.
144. Maga P, Mikolajczyk TP, Partyka L, Krzanowski M, Malinowski KP, Nizankowski R. Percutaneous Transluminal Angioplasty in Patients with Peripheral Arterial Disease Does Not Affect Circulating Monocyte Subpopulations. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2708957.
145. Baluku JB, Nabwana M, Kansime G, Nuwagira E. Cigarette smoking is associated with an increase in blood monocytes in people with tuberculosis: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(37):e30737.

146. Yılmaz M, Kayançiçek H. A New Inflammatory Marker: Elevated Monocyte to HDL Cholesterol Ratio Associated with Smoking. *J Clin Med*. 2018;7(4).
147. Li J, Huynh L, Cornwell WD, Tang MS, Simborio H, Huang J, et al. Electronic Cigarettes Induce Mitochondrial DNA Damage and Trigger TLR9 (Toll-Like Receptor 9)-Mediated Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(2):839-53.
148. Xiang Y, Liang B, Zhang X, Zheng F. Lower HDL-C levels are associated with higher expressions of CD16 on monocyte subsets in coronary atherosclerosis. *Int J Med Sci*. 2020;17(14):2171-9.
149. Huang ZS, Chiang BL. Correlation between serum lipid profiles and the ratio and count of the CD16+ monocyte subset in peripheral blood of apparently healthy adults. *J Formos Med Assoc*. 2002;101(1):11-7.
150. Ziegler-Heitbrock L. Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. *Front Immunol*. 2015;6:423.
151. Thomas GD, Hamers AAJ, Nakao C, Marcovecchio P, Taylor AM, McSkimming C, et al. Human Blood Monocyte Subsets: A New Gating Strategy Defined Using Cell Surface Markers Identified by Mass Cytometry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(8):1548-58.
152. Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun*. 1998;66(6):2782-90.
153. Horne BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, et al. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(10):1638-43.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

ABI	ankle brachial index
AGE	Advanced glycation end products
AO	Acridinorange
APZ	antigenpräsentierende Zellen
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse)
FBS	fetal bovine serum
FcR	Fc -Rezeptor
FSC	Forward side scatter (Vorwärts-Streulicht)
IFN γ	Interferon gamma
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low- Density Lipoprotein
oxLDL	oxidized low-density lipoprotein

PAMPs	pathogen associated molecular patterns
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (Periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PRR	pattern recognition receptor
RCF	relative centrifugal force (relative Zentrifugalkraft)
SSC	Sideward side scatter (Seitwärts-Streulicht)
TGF- β	transforming growth factor β
TH-Zellen	T-Helferzellen
TLR	toll like receptor
Treg	T-regulatorische Zellen
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low-density lipoprotein
VSMCs	vascular smooth muscle cells

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Rolle der Monozytensubtypen bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose.....	14
Abbildung 2. Arbeitsplatz: Sicherheitswerkbank.....	21
Abbildung 3. Zellseparation nach Dichtegradientenzentrifugation	23
Abbildung 4. Identifizierung von Monozyten in FSC/SSC	27
Abbildung 5. Eliminierung von Dubletten.....	28
Abbildung 6. Durchflussszytometrische Dot plot Analyse.....	29
Abbildung 7. Fluoreszenzintensitätsmessungen für ein negatives und positives Ergebnis	30
Abbildung 8. Erfolgreiche FMO-Kontrolle.....	31
Abbildung 9. Nicht erfolgreiche FMO-Kontrolle	32
Abbildung 10. Einfluss der Probenverarbeitung auf die Isolation von Monozyten.....	33
Abbildung 11. Korrelation zwischen HbA1c und Monozytensubtypen	40
Abbildung 12. Auswirkung der Isolationsmethode auf die Vitalität der Zellen	41
Abbildung 13. Auswirkung der Isolationsmethode auf die Bestimmung von intermediären Monozyten.....	42
Abbildung 14. Einfluss der Kryokonservierung auf die Vitalität von PBMC	43
Abbildung 15. Einfluss der Kryokonservierung auf die Ausbeute von PBMC	44
Abbildung 16. Einfluss der Kryokonservierung auf den Erhalt von Monozyten	45
Abbildung 17. Einfluss der Kryokonservierung auf die Intensität der gemessenen Oberflächenmarker-Signale	46
Abbildung 18. Quantitative Messung der CD14 und CD16 Signale	47
Abbildung 19. Fluoreszenz-Intensitätsmessung von CD163	48
Abbildung 20. Monozyten-Zahlen bei pAVK vs. gesunden Probanden.....	49
Abbildung 21. Monozyten-Anteile bei pAVK vs. Gesunden	50
Abbildung 22. Monozyten-Anteile an PBMC gesamt in frischen vs. kryokonservierten	

Proben	51
Abbildung 23. Verteilung der Monozytensubtypen bei pAVK und bei Gesunden	53
Abbildung 24. Intermediäre Monozyten in frischen vs. kryokonservierten Proben	54
Abbildung 25. Monozyten-Subtypen bei pAVK und bei Gesunden in frischen und in kryokonservierten Proben	55
Abbildung 26. Intensität des CD163-Signals auf Monozytensubtypen.....	56
Abbildung 27. Unterschiede CD163- Signalverlust zwischen den untersuchten Subpopulationen	57

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Patienten- Charakteristika	37
Tabelle 2. Baseline- Parameter.....	38