

# **Untersuchung der Auflösungskapazität von Cholesterinkristallen im Serum bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Malte Gaumert**

aus Siegburg

2023

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Sebastian Zimmer
2. Gutachter: PD Dr. med. Davide Cucchi

Tag der Mündlichen Prüfung: 14.09.2023

Aus der Klinik und Poliklinik für Kardiologie, Angiologie, Pneumologie und Internistische  
Intensivmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	5
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	6
1.1	Definition der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit	6
1.2	Ätiologie, Epidemiologie und Prognose	6
1.2.1	Ätiologie	6
1.2.2	Epidemiologie und Prognose	6
1.3	Einteilung der pAVK	7
1.3.1	Klassifikation nach Fontaine	8
1.3.2	Klassifikation nach Rutherford	8
1.4	Risikofaktoren	8
1.4.1	Rauchen	8
1.4.2	Arterielle Hypertonie	9
1.4.3	Hypercholesterinämie	9
1.4.4	Diabetes Mellitus	10
1.4.5	Niedriges HDL	10
1.4.6	Sonstige Risikofaktoren	10
1.5	Pathogenese	11
1.6	Cholesterinkristalle (CC) und Auflösungskapazität (CCDC)	12
1.7	Ziel dieser Arbeit	13
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	14
2.1	Patientenkollektiv	14
2.2	Probenentnahme	15
2.3	Herstellung der Cholesterinkristalle	15
2.4	Messungen	16
2.5	Auswertung	17
2.6	Statistische Auswertung	18
2.7	Validierung der Messmethode	19

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	20
3.1	Beschreibung Gesamtkollektiv	20
3.2	Unterteilung nach pAVK	22
3.3	Unterteilung nach Auflösungskapazität	24
3.4	Primärer Endpunkt	26
3.5	Weitere Ergebnisse	27
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	30
4.1	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit	33
4.2	Auflösungskapazität	34
4.3	HDL	35
4.4	Limitationen	35
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	37
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	39
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	40
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	41
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	46

## Abkürzungsverzeichnis

ABI	Knöchel-Arm-Index
BMI	Body-Mass-Index
CC	Cholesterinkristalle
CCDC	Cholesterol crystal dissolution capacity (Auflösungskapazität)
CCE	Cholesterinkristallembolien
CRP	C-reaktives Protein
DSA	digitale Substraktionsangiographie
HDL	High-Density-Lipoprotein-Cholesterin
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit

## 1. Einleitung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) ist eine Erkrankung mit hoher Prävalenz in der Bundesrepublik Deutschland und weltweit (Malyar et al., 2013).

Dabei ist die pAVK hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz in Bezug auf koronare Herzkrankheit und zerebrovaskuläre Erkrankungen sowie auf die Folgen durch die pAVK selbst häufig unterschätzt, unterdiagnostiziert und untertherapiert (Reinecke et al., 2015).

### 1.1 Definition der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit

Laut Definition werden alle stenosierenden und obliterierenden Gefäßprozesse der distalen Aorta und der Extremitäten-versorgenden Arterien als periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) bezeichnet (Ludwig, 2019).

### 1.2 Ätiologie, Epidemiologie und Prognose

#### 1.2.1 Ätiologie

Die häufigste Ursache der arteriellen Verschlusskrankheit der Extremitäten ist die Arteriosklerose (Gröchening, 2009). Insgesamt sind entzündliche, genetische oder traumatische Prozesse nur für etwa 5 % aller pAVK-Fälle verantwortlich (EAS Guidelines). Im Weiteren liegt der Fokus auf der arteriosklerotisch bedingten pAVK.

#### 1.2.2 Epidemiologie und Prognose

In Deutschland liegt die kumulative Inzidenz eines Patienten über 65 Jahren binnen sieben Jahren an einer pAVK zu erkranken, bei 12,9 % (Krause et al., 2016). Mit höherem Alter nimmt die Prävalenz der pAVK stetig zu. Durch den demographischen Wandel in Deutschland und die steigende Zahl älterer Menschen steigt auch die Zahl der Patienten mit pAVK. Von 2005 bis 2009 stieg die Zahl der Erkrankten um 20,7 %. Dieser Anstieg

bedeutet vor allem ökonomisch eine deutliche Mehrbelastung des Gesundheitssystems (Malyar et al., 2013).

Insgesamt gilt die pAVK als unterdiagnostiziert. Dies konnte auch durch die ELLIPSE-Studie 2009 gezeigt werden. Dort wurden prospektiv 2.146 Patienten untersucht, die ein Hochrisikoprofil für arteriosklerotische Erkrankungen, jedoch keine Symptome einer pAVK aufwiesen. Bei 41,1 % dieses Patientenkollektivs konnte ein Knöchel-Arm Index (ABI)  $<0,9$  und damit ein pathologischer Wert festgestellt werden, welcher das Kriterium einer relevanten Arteriosklerose/Stenose erfüllt (Mourad et al., 2009).

Die besondere und teilweise unterschätzte Bedeutung der pAVK für die Prognose der betroffenen Patienten wurde auch in der getABI-Studie deutlich. Es handelte sich dabei um eine prospektive, multizentrische Studie in deutschen Hausarztpraxen, die 6.880 unselektierte Patienten untersuchte. Dabei wurden über mehr als 5 Jahre Patienten  $> 65$  Jahre untersucht. Eine pAVK war bei 20,7 % dieser Patienten diagnostiziert. Nach fünf Jahren zeigten die Patienten mit pAVK doppelt so viele ischämische Schlaganfälle wie der Rest des Patientenkollektivs (Diehm et al., 2009). Dabei korrelierte die Häufigkeit von transitorisch ischämischen Attacken oder ischämischen Schlaganfällen mit niedrigen ABI-Werten (Meves et al., 2010). Bei einem Knöchel-Arm Index von 0,9 oder weniger steigt die Gefahr der kardiovaskulären Ereignisse sowie der Gesamtmortalität im 10-Jahres-Risiko um das Doppelte an (Fowkes et al., 2008).

Zudem zeigten einige Studien selbst nach Anpassung der herkömmlichen Risikofaktoren noch ein erhöhtes Risiko für Mortalität und Morbidität für Patienten mit pAVK.

### 1.3 Einteilung der pAVK

Die Einteilung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit erfolgt im klinischen Alltag in zwei Klassifikationen. Zum einen die in Deutschland häufiger genutzte Einteilung nach Fontaine sowie die im Internationalen gebräuchlichere Einteilung nach Rutherford.

### 1.3.1 Klassifikation nach Fontaine

Die Klassifikation nach Fontaine folgt dabei ausschließlich dem klinischen Erscheinungsbild der pAVK. Dies macht die Erhebung des Stadiums insgesamt leichter, ist allerdings auch deutlich subjektiver und von der Compliance der Patienten abhängig. Die Klassifikation umfasst vier Stadien, in denen vor allem die Schmerzsymptomatik des Patienten unter Alltagsbedingungen erfasst wird. Stadium I umfasst asymptomatische Patienten, bei denen Gefäßveränderungen festgestellt werden konnten.

In Stadium II klagen die Patienten über eine reduzierte Gehstrecke. Dabei wird die Gehstrecke in über 200 Meter (Stufe IIa) und unter 200 Meter (Stadium IIb) eingeteilt. Patienten im Stadium III geben einen Schmerz bereits in Ruhe an („ischämischer Ruheschmerz“). Stadium IV beinhaltet Patienten bei denen ein Gewebsuntergang (z.B. Gangrän, Ulcus) aufgetreten ist.

### 1.3.2 Klassifikation nach Rutherford

Die Klassifikation nach Rutherford ergänzt das klinische Erscheinungsbild um standardisierte, messbare Parameter wie z.B. den Dopplerdruck der Knöchelarterien sowie die exakte Laufzeit und Steigung. Hierdurch lässt sich das Ausmaß der pAVK objektiver beurteilen. Die Standardisierung der Messergebnisse macht diese Einteilung weniger fehleranfällig. Die bessere Objektivierbarkeit der Ergebnisse ist ein Grund dafür, dass sich der Gebrauch der Rutherford-Klassifikation in international wissenschaftlichen Arbeiten durchgesetzt hat (Deutsche Gesellschaft für Angiologie, 2015).

## 1.4 Risikofaktoren

### 1.4.1 Rauchen

Rauchen ist ein besonders starker Risikofaktor für die Entstehung einer pAVK (Criqui und Aboyans, 2015). In Deutschland rauchen ca. 23,8 % der über 18-Jährigen (BMfG, Internetseite, 08.01.2021). Der Zusammenhang zwischen pAVK und dem Rauchen bleibt

auch nach der Raucherentwöhnung bestehen. Erst nach ca. 10 Jahren Raucherentwöhnung nimmt der Zusammenhang erheblich ab (Joosten et al., 2012).

Die Bedeutung von Rauchen als Risikofaktor wird durch die 2016 veröffentlichte REGICOR-Studie verdeutlicht. Dort wurde neben dem Diabetes mellitus das inhalative Zigarettenrauchen als stärkster Risikofaktor identifiziert. Es wurde sogar ein Screening aller aktiven oder ehemaligen Rauchern über 65 Jahren auf das Vorliegen einer pAVK vorgeschlagen (Velescu et al., 2016).

Zudem gilt die Raucherentwöhnung als einer der wichtigsten Eckpfeiler der konservativen pAVK-Therapie (Deutsche Gesellschaft für Angiologie, 2015).

#### 1.4.2 Arterielle Hypertonie

Aufgrund ihrer hohen Prävalenz trägt die arterielle Hypertonie, insbesondere bei älteren Patienten, erheblich zur Gesamtbelastung der Bevölkerung mit pAVK bei.

In einer Analyse von 4,2 Millionen Menschen und 44.329 Fällen von pAVK war ein Anstieg des systolischen Blutdrucks um 20 mmHg mit einem relativen Risiko für die Entstehung einer pAVK von ca. 63 % verbunden (Emdin et al., 2015).

In einer prospektiven bevölkerungsbezogenen Studie mit 92.728 Personen war die arterielle Hypertonie der stärkste Prädiktor für das Auftreten aller akuten peripheren arteriellen Verschlüsse, einschließlich akuter Mesenterialschämie, akuter Extremitätenischämie und chronischer Extremitäten-bedrohender Ischämie (Howard et al., 2015).

#### 1.4.3 Hypercholesterinämie

Hohe Plasmaspiegel von Gesamtcholesterin und Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL) gehören zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Arteriosklerose (Wang, 2017). In einer prospektiven Studie mit 51.529 Männern im Alter von 40 bis 79 Jahren über zwanzig Jahre zeigte die Hypercholesterinämie eine starke und unabhängige Assoziation mit der klinischen Erscheinung der pAVK (Joosten et al., 2012).

High-Density-Lipoprotein-Cholesterin (HDL) hingegen hat sich in allen großen epidemiologischen Studien als schützend erwiesen. In einem Vergleich von pAVK-

Patienten mit gesunden Probanden zeigte sich das Verhältnis von Gesamtcholesterin zu HDL als stärkster Prädiktor zur Entstehung einer pAVK (Ridker et al., 2001).

#### 1.4.4 Diabetes mellitus

Bevölkerungsstudien konnten eine starke Assoziation zwischen Diabetes mellitus (unabhängig vom Typ) und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit aufzeigen (Criqui und Aboyans, 2015).

Dieses Risiko steigt mit der Erkrankungsdauer der Patienten. Dabei gilt vor allem der unbehandelte Langzeit-Diabetes als Prädisposition für die Entstehung einer pAVK (Velescu et al. 2016).

Die Prognose der pAVK ist bei Diabetikern insgesamt deutlich schlechter als bei Nicht-Diabetikern. Das Amputationsrisiko ist bis zu fünffach erhöht und es besteht eine Neuropathie sowie ein höheres Infektionsrisiko (Jude et al., 2001).

#### 1.4.5 Niedriges HDL

Im Gegensatz zu hohen Spiegeln von Gesamtcholesterin und LDL als Risikofaktoren gilt beim HDL ein niedriger Spiegel als Risikofaktor. Dies konnte bereits in vielen klinischen Studien gezeigt werden (Gordon et al, 1989). Obwohl niedriges HDL das kardiovaskuläre Risiko erhöht, konnte bisher nicht gezeigt werden, dass ein hoher Spiegel von HDL im Gegenzug protektiv wirkt (Rohrer et al., 2004)

#### 1.4.6 Sonstige Risikofaktoren

Zu den nicht modifizierbaren Risikofaktoren gehören vor allem das Alter und das männliche Geschlecht. In der getABI-Studie hatten von 6.880 untersuchten Personen über 65 Jahren rund 20,7 % eine symptomatische oder asymptomatische pAVK (Diehm 2001). In Ländern mit hohem Einkommen ist insbesondere die symptomatische pAVK bei Männern insgesamt häufiger, obwohl der geschlechtsspezifische Unterschied mit steigendem Alter wieder abnimmt. In Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen ist die Prävalenz bei Frauen insgesamt höher als bei Männern (Fowkes et al., 2013).

## 1.5 Pathogenese

Arteriosklerose gilt als häufigste Ursache von kardiovaskulären und peripheren arteriellen Erkrankungen weltweit (Gallino et al., 2014).

Die Pathogenese dieser Erkrankung ist dabei bis heute nicht vollständig erforscht. Chronisch-entzündliche Prozesse des Gefäßendothels sind dabei ein wichtiger Faktor (Grebe und Latz, 2013). Zudem begünstigen verschiedene Risikofaktoren die Entstehung sowie das Fortschreiten der Arteriosklerose. Zu den modifizierbaren Risikofaktoren zählen vor allem inhalativer Nikotinkonsum, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Übergewicht sowie die Dyslipidämie (Herrington et al., 2016). Genetische Faktoren, das Geschlecht und das Alter sind als nicht-modifizierbare Risikofaktoren zu nennen. Diese Risikofaktoren führen zu Blutflussveränderungen und Verletzungen des Endothels, welche eine meist chronische inflammatorische Reaktion hervorrufen. Diese chronische Entzündung begünstigt weitere Veränderungen der Gefäßwand. Unter anderem führt sie zu Veränderungen der Adhäsionsfähigkeit und der Permeabilität des Endothels. Weiterhin werden Koagulantien statt Antikoagulantien an der Zellwand gebildet, was die Entstehung weiterer Plaques begünstigt (Ross, 1999).

Meist beginnt die Arteriosklerose mit der Akkumulation von Lipoproteinen in einem Gefäßbereich, der bereits eine Endothelschädigung erfahren hat (Wolf und Ley, 2014). Diese Lipoproteine werden benötigt, da freies Cholesterin eine schlechte Wasserlöslichkeit aufweist. Daher erfolgt der Cholesterintransport im Blut vor allem über Transportproteine wie LDL und HDL. Dabei übernimmt LDL den Transport zu den Zellen hin, während HDL den Abtransport übernimmt (Grebe und Latz, 2013).

Das akkumulierte Cholesterin bzw. die akkumulierten Lipoproteine können von Makrophagen als Cholesterinkomplexe oder Cholesterinkristalle (CC) durch Phagozytose aufgenommen werden. Übersteigt die Cholesterinkonzentration die Aufnahmekapazität der Phagozyten, bilden sich Cholesterinablagerungen in den Gefäßwänden (Wolf et al., 2014). Diese Ablagerungen rufen eine gesteigerte inflammatorische Reaktion hervor (Nahrendorf, 2018). Es bilden sich sogenannte arteriosklerotische Plaques. Durch die beschriebenen Prozesse kommt es zu einer Verhärtung und Verengung der betroffenen Gefäße. Das Wachstum dieser Plaques kann pathophysiologisch zu Gefäßverengungen

und klinisch zur Minderperfusion bis hin zu kritischen Hypoxien des abhängigen Gewebes führen (Libby et al., 2011).

Neben den chronischen Folgen bestehen jedoch auch akute Gefahren durch die Entstehung arteriosklerotischer Plaques. So können die Plaques aufreißen und, vor allem durch thrombotische Auflagerungen, akute arterielle Verschlüsse hervorrufen. Diese Rupturen können iatrogen bei Eingriffen wie Angiographien oder Herzkatheteruntersuchungen entstehen. Häufiger treten sie jedoch spontan auf (Wang et al., 2017).

So gelten Rupturen von arteriosklerotischen Plaques als eine Hauptursache für das akute Koronarsyndrom sowie Myokardinfarkte (Davies, 2000). Diese Plaque-Rupturen und die Verletzung der Intima konnten unter anderem durch Abela bei Patienten, die an einem akuten Koronarsyndrom verstarben, beobachtet und nachgewiesen werden, (Abela, 2010).

Die durch Plaqueruptur entstehenden Cholesterinkristallembolien (CCE) können auch die Extremitäten, Muskeln, das zentrale Nervensystem sowie viele andere Organe wie Augen, Nieren oder den Magen-Darm-Trakt betreffen und dort zu akuten arteriellen Verschlüssen führen (Wang et al., 2017).

## 1.6 Cholesterinkristalle (CC) und Auflösungskapazität (CCDC)

Historisch gesehen war es zu Beginn der Untersuchung von arteriosklerotischen Plaques schwierig die Cholesterinkristalle mit einem Lichtmikroskop oder einem Elektronenmikroskop direkt nachzuweisen. Im Standardverfahren wurden Dehydratisierung und Ethanol genutzt. Das Ethanol löste die Cholesterinkristalle auf und diese Stellen der Plaques waren daher zunächst nur als Lücken darstellbar (Nasiri et al., 2015). Die Cholesterinkristalle sind jedoch nicht, wie in der Vergangenheit angenommen, ein Nebenprodukt der fortgeschrittenen Arteriosklerose, sondern können bereits in frühen Stadien nachgewiesen werden und haben Anteil an der Ausdehnung der arteriosklerotischen Plaques (Düwell et al., 2010).

Die Akkumulation von Cholesterin führt zu deren Kristallisation. Die Kristallisation ist verantwortlich für eine Volumenzunahme sowie für die Entstehung scharfkantiger

Cholesterinkristalle, welche potentiell Membranen verletzen könnten (Abela und Aziz, 2005).

Durch diese Eigenschaften werden Cholesterinkristalle als mögliche Auslöser der Ruptur von arteriosklerotischen Plaques diskutiert, was durch Abela und Kollegen 2006 auch nachgewiesen werden konnte (Abela und Aziz, 2006). Pathophysiologisch steht hier die Volumenexpansion im Rahmen der Kristallisation im Fokus, durch welche die Plaque-Kappe reißen kann (Abela, 2010).

Auch wenn angenommen wird, dass Cholesterinkristalle direkt oder durch die von ihnen vermittelte Inflammation das Entstehen sowie Fortschreiten einer pAVK begünstigen, so können die zirkulierenden Cholesterinkristalle nicht direkt nachgewiesen werden. Dies führt zu der Annahme, dass die Cholesterinkristalle vom Blut aufgelöst werden (Devy und Brunet-Possenti, 2016). In eigenen Versuchen konnte festgestellt werden, dass die CCDC nicht nur zwischen verschiedenen Spezies, sondern auch zwischen Individuen derselben Spezies variieren.

### 1.7 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen der CCDC und der Prävalenz der pAVK zu untersuchen.

Weiterhin soll die CCDC als neuer Biomarker im Kontext der bisher bekannten Risikofaktoren der pAVK untersucht werden.

Als primärer Endpunkt wurde der Unterschied der Auflösungskapazität zwischen pAVK-Patienten und Kontrollgruppe gewählt.

Als sekundärer Endpunkt wurde der Zusammenhang zwischen der CCDC und den bisher bekannten Risikofaktoren zur Entstehung einer pAVK definiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Eingeschlossen wurden Patienten, die im Zeitraum 2016-2020 am Universitätsklinikum Bonn aus klinischer Indikation eine digitale Subtraktionsangiographie (DSA) der Extremitäten erhielten. Initial wurde von 51 Patienten Blut gewonnen.

Als Kontrollgruppe dienten Patienten ohne diagnostizierte pAVK oder KHK, die eine elektive oder notfallmäßige Herzkatheteruntersuchung erhalten haben. Diese Untersuchung erfolgte zum Beispiel als prä-operative Diagnostik oder zum Ausschluss einer KHK bei akutem Koronarsyndrom.

Dabei wurden verschiedene Kriterien zu Patientenauswahl angewendet. Alle Patienten mussten ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie schriftlich erteilen. Weiterhin wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen sämtliche Baseline Charakteristika wie zum Beispiel die Anamnese bzgl. Risikofaktoren und Vorerkrankungen sowie die Laborwerte und Medikation vollständig erfasst waren. Nach Anwendung dieser Ein- und Ausschlusskriterien konnten 51 Patienten in die Testgruppe sowie 53 Patienten in die Kontrollgruppe eingeschlossen werden.

Nach Analyse der Patientenseren wurden in der Testgruppe 9 Patienten und in der Kontrollgruppe 23 Patienten auf Grund nicht valider Messungen ausgeschlossen. Final konnten insgesamt 72 Patienten, davon 42 in der Testgruppe und 30 in der Kontrollgruppe in die Studie eingeschlossen werden.

Vor der Blutentnahme erfolgte bei allen Patienten eine mündliche und schriftliche Aufklärung. Zudem wurde die schriftliche Einwilligung eingeholt. Das Studienprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Lfd. Nr.106/14). Alle Untersuchungen erfolgten auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki von 1983 und allen weiteren gesetzlichen Grundlagen.

## 2.2 Probenentnahme

Zu Beginn der DSA, vor Injektion von Kontrastmittel oder Antikoagulantien, wurden 20ml Blut aus der arteriellen Schleuse entnommen. Die Blutproben wurden in Standard Serum-Röhrchen (S-Monovette 7,5ml, Sarstedt AG&CO, Nürnberg, Deutschland) gesammelt und sofort weiterverarbeitet. Das Serum wurde durch Zentrifugation (3000 rpm, 21° C, 10 Minuten) von den zellulären Blutbestandteilen getrennt. Das Serum wurde aliquotiert und unmittelbar in 2ml Eppendorf-Tubes bei -80° C eingefroren.

## 2.3 Herstellung der Cholesterinkristalle

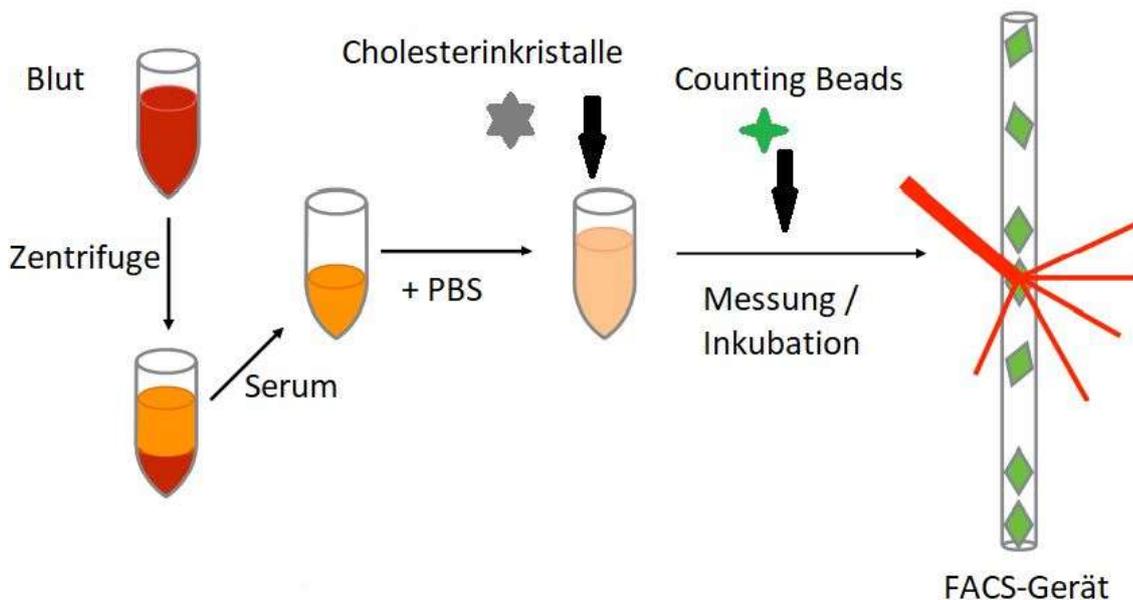
Zur Herstellung der Cholesterinkristalle wurde eine Lösung von 2mg/ml Cholesterin (Cholesterol, SIGMA Life Science, Saint Louis, Missouri, USA) in 1ml 1-Propanol (1-Propanol pure, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) erstellt. Die Kristallisation des Cholesterins wurde durch die Zugabe des 1,5-fachen Volumens Endotoxin freien, destillierten Wassers (UltraPure DNase/RNase-free distilled Water, LIFE Technologies Limited, Carlsbad, Kalifornien, USA) initiiert. Diese Lösung wurde nach 24-Stunden bei Raumtemperatur in einem Konzentrator (Konzentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 30° C für 12 Stunden getrocknet. Nach dem Trocknen wurde aus den Cholesterinkristallen und 1 %iger BSA-Lösung eine 2 mg/ml Cholesterinkristalllösung erstellt. Diese Cholesterinkristalllösung wurde für drei Minuten im Ultraschallbad (RK 100, Bandelin Elektronik, Berlin, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung durch Hinzufügen von 1 %iger BSA-Lösung auf 1:20 verdünnt. Die Lagerung erfolgte in sterilen Glasbehältern bei 4°C.

## 2.4 Messungen

Vor der Herstellung der Proben wurde die Cholesterinkristalllösung für mindestens eine Minute am Vortexmischer durchmischt.

Für die Messungen wurde eine 50 %ige Serumlösung aus Serum, PBS und einer definierten Menge von Cholesterinkristallen hergestellt.

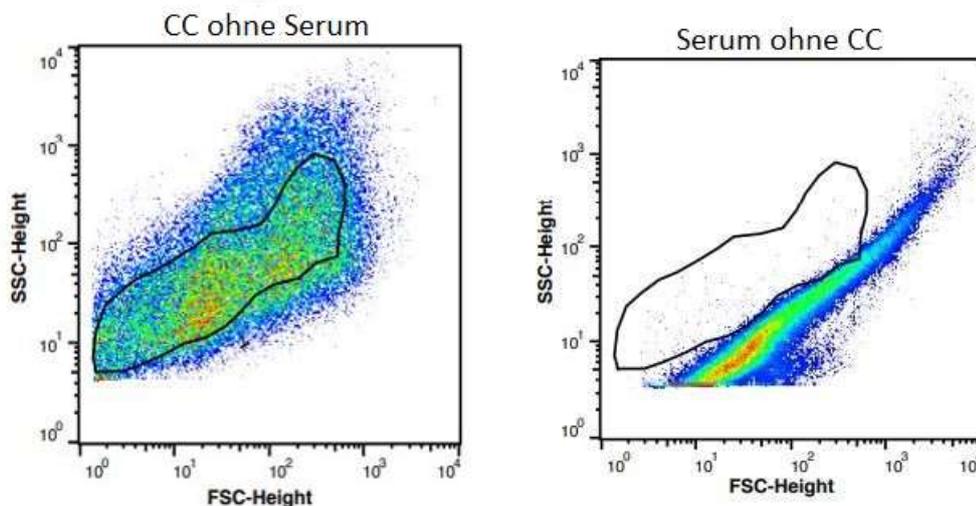
Die Proben wurden in eine 0-Stunden Gruppe sowie eine 2-Stunden Gruppe mit jeweils 5 Proben pro Zeitpunkt aufgeteilt. Die Proben der 2-Stunden Gruppe wurden bei 37°C unter konstanter Bewegung für zwei Stunden inkubiert. Die Proben der 0-Stunden Gruppe wurden unmittelbar getestet. Unmittelbar vor jeder Messung wurden die Counting Beads (Count Bright Absolute Counting Beads, Life Technologies Corporation, Eugene, Oregon, USA) zugegeben. Durch die Verwendung von Counting Beads konnte eine konstante Konzentration der Cholesterinkristalle in allen Proben gewährleistet und die Cholesterinkristalle in Absolutwerten quantifiziert werden. Jede Messung wurde nach 1000 gemessenen Counting Beads gestoppt. Die Messungen erfolgten mittels Durchflußzytometrie (FACSCalibur, Becton and Dickinson Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA).



**Abb. 1:** Probenvorbereitung zur Messung

## 2.5 Auswertung

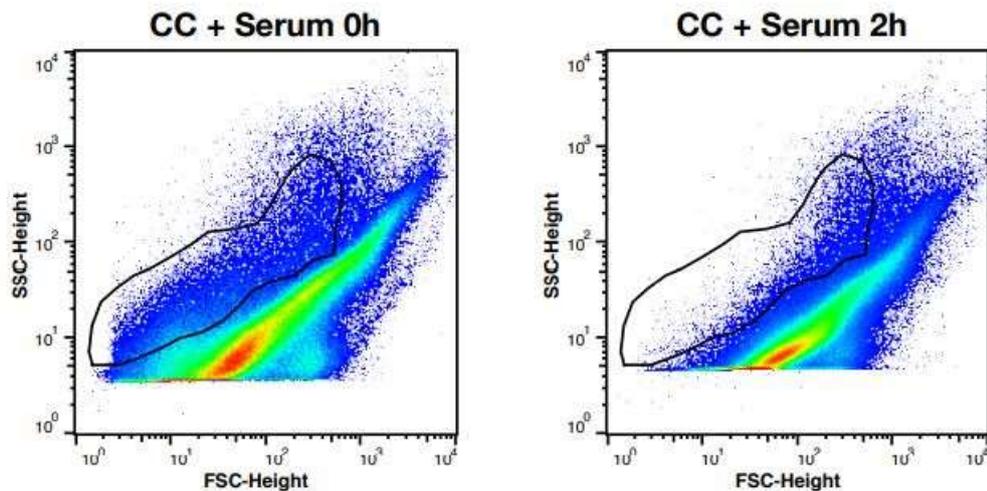
Für die Datenauswertung wurde FlowJo-Software (FlowJo V10, FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA) genutzt. Die Cholesterinkristalle wurden durch ihre charakteristische seitliche und longitudinale Streuung detektiert. Festdefinierte Auswertungsbereiche zum Erfassen der Cholesterinkristalle wurden im Auswertungsdiagramm festgelegt. Auf der X-Achse werden hier die Werte des „forward-scatter“, auf der Y-Achse die Werte des „side-scatter“ aufgetragen. Dazu wurden die Cholesterinkristalle ohne Serum in PBS im FACS-Gerät analysiert und anschließend der Bereich ermittelt, in dem 50 % der Kristalle und damit der Bereich der dichtesten Häufigkeitsverteilung gemessen wurden. Zudem wurde jedes Serum, ohne die Zugabe von Cholesterinkristallen, einzeln untersucht. Anschließend wurde der Bereich ermittelt und festgelegt, in dem sich kein Serum und 50 % der Cholesterinkristalle befinden (siehe Abb. 2)



**Abb. 2:** 50 % - Bereich der Cholesterinkristalle ohne Serum und ermittelter Bereich des Serums ohne Cholesterinkristalle

So wurde sichergestellt, dass ausschließlich Veränderungen der Kristalle gemessen wurden und die Messinformationen des jeweiligen Serums individuell ausgeschlossen werden konnten.

Vor der Auswertung wurden zudem die Counting Beads herausgerechnet. Insgesamt wurden somit nur Bereiche ausgewertet, in denen sich Cholesterinkristalle befanden. Anschließend wurde dieser ermittelte Bereich auf jede Messung zum Messzeitpunkt 0 sowie 2 Stunden angewendet. So konnten die individuelle Auflösungskapazität jedes Serums durch die Abnahme der Ereignisse nach 2 Stunden gegenüber dem Ausgangswert nach 0 Stunden im definierten Bereich ermittelt werden.



**Abb. 3:** Messbereich bei 0 und 2 Stunden

## 2.6 Statistische Auswertung

Aus den jeweiligen fünf Ergebnissen zum Zeitpunkt „0 Stunden“ und „2 Stunden“ wurde ein Mittelwert gebildet. Aus diesen Mittelwerten wurde dann eine prozentuale Veränderung „2 Stunden“ gegenüber „0 Stunden“ errechnet. Diese spiegelt die CCDC des jeweiligen Serums wider.

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der Daten durch SSPS (Version 25.0). Für normalverteilte Stichproben erfolgte die Auswertung mittels t-Test, sonst mittels nicht-parametrischem Test (Wilcoxon-Test).

## 2.7 Validierung der Messmethode

Zur Verifikation der Ergebnisse erfolgte eine Vergleichsmessung mittels Coulter-Counter-Methode. Dabei handelt es sich um eine Messmethode, bei der die Anzahl der Partikel durch die Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit zwischen zwei Elektroden bestimmt wird (Coulter Counter Z2, Beckmann Coulter Life Science, Indianapolis, USA). Es konnte eine hohe Korrelation zwischen der Durchflußzytometrie und der Coulter-Counter-Methode (Pearson Korrelation 0,949) nachgewiesen werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Beschreibung Gesamtkollektiv

Insgesamt wurden 72 Patienten und Patientinnen mit einem Altersdurchschnitt von 68,0 Jahren untersucht. Wie Tabelle 1 zeigt war das männliche Geschlecht mit 63,9 % etwas häufiger vertreten als das Weibliche. Eine diagnostizierte pAVK war zum Zeitpunkt der Untersuchung bei 52,8 % der Patientinnen und Patienten vorhanden.

In der Labordiagnostik wurden vor allem die Blutfettwerte und die Entzündungswerte untersucht. Bei den Blutfettwerten zeigte sich im Mittel ein Gesamtcholesterin von 182,6 mg/dl sowie Triglyceride von 137,2 mg/dl. Die Werte für LDL lagen bei 113,1 mg/dl und die HDL-Werte bei 51,2 mg/dl.

Bei den Entzündungswerten zeigte sich ein C-reaktives Protein (CRP) von 21,0 mg/l sowie Leukozyten von 8,1 G/l. Als Vorerkrankung zeigten 66,7 % einen arteriellen Hypertonus, 31,9 % einen Diabetes Mellitus und 26,8 % Übergewicht (Body-Mass-Index (BMI) >25 kg/m<sup>2</sup>). Zudem waren 43,7 % aller Patienten Raucher.

59,2 % der Patienten wurden zum Untersuchungszeitpunkt mit einem Statin therapiert.

Die CCDC betrug im Mittel 15,1 % ± 14,0. (Siehe Tab. 1.)

Tab. 1: Baseline-Charakteristika

	<b>Gesamtkollektiv</b>
<b>Demographie</b>	
Anzahl (n)	72
Alter (Jahre)	67,97 ± 13,0
Männlich (%)	63,9 (n=43)
Größe (cm)	171,7 ± 8,0
Gewicht (kg)	81,3 ± 18,2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,5 ± 5,1
pAVK (%)	52,7 (n=38)
<b>Laborwerte</b>	
Cholesterin (mg/dl)	182,6 ± 57,8
LDL (mg/dl)	113,1 ± 48,8
Triglyceride (mg/dl)	137,2 ± 93,7
HDL (mg/dl)	51,27 ± 14,7
eGFR (ml/Min)	61,6 ± 13,2
CRP (mg/l)	21,0 ± 33,2
Leukozyten (G/l)	8,1 ± 3,3
TSH (µU/ml)	2,2 ± 3,7
<b>Risikofaktoren</b>	
Hypertonie (%)	66,7 (n=48)
Diabetes (%)	31,9 (n=23)
Übergewicht (%)	56,9 (n=41)
Raucher (%)	43,0 (n=31)
<b>Medikamente</b>	
Statine (%)	59,7 (n=43)
<b>Auflösungskapazität</b>	
CCDC (%)	15,1 ± 14,0

### 3.2 Unterteilung nach pAVK

Es erfolgte die Einteilung des Patientenkollektivs nach dem Kriterium der diagnostizierten pAVK. Tabelle 2 zeigt die Aufteilung in die oben genannten Gruppen sowie die jeweilige Signifikanz der untersuchten Parameter.

Dabei waren die Patienten in der pAVK-Gruppe waren signifikant häufiger männlich (76,3 % zu 50 %) und signifikant älter (73,7 Jahre zu 61,6 Jahre,  $p < 0,001$ ).

Gewicht und BMI waren in der Kontrollgruppe numerisch höher, aber ohne statistische Signifikanz.

Laborchemisch hatten die Patienten der Kontrollgruppe signifikant höhere LDL-Werte (134,3 mg/dl zu 95,3 mg/dl,  $p = 0,001$ ) und zeigten auch eine signifikante Erhöhung des Gesamtcholesterins im Vergleich zur pAVK-Gruppe (209,3 mg/dl zu 160,8 mg/dl,  $p < 0,001$ ).

Die weiteren Laborparameter zeigten numerische Unterschiede, ohne das definierte Signifikanzniveau zu erreichen.

Die Patienten der Kontrollgruppe hatten im Schnitt seltener eine arterielle Hypertonie als Nebendiagnose (78,9 % vs. 52,9 %,  $p = 0,019$ ). Die weiteren Risikofaktoren zeigten sich weitestgehend ausgeglichen.

Patienten der pAVK-Gruppe wurden mit 89,2 % signifikant häufiger als Patienten der Kontrollgruppe mit einem Statin therapiert (26,5 %,  $p < 0,001$ ).

Die Auflösungskapazität war in der pAVK-Gruppe hoch signifikant ( $p = 0,005$ ) niedriger als in der Kontrollgruppe oder im Gesamtkollektiv.

Die Mittelwerte lagen in der Kontrollgruppe mit 20,8 % deutlich über dem der pAVK-Gruppe (9,9 %) und auch über dem Mittelwert des Gesamtkollektivs (15,1 %). (Siehe Tab. 2)

**Tab. 2:** Baseline-Charakteristika der pAVK-Gruppe und der Kontrollgruppe

	<b>pAVK-Gruppe</b>	<b>Kontrollgruppe</b>	<b>Signifikanz</b>
<b>Demographie</b>			
Anzahl (n)	42	30	
Alter (Jahre)	73,7 ± 11,0	61,6 ± 12,2	<b>&lt; 0,001</b>
Männlich (%)	76,1 (n=30)	50,0 (n=15)	<b>0,020</b>
Größe (cm)	172,6 ± 7,1	170,7 ± 8,9	0,334
Gewicht (kg)	80,0 ± 14,7	82,8 ± 21,5	0,544
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,7 ± 3,9	28,3 ± 6,0	0,214
<b>Laborwerte</b>			
Cholesterin (mg/dl)	160,8 ± 52,1	209,3 ± 53,5	<b>&lt; 0,001</b>
LDL (mg/dl)	95,3 ± 44,5	134,3 ± 45,7	<b>0,001</b>
Triglyceride (mg/dl)	115,9 ± 55,0	162,7 ± 121,7	0,059
HDL (mg/dl)	52,5 ± 15,4	49,8 ± 14,0	0,454
eGFR (ml/Min)	59,9 ± 14,5	63,5 ± 11,5	0,262
CRP (mg/l)	18,9 ± 33,4	24,5 ± 33,4	0,542
Leukozyten (G/l)	8,5 ± 2,9	7,6 ± 3,6	0,545
TSH (µU/ml)	2,8 ± 4,9	1,6 ± 1,3	0,183
<b>Risikofaktoren</b>			
Hypertonie (%)	78,5 (n=33)	53,3 (n=16)	<b>0,019</b>
Diabetes (%)	33,3 (n=14)	30,0 (n=9)	0,663
Übergewicht (%)	61,9 (n=26)	67,7 (n=20)	0,730
Raucher (%)	45,2 (n=19)	43,3 (n=1)	0,777
<b>Medikamente</b>			
Statine (%)	88,1 (n=35)	26,6 (n=8)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Auflösungskapazität</b>			
CCDC (%)	9,9 ± 10,5	20,8 ± 15,3	<b>0,005</b>

### 3.3 Unterteilung nach Auflösungskapazität

Zur weiteren Untersuchung erfolgte die Unterteilung des Patientenkollektivs – je nach CCDC-Wert – in zwei Gruppen. Dabei wurde das Gesamtkollektiv anhand des Mittelwertes (15,1 %) für CCDC in zwei Gruppen unterteilt. So lag der Mittelwert der Auflösungskapazität der Low-CCDC Gruppe bei 4,1 % und die der High-CCDC Gruppe bei 23,8 %.

Weniger als 50 % der High-CCDC Gruppe waren männlich (48,6 %). Im Gegensatz dazu enthielt die Low-CCDC Gruppe 78,1 % männliche Patienten ( $p = 0,008$ ).

Zwar gab es auch numerische Unterschiede im Alter, dem Gewicht, der Größe und dem BMI, davon zeigte sich jedoch lediglich der Größenunterschied statistisch signifikant ( $p = 0,030$ ).

Patienten der High-CCDC Gruppe hatten im Vergleich zur Low-CCDC Gruppe statistisch signifikant höhere LDL-Werte (125,3 mg/dl vs. 98,7 mg/dl,  $p = 0,043$ ).

Ca. 75 % der Patienten innerhalb der Low-CCDC Gruppe hatten Übergewicht. Im Gegensatz dazu war bei nur ca. 50 % der High-CCDC Gruppe ein BMI  $> 25 \text{ kg/m}^2$  (53,1 %,  $p = 0,035$ ) vorhanden.

In der Low-CCDC Gruppe zeigten signifikant mehr Patienten eine Statintherapie als in der Vergleichsgruppe (45,5 % vs. 75 %,  $p = 0,003$ ).

40 % der High-CCDC Gruppe hatten eine diagnostizierte pAVK. Die Anzahl der pAVK-Erkrankten in der Low-CCDC Gruppe war mit 68,8 % signifikant ( $p = 0,034$ ) höher.

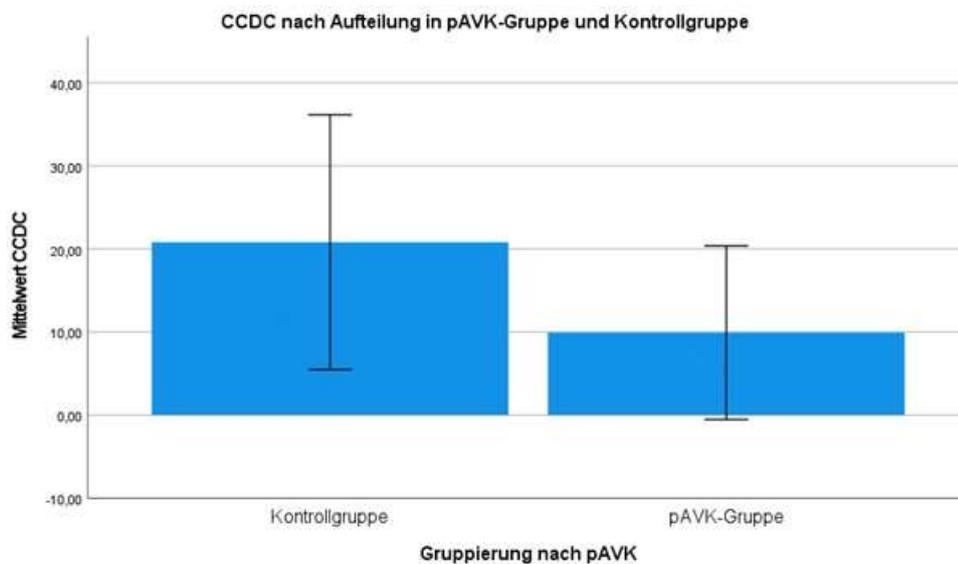
In allen weiteren Baselinecharakteristika konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, wie die nachfolgende Tabelle 3 zeigt. Es sind Patienten in die Gruppen „Low-CCDC“ sowie „High-CCDC“ aufgeteilt und die jeweilige Signifikanz der untersuchten Parameter aufgelistet.

**Tab.3:** Baseline-Charakteristika nach Auflösungskapazität

	<b>Low-CCDC</b>	<b>High CCDC</b>	<b>Signifikanz</b>
<b>Demographie</b>			
Anzahl (n)	32	40	
Alter (Jahre)	70,1 ± 13,5	65,6 ± 12,2	0,148
Männlich (%)	78,4 (n=25)	47,5 (n=19)	<b>0,008</b>
Größe (cm)	173 ± 7,2	169,6 ± 8,2	<b>0,030</b>
Gewicht (kg)	85,2 ± 15,5	77,6 ± 20,0	0,100
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,1 ± 4,1	26,8 ± 5,9	0,305
<b>Laborwerte</b>			
Cholesterin (mg/dl)	173,9 ± 57,5	192,69 ± 57,3	0,179
LDL (mg/dl)	102,0 ± 48,5	125,6 ± 46,7	<b>0,043</b>
Triglyceride (mg/dl)	129,7 ± 72,0	146,1 ± 115,3	0,482
HDL (mg/dl)	59,8 ± 14,6	52,9 ± 14,9	0,371
eGFR (ml/Min)	59,8 ± 14,7	63,6 ± 11,3	0,222
CRP (mg/l)	23,5 ± 36,3	18,5 ± 30,3	0,574
Leukozyten (G/l)	7,8 ± 2,8	8,4 ± 3,7	0,530
TSH (µU/ml)	2,7 ± 5,0	1,7 ± 1,4	0,269
<b>Risikofaktoren</b>			
Hypertonie (%)	68,7 (n=21)	65,0 (n=26)	0,868
Diabetes (%)	34,4 (n=11)	27,5 (n=11)	0,550
Übergewicht (%)	78,1 (n=25)	52,5 (n=21)	<b>0,035</b>
Raucher (%)	43,7 (n=14)	42,5 (n=17)	0,893
<b>Medikamente</b>			
Statine (%)	75,0 (n=24)	40,0 (n=16)	<b>0,003</b>
<b>Auflösungskapazität</b>			
CCDC (%)	5,2 ± 7,3	25,4 ± 11,8	<b>&lt; 0,001</b>
<b>pAVK</b>	65	40	<b>0,035</b>

### 3.4 Primärer Endpunkt

Die Kapazität Cholesterinkristalle aufzulösen war in beiden Gruppen statistisch hochsignifikant unterschiedlich. Patienten mit pAVK lösten die Cholesterinkristalle im Mittel deutlich schlechter auf. Patienten ohne pAVK zeigten einen CCDC-Wert von 20,8 %, Patienten mit pAVK einen Wert von 9,9 %, was einem Signifikanzniveau von  $p = 0,005$  entspricht. Dies zeigt Abbildung 4 deutlich.



**Abb. 4:** CCDC nach Aufteilung in pAVK-Gruppe und Kontrollgruppe

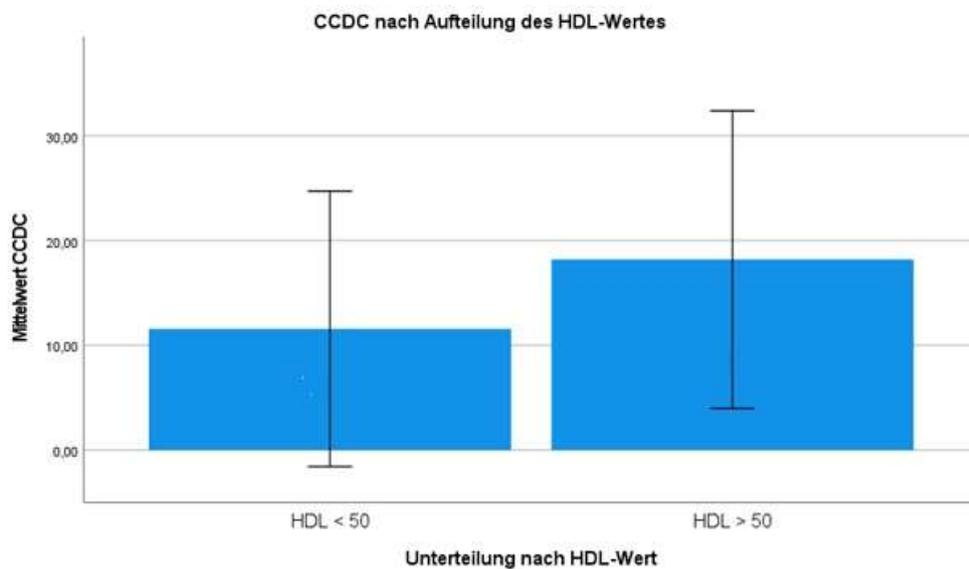
Auf der Y-Achse ist der Mittelwert der CCDC aufgetragen. Die X-Achse zeigt die Aufteilung in die Kontrollgruppe (n=30) sowie der Gruppe der Patienten mit pAVK (n=42). Der Mittelwert beträgt für die Kontrollgruppe  $20,8 \pm 16,7$  und für die Gruppe der pAVK-Patienten  $9,9 \pm 10,3$ .

### 3.5 Weitere Ergebnisse

Da der HDL-Wert als protektiver Faktor in der Entstehung der pAVK gilt, wurde dieser ebenfalls in Bezug auf die CCDC untersucht. Die Gesamtkorrelation (nach Pearson) lag dabei bei 0,119 (Signifikanz 0,321)

Weiterhin wurden die Patienten nach ihrem HDL-Wert in zwei Gruppen unterteilt. Hier lag der Trennwert bei 50 mg/dl.

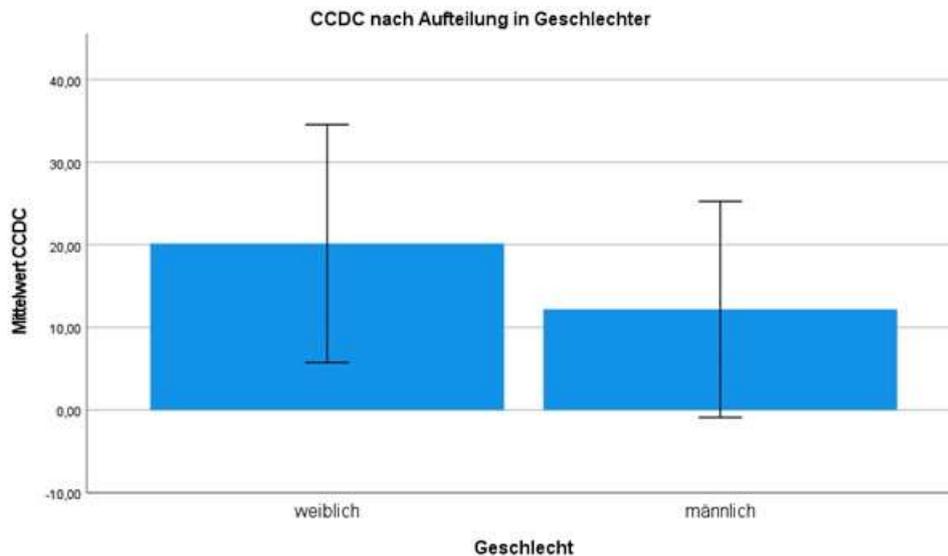
Die Gruppe mit einem HDL-Wert > 50mg/dl hatte hier eine höhere Auflösungskapazität (18,1 %) als die Gruppe mit einem geringeren Wert (10,2 %,  $p = 0,040$ ). (Abb. 5)



**Abb. 5:** CCDC nach Aufteilung des HDL-Wertes

Diese Grafik zeigt die Mittelwerte der CCDC (Y-Achse) in Bezug auf die HDL-Werte, aufgeteilt in eine Gruppe über 50mg/dl ( $n= 38$ ) und eine Gruppe unter 50 mg/dl ( $n=34$ ) (X-Achse). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Der Mittelwert beträgt für die Gruppe mit einem HDL-Wert > **50mg/dl 18,1 ± 13,0** und für die Gruppe mit einem HDL-Wert > **50mg/dl 10,2 ± 16,1**.

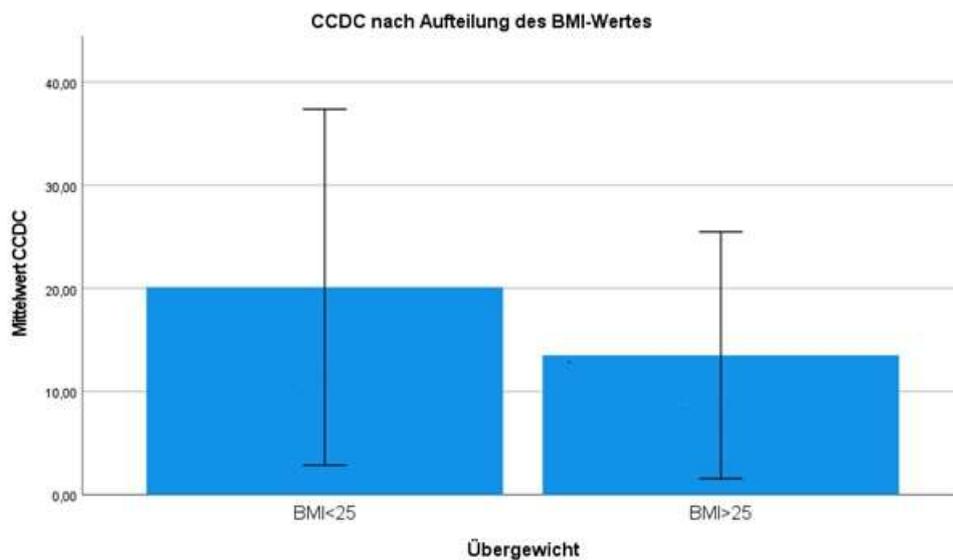
Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der CCDC zwischen den Geschlechtern. Wie Abbildung 6 zeigt lag die CCDC der Frauen dabei mit 20,2 % deutlich über den 12,2 % der Männer ( $p = 0,024$ ).



**Abb. 6:** CCDC nach Aufteilung in Geschlechter

Auf der Y-Achse sind die Mittelwerte der CCDC mit der Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben. Die X-Achse unterteilt die Patienten nach dem jeweiligen Geschlecht in männlich ( $n=43$ ) und weiblich ( $n=29$ ). Der Mittelwert beträgt für das männliche Geschlecht  $12,2 \pm 14,8$  und für weibliche Geschlecht  $20,2 \pm 14,4$

Auch ging ein  $\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$  mit einer schlechteren CCDC einher als ein  $\text{BMI} < 25$ . Abbildung 7 zeigt die Unterteilung der Gruppen nach den BMI-Werten. Dabei zeigte sich in der Gruppe mit einem  $\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$  eine CCDC von 13,5% und in der Gruppe mit  $\text{BMI} < 25$  eine CCDC von 20,1%. Das Signifikanzniveau lag dabei bei  $p = 0,034$ .



**Abb. 7:** CCDC nach Aufteilung des BMI-Wertes

Auf der Y-Achse ist der Mittelwert der CCDC mit der Standardabweichung aufgetragen. Die X-Achse zeigt die Aufteilung nach BMI-Wert ( $> 25 \text{ kg/m}^2$  ( $n=46$ ) und  $< 25 \text{ kg/m}^2$  ( $n=26$ )).

Der Mittelwert beträgt für einen BMI-Wert  $> 25 \text{ kg/m}^2$   $13,5 \pm 13,4$  und für einen BMI-Wert  $< 25 \text{ kg/m}^2$   $20,1 \pm 18,1$ .

Es bestand zu dem eine negative Korrelation ( $- 0,236$  nach Pearson) mit einer Signifikanz von  $p = 0,049$  zwischen einem steigenden CCDC-Wert und dem Alter wie Tabelle 4 unten ausführlich zeigt.

**Tab. 4:** CCDC in Korrelation zum Alter

		CCDC	Alter
CCDC	Korrelation nach Pearson	1	-,236*
	Signifikanz (2-seitig)		,049
	N	72	70
Alter	Korrelation nach Pearson	-,236*	1
	Signifikanz (2-seitig)	,049	
	N	70	70

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal, die Auflösungskapazität des Serums von Cholesterinkristallen im Hinblick auf einen Zusammenhang mit der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit untersucht. Hierfür erfolgte die Untersuchung von arteriellem Serum in einem Kollektiv von 42 symptomatischen pAVK-Patienten im Vergleich mit einer gefäßgesunden Kontrollgruppe. Die Auflösungskapazität war hierbei in der pAVK-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe oder im Gesamtkollektiv. Probanden mit niedriger CCDC litten signifikant häufiger an einer peripheren Verschlusskrankheit. Die Ergebnisse könnten für die Diagnostik und Therapie der pAVK im Speziellen, aber auch der Arteriosklerose in allen anderen Gefäßbetten, wie beispielsweise der koronaren Herzerkrankung oder der zerebralen Verschlusskrankheit, neue Wege eröffnen.

So könnte die CCDC einen potentiellen neuen Biomarker für die Entstehung und das Fortschreiten der pAVK darstellen. Weiterhin könnte das Verständnis der Pathogenese der Arteriosklerose verbessert werden. Die Akkumulation von Cholesterin und Lipoproteinen in der vorgeschädigten Gefäßwand stellt einen zentralen Mechanismus in der Aktivierung der vaskulären Entzündungsreaktion dar, die heute in den Fokus der pathophysiologischen Erklärungsmuster der Arteriosklerose gerückt ist (Wolf et al., 2014). Die Auflösungskapazität für eben jene Cholesterinkristalle, die ein zentrales auslösendes Agens (Duewell et al., 2010) der Immunreaktion in der Gefäßwand darstellen, bietet hier eine völlig neue diagnostische Perspektive.

Dieser potentielle neue Biomarker könnte die bisherige Diagnostik der pAVK entscheidend ergänzen. Insbesondere im Bereich der Primärprävention könnten die individualisierte Prognoseabschätzung vereinfacht und Therapieindikationen differenzierter gestellt werden. So könnte eine gute Cholesterinkristall-Auflösungskapazität einen Patienten mit mittlerem kardiovaskulärem Risiko in eine niedrigere Kategorie überführen und gegebenenfalls die Therapieindikation zurückstellen, während eine schlechte Auflösungskapazität bei diesem Patienten ein aggressiveres Vorgehen mit medikamentöser Cholesterinsenkung und gegebenenfalls Thrombozythenaggregationshemmung begründen könnte (Deutsche Gesellschaft für Angiologie, 2015).

Sollte sich die CCDC pharmakologisch beeinflussen lassen, stünde neben der klassischen Cholesterinsenkung gegebenenfalls ein gänzlich neuer therapeutischer Ansatz zur Verfügung. Zudem müsste man die Faktoren, welche die CCDC vermitteln und beeinflussen, in weiteren Studien detektieren. Vor dem Hintergrund der weiterhin bestehenden Unterversorgung eines Großteils der pAVK-Patienten mit cholesterinsenkender Therapie könnte sich hier eine Chance zur Verbesserung der Versorgungslage bieten.

In weiteren Studien muss untersucht werden, in welchem Zusammenhang die CCDC zu den bisher bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren steht. So könnte die CCDC zum Beispiel in positivem Zusammenhang mit der Höhe des HDL-Wertes oder der HDL-Funktion stehen und von dieser beeinflusst werden. Bekannte Risikofaktoren wie Rauchen, erhöhtes LDL, niedriges HDL oder eine arterielle Hypertonie (Herrington et al., 2016), könnten direkten oder indirekten Einfluss auf die Auflösungskapazität haben. Aber auch ein umgekehrter Einfluss ist denkbar. So könnte eine gute Auflösungskapazität bei Menschen dazu führen, dass andere Risikofaktoren weniger Einfluss auf die Entstehung der pAVK haben als bei Menschen mit einer geringeren Auflösungskapazität. Unsere Studie legt einen Zusammenhang zwischen der Höhe des HDL-Cholesterins und der CCDC nahe. Ein Einfluss der Höhe des Gesamtcholesterins, des LDL-Cholesterins, der Triglyceride, des Nikotinkonsums oder anderer Begleiterkrankungen wie der arteriellen Hypertonie oder des Diabetes mellitus auf die CCDC ließ sich nicht nachweisen. Unsere Untersuchung war jedoch auch nicht für diese weiteren Fragestellungen ausgelegt. Es sind größere Stichproben erforderlich um direkte aber auch indirekte Einflussfaktoren auf die CCDC mit ausreichender statistischer Sicherheit nachweisen zu können.

Auch die prognostische Aussagekraft der CCDC könnte im weiteren Verlauf untersucht und genutzt werden. So könnte die Auflösungskapazität, wie oben bereits dargelegt, genutzt werden, um bei Patienten ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer pAVK zu erkennen und diese prophylaktisch zu therapieren bevor die Erkrankung zu Symptomen geführt hat. Auch eine individualisierte Therapiesteuerung anhand der CCDC wäre denkbar. Hierfür sind weitere, prospektive Untersuchungen notwendig. Der Einfluss

verschiedener Medikamentengruppen, wie beispielsweise der Statine, der Bempedoin-säure, des Ezetimib oder der PCSK9-modulierenden Therapeutika, die derzeit die Hauptrolle der Therapie der pAVK spielen (Yadav et al 2016) oder weitere Einflussfaktoren auf die CCDC müsste abgegrenzt werden.

Auch im Rahmen der Primärprävention könnte der neue Biomarker eine wichtige Rolle mit großer gesellschaftlicher Tragweite spielen. Vergleichbar zum Lipoprotein(a) könnte, einmalig in Lebenszeit bestimmt, das Risiko zur Entstehung der pAVK abgeschätzt und Untersuchungsintervalle oder prophylaktische Maßnahmen eingeleitet werden (Wilson et al, 2019). Dies erscheint derzeit vor allem für Patienten mit familiärer Disposition ohne eindeutig abgrenzbares pathophysiologisches Korrelat vielversprechend. Voraussetzung hierfür wäre eine intraindividuelle Stabilität der Auflösungskapazität im Langzeitverlauf. Weiterhin wurden in dieser Studie weder der individuelle Krankheitsverlauf noch Outcome der Patienten untersucht. Dies sollte in weiteren Studien getan werden um die CCDC auch im Hinblick auf eine Prognose für das Outcome zu untersuchen

Die in unsere Studie eingeschlossenen Patienten zeigen ein mit ähnlichen Studienpopulationen vergleichbares Risikoprofil. Bei den insgesamt älteren Patienten konnten gehäuft deutlich erhöhte Blutfettwerte sowie eine arterielle Hypertonie und Adipositas dokumentiert werden. So liegen vor allem das Gesamtcholesterin, das LDL-Cholesterin sowie die Triglyceride über den, in internationalen Leitlinien empfohlenen Normwerten.

Die im Mittel deutliche Erhöhung des CRP als Entzündungsmarker kann bei normwertigen Leukozyten und fehlender Infektsymptomatik am ehesten auf den chronischen Inflammationsprozess der generalisierten arteriellen Verschlusskrankheit zurückgeführt werden.

#### 4.1 Periphere Arterielle Verschlusskrankheit

Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die CCDC bei Patienten mit pAVK signifikant schlechter ist, als in der gefäßgesunden Kontrollgruppe.

Insgesamt zeigen sich die Kontrollgruppe und die pAVK-Gruppe hinsichtlich ihrer Patientencharakteristika zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses ausgeglichen zusammengesetzt. Es gibt einige Risikofaktoren der pAVK, wie arterielle Hypertonie, männliches Geschlecht sowie das höhere Alter, die signifikant häufiger in der pAVK-Gruppe vorkommen. Die weiteren bekannten Risikofaktoren für die Entstehung einer pAVK wie Diabetes mellitus, Übergewicht und der aktive, inhalative Nikotinkonsum zeigen sich in beiden Gruppen ausgeglichen verteilt. Weiterhin sind die Gesamtcholesterinwerte, ebenfalls ein bekannter Risikofaktor, in der Kontrollgruppe sogar signifikant höher.

Der Altersunterschied zwischen beiden Gruppen lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass die Symptome der pAVK im Verlauf der Erkrankung und mit zunehmendem Alter zunehmen und nur Patienten eingeschlossen wurden, die auf Grund einer pAVK-typischen Symptomatik interventionsbedürftig waren. Die Untersuchungen in der Kontrollgruppe hingegen erfolgte zum Beispiel zum Ausschluss einer koronaren Herzkrankheit bei akutem Koronarsyndrom oder als präoperative Diagnostik. In der Kontrollgruppe erhielten 20 % der Patienten die Herzkatheteruntersuchung präoperativ bei Aortenaneurysma, 35 % bei akutem Koronarsyndrom oder hypertensiver Krise ohne diagnostizierte KHK, 15 % bei Dyspnoe durch Mitralklappenprolaps und 10 % bei Endokarditis mit valvulärer Insuffizienz. Diese Erkrankungen treten auch bei jüngeren Patienten auf, so dass die Kontrollgruppe insgesamt jünger war.

Die signifikant höheren Cholesterinwerte der Kontrollgruppe könnten auf eine Unabhängigkeit der Auflösungskapazität vom Cholesterinspiegel im Blut hinweisen. Die Aussagekraft wird jedoch durch die Patientenauswahl eingeschränkt. So erhielten circa 30 % der Patienten in der Kontrollgruppe eine notfallmäßige Herzkatheteruntersuchung. Die Untersuchungen der Patienten in der pAVK-Gruppe hingegen erfolgten allesamt elektiv. So ist nicht geklärt, ob alle Patienten im Kontrollkollektiv vor der Untersuchung nüchtern waren. Daher könnte die Nahrungsaufnahme vor Intervention die höheren Cholesterinwerte erklären und die Aussagekraft einschränken. Eine weitere mögliche Erklärung liegt in der bereits präinterventionell begonnenen Statintherapie. Die Patienten

der pAVK-Gruppe hatten insgesamt signifikant häufiger eine Statintherapie (89,2 %) als die Patienten der Kontrollgruppe (26,2 %). Da Statine nachweislich den Cholesterinspiegel senken, wären die Unterschiede auch dadurch erklärbar.

Eine Subgruppenanalyse zwischen Statin-vorthera-pierten und Statin-naiven Patienten war aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich.

Im Hinblick auf den primären Endpunkt ist zu beachten, dass die Patienten mit der schlechteren Auflösungskapazität, also die pAVK-Patienten, im Vergleich mit der Kontrollgruppe älter und mit mehr Vorerkrankungen belastet waren. Dies erhöht die Aussagekraft der vorliegenden Untersuchung.

#### 4.2 Auflösungskapazität

Eine Analyse des Kollektivs, getrennt nach der Auflösungskapazität, unterstützt die Aussage der primären Auswertung. Auch hier zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Prävalenz des männlichen Geschlechtes sowie des LDL-Wertes zugunsten der Low-CCDC Gruppe.

Das männliche Geschlecht ist nicht nur in der pAVK-Gruppe signifikant häufiger vertreten, sondern auch in der Low-CCDC-Gruppe. Es liegt also eine mögliche Assoziation zwischen der Auflösungskapazität, dem Geschlecht, sowie der Entstehung einer pAVK vor.

Die höheren Werte für LDL lassen sich, wie bereits im Abschnitt zuvor durch die Rekrutierung der Patienten sowie die Statintherapie erklären.

Auffällig in dieser Patientenaufteilung ist das Übergewicht. Es zeigt sich, dass die Low-CCDC Gruppe häufiger einen BMI über 25 kg/m<sup>2</sup> aufweist. Da der BMI insgesamt ausgeglichen zwischen beiden Gruppen ist, besteht also eine mögliche Assoziation zwischen Übergewicht und Auflösungskapazität.

### 4.3 HDL

Wie bereits erwähnt, gilt ein niedriger HDL-Cholesterin-Spiegel, im Sinne eines inflammatorischen Markers, als Risikofaktor für die Entstehung einer pAVK (Daskalopoulou et al, 2008). Das HDL-Cholesterin zeigte sich sowohl in der pAVK-Gruppe als auch in der Low-CCDC-Gruppe numerisch höher, ohne jedoch das vordefinierte Signifikanzniveau zu erreichen.

Eine Analyse des Kollektivs, dichotom getrennt nach HDL-Cholesterin ( $> 50\text{mg/dl}$  und  $< 50\text{ mg/dl}$ ), ergibt einen signifikanten Unterschied. Die Patientengruppe mit einem HDL-Cholesterin über  $50\text{ mg/dl}$  hatten eine signifikant bessere Auflösungskapazität. In der Korrelationsanalyse zeigte sich keine direkte Korrelation (Koeffizient  $0,119$  nach Pearson) zwischen HDL-Cholesterin und Auflösungskapazität.

### 4.4 Limitationen

Die vorliegende Studie untersuchte erstmals den Zusammenhang zwischen der Kapazität humanen Serums Cholesterinkristalle aufzulösen und dem Vorliegen einer pAVK. Die untersuchten Blutproben wurden hierbei bei symptomatischen pAVK-Patienten und Kontrollprobanden aus dem arteriellen Zugang entnommen. Die Vergleichsgruppe besteht dabei aus Patienten, die aus sehr heterogener Indikation einer invasiven, arteriellen Diagnostik unterzogen wurden. Dies war dem Ziel geschuldet, arterielle Vergleichsproben zu gewinnen, schränkt möglicherweise die Aussagekraft aber ein. Auch das monozentrische Studiendesign und die limitierte Fallzahl stellen mögliche Limitationen der Studie dar.

Unklar ist außerdem wie konstant die Auflösungskapazität eines Patienten intraindividuell im zeitlichen Verlauf ist und welchen Einflussfaktoren diese unterliegt. Es fehlt bisher eine Untersuchung der Auflösungskapazität im longitudinalen Verlauf um eventuelle, intraindividuelle Veränderungen der Auflösungskapazität feststellen zu können. Auf Grund der limitierten Fallzahl konnten zudem weitere Einflussfaktoren wie zum Beispiel Medikamente, Tumor-, oder chronisch entzündliche Erkrankungen nicht untersucht werden. Hier wäre vor allem ein möglicher Einfluss von Statinen auf die

Auflösungskapazität zu untersuchen. Dafür wären weitere Studien mit größeren Fallzahlen hilfreich.

Weiterhin ist die Frage der Kausalität bislang unbeantwortet. Zu klären bleibt, ob eine schlechte CCDC den Ausgangspunkt der Entstehung einer Arteriosklerose darstellt, oder ob eine schlechte Auflösungskapazität Folge und Ausdruck eines gegebenenfalls generalisierten arteriosklerotischen Prozesses beziehungsweise weiterer klinischer Risikofaktoren ist. Zur Klärung der Kausalität sind weitere, grundlagenwissenschaftliche Arbeiten und größere klinische Studien notwendig.

Eine weitere, im klinischen Kontext relevante Limitation ist das Fehlen des Knöchel-Arm-Index (ABI) im Kontrollkollektiv. Somit konnte der Zusammenhang zwischen der Auflösungskapazität und diesem, in der pAVK-Diagnostik zentralen, weit verbreiteten, gut validierten und prognostisch wichtigen Faktor nicht untersucht werden.

Da dieser Test eine völlig neue Untersuchungsmethode darstellt gibt es derzeit keinerlei vergleichbare Tests, in denen die gewonnenen Ergebnisse korreliert werden könnten.

## 5. Zusammenfassung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit zeigt sowohl in Deutschland als auch weltweit eine hohe Prävalenz. Insbesondere in den fortgeschrittenen Stadien bestehen hohe Amputationsraten und eine hohe Sterblichkeit. Nichtsdestotrotz ist die pAVK, auch in Deutschland, unverändert unterdiagnostiziert und untertherapiert (Reinecke et al., 2015). Daher könnte ein neuer Biomarker die Diagnose einfacher und früher stellen. Und sollte die CCDC beeinflussbar sein, würde ein neuer Therapieansatz die Therapie der Patienten vereinfachen.

Die vorliegende Arbeit geht erstmalig der Fragestellung nach, ob die Messung der CCDC im Blut mit dem Vorliegen der pAVK korreliert. Zusätzlich sollen Einflussfaktoren auf die CCDC herausgearbeitet werden. Schließlich soll die Frage beantwortet werden, ob dieser Parameter gegebenenfalls einen neuen Biomarker bei der Diagnose der pAVK darstellen könnte.

Die Ergebnisse unserer Studie weisen einen Zusammenhang zwischen der Auflösungskapazität und dem Vorhandensein einer pAVK bei symptomatischen Patienten nach. Patienten mit einer diagnostizierten, symptomatischen, peripheren arteriellen Verschlusskrankheit zeigten eine signifikant schlechtere Auflösungskapazität als die Patienten der Kontrollgruppe, die nicht an einer pAVK erkrankt waren. Patienten mit schlechter CCDC waren signifikant häufiger an einer pAVK erkrankt. Dies legt nahe, dass die Untersuchung der Auflösungskapazität als Biomarker für die Entstehung einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit vielversprechend sein kann. Um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen und weitere Einflussfaktoren herauszuarbeiten, müssten weitere Studien erfolgen. Der prognostische Nutzen muss in einer prospektiven Studie untersucht werden.

Auch die intraindividuelle, zeitliche Konstanz der Auflösungskapazität untersucht sollte werden.

Ebenfalls könnte und sollte der Zusammenhang zwischen der Auflösungskapazität und weiteren, durch Arteriosklerose verursachten Erkrankungen, wie der koronaren Herzkrankheit sowie der zentralen arteriellen Verschlusskrankheit erforscht werden.

Eine standardisierte angiologische Untersuchung aller Patienten, einschließlich der Kontrollgruppe, ist hierbei anzustreben. Sollte so ein prognostischer Nutzen der

Bestimmung der Cholesterinkristall-Auflösungskapazität nachgewiesen werden können, so eröffnet dies in Diagnostik und vielleicht Therapie der Arteriosklerose völlig neue Perspektiven.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Probenvorbereitung zur Messung	16
Abbildung 2: 50 % - Bereich der Cholesterinkristalle ohne Serum und ermittelter Bereich des Serums ohne Cholesterinkristalle	17
Abbildung 3: Messbereich bei 0 und 2 Stunden	18
Abbildung 4: CCDC nach Aufteilung in pAVK-Gruppe und Kontrollgruppe	26
Abbildung 5: CCDC nach Aufteilung des HDL-Wertes	27
Abbildung 6: CCDC nach Aufteilung in Geschlechter	28
Abbildung 7: CCDC nach Aufteilung des BMI-Wertes	29

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Baseline-Charakteristika des Gesamtkollektivs	21
Tabelle 2: Baseline-Charakteristika der pAVK-Gruppe und der Kontrollgruppe	23
Tabelle 3: Baseline-Charakteristika nach Auflösungskapazität	25
Tabelle 4: CCDC in Korrelation zum Alter	29

## 8. Literaturverzeichnis

Abela G S. Cholesterol crystals piercing the arterial plaque and intima trigger local and systemic inflammation. *J Clin Lipidol* 2010; 4: 156–164

Abela G S, Aziz K. Cholesterol crystals cause mechanical damage to biological membranes: a proposed mechanism of plaque rupture and erosion leading to arterial thrombosis. *J Clin Cardiol* 2005; 28: 413–420

Abela G S, Aziz K. Cholesterol crystals rupture biological membranes and human plaques during acute cardiovascular events--a novel insight into plaque rupture by scanning electron microscopy. *Scanning* 2006; 28: 1–10

Bundesministerium für Gesundheit 2021: Rauchen.  
<https://www.bundesgesundheitsministerium.de/service/begriffe-von-a-z/r/rauchen.html?fbclid=IwAR2r8G-RdeCGUXtPqELbQ4kj9xPeFRcDsCOUTAic3sF9IQEDxs5dpyf12H0#:~:text=In%20Deutschland%20rauchen%20insgesamt%2023,in%20der%20Raucherquote%20zu%20beobachten> (Zugriffsdatum 22.02.2021)

Criqui M H, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circulation research* 2015; 116: 1509–1526

Daskalopoulou S S, Pathmarajah M, Kakkos S K, et al. Association between ankle-brachial index and risk factor profile in patients newly diagnosed with intermittent claudication. *Circulation Journal* 2008; 72: 441-448

Davies M J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart - British Cardiac Society* 2000; 83: 361-366

Deutsche Gesellschaft für Angiologie, Gesellschaft für Gefäßmedizin. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. 2015

Devy L, Brunet-Possenti F, Cholesterol Embolization after Transcatheter Aortic-Valve Replacement. *NEJM* 2016; 375: e25

Diehm C, Allenberg J R, Pittrow D, Mahn M, Tepohl G, Haberl R L, et al. Mortality and vascular morbidity in older adults with asymptomatic versus symptomatic peripheral artery disease. *Circulation* 2009; 120: 2053-2061

Dr. med. Ernst Gröchenig Periphere arterielle Verschlusskrankheit. *ARS MEDICI* 2009

Duewell P, Kono H, Rayner K J, Sirois C M, Vladimer G, Bauernfeind F G, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; 464: 1357-1361

Emdin C A, Anderson S G, Callender T, Conrad N, Salimi-Khorshidi G, Mohseni H, et al. Usual blood pressure, peripheral arterial disease, and vascular risk: cohort study of 4.2 million adults. *BMJ* 2015; 351

Fowkes, F G R, Murray G D, Butcher I, Heald C L, Lee R J, Chambless L E, et al. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA* 2008; 300: 197-208

Fowkes F G R, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg J O, McDermott M M, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 2013; 382: 1329-1340

Gallino A, Aboyans V, Diehm C, Cosentino F, Stricker H, Falk E, et al. Non-coronary atherosclerosis. *Eur Heart J* 2014; 35: 1112-1119

getABI Study group. German epidemiological trial on ankle brachial index for elderly patients in family practice to detect peripheral arterial disease, significant marker for high mortality. *VASA* 2002; 31: 241-248

Gordon D J, Probstfield J L, Garrison R J, Neaton J D, Castelli W P, Knoke J D, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79: 8-15

Grebe A, Latz E. Cholesterol crystals and inflammation. *Current rheumatology reports* 2013; 15: 313

Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circulation research* 2016; 118: 535-546

Howard D P J, Banerjee A, Fairhead J F, Hands L, Silver L E, Rothwell P M. Population-Based Study of Incidence, Risk Factors, Outcome, and Prognosis of Ischemic Peripheral Arterial Events: Implications for Prevention. *Circulation* 2015; 132: 1805-1815

Joosten M M, Pai J K, Bertoia M L, Rimm E B, Spiegelman D, Mittleman M A, Mukamal K J. Associations between conventional cardiovascular risk factors and risk of peripheral artery disease in men. *JAMA* 2012; 308: 1660-1667

Jude E B, Oyibo S O, Chalmers N, Boulton A J. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes care* 2001; 24: 1433-1437

Krause D, Burghaus I, Thiem U, Trampisch U S, Trampisch M, Klaassen-Mielke R, et al. The risk of peripheral artery disease in older adults - seven-year results of the getABI study. *VASA. Zeitschrift für Gefäßkrankheiten* 2016; 45: 403-410

Libby P, Ridker P M, Hansson G K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473:317-325

Ludwig, M. *Facharztwissen Angiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2020

Mach F, Baigent C, Catapano A L, Koskinas K C, Casula M, Badimon, Lina et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2020; 41: 111-188

Malyar N, Fürstenberg T, Wellmann J, Meyborg M, Lüders F, Gebauer K, et al. Recent trends in morbidity and in-hospital outcomes of in-patients with peripheral arterial disease: a nationwide population-based analysis. *Eur Heart J* 2013; 34: 2706-2714

Meves S H, Diehm C, Berger K, Pittrow D, Trampisch H-J, Burghaus I, et al. Peripheral arterial disease as an independent predictor for excess stroke morbidity and mortality in

primary-care patients: 5-year results of the getABI study. *Cerebrovascular diseases* 2010; 29: 546-554

Mourad J-J, Cacoub P, Collet J-P, Becker F, Pinel J-F, Huet D, et al. Screening of unrecognized peripheral arterial disease (PAD) using ankle-brachial index in high cardiovascular risk patients free from symptomatic PAD. *J Vasc Surg* 2009; 50: 572-580

Nahrendorf M. Myeloid cell contributions to cardiovascular health and disease. *Nature medicine* 2018; 24: 711-720

Nasiri M, Janoudi A, Vanderberg A, Frame M, Flegler C, Flegler S, Abela G S. Role of cholesterol crystals in atherosclerosis is unmasked by altering tissue preparation methods. *Microsc Res Tech* 2015; 78: 969-974

Reinecke H, Unrath M, Freisinger E, Bunzemeier H, Meyborg M, Lüders F, et al. Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence. *Eur Heart J* 2015; 36: 932-938

Ridker P M, Stampfer M J, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001; 285 : 2481-2485

Rohrer L, Hersberger M, von Eckardstein A. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 269-278

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 1999; 340: 115-126

Velescu A, Clara A, Peñafiel J, Grau M, Degano I R, Martí R, et al. Peripheral Arterial Disease Incidence and Associated Risk Factors in a Mediterranean Population-based Cohort. The REGICOR Study. *European journal of vascular and endovascular surgery: EJVES* 2016; 51: 696-705

Wang C, Li P, Xuan J, Zhu C, Liu J, Shan L, et al. Cholesterol Enhances Colorectal Cancer Progression via ROS Elevation and MAPK Signaling Pathway Activation. *Cell Physiol Biochem* 2017; 42: 729-742

Wilson D P, Jacobson T A, et al. Use of Lipoprotein(a) in a clinical practice: A biomarker whose time has com. A scientific statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol* 2019; 13: 374-392

Wolf D, Ley K. Immunität und Entzündung bei Arteriosklerose. *Herz* 2019; 44 (2): 107-120

Yadav K, Sharma M, Ferdinand K C. Proprotein convertase substilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors: Present perspectives and future horizons. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016; 26: 853-862

## **9. Danksagung**

Meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Thorsten Mahn, möchte ich für sein Engagement, seine fachkundige Beratung sowie die umfangreiche und zuverlässige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit recht herzlich danken.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Zimmer, danke ich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die konstruktive Unterstützung.

Herr Prof. Dr. med. Georg Nickenig danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation an seiner Klinik.