

Die Rolle von Sphingosin-1-phosphat und seinen Rezeptoren in Atherosklerose und Restenose bei pAVK-Patienten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Justus Maximilian Erich Werner Grewe

aus

Osnabrück

2024

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. med. Axel Larena-Avellaneda

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren

Mitglied der Prüfungskommission: Univ.-Prof. Dr. med. Ewa Klara Stürmer

Datum der mündlichen Prüfung: 27.03.2025

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Periphere arterielle Verschlusskrankheit</i>	2
1.1.1	Definition	2
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Ätiologie	2
1.1.4	Pathogenese: Atherosklerose	5
1.1.5	Klinik und Einteilung	8
1.1.6	Diagnostik	9
1.1.7	Therapie	10
1.1.8	Komplikationen und Nachsorge	13
1.2	<i>Sphingosin-1-phosphat</i>	14
1.2.1	Metabolismus	14
1.2.2	S1P-Rezeptoren	18
1.2.2.1	Die Rolle der S1P-Rezeptoren in der Atherogenese	18
1.2.2.2	Die Rolle der S1P-Rezeptoren in der Restenose	23
2	Fragestellung und Zielsetzung	26
3	Material und Methoden	27
3.1	<i>Studiendesign</i>	27
3.2	<i>Material</i>	30
3.2.1	Chemikalien und Reagenzien	30
3.2.2	Kits	31
3.2.3	Verbrauchsmaterialien	31
3.2.4	Geräte	32
3.2.5	Software	32
3.3	<i>Methoden</i>	33
3.3.1	Analyse der Genexpressionen	33
3.3.1.1	RNA-Isolation	33
3.3.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten RNA	34
3.3.1.3	cDNA-Synthese	35
3.3.1.4	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	36
3.3.2	Histologische Untersuchungen	40
3.3.2.1	Herstellung histologischer Präparate	40
3.3.2.2	Färbungen der Präparate	41
3.3.2.3	Digitalisierung der histologischen Präparate	44
3.3.2.4	Gruppeneinteilung anhand histomorphologischer Charakteristika	44
3.3.3	Bestimmung der Plasma- und Serum-S1P-Konzentrationen	47
3.3.4	Datenauswertung und statistische Methoden	48
4	Ergebnisse	49
4.1	<i>Erhobene Parameter der Gesamtstudienkohorte</i>	49
4.1.1	Epidemiologische Daten	49
4.1.2	Präoperative Medikation	49
4.1.3	Laborparameter	50
4.1.4	Klinisches Outcome	50
4.1.5	Einteilung der Plaques anhand der Histomorphologie	51
4.1.6	Genexpressionsdaten	51
4.2	<i>Vergleich der erhobenen Parameter zwischen den Subgruppen Outcome 0 und 152</i>	152
4.2.1	Epidemiologische Daten	52

4.2.2	Präoperative Medikation	53
4.2.3	Laborparameter	53
4.2.4	Einteilung der Plaques anhand der Histomorphologie	55
4.2.5	Genexpressionsdaten	56
4.3	<i>Untersuchung zur Assoziation der Genexpressionen in Vollwand und Plaque</i>	59
4.4	<i>Untersuchung zur Assoziation der Genexpressionen zwischen Vollwand und Plaque</i>	60
4.5	<i>Untersuchung zur Assoziation zwischen den Genexpressionen in der Vollwand und der Histomorphologie der Plaques</i>	61
4.6	<i>Untersuchung zum Einfluss der Statineinnahme auf das Lipidprofil und die Genexpression</i>	62
5	Diskussion	65
5.1	<i>Charakterisierung der Gesamtstudienkohorte</i>	65
5.2	<i>Vergleich der erhobenen Parameter zwischen den Patienten mit und ohne einer Restenose im Verlauf</i>	67
5.3	<i>Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren</i>	71
5.4	<i>Limitationen</i>	75
6	Zusammenfassung	77
7	Summary	78
8	Abkürzungsverzeichnis	79
9	Literaturverzeichnis	81
10	Abbildungsverzeichnis	96
11	Tabellenverzeichnis	97
12	Anhang	98
13	Danksagung	122
14	Lebenslauf	123
15	Eidesstattliche Erklärung	124

1 Einleitung

Im Jahr 2022 waren Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit 33,6 % die führende Todesursache in Deutschland und verursachten mit fast 50 Milliarden Euro die höchsten direkten Gesundheitskosten (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2023). Zu den wichtigsten Entitäten der Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören u.a. die koronare Herzkrankheit (KHK), die Karotisstenose und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Alle drei Krankheitsbilder sind im Wesentlichen auf die Folgen von Atherosklerose zurückzuführen. Diese ist eine komplexe Pathologie der arteriellen Gefäße, die durch Endotheldysfunktion, Cholesterin-Ablagerungen in den Gefäßwänden und chronische Entzündungsreaktionen charakterisiert ist. Klinisch manifest wird die Atherosklerose unter anderem durch eine Einengung des Gefäßlumens oder eine Plaqueruptur mit konsekutiver Thrombembolie. Aus der Stenose bzw. dem Gefäßverschluss resultieren Myokardinfarkt, Apoplex oder Extremitätenischämie (Espinola-Klein *et al.*, 2002).

Ein weiterhin bedeutsames Problem bei der Behandlung von Stenosen stellt der erneute Gefäßverschluss nach erfolgter Therapie - die Restenose - dar. Während die umfangreiche Forschung zu Risikofaktoren und Pathomechanismen primärer atherosklerotischer Läsionen bereits im frühen 20. Jahrhundert begann, startete die systematische Erforschung von Restenosen erst in den späten 1970er Jahren mit der Zunahme interventioneller und offen chirurgischer Therapien (Anitschkow, 1924, Cossman *et al.*, 1978). Auch wenn bereits wichtige Erkenntnisse gewonnen wurden, gibt es *bis dato* in der klinischen Versorgung abgesehen von drug-eluting Stents oder Balloons keine pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten, um gezielt Restenosen zu verhindern. Durch die Identifizierung von Risikofaktoren und zugrundeliegenden Pathomechanismen, könnte die Versorgung von Hochrisikopatienten beispielsweise durch engere Nachsorgetermine und eine patientenangepasste Pharmakotherapie verbessert werden (Tsigkas *et al.*, 2011).

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein natürliches, bioaktives Sphingolipid und spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese diverser Krankheitsbilder. Durch die Bindung von S1P an G-Protein-gekoppelte S1P-Rezeptoren (S1PR) werden wichtige Funktionen im Gefäßsystem reguliert. Dazu zählen Angiogenese, endotheliale Integrität sowie Zellmigration (Allende *et al.*, 2003, Kerage *et al.*, 2014, Weigert *et al.*, 2019). Darüber hinaus ist die Konzentration von S1P im Blutserum von Patienten mit einer pAVK oder einer Karotisstenose im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erniedrigt (Soltau *et al.*, 2016). Der aktuelle wissenschaftliche Kenntnisstand unterstreicht das Potential des S1P-Systems als potentiell Ziel für Biomarker zur Identifizierung von Hochrisikopatienten für Restenosen oder zur Entwicklung therapeutischer Ansätze zur Prävention von Restenosen nach vaskulären Eingriffen.

1.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit

1.1.1 Definition

Der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) liegt eine arterielle Durchblutungsstörung der Extremitäten zugrunde. Insbesondere die untere Extremität ist häufig von dieser Erkrankung betroffen. Die Durchblutung kann aufgrund einer Stenose partiell oder aufgrund einer Okklusion komplett unterbunden sein. Ursächlich für die meist chronische Erkrankung ist in circa 95 % der Fälle die Atherosklerose, während entzündliche, genetische und traumatische Ursachen eine untergeordnete Rolle spielen (Lawall *et al.*, 2015b).

1.1.2 Epidemiologie

Bei Betrachtung der epidemiologischen Daten muss beachtet werden, dass sich die Diagnosekriterien für die pAVK, nach denen die Patienten in Studien eingeschlossen wurden, im Laufe der Zeit verändert haben. Frühere Studien fokussierten sich v.a. auf das Leitsymptom Claudicatio intermittens (CI), den ischämischen Muskelschmerz, der stark belastungsabhängig ist. Die CI wurde z.B. mit Hilfe des San Diego Claudicatio Fragebogens erfasst (Criqui und Aboyans, 2015). Allerdings wird die Erkrankung nur in einem Viertel der Fälle symptomatisch (Norgren *et al.*, 2007). In aktuelleren Studien werden daher auch die asymptomatischen Patienten mittels der nicht-invasiven Bestimmung des Knöchel-Arm-Index („ankle brachial index“, ABI) (s. Kapitel 1.1.6) erfasst (Criqui und Aboyans, 2015). Eine pAVK wird dabei meist durch einen ABI < 0,9 definiert (Lawall *et al.*, 2015b).

Die Gesamtprävalenz der pAVK in Deutschland liegt bei 3 - 10 % und ist stark altersabhängig. So steigt diese mit einem höheren Lebensalter (> 70 J.) auf etwa 20 % an (Lawall *et al.*, 2015a). Zudem zeigt die Prävalenz der pAVK auch eine Geschlechterabhängigkeit: während Frauen in jüngeren Jahren seltener an einer pAVK erkranken, ist ihre Prävalenz etwa ab dem 75. Lebensjahr höher als die der Männer (Diehm *et al.*, 2004). Aufgrund des demographischen Wandels nimmt auch die Inzidenz der pAVK zu. Während im Jahr 2005 2,67 % aller Hospitalisierungen in Deutschland auf eine pAVK zurückzuführen war, erhöhte sich der Anteil im Jahr 2009 auf 3,0 % (Malyar *et al.*, 2013).

1.1.3 Ätiologie

In 95 % der Fälle ist die chronische pAVK eine Manifestationsform der Atherosklerose. Die Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose lassen sich in beeinflussbare und nicht beeinflussbare unterteilen (s. Tabelle 1) (Kuhlmann *et al.*, 2014).

Tabelle 1: Hauptrisikofaktoren der pAVK. Modifiziert nach Kuhlmann et al. 2014.

nicht beeinflussbar	beeinflussbar
Familiäre Vorbelastung	Nikotinabusus
Hohes Lebensalter	Diabetes mellitus
Männliches Geschlecht	Arterielle Hypertonie
Ethnische Herkunft	Dyslipidämie
	Adipositas

Vor allem die beeinflussbaren Risikofaktoren sind als Ziele der Primär- und Sekundärprävention klinisch relevant. In der derzeit in Überarbeitung befindlichen deutschen Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der pAVK wird der Nikotinabusus als wichtigster Risikofaktor genannt (Lawall et al., 2015b). Bereits im Jahr 1911 wurde erstmals die Beobachtung gemacht, dass die CI dreimal häufiger bei Rauchern als bei Nichtrauchern auftrat (Erb, 1911). Price et al. zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl an gerauchten Zigaretten in *Pack Years* (20 Zigaretten pro Tag über den Zeitraum eines Jahres entspricht einem *Pack Year*) und der Inzidenz. Während die Inzidenz der pAVK bei Nichtrauchern 2,6 % betrug, lag sie bei moderaten Rauchern (≤ 25 *Pack Years*) bei 4,5 % und bei starken Rauchern (> 25 *Pack Years*) bei 9,8 % (Price et al., 1999). Zudem konnte in einer Metaanalyse gezeigt werden, dass fortwährendes Rauchen nach einer Bypass-Operation zu einem dreifach erhöhten Risiko eines Transplantatversagens führt, während nach einem Rauchstopp selbst nach der Operation, die Offenheitsrate des Transplantats mit der von Nichtrauchern vergleichbar ist (Willigendael et al., 2005).

Im Rahmen der Framingham Heart Study konnte beobachtet werden, dass der Diabetes mellitus mit einem 2,6-fach erhöhten Risiko für eine CI einhergeht (Murabito et al., 1997). Zudem konnte bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des adulten glykierten Hämoglobins (HbA1c) und der Manifestation einer pAVK gefunden werden. In einer Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass das relative Risiko für das Auftreten einer pAVK sich bei einem Anstieg des HbA1c pro Prozentpunkt um 29 % erhöht (Zhang et al., 2012).

Ein weiterer beeinflussbarer und unabhängiger Risikofaktor der Atherosklerose ist die arterielle Hypertonie, die nach aktuellen Leitlinien durch einen systolischen Blutdruck ≥ 140 mmHg und/oder einen diastolischen Blutdruck ≥ 90 mmHg definiert wird (Criqui und Aboyans, 2015, Williams et al., 2018). In einer Beobachtungsstudie von Selvin et al. konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil an Hypertonikern bei Patienten mit pAVK im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant erhöht ist und Hypertoniker zudem ein rund 75 % höheres Risiko aufweisen, an einer pAVK zu erkranken (Selvin und Erlinger, 2004).

Ein weiterer Risikofaktor für die pAVK sind Dyslipidämien. Nach der aktuellen europäischen Leitlinie zur Behandlung von Dyslipidämien ist die Dyslipidämie durch ein abnormales Lipidprofil gekennzeichnet, das erhöhte Serumkonzentrationen von Gesamt-Cholesterin bzw.

Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL-Cholesterin), Triglyceriden oder beidem sowie verringerte Serumkonzentrationen von High-Density-Lipoprotein-Cholesterin (HDL-Cholesterin) umfassen kann (Mach *et al.*, 2020). Im Rahmen der Framingham Heart Study konnte mit Hilfe einer gepoolten logistischen Regressionsanalyse gezeigt werden, dass jeder Anstieg des Gesamtcholesterins um 40 mg/dL mit einem relativen Risiko von 1,2 für das Auftreten einer CI assoziiert ist (Murabito *et al.*, 1997). Zudem beobachteten Daskalopoulou *et al.* erstmals eine signifikante inverse Korrelation zwischen dem ABI und der Serumkonzentration von LDL-Cholesterin (Daskalopoulou *et al.*, 2008).

Auch Adipositas und Bewegungsmangel als Faktoren des metabolischen Syndroms werden zu den beeinflussbaren Risikofaktoren der Atherosklerose gezählt. Adipositas wird definiert als ein BMI ≥ 30 kg/m². Allerdings wurde bei zahlreichen Erkrankungen, wie beispielsweise der pAVK, das kontrovers diskutierte Adipositas-Paradoxon beobachtet. Trotz des starken Zusammenhangs zwischen Adipositas und kardiovaskulären Risikofaktoren sowie einer generell verminderten Lebenserwartung, zeigen zahlreiche Studien eine geringere Mortalität bei Adipositas-Patienten als bei Patienten mit einem niedrigen BMI. Dieses Phänomen kann jedoch teilweise dadurch erklärt werden, dass Raucher und Patienten mit COPD in der Gruppe mit niedrigem BMI überrepräsentiert waren (Galal *et al.*, 2008, Ludhwani und Wu, 2019).

Darüber hinaus wurden in Metaanalysen Hinweise auf weitere Risikofaktoren der pAVK wie beispielsweise eine verringerte glomeruläre Filtrationsrate oder eine erhöhte Serumkonzentrationen des c-reaktiven Proteins (CRP) gefunden (Singh *et al.*, 2017, Matsushita *et al.*, 2017).

1.1.4 Pathogenese: Atherosklerose

Die Arterienwand besteht aus drei Schichten: Tunica intima, media und adventitia (s. Abbildung 1). Die Tunica intima besteht aus einer einschichtigen Endothelzellschicht sowie einer zellarmen, lockeren Bindegewebsschicht. Die Tunica media wird durch die Membrana elastica interna von der Tunica intima getrennt und besteht aus glatten Muskelzellen (GMZ) und elastischen Fasern. Das lockere Bindegewebe der Tunica adventitia ist wiederum durch die Membrana elastica externa von der Tunica media getrennt (Böcker *et al.*, 2019).

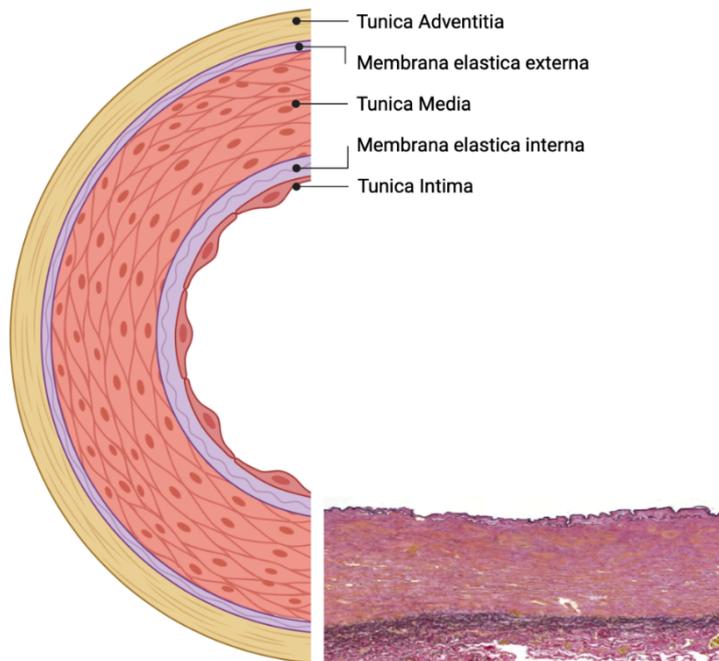


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Arterienwand sowie ein korrespondierender histologischer Ausschnitt der Wand einer Femoralarterie in EvG-Färbung. EvG, Elastica-van-Gieson.

Die Endothelzellen (EZ) kleiden die Innenseite der Blutgefäße aus und bilden damit eine Barriere zwischen Gefäßlumen und Extravascularraum. Zudem beeinflussen sie eine Vielzahl an physiologischen Funktionen wie z.B. der Regulation des Blutdrucks, der Gerinnungsprozesse und der Angiogenese. GMZ dienen neben der Vasokonstriktion und -dilatation auch der Produktion von Matrixmolekülen wie Kollagen, Elastin und Proteoglykanen (Böcker *et al.*, 2019).

Neben den unterschiedlichen histomorphologischen Charakteristika können auch zelltypspezifische Oberflächenantigene zur Unterscheidung der Zelltypen herangezogen werden. So wird beispielsweise das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (CD31) in hohen Mengen auf der Oberfläche von frühen und reifen EZ exprimiert (Liu und Shi, 2012). Als Zelltypmarker für GMZ wird häufig das Myosin-11 (Myh11) verwendet. Myh11 ist Bestandteil der Myosinschwerketten und wandelt als kontraktiles Protein durch die Hydrolyse

von Adenosintriphosphat (ATP) chemische Energie in mechanische Energie um (Chakraborty *et al.*, 2019).

Zudem finden Zelltypmarker für verschiedene Entzündungszellen Verwendung, um pathologisch veränderte Gefäße zu untersuchen. Die Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C (CD45), ist ein Oberflächenprotein aus der Gruppe der Proteinphosphatasen und wird vorwiegend von Lymphozyten exprimiert (Altin und Sloan, 1997). Zur Identifizierung von Monozyten und Makrophagen wird das Zelladhäsionsprotein Macrosialin (CD68), verwendet. Mit Hilfe von CD68 erkennen Makrophagen oxidiertes LDL und Phosphatidylserin und können so an apoptotische Zellen binden (Chistiakov *et al.*, 2017). Obschon die Begriffe Arteriosklerose und Atherosklerose im klinischen Alltag häufig synonym verwendet werden, haben sie unterschiedliche Bedeutungen. Die Arteriosklerose ist ein Sammelbegriff für verschiedene Krankheitsbilder, bei denen sich die Arterienwand verdickt und an Elastizität verliert. Dazu gehören neben der Atherosklerose auch die Arteriolosklerose und Mönckeberg-Arteriosklerose. Die Arteriolosklerose bezeichnet eine Verhärtung (Sklerose) der Tunica intima und media v.a. der kleinen Gefäße (Arteriolen). Bei der Mönckeberg-Arteriosklerose kommt es zu Kalziumablagerungen v.a. in der Tunica media kleiner bis mittelgroßer Arterien, wodurch deren Wände an Elastizität verlieren. Die häufigste Form der Arteriosklerose ist die Atherosklerose (aus dem Griechischen: *athyre* = Fettbrei, *skleros* = hart). Hierbei beruht die Verhärtung auf fettige Ablagerungen (Plaques) in der Arterienwand von mittelgroßen und großen Arterien (Böcker *et al.*, 2019).

Die Pathogenese der Atherosklerose konnte *bis dato* noch nicht vollständig geklärt werden. Verschiedene Theorien wurden dazu aufgestellt, wobei v.a. die „*Response-to-injury*“-Hypothese hohen Anklang fand und stetig weiterentwickelt wurde (Buja, 2020). Ausgangspunkt für die Entstehung der Atherosklerose ist eine chronische Belastung der Gefäße mit konsekutiver Schädigung des Endothels (s. Abbildung 2). Arterielle Hypertonie sowie besondere Strömungsverhältnisse führen generalisiert bzw. lokal an Prädilektionsstellen zu einer hämodynamischen Belastung. Zudem sind biochemisch-toxische Endothelbelastungen für die Atherosklerose mitverantwortlich. Dazu zählen die Hypercholesterinämie, die Homocysteinämie, durch Rauchen aufgenommene Toxine sowie chronisch-entzündliche Erkrankungen und Infektionen (Böcker *et al.*, 2019). Es kommt zur Bildung von gefäßschädigenden Radikalen, welche auch eine Insuffizienz der endothelialen NO-Synthase (eNOS) zur Folge haben. Hierdurch kommt es zu einem Mangel an Stickstoffmonoxid (NO) und damit zu einer endothelialen Dysfunktion. Dies führt u.a. zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, was zusammen mit einer verstärkten Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen die Gewebeinfiltration von Monozyten und Lymphozyten fördert (Böcker *et al.*, 2019, Libby, 2021). Eine Reaktion der Arterienwand hierauf ist eine gesteigerte Proliferation von GMZ sowie Migration in die Tunica intima mit konsekutiver

Intimaverdickung. Durch die erhöhte Gefäßpermeabilität kommt es auch zu einer vermehrten Akkumulation atherogener Lipide wie LDL im subendothelialen Raum. Makrophagen, aber auch GMZ, die diese Lipide metabolisieren, werden hierdurch zu Schaumzellen und sterben letztendlich durch die Toxizität des oxidierten LDL. Die aufgenommenen Lipide lagern sich nun extrazellulär ab und bilden einen Lipidkern (Atherom). Vitale Schaumzellen und nekrotische Lipidkerne unterhalten wiederum ein proinflammatorisches Milieu, wodurch die Einwanderung und Proliferation weiterer Lymphozyten und GMZ gefördert wird. Die Sekretion extrazellulärer Matrix durch die GMZ führt zur Bildung einer fibrösen Kappe und damit zur Formation eines Fibroatheroms. Mit zunehmendem Wachstum der Plaque wird das Gefäßlumen schließlich eingeengt und der Blutfluss behindert (Böcker *et al.*, 2019).

Ob eine Plaque stabil bleibt oder rupturiert, ist abhängig vom Aufbau und der Zusammensetzung. Stabile Plaques weisen eine dicke fibröse Kappe, einen kleinen Lipidkern und wenig Entzündungszellen auf. Im weiteren Verlauf können jedoch proinflammatorische Zytokine die GMZ bei der Produktion extrazellulärer Matrix hemmen und von Makrophagen sezernierte Matrix-Metalloproteinasen die fibröse Kappe schwächen. Infolge einer Ruptur der fibrotischen Kappe kommen Gewebefaktoren und freies Kollagen in Kontakt mit dem Blut und die Gerinnungskaskade wird aktiviert. Dies führt zu einer Thrombusbildung, die den lokalen Blutfluss einschränken kann (Finn *et al.*, 2010).

Viele Plaques weisen im fortgeschrittenen Stadium Verkalkungen auf. Inwiefern Verkalkungen die Gefahr einer Plaqueruptur erhöhen, scheint von deren Lokalisation und Struktur abhängig zu sein. Während kleine Mikroverkalkungen, die sich innerhalb der fibrösen Kappe bilden, zu einer erheblichen Belastung innerhalb der Kappe führen, wird die Plaque stabiler, wenn destabilisierende Mikroverkalkungen in große Makroverkalkungen unterhalb der fibrösen Kappe übergehen (Ruiz *et al.*, 2015).

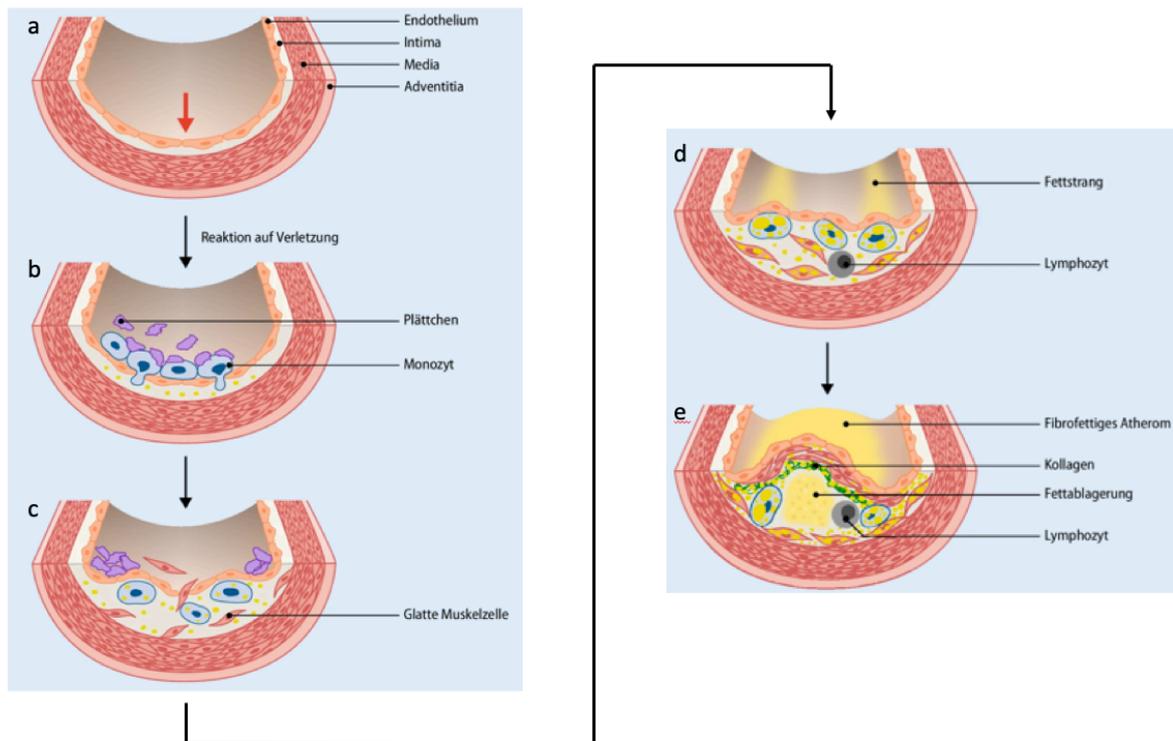


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entstehung von Atherosklerose. a, Aufbau einer gesunden Arterienwand. b, Risikofaktoren wie z.B. Hypertonie, Rauchen oder Hyperlipidämie führen zu einer endothelialen Dysfunktion mit einer erhöhten Permeabilität sowie zu einer Adhäsion und Migration von Leukozyten und Makrophagen. c, Migration von glatten Muskelzellen in die Intima, Akkumulation von Lipiden und Makrophagenaktivierung; d, Aufnahme von modifizierten Lipiden durch Makrophagen und GMZ mit konsekutiver Bildung von Schaumzellen. e, Proliferation von glatten Muskelzellen in der Intima und Bildung extrazellulärer Matrix führen zur Bildung einer fibrösen Kappe. Modifiziert nach Dihlmann et al. 2019. GMZ, glatte Muskelzelle

1.1.5 Klinik und Einteilung

In Deutschland erfolgt die Einteilung der pAVK im klinischen Alltag nach der Stadieneinteilung von Fontaine, während in der wissenschaftlichen Fachliteratur vorwiegend die Rutherford-Klassifikation Verwendung findet (Lawall et al., 2015b). Die beiden Klassifikationen sind in Tabelle 2 vergleichend dargestellt.

Tabelle 2: Einteilung der pAVK nach Fontaine und Rutherford. Modifiziert nach Lawall et al. 2015b. m, Meter.

	Fontaine		Rutherford		
	Stadium		Grad	Kategorie	
Claudicatio intermittens	I	asymptomatisch	0	0	asymptomatisch
	IIa	Gehstrecke > 200 m	I	1	leicht
	IIb	Gehstrecke < 200 m	I	2	mäßig
kritische Extremitätenischämie			I	3	schwer
	III	Ruhschmerz	II	4	Ruhschmerz
	IV	Ulkus, Gangrän	III	5	kleinflächige Nekrose
			III	6	großflächige Nekrose

Im frühen Erkrankungsstadium verläuft die pAVK meist asymptomatisch. Das initiale Symptom ist die Claudicatio intermittens (lat.: *claudicatio* = Hinken, *intermittens* = zeitweilig nachlassend;

CI). Hierbei handelt es sich um reproduzierbare, belastungsabhängige Ischämieschmerzen, die sich bei Pausieren der Belastung oder Tieflagerung der betroffenen Extremität verbessern. Die Lokalisation der Schmerzen ist meist distal der Stenose und das Ausmaß der Schmerzen ist abhängig vom Stenosegrad sowie dem Ausbildungsgrad der Kollateralkreisläufe. Im Falle einer *walking through* Claudicatio verbessert sich die Symptomatik beim Weitergehen, da die Beinarterien gut kollateralisiert sind und die Extremität ausreichend mit Blut versorgt wird. Das Stadium II nach Fontaine wird anhand einer definierten Gehstrecke in zwei Substadien eingeteilt: Stadium IIa bei einer schmerzfreien Gehstrecke > 200 Meter sowie Stadium IIb bei einer schmerzfreien Gehstrecke < 200 Meter (Ludwig, 2010). Während es bei ungefähr einem Viertel der Patienten mit CI zu einer spontanen Remission der Beschwerden kommt und bei der Hälfte der Patienten die Beschwerdesymptomatik konstant bleibt, erleiden rund ein Viertel der Patienten einen klinischen Progress (Lawall *et al.*, 2015b). Bei weiterer Progression der Erkrankung reicht die Kompensation der Blutversorgung mittels Kollateralkreisläufen nicht mehr aus und es kommt zu einer kritischen Extremitätenischämie. Die ischämiebedingten Ruheschmerzen treten bereits in Horizontallage der Extremität auf und bessern sich bei Tieflagerung. Ab einem bestimmten Zeitpunkt kann es aufgrund von insuffizienter Blutversorgung des Gewebes und somit auch des gestörten Abtransports toxischer Stoffwechselendprodukte zur Ausbildung von Nekrosen und Gangränen kommen. Davon zu unterscheiden sind Nekrosen, die im Rahmen von Bagatelltraumata in den Stadien I oder II nach Fontaine entstanden. Diese werden aufgrund ihrer besseren Prognose als kompliziertes Stadium I oder II bezeichnet (Ludwig, 2010).

1.1.6 Diagnostik

Neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung stehen apparative sowie bildgebende Verfahren zur Diagnostik der pAVK zur Verfügung. Während im Rahmen der Anamnese unter anderem kardiovaskuläre Risikofaktoren, Vorerkrankungen sowie die Schmerzanamnese erfragt werden, gehören zu der klinischen Untersuchung die Palpation und Auskultation der Extremitätenarterien im Seitenvergleich sowie die Ratschow-Lagerungsprobe. Zur Differenzierung des Stadiums II nach Fontaine sowie zur Verlaufskontrolle kann ein Geh-Test oder eine Laufbandergometrie durchgeführt werden (Ludwig, 2010).

Goldstandard der nicht-invasiven Diagnostik ist die Bestimmung des Knöchel-Arm-Index (engl.: *ankle-brachial-index*; ABI). Hierbei handelt es sich um eine dopplersonographische Messung der arteriellen Verschlussdrucke an Oberarm (A. brachialis) und der distalen, unteren Extremität (A. dorsalis pedis und A. tibialis posterior). Es wird ein Quotient aus dem niedrigsten systolischen Blutdruckwert der Knöchelarterien und dem gemittelten systolischen Blutdruckwert der Oberarmarterien gebildet (Lawall *et al.*, 2015b). Je niedriger der Quotient, desto stärker ausgeprägt sind die atherosklerotischen Veränderungen und die konsekutive

Behinderung des Blutflusses in der unteren Extremität. Per Definition liegt eine pAVK ab einem ABI-Wert von $< 0,9$ vor. Es kann allerdings zu falsch-normalen ABI-Werten bei gut kollateralisierten proximalen Stenosen sowie zu falsch-hohen ABI-Werten ($> 1,3$) bei Diabetikern aufgrund der Mönckeberg-Mediasklerose kommen. Hierbei kommt es zu einer Verkalkung der Tunica media, infolgedessen aufgrund einer mangelnden Komprimierbarkeit der Gefäßwand ein zu hoher Blutdruck gemessen wird. Bei nicht plausiblen ABI-Werten können ergänzende Untersuchungsverfahren wie die Oszillographie oder die transkutane Sauerstoffdruckmessung Anwendung finden (Lawall *et al.*, 2015b).

Die bildgebende diagnostische Methode der ersten Wahl ist die farbkodierte Duplexsonographie (FKDS). Dabei handelt es sich um eine Kombination aus zweidimensionaler Ultraschalltechnik (B-Bild) und Dopplersonographie. Während das B-Bild Aufschluss über die Gefäßmorphologie und die Intima-Media-Dicke gibt, können mittels Dopplersonographie hämodynamische Flusseigenschaften analysiert werden. Hierbei werden die Flussgeschwindigkeiten und -Richtungen farblich kodiert (Ludwig, 2010, Lawall *et al.*, 2015b).

Bei therapeutischer Konsequenz oder nicht ausreichend beurteilbarem Befund der FKDS finden weitere angiographische Verfahren wie die computertomographische Angiographie (CTA), die Magnetresonanztomographie (MRA) oder die digitale Subtraktionsangiographie (DSA) Verwendung. Bei der präoperativen Diagnostik mittels MRA oder CTA wird der Bereich einer Stenose durch eine Kontrastmittelaussparung sichtbar. Zur Operationsplanung bei komplexen Befunden der MRA oder CTA oder bei geplanter interventioneller Therapie ist die DSA in Interventionsbereitschaft die Methode der Wahl (Lawall *et al.*, 2015b). Hierbei wird ein Leerbild von einem mit Kontrastmittel gefüllten Bild (Füllbild) durch die Recheneinheit des Röntgengeräts subtrahiert, sodass die Gefäße selektiv dargestellt werden können (Neufang und Beyer, 2013).

1.1.7 Therapie

Die Behandlung der pAVK umfasst konservative, medikamentöse und invasive Therapieverfahren. Ziele der stadienabhängigen Maßnahmen sind neben der Verhinderung der Progression der pAVK und der Reduktion der allgemeinen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität auch die Verbesserung der peripheren Durchblutung sowie der Erhalt der betroffenen Extremität (Lawall *et al.*, 2015b).

Zu den wichtigsten konservativen Therapiemaßnahmen gehört die sofortige Nikotinkarenz. Aufgrund der Tatsache, dass der Nikotinabusus ein hohes Suchtpotential hat und nicht assistierte Rauchstoppversuche in 95 % der Fälle erfolglos sind, wird eine Kombination von Nikotinersatz, ärztlicher Betreuung und Gruppentherapie empfohlen (Kotz *et al.*, 2020, Lawall

et al., 2015b). Zudem sollen im Stadium II nach Fontaine tägliche strukturierte Gehtrainings zu einer Ausbildung eines suffizienten Kollateralkreislaufs führen (Lawall *et al.*, 2015b).

Ziel der Sekundärprävention mittels medikamentöser Therapie ist v.a. die Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren und damit die Progressionshemmung peripherer Gefäßläsionen. Eine Hyperlipidämie soll mithilfe eines geeigneten Cholesterinsyntheseenzymhemmer (CSE-Hemmer) sowie einer mediterranen Diät behandelt werden. Statine sind nach wie vor die bewährteste Klasse von CSE-Hemmern, wenn es darum geht, den klinischen Outcome bei atherosklerotischen Erkrankungen zu verbessern. Statine hemmen die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl(HMG)-CoA-Reduktase und damit die Cholesterinsynthese in der Leber, was zu einer konsekutiven Hochregulierung des LDL-Rezeptors in den Hepatozyten und zu einer Senkung des zirkulierenden LDL-Cholesterins führt (Zhou *et al.*, 2022). Bei pAVK-Patienten wird eine Senkung der LDL-Cholesterin-Serumkonzentration um $\geq 50\%$ vom Ausgangswert mit einem Zielwert von < 55 mg/dl empfohlen (Mach *et al.*, 2020). Bezüglich der Normalisierung erhöhter Triglycerid-Konzentration und erniedrigter Serumkonzentration von HDL-Cholesterin herrscht bisher kein Konsens (Frank *et al.*, 2019). Zur Behandlung eines Hypertonus sollen Angiotensinkonversionsenzym-(ACE)-Hemmer und Calciumantagonisten eingesetzt werden. Es werden Zielblutdrucke von 120-129/70-80 mmHg bei Patienten unter 65 Lebensjahren und 130-139/70-80 mmHg bei Patienten über 65 Lebensjahren empfohlen (Frank *et al.*, 2019). Allerdings ist bei Patienten mit einer kritischen Extremitätenischämie auf eine langsame Blutdrucksenkung zur Aufrechterhaltung des Perfusionsdrucks zu achten (Ludwig, 2010). Ziel der medikamentösen Behandlung eines Diabetes mellitus Typ 2 ist ein HbA1c-Wert im Bereich von 6,5 bis 8 %, wobei dies individuell je nach Alter, weiteren Begleiterkrankungen und Hypoglykämierisiko angepasst wird (Lawall *et al.*, 2015b). Des Weiteren sollen alle symptomatischen Patienten Thrombozytenaggregationshemmer erhalten. Während in der deutschen Leitlinie eine tägliche Dosis von 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) empfohlen wird, wird in der europäischen Leitlinie aufgrund der CAPRIE-Studie eine tägliche Dosis von 75 mg Clopidogrel bevorzugt (Lawall *et al.*, 2015b, Frank *et al.*, 2019). Bei eingeschränkter Lebensqualität und begrenzter Möglichkeit eines Gehtrainings können gezielt Rheologika wie Naftidrofuryl oder Cilostazol bei Patienten ab Stadium IIb nach Fontaine eingesetzt werden (Lawall *et al.*, 2015b).

Kann die Symptomatik der CI nicht ausreichend mit Hilfe von konservativen und medikamentösen Therapiemaßnahmen verbessert werden oder liegt eine kritische Extremitätenischämie vor, sind endovaskuläre und/oder offen-chirurgische Revaskularisationsverfahren indiziert. Die Behandlungsempfehlungen sind dabei abhängig vom klinischen Stadium der pAVK sowie der Lokalisation und Morphologie der Gefäßläsion (Lawall *et al.*, 2015b).

Ein endovaskuläres Standardverfahren ist hierbei die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) mit Ballondilatation und gegebenenfalls Stentimplantation (Lawall *et al.*, 2015b). Hierbei wird zunächst in Seldinger-Technik ein perkutaner Gefäßzugang geschaffen: Nach der Lokalanästhesie der Gefäßregion erfolgt die perkutane Gefäßpunktion mit einer Hohlnadel. Anschließend wird ein Führungsdraht durch den Hohlraum in das Gefäßlumen vorgeschoben. Durch das Abdrücken der Punktionsstelle wird der Führungsdraht im Gefäßlumen fixiert, sodass die Hohlnadel über den Führungsdraht zurückgezogen werden kann. Im nächsten Schritt kann über den Führungsdraht eine Schleuse in das Gefäß eingeführt werden. Zum Schluss wird der Führungsdraht wieder entfernt und die Schleuse gespült (Seldinger, 1953). Als nächstes erfolgt eine DSA, um die Länge und Morphologie der Gefäßläsion zu ermitteln sowie therapierelevante Kollateralkreisläufe zu erkennen. Über die Schleuse wird nun ein Führungsdraht bis über die Stenose hinweg eingeführt, über den im Anschluss ein aufblasbarer Ballonkatheter vorgeschoben wird. Anschließend erfolgt eine Expansion des Ballons mittels großen Druckes, wodurch ein kontrolliertes Trauma der Gefäßwand verursacht wird. Dabei kommt es zum Einriss der Tunica intima und zu einer Umverteilung des Plaquematerials. Je nach Morphologie und Lokalisation der Stenose kann die PTA mit der Implantation eines Stents kombiniert werden. Dafür stehen unter anderem ballonexpandierende, selbstexpandierende sowie medikamentenbeschichtete Stents und Stent-Prothesen zur Verfügung (Debus und Gross-Fengels, 2020a).

Offen-chirurgische Verfahren wie die Thrombendarterektomie (TEA) oder die Bypass-Operation sind v.a. bei gelenkübergreifenden Stenosen und Stenosen an der Femoralisgabel aufgrund des höheren mechanischen Stresses sowie einer ausgeprägteren Entzündungsreaktion indiziert (Ludwig, 2010).

Im Rahmen einer offenen TEA wird zunächst der betroffene Gefäßabschnitt freigelegt und längsseits inzidiert. Danach wird mit Hilfe eines Dissektionsspatels die Plaque zusammen mit der Tunica intima und Teilen der Tunica media aus der Gefäßwand geschält. Im Anschluss daran wird die blutstromwärts distal herbeigeführte Stufe zwischen Tunica intima und Tunica media mittels Intima-Adaptationsnaht fixiert, um das Risiko einer Gefäßdissektion zu vermindern. Oftmals wird im Zuge einer TEA eine Erweiterungsplastik eingenäht, da eine Verschlussnaht zu einer erneuten Einengung des Gefäßlumens führen kann (Debus und Gross-Fengels, 2020b). Als Erweiterungsplastik finden neben autologen Venenpatches auch xenogene oder alloplastische Patches Verwendung. Kommen aufgrund der Morphologie und Lokalisation der Gefäßläsion weder eine endovaskuläre noch eine offen-chirurgische Rekanalisation in Betracht, ist eine Bypass-Operation indiziert (Debus und Gross-Fengels, 2020b). Dabei werden autologe oder alloplastische Bypassmaterialien verwendet, um stenosierte Gefäßabschnitte zu überbrücken. Aufgrund ihrer höheren Offenheitsrate und geringeren Infektanfälligkeit werden im femoropoplitealen Gefäßabschnitt autologe

Venenbypass Grafts empfohlen. Alloplastische Bypassmaterialien werden im aortoiliakalen Gefäßabschnitt verwendet. Bei ausgeprägten Nekrosen oder systemisch ausbreitenden Infektionen und fehlender Revaskularisierungsmöglichkeit ist als *Ultima Ratio* die Amputation der betroffenen Extremität indiziert (Debus und Gross-Fengels, 2020b).

1.1.8 Komplikationen und Nachsorge

Im Rahmen der endovaskulären und/oder offen-chirurgischen Revaskularisation können Komplikationen wie Blutungen, Wundinfektionen und Protheseninfektionen bis hin zu Sepsis auftreten. Zudem kann es durch Thrombembolien zu einem akuten arteriellen Verschluss der betroffenen Extremität kommen. Aufgrund der Tatsache, dass die Atherosklerose eine systemische Erkrankung mit unterschiedlichen Manifestationsorten ist, besteht auch ein hohes Risiko für das Auftreten atherosklerotischer Zweiterkrankungen. Sigvant *et al.* beobachteten, dass innerhalb eines Jahres nach der Diagnose einer symptomatischen pAVK einer von acht Patienten ein schwerwiegendes kardiovaskuläres Ereignis, wie einen Schlaganfall oder Myokardinfarkt, erleidet (Sigvant *et al.*, 2017).

Die Restenose, also das erneute Auftreten einer Verengung des behandelten Gefäßabschnitts nach der Revaskularisation, stellt ein großes klinisches Problem dar. Je nach Revaskularisationsverfahren und Lokalisation der pAVK wurden nach einem Jahr mittlere Durchgängigkeitsraten von 56 % bis 77 % und nach fünf Jahren von 39 % bis 80 % beschrieben (Hess *et al.*, 2017).

Die physiologische Antwort der Arterienwand auf eine endovaskuläre Revaskularisation kann in drei Phasen gegliedert werden: mechanische, thrombogene und proliferative Phase (Frank *et al.*, 2019). Unmittelbar nach der PTA kann es zu einem elastischen Rückstoß der Gefäßwand als Reaktion auf die mechanische Dilatation (*elastic recoil*) kommen. Während der zweiten Phase können infolge von Einblutungen Thrombenformationen in der dilatierten Gefäßwand entstehen. Die proliferative Phase ist durch die Intimahyperplasie (IH) gekennzeichnet. Im Rahmen der IH kommt es zu einer Verdickung der Tunica intima durch die Einwanderung und Proliferation von GMZ aus der Tunica media sowie der Produktion einer großen Menge an extrazellulärer Matrix (Frank *et al.*, 2019). Zur Verhinderung einer Restenose nach einer PTA sind verschiedene Maßnahmen entwickelt worden. So wurde durch die Implantation von Stents im Rahmen der PTA der *elastic recoil* und durch den Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern und Antikoagulanzen die Thrombenformation verhindert. Zudem wurden medikamentenbeschichtete Ballons und Stents entwickelt, die die Ausbildung einer Intimahyperplasie verringern (Paraskevas *et al.*, 2008). Im Rahmen von offen-chirurgischen Revaskularisationsverfahren werden Restenosen vor allem durch die IH oder das Fortschreiten der Atherosklerose (Neoatherosklerose) hervorgerufen (Vartanian und Conte, 2015).

Das wesentliche Ziel in der postinterventionellen und -operativen Nachsorge ist eine hohe Offenheitsrate, die sowohl durch Verhinderung von akuten arteriellen Thrombosen sowie durch Vermeidung von Restenosen erreicht werden kann. Hierzu wird allen Patienten die Einnahme cholesterinsenkender Medikamente sowie eine lebenslange, tägliche Thrombozytenaggregationshemmung empfohlen. Nach Stentimplantation wird je nach Lokalisation zunächst eine duale Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel angeraten. Zudem kann bei Patienten mit einer kritischen Extremitätenischämie die Gabe von niedermolekularem Heparin erwogen werden. Darüber hinaus ist die Teilnahme an einem strukturierten Nachsorgeprogramm angeraten. Dieses umfasst neben der konsequenten Behandlung kardiovaskulärer Risikofaktoren auch Anleitungen zu strukturierten Gefäßtrainings sowie halbjährliche Kontrolluntersuchungen (Lawall *et al.*, 2015b).

1.2 Sphingosin-1-phosphat

Angesichts der bedeutenden Rolle von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) bei der Atherogenese und Intimahyperplasie ist ein gesteigertes Interesse an der Untersuchung dieses Moleküls als potentiell pharmakologisches Ziel für die Entwicklung gezielter Therapien zur Vermeidung von Restenosen zu verzeichnen. S1P ist ein natürliches, bioaktives Lipid aus der Gruppe der Sphingolipide. Bis Anfang der 1990er Jahre gingen Wissenschaftler davon aus, dass S1P lediglich ein Abbauprodukt von Sphingomyelin sei. Das Interesse an S1P wuchs jedoch, nachdem entdeckt wurde, dass dieses die Zellproliferation regulieren kann (Zhang *et al.*, 1991). Im Laufe der Jahre fand man heraus, dass S1P und seine Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Krankheiten, wie z.B. Multiple Sklerose, Tumorerkrankungen, Osteoporose und Atherosklerose spielen (Cohan *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2019, Grewe *et al.*, 2022, Daum *et al.*, 2009). Zu den durch S1P regulierten biologischen Zellfunktionen zählen u.a. Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose (Olivera und Spiegel, 1993, Wang *et al.*, 1999, Cuvillier *et al.*, 1996). Des Weiteren werden durch S1P auch Funktionen im Gefäßsystem reguliert. So ist S1P beispielsweise unabdingbar bei der Angiogenese sowie an der Regulation des Gefäßtonus und der Gefäßpermeabilität beteiligt (Lee *et al.*, 1999, Kerage *et al.*, 2014).

1.2.1 Metabolismus

Die Biosynthese des S1P ($C_{18}H_{38}NO_5P$) erfolgt über mehrere Schritte und beginnt unter anderem mit der Ausgangssubstanz Sphingomyelin, einem Bestandteil der Plasmamembranen (siehe Abbildung 3). Die Sphingomyelinase katalysiert die Umwandlung von Sphingomyelin in ein Ceramid unter Abspaltung eines Phosphocholinrestes. Zudem können Ceramide aus der Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA *de novo* synthetisiert werden. Anschließend katalysiert die Ceramidase die Hydrolyse des Ceramids zu Sphingosin

und einer freien Fettsäure. Im letzten Schritt entsteht S1P durch Phosphorylierung von Sphingosin durch eine von zwei Sphingosinkinasen (SPHK1 oder SPHK2) (Kurano und Yatomi, 2018). Intrazelluläres S1P kann mit Hilfe von Transportern wie des ATP-unabhängigen Transporters Spinster 2 (SPNS2) oder des ATP-abhängigen ABC-Transporters aus der Zelle sezerniert werden (Kurano und Yatomi, 2018).

Dem Gleichgewicht zwischen S1P und Ceramiden kommt im Rahmen des Sphingolipid-Rheostats eine besondere Bedeutung zu. Während Ceramide vorwiegend antiproliferative und apoptotische Zellvorgänge begünstigen, stimuliert S1P die Zellproliferation sowie das Überleben (Newton *et al.*, 2015). Abgebaut wird S1P zum einen durch Dephosphorylierung durch zwei spezifische S1P-Phosphatasen (SGPP1 und SGPP2) oder zum anderen durch eine S1P-Lyase (SPGL1), welche S1P irreversibel in Phosphoethanolamin und Hexadecenal spaltet (Kurano und Yatomi, 2018).

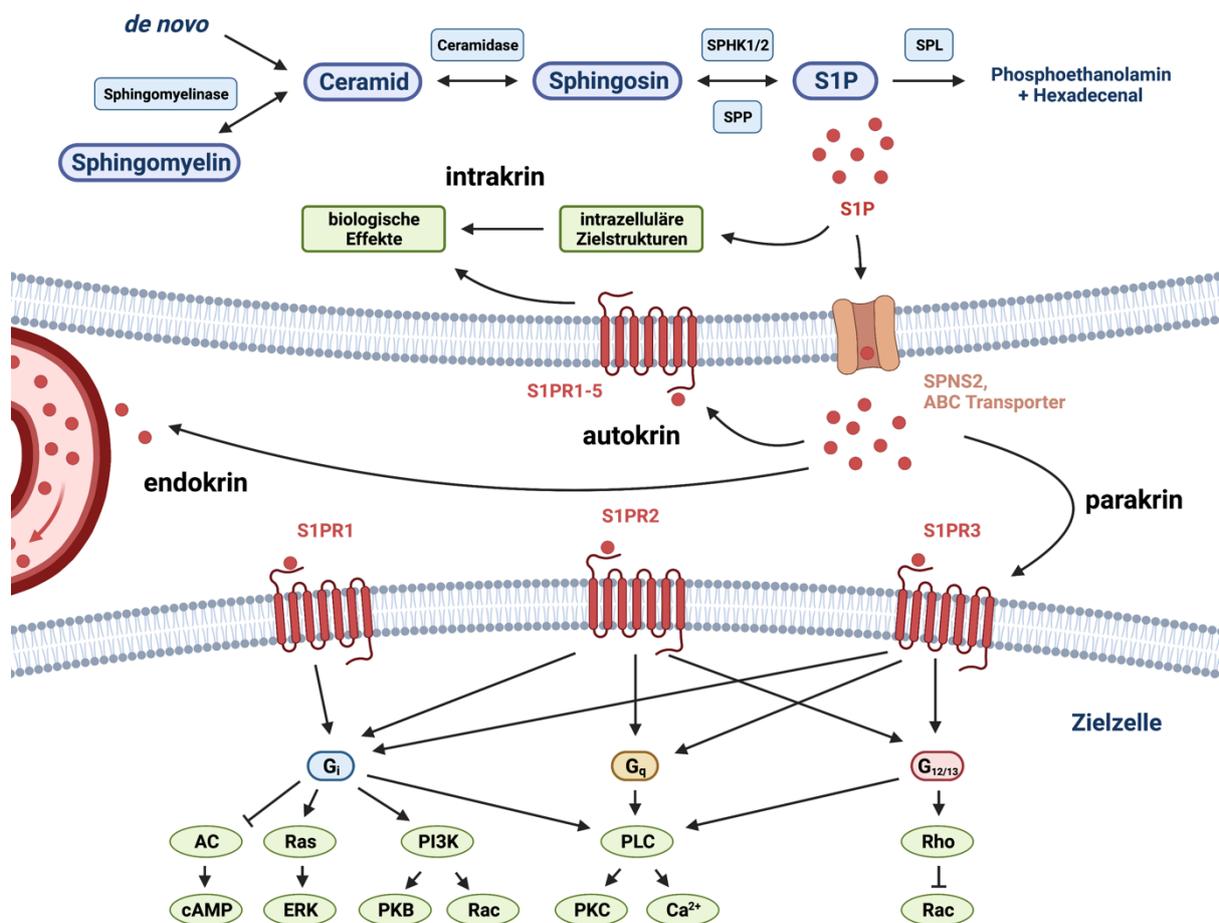


Abbildung 3: Metabolismus von Sphingosin-1-phosphat und die Signaltransduktion seiner Rezeptoren. Ceramide werden entweder *de novo* synthetisiert oder durch Abspaltung von Sphingomyelin gebildet. Anschließend katalysiert die Ceramidase die Hydrolyse zu Sphingosin. Die Sphingosinkinasen 1 und 2 (SPHK1/2) katalysieren die Phosphorylierung von Sphingosin zu Sphingosin-1-phosphat (S1P). S1P wird über S1P-Phosphatasen (SPP) dephosphoryliert bzw. von der S1P-Lyase (SPL) abgebaut. Eine Freisetzung von S1P kann durch den ATP-unabhängigen Spinster 2 (SPNS2)-Transporter bzw. den ATP-abhängigen ABC-Transporter erfolgen. Anschließend kann S1P entweder intrakrin oder autokrin auf die Wirtszelle, parakrin auf benachbarte Zellen oder endokrin über den Blutkreislauf wirken. Die Bindung von S1P an dessen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (S1PR) führt über die Kopplung spezifischer G α -Proteine (G $_i$, G $_q$ und G $_{12/13}$) zur Aktivierung oder Inhibierung unterschiedlicher Signalwege. AC, Adenylylcyclase; Ca $^{2+}$, zweifach positiv geladenes Kalziumion; cAMP, cyclisches Adenosinmonophosphat; ERK, Extracellular-signal Regulated Kinase; eNOS, endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; PKB, Proteinkinase B; PKC, Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C; S1P, S1PR, Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor. Modifiziert nach Grewe et al. 2022 und Blaho und Hla 2011.

S1P wird von Erythrozyten, Thrombozyten und Endothelzellen synthetisiert und sezerniert und kommt als physiologischer Bestandteil im Blut in mikromolaren Konzentrationen vor. Die S1P-Konzentration im Gewebe bzw. in der interstitiellen Flüssigkeit liegt hingegen im nanomolaren Bereich (Hla et al., 2008). Der daraus resultierende S1P-Gradient zwischen Blut und Gewebe wird von unterschiedlichen Zellen wie hämatopoetischen Stammzellen oder Lymphozyten beim Austritt aus Lymphknoten oder der Einwanderung von Osteoklastenvorläuferzellen in die Knochenmatrix genutzt (Matloubian et al., 2004, Ishii et al., 2009).

Daum *et al.* geben für S1P im Blutserum einen Referenzbereich von 0,592 - 1,509 nmol/ml und im Blutplasma von 0,490 - 1,152 nmol/ml an (Daum *et al.*, 2020). Ein Grund für die hohe S1P-Konzentration im Blut ist u.a., dass Erythrozyten eine hohe SPHK-Aktivität aufweisen, allerdings weder die SGPL noch SGPPs exprimieren (Ito *et al.*, 2007). Unter pathologischen Umständen kann es auch zu einer lokalen Erhöhung der S1P-Konzentration kommen. So führt eine Gefäßverletzung zur Aktivierung von Thrombozyten mit konsekutiver, lokaler Freisetzung von S1P (Yatomi, 2008). Aber auch Endothelzellen scheinen unter dem Einfluss von laminaren Scherkräften S1P zu sezernieren. Venkataraman *et al.* zeigten, dass Endothelzellen unter dem Einfluss von laminaren Scherkräften eine verminderte Expression von S1P-abbauenden Enzymen aufweisen und daher vermehrt S1P freisetzen (Venkataraman *et al.*, 2008). Im Blut ist das amphiphile S1P vorwiegend zu 60 % an HDL und zu 30 % an Albumin gebunden. Kleinere Mengen S1P sind auch an VLDL (Very-Low-Density Lipoprotein) sowie LDL gebunden (Murata *et al.*, 2000). Christofferson *et al.* fanden heraus, dass S1P über das Apolipoprotein M (ApoM) an HDL gebunden wird und die pleiotropen, vasoprotektiven Eigenschaften des HDL zum Teil durch S1P vermittelt werden (Christoffersen *et al.*, 2011). Die Datenlage bezüglich der S1P-Konzentration im Blut als Biomarker für atherosklerotisch bedingte Krankheiten zeigt gegensätzliche Ergebnisse. Während KHK-Patienten in der Studie von Deutschman *et al.* höhere Serum-S1P-Konzentrationen als eine Kontrollgruppe aufwiesen, beobachteten Sattler *et al.* niedrigere Plasma-S1P-Konzentrationen bei der Gruppe der KHK-Patienten (Deutschman *et al.*, 2003, Sattler *et al.*, 2010). Soltau *et al.* beobachteten erniedrigte Serum-S1P-Konzentrationen bei pAVK- und Karotisstenose-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem wies die Serum-S1P-Konzentration eine signifikant bessere Vorhersagekraft für die pAVK und Karotisstenose als HDL-Cholesterin auf (Soltau *et al.*, 2016). Sui *et al.* untersuchten die S1P-Blutkonzentrationen als Biomarker für die Progression und Schwere von DM2 und fanden als Nebenergebnis heraus, dass die DM2-Patienten mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen signifikant niedrigere Serum-S1P-Spiegel aufwiesen (Sui *et al.*, 2019). Zudem konnte bei LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass durch die Erhöhung des endogenen S1P-Spiegels die Atherogenese gehemmt wurde. Hierbei wurde eine verminderte Plaquebildung mit geringerem Makrophagengehalt, eine reduzierte Leukozytenadhäsion an den Kapillarwänden sowie eine geringere endotheliale Permeabilität beobachtet (Feuerborn *et al.*, 2018). Nach bisherigem Wissenstand könnte also S1P im Blut als potentieller Biomarker für Atherosklerose und speziell für die pAVK fungieren. Daher sind weitere Studien mit größeren Stichprobengrößen und einheitlichen Messverfahren sowie einer Differenzierung zwischen Serum- und Plasma-S1P-Spiegeln notwendig.

1.2.2 S1P-Rezeptoren

1998 entdeckte das Forscherteam um Timothy Hla erstmals, dass Sphingosin-1-phosphat nicht nur als intrazellulärer *Second Messenger* fungiert, sondern auch als extrazellulärer Ligand über die Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (*Endothelial Differentiation Gene-1*, EDG-1) autokrine, parakrine und endokrine Eigenschaften besitzt (Lee *et al.*, 1998, Cannavo *et al.*, 2017). Im weiteren Verlauf wurden vier weitere G-Protein-gekoppelte S1P-Rezeptoren (EDG-3, -5, -6 und -8) entdeckt. Mittlerweile werden EDG-Rezeptoren als S1P-Rezeptoren (S1PR) bezeichnet (Vestri *et al.*, 2017). Während S1PR1-3 ubiquitär exprimiert werden, ist die Expression von S1PR4 für das lymphatische System und von S1PR5 für das Immun- und Nervensystem charakteristisch. In EZ wird neben S1PR2 und S1PR3 hauptsächlich S1PR1 exprimiert, wohingegen GMZ überwiegend S1PR2 und S1PR3 exprimieren (Cannavo *et al.*, 2017). Durch spezifische Kopplung an unterschiedliche G-Protein- α -Untereinheiten aktivieren bzw. inhibieren S1PR nach Ligandenbindung unterschiedliche Signalwege (siehe Abbildung 3) (Cannavo *et al.*, 2017).

1.2.2.1 Die Rolle der S1P-Rezeptoren in der Atherogenese

Obwohl bereits seit einiger Zeit die Rolle von S1P und dessen Rezeptoren in der Pathogenese der Atherosklerose erforscht wird, bleibt die Thematik komplex und wird weiterhin kontrovers diskutiert. Nach aktuellem Stand der Wissenschaft scheint S1P über die Bindung an seine Rezeptoren auf unterschiedlichen Zellen sowohl pro- als auch anti-atherosklerotische Eigenschaften zu besitzen (Kurano und Yatomi, 2018).

S1PR1

S1PR1 spielt eine bedeutende Rolle bei der Gefäßreifung sowie bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Barrierefunktion. Liu *et al.* beobachteten in Mausversuchen, dass eine globale Deletion des S1PR1 aufgrund von embryonalen Blutungen zum intrauterinen Tod führt (Liu *et al.*, 2000). Dieser Phänotyp mit undichten embryonalen Blutgefäßen ähnelte dem von Mäusen mit einer endothelspezifischen Deletion des S1PR1. Folglich wurde eine Beteiligung des endothelialen S1PR1 an der Differenzierung und Rekrutierung von GMZ an die Kanalwand und damit an der Reifung embryonaler Gefäße vermutet (Allende *et al.*, 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass S1P über die Bindung an S1PR1 einen proliferativen und promigratorischen Effekt auf EZ und GMZ *in vitro* hat (Kimura *et al.*, 2000, Kluk und Hla, 2001).

Die vaskuläre Barriere wird durch eine Reihe von Faktoren wie z.B. Zell-Zellkontakte, Aktivierung der eNOS und Zelladhäsionsmoleküle reguliert (Xiong und Hla, 2014, Puca *et al.*, 2012). So beobachteten Peng *et al.* bereits 2004, dass die intravenöse Gabe von S1P oder seinem Strukturanalogen FTY720 in einem Mausmodell mit Lipopolysaccharid (LPS)-

induzierter Lungenentzündung zu einer Reduktion der Gefäßleckage sowie der Entzündung in der Lunge führt (Peng *et al.*, 2004). Im weiteren Verlauf konnte in *in vivo*-Versuchen mittels Einsatzes eines S1PR1-spezifischen Agonisten (SEW-2871) bzw. Antagonisten (SB-649146) der S1PR1 als Barriere-verstärkender S1PR identifiziert werden. Im Gegensatz zu S1PR1 führen eine Aktivierung von S1PR2 sowie S1PR3 zu einer Verringerung der vaskulären Barriere in murinen Lungenarterien (Sammani *et al.*, 2010). Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass S1P über die Bindung an S1PR1 mit konsekutiver Aktivierung der Guanosintriphosphatase (GTPase) Rac die Reorganisation des Zytoskeletts sowie die Bildung von *Adherens Junctions*, *Tight Junctions* und fokalen Adhäsionskomplexen auf der Zelloberfläche induziert (Wang und Dudek, 2009). Des Weiteren stimuliert S1P über die Bindung an S1PR1 die Phosphorylierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und damit die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) (Igarashi und Michel, 2000). Für NO konnte u.a. *in vitro* eine S1PR1-vermittelte anti-apoptotische Wirkung auf Endothelzellen sowie *in vivo* eine vasodilatatorische Wirkung nachgewiesen werden (Kwon *et al.*, 2001, Cantalupo *et al.*, 2017).

Zudem beobachteten Kimura *et al.* *in vitro*, dass HDL-gebundenes S1P über die Bindung an S1PR1 eine Herunterregulierung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen in HUVECs (*Human umbilical vein endothelial cells*) bewirkt (Kimura *et al.*, 2006). Dies wurde *in vivo* durch die Tatsache bestätigt, dass die Überexprimierung sowie die pharmakologische Aktivierung von S1PR1 im Endothel die Expression von Zelladhäsionsmolekülen verringern, während die endothelspezifische Deletion sowie die pharmakologische Inhibierung von S1PR1 zu vermehrter Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1) und VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) führen (Lien *et al.*, 2006, Jung *et al.*, 2012, Jiang *et al.*, 2017). Die Femoralisgabel ist aufgrund der turbulenten Strömungsverhältnisse ein Prädilektionsort für die Entstehung atherosklerotischer Plaques (Chatzizisis *et al.*, 2007). Interessanterweise konnten Jung *et al.* mittels *en face* Immunfluoreszenzfärbung zeigen, dass der S1PR1 in Gefäßabschnitten mit laminarer Strömung auf Endothelzellen exprimiert, während der Rezeptor in Gefäßabschnitten mit turbulenten Scherstress internalisiert wird (Jung *et al.*, 2012). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Expression von Zelladhäsionsmolekülen in Gefäßabschnitten mit turbulenter Strömung erhöht ist (Walpola *et al.*, 1995).

Aufgrund der vielen neuen Erkenntnisse sind S1PR attraktive Ziele für innovative therapeutische Ansätze geworden. Eines der bekanntesten bereits seit längerem zugelassenen Medikamente ist das Immunsuppressivum Fingolimod (FTY720) zur Therapie der Multiplen Sklerose. FTY720 verursacht eine ausgeprägte Lymphopenie, indem es den S1PR1-vermittelten Austritt u.a. von autoreaktiven Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen in den Blutkreislauf hemmt. FTY720 ist ein Struktur analogon von S1P

und bindet nach Phosphorylierung durch SPHK2 an S1PR1-5 mit Ausnahme von S1PR2 (Brinkmann *et al.*, 2002, Billich *et al.*, 2003, Nofer *et al.*, 2007). Eine konstitutive Aktivierung von S1PR1 führt zu seiner Internalisierung sowie Degradation (Jo *et al.*, 2005, Oo *et al.*, 2007). Dadurch sind die Lymphozyten nicht mehr chemotaktisch sensibel für den S1P-Gradienten und treten nicht mehr aus dem Lymphknoten aus (Matloubian *et al.*, 2004, Schwab *et al.*, 2005, Pham *et al.*, 2010). Infolgedessen können die autoreaktiven Lymphozyten nicht mehr über die Blut-Hirn-Schranke das zentrale Nervensystem infiltrieren (Kappos *et al.*, 2006). Keul *et al.* untersuchten den Einfluss von FTY720 *in vivo* auf die Atherogenese bei ApoE-defizienten Mäusen und zeigten, dass die Gabe von FTY720 zu einem signifikanten Rückgang des Volumens atherosklerotischer Läsionen um 62,5 % führt. Es wurde postuliert, dass diese Wirkung wahrscheinlich auf die Unterdrückung der Mechanismen zurückzuführen, die für die Migration von Monozyten zu atherosklerotischen Läsionen verantwortlich sind (Keul *et al.*, 2007). Die Interpretation solcher *in vivo*-Experimente gestaltet sich allerdings schwierig, da die Effekte sowohl auf der Aktivierung von S1PR1 oder anderen S1PR als auch auf die Herunterregulation von S1PR1 beruhen könnten.

S1PR2

Im Gegensatz zum S1PR1 sind S1PR2-defiziente Mäuse lebensfähig und weisen eine normale Gefäßreifung auf (Kono *et al.*, 2004). Allerdings fallen die Wurfgrößen kleiner aus und S1PR2-defiziente Mäuse präsentieren sich einen Monat nach Geburt taub (Kono *et al.*, 2004, Kono *et al.*, 2007). Die Ursache der Gehörlosigkeit scheint ein Defekt in der *Stria vascularis* zu sein. Der Verlust der S1PR2-vermittelten Vasokonstriktion in einem der *Stria vascularis* vorgeschalteten Gefäß führt zu einer hohen Druckbelastung mit konsekutiver Vasodilatation und Deformation des Kapillarbettes (Kono *et al.*, 2007). Lorenz *et al.* beobachteten, dass eine S1PR2-Defizienz *in vivo* zu einer Abnahme des allgemeinen Gefäßtonus sowie der kontraktilen Reaktionsfähigkeit führt (Lorenz *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang zeigten *ex vivo*-Versuche mit murinen Aorten, dass S1P über die Bindung an S1PR2 mit konsekutiver Aktivierung des $G\alpha_{12/13}$ -Rho/Rho-Kinase-Signalwegs die mittlere effektive Konzentration (EC50) des α 1-Adrenorezeptor-Agonisten Phenylephrin verringert und damit dessen vasokonstriktive Wirkung potenziert wird (Panta *et al.*, 2019).

Im Unterschied zum S1PR1 schwächt der S1PR2 die vaskuläre Barrierefunktion, indem die Zell-Zellverbindungen gelockert werden und so die Permeabilität erhöht wird (Sanchez *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2015, Xu *et al.*, 2021). Während der S1PR1 über $G\alpha_i$ und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Signale zur Reduktion der Gefäßpermeabilität vermittelt, wird dieser Signalweg durch die S1PR2-vermittelte Aktivierung von PTEN (Phosphatase und Tensin homolog) inhibiert (Sanchez *et al.*, 2007). Des Weiteren reguliert S1P über die Bindung an S1PR2 die Produktion proinflammatorischer Zytokine. So ist die LPS-induzierte Produktion

proinflammatorischer Marker nach Gabe des S1PR2-Antagonisten JTE-013 sowie in S1PR2-defizienten Mäusen supprimiert (Skoura *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2013a).

Weiterhin zeigten Sanchez *et al.* in *in vitro*-Experimenten, dass der endotheliale S1PR2 die promigratorischen Signale des S1PR1 durch die Aktivierung von PTEN antagonisiert (Sanchez *et al.*, 2005). In einem Atherosklerose-Mausmodell beobachteten Skoura *et al.* in S1PR2-knockout Mäusen eine 80%ige Reduktion der Plaquegröße sowie der Anzahl an Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Als nächstes wurden S1PR2-defiziente Makrophagen in ApoE-defiziente Mäuse transplantiert, um zu überprüfen, ob die Expression des S1PR2 auf Makrophagen für die beobachteten Unterschiede verantwortlich ist. Dabei zeigten sich im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen ebenfalls eine Reduktion der Plaquegröße sowie eine verringerte Anzahl an Makrophagen in der Plaque (Skoura *et al.*, 2011). Ishii *et al.* fanden eine Beeinträchtigung der S1P-vermittelten Rekrutierung osteoklastischer Vorläuferzellen in die Knochen von S1PR2-knockout Mäusen. Diese Zellen entstammen den gleichen Vorläuferzellen wie Makrophagen und können in Abwesenheit osteoklastischer Differenzierungsstimuli auch zu solchen differenzieren (Arai *et al.*, 1999, Ishii *et al.*, 2011). Die Rekrutierung von osteoklastischen Vorläuferzellen wird über den S1P-Gradienten und die unterschiedliche Expression von S1PR1 und S1PR2 reguliert. Mittels S1PR1 wandern die Zellen dem S1P-Gradienten folgend (niedrige S1P-Konzentration im Knochenmark, hohe im Blut) ins Blut, wo eine konstitutive Aktivierung des S1PR1 letztendlich zur Internalisierung und Degradation des S1PR1 führt, sodass die Expression des S1PR2 im Vergleich zum S1PR1 relativ erhöht ist. S1P vermittelt nun über S1PR2 einen chemorepulsiven Effekt, sodass die osteoklastischen Vorläuferzellen aus dem Blutkreislauf in das umliegende Gewebe treten (Ishii *et al.*, 2011). Dieses Modell steht im Einklang mit der Vermutung, dass innerhalb der Plaques über den S1PR2 auf Makrophagen ein Retentionssignal vermittelt wird (Michaud *et al.*, 2010).

S1PR3

Eine globale Deletion des S1PR3 zeigt wie auch die des S1PR2 keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit von Mäuseembryonen. Allerdings geht eine globale Doppeldeletion von S1PR2 und S1PR3 mit schweren vaskulären Abnormitäten sowie einer erhöhten embryonalen Letalität einher. Daher wurde vermutet, dass die beiden Rezeptoren redundante oder kooperative Funktionen hinsichtlich der Gefäßreifung besitzen (Kono *et al.*, 2004).

Die Wirkung von S1P auf die Gefäßpermeabilität scheint nicht nur vom endothelialen S1PR-Expressionsmuster, sondern auch von der Plasma-Konzentration abhängig zu sein. Unter physiologischen Konzentrationen (0,5 μM) verringert S1P über die Bindung an S1PR1 mit konsekutiver Aktivierung von G_{α_i} und der GTPase Rac die Gefäßpermeabilität. Erhöhte S1P-Konzentrationen (5 μM) führen hingegen v.a. über die Bindung an S1PR3 zur Aktivierung von $G_{12/13}$ und der GTPase Rho und damit zur Verstärkung der Gefäßpermeabilität *in vitro* (Garcia

et al., 2001, Shikata *et al.*, 2003). Zudem beobachteten Sammani *et al.* in einem Mausmodell mit LPS-induzierter Lungenentzündung (Zustand einer gesteigerten Gefäßpermeabilität), dass die Herunterregulation der S1PR3-Expression mittels *Small interfering RNA* (siRNA) zu einer Reduktion der Gefäßpermeabilität in den Lungenarterien führt (Sammani *et al.*, 2010). Interessanterweise wiesen Sun *et al.* eine erhöhte Konzentration an S1PR3-haltigen extrazellulären Vesikeln im Plasma von Patienten mit einer Sepsis-bedingten akuten Lungenentzündung nach, weshalb der S1PR3 als neuer Biomarker für den Schweregrad der akuten Lungenentzündung vorgeschlagen wurde (Sun *et al.*, 2012).

Abhängig vom Zelltyp zeigt die Aktivierung des S1PR3 sowohl einen vasodilatativen als auch vasokonstriktiven Effekt. So stimuliert S1P über die Bindung an den endothelialen S1PR3 via PI3K die Phosphorylierung der eNOS und damit die Vasodilatation (Nofer *et al.*, 2004). Die Bindung von S1P an den S1PR3 auf GMZ führt hingegen über die G_q-abhängige Aktivierung der PLC zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium und damit zur Vasokonstriktion (Murakami *et al.*, 2010, Hemmings, 2006).

Des Weiteren begünstigt die Aktivierung des endothelialen S1PR3 die Leukodiapedese. So führt eine S1PR3-abhängige Erhöhung des intrazellulären Kalziums in HUVECs zu einer Hochregulation der P-Selektin-Expression. P-Selektin ist ein Zelladhäsionsmolekül und fördert das endotheliale *Rolling* (Nussbaum *et al.*, 2015). Zudem führt die Bindung von S1P an S1PR3 über eine Aktivierung von NF- κ B zu einer erhöhten Expression von VCAM-1 und ICAM-1, wodurch die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand verstärkt wird (Kimura *et al.*, 2006, Galkina und Ley, 2007). Im Einklang mit diesen *in vitro* Ergebnissen zeigten Keul *et al.* in einem murinen Atherosklerose-Modell mit ApoE-defizienten Mäusen, dass die zusätzliche Deletion des S1PR3 zwar nicht zu einer Reduktion der Plaquegröße, jedoch zu einer geringeren Zahl an Makrophagen führt (Keul *et al.*, 2011).

Nach aktuellem wissenschaftlichem Kenntnisstand scheint S1P über die Bindung an seine Rezeptoren sowohl pro- als auch anti-atherosklerotische Eigenschaften zu besitzen. Die Gesamtwirkung des S1P wird demnach beeinflusst durch das Expressionsmuster der S1PR in der Gefäßwand, deren Bindung an unterschiedliche G-Proteine sowie der S1P-Blutkonzentration.

Als Pathomechanismus einer Restenose wird neben der Intimahyperplasie auch das erneute Auftreten von Atherosklerose in der Neointima bzw. die Neoatherosklerose diskutiert (Nguyen *et al.*, 2022, Nusca *et al.*, 2022). Histologisch ähnelt die Neoatherosklerose der nativen Atherosklerose und ist durch die Akkumulation von lipidbeladenen Schaumzellen mit oder ohne Bildung von nekrotischen Kernen oder Verkalkungen gekennzeichnet. Während es bei der Atherosklerose bereits im Kindesalter zu einer adaptiven Intimahyperplasie und im weiteren Verlauf zur pathologischen Intimaverdickung mit ersten Lipidablagerungen in die

Intima kommt und meist Jahrzehnte vergehen bis erste Symptome auftreten, entwickelt sich die Atherosklerose in der Neointima bereits innerhalb von Monaten bis Jahre. Die Mechanismen der rapiden Entstehung von Neoatherosklerose sind noch nicht hinreichend identifiziert worden. Es wird jedoch postuliert, dass eine gestörte Re-Endothelialisierung oder eine beeinträchtigte vaskuläre Integrität der Neointima zu diesem Prozess beitragen könnte (Insull, 2009, Otsuka *et al.*, 2015, Nusca *et al.*, 2022).

1.2.2.2 Die Rolle der S1P-Rezeptoren in der Restenose

Wie bereits erwähnt, ist neben der Progression der Grunderkrankung v.a. die intimale Hyperplasie die Hauptursache für eine Restenose nach der Revaskularisation. Pathognomonisch für die Intimahyperplasie ist die Dedifferenzierung von GMZ in der Tunica media sowie deren Migration in die Tunica intima und Proliferation, was folglich zu einer Verdickung der Arterienwände und einer erneuten Einengung des arteriellen Lumens führt (Owens *et al.*, 2004). Hierbei scheint insbesondere das Verhältnis zwischen S1PR1/3 und S1PR2 eine bedeutende Rolle zu spielen (Inoue *et al.*, 2007, Yuan *et al.*, 2017).

S1PR1

Kluk und Hla zeigten, dass S1PR1 in GMZ von Baby-Ratten hoch exprimiert ist und die Proliferation sowie die Migration fördert. Im Vergleich dazu exprimierten adulte mediale GMZ kaum S1PR1 und zeigten keine migratorische Reaktion auf S1P. Nach Transfektion dieser Zellen mit S1PR1 erhöhte sich jedoch deren Proliferationsrate und es konnte auch eine Steigerung der S1P-abhängigen Migration beobachtet werden (Kluk und Hla, 2001). Hobson *et al.* konnten nachweisen, dass die PDGF-BB-(Platelet Derived Growth Factor-BB)-induzierte Migration durch S1PR1 stimuliert wird. Die Aktivierung des PDGF-beta-Rezeptors stimuliert die SPHK, was zu erhöhten intrazellulären S1P-Spiegeln, Aktivierung von S1PR1, Rac-Stimulation und so zu einer gesteigerten Zellmigration führt (Hobson *et al.*, 2001). Braetz *et al.* untersuchten die Rolle von S1PR1 in der Restenose an einem humanisierten Rattenmodell. Hierbei wurde einer immundefizienten Ratte ein Teilstück der Bauchorta entnommen und durch eine zuvor denudierte humane *Arteria thoracica interna* ersetzt. Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an S1PR1 exprimierenden GMZ in der Tunica media nach der Implantation zunimmt und sich diese vorwiegend zum Lumen hin anreichern. Aufgrund dieser Verteilung der S1PR1-positiven Zellen wurde vermutet, dass S1PR1-positive GMZ mittels S1PR1 aus der Tunica media in die Tunica intima migrieren können (Braetz *et al.*, 2018). Eine gesteigerte S1PR1-Expression nach Endothelverletzung wurde ebenfalls von Kitano *et al.* in einem Mausmodell mit Ligatur der Karotisarterie bei Wildtyp-Mäusen beobachtet. Zudem zeigten transgene Mäuse mit einer spezifischen S1PR1-Überexprimierung in GMZ im Vergleich zu GMZ aus Wildtyp-Mäusen eine

verstärkte Ligatur-induzierte neointimale Hyperplasie mit erhöhter neointimaler Zellproliferation (Kitano *et al.*, 2019).

S1PR2

Ryu *et al.* gingen der Frage nach, warum S1P die Migration von HUVECs stimuliert, die Migration von GMZ jedoch hemmt. Sie entdeckten dabei, dass GMZ in hohem Maße S1PR2 exprimieren, während HUVECs vorwiegend S1PR1 exprimieren und in diesen Zellen eine Expression von S1PR2 nicht nachweisbar war. Eine Überexpression von S1PR2 in HUVECs und von S1PR1 in GMZ verringerte die S1P-induzierte Stimulation bzw. Hemmung der Zellmigration (Ryu *et al.*, 2002). Zudem fördert S1P über die Aktivierung von S1PR2 auf GMZ die Expression von Differenzierungsgenen und könnte so einer Dedifferenzierung, also der Umwandlung des kontraktiven Phänotyps in einen synthetischen Phänotyp, entgegenwirken (Grabski *et al.*, 2009). Des Weiteren beobachteten Shimizu *et al.*, dass die Ligatur der Karotisarterie bei einer S1PR2-Knockout-Maus im Vergleich zu einer Wildtyp-Maus eine stärkere Intimahyperplasie mit einer größeren Anzahl an medialen und intimalen GMZ hervorruft (Shimizu *et al.*, 2007). Wang *et al.* identifizierten kürzlich ein neues Adipokin (FAM19A5), welches *in vitro* durch die Bindung an S1PR2 die Proliferation und Migration von GMZ unterdrücken und *in vivo* das Ausmaß der durch eine Ballonverletzung der Karotisarterie induzierte neointimale Hyperplasie abschwächen kann (Wang *et al.*, 2018). Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass dem S1PR2 generell eine inhibierende Wirkung auf die Intimahyperplasie zugeschrieben wird.

S1PR3

Die Rolle des S1PR3 in der Restenose wird kontrovers diskutiert. Keul *et al.* beobachteten vier Wochen nach Ligatur der Karotisarterie bei S1PR3-defizienten Mäusen sowohl eine größere neointimale Hyperplasie als auch eine höhere Zellzahl in der Neointima als bei der Kontrollgruppe. Zur weiteren Untersuchung dieser Beobachtung wurden GMZ aus Wildtyp- sowie S1PR3-defizienten Aorten isoliert und ihre Proliferationsraten und migratorische Antworten auf S1P gemessen. Während kein signifikanter Unterschied bezüglich der Proliferationsrate gefunden werden konnte, wiesen S1PR3-defiziente GMZ aus der Aorta im Vergleich zu Wildtyp-Zellen eine geringere Migration (Keul *et al.*, 2011). Die Rolle des S1PR3 bei der Restenose wurde ebenfalls durch Shimizu *et al.* nach Denudierung der Iliofemoralarterie in Wildtyp- und S1PR3-defizienten Mäusen untersucht. Vier Wochen nach Denudierung des Endothels mittels eines Loop-Katheters wurde bei S1PR3-defizienten Mäusen eine signifikant kleinere neointimale Hyperplasie mit einer geringeren Proliferationsrate beobachtet. Zudem wurde auf zellulärer Ebene gezeigt, dass bei S1PR3-überexprimierenden GMZ aus der Karotisarterie, verglichen mit Wildtyp-GMZ, durch

Stimulation mit S1P über die Aktivierung des ERK/AKT/RAC-Signalweges die Migration und Proliferation gesteigert wird (Shimizu *et al.*, 2012).

Offensichtlich besitzt der S1PR3 gegensätzliche Funktionen, je nachdem welches Tiermodell angewandt wird. Hierbei könnten unterschiedliche Gefäße (Karotiden vs. Aorten vs. Iliofemoralarterien) als auch verschiedene Verletzungsmodelle (Ligatur vs. Denudation) eine Rolle spielen (Shimizu *et al.*, 2012).

Nach aktuellem wissenschaftlichem Kenntnisstand scheinen also gefäßbettspezifische S1PR-Agonisten bzw. -Antagonisten eine potentielle Therapieoption zur Verhinderung einer Intimahyperplasie zu sein. Wamhoff *et al.* untersuchten den Effekt von den S1PR1- und S1PR3-Antagonisten VPC44116 und VPC25239 sowie dem S1PR2-Antagonisten JTE013 auf die Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie bei Ratten. Sie zeigten, dass das Ausmaß der durch eine Ballonverletzung der Karotisarterie induzierten neointimalen Hyperplasie durch die tägliche intraperitoneale Gabe von VPC44116 halbiert wird. Zudem wurde die S1P-induzierte Proliferation von GMZ aus der Rattenaorta durch VPC25239 verringert und durch JTE013 erhöht. Ebenso wurde durch VPC25239 die S1P-induzierte Expression von Differenzierungsgenen erhöht, während sie durch JTE013 verringert wurde (Wamhoff *et al.*, 2008).

Insgesamt lassen die Ergebnisse also darauf schließen, dass die Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie durch S1PR1 gefördert und durch S1PR2 gehemmt wird.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid, welches im Gefäßsystem sowohl physiologische als auch pathophysiologische Prozesse reguliert, die an der Entstehung der Atherosklerose sowie der Restenose beteiligt sind. Ein Großteil der Erkenntnisse zu den komplexen Funktionen von S1P und seinen Rezeptoren stammt aus Zellversuchen sowie aus Studien an Tiermodellen und lässt sich daher nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen. Aufgrund dessen soll in dieser Dissertation die Rolle von S1P und seinen Rezeptoren in der Atherosklerose und Restenose bei Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist es zum einen zu untersuchen, ob sich Assoziationen zwischen S1P-Blutkonzentrationen und anderen erhobenen klinischen Parametern einschließlich Outcome-Daten finden. Entsprechende Befunde könnten Hinweise darauf geben, ob S1P ein potentieller Indikator für das Auftreten von Restenosen ist. Zum anderen soll die Expression der S1P-Rezeptoren sowie von bestimmten Zellmarkern (CD31, CD45, CD68, Myh11) innerhalb der atherosklerotischen Plaques sowie der benachbarten gesunden Gefäßwand gemessen werden. Danach soll untersucht werden, ob die Expression einzelner S1P-Rezeptoren Hinweise auf die histomorphologische Plaquebeschaffenheit gibt oder prädiktiv für das Auftreten einer Restenose ist.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Im Rahmen der epidemiologischen, prospektiven Kohortenstudie „Die Rolle von Sphingosin-1-phosphat und seinen Rezeptoren in Atherosklerose und Restenose“ wurden für die Dissertation im Zeitraum von 2014 bis 2020 insgesamt 187 Patienten eingeschlossen. Der Ethikantrag für diese Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (PV 4678).

Alle eingeschlossenen Patienten litten an einer klinisch relevanten, atherosklerotisch bedingten Durchblutungsstörung in den Becken-Beinarterien. Die Indikationsstellung erfolgte gemäß den damals gültigen deutschen S3-Leitlinien zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der pAVK (Lawall *et al.*, 2015b).

Weitere Voraussetzungen für die Studienteilnahme waren Volljährigkeit, ausreichende Deutschkenntnisse sowie die für die Untersuchungen und das schriftliche Einverständnis erforderliche körperliche und geistige Gesundheit (s. Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung im Anhang). Abbildung 4 gibt einen Überblick über den Studienablauf.

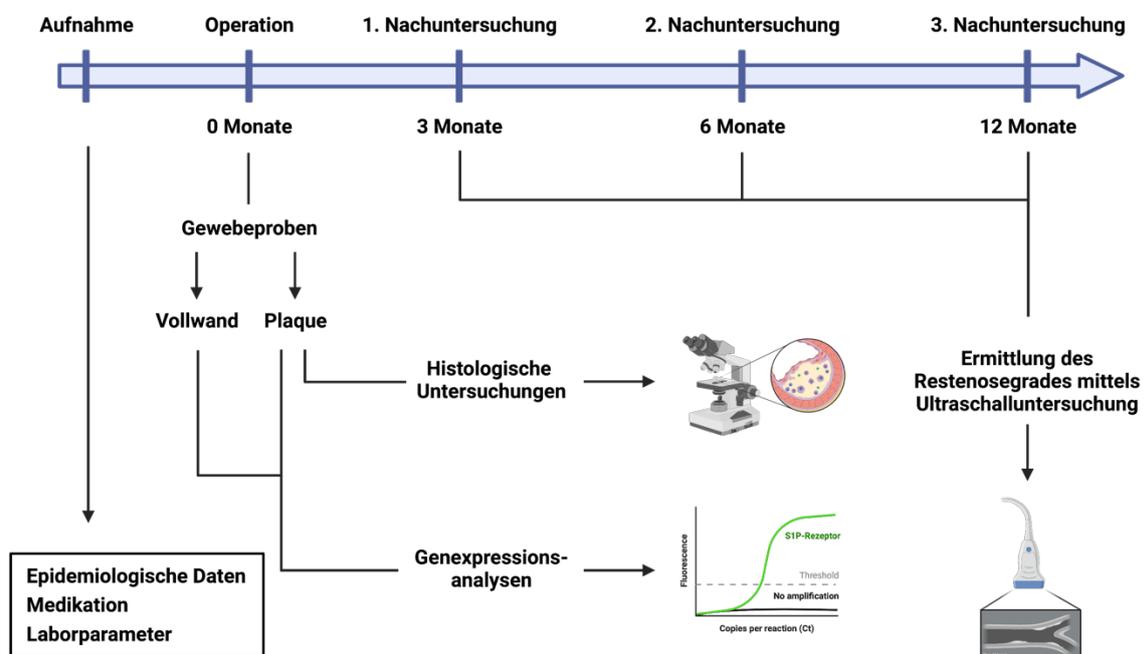


Abbildung 4: Übersicht des Studienablaufs. Dargestellt sind der zeitliche Verlauf von der Aufnahme, über die Operation (oder Intervention) bis hin zu den drei Nachsorgeterminen, die erhobenen Daten sowie die durchgeführten Untersuchungen.

Die Akquise patientenbezogener Daten erfolgte mittels Interview im Rahmen der Aufnahmeuntersuchung sowie aus der digitalen Patientenakte (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Erhobene patientenbezogene Daten und ihre Definition. D, Tag; M, Monat; J, Jahr; NOAK, neue orale Antikoagulanzen.

	Variable	Variablendefinition
Epidemiologische Daten	Geburtsdatum	DD.MM.JJJJ
	Geschlecht	männlich/weiblich
	Körpergewicht	in Kilogramm (kg)
	Körpergröße	in Zentimetern (cm)
	Body-Mass-Index	kg/m ²
Präoperative Medikation	Acetylsalicylsäure	ja/nein
	Antidiabetikum	ja/nein
	Antihypertensivum	ja/nein
	Betablocker	ja/nein
	Clopidogrel	ja/nein
	Marcumar	ja/nein
	NOAK	ja/nein
	Statin	ja/nein

Zudem wurde vor der geplanten Therapie eine venöse Blutentnahme durchgeführt. Routinelaborparameter aus den Serum- und Plasmaproben (Sarstedt; s. Tabelle 8) wurden nach standardisierten Methoden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bestimmt (s. Tabelle 4). Die korrespondierenden Einheiten und Referenzwerte wurden dem klinikinternen Laborführer entnommen (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), 2021).

Tabelle 4: Erhobene Laborparameter. Die Referenzbereiche für Plasma- und Serum-S1P sind der Studie von Daum et al. 2020 entnommen worden. a, Frauen; b, Männer.

Laborparameter	Einheit	Referenzbereich
Erythrozyten	Mrd/ml	4,1-5,1 ^a ; 4,5-5,9 ^b
Leukozyten	Mrd/l	3,8-11,0
Thrombozyten	Mrd/l	150-400
Hämoglobin	g/dl	12,3-15,3 ^a ; 14,0-17,5 ^b
Hämatokrit	l/l	35-45 ^a ; 36-48 ^b
Kreatinin	mg/dl	0,55-1,02 ^a ; 0,70-1,30 ^b
Gesamt-Cholesterin	mg/dl	< 200
Triglyceride	mg/dl	< 150
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 48 ^a ; > 40 ^b
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 100
C-reaktives Protein	mg/l	< 5
Serum-S1P	nmol/ml	0,59-1,51
Plasma-S1P	nmol/ml	0,49-1,15

Außerdem wurden die präoperativen Serum- und Plasma-S1P-Konzentrationen massenspektroskopisch bestimmt (s. Kapitel 3.3.3). Hierzu wurde das bei 4 °C gelagerte Blut innerhalb von 48 Stunden nach Entnahme für 15 min bei 1.500 x g zentrifugiert und das aliquotierte Serum bzw. Plasma bis zur späteren massenspektroskopischen Messung bei -

80 °C (V.I.P.™, SANYO; s. Tabelle 9) gelagert. Der Referenzbereich für Serum-S1P ist der Studie von Moritz *et al.* 2017 entnommen worden.

Sofern es möglich war, wurden im Rahmen von Thrombendarteriektomien und Bypass-Operationen Gewebeproben der Plaque sowie der benachbarten, gesunden Gefäßwand (Vollwand) entnommen. Im Anschluss daran wurden die Gewebeproben für die Genexpressionsanalysen (s. Kapitel 3.3.1) zunächst für mindestens 48 h bei Raumtemperatur und anschließend bis zur weiteren Verwendung in RNAlater™-Lösung (Thermo Fisher Scientific; s. Tabelle 6) bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert. Weitere Teile der Gewebeproben wurden für die histologische Untersuchung (s. Kapitel 3.3.2) in Formalin (Formafix 4 % gepuffert, Grimm med. Logistik GmbH; s. Tabelle 6) bei Raumtemperatur gelagert.

Drei, sechs und zwölf Monate nach dem Eingriff wurden die Patienten zu Nachsorgeuntersuchungen mittels farbkodierter Duplexsonographie (GE LOGIQ E6/E9 mit dem Linearschallkopf 9, General Electrics; s. Tabelle 9) einbestellt. Die Untersuchung des betroffenen Gefäßabschnitts erfolgte in Rückenlage. Nach Begutachtung der Gefäßmorphologie und Bestimmung der Intima-Media-Dicke im B-Bild wurde die Flussgeschwindigkeit im Pulsed-Wave-Doppler mit einem Anschallwinkel von $\leq 60^\circ$ quantifiziert. Die Graduierung einer potentiellen Restenose erfolgte für alle Gefäßabschnitte gleichermaßen anhand der Flussgeschwindigkeit im versorgten Gefäßabschnitt (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Einteilung des Restenosegrades anhand der Flussgeschwindigkeiten. Die Flussgeschwindigkeiten wurden mittels farbkodierter Duplexsonographie ermittelt.

Flussgeschwindigkeit	Befund	Restenosegrad
1-99 cm/s	normal	0
100-199 cm/s	leichtgradig	1
200-299 cm/s	mittelgradig	2
> 300 cm/s	hochgradig	3
0 cm/s	Verschluss	4

Neben den Restenosegraden nach drei, sechs und zwölf Monaten wurde auch eine binäre Outcome-Variable erhoben, wobei Subgruppe Outcome 0 alle Patienten enthielt, die keine Restenose innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums aufwiesen, und die Subgruppe Outcome 1 alle Patienten mit einem Restenosegrad von 1-4. Der klinische Endpunkt wurde durch einen Restenosegrad von 3 oder 4 definiert, da bei diesen Patienten eine Revision des Gefäßabschnittes erfolgte. Sind Patienten nicht zur Nachuntersuchung erschienen, wurde der Gefäßstatus inklusive Flussgeschwindigkeiten im operierten Gefäßabschnitt beim auswärtigen, behandelnden Arzt erfragt. War dies nicht möglich und wurde bei einer folgenden Nachuntersuchung eine normale Flussgeschwindigkeit ermittelt, so wurde ebenfalls ein Restenosegrad von 0 für den vorherigen Zeitpunkt rückblickend angenommen. Wurde jedoch

bei einer folgenden Nachuntersuchung ein Restenosegrad ≥ 1 ermittelt, konnten keine Annahmen zu vorherigen Zeitpunkten gemacht werden.

3.2 Material

In den folgenden Kapiteln werden die zur Lagerung bzw. Aufarbeitung sowie zur Untersuchung der Gewebeproben verwendeten Chemikalien und Reagenzien (s. Tabelle 6), Kits (s. Tabelle 7), Verbrauchsmaterialien (s. Tabelle 8), Geräte (s. Tabelle 9) sowie Software (s. Tabelle 10) aufgelistet.

3.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Formafix 4 % gepuffert	Grimm med. Logistik GmbH
Osteosoft®	Merck KGaA
Isopropanol (70, 80, 85, 90, 96 & 100 %)	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Tissue-Tek® Paraffinwachs TEK III	Sakura Finetek Germany GmbH
Xylol z. A.	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Ethanol vergällt (70, 96 & 99 %)	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Eukitt® Quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich® Co. LLC.
Hämatoxylin-Lösung (Mayer)	Medite GmbH
Eosin-Lösung 0,2 % aq.	Medite GmbH
Resorcinfuchsin-Lösung nach Weigert	Waldeck GmbH & Co KG
Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert A und B	Waldeck GmbH & Co KG
Thiazinrot R	Waldeck GmbH & Co KG
Pikrinsäure gesättigt in Isopropanol	MORPHISTO GmbH
Ammoniumeisen(III)-sulfat-Dodecahydrat	Merck KGaA
Pikrinsäure-Lösung 1,2 % aq.	AppliChem GmbH
Orange G	Merck KGaA
Ponceau-Säurefuchsin-Lösung (Masson)	Waldeck GmbH & Co KG
Phosphorwolframsäure	Waldeck GmbH & Co KG
Anilinblau	Waldeck GmbH & Co KG
Essigsäure 99,99 %	Sigma-Aldrich® Co. LLC.
RNAlater™-Lösung	Thermo Fischer Scientific
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich® Co. LLC.
Ethanol 99 %	Walter CMP
S1P-d7 ([16,17,18- ² H7]-S1P)	Avanti Polar Lipids
Acetonitril 80 % aq.	Th. Geyer GmbH & Co. KG

3.2.2 Kits

Tabelle 7: Kits

Name	Hersteller	Komponenten
RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (50)	Qiagen	RNeasy Mini Spin Columns Collection tubes (1,5 ml) Collection tubes (2 ml) RLT Puffer Proteinase K RW1 Puffer RPE Puffer RNase-freies Wasser
RNase-Free DNase Set	Qiagen	RNase-freie DNase I RDD Puffer RNase-freies Wasser
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Scientific	5X Reaction Mix (Reaktionspuffer, dNTPs, oligo (dT) ₁₈ und randomisierte Hexamer-Primer) Maxima Enzyme Mix (Maxima Reverse Transkriptase und RiboLock RNase Inhibitor) RNase-freies Wasser
Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Kit (400)	Qiagen	2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix (HotStarTaq®Plus DNA Polymerase, Rotor-Gene SYBR Green PCR Buffer, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP))

3.2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Einbettkassette	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
Mikrotomklinge S35 Edelstahl	Feather Safety Razor CO., LTD.
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH
Deckgläser 24 x 60 mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
Stainless Steel Beads, 7mm	Qiagen
PCR 0.1 ml 4-Tube & 4-Cap Strips	Qiagen
Serum-Monovette (7,5 ml)	Sarstedt
EDTA-Monovette (7,5 ml)	Sarstedt
Zorbax SB-C8 column (2.1 × 50 mm)	Agilent Technologies

3.2.4 Geräte

Tabelle 9: Geräte

Name	Hersteller
TissueLyser® LT	Qiagen
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Epoch™ Spektralphotometer	BioTek
Take3™ Mikro-Volumen Platte	BioTek
Thermal Cycler T100™	BioRad
Rotor-Gene-Q-System (qPCR-Maschine)	Qiagen
V.I.P.™ (Gefrierschrank -80°C)	SANYO
Comfort (Gefrierschrank -20°C)	LIEBHERR
Schlittenmikrotom SM2010 R	Leica Bio
Modulares Paraffin-Einbettssystem TES 99	Medite
Paraffin-Streckbad 1052	LAUDA-GFL
Shandon Citadel 2000	Thermo Fischer Scientific
Trocken- und Wärmeschrank ED 56	Binder
Axio Scan.Z1	ZEISS
Massenspektrometer (Varian L1200 MS/MS)	Agilent Technologies
GE LOGIQ E6/E9 (Sonographie-Gerät)	General Electrics
Linearschallkopf 9 (2-10 MHz)	General Electrics

3.2.5 Software

Tabelle 10: Verwendete Programme

Name	Hersteller	Version
MS Office Excel	Microsoft	16.16.13
Gen5™ (RNA-Qualitätskontrolle)	BioTek®	2.0
Rotor-Gene Q	Qiagen	2.1.0.9
Netscope Viewer Student	Net-Base Software GmbH	1.1.7209.16711
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.	8

3.3 Methoden

3.3.1 Analyse der Genexpressionen

Um die Expression von Genen in den Gewebeproben zu untersuchen, wurden zunächst die Ribonukleinsäuren (gesamt RNA) isoliert und anschließend mittels reverser Transkriptase in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wurde daraufhin mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und analysiert.

3.3.1.1 RNA-Isolation

Die Aufarbeitung der bei -80 °C in RNAlater gelagerten Gewebeproben erfolgte mit dem RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen; s. Tabelle 7). Während die Gewebeproben für zehn Minuten bei Raumtemperatur auftauten, wurden zunächst für jede Probe 300 µl RLT Puffer mit 3 µl β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich; s. Tabelle 6) versetzt. Das Guanidiniumthiocyanat des RLT Puffers und das β-Mercaptoethanol dienen hierbei zur Inaktivierung der RNasen. Diese Lösung wurde zusammen mit zwei Metallkügelchen (Stainless Steel Beads, Qiagen; s. Tabelle 8) in ein steriles, auf Eis gelagertes 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Nach dem Auftauen wurde je nach Größe entweder die komplette Gewebeprobe verwendet, oder es wurde mittels sterilen Skalpells ein circa 3 mg schweres Teilstück herausgeschnitten. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Teilstück repräsentativ für die gesamte Plaque war. Weiter wurde die Probe mittels Skalpells in circa 1 x 1 mm große Stücke zerkleinert und nach Entfernung der überschüssigen RNAlater-Lösung in das vorbereitete Reaktionsgefäß gegeben.

Der zuvor auf Trockeneis gekühlte Rotor des Tissue Lyser LT (Qiagen; s. Tabelle 9) wurde mit dem Reaktionsgefäß bestückt und die Gewebeprobe wurde für fünf Minuten bei 50 Hertz homogenisiert. Danach wurde die Gewebeprobe auf Eis und der Rotor auf Trockeneis erneut für weitere fünf Minuten gekühlt. Diese Prozedur wurde insgesamt drei Mal durchgeführt.

In der Zwischenzeit wurde für den Proteinverdau eine Proteinase K Lösung bestehend aus 590 µl RNase-freien Wasser und 10 µl Proteinase K angesetzt. Aus dem 2 ml Reaktionsgefäß wurde anschließend das Homogenat in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um möglichst das ganze Homogenat zu überführen, wurde das 2 ml Reaktionsgefäß zum Schluss mit 600 µl Proteinase K Lösung gespült und der restliche Inhalt ebenfalls in das 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation des Ansatzes bei 56 °C und 800 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf; s. Tabelle 9). Nach einer dreiminütigen Zentrifugation (Zentrifuge 5810, Eppendorf; s. Tabelle 9) bei 10.000 x g wurde der Überstand (ca. 900 µl) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 450 µl Ethanol 99 % (Walter CMP; s. Tabelle 6) vermischt.

Als nächstes folgte die Reinigung und Konzentration der gesamt RNA: Hierbei wurden 700 µl des Ansatzes auf die Eluationssäule gegeben, bei 8.000 x g zentrifugiert und der im

Auffangbehältnis befindliche Durchfluss verworfen. Die Prozedur wurde für die verbliebenen 650 µl wiederholt.

Für den ersten Waschschrift wurden 350 µl RW1 Puffer auf die Eluationssäule gegeben und zentrifugiert (1 min, 8.000 x g). Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur ein 30-minütiger Verdau der gebundenen genomischen DNA unter Verwendung des RNase-Free DNase Sets (Qiagen; s. Tabelle 7). Hierbei wurden 10 µl DNase-Lösung mit 70 µl RDD Puffer gemischt und auf die Membran der Eluationssäule pipettiert.

Danach wurde die Eluationssäule ein zweites Mal mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen, gefolgt von 2 weiteren Waschschriften mit 500 µl RPE Puffer, um Salze und Proteine zu entfernen (Zentrifugation bei 8.000 x g; je 1 Minute). Im Anschluss wurde die Eluationssäule in ein neues Auffanggefäß überführt und bei 12.000 x g zentrifugiert, um Waschpufferreste vollständig zu entfernen. Zur Elution der RNA wurde die Eluationssäule in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, 50 µl RNase-freies Wasser (Qiagen; s. Tabelle 7) auf die Säulenmembran gegeben und die Säule für eine Minute bei 8.000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.3.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten RNA

Die Konzentration sowie die Reinheit der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (BioTek®; s. Tabelle 9) gemessen. Hierzu wurden je Probe 2 µl der RNA-Lösung auf eine Mikro-Volumen-Platte (BioTek®; s. Tabelle 9) gegeben. Auf die ersten beiden Mikrosots der Platte wurden je 2 µl RNase-freies Wasser (Qiagen; s. Tabelle 7) zur Blindwertbestimmung pipettiert. Anschließend wurde die Mikro-Volumen-Platte in das Spektralphotometer gegeben, in dem die Extinktion des Lichts bei einer Wellenlänge von 260 nm, 280 nm und 320 nm (interne Referenz des Photometers) gemessen wurde. Mit Hilfe einer Datenanalyse-Software (Gen5, BioTek®; s. Tabelle 10) wurde ebenfalls der 260/280-Quotient und die RNA-Konzentration berechnet.

Die RNA-Konzentration wurde mittels Extinktionswert bei 260 nm Wellenlänge unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet:

$$\log I_0/I = E_{260} = \varepsilon_{260} \times c \times d \rightarrow c = \frac{E_{260}}{\varepsilon_{260} \times d}$$

wobei:

I_0/I = Verhältnis der Intensitäten des eingestrahnten (I_0) und des austretenden (I) Lichts,

E_{260} = gemessene Extinktion bei der Wellenlänge von 260 nm,

ε_{260} = substratspezifischer Extinktionskoeffizient der Wellenlänge 260 nm,

c = Konzentration der absorbierenden Substanz in ng/ μ l,

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm).

Da die Schichtdicke der Küvette d mit 1 cm und der substratspezifische Extinktionskoeffizient für RNA mit $0.025 \text{ (ng}/\mu\text{l)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ konstant sind, ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Extinktion und der Konzentration der RNA-Lösung, wobei eine Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 40 ng/ μ l entspricht (Studio *et al.*, 2013).

Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren und Proteinen bei einer Wellenlänge von 260 nm respektive 280 nm, kann mittels des Extinktionsquotienten (260/280) die Reinheit des RNA-Eluats bestimmt werden. Ein Extinktionsquotient (260/280) von 1,8 – 2,0 wird für eine reine RNA-Lösung gemessen. Abweichende 260/280-Quotienten entstehen unter anderem durch Kontaminationen mit Proteinen, Phenolen oder Guanidinisothiocyanat (Bestandteil des RLT Puffers) oder auch bei sehr niedrigen RNA-Konzentrationen von unter 10 ng/ μ l (Chomczynski und Sacchi, 2006).

Qualitätskriterien für RNA-Lösungen im Rahmen dieser Untersuchungen beinhalteten eine RNA-Konzentration von mindestens 0,5 ng/ μ l und ein 260/280-Extinktionskoeffizient zwischen 1,8 und 2,8. Bei Nichteinhaltung dieser Werte, wurde die RNA-Isolation wiederholt. War kein weiteres Gewebe vorhanden, wurden für die betreffenden RNA-Lösungen die Genexpressionsanalysen jeweils dreifach durchgeführt und, sofern die Qualitätskriterien der qPCR (s. Kapitel 3.3.1.4) eingehalten wurden, der Mittelwert der neun Einzelmessungen verwendet.

3.3.1.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific; s. Tabelle 7) verwendet. Hierbei wurden folgende Reagenzien gemäß dem Herstellerprotokoll auf Eis gemischt:

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen
5X Reaction Mix (Reaktionspuffer, dNTPs, oligo (dT) und randomisierte Hexamer-Primer)	4 µl
Maxima Enzyme Mix (Maxima Reverse Transkriptase und RiboLock RNase-Inhibitor)	2 µl
RNA-Lösung (maximale Stoffmenge: 200 ng; gegebenenfalls mit RNase-freiem Wasser verdünnt)	14 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in die PCR-Maschine (Thermal Cycler T100™, BioRad; s. Tabelle 9) gesetzt. Gemäß Herstellerprotokoll wurde die Probe im ersten Schritt für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert (*annealing*). Durch Verwendung von oligo-(dT)- Primern, die sich spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA anlagern, werden selektiv mRNA-Moleküle revers transkribiert. Im zweiten Schritt erfolgte die cDNA-Synthese für 30 Minuten bei 50 °C. Zum Schluss wurde die DNA-Polymerase bei 85 °C für 5 Minuten deaktiviert und somit die Reaktion gestoppt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben anschließend bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.3.1.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird eine spezifische DNA-Sequenz (Amplikon) mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase und spezifischen Primern amplifiziert. Die Anzahl der DNA-Kopien steigt hierbei exponentiell an, da es im Idealfall pro Zyklus zu einer Verdopplung des Reaktionsproduktes kommt. Bei der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wird die Produktmenge kontinuierlich am Ende eines jeden Zyklus gemessen. In dieser Studie wurde hierzu ein Farbstoff verwendet (SYBR® Green, Qiagen; s. Tabelle 7), der sich spezifisch an doppelsträngige DNA anlagert. Zuletzt wird die Zahl der Zyklen, die notwendig sind, um einen bestimmten Schwellenwert zu erreichen (C_T -Wert, engl. *cycle-threshold*), als Maß für die ursprünglich eingesetzte cDNA-Menge des Zielgens bestimmt. Setzt man den C_T -Wert der Zielgene ins Verhältnis zu den C_T -Werten eines Referenzgens (hier GAPDH, s.u.), welches in jedem Lauf mitbestimmt wird, kann man relative Expressionsänderungen von Zielgenen in verschiedenen Proben miteinander vergleichen.

Durchführung der qPCR

Die quantitative Bestimmung der Expression von den Zielgenen erfolgte mittels Rotor-Gene-Q-System (Qiagen, s. Tabelle 9), der dazugehörigen Software Rotor-Gene Q (Qiagen, s. Tabelle 10) und MS Excel (Microsoft, s. Tabelle 10). Für die relative Quantifizierung wurde neben den Zielgenen (die S1P-Rezeptoren S1PR1, S1PR2 und S1PR3, sowie die Zellmarker CD31, CD45, CD68 und Myh11) auch GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Referenzgen untersucht. Von Referenzgenen wird in erster Näherung davon

ausgegangen, dass sie in allen untersuchten Gewebeproben konstant exprimiert werden. Des Weiteren wurde für die qPCR der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green verwendet. Dieser interkaliert unspezifisch in die kleine Furche doppelsträngiger DNA und gibt bei Anregung ein Fluoreszenzsignal ab. Das detektierbare Fluoreszenzsignal verhält sich damit proportional zur Menge des amplifizierten PCR-Produkts (Walker und Rapley, 2008).

Als erstes wurde für jedes zu analysierende Gen (GAPDH, S1PR1, S1PR2, S1PR3, CD31, CD45, CD68 und Myh11) ein Mastermix (s. Tabelle 12) angesetzt, der die Gen-spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Sigma-Aldrich® Co. LLC.; s. Tabelle 13), das Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Kit und RNase-freies Wasser enthielt. Die Primer-Konzentration von 0,5 µM wurde hierbei so gewählt, dass eine Verdopplung der Primer-Konzentration bei definierter Template-Menge zu keiner Veränderung der C_T-Werte führte. Zugleich wurde bestimmt, dass eine Verdopplung der Template-Menge zu einer Verringerung des C_T-Wertes um 1 führt.

Tabelle 12: Pipettierschema für den Mastermix

Reagenz	Volumen
Primer (Konzentration: 0,5 µM): GAPDH, S1PR1, S1PR2, S1PR3, CD31, CD45, CD68 oder Myh11	1 µl
Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Kit	5 µl
RNase-freies Wasser	3 µl
Gesamtvolumen	9 µl

Tabelle 13: Primersequenzen für die qPCR

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
S1PR1	ATCATGGGCTGGAAGTGCATCA	CGAGTCCTGACCAAGGAGTAGAT
S1PR2	CAGACGCTAGCCCTGCTCAAGA	TAGTGGGCTTTGTAGAGGA
S1PR3	ACAACCGCATGTACTTTTTTCAT	TACTGCCCTCCCTGAGGAACCA
CD31	AACAGTGTGACATGAAGAGCC	TGTA AACAGCACGTCATCCTT
CD45	ACCACAAGTTTACTAACGCAAGT	TTTGAGGGGGATTCCAGGTAAT
CD68	CTTCTCTCATTCCCCTATGGACA	GAAGGACACATTGTA CTCCACC
Myh11	CGCCAAGAGACTCGTCTGG	TCTTTCCAACCGTGACCTTC
GAPDH	TCCTGCACCACCAACTGCTT	AGGGGCCATCCACAGTCTTC

Anschließend wurden gemäß Pipettierschema (s. Tabelle 14) jeweils 9 µl Mastermix je Reaktionsgefäß (PCR 0.1 ml 4-Tube & 4-Cap Strips, Qiagen; s. Tabelle 8) vorgelegt und 1 µl der cDNA, des Standardmix (Positivkontrolle) oder des RNase-freien Wassers (Negativkontrolle) hinzugefügt. Alle zu messenden Gene wurden in Triplikaten, die Negativkontrolle in Duplikaten und die Positivkontrolle als Unikat gemessen. Die Positivkontrolle bestand aus einer Mischung von DNA-Proben, die den Sequenzen der Zielgenen entsprachen. Diese Proben wurden zuvor per PCR synthetisiert, danach mittels Agarosegel-Elektrophorese isoliert und aufgereinigt. Ihre Identität wurde vor ihrer Verwendung

durch Sequenzierung bestätigt. Die Konzentration der Positivkontrolle betrug je nach Zielgen 1-10 pg/ml. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit RNase-freiem Wasser verwendet.

Tabelle 14: Pipettierschema der qPCR

	Probe cDNA (in Triplikaten)	Negativkontrolle H ₂ O (in Duplikaten)	Positivkontrolle Standardmix (in Unikaten)
Gen 1	9 µl Mastermix + 1 µl cDNA	9 µl Mastermix + 1 µl H ₂ O	9 µl Mastermix + 1 µl Standardmix
Gen 2	9 µl Mastermix + 1 µl cDNA	9 µl Mastermix + 1 µl H ₂ O	9 µl Mastermix + 1 µl Standardmix

Im Anschluss daran wurde die qPCR gemäß dem in Tabelle 18 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 15: Schema der qPCR-Reaktion

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	10 s	} 40 x
Hybridisierung	60 °C	15 s	
Kettenverlängerung	72 °C	20 s	
Schmelzkurve	72 °C – 95 °C	90 s pro 1 °C	

Auswertung der qPCR-Daten

Nach Beendigung der qPCR wurden die Messergebnisse in einem Graphen (s. Abbildung 6A) dargestellt: Auf der x-Achse ist die Anzahl der durchlaufenen Zyklen aufgetragen, auf der y-Achse die Intensität der Fluoreszenz (ΔR_n). R_n ist das detektierte Fluoreszenzsignal, welches an den Blindwert des nicht interkalierenden SYBR® Green normalisiert wurde und ΔR_n ist die Differenz zwischen R_n und einer festgelegten Baseline.

Der Graph kann in vier Phasen eingeteilt werden: In der anfänglichen lag-Phase (I) wird die DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert, ohne dass aber eine signifikante Steigerung des Fluoreszenzsignals detektiert werden kann. In der darauffolgenden log-Phase (II) kann unter optimalen Bedingungen die Verdopplung des PCR-Produkts pro Zyklus detektiert werden. Aufgrund der Akkumulation der PCR-Produkte und dem Verbrauch von Substrat und Enzym flacht die Kurve in der Verzögerungsphase (III) immer weiter ab. In der Plateauphase (IV) werden schließlich keine neuen Produkte mehr gebildet. Für die Datenanalyse der qPCR ist somit die log-Phase von entscheidender Bedeutung.

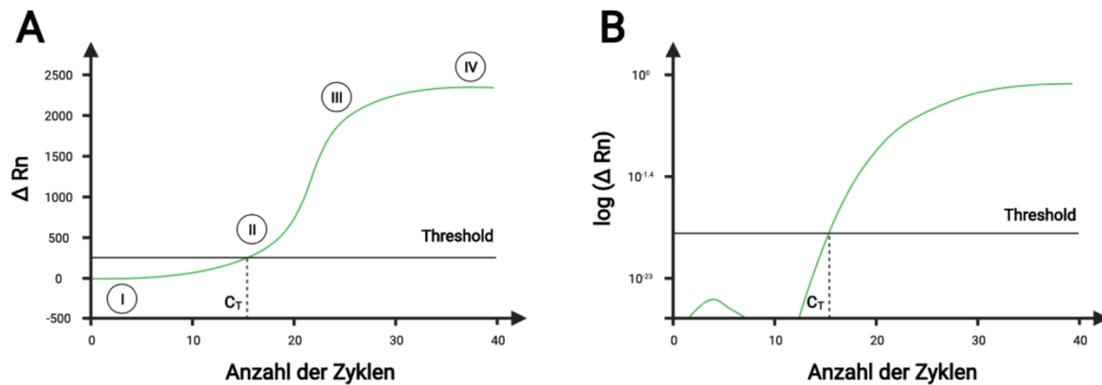


Abbildung 5: Amplifikationsdiagramme der qPCR. (A) ΔRn ist auf der y-Achse gegenüber der Anzahl der Zyklen auf der x-Achse aufgetragen. Der Kurvenverlauf kann in vier Phasen eingeteilt werden: lag-Phase (I), log-Phase (II), Verzögerungsphase (III) und Plateauphase (IV). (B) Der $\log(\Delta Rn)$ ist auf der y-Achse gegenüber der Anzahl der Zyklen auf der x-Achse aufgetragen. Der lineare Kurvenverlauf entspricht der log-Phase aus (A).

Zur Datenanalyse wurden die Messwerte logarithmisch aufgetragen, sodass die log-Phase des ursprünglichen Graphen nun der linearen Phase des zweiten Graphen entspricht (s. Abbildung 6B). Hierbei ist ΔRn in logarithmischer Form auf der y-Achse aufgetragen. Die log-Phase des ersten Graphen entspricht nun der linearen Phase des zweiten Graphen.

In diesen linearen Bereich wurde nun der Schwellenwert (Threshold) gesetzt. Die Anzahl an Zyklen, in der die Signalstärke erstmals über dem vom Threshold definierten Fluoreszenz-Schwellenwert liegt, wird als C_T -Wert bezeichnet und ist umgekehrt proportional zur Ausgangskonzentration der Ziel-cDNA. Die Auswahl des Schwellenwertes im linearen Bereich der logarithmierten Messwerte garantiert, dass eine relative Verdopplung der eingesetzten cDNA-Probenmenge eine Abnahme des C_T -Wertes um 1 zur Folge hat. Die relative Quantifizierung der Expression eines Zielgens basiert auf dem Vergleich mit der Expression des Referenzgens GAPDH (s. oben). Die Auswertung der qPCR-Rohdaten mittels ΔC_T -Methode erfolgte durch folgende Formel (Livak und Schmittgen, 2001):

$$\text{Expression des Zielgens (\%GAPDH)} = 2^{-(C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{GAPDH}))} \times 100$$

Nach Beendigung der 40 Zyklen wurde mittels Schmelzkurve die Spezifität der Amplifikation geprüft. Hierbei wurde die Temperatur des Ansatzes kontinuierlich von 72 °C auf 95 °C erhöht und die Änderung in der Fluoreszenzintensität aufgezeichnet. Jedes Amplikon besitzt eine spezifische Schmelztemperatur, bei der der Doppelstrang in Einzelstränge zerfällt. Dieses geht mit einer Abnahme des Fluoreszenzsignals einher, weil der an den Doppelstrang gebundene Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird. Diese Abnahme des Signals erscheint nach Ableitung der Daten im Idealfall als ein Einzelpeak.

Qualitätskriterien

Alle qPCR-Messungen der Zielgene wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus den gemessenen C_T -Werten der Einzelmessungen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Lag die Standardabweichung über 0,5, wurde die qPCR-Messung wiederholt. Als weiteres Qualitätskriterium wurden die beiden Negativkontrollen herangezogen. Zeigte sich bei beiden ein PCR-Produkt, wurde von einer Verunreinigung des Mastermixes oder des RNase-freien Wassers ausgegangen und die gesamte qPCR Analyse mit neuen Lösungen wiederholt. Die einfach gemessene Positivkontrolle diente zur Kontrolle der eingesetzten Primer.

Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse wurde die Spezifität der Amplifikation überprüft. Wurden mehrere lokale Maxima gefunden (s. oben), war davon auszugehen, dass mehr als ein Reaktionsprodukt vorlag. In diesen Fällen wurde die Messung wiederholt.

3.3.2 Histologische Untersuchungen

3.3.2.1 Herstellung histologischer Präparate

Direkt im Anschluss an die operative Gewinnung wurden die Gewebeproben zur Fixierung für 24 h in eine Formalin-Lösung überführt. Anschließend wurde zur Entkalkung der Gewebeproben die Entkalkungslösung Osteosoft® (Merck KGaA; s. Tabelle 6) verwendet. Die darin enthaltenen Chelatbildner binden dabei die Kalziumionen aus dem Gewebe. Da die verwendeten Proben eine ähnliche Schichtdicke aufwiesen, war die notwendige Entkalkungsdauer hauptsächlich vom Verkalkungsgrad abhängig.

Anschließend wurden die Gewebeproben in Einbettkassetten (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH; s. Tabelle 8) überführt und in einer Entwässerungsmaschine (Shandon Citadel 2000, Thermo Fischer Scientific; s. Tabelle 9) gemäß dem folgenden Protokoll mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol (70, 80, 85, 90, 96 & 100 %), Th. Geyer GmbH & Co. KG; s. Tabelle 6) dehydratisiert (s. Tabelle 16) :

Tabelle 16: Protokoll der Entwässerung

Schritt	Reagenz	Zeit
1	Isopropanol 70 %	50 min
2	Isopropanol 70 %	60 min
3	Isopropanol 80 %	60 min
4	Isopropanol 85 %	60 min
5	Isopropanol 90 %	60 min
6	Isopropanol 90 %	60 min
7	Isopropanol 96 %	60 min
8	Isopropanol 96 %	60 min
9	Isopropanol 100 %	90 min
10	Isopropanol 100 %	90 min
11	Paraffin 56 °C	120 min
12	Paraffin 56 °C	180 min

Waren die Proben zu groß für die Einbettkassetten, wurden sie orthogonal zur Flussrichtung in kleinere Teilstücke geschnitten. Im Anschluss an die Dehydratisierung wurden die Gewebeproben in einer Paraffinausgießstation (Modulares Paraffin-Einbettssystem TES 99, Medite; s. Tabelle 9) senkrecht in Paraffin (Tissue-Tek® Paraffinwachs TEK III, Sakura Finetek Germany GmbH; s. Tabelle 6) eingebettet. Nachdem das Paraffin durch das Herunterkühlen auf der Kühlplatte ausgehärtet war, wurden die Paraffinblöcke bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Vor dem Schneiden wurden die Paraffinblöcke zunächst für zehn Minuten im Gefrierschrank (Comfort, LIEBHERR; s. Tabelle 9) bei -20 °C vorgekühlt. Dann wurden am Schlittenmikrotom (SM2010 R, Leica Bio; s. Tabelle 9) unter Verwendung von Einweg-Mikrotomklingen (Mikrotomklinge S35 Edelstahl, Feather Safety Razor CO., LTD.; s. Tabelle 8) 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Es folgte die Überführung der Schnitte in ein 40 °C warmes Wasserbad zum Glätten (Paraffin-Streckbad 1052, LAUDA-GFL; s. Tabelle 9) und das anschließende Aufziehen der Schnitte auf Objektträger (SuperFrost Plus Objektträger, R. Langenbrinck GmbH; s. Tabelle 8). Die Objektträger wurden anschließend für mindestens zwölf Stunden bei 37 °C zum Trocknen in einen Wärmeschrank (Trocken- und Wärmeschrank ED 56, Binder; s. Tabelle 9) gegeben.

3.3.2.2 Färbungen der Präparate

Da die verwendeten Farbstoffe wasserlöslich sind, musste der histologische Schnitt gemäß folgendem Protokoll durch Xylol (Th. Geyer GmbH & Co. KG; s. Tabelle 6) zunächst entparaffiniert und danach durch eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol vergällt (99, 96 & 70 %), Th. Geyer GmbH & Co. KG; s. Tabelle 6) rehydriert werden (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Protokoll der Entparaffinierung und der Rehydrierung

Schritt	Reagenz	Zeit
1	Xylol	5 – 10 min
2	Xylol	5 – 10 min
3	Xylol	5 – 10 min
4	Ethanol 99 %	5 min
5	Ethanol 99 %	5 min
6	Ethanol 96 %	5 min
7	Ethanol 70 %	5 min
8	Aqua dest	spülen

Im Anschluss daran wurden folgende Färbungen durchgeführt:

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurde als erste Übersichtsfärbung verwendet, um verschiedene Gewebestrukturen und pathologische Veränderungen darzustellen. Hierbei färbt das basische Hämatoxylin alle basophilen bzw. sauren Strukturen wie z. B. Zellkerne und das raue endoplasmatische Retikulum dunkelblau bis dunkelviolet. Das saure Eosin färbt alle azidophilen bzw. basischen Strukturen wie z. B. Proteine des Zytoplasmas, Kollagen und elastische Fasern rot (Lang, 2012). Die histologischen Schnitte wurden gemäß Färbeprotokoll (s. Tabelle 18) gefärbt und anschließend mit Eukitt® Quick-hardening mounting medium (Sigma-Aldrich® Co. LLC.; s. Tabelle 6) eingedeckt (Deckgläser 24 x 60 mm, Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH; s. Tabelle 8):

Tabelle 18: Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Schritt	Reagenz	Zeit
1	Hämatoxylin-Lösung (Mayer)	5 min
2	Leitungswasser	10 min
3	Aqua dest	spülen
4	Eosin-Lösung 0,2 % aq.	10 min
5	Ethanol 70 %	spülen
6	Ethanol 96 %	spülen
7	Ethanol 99 %	5 – 10 min
8	Ethanol 99 %	5 – 10 min
9	Xylol	5 – 10 min
10	Xylol	5 – 10 min
11	Xylol	5 – 10 min
12	Eindecken mit Eukitt® Quick-hardening mounting medium	

Elastica-van-Gieson-Färbung

Die Elastica-van-Gieson-(EvG)-Färbung ist eine Kombination aus der Van-Gieson- und der Elastica-Färbung. Bei der Elastica-Färbung werden zunächst die elastischen Fasern durch das Resorcinfuchsin (Waldeck GmbH & Co KG, s. Tabelle 6) dunkelviolet bis schwarz gefärbt, sodass die drei Wandschichten der Arterie voneinander abgrenzbar werden (s. Tabelle 19).

Anschließend werden die Kerne mittels Eisenhämatoxylin (Waldeck GmbH & Co KG, s. Tabelle 6) schwarzbraun bis schwarzblau angefärbt. Mit der Van-Gieson-Färbung wird Kollagen rot dargestellt, während Muskelzellen bzw. Zytoplasma gelb erscheinen (Lang, 2012).

Für die Pikrinsäure-Thiazinrot-Lösung wurden 7,5 ml 1 % wässrige Thiazinrot-Lösung (Waldeck GmbH & Co KG, s. Tabelle 6) zu 100 ml gesättigter Pikrinsäure (1,2 %) (AppliChem GmbH; s. Tabelle 6) gegeben.

Tabelle 19: Protokoll der Elastica-van-Gieson-Färbung

Schritt	Reagenz	Zeit
1	Resorcinfuchsin-Lösung nach Weigert	20 – 30 min
2	Leitungswasser	spülen
3	Aqua dest	spülen
4	Mikroskopische Kontrolle der dunkelvioletten elast. Fasern	
5	Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert	15 min
6	Leitungswasser	10 min
7	Aqua dest	spülen
8	Pikrinsäure-Thiazinrot-Lösung	5 min
9	Aqua dest	spülen
10	Ethanol 70 %	spülen
11	Ethanol 96 %	spülen
12	Ethanol 99 %	5 min
13	Ethanol 99 %	5 min
14	Xylol	5 – 10 min
15	Xylol	5 – 10 min
16	Xylol	5 – 10 min
17	Eindecken mit Eukitt® Quick-hardening mounting medium	

Carstairs-Färbung

Zur Detektion von Einblutungen sowie Thromben wurde die Carstairs-Färbung verwendet (s. Tabelle 20). Hierbei werden Fibrin hellrot, Thrombozyten graublau, kollagenes Bindegewebe blau, Muskeln dunkelrot und Erythrozyten orange bis rot angefärbt (Carstairs, 1965).

Für die Pikrinsäure-Orange-G-Lösung wurden 40 ml in destilliertem Wasser gesättigte Pikrinsäure (AppliChem GmbH; s. Tabelle 6) und 160 ml in Isopropanol gesättigte Pikrinsäure (MORPHISTO GmbH; s. Tabelle 6) mit 0,4 g Orange G (Merck KGaA; s. Tabelle 6) versetzt. Das Ammonium Eisen(III)-sulfat-Dodecahydrat (Merck KGaA; s. Tabelle 6) und die Phosphorwolframsäure (Waldeck GmbH & Co KG; s. Tabelle 6) wurden gemäß Konzentrationsangaben in destilliertem Wasser gelöst. Für die Anilinblau-Lösung wurden 2 g Anilinblau (Waldeck GmbH & Co KG; s. Tabelle 6) in 200 ml 1 %iger Essigsäure (Sigma-Aldrich® Co. LLC.; s. Tabelle 6) gelöst. Die Hämatoxylin-Lösung (Mayer) (Meditate GmbH; s. Tabelle 6) sowie die Ponceau-Säurefuchsin-Lösung (Masson) (Waldeck GmbH & Co KG; s. Tabelle 6) waren bereits gebrauchsfertig.

Tabelle 20: Protokoll der Carstairs-Färbung

Schritt	Reagenz	Zeit
1	Ammoniumeisensulfat-Lösung 5 %	5 min
2	Leitungswasser	spülen
3	Leitungswasser	5 min
4	Hämatoxylin-Lösung (Mayer)	10 min
5	Leitungswasser	spülen
6	Leitungswasser	5 min
7	Picrinsäure- Orange G-Lösung	40 min
8	Aqua dest	spülen
9	Ponceau-Säurefuchsin-Lösung (Masson)	5 min
10	Aqua dest	spülen
11	Phosphorwolframsäure-Lösung 1%	5 min
12	Aqua dest	spülen
13	Anilinblau-Lösung	15 min
14	Aqua dest	spülen
15	Ethanol 70 %	1 min
16	Ethanol 96 %	1 min
17	Ethanol 96 %	1 min
18	Ethanol 99 %	1 min
19	Ethanol 99 %	1 min
20	Xylol	1 min
21	Eindecken mit Eukitt® Quick-hardening mounting medium	

3.3.2.3 Digitalisierung der histologischen Präparate

Alle gefärbten Schnitte wurden anschließend mittels dem Slide-Scanner-Mikroskop Axio Scan.Z1 (ZEISS; s. Tabelle 9) aus dem Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Leiter: Prof. Dr. Udo Schumacher) mit 20-facher Vergrößerung gescannt. Aus den Rohdaten wurden danach mit dem Programm Netscope Viewer (Net-Base Software GmbH; s. Tabelle 10) je Objektträger eine Übersichtsaufnahme sowie detaillierte Aufnahmen der einzelnen Plaques angefertigt.

3.3.2.4 Gruppeneinteilung anhand histomorphologischer Charakteristika

Wenn möglich, wurden die Plaques anhand der folgenden histomorphologischen Charakteristika qualitativ vier Gruppen zugeteilt, wobei mehrfache Zuteilungen möglich waren:

1. Einblutung

Frische Einblutungen weisen intakte Erythrozyten innerhalb der Plaque auf, welche sich in der HE-Färbung rot, in der EvG-Färbung gelb bis braun und in der Carstairs-Färbung gelb darstellen. Als Residuen älterer Blutungen finden sich der Detritus lysierter Erythrozyten sowie Hämoglobinabbauprodukte, welche in Siderophagen gespeichert sind. Siderophagen stellen sich in der HE- und EvG-Färbung bräunlich dar. Fibrin weist in der HE-Färbung eine rosa, in der EvG-Färbung eine gelbe und in der Carstairs-Färbung eine hellrote bis orangerote Färbung auf, während sich Thrombozyten in der Carstairs-Färbung graubläulich darstellen (s. Abbildung 6). Inwiefern Einblutungen in die Plaques aufgrund von Wühlblutungen von lumenseits in den Lipidkern oder aus Neovaskularisationen innerhalb der Plaque entstanden sind, lässt sich histomorphologisch hingegen nicht eindeutig unterscheiden.



Abbildung 6: Histologische Darstellung einer Plaque mit Einblutung. Dargestellt in HE-Färbung (A), EvG-Färbung (B) und Carstairs-Färbung (C). Maßstabsbalken =2 mm.

2. Intimaverdickung

Eine verdickte Tunica Intima besteht aus einer dem Endothel angrenzenden Proteoglykanschicht und einer dickeren, darunterliegenden muskuloelastischen Schicht. Während die Proteoglykanschicht hauptsächlich aus Proteoglykanen und weniger aus elastischen Fasern und Kollagenen besteht, finden sich in der muskuloelastischen Schicht reichlich, in dichten Schichten angeordnete glatte Muskelzellen und elastische Fasern sowie auch vermehrt Kollagen. Dabei stellt sich Kollagen in der HE-Färbung blassrot, in der EvG-Färbung intensiv rot sowie in der Carstairs-Färbung blau dar und Muskelzellen präsentieren sich in der HE-Färbung rot und in der EvG-Färbung gelblich (s. Abbildung 7). Bereiche mit einem hohen Gehalt an Proteoglykanen stellen sich in der HE-Färbung leicht bläulich dar.



Abbildung 7: Histologische Darstellung einer Plaque mit Intimaverdickung. Dargestellt in HE-Färbung (A), EvG-Färbung (B) und Carstairs-Färbung (C). Maßstabsbalken = 1 mm.

3. Kalzifizierung

Kalzifizierungen stellen sich in der HE-Färbung bläulich sowie in der EvG-Färbung hellviolett bis bräunlich dar und können als kleine, grobkörnige Verkalkungszonen sowie als klein- und großflächige Schollengebilde auftreten. In der dargestellten Plaque (s. Abbildung 8) erkennt man entlang der Membrana elastica interna mehrere kleinflächige Kalkschollen, die durch feine Bindegewebssepten voneinander getrennt sind. Des Weiteren finden sich multiple Lipidkerne in unmittelbarer Nähe zu den Kalkschollen. Neben der ausgeprägten luminalen Vorwölbung zeigt sich eine stark septierte, partiell aufgefaserte Tunica intima mit Einblutungen.

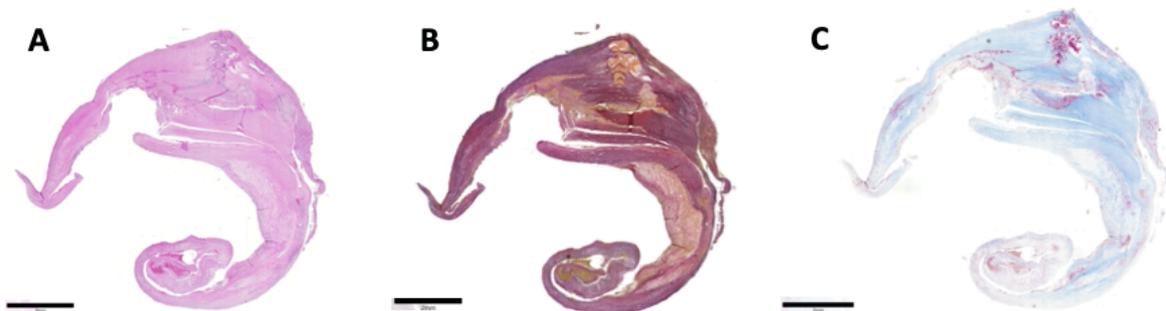


Abbildung 8: Histologische Darstellung einer kalzifizierten Plaque. Dargestellt in HE-Färbung (A), EvG-Färbung (B) und Carstairs-Färbung (C). Maßstabsbalken = 2 mm.

4. Nekrotischer Kern

Nekrotische Kerne bestehen aus Schaumzellen, extrazellulären Lipidablagerungen und sowie Zeldretitus nekrotischer Schaumzellen (s. Kapitel 1.1.4). Die Zellkerne der Schaumzellen sind in der HE-Färbung blau und in der EvG-Färbung braun-schwarz gefärbt (s. Abbildung 9). Lipide sind bei der Paraffineinbettung ausgewaschen worden und daher nicht anfärbbar. Umgeben ist der nekrotische Kern lumenseits von einer dünnen fibrösen Kappe. In der dargestellten Plaque findet sich zusätzlich eine endoluminale Thrombenformation.

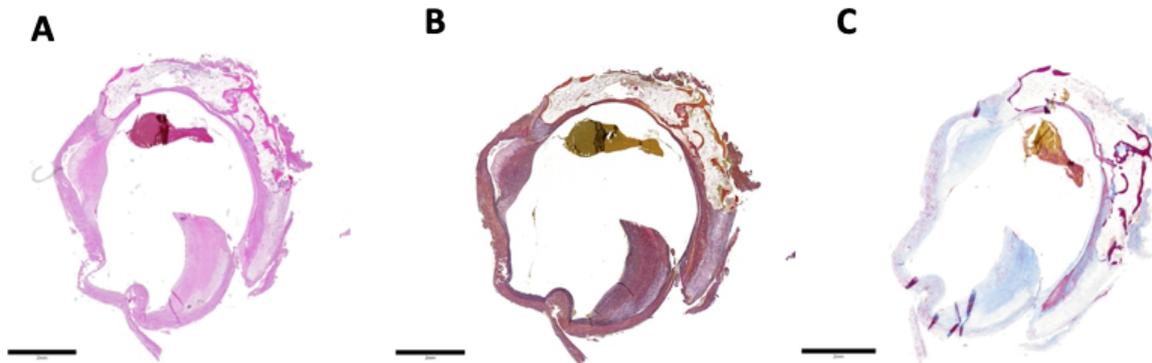


Abbildung 9: Histologische Darstellung einer Plaque mit nekrotischem Kern. Dargestellt in HE-Färbung (A), EvG-Färbung (B) und Carstairs-Färbung (C). Maßstabsbalken = 2 mm.

3.3.3 Bestimmung der Plasma- und Serum-S1P-Konzentrationen

Die Messung der Serum- und Plasma-S1P Konzentrationen wurde am Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf im Labor von Prof. Dr. Edzard Schwedhelm durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS, engl. *liquid chromatography tandem mass spectrometry*) unter Anwendung eines etablierten Protokolls (Moritz *et al.*, 2017).

Nach Hinzugabe von 20 µl internen Standards (1 µmol/L S1P-d7, Avanti Polar Lipids, s. Tabelle 6) zu 20 µl der Serum- oder Plasmaprobe, wurde in der Probe durch Zugabe von 350 µl Acetonitril (80 Vol.-%, s. Tabelle 6) Protein gefällt. Im Anschluss an die Zentrifugation (10,000 x g für 15 min) wurden 10 µl des Überstandes auf einer Zorbax SB-C8-Säule (Agilent, s. Tabelle 8) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,35 ml/min chromatographisch aufgetrennt. Dazu wurde ein binärer Gradient Methanol (2,5 % Vol.)/Acetonitril (2,5 % Vol.)/0,1 %ige Ameisensäure (95 % Vol.) zu Methanol (30 % Vol.)/Acetonitril (30 % Vol.)/0,1 %ige Ameisensäure (40 % Vol.) verwendet. Das Eluat wurde kontinuierlich mittels Elektrospray durch Anlegen einer positiven Spannung unter Stickstoff ionisiert (ESI+) und mit einem Massenspektrometer (L1200 MS/MS, Agilent Technologies; s. Tabelle 9) analysiert. Für die Analyse wurde im *Multiple Reaction Monitoring* die Intensität der Fragmentierung des S1P Molekül-Ions ($m/z = 380$) in sein Produkt-Ion ($m/z = 264$) gemessen. Der interne Standard

S1P-d7 mit dem Übergang $m/z = 387$ zu $m/z = 271$ wurde ebenfalls gemessen, um für Ungenauigkeiten in der Probenaufbereitung sowie der Messinstrumente zu korrigieren. Jede Messplatte (96 Proben) enthielt zwei Qualitätsstandards (0,3 μM und 1 μM S1P) sowie eine Kalibrierungsreihe (0 μM , 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM , 3 μM S1P). Mit Hilfe der daraus resultierenden Kalibrierungskurve konnte aus dem Peakflächenverhältnis der Übergänge von S1P und S1P-d7 die absolute S1P-Konzentration der Probe bestimmt werden.

3.3.4 Datenauswertung und statistische Methoden

Die Erfassung der erhobenen Daten erfolgte tabellarisch mittels Microsoft Office Excel (s. Tabelle 10). Alle statistischen Datenanalysen sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism 8 (Graphpad Software, Inc.; s. Tabelle 10) durchgeführt.

Bei Subgruppen mit einer Gruppengröße ≤ 5 wurde angesichts geringer Aussagekraft auf eine statistische Datenanalyse verzichtet.

Alle mittels qPCR gemessenen Expressionswerte wurden logarithmiert (binärer Logarithmus (\log_2)). Die Überprüfung auf Normalverteilung der Daten erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests. Gruppenvergleiche wurden bei normalverteilten Daten mittels ungepaartem, zweiseitigen T-Test durchgeführt. Lag bei mindestens einer Datenmenge keine Normalverteilung vor, erfolgte die Mittelwertsprüfung mittels Mann-Whitney-Test. Für die Analyse von binären Variablen wurde der Exakte Test nach Fisher verwendet. Zur Analyse von Korrelationen wurden im Fall von normalverteilten Datensätzen der Pearson-Korrelationskoeffizient mit korrespondierendem p-Wert berechnet, während bei nicht normalverteilten Datensätzen Rangkorrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt wurden. Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Laborwerte auf die Restenosefreiheit (Restenosegrad = 0) wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methodik Verlaufskurven erstellt und mittels Log-Rank-Tests verglichen. Die Gruppeneinteilung erfolgte anhand der jeweiligen Referenzbereiche (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), 2021).

Neben Mittelwerten (MW) \pm Standardabweichungen (SD) wurden auch MW mit Konfidenzintervallen von 95 % (95 % KI) zur Beschreibung der Daten angegeben. Zudem wurden Datensätze als Box-Plots mit Whiskern (10.-90. Perzentile) inklusive Ausreißer dargestellt. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Erhobene Parameter der Gesamtstudienkohorte

Im Zeitraum von Juli 2014 bis Februar 2020 wurden 187 Patienten in die Studie eingeschlossen. Gemäß der deutschen S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der pAVK wurden 152 der eingeschlossenen Patienten (81,3 %) offen-chirurgisch und 35 (18,7 %) endovaskulär versorgt. Insgesamt wurden 205 Gewebeproben entnommen, davon 158 Plaqueproben und 47 Vollwandproben (s. Abbildung 10). Die Plaqueproben wurden für histologische und Genexpressionsanalysen aufgeteilt. Da die Vollwandproben sehr klein waren, wurde bei diesen auf eine histologische Untersuchung verzichtet. Alle erhobenen Daten sind der Tabelle 27 im Anhang zu entnehmen.

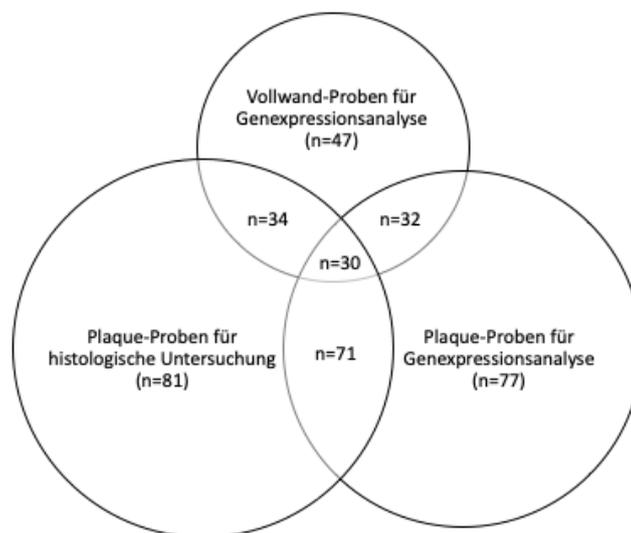


Abbildung 10: Venn-Diagramm von der Verteilung aller entnommenen Gewebeproben (n=205).

4.1.1 Epidemiologische Daten

Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer (n=187) betrug $69,5 \pm 9,0$ Jahre und der Anteil an Männern lag bei 70,1 %. Weibliche Studienteilnehmer waren älter als männliche ($70,9 \pm 9,1$ vs. $68,9 \pm 9,0$ Jahre). Das mittlere Körpergewicht betrug $76,5 \pm 16,2$ kg, die mittlere Körpergröße $172,7 \pm 9,7$ cm und der errechnete BMI $25,5 \pm 4,3$ kg/m².

4.1.2 Präoperative Medikation

Die am häufigsten präoperativ eingenommene Medikamentengruppe in der Gesamtstudienkohorte war ein Antihypertensivum (82,0 %), gefolgt von einem Statin (79,6 %), der ASS (73,1 %), einem Betablocker (59,3 %), einem Antidiabetikum (27,4 %) und

Clopidogrel (24,6 %). Neue orale Antikoagulanzen (NOAK) (9,0 %) und Marcumar (6,6 %) wurden am seltensten eingenommen.

4.1.3 Laborparameter

Mit Ausnahme der Triglyceride und des C-reaktiven Proteins lagen alle präoperativen Laborwerte im Durchschnitt innerhalb der jeweiligen Referenzbereiche (s. Tabelle 21). In der Gesamtstudienkohorte war die Konzentration des Serum-S1P signifikant höher als die des Plasma-S1P ($p \leq 0,0001$).

Tabelle 21: Präoperative Laborparameter der Gesamtstudienkohorte. Daten werden gezeigt als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) sowie in Klammern die Anzahl der analysierten Proben. Die Referenzbereiche sind geschlechtsübergreifend. Die Referenzbereiche für Plasma- und Serum-S1P sind der Studie von Daum et al. 2020 entnommen worden. HDL, High-Density Lipoprotein; LDL, Low-Density Lipoprotein; S1P, Sphingosin-1-Phosphat.

	Einheit	Referenzbereich	MW \pm SD (Anzahl)
Erythrozyten	Mrd/ml	4,1-5,9	4,32 \pm 0,56 (167)
Leukozyten	Mrd/l	3,8-11,0	7,87 \pm 2,24 (167)
Thrombozyten	Mrd/l	150-400	253,0 \pm 87,8 (167)
Hämoglobin	g/dl	12,3-17,5	13,2 \pm 2,0 (167)
Hämatokrit	l/l	35-48	39,6 \pm 5,3 (167)
Kreatinin	mg/dl	0,55-1,30	1,11 \pm 0,65 (167)
Gesamt-Cholesterin	mg/dl	< 200	171,2 \pm 42,5 (162)
Triglyceride	mg/dl	< 150	170,1 \pm 106,6 (162)
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 40	53,8 \pm 17,1 (162)
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 100	85,6 \pm 35,9 (157)
C-reaktives Protein	mg/l	< 5	10,4 \pm 14,8 (167)
Serum-S1P	nmol/ml	0,59-1,51	1,71 \pm 0,49 (184)
Plasma-S1P	nmol/ml	0,49-1,15	0,99 \pm 0,30 (177)

4.1.4 Klinisches Outcome

Innerhalb des zwölfmonatigen Beobachtungszeitraums wurde bei 162 (86,6 %) von insgesamt 187 eingeschlossenen Patienten mindestens einmal der Restenosegrad ermittelt, von den restlichen 25 Patienten konnten diesbezüglich keine Daten erhoben werden. Insgesamt wurden 373 Nachuntersuchungen durchgeführt. Es konnte nach drei Monaten bei 140 (74,9 %), nach sechs Monaten bei 132 (70,6 %) und nach zwölf Monaten bei 101 (54,0 %) Patienten der Restenosegrad mittels FKDS ermittelt werden (s. Kapitel 3.1).

Von den insgesamt 162 Patienten wiesen 106 (65,4 %) Patienten auch bei multiplen Messungen keine Restenose auf (Subgruppe Outcome 0). Bei 56 Patienten zeigte sich zumindest bei einer der Messungen ein Restenosegrad von mindestens 1 (Subgruppe Outcome 1). In der Subgruppe Outcome 1 betrug der höchste gemessene Restenosegrad bei 17 Patienten (10,5 %) 1, bei 15 Patienten (9,3 %) 2, bei 20 Patienten (32,3 %) 3 und bei 4 Patienten (2,5 %) 4. Der höchste jemals gemessene Restenosegrad pro Patient wurde bei 22

Patienten (39,3 %) nach drei Monaten, bei 19 Patienten (33,9 %) nach sechs Monaten und bei 15 Patienten (26,8 %) nach zwölf Monaten ermittelt. Bezüglich der genauen Verteilung der Restenosegrade bei den Nachuntersuchungen nach drei, sechs und 12 Monaten wird auf die Tabelle 28 im Anhang verwiesen.

Insgesamt erreichten 24 (14,8 %) Patienten den klinischen Endpunkt, der durch einen Restenosegrad von ≥ 3 definiert ist (s. Kapitel 3.1). Der klinische Endpunkt wurde von 6 Patienten nach drei Monaten, von 15 Patienten nach sechs Monaten und von 3 Patienten nach zwölf Monaten erreicht.

4.1.5 Einteilung der Plaques anhand der Histomorphologie

Bei 81 (43,3 %) der insgesamt 187 eingeschlossenen Patienten wurde eine Gewebeprobe von der Plaque zur histologischen Analyse entnommen (s. Abbildung 10). Anhand histomorphologischer Charakteristika wurde die Plaque, sofern beurteilbar, vier Gruppen zugeordnet, wobei Mehrfachnennungen zulässig waren (s. Kapitel 3.3.2.4).

53 (65,4 %) der histologisch aufgearbeiteten Plaques konnten mindestens einer Gruppe zugeordnet werden. Als histomorphologisches Charakteristikum wiesen 15 Plaques (28,3 %) eine Einblutung, 30 Plaques (56,6 %) eine Intimaverdickung, 25 Plaques (47,2 %) eine Kalzifizierung und 6 Plaques (11,3 %) einen nekrotischen Kern auf. Bei den verbliebenen 28 Plaques (34,6 %) war eine histomorphologische Beurteilung nicht möglich. Die Mehrfachnennungen der einzelnen Plaques sind der Tabelle 27 im Anhang zu entnehmen.

4.1.6 Genexpressionsdaten

Bei 77 (41,2 %) Patienten der Gesamtstudienkohorte konnte eine Gewebeprobe der Plaque und bei 47 (25,1 %) eine Gewebeprobe der Vollwand zur Genexpressionsanalyse entnommen werden (s. Abbildung 10). Bei 32 Patienten (17,1 %) konnten Gewebeproben sowohl von der Plaque als auch der Vollwand entnommen werden. Die Genexpressionswerte des S1PR1, S1PR2, S1PR3, CD31, CD45, CD68 und Myh11 aus der Vollwand (s. Abbildung 11A) und der Plaque (s. Abbildung 11B) wurden mittels qPCR ermittelt und sind in logarithmierter Form (\log_2) dargestellt.

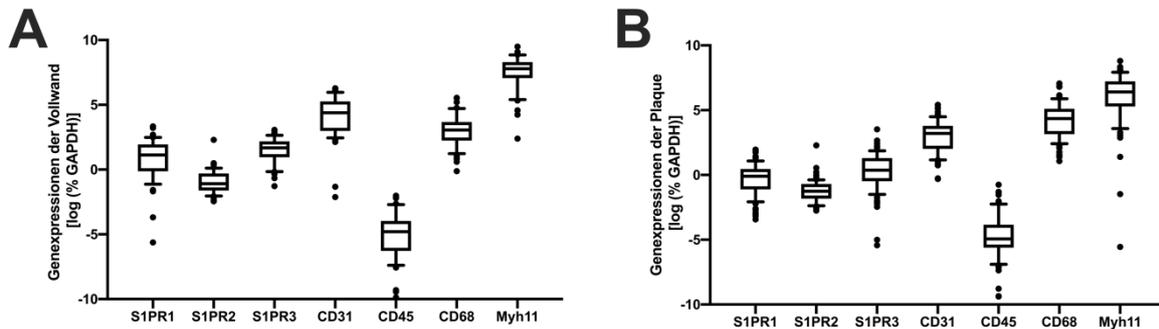


Abbildung 11: Darstellung der Genexpressionswerte aus Vollwand (A) und Plaque (B). Die Genexpressionen aus der Vollwand (n=47) und Plaque (n=77) wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Gezeigt sind Box-Plots mit Whiskern (10.-90. Perzentile) sowie Ausreißer. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Die statistischen Gruppenvergleiche mittels Mann-Whitney-Test oder ungepaartem, zweiseitigen T-Test zeigten signifikant höhere Genexpressionen von S1PR1 ($p < 0.0001$), S1PR2 ($p = 0,049$), S1PR3 ($p < 0.0001$), CD31 ($p < 0.0001$) und Myh11 ($p < 0.0001$) in der Vollwand. Lediglich für CD68 wurde eine signifikant höhere Genexpression in der Plaque als in der Vollwand festgestellt ($p < 0.0001$). Für CD45 ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen ($p = 0,380$).

4.2 Vergleich der erhobenen Parameter zwischen den Subgruppen

Outcome 0 und 1

In diesem Kapitel werden alle erhobenen Parameter mittels Gruppenvergleich zwischen den Studienteilnehmern ohne (Subgruppe Outcome 0; n=106) und mit einer messbaren Restenose im Verlauf (Subgruppe Outcome 1; n=56) analysiert.

4.2.1 Epidemiologische Daten

Zwischen den Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1 konnten bezüglich der epidemiologischen Daten zwei signifikante Unterschiede festgestellt werden: Patienten mit einer Restenose im Verlauf wiesen einen höheren BMI ($p = 0,015$) sowie einen höheren Frauenanteil ($p = 0,05$) auf (s. Tabelle 22).

Tabelle 22: Vergleich der Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1 anhand epidemiologischer Parameter. Daten für Alter, Gewicht, Größe und Body-Mass-Index sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Daten der Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1 wurden mittels Mann-Whitney-Test (a), ungepaartem, zweiseitigen T-Test (b) oder zweiseitigem Exakten Test nach Fisher (c) verglichen, wobei das Signifikanzniveau bei $p \leq 0,05$ lag.

	Outcome		p-Wert
	0	1	
Anzahl	106	56	
Alter [Jahre]	69,7 ($\pm 9,2$)	69,2 ($\pm 8,2$)	0,590 ^a
Geschlecht [% Männer]	74,5	58,9	0,050^c
Körpergewicht [kg]	74,9 ($\pm 15,5$)	78,4 ($\pm 17,6$)	0,205 ^a
Körpergröße [cm]	173,5 ($\pm 9,9$)	171,1 ($\pm 9,4$)	0,156 ^b
Body-Mass-Index [kg/m²]	24,8 ($\pm 3,9$)	26,6 ($\pm 4,7$)	0,015^b

4.2.2 Präoperative Medikation

Zwischen den Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1 konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der präoperativen Medikation festgestellt werden (s. Tabelle 23).

Tabelle 23: Vergleich der präoperativen Medikation der Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1. Gezeigt wird die absolute Anzahl der einnehmenden Patienten sowie in Klammern der relative Anteil an der jeweiligen Gruppe. Der Gruppenvergleich zwischen den Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1 erfolgte mittels zweiseitigem Exakten Test nach Fisher. Das Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$. NOAK, neue orale Antikoagulanzen.

	Outcome		p-Wert
	0	1	
Acetylsalicylsäure	65 (70,7%)	39 (76,5%)	0,558
Antidiabetikum	20 (22,2%)	16 (32,0%)	0,229
Antihypertensivum	75 (81,5%)	43 (84,3%)	0,819
Betablocker	54 (58,7%)	34 (66,7%)	0,375
Clopidogrel	22 (23,9%)	16 (31,4%)	0,429
Marcumar	7 (7,6%)	2 (4,0%)	0,493
NOAK	10 (10,9%)	4 (7,8%)	0,770
Statin	76 (82,6%)	40 (78,4)	0,656

4.2.3 Laborparameter

Als nächstes wurden die Laborparameter in einem Gruppenvergleich anhand des klinischen Outcomes auf signifikante Unterschiede untersucht (s. Tabelle 24).

Tabelle 24: Vergleich der präoperativen Laborparameter zwischen den beiden Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1. Gezeigt wird der Mittelwert \pm Standardabweichung und in Klammern die Anzahl der analysierten Proben. Die Daten der Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1 wurden mittels Mann-Whitney-Test (a) oder zweiseitigem T-Test (b) verglichen, wobei das Signifikanzniveau bei $p \leq 0,05$ lag. HDL, High-density lipoprotein; LDL, Low-density lipoprotein; S1P, Sphingosin-1-Phosphat.

	Outcome		p-Wert
	0	1	
Erythrozyten [Mrd/ml]	4,35 \pm 0,54 (92)	4,35 \pm 0,59 (51)	0,941 ^b
Leukozyten [Mrd/l]	7,74 \pm 1,83 (92)	7,79 \pm 2,50 (51)	0,499 ^a
Thrombozyten [Mrd/l]	242,3 \pm 68,5 (92)	270,6 \pm 102,8 (51)	0,144 ^a
Hämoglobin [g/dl]	13,3 \pm 2,1 (92)	13,2 \pm 1,9 (51)	0,812 ^a
Hämatokrit [l/l]	39,7 \pm 5,0 (92)	39,9 \pm 5,5 (51)	0,850 ^b
Kreatinin [mg/dl]	1,13 \pm 0,57 (92)	1,16 \pm 0,86 (51)	0,628 ^a
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	166,3 \pm 38,2 (89)	184,3 \pm 44,3 (49)	0,013^b
Triglyceride [mg/dl]	162,8 \pm 97,3 (89)	206,0 \pm 126,1 (49)	0,020^a
HDL-Cholesterin [mg/dl]	54,8 \pm 16,6 (89)	53,0 \pm 19,3 (49)	0,330 ^a
LDL-Cholesterin [mg/dl]	80,4 \pm 34,8 (86)	94,5 \pm 34,5 (47)	0,027^a
C-reaktives Protein [mg/l]	9,4 \pm 11,6 (92)	8,0 \pm 6,9 (51)	0,538 ^a
Serum-S1P [nmol/ml]	1,66 \pm 0,43 (103)	1,77 \pm 0,57 (56)	0,478 ^a
Plasma-S1P [nmol/ml]	0,97 \pm 0,28 (101)	1,01 \pm 0,34 (53)	0,794 ^a

Es zeigte sich, dass Patienten mit einer messbaren Restenose im Verlauf (Subgruppe Outcome 1) signifikant höhere Konzentrationen an Gesamt-Cholesterin ($p=0,013$) (s. Abbildung 12A), Triglyceriden ($p=0,020$) (s. Abbildung 12B) sowie LDL-Cholesterin ($p=0,027$) (s. Abbildung 12D) im Serum aufwiesen. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen bezüglich der HDL-Cholesterin Konzentration festgestellt werden ($p=0,330$) (s. Abbildung 12C).

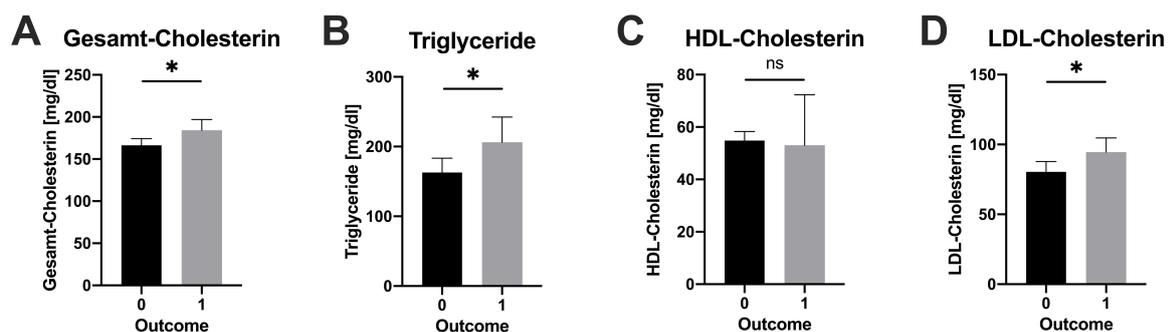


Abbildung 12: Vergleich der Laborparameter des Lipidprofils zwischen den Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1. Dabei ergaben sich folgende Gruppengrößen: A, B, C: Outcome 0 ($n=89$), Outcome 1 ($n=49$); D: Outcome 0 ($n=86$), Outcome 1 ($n=47$). Die Laborparameter (gezeigt als MW und 95% Konfidenzintervall) wurden mittels ungepaartem, zweiseitigen T-Test (A) oder Mann-Whitney-Test (B, C, D) verglichen. HDL, High-density Lipoprotein; LDL, Low-density Lipoprotein; ns, nicht signifikant, $*p \leq 0,05$.

Um zu überprüfen, ob die signifikanten Laborwerte des Lipidprofils einen Einfluss auf die Restenosefreiheit (Restenosegrad = 0) der Patienten hat, wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methodik Verlaufskurven erstellt und mit Hilfe des Log-Rank-Tests mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ verglichen. Hierbei zeigte sich bezüglich des Gesamt- und LDL-

Cholesterins ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kaplan-Meier-Kurven. Patienten mit einer präoperativen Gesamt-Cholesterin-Konzentration (s. Abbildung 13A) bzw. LDL-Cholesterin-Konzentration (s. Abbildung 13C) oberhalb der jeweiligen Referenzbereiche (s. Kapitel 3.1) zeigten eine signifikant höhere Restenoserate als die Patienten mit einer Gesamt-Cholesterin-Konzentration ($p=0,014$) bzw. LDL-Cholesterin-Konzentration ($p=0,024$) innerhalb der Referenzbereiche. Die Kaplan-Meier-Kurven der beiden Triglycerid-Gruppen (s. Abbildung 13B) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,096$).

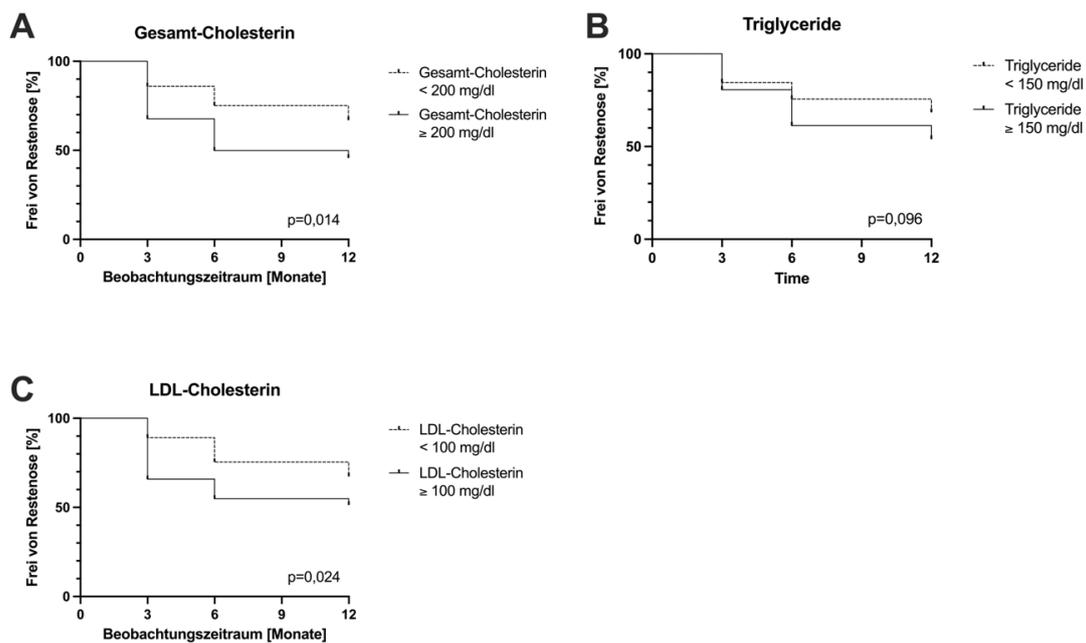


Abbildung 13: Vergleich der Rate an Restenosefreiheit anhand des Lipidprofils. Gezeigt sind die Kaplan-Meier-Kurven für die präoperativen Serum-Blutkonzentrationen von Gesamt-Cholesterin (A), Triglyceriden (B) und LDL-Cholesterin (C). In der Kaplan-Meier-Analyse wurde das Auftreten eines Restenosegrades von ≥ 1 als Event definiert und mit 1 codiert. Die Untersuchungsergebnisse wurden zensiert, wenn bis zum Ende des Beobachtungszeitraums ein Restenosegrad von 0 ermittelt wurde oder der Patient nicht zu weiteren Nachuntersuchungen erschienen ist. Die zensierten Untersuchungsergebnisse wurden mit 0 codiert. Die Gruppeneinteilung erfolgte anhand der in Kapitel 1.1 genannten Referenzwerte, sodass sich folgende Gruppengrößen ergaben: A: $n(\text{Gesamt-Cholesterin} < 200 \text{ mg/dl}) = 107$, davon 74 zensiert; $n(\text{Gesamt-Cholesterin} \geq 200 \text{ mg/dl}) = 31$, davon 15 zensiert. B: $n(\text{Triglyceride} < 150 \text{ mg/dl}) = 68$, davon 50 zensiert; $n(\text{Triglyceride} \geq 150 \text{ mg/dl}) = 67$, davon 38 zensiert. C: $n(\text{LDL-Cholesterin} < 100 \text{ mg/dl}) = 92$, davon 64 zensiert; $n(\text{LDL-Cholesterin} \geq 100 \text{ mg/dl}) = 41$, davon 22 zensiert. Der Vergleich der Überlebenskurven erfolgte mittels Log-Rank-Test. HDL, High-density Lipoprotein; LDL, Low-density Lipoprotein; p, Signifikanzniveau.

4.2.4 Einteilung der Plaques anhand der Histomorphologie

Bei 49 von 106 der Patienten ohne eine messbare Restenose im Verlauf wurden im Rahmen der Revaskularisierung eine Plaqueprobe zur histologischen Untersuchung entnommen, von denen 30 Plaques mindestens einer histomorphologischen Gruppe zugeordnet werden konnten (19 Plaques waren histomorphologisch nicht beurteilbar). In der Gruppe der Patienten mit einer Restenose im Verlauf wurde bei 23 von 56 Patienten eine Plaqueprobe entnommen, von denen 19 Plaques beurteilbar waren. Eine Analyse der Verteilung der histomorphologischen Charakteristika mittels Exaktem Test nach Fisher zeigte keine

signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1 (s. Tabelle 25).

Tabelle 25: Einteilung der beurteilbaren Plaques aus den Subgruppen Outcome 0 (n=30) und 1 (n=19) anhand ihrer histomorphologischen Charakteristika. Dargestellt sind die absoluten Zahlen sowie in Klammern der relative Anteil an den beurteilbaren Plaques innerhalb der Subgruppen. Mehrfachnennung war möglich. Der Gruppenvergleich wurde mittels Exaktem Test nach Fisher durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau bei $p \leq 0,05$ lag.

	Outcome		p-Wert
	0	1	
Einblutung	8 (26,7%)	6 (31,6%)	0,753
Intimaverdickung	17 (56,7%)	9 (47,4%)	0,569
Kalzifizierung	13 (43,3%)	9 (47,4%)	1,000
Nekrotischer Kern	3 (10%)	3 (15,8%)	0,665

4.2.5 Genexpressionsdaten

Zur Untersuchung einer möglichen Prädiktion einer Restenose anhand der Genexpressionsdaten aus der Vollwand sowie der Plaque wurden Gruppenvergleiche der gemessenen Gene zwischen den Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1 durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass für diese Analysen nur Studienteilnehmer herangezogen werden konnten, von denen sowohl Gewebeproben als auch klinische Outcome-Daten vorhanden waren, waren die jeweiligen Gruppengrößen kleiner als im Kapitel 4.1.6.

Vollwand

In den Vollwandproben fanden sich zwei statistisch signifikante Unterschiede in den Genexpressionen zwischen den beiden Subgruppen Outcome 0 (n=32) und Outcome 1 (n=13). Patienten mit einer Restenose wiesen eine geringere Genexpression von S1PR1 auf ($p=0,018$) (s. Abbildung 14A). Ebenso wurde bei diesen Patienten eine geringere Expression von CD31 in der Vollwand ($p=0,043$) beobachtet (s. Abbildung 14D).

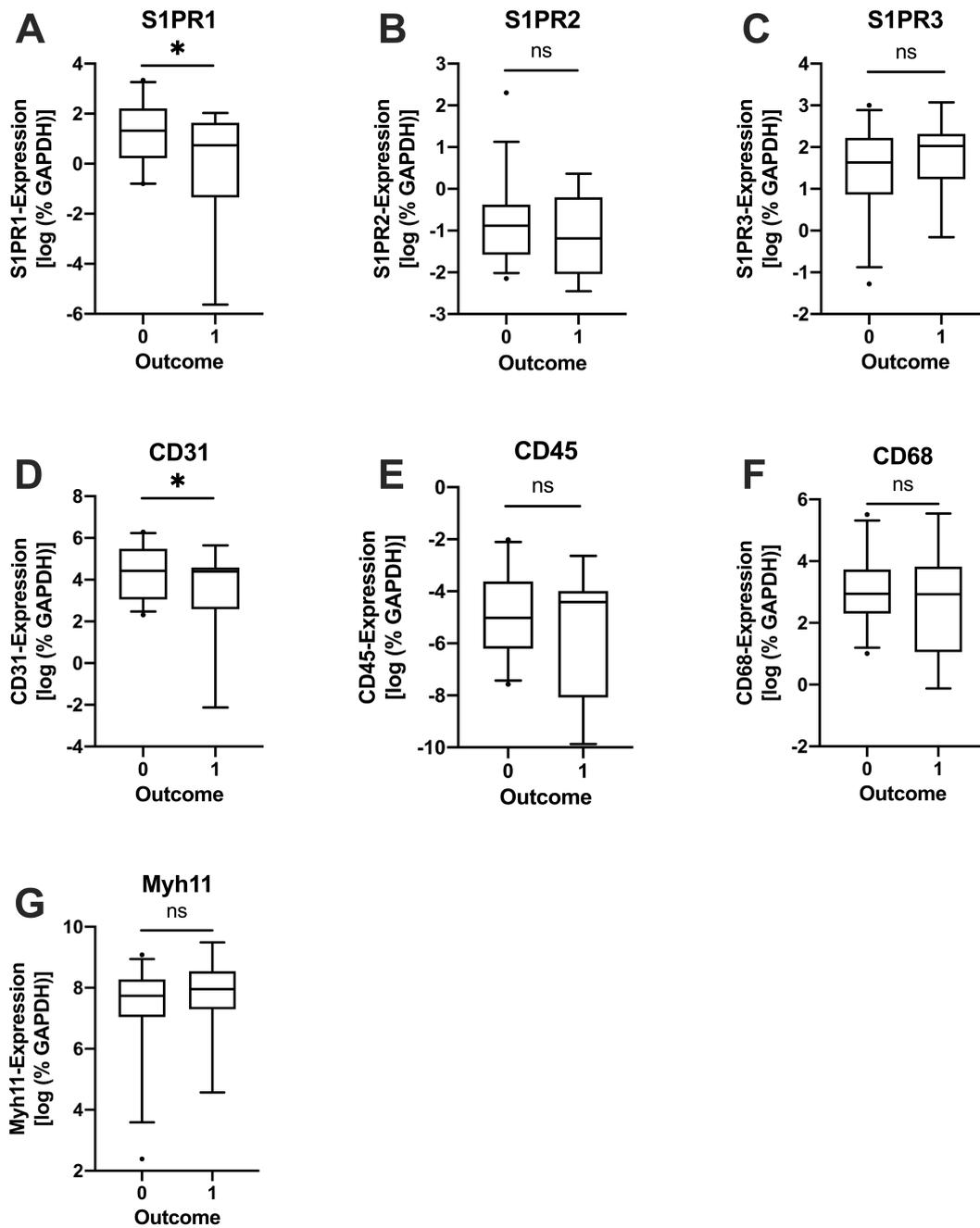


Abbildung 14: Vergleich der Genexpressionen in der Vollwand anhand des klinischen Outcomes. Die Genexpressionen der Subgruppe Outcome 0 (n=32) und der Subgruppe Outcome 1 (n=13) wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Gezeigt sind Box-Plots mit Whiskern (10.-90. Perzentile) sowie Ausreißer. Die statistische Berechnung der Gruppenvergleiche erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigen T-Test (A, B, D, E, F) oder Mann-Whitney-Test (C, G). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; ns, nicht signifikant; *p≤0,05.

Plaque

In den Plaqueproben wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede der Genexpressionen zwischen den Subgruppen Outcome 0 (n=48) und Outcome 1 (n=20) gefunden (s. Abbildung 15).

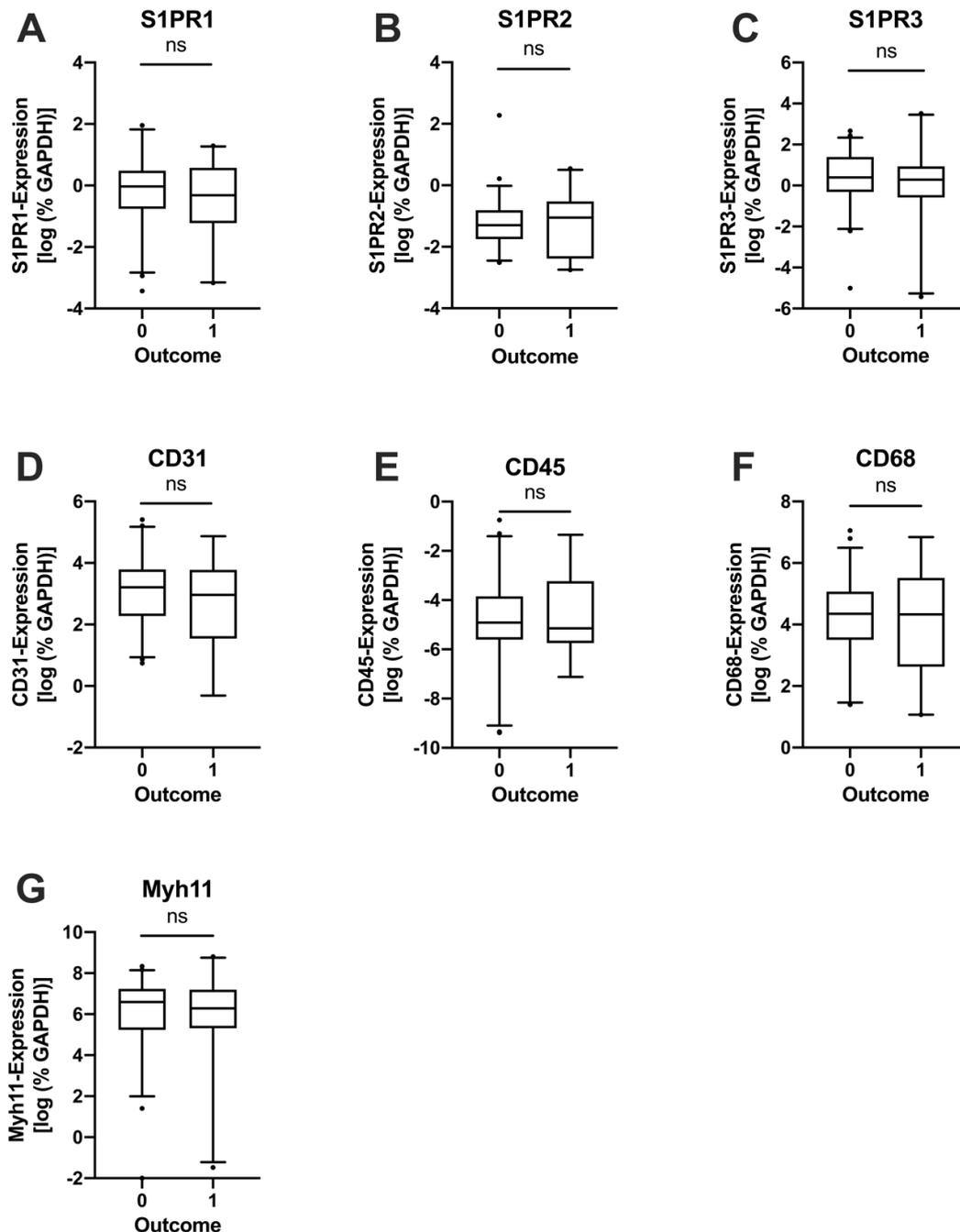


Abbildung 15: Vergleich der Genexpressionen in der Plaque anhand des klinischen Outcomes. Die Genexpressionen der Subgruppe Outcome 0 (n=48) und der Subgruppe Outcome 1 (n=20) wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Gezeigt sind Box-Plots mit Whiskern (10.-90. Perzentile) sowie Ausreißer. Die statistische Berechnung der Gruppenvergleiche erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigen T-Test (A, B, C, E, F) oder Mann-Whitney-Test (D, G). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; ns, nicht signifikant.

4.3 Untersuchung zur Assoziation der Genexpressionen in Vollwand und Plaque

Um die Fragestellung, ob die Expression eines S1P-Rezeptors mit der Expression eines anderen S1P-Rezeptors oder eines Zellmarkers assoziiert ist, zu untersuchen, wurden Korrelationsanalysen mit den Vollwand- (n=47) (s. Abbildung 16 A-C) bzw. den Plaqueproben (n=77) (s. Abbildung 16 D-F) durchgeführt. Zur Übersicht sind die jeweiligen Korrelationskoeffizienten mit den korrespondierenden p-Werten dargestellt, während die einzelnen Korrelationsdiagramme dem Anhang zu entnehmen sind (s. Abbildung 20 und Abbildung 21).

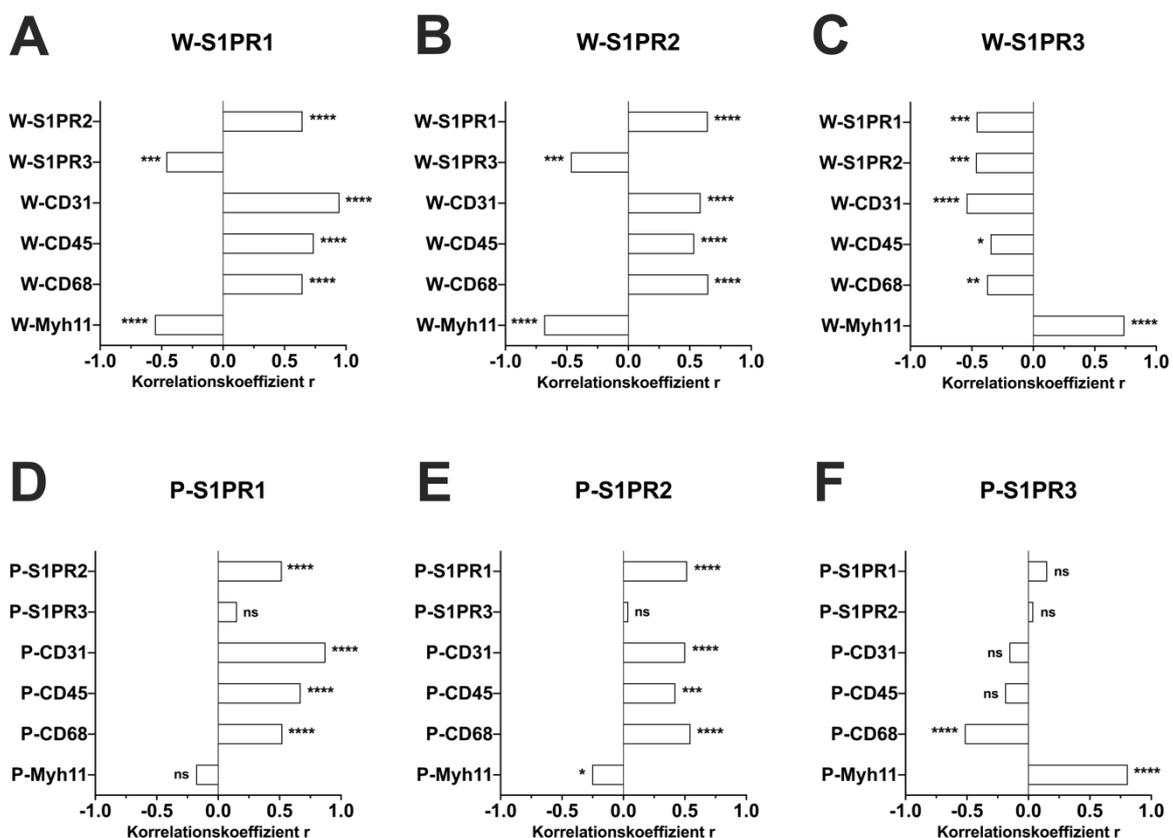


Abbildung 16: Korrelationsanalyse der Genexpressionen innerhalb der Gewebetypen Vollwand (A-C) und Plaque (D-F). Die Genexpressionen aus der Vollwand (n=47) und Plaque (n=77) wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Waren bei einer Korrelationsanalyse beide zu untersuchende Datensätze normalverteilt, wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson sowie der korrespondierende p-Wert berechnet. Im Fall nicht normalverteilter Genexpressionsdaten (A-C: S1PR3, Myh11; D-F: S1PR1, Myh11), wurde eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. W, Vollwand; P, Plaque; r, Korrelationskoeffizient; ns, nicht signifikant; *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001; ****p≤0,0001.

In den Vollwandproben ließ sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von S1PR1 und des S1PR2 ermitteln ($r=0,647$, $p\leq 0,0001$) (s. Abbildung 16A), während eine signifikante, negative Korrelation zwischen S1PR3 und S1PR1 ($r=-0,463$, $p\leq 0,001$) (s. Abbildung 16C) sowie zwischen S1PR3 und S1PR2 ($r=-0,468$, $p\leq 0,001$) (s. Abbildung 16B)

gefunden wurden. Für die Korrelation der S1P-Rezeptoren mit den Zellmarkern wurden die stärksten positiven Korrelationen zwischen den Genexpressionen von S1PR1 und CD31 ($r=0,947$, $p\leq 0,0001$) (s. Abbildung 16A), S1PR2 und CD68 ($r=0,650$, $p\leq 0,0001$) (s. Abbildung 16B) sowie S1PR3 und Myh11 ($r=0,741$, $p\leq 0,0001$) (s. Abbildung 16C) gefunden.

Auch bei den Plaqueproben ließ sich eine signifikante Korrelation zwischen den Genexpressionen von S1PR1 und S1PR2 ermitteln ($r=0,518$, $p\leq 0,0001$) (s. Abbildung 16D), während keine signifikanten Korrelationen zwischen S1PR3 und S1PR1 ($r=0,153$, $p=0,183$) (s. Abbildung 16F) sowie S1PR2 ($r=0,040$, $p=0,733$) (s. Abbildung 16E) gefunden wurden. Bezüglich der Zellmarker wurden die stärksten positiven Korrelationen zwischen den Genexpressionen von S1PR1 und CD31 ($r=0,873$, $p\leq 0,0001$) (s. Abbildung 16D), S1PR2 und CD68 ($r=0,546$, $p\leq 0,0001$) (s. Abbildung 16E) sowie S1PR3 und Myh11 ($r=0,809$, $p\leq 0,0001$) (s. Abbildung 16F) ermittelt.

Insgesamt zeigten sich qualitativ ähnliche Assoziationen in Vollwand und Plaque für die Expression der betrachteten Gene. Hinsichtlich der Expression des S1PR3 wurden allerdings nur in der Vollwand negative Assoziationen mit S1PR1 bzw. S1PR2 gefunden.

4.4 Untersuchung zur Assoziation der Genexpressionen zwischen Vollwand und Plaque

Im Folgenden wurden Assoziationen hinsichtlich der Expression von Zellmarkern und S1P Rezeptoren zwischen Vollwand und Plaque untersucht. Da für diese Analysen nur Studienteilnehmer herangezogen werden konnten, von denen sowohl Gewebeproben von der Plaque als auch von der Vollwand vorhanden waren, war die Gruppengröße relativ klein ($n=32$, s. Abbildung 10). Dennoch ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des S1PR2 in der Vollwand und von CD45 in der Plaque ($r=0,366$, $p=0,043$) (s. Abbildung 17A). Zudem wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des S1PR3 in der Vollwand und der von CD68 in der Plaque gefunden ($r=0,364$, $p=0,044$) (s. Abbildung 17B).

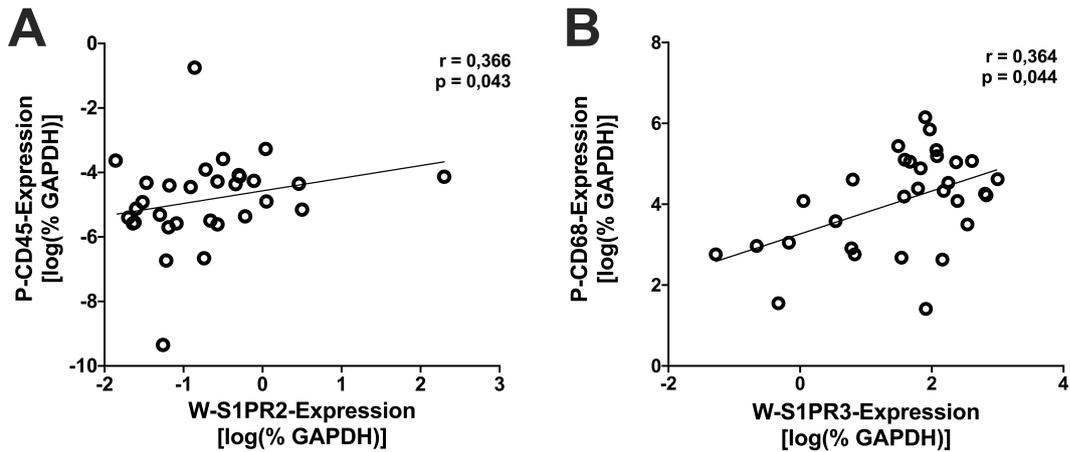


Abbildung 17: Korrelationsanalyse der Genexpressionen zwischen den Gewebetypen Vollwand und Plaque. Die Genexpressionen wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Die dargestellten Genexpressionsdaten ($n=31$) waren nicht normalverteilt, sodass eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt wurde. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; W, Vollwand; P, Plaque; r , Korrelationskoeffizient; p , Signifikanzniveau.

Weitere signifikante Korrelationen wurden nicht gefunden (s. Tabelle 29 im Anhang).

4.5 Untersuchung zur Assoziation zwischen den Genexpressionen in der Vollwand und der Histomorphologie der Plaques

Als nächstes wurde untersucht, ob es Korrelationen zwischen der Expression der untersuchten Gene in der Vollwand und histomorphologischen Merkmalen der Plaques gibt. Bei 34 (18,2 %) von 187 Patienten konnte sowohl der Plaque-Gewebeprobe mindestens ein histomorphologisches Charakteristikum zugeordnet werden als auch Probenmaterial aus der Vollwand für die qPCR gewonnen werden.

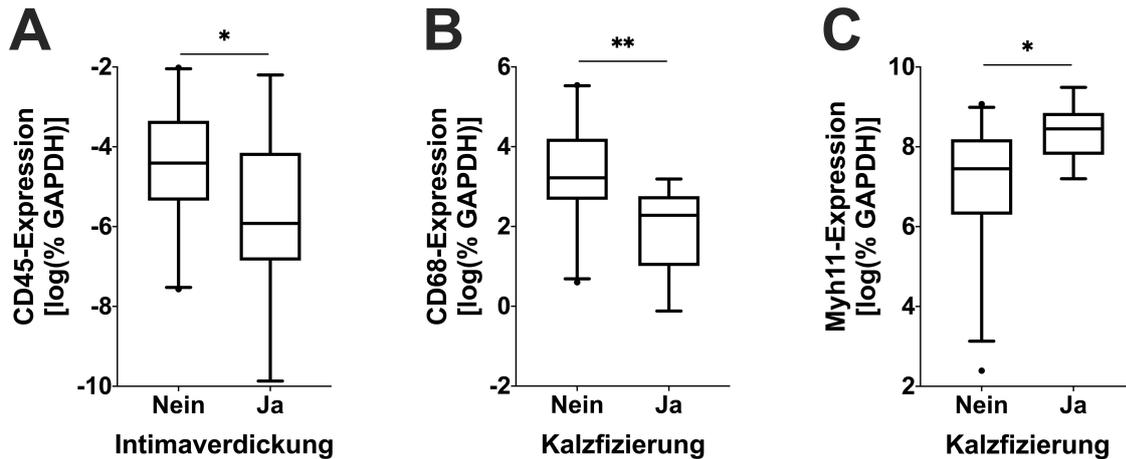


Abbildung 18: Vergleich der Genexpressionen in der Vollwand anhand der Histomorphologie der korrespondierenden Plaques. Die Genexpressionen wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Dabei ergaben sich folgende Gruppengrößen: A: Intimahyperplasie nein (n=23), Intimahyperplasie ja (n=11); B, C: Kalzifizierung nein (n=27), Kalzifizierung ja (n=7). Gezeigt sind Box-Plots mit Whiskern (10.-90. Perzentile) sowie Ausreißer. Die statistische Berechnung der Gruppenvergleiche erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigen T-Test (A, B) oder Mann-Whitney-Test (C). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; *p≤0,05; **p≤0,01.

Bei Patienten, deren Plaques Zeichen einer Intimaverdickung aufwiesen, wurde eine signifikant geringere Expression von CD45 in der Vollwand gemessen werden (p=0,028) (s. Abbildung 18A). Zudem zeigte sich bei Patienten mit kalzifizierten Plaques durchschnittlich eine geringere Genexpression von CD68 (p=0,008) und eine höhere Genexpression von Myh11 (p=0,021) (s. Abbildungen 18B und 18C).

Weitere signifikante Unterschiede wurden nicht gefunden (s. Tabelle 30 und Tabelle 31 im Anhang).

4.6 Untersuchung zum Einfluss der Statineinnahme auf das Lipidprofil und die Genexpression

Patienten, die im 12-monatigen Beobachtungszeitraum eine Restenose entwickelten, wiesen eine geringere Genexpressionen von S1PR1 und CD31 in der Vollwand (s. Kapitel 4.2.5) sowie erhöhte Serum-Blutkonzentrationen von Gesamt-Cholesterin, Triglyceriden und LDL-Cholesterin (s. Kapitel 4.2.3) auf. Zudem war der Anteil an Patienten, die präoperativ bereits mit Statinen behandelt wurden, in der Subgruppe Outcome 0 (n=92) mit 82,6 % höher als in der Subgruppe Outcome 1 (n=51) mit 78,4 %. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant (p=0,656) (s. Kapitel 4.2.2).

Aufgrund dessen wurde im Folgenden der Einfluss der Statineinnahme auf das Lipidprofil untersucht (s. Tabelle 26). Für diese Untersuchung wurden die Laborparameter derjenigen Patienten herangezogen, bei denen der Status der Lipidmedikation erfasst wurde.

Tabelle 26: Vergleich des Lipidprofils anhand der Statineinnahme. Die Laborparameter (Mittelwert \pm Standardabweichung) wurden mittels Mann-Whitney-Test (a) oder ungepaartem, zweiseitigen T-Test (b) verglichen, wobei das Signifikanzniveau bei $p \leq 0,05$ lag. HDL, High-density Lipoprotein; LDL, Low-density Lipoprotein.

	Statineinnahme	Anzahl	MW (\pm SD)	p-Wert
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	nein	32	203,2 (\pm 52,8)	<0,0001^a
	ja	130	163,4 (\pm 35,6)	
Triglyceride [mg/dl]	nein	32	169,3 (\pm 80,7)	0,485 ^a
	ja	130	170,3 (\pm 112,3)	
HDL-Cholesterin [mg/dl]	nein	32	53,5 (\pm 14,3)	0,937 ^a
	ja	130	53,8 (\pm 17,7)	
LDL-Cholesterin [mg/dl]	nein	32	115,7 (\pm 43,0)	<0,0001^b
	ja	125	77,8 (\pm 29,4)	

Es zeigte sich wie erwartet, dass Patienten, die bereits präoperativ Statine einnahmen, ein signifikant niedrigeres Serum-Gesamtcholesterin ($p \leq 0,0001$) und LDL-Cholesterin ($p \leq 0,0001$) aufwiesen.

Als nächstes wurde die Frage untersucht, ob die Einnahme von Statinen einen Einfluss auf die Expression von Genen hat. Die gemessenen Genexpressionsdaten aus der Plaque wurden in einem Gruppenvergleich auf signifikante Unterschiede in Bezug auf die Statineinnahme untersucht.

Hierbei wurde festgestellt, dass Patienten, die bereits präoperativ Statine einnahmen, in der Plaque signifikant höhere Genexpressionen von S1PR1 ($p=0,005$) (s. Abbildung 19A), S1PR3 ($p=0,008$) (s. Abbildung 19C) und CD31 ($p=0,002$) (s. Abbildung 19D) aufwiesen als Patienten, die präoperativ keine Statine einnahmen.

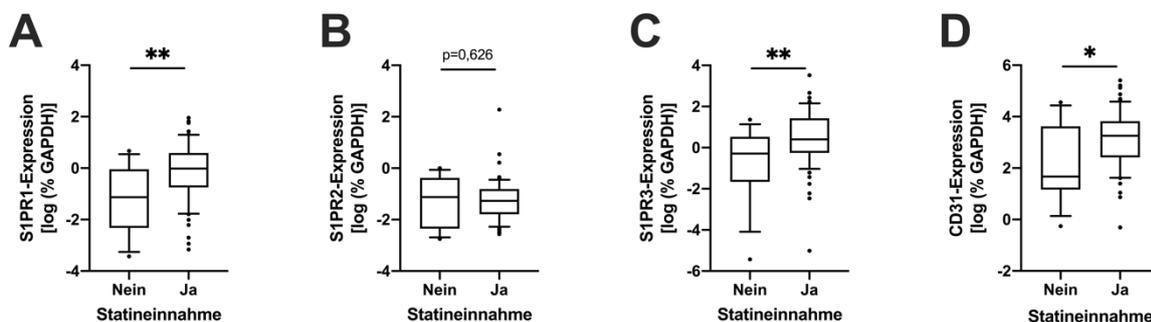


Abbildung 19: Vergleich der Genexpressionen in der Plaque anhand der Statineinnahme. Die Genexpressionen von S1PR1 (A), S1PR2 (B), S1PR3 (C) und CD31 (D) wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Es ergaben sich folgende Gruppengrößen: A, B, C: Statineinnahme nein (n=13), Statineinnahme ja (n=64); D: Statineinnahme nein (n=13), Statineinnahme ja (n=62). Gezeigt sind Box-Plots mit Whiskern (10.-90. Perzentile) sowie Ausreißer. Die statistische Berechnung der Gruppenvergleiche erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigen T-Test. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Bezüglich der Expression des S1PR2 ($p=0,626$) sowie weiterer Zellmarker konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede anhand der Statineinnahme beobachtet werden (s.

Tabelle 32 im Anhang). Auf eine statistische Untersuchung der Genexpressionsdaten aus der Vollwand wurde aufgrund von einer zu geringen Subgruppengröße ($n=5$) verzichtet.

5 Diskussion

Die Atherosklerose ist eine komplexe Systemerkrankung der arteriellen Gefäße und manifestiert sich klinisch unter anderem als periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Dabei kommt es durch die Bildung von lipidhaltigen Plaques in der Intima zu einer Einengung bzw. einem Verschluss des Lumens mit konsekutiver Durchblutungsstörung (Böcker *et al.*, 2019, Libby, 2021). Obschon diverse endovaskuläre und offen-chirurgische Verfahren zur Revaskularisierung zur Verfügung stehen, ist die 1-Jahres-Restenoserate je nach Lokalisation und Verfahren derzeit mit bis zu 60 % sehr hoch (Lawall *et al.*, 2015b, Norgren *et al.*, 2007). Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein natürliches, bioaktives Sphingolipid, welches über die Bindung an G-Protein-gekoppelte S1P-Rezeptoren (S1PR) im Gefäßsystem sowohl physiologische als auch pathophysiologische Prozesse reguliert, die an der Entstehung von Atherosklerose sowie der Restenose beteiligt sind (Daum, 2018).

Um eine potentielle klinische Bedeutung des S1P-Systems in der pAVK zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit humane Gewebeproben von pAVK-Patienten für Genexpressionsanalysen und histologischen Untersuchungen verwendet sowie weitere klinische Parameter (epidemiologische Daten, präoperative Medikation, Laborwerte und S1P-Blutkonzentration sowie im Verlauf nach drei, sechs und zwölf Monaten mittels Ultraschall erhobene Restenosegrade) erhoben. Aus den gesammelten Daten sollten neue Erkenntnisse bezüglich der Vorhersagbarkeit des Auftretens einer Restenose, des Expressionsmusters der S1PR in gesundem (Vollwand) und atherosklerotisch verändertem (Plaque) arteriellem Gewebe sowie der histomorphologischen Beschaffenheit der Plaques gewonnen werden.

5.1 Charakterisierung der Gesamtstudienkohorte

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit eingeschlossenen Patientenkollektiv handelt es sich um Patienten, die aufgrund einer pAVK in der gefäßmedizinischen Klinik des Universitären Herz- und Gefäßzentrums Hamburg vorstellig wurden. Die Tatsache, dass es sich bei der pAVK um eine Erkrankung v.a. des höheren Lebensalters handelt und die Prävalenz mit zunehmendem Alter ansteigt, spiegelt sich in dem Durchschnittsalter von 69,5 Jahren der Gesamtstudienkohorte wider (Fowkes *et al.*, 2013). Männer waren in der Gesamtstudienkohorte mit einem Anteil von 70,1 % überdurchschnittlich stark vertreten. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Prävalenz der pAVK bei Männern höher ist als bei Frauen, während Frauen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung älter und schwerer betroffen sind als Männer (Diehm *et al.*, 2004, Cheanvechai *et al.*, 2004). Der mittels Körpergröße ($172,7 \pm 9,7$ cm) und Körpergewicht ($76,5 \pm 16,2$ kg) errechnete durchschnittliche BMI betrug $25,5 \pm 4,3$ kg/m² und entsprach damit einer Prä-Adipositas (Mensink *et al.*, 2013). Die Gesamtstudienkohorte wies damit einen leicht niedrigeren BMI auf als vergleichbare Studienpopulationen (Diehm *et al.*, 2009, Daskalopoulou *et al.*, 2008, Farber *et al.*, 2022).

Die präoperativen Einnahmeraten der verschiedenen Medikamentengruppen entsprachen mit Ausnahme der von Statinen denen vergleichbarer Studien (Hackam und Vyas, 2018, Peters *et al.*, 2020). Beinahe 80 % der Patienten nahmen präoperativ Statine ein. In einer Meta-Analyse mit 86 Studien aus den Jahren 2000 bis 2018 wurde eine durchschnittliche Verschreibungsrate von 56 % ermittelt, wobei oftmals weniger als die Hälfte der Rezepte auch wirklich eingelöst werden (Hackam und Vyas, 2018, Gebauer *et al.*, 2021). Die Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass die Verschreibungsrate von Statinen bei pAVK-Patienten seit 2000 jährlich um durchschnittlich 2 % steigt und an spezialisierten Kliniken wie dem Universitären Herz- und Gefäßzentrum Hamburg höhere Verschreibungsraten beobachtet werden können (Hackam und Vyas, 2018, Huang *et al.*, 2017). Nahezu alle Patienten stellen sich hier präoperativ in einer Sprechstunde vor, in der bereits auf die Wichtigkeit der Einnahme von Statinen hingewiesen wird.

Mit Ausnahme des Entzündungsmarkers CRP und den Triglyceriden lagen die Mittelwerte aller erhobenen Laborwerte in ihren jeweiligen Referenzintervallen. In mehreren Studien wurde ein erhöhter CRP-Wert als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer symptomatischen pAVK beschrieben, wodurch die Hypothese gestützt wird, dass die chronische Entzündung der Arterienwände eine wichtige Rolle bei der Atherogenese spielt (Ridker *et al.*, 2001, Brevetti *et al.*, 2010). Ebenso gilt die Hypertriglyceridämie als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, wobei es *bis dato* keinen Anhalt dafür gibt, dass eine medikamentöse Behandlung zu einer geringeren Morbidität und Mortalität bei pAVK-Patienten führt (Talayero und Sacks, 2011, Frank *et al.*, 2019).

Während die gemittelte S1P-Konzentration des Blutplasmas mit $0,99 \pm 0,30$ nmol/ml im Referenzbereich lag, erschien die durchschnittliche S1P-Konzentration im Blutserum mit $1,71 \pm 0,49$ nmol/ml erhöht. Obschon Soltau *et al.* in einer Voruntersuchung bei pAVK-Patienten einen erniedrigten Serum-S1P-Spiegel im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit gesunden Probanden feststellten, wiesen KHK-Patienten in der Untersuchung von Deutschmann *et al.* erhöhte S1P-Spiegel auf (Soltau *et al.*, 2016, Deutschmann *et al.*, 2003). Die variierenden Ergebnisse lassen sich möglicherweise auf die hohe interindividuelle Varianz bei zumeist kleinen Stichprobengrößen sowie unterschiedliche präanalytische Prozessierungs- und Messmethoden zurückführen (Daum *et al.*, 2020, Moritz *et al.*, 2017). Der Unterschied der S1P-Konzentrationen zwischen Serum- und Plasmaproben wurde hingegen mehrfach beschrieben. Ein möglicher Grund dafür ist, dass in Thrombozyten gespeichertes S1P während der Blutgerinnung in den Serumproben freigesetzt wird (Ono *et al.*, 2013, Garcia *et al.*, 2001, Yatomi, 2008).

Im Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten wiesen 24 Patienten (14,8 %) einen Restenosegrad von 3 oder 4 (klinischer Endpunkt) auf, sodass eine Revision des Gefäßabschnittes notwendig war. Von diesen Patienten sind 21 zuvor offen-chirurgisch und

drei endovaskulär versorgt worden. Dadurch ergibt sich für offen-chirurgische Verfahren eine 1-Jahres-Reinterventionsrate von 16,2 % und für die endovaskuläre Versorgung von 9,4 %. Im Vergleich dazu ergab eine Analyse von Kuchenbecker *et al.*, die auf Krankenversicherungsdaten von mehr als 59.000 hospitalisierten pAVK-Patienten in Deutschland im Zeitraum von 2005 bis 2019 basierte, für endovaskuläre Eingriffe eine 1-Jahres-Reinterventionsrate von 20,8 % und für offene chirurgische Verfahren eine Rate von 13,7 % (Kuchenbecker *et al.*, 2023). Dass Restenosen vor allem innerhalb der ersten 6 Monate auftreten, konnte nicht nur im femoropoplitealen Gefäßabschnitt, sondern auch bei den Koronar- und Karotisarterien beobachtet werden (Gabrielli *et al.*, 2012, Davaine *et al.*, 2012, Popma und Topol, 1990, Lal *et al.*, 2013, Adams *et al.*, 2015, Farber *et al.*, 2022). Die Relevanz der ersten 6 Monate bei der Nachsorge von Patienten wurde zusätzlich durch die Ergebnisse der BASIL-Studie unterstrichen. Meecham *et al.* zeigten hierbei in einem Vergleich der Outcome-Daten zwischen interventionell und offen-chirurgisch versorgten pAVK-Patienten, dass in beiden Gruppen der Großteil aller Patienten eine Reintervention in den ersten 12 Monaten erhalten, während sich die Reinterventionsrate in den darauffolgenden 7 Jahren (endovaskulär 34,4 % vs. offen-chirurgisch 18,8 %) kaum mehr erhöht (Meecham *et al.*, 2019). Beim Vergleich der Genexpressionswerte zwischen den Gewebeproben aus der Vollwand und der Plaque erkennt man, dass in den Plaques S1PR1 und CD31 relativ schwächer exprimiert werden als in der Vollwand. Aufgrund der Tatsache, dass sich das Expressionslevel von CD31 in EZ aus gesunden Gefäßwänden und in denen über Atheroskleroseplaques nicht signifikant voneinander unterscheidet, sind diese Unterschiede möglicherweise auf die ungleichen Anteile an EZ in den Vollwand- und Plaqueproben zurückzuführen (Nakashima *et al.*, 1998, Davies *et al.*, 1993). Zudem ist die relative Expression des Makrophagenmarkers CD68 in den Gewebeproben der Plaque höher als in den Vollwandproben. Diese Beobachtung erscheint unter der Prämisse der Atherosklerose als chronisch-entzündliche Erkrankung der Arterienwand plausibel. Ein direkter Vergleich von Genexpressionswerten zwischen zwei unterschiedlichen Gewebetypen sollte jedoch immer mit Vorsicht interpretiert werden. Es können nämlich keine Aussagen darüber getroffen werden, ob dieser Unterschied aufgrund von unterschiedlichen relativen Zellzahlen oder unterschiedlich starker Genexpression zu sehen ist (Cojocar *et al.*, 2012, Feil *et al.*, 2014). Insgesamt spiegelt sich die Heterogenität der Atheroskleroseplaques in der hohen Varianz der Expressionsdaten wieder.

5.2 Vergleich der erhobenen Parameter zwischen den Patienten mit und ohne einer Restenose im Verlauf

Die beiden Subgruppen unterschieden sich bezüglich der epidemiologischen Parameter in zwei Punkten statistisch signifikant voneinander. Zum einen wiesen Patienten mit einer messbaren Restenose im Verlauf durchschnittlich einen höheren BMI ($26,6 \pm 4,7$ vs.

24,8 ± 3,9 kg/m²) auf. Während bereits seit Langem ein erhöhter BMI im Rahmen eines metabolischen Syndroms als Risikofaktor für Atherosklerose gilt, konnte dies in Bezug auf die Restenose noch nicht bestätigt werden (Hermanns, 2009, Tanaka *et al.*, 2018). Zum anderen ist der Männeranteil in der Subgruppe Outcome 1 mit 58,9 % signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe mit 74,5 %. Eine Erklärung könnte sein, dass Frauen zum Zeitpunkt der Revaskularisation älter sind und damit häufig ein bereits weiter fortgeschrittenes, komplexeres Erkrankungsbild als Männer aufweisen (Brodmann und De Carlo, 2017, McCoach *et al.*, 2013, Ortmann *et al.*, 2012). Zudem wird der bei Frauen insgesamt kleinere Gefäßdurchmesser als weiterer Grund für die beobachteten höheren Restenoseraten angeführt (Soga *et al.*, 2022, Krishnan *et al.*, 2020, Vartanian und Conte, 2015).

Bezüglich der präoperativen Medikation konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte die ohnehin schon hohe Einnahmerate wie beispielsweise von Statinen in der Gesamtstudienkohorte vor der Revaskularisierung sein.

Laborchemisch zeigten sich im Blut der Patienten mit einer Restenose signifikant höhere Konzentrationen an Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin sowie Triglyceriden. Zudem fand sich für Patienten, deren Gesamt- und LDL-Cholesterinwerte oberhalb des Normbereichs lagen, im Vergleich zu Patienten mit Werten im Normalbereich eine deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Restenose. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass die Gesamt- und LDL-Cholesterin-Konzentration bei Patienten mit einer Restenose erhöht (Lippi *et al.*, 1998, Giovanetti *et al.*, 2009, Gary *et al.*, 2011) und der Restenosegrad mit der Höhe der Lipidkonzentration assoziiert ist (Gary *et al.*, 2011). Gleichzeitig erhöht eine Hypertriglyceridämie das Risiko für ein Graft-Versagen bei einem Herzbybypass und gilt als Prädiktor für Restenosen an den Karotisarterien (Lau *et al.*, 2006, Miura *et al.*, 2021). Während cholesterinsenkende Medikamente wie Statine als Sekundärprävention zur Vermeidung von Restenosen empfohlen werden, gibt es *bis dato* jedoch keinen Hinweis dafür, dass die medikamentöse Behandlung einer Hypertriglyceridämie das Risiko für Restenosen und andere kardiovaskulären Ereignisse bei Patienten mit einer pAVK senkt (Lawall *et al.*, 2015b). Insgesamt ist die Datenlage zur Identifikation von Laborparametern als Prädiktoren und Risikofaktoren für Restenosen im Speziellen für die pAVK jedoch gering und die meist retrospektiven Studien weisen heterogene und selektierte Patientenkollektive auf.

Soltau *et al.* demonstrierten, dass Patienten mit einer pAVK oder einer Karotisstenose signifikant verminderte S1P-Konzentrationen im Serum aufweisen und Serum-S1P somit ein prognostischer Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen sein könnte (Soltau *et al.*, 2016). In der vorliegenden Arbeit unterschieden sich die präoperativen S1P-Konzentrationen im Serum oder Plasma nicht zwischen den beiden Outcome-Subgruppen. Mehrere Studien

weisen darauf hin, dass Patienten mit einer Restenose im weiteren Verlauf signifikant niedrigere S1P-Konzentrationen im Serum aufweisen. Allerdings beziehen sich diese Studien auf andere Gefäße (Karotisarterien und Zerebralarterien) sowie ausschließlich auf In-Stent-Restenosen und die S1P-Konzentrationen wurden postoperativ bestimmt (Yang *et al.*, 2015, Liu, 2017, Wang *et al.*, 2017). Jing *et al.* untersuchten in einem Beobachtungszeitraum von sechs bis zwölf Monaten nach koronarer Stentimplantation Blutparameter und zeigten, dass Patienten mit einer In-Stent-Restenose nicht nur signifikant niedrigere S1P-Konzentrationen, sondern auch eine geringere Konzentration von HDL-gebundenem S1P im Serum aufweisen. Mittels einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse identifizierten sie HDL-gebundenes S1P als unabhängigen Prädiktor für In-Stent-Restenosen in Koronararterien (Jing *et al.*, 2015). Im Blut wird S1P sowohl an Lipoproteine (60 %) als auch an Albumin (40 %) gebunden transportiert, wobei der Großteil des Lipoprotein-gebundenen S1P in HDL vorkommt (Daum *et al.*, 2009, Levkau, 2015). Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass v.a. der Gehalt von S1P in HDL die HDL-vermittelten antithrombotischen, entzündungshemmenden sowie antioxidativen Effekte qualitativ und quantitativ beeinflusst (Levkau, 2015). An Albumin gebunden scheint S1P jedoch einen gegenteiligen, pro-atherogenen Effekt zu besitzen (Sattler *et al.*, 2010, Wilkerson *et al.*, 2012). Daher sollte im Rahmen zukünftiger Studien die genaue Verteilung des S1P an den unterschiedlichen Transportmolekülen im Blut analysiert werden, um die Eignung eines präoperativen S1P-Messwertes als Prädiktor für Restenosen differenzierter untersuchen zu können.

Obschon Studien zeigen, dass histomorphologische Plaque-Charakteristika wie beispielsweise die Größe des Lipidkerns, Grad der Kalzifizierung oder Anzahl an GMZ mit dem Auftreten von Restenosen in Karotis- und Femoralarterien assoziiert sind, konnten im Rahmen dieser Untersuchung keine relevanten Unterschiede in den Gewebeproben zwischen den Outcome-Subgruppen identifiziert werden (Derksen *et al.*, 2010, Hellings *et al.*, 2008). Gründe dafür könnten neben der starken Heterogenität der Plaques auch die im Vergleich zu den anderen Studien geringere Fallzahl sein.

Hinsichtlich der Genexpressionswerte der Vollwandproben konnten zwei statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen gefunden werden. Patienten mit einer Restenose im weiteren Beobachtungszeitraum wiesen eine geringere Genexpression von S1PR1 und CD31 auf. Sowohl S1PR1 als auch CD31 werden vor allem von EZ exprimiert und dienen daher in vielen Studien als Endothelmarker (Cannavo *et al.*, 2017, Liu und Shi, 2012). Neben seinen Funktionen als Mechanosensor für Scherstress und bei der Steuerung der Leukozyten-Transmigration im Endothel fördert CD31 die Migration und das Überleben von EZ und damit die vaskuläre Integrität (Lertkiatmongkol *et al.*, 2016). CD31-beschichtete Stents fördern im Vergleich zu *bare metal stents* oder *drug-eluting stents* die Re-Endothelialisierung und verringern neben Adhärenz und Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten auch die

Bildung neointimaler Hyperplasie in einem porcinen Revaskularisierungsmodell (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2021). Gleichmaßen fördert S1P *in vitro* über die Bindung an S1PR1 die Proliferation und Migration von EZ *in vitro* und verstärkt durch die konsekutive Aktivierung der GTPase Rac die Bildung von *Adherens Junctions* und *Tight Junctions* und damit die vaskuläre Integrität (Kimura *et al.*, 2000, Wang und Dudek, 2009). Zudem wurde für HDL-gebundenes S1P eine S1PR1-abhängige Herunterregulierung der Expression Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 beschrieben (Kimura *et al.*, 2006, Lien *et al.*, 2006). Die Wahrscheinlichkeit für Restenosen könnte demnach erhöht sein, wenn das die primäre Läsion umgebende Endothel (Vollwandprobe) vorgeschädigt ist bzw. weniger EZ vorhanden sind und somit die Re-Endothelialisierung erschwert ist (Ladak *et al.*, 2022). Durch eine verminderte vaskuläre Barriere und konsekutiv erhöhter Permeabilität im Bereich der Neointima könnten Plasmasubstanzen wie beispielsweise PDGF einfacher in die Gefäßwand gelangen. Hierbei agiert PDGF für die GMZ als Chemoattraktor bei der Migration aus der Media in die Neointima und fördert dort die Zellproliferation sowie die Synthese von Kollagenen und Proteoglykanen (Larena-Avellaneda und Franke, 2004).

Neben der Intimahyperplasie kann jedoch auch das erneute Auftreten von Atherosklerose in der Neointima bzw. die Neoatherosklerose ursächlich für die Restenose sein (Nguyen *et al.*, 2022). Histologisch ist die Neoatherosklerose charakterisiert durch die Akkumulation von lipidbeladenen Schaumzellen mit oder ohne Bildung eines nekrotischen Kerns oder Verkalkung. Während es bei der Atherosklerose bereits im Kindesalter zu ersten Lipidablagerungen in die Intima kommt und meist Jahrzehnte vergehen bis erste Symptome auftreten, entwickelt sich die Atherosklerose in der Neointima bereits innerhalb von Monaten bis Jahren. Die Mechanismen der rapiden Entstehung von Neoatherosklerose sind noch nicht hinreichend identifiziert worden. Es wird jedoch postuliert, dass eine gestörte Re-Endothelialisierung oder eine beeinträchtigte vaskuläre Integrität der Neointima zu diesem Prozess beitragen könnte (Insull, 2009, Otsuka *et al.*, 2015). Es ist davon auszugehen, dass die bekannten Risikofaktoren der Atherosklerose wie beispielsweise eine Hyperlipidämie auch bei der Pathogenese der Neoatherosklerose eine bedeutende Rolle spielen. Die LINK-IT-Studie zeigte bei Patienten mit nicht-obstruktiven neoatherosklerotischen Plaques, dass die Intensivtherapie mit 10 mg/Tag Rosuvastatin und Eicosapentaensäure das Fortschreiten der Neoatherosklerose signifikant vermindert, indem sie die Blutkonzentration atherogener Lipoproteine senkt (Kuroda *et al.*, 2019). Wie bereits oben beschrieben, wiesen Patienten mit einer Restenose im Beobachtungszeitraum signifikant höhere Gesamt- sowie LDL-Cholesterin-Konzentrationen und in der Tendenz eine niedrigere Einnahmerate an Statinen auf. Abbruzzese *et al.* beschreiben in ihrer Studie einen positiven Effekt einer Statintherapie auf die Offenheitsrate von Grafts nach autogenen infrainguinalen arteriellen Rekonstruktionen, der jedoch unabhängig von der LDL-Konzentration ist (Abbruzzese *et al.*, 2004). Durch die

Inhibition der HMG-CoA-Reduktase kommt es auch zu einer verminderten posttranslationalen Modifizierung und damit zu einer Hemmung von kleinen GTPasen wie Rho und Rac und ihren nachgeschalteten Effektoren wie beispielsweise der Rho-Kinase ROCK, was die lipidunabhängigen, sogenannten pleiotropen Eigenschaften von Statinen wie eine Verringerung der endothelialen Dysfunktion oder Hemmung von Entzündungsreaktionen erklärt (Oesterle *et al.*, 2017). Ein weiteres Ergebnis der Genexpressionsanalysen war, dass Patienten, die bereits präoperativ Statine einnahmen, in der Plaque eine signifikant höhere Genexpressionen von S1PR1, S1PR3 und CD31 aufweisen. Interessanterweise konnten Igarashi *et al.* demonstrieren, dass die Stimulierung von EZ aus der Rinderaorta mit Statinen zu einem signifikanten dosisabhängigen Anstieg von S1PR1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene *in vitro* führt. Zudem konnte nach Stimulation der EZ mit Statinen eine verstärkte, durch S1P und HDL ausgelöste Phosphorylierung und Aktivierung von eNOS beobachtet werden. Umgekehrt führte die Herunterregulation von S1PR1 mittels siRNA zu einer abgeschwächten Phosphorylierung und Aktivierung von eNOS via HDL, sodass postuliert wurde, dass die pleiotrope Wirkung von Statinen teilweise mit der Aktivierung der S1PR1-Signalübertragung in EZ einhergehen könnte (Igarashi *et al.*, 2007). Weitere Forschungsgruppen bestätigten die Statin-induzierte Überexpression von S1PR1 in HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*), HUPAECS (*Human pulmonary artery endothelial cells*) sowie *in vivo* in murinen EZ aus der Lungenarterie und identifizierten dabei den Krüppel-like Faktor 2 als Transkriptionsfaktor (Josipovic *et al.*, 2018, Sun *et al.*, 2017). Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern demnach einen ersten Hinweis dafür, dass die verzögerte oder beeinträchtigte Re-Endothelialisierung mit einem erhöhten Risiko für Restenosen assoziiert ist und der pleiotrope Effekt von Statinen beim Menschen zum Teil mit der Aktivierung der S1PR1-Signalwegen in EZ zusammenhängen könnte. Um diesem Hinweis nachzugehen, müsste man in einer nächsten Untersuchung mit einer größeren Fallzahl zusätzlich eine Gewebeprobe der Restenose gewinnen, um den zugrundeliegenden Pathomechanismus identifizieren sowie die Re-Endothelialisierung analysieren zu können.

5.3 Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren

S1P spielt über die Bindung an seine Rezeptoren auf unterschiedlichen Zelltypen im Gefäßsystem sowohl bei der Atherogenese als auch bei der Restenose eine entscheidende Rolle. Die Funktion von S1P ist allerdings komplex, da sowohl protektive als auch schädigende Effekte auf das Gefäßsystem beobachtet wurden. Die tatsächliche Wirkung von S1P hängt neben vielen anderen Faktoren wie beispielsweise der S1P-Konzentration oder des Transportmoleküls hauptsächlich von der Gefäßbett-spezifischen, relativen Expression der S1PR-Subtypen auf EZ und GMZ ab (Kurano und Yatomi, 2018). Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Genexpressionsanalysen die Assoziationen zwischen den

jeweiligen S1PR-Subtypen aber auch zwischen den S1PR-Subtypen und weiteren Zellmarkern in den Gewebeproben der Plaque und der Vollwand untersucht.

Hierbei konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen S1PR1 und S1PR2 sowohl in der Vollwand als auch in der Plaque gezeigt werden. Interessanterweise weisen die beiden Rezeptoren auf zellulärer Ebene antagonistische Effekte auf. Während S1P die endotheliale Barrierefunktion über S1PR1-Gai-Rac1- und S1PR1-Gai-Cdc42-Signalwege fördert, führt eine Aktivierung des S1PR2-G α 12/13-RhoA-Signalweges zur Kontraktion von EZ und einem Verlust der Barrierefunktion, indem die Gai-vermittelte Signalübertragung unterdrückt wird (Reinhard *et al.*, 2017). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Migration von GMZ durch die Aktivierung von S1PR1 gefördert und von S1PR2 inhibiert wird (Inoue *et al.*, 2007, Shimizu *et al.*, 2007). Die Regulation der Expression antagonistisch wirkender S1PR könnte demnach möglicherweise zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Gleichgewichts in der Gefäßwand beitragen. Bezüglich des Verhältnisses der Expression von S1PR1 und S1PR2 als potentieller prädiktiver Faktor für Restenosen konnte in dieser Arbeit jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne Restenose im weiteren Verlauf beobachtet werden.

Die relative Expression der S1PR unterscheidet sich sowohl von Gefäßbett zu Gefäßbett als auch in den unterschiedlichen Zelltypen (Sanchez *et al.*, 2007, Eghrari *et al.*, 2022). Während S1PR2 und S1PR3 v.a. von GMZ exprimiert werden, exprimieren EZ vorwiegend S1PR1 und S1PR3. Eine endotheliale Expression von S1PR2 konnte jedoch ebenfalls in größeren Arterien, in kleinen Lungenarterien, in entzündeten Gefäßen sowie in Tumorgefäßen gezeigt werden (Takuwa *et al.*, 2008, Du *et al.*, 2010, Du *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit festgestellten signifikanten positiven Korrelationen der Genexpression von S1PR1 sowie S1PR2 und die negative Korrelation von S1PR3 mit CD31 sowohl in den Plaque- als auch in den Vollwandgewebeproben deuten darauf hin, dass die EZ in humanen Beinarterien v.a. S1PR1 und S1PR2 und weniger S1PR3 exprimieren. Aufgrund der signifikant positiven Korrelation der Genexpression von S1PR3 und der negativen Korrelation von S1PR1 und S1PR2 mit Myh-11 könnte vermutet werden, dass GMZ vorwiegend S1PR3 und weniger S1PR1 oder S1PR2 exprimieren. Eine Expression von S1PR3 in humanen GMZ konnte bereits durch viele Studien demonstriert werden (Waeber *et al.*, 2004, Kerage *et al.*, 2014). Die Hypothese, dass der S1PR1 nicht von GMZ exprimiert wird, steht jedoch in scheinbarem Widerspruch zu einer Studie von Braetz *et al.* Durch Verwendung eines humanisierten Modells für Intimahyperplasie, in dem die Abdominalaorta einer Ratte durch eine denudierte, humane innere Brustwandarterie ersetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass GMZ durchaus S1PR1 exprimieren und die Migration von GMZ im in Richtung Intima S1PR1-abhängig sein könnte (Braetz *et al.*, 2018). Ebenso wiesen GMZ in der Neointima eine stärkere Expression von S1PR1 auf als GMZ in der Media (Kluk und Hla, 2001). Daher könnte neben einer Gefäßbett-

spezifischen, divergierenden Expression vom S1PR1 in GMZ auch eine im Rahmen der phänotypischen Modulation von GMZ als Reaktion auf die Denudation induzierte S1PR1-Expression ein Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen sein.

Die signifikant negative Korrelation zwischen S1PR2 und dem GMZ-Marker Myh11 sowohl in Plaque- als auch Vollwandproben könnte zwei Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist, dass die GMZ zu Fibroblasten-ähnlichen Muskelzellen transdifferenzieren und während dieses Prozesses die Expression von My11 abnimmt und von S1PR2 ansteigt (Torella *et al.*, 2011, Pan und Reilly, 2019). Zum anderen könnte eine Infiltration der Media durch Fibroblasten das Expressionsverhältnis von S1PR2 und Myh11 zugunsten des S1PR2 verschieben (Singh und Torzewski, 2019).

Des Weiteren konnten signifikant positive Korrelationen zwischen S1PR1 und S1PR2 und den Zellmarkern für Leukozyten und Makrophagen CD45 respektive CD68 beobachtet werden. Diese Beobachtung steht mit früheren Arbeiten in Übereinstimmung, die zeigen, dass S1PR die Migration dieser Zellen reguliert. Bei der Behandlung schwerer, schubförmiger Multipler Sklerose mit Fingolimod, bei der autoreaktive T-Lymphozyten die Myelinscheide im zentralen Nervensystem angreifen, stellt der S1PR1 auf der Oberfläche von jenen Zellen das Zielmolekül dar. Fingolimod agiert hierbei als funktioneller Antagonist und führt zu einer Internalisierung und Degradation des S1PR1. Durch Unterbindung des S1PR1-vermittelten Austritts von autoreaktiven T-Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen wird die Infiltration in das zentrale Nervensystem verhindert und damit der Krankheitsprogress vermindert (Kappos *et al.*, 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass S1P über die Aktivierung von S1PR2 die Retention von humanen T-Gedächtnis- und murinen T-Helferzellen in sekundären lymphatischen Organen fördert (Moriyama *et al.*, 2014, Drouillard *et al.*, 2018). Neben Monozyten und Makrophagen wird CD68 auch von Osteoklasten-ähnlichen Zellen in Atherosklerose-Plaques exprimiert (Qiao *et al.*, 2015). In den Studien von Ishii *et al.* zum Einfluss von S1P auf die Migration von Osteoklasten konnte gezeigt werden, dass durch die feine Regulation des Verhältnisses der S1PR1- und S1PR2-Expression sowie deren divergierenden chemoattraktiven respektive chemorepulsiven Effekte in Richtung hoher S1P-Konzentrationen der Eintritt aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf sowie *vice versa* der Austritt aus dem Blutkreislauf ins Zielgewebe gesteuert wird. Innerhalb des Blutgefäßes wird der S1PR1 durch die hohe Konzentration von S1P aktiviert und anschließend internalisiert, sodass der S1PR2 prädominant auf der Zelloberfläche wird. Durch die S1PR2-vermittelte Chemorepulsion wandern Osteoklasten schließlich aus dem Blutgefäß beispielsweise in atherosklerotische Plaques ein. Wird die erneute Expression von S1PR1 durch bestimmte dort sezernierte Chemokine supprimiert, verbleibt die Zelle am jeweiligen Bestimmungsort (Ishii *et al.*, 2009, Ishii *et al.*, 2011, Grewe *et al.*, 2022). Zudem konnten Skoura *et al.* in einem Atherosklerose-Mausmodell zeigen, dass die zusätzliche Deletion von S1PR2 in den

hämatopoetischen Stammzellen zu einer verminderten Anzahl an Makrophagen in den atherosklerotischen Plaques führt. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an Monozyten im peripheren Blut beobachtet werden (Skoura *et al.*, 2011).

Aufgrund der Tatsache, dass die Atherosklerose eine systemische Erkrankung darstellt und einzelne Plaques nicht isoliert betrachtet werden sollten, wurden ebenfalls die Assoziationen der Genexpressionen zwischen Vollwand und Plaque untersucht. Ziel dieser Untersuchung war es, herauszufinden, ob die Expression bestimmter S1PR in der Vollwand mit der Expression von Zellmarkern und damit dem Vorhandensein bestimmter Zellen in benachbarten Plaques assoziiert ist. Hierbei zeigten sich zwei statistisch signifikante Korrelationen. Die Genexpression von S1PR2 in der Vollwand korrelierte positiv mit der Genexpression des Zellmarkers für Leukozyten CD45 in der benachbarten Plaque. Daher könnte postuliert werden, dass die Höhe der Expression des S1PR2 in der gesunden Arterienwand einen Surrogatmarker für das entzündliche Geschehen in der benachbarten Plaque darstellt. In der Tat zeigten Sanchez *et al.*, dass die Aktivierung von überexprimierten S1PR2 über die Disruption von *Adherens Junctions* die vaskuläre Barriere *in vitro* vermindert, während die Behandlung mit dem S1PR2-Antagonisten JTE-013 zu einer Verbesserung der vaskulären Barriere führt. Zudem verminderte JTE-013 die H₂O₂-induzierte Permeabilität in Lungenarterien von Ratten *in vivo* (Sanchez *et al.*, 2007). Des Weiteren zeigten Skoura *et al.*, dass S1P über die Aktivierung von S1PR2 auf humanen EZ die Expression proinflammatorischer Moleküle wie die Cyclooxygenase-2 fördert und der vasoprotektiven sowie antiinflammatorischen eNOS *in vitro* hemmt (Skoura *et al.*, 2007). Interessanterweise beobachteten Zhang *et al.*, dass auch die Inkubation von EZ mit dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sowohl zu einer erhöhten Expression von S1PR2 als auch von SPHK1 und damit mit erhöhten S1P-Spiegeln einhergeht. Diese TNF- α -induzierte, autokrine Aktivierung des S1P-S1PR2-Signalweges führte schließlich NF κ B-vermittelt zu einer erhöhten Expression von den Adhäsionsmolekülen VCAM-1 und ICAM-1 (Zhang *et al.*, 2013b). Daher könnte es auch sein, dass nicht die erhöhte Expression von S1PR2 in EZ das entzündliche Geschehen in der Gefäßwand fördert, sondern die erhöhte S1PR2-Expression eine Folge von bereits in der Gefäßwand vorhandenen proinflammatorischen Zytokinen ist bzw. diese Forschungsergebnisse einen *circulus vitiosus* beschreiben.

Die zweite signifikante positive Korrelation bestand zwischen der Genexpression von S1PR3 in der Vollwand und dem Zellmarker für Makrophagen CD68 in der benachbarten Plaque. Das proinflammatorische Zytokin *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) fördert die Adhäsion zirkulierender Monozyten an die Gefäßwand und ermöglicht damit deren Eintritt in diese. Lin *et al.* zeigten *in vitro*, dass die endotheliale MCP-1 Expression neben S1PR1 auch durch S1PR3 vermittelt wird (Lin *et al.*, 2007). Zudem beobachteten Keul *et al.* in einem Atherosklerose-Mausmodell, dass eine globale Deletion von S1PR3 zwar nicht zu einer

Reduktion der Plaquegröße jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Makrophagen in Plaques führt. Dieser Effekt war allerdings nicht nur auf den endothelialen S1PR3, sondern auch auf den von Makrophagen exprimierten S1PR3 zurückzuführen (Keul *et al.*, 2011). Die Beobachtung, dass die Expression von S1PR2 bzw. S1PR3 in der Vollwand mit Markern für Leukozyten (CD45) bzw. Makrophagen (CD68) in der Plaque korreliert, deutet auf die Möglichkeit hin, dass molekulare Veränderungen in der Vollwand gemessen werden könnten, bevor sich klinisch relevante atherosklerotische Plaques gebildet haben.

5.4 Limitationen

Diese Arbeit weist folgende Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten und als Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen dienen können:

Von den insgesamt 187 in die Studie aufgenommenen Probanden haben lediglich 28 Patienten (15 %) alle drei geplanten Nachsorgeuntersuchungen wahrgenommen, während 25 Patienten (13,4 %) zu keiner dieser Kontrollen erschienen. Ursächlich dafür könnte neben einer mangelnden Compliance auch der Beginn der globalen Pandemie durch SARS-CoV-2 (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*) gewesen sein. Aufgrund der geringen Anzahl von 24 Patienten, die den klinischen Endpunkt mit einem Restenosegrad von 3 oder 4 erreicht haben, der Unvollständigkeit der erhobenen Parameter durch das Fehlen von Gewebeproben sowie mangelnder Compliance der Patienten beim Wahrnehmen der Nachsorgeuntersuchungen, wurden keine statistischen Analysen des klinischen Endpunktes betreffend durchgeführt. Daher wurden die Patienten mithilfe der ermittelten Restenosegraden nach drei, sechs und zwölf Monaten in zwei Subgruppen unterteilt. Subgruppe Outcome 0 (n=106) enthielt alle Patienten, die keine messbare Restenose innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums aufwiesen. In die Subgruppe Outcome 1 (n=56) wurden alle Patienten eingeteilt, die innerhalb eines Jahres eine Restenose (1-4) entwickelten. Eine Limitation dieser Arbeit ist daher, dass durch die binäre Einteilung der Patienten keine Aussagen zu den potentiell zeitabhängigen Risikofaktoren oder Mechanismen der Restenosierung getroffen werden können. Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant, Studien so zu designen, dass im Falle einer Restenose der Mechanismus (Intimahyperplasie oder Neoatherosklerose) durch eine erneute Probenentnahme im Rahmen der Reintervention weiter untersucht werden kann.

Eine generelle Limitation von Studien, die quantitative Messungen der Genexpression verwenden, ist die mehrdeutige Interpretationsmöglichkeit der Ergebnisse. So kann eine divergierende Genexpression in Geweben nicht nur auf die Hoch- oder Herunterregulierung von Genen zurückzuführen sein, sondern auch auf die relativen Veränderungen von Zellpopulationen in den Gewebeproben durch Proliferation, Infiltration oder Zelltod.

Selbstverständlich kann auch nicht davon ausgegangen werden, dass die mRNA-Expression der Zielgene linear mit der tatsächlichen Proteinexpression oder deren Funktion korreliert. So sind beispielsweise nachfolgende Untersuchungen auf Proteinebene erforderlich, um Aussagen über Funktionen und Rolle der gemessenen Gene machen zu können. Zudem muss kritisch hinterfragt werden, wie spezifisch die ausgewählten Zellmarker tatsächlich sind.

6 Zusammenfassung

Atherosklerose ist eine komplexe Systemerkrankung arterieller Gefäße und manifestiert sich unter anderem klinisch als periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Obschon diverse endovaskuläre und offen-chirurgische Verfahren zur Revaskularisierung etabliert sind, ist die 1-Jahres-Restenoserate je nach Lokalisation und Verfahren zum Teil mit 20 bis 40 % sehr hoch. Das natürliche, bioaktive Sphingolipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) reguliert über die Bindung an spezifische S1P-Rezeptoren (S1PR) im Gefäßsystem sowohl physiologische als auch pathophysiologische Prozesse, die an der Entstehung von Atherosklerose sowie der Restenose beteiligt sind. Um ein besseres Verständnis für die Rolle von S1P und seinen Rezeptoren bei der Atherosklerose und Restenose zu gewinnen und mögliche Ansatzpunkte für eine verbesserte Nachsorge bei Hochrisikopatienten zu identifizieren, wurden im Rahmen einer prospektiven Kohortenstudie von 187 Patienten mit einer pAVK klinische Parameter (epidemiologische Daten, präoperative Medikation, Laborparameter und S1P-Blutkonzentration) erhoben und sofern möglich, Gewebeproben aus der Plaque und der benachbarten Arterienwand für Genexpressionsanalysen und histologische Untersuchungen gewonnen. Nach den Eingriffen wurden die Patienten über einen Zeitraum von zwölf Monaten mittels farbkodierter Dopplersonographie mehrmals nachuntersucht, um Restenosen zu erfassen. Die laborchemischen Untersuchungen ergaben, dass Patienten mit einer Restenose in Nachsorgeuntersuchungen präoperativ signifikant höhere Blutkonzentrationen an Triglyzeriden, Gesamt- oder LDL-Cholesterin aufwiesen. Zudem zeigte sich für Patienten, deren Gesamt- oder LDL-Cholesterinwerte oberhalb des Normbereichs lagen, im Vergleich zu Patienten mit Werten im Normalbereich eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Restenose. Die Genexpressionsanalysen von Gewebeproben aus der Arterienwand zeigten bei Patienten mit einer Restenose geringere Expressionswerte von S1PR1 und dem Endothelmarker CD31. Eine Aktivierung von S1PR1 stärkt die vaskuläre Integrität, fördert die Re-Endothelialisierung der Gefäßwand und könnte damit einer Intimahyperplasie sowie einer Neoatherosklerose als Ursachen einer Restenose entgegenwirken. Interessanterweise wurden bei Patienten mit präoperativer Statineinnahme signifikant höhere Genexpressionswerte von S1PR1, S1PR3 sowie CD31 gemessen. Dieser Zusammenhang zwischen Statineinnahme und S1PR-Expression wurde bisher nur in Mausmodellen beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen damit den Schluss zu, dass S1PR1 durch seine positiven Effekte auf das Endothel eine Restenose inhibiert und dass Statine neben ihrer Cholesterinsenkenden Wirkung die Restenose auch durch eine Stimulierung der S1PR1 Expression vermindern kann.

7 Summary

The leading cause of death in Germany are cardiovascular diseases, where atherosclerosis plays an important role. Atherosclerosis is a complex systemic disease of arterial vessels and depending which vessels are most severely concerned, causes many diseases including peripheral artery disease (PAD). Although various endovascular and open surgical procedures for revascularisation are established, the 1-year restenosis rate is currently very high at up to 20-40 %, depending on the localisation and procedure. The natural, bioactive sphingolipid sphingosine-1-phosphate (S1P) regulates both physiological and pathophysiological processes in the vasculature - including the development of atherosclerosis as well as restenosis - via binding to specific S1P receptors (S1PR). In order to gain a better understanding of the role of S1P and its receptors in atherosclerosis and restenosis and to identify possible strategies for improved follow-up in high-risk patients, the prospective cohort study collected clinical parameters (epidemiological data, preoperative medication, laboratory parameters and S1P blood levels) from 187 patients with PAD. Where possible, human tissue samples obtained during the revascularisation procedure were also collected and subjected to gene expression analyses and histological examinations. After surgery, patients were examined multiple times over a 12-month period using color-coded Doppler ultrasonography to detect restenosis. Blood analyses showed that patients with a measurable restenosis within the 12-month observation period preoperatively had significantly higher blood concentrations of triglycerides, total cholesterol or LDL-cholesterol. In addition, patients with total or LDL-cholesterol concentrations above reference levels were shown to suffer restenosis with higher probability compared to patients with normal total or LDL-cholesterol concentrations. Gene expression analyses of tissue samples taken from the surrounding area of the plaques showed lower expression levels of S1PR1 and CD31 in patients with measurable restenosis. Both S1PR1 and CD31 are highly expressed in endothelial cells and activation of S1PR1 may counteract intimal hyperplasia and neoatherosclerosis as mechanisms of restenosis by promoting re-endothelialization, endothelial survival and strengthening the vascular barrier. Interestingly, significantly higher gene expression levels of S1PR1, S1PR3 and CD31 were measured in patients who took statins preoperatively. Such association between statin intake and S1PR expression has previously only been observed in mice. The results reported in this thesis thus suggest that S1PR1 may inhibit restenosis by its beneficial effects on endothelial integrity and that statins prevent restenosis not only by lowering cholesterol levels but also by stimulating S1PR1 expression.

8 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ABI	Knöchel-Arm-Index (engl. ankle brachial index)
AC	Adenylylcyclase
ACE-Hemmer	Angiotensinkonversionsenzym-Hemmer
ApoE	Apolipoprotein E
ApoM	Apolipoprotein M
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
Ca ²⁺	zweifach positiv geladenes Kalziumion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD31	Cluster of Differentiation 31
CD45	Cluster of Differentiation 45
CD68	Cluster of Differentiation 68
cDNA	complementary DNA
CI	Claudicatio intermittens
CoA	Coenzym A
CRP	c-reaktives Protein
CSE-Hemmer	Cholesterinsyntheseenzymhemmer
C _T	cycle-threshold
CTA	computertomographische Angiographie
dL	Deziliter
DM2	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DSA	digitale Subtraktionsangiographie
EDG-1	Endothelial Differentiation Gene-1
eNOS	endothelialen NO-Synthase
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EvG-Färbung	Elastica-van-Gieson-Färbung
EZ	Endothelzelle
FAM19A5	Family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like) member A5
FKDS	farbkodierte Duplexsonographie
FTY720	Fingolimod, Handelsname Gilenya
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMZ	glatte Muskelzelle
GTPase	Guanosintriphosphatase
HbA1c	Hämoglobin A1c
HDL	High-Density-Lipoprotein
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl
HUPAECS	Human pulmonary artery endothelial cells

HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
IH	Intimahyperplasie
KHK	koronare Herzkrankheit
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry
LDL	Low-Density-Lipoprotein
log2	binärer Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MRA	Magnetresonanzangiographie
mRNA	messenger ribonucleic acid
Myh11	Myosin-11
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOAK	neue orale Antikoaganzien
ns	nicht signifikant
P	Plaque
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet Derived Growth Factors
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonukleasen
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SGPP	S1P-Phosphatasen
siRNA	Small interfering RNA
SPGL1	S1P-Lyase 1
SPHK	Sphingosinkinase
SPNS2	Spinster 2
TEA	Thrombendarteriektomie
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein
W	Vollwand

9 Literaturverzeichnis

- ABBRUZZESE, T. A., HAVENS, J., BELKIN, M., DONALDSON, M. C., WHITTEMORE, A. D., LIAO, J. K. & CONTE, M. S. 2004. Statin therapy is associated with improved patency of autogenous infrainguinal bypass grafts. *Journal of vascular surgery*, 39, 1178-1185.
- ADAMS, G. L., BERSIN, R., GEORGE, J., SUBRAMANIANM, V. & SOUKAS, P. 2015. Data-driven treatment approach to in-stent restenosis. *Endovasc Today*, 6, 3-8.
- ALLENDE, M. L., YAMASHITA, T. & PROIA, R. L. 2003. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*, 102, 3665-7.
- ALTIN, J. G. & SLOAN, E. K. 1997. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol*, 75, 430-45.
- ANITSCHKOW, N. 1924. Zur Ätiologie der Atherosklerose. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 249, 73-82.
- ARAI, F., MIYAMOTO, T., OHNEDA, O., INADA, T., SUDO, T., BRASEL, K., MIYATA, T., ANDERSON, D. M. & SUDA, T. 1999. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med*, 190, 1741-54.
- BILLICH, A., BORNANCIN, F., DÉVAY, P., MECHTCHERIAKOVA, D., URTZ, N. & BAUMRUKER, T. 2003. Phosphorylation of the Immunomodulatory Drug FTY720 by Sphingosine Kinases*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 47408-47415.
- BLAHO, V. A. & HLA, T. 2011. Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors. *Chem Rev*, 111, 6299-320.
- BÖCKER, W., DENK, H., HEITZ, P. U., MOCH, H., HÖFLER, G. & KREIPE, H. 2019. Gefäße - Pathologie. Kapitel 20, S. 403-422. *Lehrbuch Pathologie*. 5. Auflage. Elsevier Health Sciences. München.
- BRAETZ, J., BECKER, A., GEISSEN, M., LARENA-AVELLANEDA, A., SCHREPFER, S. & DAUM, G. 2018. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 regulates neointimal growth in a humanized model for restenosis. *J Vasc Surg*, 68, 201s-207s.
- BREVETTI, G., GIUGLIANO, G., BREVETTI, L. & HIATT, W. R. 2010. Inflammation in Peripheral Artery Disease. *Circulation*, 122, 1862-1875.
- BRINKMANN, V., DAVIS, M. D., HEISE, C. E., ALBERT, R., COTTENS, S., HOF, R., BRUNS, C., PRIESCHL, E., BAUMRUKER, T., HIESTAND, P., FOSTER, C. A., ZOLLINGER, M. & LYNCH, K. R. 2002. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem*, 277, 21453-7.
- BRODMANN, M. & DE CARLO, M. 2017. Treatment of Peripheral Arteriopathy in Women. In: PRESBITERO, P., MEHILLI, J. & PETRONIO, A. S. (eds.) *Percutaneous Treatment of Cardiovascular Diseases in Women*. Cham: Springer International Publishing.
- BUJA, L. M. 2020. Innovators in atherosclerosis research: A historical review. *International Journal of Cardiology*, 307, 8-14.
- CANNAVO, A., LICCARDO, D., KOMICI, K., CORBI, G., DE LUCIA, C., FEMMINELLA, G. D., ELIA, A., BENCIVENGA, L., FERRARA, N., KOCH, W. J., PAOLOCCI, N. & RENGO, G. 2017. Sphingosine Kinases and Sphingosine 1-Phosphate Receptors: Signaling and Actions in the Cardiovascular System. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 556.
- CANTALUPO, A., GARGIULO, A., DAUTAJ, E., LIU, C., ZHANG, Y., HLA, T. & LORENZO, A. D. 2017. S1PR1 (Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1) Signaling Regulates Blood Flow and Pressure. *Hypertension*, 70, 426-434.
- CARSTAIRS, K. C. 1965. The identification of platelets and platelet antigens in histological sections. *J Pathol Bacteriol*, 90, 225-31.
- CHAKRABORTY, R., SADDOUK, F. Z., CARRAO, A. C., KRAUSE, D. S., GREIF, D. M. & MARTIN, K. A. 2019. Promoters to Study Vascular Smooth Muscle. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 39, 603-612.

- CHATZIZISIS, Y. S., COSKUN, A. U., JONAS, M., EDELMAN, E. R., FELDMAN, C. L. & STONE, P. H. 2007. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular and vascular behavior. *Journal of the American College of Cardiology*, 49, 2379-2393.
- CHEANVECHAI, V., HARTHUN, N. L., GRAHAM, L. M., FREISCHLAG, J. A. & GAHTAN, V. 2004. Incidence of peripheral vascular disease in women: is it different from that in men? *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 127, 314-317.
- CHISTIYAKOV, D. A., KILLINGSWORTH, M. C., MYASOEDOVA, V. A., OREKHOV, A. N. & BOBRYSEV, Y. V. 2017. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*, 97, 4-13.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1, 581-5.
- CHRISTOFFERSEN, C., OBINATA, H., KUMARASWAMY, S. B., GALVANI, S., AHNSTRÖM, J., SEVVANA, M., EGERER-SIEBER, C., MULLER, Y. A., HLA, T., NIELSEN, L. B. & DAHLBÄCK, B. 2011. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 9613-9618.
- COHAN, S., LUCASSEN, E., SMOOT, K., BRINK, J. & CHEN, C. 2020. Sphingosine-1-Phosphate: Its Pharmacological Regulation and the Treatment of Multiple Sclerosis: A Review Article. *Biomedicines*, 8.
- COJOCARU, E., TRANDAFIRESCU, M., LEON, M., COTUTIU, C. & FOIA, L. 2012. Immunohistochemical expression of anti-CD68 antibody in atherosclerotic plaque. *Rom J Morphol Embryol*, 53, 61-66.
- COSSMAN, D., CALLOW, A. D., STEIN, A. & MATSUMOTO, G. 1978. Early Restenosis After Carotid Endarterectomy. *Archives of Surgery*, 113, 275-278.
- CRIQUI, M. H. & ABOYANS, V. 2015. Epidemiology of Peripheral Artery Disease. *Circulation Research*, 116, 1509-1526.
- CUVILLIER, O., PIRIANOV, G., KLEUSER, B., VANEK, P. G., COSO, O. A., GUTKIND, J. S. & SPIEGEL, S. 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381, 800-803.
- DASKALOPOULOU, S. S., PATHMARAJAH, M., KAKKOS, S. K., DASKALOPOULOS, M. E., HOLLOWAY, P., MIKHAILIDIS, D. P., MAYO, N. E. & GEROULAKOS, G. 2008. Association between ankle-brachial index and risk factor profile in patients newly diagnosed with intermittent claudication. *Circ J*, 72, 441-8.
- DAUM, G. 2018. Sphingosin-1-phosphat und die Hoffnung auf neue Therapieansätze in der Gefäßmedizin. *Gefäßchirurgie*, 23, 375-377.
- DAUM, G., GRABSKI, A. & REIDY, M. A. 2009. Sphingosine 1-Phosphate. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29, 1439-1443.
- DAUM, G., WINKLER, M., MORITZ, E., MÜLLER, T., GEFFKEN, M., VON LUCADOU, M., HADDAD, M., PEINE, S., BÖGER, R. H., LARENA-AVELLANEDA, A., DEBUS, E. S., GRÄLER, M. & SCHWEDHELM, E. 2020. Determinants of Serum- and Plasma Sphingosine-1-Phosphate Concentrations in a Healthy Study Group. *TH Open*, 4, e12-e19.
- DAVAINE, J. M., AZÉMA, L., GUYOMARCH, B., CHAILLOU, P., COSTARGENT, A., PATRA, P., LAMBERT, G. & GOUËFFIC, Y. 2012. One-year Clinical Outcome after Primary Stenting for Trans-Atlantic Inter-Society Consensus (TASC) C and D Femoropopliteal Lesions (The STELLA "STenting Long de L'Artère fémorale superficielle" Cohort). *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 44, 432-441.
- DAVIES, M. J., GORDON, J., GEARING, A., PIGOTT, R., WOOLF, N., KATZ, D. & KYRIAKOPOULOS, A. 1993. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *The Journal of pathology*, 171, 223-229.

- DEBUS, E. S. & GROSS-FENGELS, W. 2020a. Endoluminale Therapie in der Gefäßmedizin. In: DEBUS, E. S. & GROSS-FENGELS, W. (eds.) *Operative und interventionelle Gefäßmedizin*. S. 261-268. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- DEBUS, E. S. & GROSS-FENGELS, W. 2020b. Offene gefäßchirurgische Rekonstruktionsverfahren. In: DEBUS, E. S. & GROSS-FENGELS, W. (eds.) *Operative und interventionelle Gefäßmedizin*. S. 255-260. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- DERKSEN, W. J., DE VRIES, J.-P. P., VINK, A., VELEMA, E., VOS, J.-A., DE KLEIJN, D., MOLL, F. L. & PASTERKAMP, G. 2010. Histologic atherosclerotic plaque characteristics are associated with restenosis rates after endarterectomy of the common and superficial femoral arteries. *Journal of vascular surgery*, 52, 592-599.
- DEUTSCHMAN, D. H., CARSTENS, J. S., KLEPPER, R. L., SMITH, W. S., PAGE, M. T., YOUNG, T. R., GLEASON, L. A., NAKAJIMA, N. & SABBADINI, R. A. 2003. Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate. *American heart journal*, 146, 62-68.
- DIAZ-RODRIGUEZ, S., RASSER, C., MESNIER, J., CHEVALLIER, P., GALLET, R., CHOQUEUX, C., EVEN, G., SAYAH, N., CHAUBET, F. & NICOLETTI, A. 2021. Coronary stent CD31-mimetic coating favours endothelialization and reduces local inflammation and neointimal development in vivo. *European Heart Journal*, 42, 1760-1769.
- DIEHM, C., ALLENBERG, J. R., PITTRROW, D., MAHN, M., TEPOHL, G., HABERL, R. L., DARIUS, H., BURGHAUS, I. & TRAMPISCH, H. J. 2009. Mortality and vascular morbidity in older adults with asymptomatic versus symptomatic peripheral artery disease. *Circulation*, 120, 2053-61.
- DIEHM, C., SCHUSTER, A., ALLENBERG, J. R., DARIUS, H., HABERL, R., LANGE, S., PITTRROW, D., VON STRITZKY, B., TEPOHL, G. & TRAMPISCH, H.-J. 2004. High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis*, 172, 95-105.
- DIHLMANN, S., PETERS, A. S. & HAKIMI, M. 2019. Entstehung der Arteriosklerose. *Gefäßchirurgie*, 24, 195-207.
- DROUILLARD, A., NEYRA, A., MATHIEU, A.-L., MARÇAIS, A., WENCKER, M., MARVEL, J., BELOT, A. & WALZER, T. 2018. Human naive and memory T cells display opposite migratory responses to sphingosine-1 phosphate. *The Journal of Immunology*, 200, 551-557.
- DU, J., ZENG, C., LI, Q., CHEN, B., LIU, H., HUANG, X. & HUANG, Q. 2012. LPS and TNF- α induce expression of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in human microvascular endothelial cells. *Pathology-Research and Practice*, 208, 82-88.
- DU, W., TAKUWA, N., YOSHIOKA, K., OKAMOTO, Y., GONDA, K., SUGIHARA, K., FUKAMIZU, A., ASANO, M. & TAKUWA, Y. 2010. S1P2, the G Protein-Coupled Receptor for Sphingosine-1-Phosphate, Negatively Regulates Tumor Angiogenesis and Tumor Growth In vivo in Mice. Inhibition of Tumor Angiogenesis by S1P2. *Cancer research*, 70, 772-781.
- EGHRARI, N. B., WENDT, T. S. & GONZALES, R. J. 2022. Differential Expression Profile of Sphingosine-1-Phosphate Receptors in Human Brain Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells Following Hypoxia Plus Glucose Deprivation. *The FASEB Journal*, 36.
- ERB, W. 1911. Klinische Beiträge zur Pathologie des Intermittierenden Hinkens. *Munch Med Wochenschr*, 2, 2487.
- ESPINOLA-KLEIN, C., RUPPRECHT, H.-J., BLANKENBERG, S., BICKEL, C., PETH, S., KOPP, H., VICTOR, A., HAFNER, G. & MEYER, J. 2002. Manifestationen der Atherosklerose in verschiedenen Gefäßregionen - Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich Epidemiologie, Ätiologie und Prognose. *Medizinische Klinik*, 97, 221-228.

- FARBER, A., MENARD, M. T., CONTE, M. S., KAUFMAN, J. A., POWELL, R. J., CHOUDHRY, N. K., HAMZA, T. H., ASSMANN, S. F., CREAGER, M. A., CZIRAKY, M. J., DAKE, M. D., JAFF, M. R., REID, D., SIAMI, F. S., SOPKO, G., WHITE, C. J., VAN OVER, M., STRONG, M. B., VILLARREAL, M. F., MCKEAN, M., AZENE, E., AZARBAL, A., BARLEBEN, A., CHEW, D. K., CLAVIJO, L. C., DOUVILLE, Y., FINDEISS, L., GARG, N., GASPER, W., GILES, K. A., GOODNEY, P. P., HAWKINS, B. M., HERMAN, C. R., KALISH, J. A., KOOPMANN, M. C., LASKOWSKI, I. A., MENA-HURTADO, C., MOTAGANAHALLI, R., ROWE, V. L., SCHANZER, A., SCHNEIDER, P. A., SIRACUSE, J. J., VENERMO, M. & ROSENFELD, K. 2022. Surgery or Endovascular Therapy for Chronic Limb-Threatening Ischemia. *New England Journal of Medicine*, 387, 2305-2316.
- FEIL, S., FEHRENBACHER, B., LUKOWSKI, R., ESSMANN, F., SCHULZE-OSTHOFF, K., SCHALLER, M. & FEIL, R. 2014. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circulation research*, 115, 662-667.
- FEUERBORN, R., BESSER, M., POTI, F., BURKHARDT, R., WEISSE-PLENZ, G., CEGLAREK, U., SIMONI, M., PROIA, R. L., FREISE, H. & NOFER, J.-R. 2018. Elevating endogenous Sphingosine-1-phosphate (S1P) levels improves endothelial function and ameliorates atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient (LDL-R^{-/-}) mice. *Thrombosis and haemostasis*, 118, 1470-1480.
- FINN, A. V., NAKANO, M., NARULA, J., KOLODZIE, F. D. & VIRMANI, R. 2010. Concept of Vulnerable/Unstable Plaque. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30, 1282-1292.
- FOWKES, F. G. R., RUDAN, D., RUDAN, I., ABOYANS, V., DENENBERG, J. O., MCDERMOTT, M. M., NORMAN, P. E., SAMPSON, U. K. A., WILLIAMS, L. J., MENSAH, G. A. & CRIQUI, M. H. 2013. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet*, 382, 1329-1340.
- FRANK, U., NIKOL, S., BELCH, J., BOC, V., BRODMANN, M., CARPENTIER, P. H., CHRAIM, A., CANNING, C., DIMAKAKOS, E., GOTTSÄTER, A., HEISS, C., MAZZOLAI, L., MADARIC, J., OLINIC, D. M., PÉCSVÁRADY, Z., POREDOŠ, P., QUÉRÉ, I., ROZTOCIL, K., STANEK, A., VASIC, D., VISONÀ, A., WAUTRECHT, J.-C., BULVAS, M., COLGAN, M.-P., DORIGO, W., HOUSTON, G., KAHAN, T., LAWALL, H., LINDSTEDT, I., MAHE, G., MARTINI, R., PERNOD, G., PRZYWARA, S., RIGHINI, M., SCHLAGER, O. & TERLECKI, P. 2019. ESVM Guideline on peripheral arterial disease. *Vasa*, 48, 1-79.
- GABRIELLI, R., ROSATI, M. S., VITALE, S., BACIARELLO, G., SIANI, A., CHIAPPA, R., CASELLI, G. & IRACE, L. 2012. Randomized controlled trial of remote endarterectomy versus endovascular intervention for TransAtlantic Inter-Society Consensus II D femoropopliteal lesions. *Journal of Vascular Surgery*, 56, 1598-1605.
- GALAL, W., VAN GESTEL, Y. R., HOEKS, S. E., SIN, D. D., WINKEL, T. A., BAX, J. J., VERHAGEN, H., AWARA, A. M., KLEIN, J. & VAN DOMBURG, R. T. 2008. The obesity paradox in patients with peripheral arterial disease. *Chest*, 134, 925-930.
- GALKINA, E. & LEY, K. 2007. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27, 2292-2301.
- GARCIA, J. G., LIU, F., VERIN, A. D., BIRUKOVA, A., DECHERT, M. A., GERTHOFFER, W. T., BAMBERG, J. R. & ENGLISH, D. 2001. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest*, 108, 689-701.
- GARY, T., RIEF, P., STOJAKOVIC, T., FROEHLICH, H., SCHARNAGL, H., HAFNER, F., PILGER, E. & BRODMANN, M. 2011. Lipoproteins and the Development of Restenosis After Stent Implantation in the Superficial Femoral Artery in Patients with Peripheral Artery Disease. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 34, 739-743.
- GEBAUER, K., WINTERSOHL, K., KRASKA, R., KORTENDICK, K., FAHRLAND, U., FREISINGER, E., MEYBORG, M., STELLA, J., ENGELBERTZ, C., REINECKE, H. & MALYAR, N. 2021. Medikamentöse Sekundärprävention bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit. *Herz*, 46, 280-286.

- GIOVANETTI, F., GARGIULO, M., LAGHI, L., D'ADDATO, S., MAIOLI, F., MUCCINI, N., BORGHI, C. & STELLA, A. 2009. Lipoprotein (a) and other serum lipid subfractions influencing primary patency after infrainguinal percutaneous transluminal angioplasty. *Journal of Endovascular Therapy*, 16, 389-396.
- GRABSKI, A. D., SHIMIZU, T., DEOU, J., MAHONEY, W. M., JR., REIDY, M. A. & DAUM, G. 2009. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 regulates expression of smooth muscle alpha-actin after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 1644-50.
- GREWE, J. M., KNAPSTEIN, P.-R., DONAT, A., JIANG, S., SMIT, D. J., XIE, W. & KELLER, J. 2022. The role of sphingosine-1-phosphate in bone remodeling and osteoporosis. *Bone Research*, 10, 34.
- HACKAM, D. G. & VYAS, M. V. 2018. Utilization of Vasculoprotective Therapy for Peripheral Artery Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, 131, 1332-1339.e3.
- HELLINGS, W. E., MOLL, F. L., DE VRIES, J.-P. P., ACKERSTAFF, R. G., SELDENRIJK, K. A., MET, R., VELEMA, E., DERKSEN, W. J., DE KLEIJN, D. P. & PASTERKAMP, G. 2008. Atherosclerotic plaque composition and occurrence of restenosis after carotid endarterectomy. *Jama*, 299, 547-554.
- HEMMINGS, D. G. 2006. Signal transduction underlying the vascular effects of sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 373, 18-29.
- HERMANN, H. J. 2009. Adipositas und Gefäßchirurgie. *Gefäßchirurgie*, 14, 478.
- HESS, C. N., NORGRÉN, L., ANSEL, G. M., CAPELL, W. H., FLETCHER, J. P., FOWKES, F. G. R., GOTTSÄTER, A., HITOS, K., JAFF, M. R., NORDANSTIG, J. & HIATT, W. R. 2017. A Structured Review of Antithrombotic Therapy in Peripheral Artery Disease With a Focus on Revascularization: A TASC (InterSociety Consensus for the Management of Peripheral Artery Disease) Initiative. *Circulation*, 135, 2534-2555.
- HLA, T., VENKATARAMAN, K. & MICHAUD, J. 2008. The vascular S1P gradient—Cellular sources and biological significance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781, 477-482.
- HOBSON, J. P., ROSENFELDT, H. M., BARAK, L. S., OLIVERA, A., POULTON, S., CARON, M. G., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. 2001. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*, 291, 1800-3.
- HUANG, B.-T., PENG, Y., HUANG, F.-Y., XIA, T.-L., GUI, Y.-Y., LIAO, Y.-B., PU, X.-B., CHEN, S.-J., YANG, Y. & CHEN, M. 2017. Trends in prescribing rate of statins at discharge and modifiable factors in patients with atherosclerotic cardiovascular disease. *Internal and Emergency Medicine*, 12, 1121-1129.
- IGARASHI, J. & MICHEL, T. 2000. Agonist-modulated targeting of the EDG-1 receptor to plasmalemmal caveolae: eNOS activation by sphingosine 1-phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 32363-32370.
- IGARASHI, J., MIYOSHI, M., HASHIMOTO, T., KUBOTA, Y. & KOSAKA, H. 2007. Statins induce S1P1 receptors and enhance endothelial nitric oxide production in response to high-density lipoproteins. *British journal of pharmacology*, 150, 470-479.
- INOUE, S., NAKAZAWA, T., CHO, A., DAVASTAN, F., SHILLING, D., DAUM, G. & REIDY, M. 2007. Regulation of arterial lesions in mice depends on differential smooth muscle cell migration: a role for sphingosine-1-phosphate receptors. *Journal of vascular surgery*, 46, 756-763.
- INSULL, W., JR. 2009. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *The American Journal of Medicine*, 122, S3-S14.
- ISHII, M., EGEN, J. G., KLAUSCHEN, F., MEIER-SCHELLERSHEIM, M., SAEKI, Y., VACHER, J., PROIA, R. L. & GERMAIN, R. N. 2009. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, 458, 524-528.
- ISHII, T., SHIMAZU, Y., NISHIYAMA, I., KIKUTA, J. & ISHII, M. 2011. The role of sphingosine 1-phosphate in migration of osteoclast precursors; an application of intravital two-photon microscopy. *Mol Cells*, 31, 399-403.

- ITO, K., ANADA, Y., TANI, M., IKEDA, M., SANNO, T., KIHARA, A. & IGARASHI, Y. 2007. Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 357, 212-217.
- JIANG, H., SHEN, S. M., YIN, J., ZHANG, P. P. & SHI, Y. 2017. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1PR1) agonist CYM5442 inhibits expression of intracellular adhesion molecule 1 (ICAM1) in endothelial cells infected with influenza A viruses. *PLoS One*, 12, e0175188.
- JING, X.-D., WEI, X.-M., DENG, S.-B., DU, J.-L., LIU, Y.-J. & SHE, Q. 2015. The relationship between the high-density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine-1-phosphate (S1P) and coronary in-stent restenosis. *Clinica Chimica Acta*, 446, 248-252.
- JO, E., SANNA, M. G., GONZALEZ-CABRERA, P. J., THANGADA, S., TIGYI, G., OSBORNE, D. A., HLA, T., PARRILL, A. L. & ROSEN, H. 2005. S1P1-Selective In Vivo-Active Agonists from High- Throughput Screening: Off-the-Shelf Chemical Probes of Receptor Interactions, Signaling, and Fate. *Chemistry & Biology*, 12, 703-715.
- JOSIPOVIC, I., PFLÜGER, B., FORK, C., VASCONEZ, A. E., OO, J. A., HITZEL, J., SEREDINSKI, S., GAMEN, E., HERINGDORF, D. M. Z., CHEN, W., LOOSO, M., PULLAMSETTI, S. S., BRANDES, R. P. & LEISEGANG, M. S. 2018. Long noncoding RNA LISPR1 is required for S1P signaling and endothelial cell function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 116, 57-68.
- JUNG, B., OBINATA, H., GALVANI, S., MENDELSON, K., DING, B. S., SKOURA, A., KINZEL, B., BRINKMANN, V., RAFII, S., EVANS, T. & HLA, T. 2012. Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Dev Cell*, 23, 600-10.
- KAPPOS, L., ANTEL, J., COMI, G., MONTALBAN, X., O'CONNOR, P., POLMAN, C. H., HAAS, T., KORN, A. A., KARLSSON, G. & RADUE, E. W. 2006. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 355, 1124-40.
- KERAGE, D., BRINDLEY, D. N. & HEMMING, D. G. 2014. Review: novel insights into the regulation of vascular tone by sphingosine 1-phosphate. *Placenta*, 35 Suppl, S86-92.
- KEUL, P., LUCKE, S., VON WNUCK LIPINSKI, K., BODE, C., GRÄLER, M., HEUSCH, G. & LEVKAU, B. 2011. Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3 Promotes Recruitment of Monocyte/Macrophages in Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation Research*, 108, 314-323.
- KEUL, P., TÖLLE, M., LUCKE, S., VON WNUCK LIPINSKI, K., HEUSCH, G., SCHUCHARDT, M., VAN DER GIET, M. & LEVKAU, B. 2007. The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 607-13.
- KIM, G. S., YANG, L., ZHANG, G., ZHAO, H., SELIM, M., MCCULLOUGH, L. D., KLUK, M. J. & SANCHEZ, T. 2015. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in the disruption of cerebrovascular integrity in experimental stroke. *Nature Communications*, 6, 7893.
- KIMURA, T., TOMURA, H., MOGI, C., KUWABARA, A., DAMIRIN, A., ISHIZUKA, T., SEKIGUCHI, A., ISHIWARA, M., IM, D. S., SATO, K., MURAKAMI, M. & OKAJIMA, F. 2006. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem*, 281, 37457-67.
- KIMURA, T., WATANABE, T., SATO, K., KON, J., TOMURA, H., TAMAMA, K., KUWABARA, A., KANDA, T., KOBAYASHI, I., OHTA, H., UI, M. & OKAJIMA, F. 2000. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J*, 348 Pt 1, 71-6.
- KITANO, T., USUI, S., TAKASHIMA, S. I., INOUE, O., GOTEN, C., NOMURA, A., YOSHIOKA, K., OKAJIMA, M., KANEKO, S., TAKUWA, Y. & TAKAMURA, M. 2019. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 promotes neointimal hyperplasia in a mouse model of carotid artery injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 511, 179-184.
- KLUK, M. J. & HLA, T. 2001. Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res*, 89, 496-502.

- KONO, M., BELYANTSEVA, I. A., SKOURA, A., FROLENKOV, G. I., STAROST, M. F., DREIER, J. L., LIDINGTON, D., BOLZ, S.-S., FRIEDMAN, T. B. & HLA, T. 2007. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 10690-10696.
- KONO, M., MI, Y., LIU, Y., SASAKI, T., ALLENDE, M. L., WU, Y.-P., YAMASHITA, T. & PROIA, R. L. 2004. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 29367-29373.
- KOTZ, D., BATRA, A. & KASTAUN, S. 2020. Rauchstoppversuche und genutzte Entwöhnungsmethoden. *Dtsch Arztebl* 117 (1–2), 7-13.
- KRISHNAN, P., TARRICONE, A., PURUSHOTTAM, B., CHEN, S., KAPUR, V., GUJJA, K., KINI, A. & SHARMA, S. 2020. Gender differences in the outcomes of drug-coated balloon treatment in symptomatic femoropopliteal arterial disease. *Vascular and Endovascular Surgery*, 54, 348-354.
- KUCHENBECKER, J., PETERS, F., KREUTZBURG, T., MARSCHALL, U., L'HOEST, H. & BEHRENDT, C.-A. 2023. The relationship between hospital procedure volume and outcomes after endovascular or open surgical revascularisation for peripheral arterial disease: an analysis of health insurance claims data. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 65, 370-378.
- KUHLMANN, I., CHIN, D. & RIMBACH, G. 2014. Risikofaktoren. *Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen und Atherosklerose*. S. 20-21. 1. Auflage. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- KURANO, M. & YATOMI, Y. 2018. Sphingosine 1-Phosphate and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 25, 16-26.
- KURODA, K., OTAKE, H., SHINOHARA, M., KURODA, M., TSUDA, S., TOBA, T., NAGANO, Y., TOH, R., ISHIDA, T. & SHINKE, T. 2019. Effect of rosuvastatin and eicosapentaenoic acid on neoatherosclerosis: The LINK-IT Trial. *EuroIntervention*, 15, e1099-e1106.
- KWON, Y.-G., MIN, J.-K., KIM, K.-M., LEE, D.-J., BILLIAR, T. R. & KIM, Y.-M. 2001. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 10627-10633.
- LADAK, S. S., McQUEEN, L. W., LAYTON, G. R., AUJLA, H., ADEBAYO, A., ZAKKAR, M. 2022. The Role of Endothelial Cells in the Onset, Development and Modulation of Vein Graft Disease. *Cells*, 11(19), 3066.
- LAL, B., BEACH, K. & ROUBIN, G. 2013. Restenosis After Carotid Artery Stenting and Endarterectomy: A Secondary Analysis of CREST: A Randomised Controlled Trial. *Journal of Vascular Surgery*, 58, 278.
- LANG, G. 2012. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. S. 169-250. 2. Auflage. Wien: Springer Vienna.
- LARENA-AVELLANEDA, A. & FRANKE, S. 2004. Die Intimahyperplasie—Bedeutung für den Gefäßchirurgen und therapeutische Möglichkeiten. *Gefässchirurgie*, 9, 89-95.
- LAU, G. T., RIDLEY, L. J., BANNON, P. G., FREEDMAN, S. B., BRIEGER, D. B., SULLIVAN, D., WONG, L. A. & KRITHARIDES, L. 2006. Hypertriglyceridaemia is associated with early non-patency of coronary bypass grafts. *Heart*, 92, 536-538.
- LAWALL, H., DIEHM, C., HOFFMANN, U. & REINECKE, H. 2015a. Periphere arterielle Verschlusskrankheit: Epidemiologie, Komorbidität und Prognose. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 140, 1798-1802.
- LAWALL, H., HUPPERT, P., RÜMENAPF, G., ESPINOLA-KLEIN, C., TRAMPISCH, H.-J., TACKE, J., STIEGLER, H., CREUTZIG, A., DOHMEN, A., SCHULTE, K.-L., FALK, J., LUEDEMANN, C., SCHIMDT-TRUCKSÄSS, A. & PLOENES, C. 2015b. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. AWMF-Register Nr. 065/003 Entwicklungsstufe 3. Stand: 30.11.2015 (in Überarbeitung); Abrufbar unter: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/065-003.html>.

- LEE, M. J., VAN BROCKLYN, J. R., THANGADA, S., LIU, C. H., HAND, A. R., MENZELEE, R., SPIEGEL, S. & HLA, T. 1998. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science*, 279, 1552-5.
- LEE, O.-H., KIM, Y.-M., LEE, Y. M., MOON, E.-J., LEE, D.-J., KIM, J.-H., KIM, K.-W. & KWON, Y.-G. 1999. Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 264, 743-750.
- LERTKIATMONGKOL, P., LIAO, D., MEI, H., HU, Y. & NEWMAN, P. J. 2016. Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Current opinion in hematology*, 23, 253.
- LEVKAU, B. 2015. HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications. *Frontiers in Pharmacology*, 6.
- LIBBY, P. 2021. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*, 592, 524-533.
- LIEN, Y. H. H., YONG, K. C., CHO, C., IGARASHI, S. & LAI, L. W. 2006. S1P1-selective agonist, SEW2871, ameliorates ischemic acute renal failure. *Kidney International*, 69, 1601-1608.
- LIN, C.-I., CHEN, C.-N., LIN, P.-W. & LEE, H. 2007. Sphingosine 1-phosphate regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through S1P1 and S1P3. *Biochemical and biophysical research communications*, 355, 895-901.
- LIPPI, G., VERALDI, G. F., DORUCCI, V., DUSI, R., RUZZENENTE, O., BRENTGANI, C., GUIDI, G. & CORDIANO, C. 1998. Usefulness of lipids, lipoprotein(a) and fibrinogen measurements in identifying subjects at risk of occlusive complications following vascular and endovascular surgery. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 58, 497-504.
- LIU, L. & SHI, G.-P. 2012. CD31: beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 94, 3-5.
- LIU, Y. 2017. Relationship of serum S1P and HC-II levels with vasoactive substances and cytokines in patients with cerebral vascular restenosis after stent implantation. *J Hainan Medical University*, 23, 966-72.
- LIU, Y., WADA, R., YAMASHITA, T., MI, Y., DENG, C. X., HOBSON, J. P., ROSENFELDT, H. M., NAVA, V. E., CHAE, S. S., LEE, M. J., LIU, C. H., HLA, T., SPIEGEL, S. & PROIA, R. L. 2000. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*, 106, 951-61.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25, 402-408.
- LORENZ, J. N., AREND, L. J., ROBITZ, R., PAUL, R. J. & MACLENNAN, A. J. 2007. Vascular dysfunction in S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292, R440-6.
- LUDHWANI, D. & WU, J. 2019. Obesity Paradox in Peripheral Arterial Disease: Results of a Propensity Match Analysis from the National Inpatient Sample. *Cureus*, 11, e4704.
- LUDWIG, M. 2010. Chronische periphere arterielle Verschlusskrankheit (cpAVK). *Gefäßmedizin in Klinik und Praxis*. S. 70-116. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- MACH, F., BAIGENT, C., CATAPANO, A. L., KOSKINAS, K. C., CASULA, M., BADIMON, L., CHAPMAN, M. J., DE BACKER, G. G., DELGADO, V., FERENC, B. A., GRAHAM, I. M., HALLIDAY, A., LANDMESSER, U., MIHAYLOVA, B., PEDERSEN, T. R., RICCARDI, G., RICHTER, D. J., SABATINE, M. S., TASKINEN, M. R., TOKGOZOGLU, L. & WIKLUND, O. 2020. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*, 41, 111-188.
- MALYAR, N., FÜRSTENBERG, T., WELLMANN, J., MEYBORG, M., LÜDERS, F., GEBAUER, K., BUNZEMEIER, H., ROEDER, N. & REINECKE, H. 2013. Recent trends in morbidity and in-hospital outcomes of in-patients with peripheral arterial disease: a nationwide population-based analysis. *European Heart Journal*, 34, 2706-2714.

- MATLOUBIAN, M., LO, C. G., CINAMON, G., LESNESKI, M. J., XU, Y., BRINKMANN, V., ALLENDE, M. L., PROIA, R. L. & CYSTER, J. G. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, 427, 355-60.
- MATSUSHITA, K., BALLEW, S. H., CORESH, J., ARIMA, H., ÄRNLÖV, J., CIRILLO, M., EBERT, N., HIRAMOTO, J. S., KIMM, H. & SHLIPAK, M. G. 2017. Measures of chronic kidney disease and risk of incident peripheral artery disease: a collaborative meta-analysis of individual participant data. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 5, 718-728.
- MCCOACH, C. E., ARMSTRONG, E. J., SINGH, S., JAVED, U., ANDERSON, D., YEO, K. K., WESTIN, G. G., HEDAYATI, N., AMSTERDAM, E. A. & LAIRD, J. R. 2013. Gender-related variation in the clinical presentation and outcomes of critical limb ischemia. *Vascular Medicine*, 18, 19-26.
- MEECHAM, L., BATE, G., PATEL, S. & BRADBURY, A. W. 2019. A comparison of clinical outcomes following femoropopliteal bypass or plain balloon angioplasty with selective bare metal stenting in the bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the limb (BASIL) trial. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 58, 52-59.
- MENSINK, G., SCHIENKIEWITZ, A., HAFTENBERGER, M., LAMPERT, T., ZIESE, T. & SCHEIDT-NAVE, C. 2013. Übergewicht und Adipositas in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1) [Overweight and obesity in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 56(5-6), 786–794.
- MICHAUD, J., IM, D. S. & HLA, T. 2010. Inhibitory role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in macrophage recruitment during inflammation. *J Immunol*, 184, 1475-83.
- MIURA, Y., KANAMARU, H., YASUDA, R., TOMA, N. & SUZUKI, H. 2021. Nonfasting Triglyceride as an Independent Predictor of Carotid Restenosis After Carotid Endarterectomy or Carotid Artery Stenting. *World Neurosurgery*, 156, e415-e425.
- MORITZ, E., WEGNER, D., GROS, S., BAHLS, M., DÖRR, M., FELIX, S. B., ITTERMANN, T., OSWALD, S., NAUCK, M., FRIEDRICH, N., BÖGER, R. H., DAUM, G., SCHWEDHELM, E. & RAUCH, B. H. 2017. Reference intervals for serum sphingosine-1-phosphate in the population-based Study of Health in Pomerania. *Clinica Chimica Acta*, 468, 25-31.
- MORIYAMA, S., TAKAHASHI, N., GREEN, J. A., HORI, S., KUBO, M., CYSTER, J. G. & OKADA, T. 2014. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. *Journal of Experimental Medicine*, 211, 1297-1305.
- MURABITO, J. M., D'AGOSTINO, R. B., SILBERSHATZ, H. & WILSON, W. F. 1997. Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Heart Study. *Circulation*, 96, 44-9.
- MURAKAMI, A., TAKASUGI, H., OHNUMA, S., KOIDE, Y., SAKURAI, A., TAKEDA, S., HASEGAWA, T., SASAMORI, J., KONNO, T., HAYASHI, K., WATANABE, Y., MORI, K., SATO, Y., TAKAHASHI, A., MOCHIZUKI, N. & TAKAKURA, N. 2010. Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P3 receptor: investigation based on a new S1P3 receptor antagonist. *Mol Pharmacol*, 77, 704-13.
- MURATA, N., SATO, K., KON, J., TOMURA, H., YANAGITA, M., KUWABARA, A., UI, M. & OKAJIMA, F. 2000. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J*, 352 Pt 3, 809-15.
- NAKASHIMA, Y., RAINES, E. W., PLUMP, A. S., BRESLOW, J. L. & ROSS, R. 1998. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at Atherosclerosis-Prone Sites on the Endothelium in the ApoE-Deficient Mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18, 842-851.
- NEUFANG, K. F. & BEYER, D. 2013. *Digitale Subtraktionsangiographie in Klinik und Praxis*. S.48-55. 2. Auflage. Berlin: Springer-Verlag.

- NEWTON, J., LIMA, S., MACEYKA, M. & SPIEGEL, S. 2015. Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in cancer therapy. *Experimental cell research*, 333, 195-200.
- NGUYEN, D. T., VOKÓ, B., NYÁRÁDI, B. B., MUNKÁCSI, T., BÉRCZI, Á., VOKÓ, Z. & DÓSA, E. 2022. Restenosis rates in patients with ipsilateral carotid endarterectomy and contralateral carotid artery stenting. *Plos one*, 17, e0262735.
- NOFER, J.-R., BOT, M., BRODDE, M., TAYLOR, P. J., SALM, P., BRINKMANN, V., BERKEL, T. V., ASSMANN, G. & BIESSEN, E. A. L. 2007. FTY720, a Synthetic Sphingosine 1 Phosphate Analogue, Inhibits Development of Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circulation*, 115, 501-508.
- NOFER, J. R., VAN DER GIET, M., TÖLLE, M., WOLINSKA, I., VON WNUCK LIPINSKI, K., BABA, H. A., TIETGE, U. J., GÖDECKE, A., ISHII, I., KLEUSER, B., SCHÄFERS, M., FOBKER, M., ZIDEK, W., ASSMANN, G., CHUN, J. & LEVKAU, B. 2004. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*, 113, 569-81.
- NORGREN, L., HIATT, W. R., DORMANDY, J. A., NEHLER, M. R., HARRIS, K. A. & FOWKES, F. G. R. 2007. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Journal of Vascular Surgery*, 45, S5-S67.
- NUSCA, A., VISCUSI, M. M., PICCIRILLO, F., DE FILIPPIS, A., NENNA, A., SPADACCIO, C., NAPPI, F., CHELLO, C., MANGIACAPRA, F. & GRIGIONI, F. 2022. In stent neo-atherosclerosis: pathophysiology, clinical implications, prevention, and therapeutic approaches. *Life*, 12, 393.
- NUSSBAUM, C., BANNENBERG, S., KEUL, P., GRÄLER, M. H., GONCALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. F., KORHONEN, H., VON WNUCK LIPINSKI, K., HEUSCH, G., NETO, H. C. D. C. F. & ROHWEDDER, I. 2015. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes leukocyte rolling by mobilizing endothelial P-selectin. *Nature Communications*, 6, 1-12.
- OESTERLE, A., LAUFS, U. & LIAO, J. K. 2017. Pleiotropic effects of statins on the cardiovascular system. *Circulation research*, 120, 229-243.
- OLIVERA, A. & SPIEGEL, S. 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 365, 557-560.
- ONO, Y., KURANO, M., OHKAWA, R., YOKOTA, H., IGARASHI, K., AOKI, J., TOZUKA, M. & YATOMI, Y. 2013. Sphingosine 1-phosphate release from platelets during clot formation: close correlation between platelet count and serum sphingosine 1-phosphate concentration. *Lipids in Health and Disease*, 12, 20.
- OO, M. L., THANGADA, S., WU, M.-T., LIU, C. H., MACDONALD, T. L., LYNCH, K. R., LIN, C.-Y. & HLA, T. 2007. Immunosuppressive and Anti-angiogenic Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 Agonists Induce Ubiquitinylation and Proteasomal Degradation of the Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 9082-9089.
- ORTMANN, J., NÜESCH, E., TRAUPE, T., DIEHM, N. & BAUMGARTNER, I. 2012. Gender is an independent risk factor for distribution pattern and lesion morphology in chronic critical limb ischemia. *Journal of vascular surgery*, 55, 98-104.
- OTSUKA, F., BYRNE, R. A., YAHAGI, K., MORI, H., LADICH, E., FOWLER, D. R., KUTYS, R., XHEPA, E., KASTRATI, A. & VIRMANI, R. 2015. Neoatherosclerosis: overview of histopathologic findings and implications for intravascular imaging assessment. *European heart journal*, 36, 2147-2159.
- OWENS, G. K., KUMAR, M. S. & WAMHOFF, B. R. 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews*, 84, 767-801.
- PAN, H. & REILLY, M. P. 2019. A protective smooth muscle cell transition in atherosclerosis. *Nature Medicine*, 25, 1194-1195.
- PANTA, C. R., RUISANCHEZ, É., MÓRÉ, D., DANCS, P. T., BALOGH, A., FÜLÖP, Á., KERÉK, M., PROIA, R. L., OFFERMANN, S., TIGYI, G. J. & BENYÓ, Z. 2019. Sphingosine-1-Phosphate Enhances α 1-Adrenergic Vasoconstriction via S1P2–G12/13–ROCK Mediated Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 6361.

- PARASKEVAS, K. I., BAKER, D. M., POMPELLA, A. & MIKHAILIDIS, D. P. 2008. Does diabetes mellitus play a role in restenosis and patency rates following lower extremity peripheral arterial revascularization? A critical overview. *Ann Vasc Surg*, 22, 481-91.
- PENG, X., HASSOUN, P. M., SAMMANI, S., MCVERRY, B. J., BURNE, M. J., RABB, H., PEARSE, D., TUDER, R. M. & GARCIA, J. G. N. 2004. Protective Effects of Sphingosine 1-Phosphate in Murine Endotoxin-induced Inflammatory Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169, 1245-1251.
- PETERS, F., KREUTZBURG, T., RIES, H. C., HEIDEMANN, F., MARSCHALL, U., L'HOEST, H., DEBUS, E. S., SEDRAKYAN, A. & BEHRENDT, C.-A. 2020. Editor's Choice – Optimal Pharmacological Treatment of Symptomatic Peripheral Arterial Occlusive Disease and Evidence of Female Patient Disadvantage: An Analysis of Health Insurance Claims Data. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 60, 421-429.
- PHAM, T. H., BALUK, P., XU, Y., GRIGOROVA, I., BANKOVICH, A. J., PAPPU, R., COUGHLIN, S. R., MCDONALD, D. M., SCHWAB, S. R. & CYSTER, J. G. 2010. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med*, 207, 17-27.
- POPMA, J. J. & TOPOL, E. J. 1990. Factors influencing restenosis after coronary angioplasty. *Am J Med*, 88, 16n-24n.
- PRICE, J. F., MOWBRAY, P. I., LEE, A. J., RUMLEY, A., LOWE, G. D. & FOWKES, F. G. 1999. Relationship between smoking and cardiovascular risk factors in the development of peripheral arterial disease and coronary artery disease: Edinburgh Artery Study. *Eur Heart J*, 20, 344-53.
- PUCA, A. A., CARRIZZO, A., FERRARIO, A., VILLA, F. & VECCHIONE, C. 2012. Endothelial nitric oxide synthase, vascular integrity and human exceptional longevity. *Immun Ageing*, 9, 26.
- QIAO, J.-H., MISHRA, V., FISHBEIN, M. C., SINHA, S. K. & RAJAVASHISTH, T. B. 2015. Multinucleated giant cells in atherosclerotic plaques of human carotid arteries: Identification of osteoclast-like cells and their specific proteins in artery wall. *Experimental and Molecular Pathology*, 99, 654-662.
- REINHARD, N. R., MASTOP, M., YIN, T., WU, Y., BOSMA, E. K., THEODORUS W. J. GADELLA, J., GOEDHART, J. & HORDIJK, P. L. 2017. The balance between Gai-Cdc42/Rac and Gα12/13-RhoA pathways determines endothelial barrier regulation by sphingosine-1-phosphate. *Molecular Biology of the Cell*, 28, 3371-3382.
- RIDKER, P. M., STAMPFER, M. J. & RIFAI, N. 2001. 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*, 285, 2481-2485.
- RUIZ, J. L., HUTCHESON, J. D. & AIKAWA, E. 2015. Cardiovascular calcification: current controversies and novel concepts. *Cardiovascular Pathology*, 24, 207-212.
- RYU, Y., TAKUWA, N., SUGIMOTO, N., SAKURADA, S., USUI, S., OKAMOTO, H., MATSUI, O. & TAKUWA, Y. 2002. Sphingosine-1-Phosphate, a Platelet-Derived Lysophospholipid Mediator, Negatively Regulates Cellular Rac Activity and Cell Migration in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 90, 325-332.
- SAMMANI, S., MORENO-VINASCO, L., MIRZAPOIAZOVA, T., SINGLETON, P. A., CHIANG, E. T., EVENOSKI, C. L., WANG, T., MATHEW, B., HUSAIN, A., MOITRA, J., SUN, X., NUNEZ, L., JACOBSON, J. R., DUDEK, S. M., NATARAJAN, V. & GARCIA, J. G. 2010. Differential effects of sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 43, 394-402.
- SANCHEZ, T., SKOURA, A., WU, M. T., CASSERLY, B., HARRINGTON, E. O. & HLA, T. 2007. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 1312-8.

- SANCHEZ, T., THANGADA, S., WU, M. T., KONTOS, C. D., WU, D., WU, H. & HLA, T. 2005. PTEN as an effector in the signaling of antimigratory G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4312-7.
- SATTLER, K. J., ELBASAN, Ş., KEUL, P., ELTER-SCHULZ, M., BODE, C., GRÄLER, M. H., BRÖCKER-PREUSS, M., BUDDE, T., ERBEL, R. & HEUSCH, G. 2010. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic research in cardiology*, 105, 821-832.
- SCHWAB, S. R., PEREIRA, J. P., MATLOUBIAN, M., XU, Y., HUANG, Y. & CYSTER, J. G. 2005. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*, 309, 1735-9.
- SELDINGER, S. I. 1953. Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography; a new technique. *Acta radiol*, 39, 368-76.
- SELVIN, E. & ERLINGER, T. P. 2004. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation*, 110, 738-43.
- SHIKATA, Y., BIRUKOV, K. G. & GARCIA, J. G. 2003. S1P induces FA remodeling in human pulmonary endothelial cells: role of Rac, GIT1, FAK, and paxillin. *J Appl Physiol (1985)*, 94, 1193-203.
- SHIMIZU, T., NAKAZAWA, T., CHO, A., DASTVAN, F., SHILLING, D., DAUM, G. & REIDY, M. A. 2007. Sphingosine 1-phosphate receptor 2 negatively regulates neointimal formation in mouse arteries. *Circ Res*, 101, 995-1000.
- SHIMIZU, T., WISPELAERE, A. D., WINKLER, M., D'SOUZA, T., CAYLOR, J., CHEN, L., DASTVAN, F., DEOU, J., CHO, A., LARENA-AVELLANEDA, A., REIDY, M. & DAUM, G. 2012. Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3 Promotes Neointimal Hyperplasia in Mouse Iliac-Femoral Arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32, 955-961.
- SIGVANT, B., HASVOLD, P., KRAGSTERMAN, B., FALKENBERG, M., JOHANSSON, S., THURESSON, M. & NORDANSTIG, J. 2017. Cardiovascular outcomes in patients with peripheral arterial disease as an initial or subsequent manifestation of atherosclerotic disease: Results from a Swedish nationwide study. *Journal of Vascular Surgery*, 66, 507-514.e1.
- SINGH, S. & TORZEWSKI, M. 2019. Fibroblasts and their pathological functions in the fibrosis of aortic valve sclerosis and atherosclerosis. *Biomolecules*, 9, 472.
- SINGH, T. P., MORRIS, D. R., SMITH, S., MOXON, J. V. & GOLLEDGE, J. 2017. Systematic Review and Meta-Analysis of the Association Between C-Reactive Protein and Major Cardiovascular Events in Patients with Peripheral Artery Disease. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 54, 220-233.
- SKOURA, A., MICHAUD, J., IM, D. S., THANGADA, S., XIONG, Y., SMITH, J. D. & HLA, T. 2011. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 81-5.
- SKOURA, A., SANCHEZ, T., CLAFFEY, K., MANDALA, S. M., PROIA, R. L. & HLA, T. 2007. Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *The Journal of clinical investigation*, 117, 2506-2516.
- SOGA, Y., TAKAHARA, M., IIDA, O., SUZUKI, K., MORI, S., KAWASAKI, D., HARAGUCHI, K., YAMAOKA, T., & ANDO, K. 2022. Ten-Year Clinical Follow-Up Following Bare-Nitinol Stent Implantation for Femoropopliteal Artery Disease. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 29(10), 1448–1457.
- SOLTAU, I., MUDERSBACH, E., GEISSEN, M., SCHWEDHELM, E., WINKLER, M. S., GEFFKEN, M., PEINE, S., SCHOEN, G., DEBUS, E. S., LARENA-AVELLANEDA, A. & DAUM, G. 2016. Serum-Sphingosine-1-Phosphate Concentrations Are Inversely Associated with Atherosclerotic Diseases in Humans. *PLoS One*, 11, e0168302.
- STATISTISCHES BUNDESAMT (DESTATIS). 2023. *Todesursachen 2022: Anteil der an COVID-19-Verstorbenen rückläufig* [Online]. Abrufbar unter: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2023/11/PD23_441_23211.html [abgerufen am 17.03.2024].

- SUI, J., HE, M., WANG, Y., ZHAO, X., HE, Y. & SHI, B. 2019. Sphingolipid metabolism in type 2 diabetes and associated cardiovascular complications. *Exp Ther Med*, 18, 3603-3614.
- SUN, X., MATHEW, B., SAMMANI, S., JACOBSON, J. R. & GARCIA, J. G. 2017. Simvastatin-induced sphingosine 1-phosphate receptor 1 expression is KLF2-dependent in human lung endothelial cells. *Pulmonary Circulation*, 7, 117-125.
- SUN, X., SINGLETON, P. A., LETSIU, E., ZHAO, J., BELVITCH, P., SAMMANI, S., CHIANG, E. T., MORENO-VINASCO, L., WADE, M. S., ZHOU, T., LIU, B., PARASTATIDIS, I., THOMSON, L., ISCHIROPOULOS, H., NATARAJAN, V., JACOBSON, J. R., MACHADO, R. F., DUDEK, S. M. & GARCIA, J. G. 2012. Sphingosine-1-phosphate receptor-3 is a novel biomarker in acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 47, 628-36.
- TAKUWA, Y., OKAMOTO, Y., YOSHIOKA, K. & TAKUWA, N. 2008. Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781, 483-488.
- TALAYERO, B. G. & SACKS, F. M. 2011. The Role of Triglycerides in Atherosclerosis. *Current Cardiology Reports*, 13, 544.
- TANAKA, A., PERLICK, A., MILLER, C. C., SANDHU, H. K., AFAQ, S., SAFI, H. J., AZIZZADEH, A. & CHARLTON-OUW, K. M. 2018. Metabolic Syndrome but not Obesity Adversely Affects Outcomes after Open Aortoiliac Bypass Surgery. *Annals of Vascular Surgery*, 46, 155-161.
- TORELLA, D., IACONETTI, C., CATALUCCI, D., ELLISON, G. M., LEONE, A., WARING, C. D., BOCHICCHIO, A., VICINANZA, C., AQUILA, I., CURCIO, A., CONDORELLI, G. & INDOLFI, C. 2011. MicroRNA-133 Controls Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch In Vitro and Vascular Remodeling In Vivo. *Circulation Research*, 109, 880-893.
- TSIGKAS, G. G., KARANTALIS, V., HAHALIS, G. & ALEXOPOULOS, D. 2011. Stent restenosis, pathophysiology and treatment options: a 2010 update. *Hellenic J Cardiol*, 52, 149-157.
- UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF (UKE). 2021. *Analysen und Parameter der Diagnostik am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin* [Online]. Abrufbar unter: <https://www.uke.de/kliniken-institute/institute/klinische-chemie-und-laboratoriumsmedizin/diagnostik/laborfuhrer.html> [abgerufen am 13.10.2021].
- VARTANIAN, S. M. & CONTE, M. S. 2015. Surgical Intervention for Peripheral Arterial Disease. *Circulation Research*, 116, 1614-1628.
- VENKATARAMAN, K., LEE, Y.-M., MICHAUD, J., THANGADA, S., AI, Y., BONKOVSKY, H. L., PARIKH, N. S., HABRUKOWICH, C. & HLA, T. 2008. Vascular Endothelium As a Contributor of Plasma Sphingosine 1-Phosphate. *Circulation Research*, 102, 669-676.
- VESTRI, A., PIERUCCI, F., FRATI, A., MONACO, L. & MEACCI, E. 2017. Sphingosine 1-Phosphate Receptors: Do They Have a Therapeutic Potential in Cardiac Fibrosis? *Frontiers in pharmacology*, 8, 296-296.
- WAEBER, C., BLONDEAU, N. & SALOMONE, S. 2004. Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors. *Drug News Perspect*, 17, 365-82.
- WALKER, J. M. & RAPLEY, R. 2008. *Molecular Biomethods Handbook*. S. 148-169. 2. Auflage. New Jersey: Humana Press.
- WALPOLA, P. L., GOTLIEB, A. I., CYBULSKY, M. I. & LANGILLE, B. L. 1995. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and Monocyte Adherence in Arteries Exposed to Altered Shear Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15, 2-10.
- WAMHOFF, B. R., LYNCH, K. R., MACDONALD, T. L. & OWENS, G. K. 2008. Sphingosine-1-phosphate receptor subtypes differentially regulate smooth muscle cell phenotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28, 1454-1461.

- WANG, F., DING, X.-Y., LYU, G., LIU, Z.-G., LI, H.-J., GENG, L.-K. & GUO, N. 2017. The predictive value of serum S1P and STIM1 levels after PCI for in-stent restenosis and their correlation with angiogenesis and inflammatory. *Journal of Hainan Medical University*, 23, 71-74.
- WANG, F., VAN BROCKLYN, J. R., HOBSON, J. P., MOVAFAGH, S., ZUKOWSKA-GROJEC, Z., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. 1999. Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a Gi-coupled cell surface receptor: potential involvement in angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 35343-35350.
- WANG, L. & DUDEK, S. M. 2009. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. *Microvascular Research*, 77, 39-45.
- WANG, P., YUAN, Y., LIN, W., ZHONG, H., XU, K. & QI, X. 2019. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in cancer. *Cancer Cell International*, 19, 295.
- WANG, Y., CHEN, D., ZHANG, Y., WANG, P., ZHENG, C., ZHANG, S., YU, B., ZHANG, L., ZHAO, G., MA, B., CAI, Z., XIE, N., HUANG, S., LIU, Z., MO, X., GUAN, Y., WANG, X., FU, Y., MA, D., WANG, Y. & KONG, W. 2018. Novel Adipokine, FAM19A5, Inhibits Neointima Formation After Injury Through Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2. *Circulation*, 138, 48-63.
- WEIGERT, A., OLESCH, C. & BRÜNE, B. 2019. Sphingosine-1-Phosphate and Macrophage Biology—How the Sphinx Tames the Big Eater. *Frontiers in Immunology*, 10.
- WILKERSON, B. A., GRASS, G. D., WING, S. B., ARGRAVES, W. S. & ARGRAVES, K. M. 2012. Sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier: high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 44645-44653.
- WILLIAMS, B., MANCIA, G., SPIERING, W., AGABITI ROSEI, E., AZIZI, M., BURNIER, M., CLEMENT, D. L., COCA, A., DE SIMONE, G., DOMINICZAK, A., KAHAN, T., MAHFOUD, F., REDON, J., RUILOPE, L., ZANCHETTI, A., KERINS, M., KJELDSEN, S. E., KREUTZ, R., LAURENT, S., LIP, G. Y. H., MCMANUS, R., NARKIEWICZ, K., RUSCHITZKA, F., SCHMIEDER, R. E., SHLYAKHTO, E., TSIOUFIS, C., ABOYANS, V. & DESORMAIS, I. 2018. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*, 39, 3021-3104.
- WILLIGENDAEL, E. M., TEIJINK, J. A. W., BARTELINK, M.-L., PETERS, R. J. G., BÜLLER, H. R. & PRINS, M. H. 2005. Smoking and the patency of lower extremity bypass grafts: A meta-analysis. *Journal of Vascular Surgery*, 42, 67-74.
- XIONG, Y. & HLA, T. 2014. S1P Control of Endothelial Integrity. In: OLDSTONE, M. B. A. & ROSEN, H. (eds.) *Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immunology and Infectious Diseases*. Cham: Springer International Publishing.
- XU, Q., CHEN, J., ZHU, Y., XIA, W., LIU, Y. & XU, J. 2021. JTE-013 Alleviates Inflammatory Injury and Endothelial Dysfunction Induced by Sepsis In Vivo and In Vitro. *Journal of Surgical Research*, 265, 323-332.
- YANG, H., JING, X. & WANG, X. 2015. The predictive values of sphingosine-1-phosphate and adiponectin in patients with in-stent restenosis. *Chongqing Medicine*, 40-41, 44.
- YATOMI, Y. 2008. Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780, 606-611.
- YUAN, F., WANG, D., XU, K., WANG, J., ZHANG, Z., YANG, L., YANG, G.-Y. & LI, S. 2017. Contribution of Vascular Cells to Neointimal Formation. *PLOS ONE*, 12, e0168914.
- ZHANG, G., YANG, L., KIM, G. S., RYAN, K., LU, S., O'DONNELL, R. K., SPOKES, K., SHAPIRO, N., AIRD, W. C., KLUK, M. J., YANO, K. & SANCHEZ, T. 2013a. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation. *Blood*, 122, 443-55.
- ZHANG, H., DESAI, N. N., OLIVERA, A., SEKI, T., BROOKER, G. & SPIEGEL, S. 1991. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol*, 114, 155-67.

- ZHANG, W., AN, J., JAWADI, H., SIOW, D. L., LEE, J.-F., ZHAO, J., GARTUNG, A., MADDIPATI, K. R., HONN, K. V. & WATTENBERG, B. W. 2013b. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 mediated NFκB activation contributes to tumor necrosis factor-α induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in endothelial cells. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 106, 62-71.
- ZHANG, Y., HU, G., YUAN, Z. & CHEN, L. 2012. Glycosylated hemoglobin in relationship to cardiovascular outcomes and death in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 7, e42551.
- ZHOU, R., STOUFFER, G. A. & FRISHMAN, W. H. 2022. Cholesterol Paradigm and Beyond in Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Cholesterol, Sterol regulatory element-binding Protein, Inflammation, and Vascular Cell Mobilization in Vasculopathy. *Cardiology in Review*, 30, 267.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer Aufbau einer Arterienwand sowie ein korrespondierender histologischer Ausschnitt der Wand einer Femoralarterie in EvG-Färbung	5
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Entstehung von Atherosklerose	8
Abbildung 3:	Metabolismus von Sphingosin-1-phosphat und die Signaltransduktion seiner Rezeptoren	16
Abbildung 4:	Übersicht des Studienablaufs	27
Abbildung 5:	Amplifikationsdiagramme der qPCR	39
Abbildung 6:	Histologische Darstellung einer Plaque mit Einblutung	45
Abbildung 7:	Histologische Darstellung einer Plaque mit Intimaverdickung	46
Abbildung 8:	Histologische Darstellung einer kalzifizierten Plaque	46
Abbildung 9:	Histologische Darstellung einer Plaque mit nekrotischem Kern	47
Abbildung 10:	Venn-Diagramm von der Verteilung aller entnommenen Gewebeproben	49
Abbildung 11:	Darstellung der Genexpressionswerte aus Vollwand (A) und Plaque (B)	52
Abbildung 12:	Vergleich der Laborparameter des Lipidprofils zwischen den Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1	54
Abbildung 13:	Vergleich der Rate an Restenosefreiheit anhand des Lipidprofils	55
Abbildung 14:	Vergleich der Genexpressionen in der Vollwand anhand des klinischen Outcomes	57
Abbildung 15:	Vergleich der Genexpressionen in der Plaque anhand des klinischen Outcomes	58
Abbildung 16:	Korrelationsanalyse der Genexpressionen innerhalb der Gewebetypen Vollwand (A-C) und Plaque (D-F)	59
Abbildung 17:	Korrelationsanalyse der Genexpressionen zwischen den Gewebetypen Vollwand und Plaque	61
Abbildung 18:	Vergleich der Genexpressionen in der Vollwand anhand der Histomorphologie der korrespondierenden Plaques	62
Abbildung 19:	Vergleich der Genexpressionen in der Plaque anhand der Statineinnahme	63
Abbildung 20:	Korrelationsdiagramme der Genexpressionen innerhalb der Vollwand	112
Abbildung 21:	Korrelationsdiagramme der Genexpressionen innerhalb der Plaque	113

Abbildungen 1, 3, 4 und 5 wurden mit BioRender.com erstellt.

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Hauptrisikofaktoren der pAVK	3
Tabelle 2:	Einteilung der pAVK nach Fontaine und Rutherford	8
Tabelle 3:	Erhobene patientenbezogene Daten und ihre Definition	28
Tabelle 4:	Erhobene Laborparameter	28
Tabelle 5:	Einteilung des Restenosegrades anhand der Flussgeschwindigkeiten	29
Tabelle 6:	Chemikalien und Reagenzien	30
Tabelle 7:	Kits	31
Tabelle 8:	Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 9:	Geräte	32
Tabelle 10:	Verwendete Programme	32
Tabelle 11:	Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	36
Tabelle 12:	Pipettierschema für den Mastermix	37
Tabelle 13:	Primersequenzen für die qPCR	37
Tabelle 14:	Pipettierschema der qPCR	38
Tabelle 15:	Schema der qPCR-Reaktion	38
Tabelle 16:	Protokoll der Entwässerung	41
Tabelle 17:	Protokoll der Entparaffinierung und der Rehydrierung	42
Tabelle 18:	Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	42
Tabelle 19:	Protokoll der Elastica-van-Gieson-Färbung	43
Tabelle 20:	Protokoll der Carstairs-Färbung	44
Tabelle 21:	Präoperative Laborparameter der Gesamtstudienkohorte	50
Tabelle 22:	Vergleich der Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1 anhand epidemiologischer Parameter	53
Tabelle 23:	Vergleich der präoperativen Medikation der Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1	53
Tabelle 24:	Vergleich der präoperativen Laborparameter zwischen den beiden Subgruppen Outcome 0 und Outcome 1	54
Tabelle 25:	Einteilung der beurteilbaren Plaques aus den Subgruppen Outcome 0 (n=30) und 1 (n=19) anhand ihrer histomorphologischen Charakteristika	56
Tabelle 26:	Vergleich des Lipidprofils anhand der Statineinnahme	63
Tabelle 27:	Rohdaten der Studie	97
Tabelle 28:	Verteilung der Restenosegrade pro Beobachtungszeitpunkt sowie der höchsten Restenosegrade über den gesamten Beobachtungszeitraum	114
Tabelle 29:	Korrelationsanalyse der Genexpressionswerten aus Vollwand und Plaque	114
Tabelle 30:	Vergleich der Genexpressionen in der Vollwand anhand des Vorkommens einer Intimaverdickung in den korrespondierenden Plaques	115
Tabelle 31:	Vergleich der Genexpressionen in der Vollwand anhand des Vorkommens einer Kalzifizierung in den korrespondierenden Plaques	115
Tabelle 32:	Vergleich der Genexpressionen in der Plaque anhand der Statineinnahme	115

12 Anhang

Tabelle 27: Rohdaten der Studie. m, männlich; w, weiblich; BMI, Body-Mass-Index; W, Vollwand-Probe; P, Plaque-Probe; M, Monate; S1P, Sphingosin-1-phosphat; S1PR, Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor; ASS, Acetylsalicylsäure; HDL, High-Density-Lipoprotein; LDL, Low-Density-Lipoprotein; NOAK, neue orale Antikoagulanzen; nd, not determined.

Patientennummer	2	7	9	25	26	28	29	32	34	35	36	38	54
Alter	72	58	71	70	70	65	71	61	66	82	58	74	81
Geschlecht m=0; w=1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Gewicht [kg]	45	90	92	67	66	70	85	63	60	64	82	80	75
Größe [m]	1,60	1,86	1,76	1,72	1,68	1,70	1,75	1,60	1,69	1,73	1,85	1,68	1,70
BMI [kg/m ²]	17,6	26,0	29,7	22,6	23,4	24,2	27,8	24,6	21,0	21,4	24,0	28,3	26,0
W_S1PR1	nd	1,34	nd	nd	nd	3,22	nd	nd	1,68	nd	nd	1,40	nd
W_S1PR2	nd	-	nd	nd	nd	0,50	nd	nd	2,03	nd	nd	-	nd
W_S1PR3	nd	2,28	nd	nd	nd	0,80	nd	nd	1,14	nd	nd	2,03	nd
W_CD31	nd	4,39	nd	nd	nd	5,90	nd	nd	2,69	nd	nd	4,57	nd
W_CD68	nd	1,98	nd	nd	nd	2,75	nd	nd	1,29	nd	nd	3,24	nd
W_Myh11	nd	9,08	nd	nd	nd	6,30	nd	nd	7,96	nd	nd	7,43	nd
W_CD45	nd	4,05	nd	nd	nd	4,15	nd	nd	9,43	nd	nd	4,80	nd
P_S1PR1	-	nd	-	nd	-	0,06	nd	nd	nd	1,03	nd	nd	0,06
P_S1PR2	2,56	nd	1,87	nd	2,60	0,50	nd	nd	nd	1,12	nd	nd	0,80
P_S1PR3	0,78	nd	1,29	nd	1,32	1,21	nd	nd	nd	1,43	nd	nd	0,10
P_CD31	-	nd	2,84	nd	1,18	3,72	nd	nd	nd	4,23	nd	nd	3,26
P_CD68	1,77	nd	2,59	nd	5,11	4,61	nd	nd	nd	4,88	nd	nd	5,37
P_Myh11	6,37	nd	7,54	nd	3,77	5,31	nd	nd	nd	6,05	nd	nd	4,29
P_CD45	-	nd	-	nd	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-
	7,12		5,33		3,10	3,58				3,83			5,16
Restenosegrad 3M	1	0	nd	nd	1	0	0	3	nd	0	nd	2	0
Restenosegrad 6M	3	0	nd	nd	1	0	0	nd	3	0	nd	2	0
Restenosegrad 12M	nd	0	3	nd	1	0	0	3	nd	0	nd	2	nd
höchster Restenosegrad	3	0	3	nd	1	0	0	3	3	0	nd	2	0
Serum_S1P	2,20	1,10	1,50	1,33	1,84	1,44	2,01	2,05	1,14	1,22	1,47	1,39	1,00
Plasma S1P	nd	0,58	0,71	nd	0,82	0,62	0,91	0,77	0,57	0,65	0,79	0,76	0,60
ASS, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
NOAK, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Statin, 0=nein 1=ja	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Betablocker, 0=nein 1=ja	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	4,18	4,86	5,17	4,25	4,02	4,57	4,90	3,43	3,95	3,26	3,17	4,31	4,03
Leukozyten [Mrd/l]	9,2	9,4	10,7	6,6	9,7	6,7	6,6	5,4	6,7	3,6	2,7	7,5	6,0
Thrombozyten [Mrd/l]	576	210	301	230	321	252	228	250	238	246	108	234	152
Hämoglobin [g/dl]	13,7	15,3	15,0	13,0	13,0	14,2	15,4	9,9	11,0	9,4	9,0	13,0	12,8
Hämatokrit [%]	42,9	45,3	47,1	39,6	36,6	41,4	44,4	30,1	34,0	29,0	27,2	39,1	40,2
Kreatinin [mg/dl]	0,86	0,92	1,29	0,68	0,71	0,75	0,93	1,49	0,72	1,72	0,9	1,63	1,75
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	254	245	251	196	234	138	228	207	191	150	96	197	122
Triglyzeride [mg/dl]	178	114	378	69	160	211	303	262	78	62	110	177	191
HDL-Cholesterin [mg/dl]	136	42	50	64	76	43	45	55	82	80	36	57	50
LDL-Cholesterin [mg/dl]	82	180	125	118	126	53	122	100	93	58	38	105	34
c-reaktives Protein [mg/l]	5	5	10	10	5	5	5	5	5	5	7	5	5
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	1	nd	0	nd	0	1	1	nd	nd	0	nd	nd	nd
Einblutung, 0=nein 1=ja	1	nd	0	nd	0	0	0	nd	nd	1	nd	nd	nd
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	0	nd	1	nd	1	0	1	nd	nd	1	nd	nd	nd

Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	0	nd	0	nd	0	0	0	nd	nd	1	nd	nd	nd
-----------------------------------	---	----	---	----	---	---	---	----	----	---	----	----	----

Patientennummer	59	61	62	76	81	83	84	85	94	99	102	104	107
Alter	80	82	61	76	72	46	75	49	67	57	74	70	69
Geschlecht m=0; w=1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Gewicht [kg]	95	58	86	50	102	85	68	85	71	93	89	77	77
Größe [m]	1,81	1,50	1,70	1,70	1,81	1,86	1,75	1,57	1,60	1,82	1,70	1,68	1,83
BMI [kg/m2]	29,0	25,8	29,8	17,3	31,1	24,6	22,2	34,5	27,7	28,1	30,8	27,3	23,0
W_S1PR1	nd	2,48	nd	nd	0,36	0,34	0,79	nd	3,34	nd	1,96	nd	nd
W_S1PR2	nd	0,60	nd	nd	1,65	1,17	1,70	nd	0,05	nd	0,36	nd	nd
W_S1PR3	nd	0,95	nd	nd	1,52	2,15	2,61	nd	1,28	nd	0,16	nd	nd
W_CD31	nd	5,93	nd	nd	3,02	2,92	2,64	nd	5,56	nd	5,64	nd	nd
W_CD68	nd	3,49	nd	nd	2,68	2,16	1,30	nd	5,21	nd	4,70	nd	nd
W_Myh11	nd	7,85	nd	nd	8,17	8,58	8,85	nd	2,39	nd	4,57	nd	nd
W_CD45	nd	4,47	nd	nd	6,28	7,02	7,57	nd	5,98	nd	4,01	nd	nd
P_S1PR1	nd	nd	nd	1,96	nd	nd	0,76	nd	0,65	nd	nd	nd	nd
P_S1PR2	nd	nd	nd	1,32	nd	nd	1,11	nd	1,54	nd	nd	nd	nd
P_S1PR3	nd	nd	nd	5,01	nd	nd	0,54	nd	1,14	nd	nd	nd	nd
P_CD31	nd	nd	nd	5,41	nd	nd	2,83	nd	3,95	nd	nd	nd	nd
P_CD68	nd	nd	nd	7,06	nd	nd	5,07	nd	2,76	nd	nd	nd	nd
P_Myh11	nd	nd	nd	5,56	nd	nd	5,16	nd	7,75	nd	nd	nd	nd
P_CD45	nd	nd	nd	2,16	nd	nd	5,40	nd	4,90	nd	nd	nd	nd
Restenosegrad 3M	nd	0	nd	0	0	0	0	1	0	nd	3	1	1
Restenosegrad 6M	3	0	nd	0	0	0	0	1	0	3	nd	nd	3
Restenosegrad 12M	nd	0	nd	0	0	0	0	1	0	nd	nd	0	nd
höchster Restenosegrad	3	0	nd	0	0	0	0	1	0	3	3	1	3
Serum S1P	2,57	0,94	2,81	1,54	0,99	1,63	1,80	1,70	nd	1,54	2,10	2,99	1,81
Plasma S1P	1,21	nd	nd	0,94	0,54	0,97	0,79	0,75	nd	0,63	nd	nd	0,71
ASS, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
NOAK, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Statin, 0=nein 1=ja	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1
Betablocker, 0=nein 1=ja	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	4,63	3,20	5,10	4,50	4,10	4,59	3,59	4,60	4,50	4,96	4,86	3,96	3,72
Leukozyten [Mrd/l]	9,2	7,6	9,4	10,0	8,6	5,8	5,3	10,4	9,7	6,6	7,2	14,9	6,4
Thrombozyten[Mrd/l]	362	285	332	332	194	303	280	256	262	291	223	271	205
Hämoglobin [g/dl]	14,8	10,3	14,2	13,9	12,5	23,5	11,1	14,3	14,1	14,8	14,7	12,7	12,4
Hämatokrit [%]	44,1	32,2	44,4	41,8	35,8	37,2	34,1	40,9	41,1	42,8	43,1	35,4	35,8
Kreatinin [mg/dl]	0,98	2,76	1,03	0,9	1,07	0,96	1,41	0,97	0,67	1,11	1,26	0,47	0,65
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	164	nd	223	136	101	186	212	181	170	175	185	161	199
Triglyzeride [mg/dl]	114	nd	125	76	271	114	98	117	108	108	103	116	51
HDL-Cholesterin [mg/dl]	50	nd	48	64	33	59	57	42	58	68	51	52	86
LDL-Cholesterin [mg/dl]	91	nd	150	57	14	104	135	116	90	85	113	86	103
c-reaktives Protein [mg/l]	16	7	8	5	5	5	10	7	5	5	5	6	7
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	0	nd	nd	0	nd	1	nd	nd	nd	nd
Einblutung, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	0	nd	nd	0	nd	0	nd	nd	nd	nd
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	0	nd	nd	1	nd	0	nd	nd	nd	nd
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	1	nd	nd	1	nd	0	nd	nd	nd	nd

Patientennummer	113	114	122	123	133	134	136	137	139	140	143	144	145
Alter	72	55	89	61	67	79	69	67	83	78	67	55	70
Geschlecht m=0; w=1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
Gewicht [kg]	85	90	70	107	104	78	62	72	80	75	64	92	47
Größe [m]	1,68	1,63	1,68	1,84	1,72	1,80	1,58	1,80	1,80	1,75	1,72	1,73	1,54
BMI [kg/m ²]	30,1	33,9	24,8	31,6	35,2	24,1	24,8	22,2	24,7	24,5	21,6	30,7	19,8
W_S1PR1	nd	nd	- 0,62	nd	nd	nd	nd						
W_S1PR2	nd	nd	- 2,15	nd	nd	nd	nd						
W_S1PR3	nd	nd	1,27	nd	nd	nd	nd						
W_CD31	nd	nd	2,56	nd	nd	nd	nd						
W_CD68	nd	nd	1,01	nd	nd	nd	nd						
W_Myh11	nd	nd	7,80	nd	nd	nd	nd						
W_CD45	nd	nd	- 7,35	nd	nd	nd	nd						
P_S1PR1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,71	nd	nd	nd	nd	nd	0,32
P_S1PR2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 1,07	nd	nd	nd	nd	nd	- 0,70
P_S1PR3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,93	nd	nd	nd	nd	nd	0,94
P_CD31	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,07	nd	nd	nd	nd	nd	2,96
P_CD68	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,52	nd	nd	nd	nd	nd	3,65
P_Myh11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,62	nd	nd	nd	nd	nd	7,53
P_CD45	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 2,03	nd	nd	nd	nd	nd	- 5,89
Restenosegrad 3M	nd	0	0	nd	0	nd	nd	0	0	0	0	nd	3
Restenosegrad 6M	nd	0	0	nd	3	nd	1	0	0	0	0	nd	nd
Restenosegrad 12M	nd	0	1	2	nd	nd	2	nd	0	0	0	nd	nd
höchster Restenosegrad	nd	0	1	2	3	nd	2	0	0	0	0	nd	3
Serum_S1P	1,11	2,19	1,38	1,07	1,95	1,75	1,36	1,13	1,29	1,42	1,56	2,27	1,38
Plasma S1P	0,55	1,07	1,48	0,89	0,90	0,92	0,62	0,85	1,15	1,03	0,91	1,26	0,90
ASS, 0=nein 1=ja	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
NOAK, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Statin, 0=nein 1=ja	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
Betablocker, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	4,37	4,49	3,33	3,33	5,67	4,64	4,64	4,02	4,21	4,61	3,78	5,05	3,53
Leukozyten [Mrd/l]	7,0	9,5	16,2	5,4	10,1	9,4	10,3	6,9	6,9	8,2	7,8	9,4	5,4
Thrombozyten [Mrd/l]	247	338	185	113	234	403	379	139	184	169	486	143	258
Hämoglobin [g/dl]	14,0	13,6	9,0	11,2	15,8	12,6	13,9	13,0	12,9	13,5	9,7	16,7	11,5
Hämatokrit [%]	41,3	39,6	28,4	31,6	49,1	37,7	43,9	38,6	40,5	39,7	32,0	50,1	38,7
Kreatinin [mg/dl]	0,7	1,08	0,79	6,23	0,88	0,99	0,83	2,28	1,06	0,83	0,71	0,83	1,07
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	114	155	nd	156	156	144	176	109	160	174	143	260	189
Triglyzeride [mg/dl]	74	249	nd	191	163	52	164	142	67	123	130	203	86
HDL-Cholesterin [mg/dl]	51	28	nd	38	45	62	74	34	66	42	50	46	91
LDL-Cholesterin [mg/dl]	48	77	nd	80	78	72	69	47	81	107	67	173	81
c-reaktives Protein [mg/l]	5	12	19	9	5	46	5	5	8	5	5	7	5
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	nd	nd	0	nd	nd	nd	0	nd	0	nd	nd	nd	nd
Einblutung, 0=nein 1=ja	nd	nd	0	nd	nd	nd	0	nd	0	nd	nd	nd	nd
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	nd	nd	1	nd	nd	nd	1	nd	1	nd	nd	nd	nd
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	nd	nd	0	nd	nd	nd	0	nd	0	nd	nd	nd	nd

Patientennummer	148	149	150	151	154	155	157	160	162	167	168	170	172
Alter	63	58	71	59	86	59	70	69	56	79	69	79	75
Geschlecht m=0; w=1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0
Gewicht [kg]	82	65	85	95	83	69	53	80	nd	79	40	59	82
Größe [m]	1,76	1,65	1,84	1,80	1,73	1,68	1,75	1,76	nd	1,77	1,52	1,58	1,78
BMI [kg/m ²]	26,5	23,9	25,1	29,3	27,7	24,4	17,3	25,8	nd	25,2	17,3	23,6	25,9
W_S1PR1	nd	nd	nd	- 0,80	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,64	nd	0,14
W_S1PR2	nd	nd	nd	- 1,90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 1,09	nd	- 1,47
W_S1PR3	nd	nd	nd	1,68	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 0,33	nd	2,39
W_CD31	nd	nd	nd	2,31	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,08	nd	3,18
W_CD68	nd	nd	nd	1,74	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,20	nd	4,64
W_Myh11	nd	nd	nd	8,03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,42	nd	7,79
W_CD45	nd	nd	nd	- 6,75	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 5,01	nd	- 4,34
P_S1PR1	- 2,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 0,24	2,94	0,07
P_S1PR2	- 2,31	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 1,36	2,51	1,59
P_S1PR3	- 0,47	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,21	0,25	2,43
P_CD31	1,75	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,26	1,04	3,21
P_CD68	2,09	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,55	3,66	4,08
P_Myh11	6,59	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,33	6,98	7,93
P_CD45	- 5,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 5,58	7,37	- 4,32
Restenosegrad 3M	0	2	0	0	nd	0	nd	1	0	0	0	0	0
Restenosegrad 6M	2	nd	0	0	nd	0	nd	1	0	0	0	0	0
Restenosegrad 12M	nd	4	2	0	nd	0	nd	1	0	nd	nd	0	0
höchster Restenosegrad	2	4	2	0	nd	0	nd	1	0	0	0	0	0
Serum S1P	1,59	1,93	1,86	1,39	0,94	1,93	1,27	1,38	3,07	1,17	1,46	1,80	1,28
Plasma S1P	0,73	1,57	0,86	0,67	0,60	0,80	1,53	0,61	1,89	0,79	0,89	0,86	0,57
ASS, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
NOAK, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Statin, 0=nein 1=ja	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
Betablocker, 0=nein 1=ja	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	4,36	4,42	4,26	4,63	4,33	4,60	3,19	3,69	4,67	4,76	4,19	3,98	4,47
Leukozyten [Mrd/l]	5,5	9,8	5,6	9,6	5,5	10,0	8,1	6,1	9,4	8,3	5,0	7,2	6,8
Thrombozyten[Mrd/l]	326	298	204	304	194	247	429	284	231	308	157	211	281
Hämoglobin [g/dl]	15,5	13,4	12,4	15,7	13,6	14,4	9,6	10,8	14,6	12,9	12,3	12,3	14,2
Hämatokrit [%]	45,7	40,3	39,4	47,0	40,3	42,4	30,3	34,3	43,9	41,1	38,6	36,5	44,4
Kreatinin [mg/dl]	0,51	0,75	0,98	0,8	0,74	0,62	0,72	1,3	0,95	1,1	0,7	1	0,9
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	218	213	139	182	137	148	133	126	181	123	185	196	148
Triglyzeride [mg/dl]	306	80	105	129	88	123	85	122	109	69	97	268	57
HDL-Cholesterin [mg/dl]	58	60	56	32	61	56	43	49	80	36	51	51	58
LDL-Cholesterin [mg/dl]	99	137	62	124	58	67	73	53	79	73	115	91	79
c-reaktives Protein [mg/l]	5	6	5	8	5	5	30	5	5	5	5	5	7
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1	1	0
Einblutung, 0=nein 1=ja	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	1
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	0
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	0

Patientennummer	173	175	181	183	184	185	186	187	190	192	193	194	196
Alter	69	70	70	47	56	66	69	74	61	79	75	54	76
Geschlecht m=0; w=1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Gewicht [kg]	90	54	94	77	96	63	84	83	70	78	85	81	64
Größe [m]	1,81	1,68	1,88	1,53	1,90	1,70	1,74	1,78	1,80	1,76	1,83	1,83	1,74
BMI [kg/m ²]	27,5	19,1	26,6	32,9	26,6	21,8	27,7	26,2	21,6	25,2	25,4	24,2	21,1
W_S1PR1	nd	nd	1,30	nd	nd	1,13	nd	nd	0,24	nd	0,50	nd	2,37
W_S1PR2	nd	nd	- 0,72	nd	nd	- 0,74	nd	nd	- 1,26	nd	- 1,60	nd	0,46
W_S1PR3	nd	nd	2,25	nd	nd	1,59	nd	nd	1,91	nd	2,54	nd	0,83
W_CD31	nd	nd	4,83	nd	nd	4,56	nd	nd	4,14	nd	2,76	nd	6,10
W_CD68	nd	nd	3,51	nd	nd	3,75	nd	nd	2,35	nd	1,82	nd	3,61
W_Myh11	nd	nd	7,06	nd	nd	7,84	nd	nd	8,45	nd	8,87	nd	7,62
W_CD45	nd	nd	- 3,09	nd	nd	- 4,99	nd	nd	- 5,43	nd	- 6,55	nd	- 4,74
P_S1PR1	nd	nd	0,49	nd	nd	- 0,05	0,30	nd	- 2,70	- 0,71	0,38	nd	- 1,75
P_S1PR2	nd	nd	- 1,80	nd	nd	- 0,84	- 1,17	nd	- 2,21	- 0,98	- 1,04	nd	- 1,41
P_S1PR3	nd	nd	- 1,76	nd	nd	0,73	0,46	nd	0,85	0,24	1,69	nd	1,31
P_CD31	nd	nd	3,75	nd	nd	2,52	3,79	nd	0,87	2,67	3,30	nd	2,46
P_CD68	nd	nd	4,53	nd	nd	5,10	4,97	nd	1,41	3,76	3,50	nd	2,76
P_Myh11	nd	nd	3,28	nd	nd	6,67	6,93	nd	7,61	5,82	7,66	nd	8,13
P_CD45	nd	nd	- 3,91	nd	nd	- 6,66	- 1,30	nd	- 9,35	- 2,74	- 5,12	nd	- 4,35
Restenosegrad 3M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Restenosegrad 6M	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Restenosegrad 12M	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
höchster Restenosegrad	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Serum_S1P	1,32	1,48	1,73	1,71	1,58	2,09	1,54	1,31	1,09	1,15	0,68	1,64	1,45
Plasma_S1P	0,76	0,79	1,16	0,67	1,17	1,12	0,68	0,97	0,87	0,68	0,46	0,86	0,77
ASS, 0=nein 1=ja	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
NOAK, 0=nein 1=ja	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Statin, 0=nein 1=ja	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Betablocker, 0=nein 1=ja	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	4,17	5,24	4,42	4,77	4,23	3,92	4,29	4,84	4,11	4,01	3,93	4,02	4,53
Leukozyten [Mrd/l]	7,2	6,7	7,0	9,5	8,5	9,8	6,3	9,4	7,9	5,1	6,4	5,7	9,6
Thrombozyten[Mrd/l]	167	276	281	267	208	430	225	257	199	136	98	287	262
Hämoglobin [g/dl]	13,8	17,6	14,4	14,7	12,6	10,4	12,8	14,4	11,8	12,7	13,7	13,1	14,7
Hämatokrit [%]	42,6	52,5	40,8	44,8	37,1	34,1	40,5	41,1	35,8	38,9	40,6	39,0	43,2
Kreatinin [mg/dl]	0,78	0,57	0,86	0,67	1,2	0,87	1,2	0,85	0,83	0,98	1	1,2	0,95
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	152	nd	143	140	131	168	171	144	101	160	188	203	170
Triglyzeride [mg/dl]	122	nd	97	109	337	71	182	330	75	78	114	452	92
HDL-Cholesterin [mg/dl]	59	nd	64	52	40	71	49	32	34	57	64	43	61
LDL-Cholesterin [mg/dl]	69	nd	60	66	24	83	86	46	52	87	101	nd	91
c-reaktives Protein [mg/l]	5	40	5	5	5	48	5	5	9	5	5	6	5
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	1	nd	1	nd	0	0	0	nd	0
Einblutung, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	0	nd	1	nd	0	0	0	nd	0
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	0	nd	0	nd	1	0	0	nd	0
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	0	nd	0	nd	0	0	0	nd	0

Patientennummer	198	204	206	207	209	211	216	223	224	225	228	244	245
Alter	77	70	74	92	71	80	74	82	63	74	68	66	78
Geschlecht m=0; w=1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
Gewicht [kg]	70	75	47	55	72	72	88	93	64	57	60	63	73
Größe [m]	1,80	1,81	1,54	1,60	1,70	1,78	1,78	1,75	1,80	1,65	1,63	1,75	1,83
BMI [kg/m ²]	21,6	22,9	19,8	21,5	24,9	22,7	27,8	30,4	19,8	20,9	22,6	20,6	21,8
W_S1PR1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,25	nd	nd	0,21	nd	nd	- 1,57
W_S1PR2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 1,19	nd	nd	- 1,48	nd	nd	- 1,64
W_S1PR3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,16	nd	nd	1,57	nd	nd	1,58
W_CD31	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,50	nd	nd	2,99	nd	nd	2,13
W_CD68	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,28	nd	nd	2,09	nd	nd	3,06
W_Myh11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,79	nd	nd	7,46	nd	nd	7,18
W_CD45	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 4,41	nd	nd	- 7,09	nd	nd	- 4,32
P_S1PR1	- 0,32	nd	nd	0,35	nd	nd	- 1,21	nd	nd	nd	nd	nd	- 1,01
P_S1PR2	- 1,05	nd	nd	0,00	nd	nd	- 2,48	nd	nd	nd	nd	nd	- 0,35
P_S1PR3	- 0,51	nd	nd	0,58	nd	nd	1,81	nd	nd	nd	nd	nd	1,54
P_CD31	3,53	nd	nd	4,26	nd	nd	1,61	nd	nd	nd	nd	nd	1,94
P_CD68	5,65	nd	nd	5,97	nd	nd	2,63	nd	nd	nd	nd	nd	4,19
P_Myh11	6,06	nd	nd	6,55	nd	nd	7,93	nd	nd	nd	nd	nd	7,31
P_CD45	- 5,57	nd	nd	- 3,97	nd	nd	- 5,70	nd	nd	nd	nd	nd	- 5,58
Restenosegrad 3M	0	0	0	nd	0	0	1	0	0	0	nd	0	nd
Restenosegrad 6M	nd	0	0	nd	nd	nd	1	0	0	0	3	nd	nd
Restenosegrad 12M	nd	0	0	nd	nd	nd	1	0	nd	0	nd	nd	nd
höchster Restenosegrad	0	0	0	nd	0	0	1	0	0	0	3	0	nd
Serum_S1P	1,11	1,86	1,69	1,14	1,25	1,61	1,13	0,95	1,67	1,37	1,20	1,73	1,57
Plasma_S1P	1,06	1,06	0,95	0,83	0,88	1,26	0,69	nd	0,80	1,22	1,00	1,29	0,95
ASS, 0=nein 1=ja	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NOAK, 0=nein 1=ja	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Statin, 0=nein 1=ja	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
Betablocker, 0=nein 1=ja	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	3,78	4,85	4,06	3,90	4,63	4,84	4,30	3,93	3,09	3,77	4,04	4,21	3,42
Leukozyten [Mrd/l]	7,4	9,8	8,4	15,1	6,1	8,0	5,3	8,0	7,0	7,0	6,6	6,2	14,1
Thrombozyten[Mrd/l]	269	343	325	444	243	240	207	180	401	169	149	213	172
Hämoglobin [g/dl]	10,3	13,8	12,3	11,0	11,1	14,2	13,3	13,0	13,0	11,6	13,4	13,0	9,9
Hämatokrit [%]	32,7	41,9	37,0	33,4	34,1	43,8	38,1	38,0	39,2	35,3	41,7	38,5	29,7
Kreatinin [mg/dl]	1,3	1	1,1	0,92	1	0,81	1,1	1,1	0,7	0,69	0,66	0,87	0,92
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	175	150	221	139	154	235	140	145	108	195	169	313	136
Triglyzeride [mg/dl]	106	85	137	89	214	158	141	133	71	160	240	230	61
HDL-Cholesterin [mg/dl]	46	35	52	58	45	64	51	48	72	78	43	70	66
LDL-Cholesterin [mg/dl]	108	98	142	63	66	139	61	70	22	85	78	197	58
c-reaktives Protein [mg/l]	16	5	5	49	6	5	5	5	5	5	15	5	5
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	0	nd	nd	0	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	0
Einblutung, 0=nein 1=ja	1	nd	nd	0	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	0
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	1	nd	nd	0	nd	nd	1	nd	nd	nd	nd	nd	0
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	0	nd	nd	0	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	0

Patientennummer	248	252	253	254	261	266	267	268	269	275	276	278	282
Alter	60	78	64	61	59	72	63	78	49	71	75	65	82
Geschlecht m=0; w=1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
Gewicht [kg]	88	66	82	80	102	83	73	60	74	75	81	90	60
Größe [m]	1,80	1,51	1,86	1,84	1,68	1,70	1,64	1,76	1,70	1,65	1,76	1,84	1,58
BMI [kg/m ²]	27,2	28,9	23,7	23,6	36,1	28,7	27,1	19,4	25,6	27,5	26,1	26,6	24,0
W_S1PR1	nd	1,68	0,13	3,68	nd								
W_S1PR2	nd	-	-	-	nd								
W_S1PR3	nd	0,86	2,36	1,22	nd								
W_CD31	nd	1,49	1,32	2,18	nd								
W_CD68	nd	4,92	3,10	-	nd								
W_Myh11	nd	-	-	-	nd								
W_CD45	nd	2,76	3,15	0,82	nd								
P_S1PR1	nd	7,92	7,65	8,19	nd								
P_S1PR2	nd	2,72	4,37	9,87	nd								
P_S1PR3	-	1,82	nd	-	nd	nd	0,34	-	nd	nd	nd	0,47	-
P_CD31	1,52	-	-	0,32	nd	nd	-	1,15	nd	nd	nd	-	3,00
P_CD68	-	-	nd	-	nd	nd	-	-	nd	nd	nd	-	-
P_Myh11	1,97	1,09	nd	1,28	nd	nd	1,95	2,37	nd	nd	nd	0,57	2,75
P_CD45	0,30	1,41	nd	0,05	nd	nd	0,58	1,77	nd	nd	nd	0,41	-
Restenosegrad 3M	2,02	4,64	nd	2,78	nd	nd	4,12	1,81	nd	nd	nd	3,86	1,54
Restenosegrad 6M	2,53	5,44	nd	4,33	nd	nd	4,55	1,40	nd	nd	nd	4,79	3,31
Restenosegrad 12M	6,89	6,63	nd	6,38	nd	nd	6,00	7,76	nd	nd	nd	5,88	5,83
höchster Restenosegrad	-	-	nd	-	nd	nd	-	-	nd	nd	nd	-	-
Serum S1P	6,02	0,75	nd	6,73	nd	nd	3,84	9,39	nd	nd	nd	1,54	5,29
Plasma S1P	0	0	0	nd	1	nd	nd	0	nd	nd	0	0	nd
ASS, 0=nein 1=ja	0	0	0	1	1	0	nd	nd	nd	nd	0	0	3
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	0	0	1	2	1	0	nd	nd	nd	nd	0	0	nd
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NOAK, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Statin, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Betablocker, 0=nein 1=ja	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	5,35	5,08	2,94	5,26	4,87	4,81	2,90	4,41	4,43	4,33	4,48	4,43	4,73
Leukozyten [Mrd/l]	11,0	11,2	5,0	7,3	6,8	7,7	7,9	7,9	9,4	7,9	8,9	10,1	6,1
Thrombozyten[Mrd/l]	207	246	260	140	181	151	189	360	328	190	241	230	255
Hämoglobin [g/dl]	17,3	14,7	8,0	16,7	14,7	14,3	9,5	13,0	12,3	13,6	13,6	12,1	14,0
Hämatokrit [%]	52,4	43,0	26,0	49,5	43,0	42,5	30,7	37,7	37,1	41,3	41,4	35,1	43,2
Kreatinin [mg/dl]	1	0,82	1,6	1,3	0,97	1,5	1,4	0,8	0,88	0,74	0,88	2,8	0,54
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	175	172	149	150	121	157	137	178	159	170	119	109	272
Triglyzeride [mg/dl]	205	87	124	249	115	599	187	79	99	67	54	198	330
HDL-Cholesterin [mg/dl]	66	50	50	33	51	37	22	90	37	73	53	31	41
LDL-Cholesterin [mg/dl]	68	105	74	67	47	nd	78	72	102	84	55	38	165
c-reaktives Protein [mg/l]	5	5	5	6	14	5	25	5	32	5	5	10	9
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	1	0	nd	1	nd	nd	1	0	nd	nd	nd	1	0
Einblutung, 0=nein 1=ja	0	0	nd	1	nd	nd	0	0	nd	nd	nd	0	0
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	1	1	nd	0	nd	nd	0	1	nd	nd	nd	0	0
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	0	0	nd	0	nd	nd	0	0	nd	nd	nd	0	0

Patientennummer	287	289	292	295	296	299	301	302	303	305	306	307	308
Alter	74	71	76	63	62	54	72	81	61	54	60	61	63
Geschlecht m=0; w=1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Gewicht [kg]	120	88	66	73	90	88	80	73	65	63	82	85	68
Größe [m]	1,80	1,82	1,60	1,78	1,94	1,73	1,68	1,74	1,71	1,64	1,73	1,85	1,72
BMI [kg/m ²]	37,0	26,6	25,8	23,0	23,9	29,4	28,3	24,1	22,2	23,4	27,4	24,8	23,0
W_S1PR1	nd	nd	nd	nd	0,61	nd	nd	2,30	nd	nd	-5,63	nd	1,13
W_S1PR2	nd	nd	nd	nd	-0,30	nd	nd	-0,22	nd	nd	-2,45	nd	-1,02
W_S1PR3	nd	nd	nd	nd	1,83	nd	nd	1,54	nd	nd	2,45	nd	1,20
W_CD31	nd	nd	nd	nd	4,45	nd	nd	5,69	nd	nd	-2,12	nd	4,71
W_CD68	nd	nd	nd	nd	4,76	nd	nd	3,67	nd	nd	-0,12	nd	2,69
W_Myh11	nd	nd	nd	nd	7,04	nd	nd	7,45	nd	nd	9,49	nd	7,04
W_CD45	nd	nd	nd	nd	-5,04	nd	nd	-3,67	nd	nd	-9,31	nd	-5,84
P_S1PR1	0,73	1,03	nd	-1,45	0,13	nd	nd	-1,79	nd	nd	nd	nd	nd
P_S1PR2	-1,90	-0,48	nd	-1,79	-1,64	nd	nd	-1,65	nd	nd	nd	nd	nd
P_S1PR3	0,39	-0,33	nd	0,06	0,24	nd	nd	1,24	nd	nd	nd	nd	nd
P_CD31	3,90	4,44	nd	1,90	3,64	nd	nd	1,66	nd	nd	nd	nd	nd
P_CD68	5,50	6,05	nd	3,06	4,89	nd	nd	2,68	nd	nd	nd	nd	nd
P_Myh11	5,53	5,20	nd	6,91	3,58	nd	nd	6,95	nd	nd	nd	nd	nd
P_CD45	-3,82	-2,31	nd	-7,06	-4,08	nd	nd	-5,36	nd	nd	nd	nd	nd
Restenosegrad 3M	nd	0	nd	nd	0	0	0	0	0	0	1	nd	0
Restenosegrad 6M	nd	0	3	nd	0	0	3	0	0	2	1	nd	0
Restenosegrad 12M	nd	nd	nd	nd	0	0	nd	0	0	2	nd	nd	0
höchster Restenosegrad	nd	0	3	nd	0	0	3	0	0	2	1	nd	0
Serum S1P	2,50	1,69	1,25	1,80	1,63	1,94	1,11	1,23	2,31	1,48	1,30	2,37	1,89
Plasma S1P	0,90	1,62	0,98	1,19	0,88	1,22	0,81	0,77	1,31	0,85	0,79	1,44	1,32
ASS, 0=nein 1=ja	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NOAK, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Statin, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Betablocker, 0=nein 1=ja	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	3,67	4,31	4,12	4,60	4,39	4,89	4,22	4,70	4,66	4,56	3,75	4,55	4,19
Leukozyten [Mrd/l]	14,7	11,4	6,9	7,3	12,9	8,7	5,0	6,1	7,8	7,4	4,9	10,7	7,8
Thrombozyten[Mrd/l]	592	299	240	179	268	176	155	226	228	331	193	271	256
Hämoglobin [g/dl]	9,9	13,8	13,3	14,4	14,0	15,8	11,2	14,2	15,5	12,2	13,3	15,2	14,6
Hämatokrit [%]	31,2	40,8	38,6	42,2	39,6	46,7	36,3	40,3	44,6	36,4	36,4	44,7	41,1
Kreatinin [mg/dl]	0,89	1,2	0,93	0,81	1,5	0,69	1,4	1,1	0,92	0,91	0,71	1,1	0,77
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	110	193	210	142	145	120	199	144	173	153	196	145	193
Triglyzeride [mg/dl]	126	110	386	117	143	326	116	150	86	243	291	104	84
HDL-Cholesterin [mg/dl]	29	78	43	72	43	35	70	58	70	48	48	56	77
LDL-Cholesterin [mg/dl]	56	93	90	47	73	20	106	56	86	56	90	68	99
c-reaktives Protein [mg/l]	141	5	7	5	20	5	5	5	5	5	5	5	5
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	1	0	nd	0	0	nd	nd	0	nd	nd	1	nd	0
Einblutung, 0=nein 1=ja	0	0	nd	0	0	nd	nd	0	nd	nd	0	nd	0
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	1	0	nd	0	0	nd	nd	0	nd	nd	1	nd	0
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	0	0	nd	0	0	nd	nd	0	nd	nd	0	nd	0

Patientennummer	311	312	314	315	316	318	319	320	321	322	323	324	325
Alter	76	76	70	76	70	84	83	80	64	75	57	80	70
Geschlecht m=0; w=1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Gewicht [kg]	48	80	65	72	65	75	82	79	75	60	65	76	94
Größe [m]	1,52	1,68	1,78	1,74	1,72	1,55	1,68	1,72	1,74	1,63	1,83	1,78	1,68
BMI [kg/m ²]	20,8	28,3	20,5	23,8	22,0	31,2	29,1	26,7	24,8	22,6	19,4	24,0	33,3
W_S1PR1	nd	nd	nd	2,69	nd	nd	1,74	nd	nd	0,25	1,81	nd	nd
W_S1PR2	nd	nd	nd	0,66	nd	nd	0,50	nd	nd	1,86	1,52	nd	nd
W_S1PR3	nd	nd	nd	0,66	nd	nd	0,17	nd	nd	1,67	3,00	nd	nd
W_CD31	nd	nd	nd	6,28	nd	nd	4,86	nd	nd	3,16	2,96	nd	nd
W_CD68	nd	nd	nd	2,67	nd	nd	5,51	nd	nd	2,55	3,38	nd	nd
W_Myh11	nd	nd	nd	5,76	nd	nd	4,24	nd	nd	8,31	7,88	nd	nd
W_CD45	nd	nd	nd	2,20	nd	nd	2,15	nd	nd	5,33	5,03	nd	nd
P_S1PR1	0,08	0,50	nd	1,31	1,86	nd	0,25	nd	nd	1,43	0,21	0,20	nd
P_S1PR2	1,02	1,50	nd	1,41	1,63	nd	1,00	nd	nd	2,24	0,59	1,21	nd
P_S1PR3	5,43	0,77	nd	1,61	1,34	nd	1,43	nd	nd	0,54	0,98	1,01	nd
P_CD31	3,78	2,57	nd	5,12	1,67	nd	1,40	nd	nd	4,69	2,81	3,15	nd
P_CD68	6,84	2,96	nd	2,97	3,79	nd	3,05	nd	nd	5,05	4,62	4,00	nd
P_Myh11	1,48	7,23	nd	8,16	5,28	nd	5,55	nd	nd	6,17	6,60	6,95	nd
P_CD45	4,05	6,84	nd	5,49	6,06	nd	5,15	nd	nd	3,63	4,92	5,26	nd
Restenosegrad 3M	2	0	0	0	0	nd	0	0	nd	0	0	0	0
Restenosegrad 6M	nd	0	0	0	0	nd	0	0	nd	0	0	0	1
Restenosegrad 12M	nd	0	0	0	0	nd	0	0	nd	nd	0	0	2
höchster Restenosegrad	2	0	0	0	0	nd	0	0	nd	0	0	0	2
Serum S1P	1,31	1,05	1,72	1,75	2,43	2,04	1,60	1,41	1,76	2,25	1,86	2,08	2,43
Plasma S1P	1,38	0,71	1,02	1,01	1,38	1,52	0,80	0,75	0,80	0,89	0,74	1,23	1,04
ASS, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NOAK, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Statin, 0=nein 1=ja	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Betablocker, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	3,43	4,51	4,70	3,79	4,19	3,81	4,64	4,62	3,77	4,43	4,00	4,69	4,82
Leukozyten [Mrd/l]	5,9	6,4	9,7	7,2	10,0	5,2	5,6	6,4	9,1	8,3	8,1	7,2	6,1
Thrombozyten[Mrd/l]	247	189	190	204	228	145	150	209	229	247	299	239	198
Hämoglobin [g/dl]	12,0	13,7	14,6	10,2	13,3	10,8	13,1	13,9	13,4	13,7	11,3	14,4	13,8
Hämatokrit [%]	33,8	40,8	44,3	30,8	40,1	33,6	40,0	40,9	38,5	40,3	35,2	43,0	41,8
Kreatinin [mg/dl]	0,81	1,6	0,86	1,4	0,91	2,3	1,3	1,1	0,86	0,66	1,7	0,92	0,99
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	182	214	129	110	164	263	164	122	115	154	115	129	135
Triglyzeride [mg/dl]	95	175	209	123	176	236	119	116	74	117	187	158	208
HDL-Cholesterin [mg/dl]	54	75	47	50	40	59	60	60	40	62	43	39	43
LDL-Cholesterin [mg/dl]	109	104	40	35	89	157	80	39	60	69	35	58	50
c-reaktives Protein [mg/l]	5	5	5	9	12	16	5	5	5	5	56	5	5
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	0	0	nd	1	1	nd	0	nd	nd	0	0	0	nd
Einblutung, 0=nein 1=ja	1	0	nd	0	0	nd	0	nd	nd	0	0	0	nd
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	1	0	nd	0	1	nd	0	nd	nd	0	0	1	nd
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	0	0	nd	0	0	nd	0	nd	nd	0	0	0	nd

Patientennummer	326	327	328	329	330	334	337	338	340	346	347	350	351
Alter	66	60	87	58	73	83	72	64	74	73	64	48	69
Geschlecht m=0; w=1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
Gewicht [kg]	64	99	86	118	79	77	85	64	80	70	55	60	75
Größe [m]	1,60	1,76	1,73	1,92	1,72	1,64	1,72	1,53	1,80	1,72	1,57	1,69	1,80
BMI [kg/m ²]	25,0	32,0	28,7	32,0	26,7	28,6	28,7	27,3	24,7	23,7	22,3	21,0	23,1
W_S1PR1	nd	nd	2,35	nd	nd	nd	nd	nd	2,30	nd	nd	nd	nd
W_S1PR2	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd
W_S1PR3	nd	nd	0,05	nd	nd	nd	nd	nd	0,78	nd	nd	nd	nd
W_CD31	nd	nd	5,91	nd	nd	nd	nd	nd	6,11	nd	nd	nd	nd
W_CD68	nd	nd	3,13	nd	nd	nd	nd	nd	3,19	nd	nd	nd	nd
W_Myh11	nd	nd	7,20	nd	nd	nd	nd	nd	7,20	nd	nd	nd	nd
W_CD45	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd
P_S1PR1	nd	-	1,82	-	nd	0,13	1,29	-	-	-	nd	-	nd
P_S1PR2	nd	0,34	0,45	0,57	nd	0,57	0,88	0,88	0,71	0,21	2,04	1,70	nd
P_S1PR3	nd	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-
P_CD31	nd	0,26	0,29	0,74	nd	2,22	0,31	2,46	1,66	0,02	nd	0,10	nd
P_CD68	nd	3,44	5,21	3,46	nd	3,07	4,87	2,20	3,24	1,15	nd	2,28	nd
P_Myh11	nd	5,11	4,08	5,16	nd	6,80	5,94	5,01	2,91	2,23	nd	3,66	nd
P_CD45	nd	6,47	6,62	5,62	nd	2,88	4,08	3,58	7,87	6,77	nd	6,25	nd
Restenosegrad 3M	0	0	0	nd	0	0	1	nd	nd	0	0	0	nd
Restenosegrad 6M	0	0	nd	nd	0	0	1	nd	nd	0	0	0	nd
Restenosegrad 12M	0	0	nd	nd	0	nd	0	nd	nd	0	0	0	nd
höchster Restenosegrad	0	0	0	nd	0	0	1	nd	nd	0	0	0	nd
Serum S1P	1,74	2,90	1,81	2,06	2,11	1,93	2,43	2,00	2,21	1,79	2,82	1,94	2,38
Plasma S1P	0,85	1,50	0,95	0,79	1,20	0,73	0,96	1,03	1,51	1,30	1,50	0,74	1,22
ASS, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NOAK, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Statin, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
Betablocker, 0=nein 1=ja	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	4,12	4,26	3,79	4,87	3,93	4,43	4,91	4,15	4,02	4,46	5,42	3,54	4,59
Leukozyten [Mrd/l]	5,2	7,3	6,1	6,7	7,5	7,2	7,9	6,3	6,2	8,6	13,5	6,8	8,9
Thrombozyten [Mrd/l]	276	179	133	171	185	244	250	245	173	251	365	241	241
Hämoglobin [g/dl]	12,9	12,5	11,5	15,0	14,3	12,8	14,3	12,0	14,1	14,8	14,3	8,6	15,5
Hämatokrit [%]	38,2	37,9	35,3	46,9	40,6	38,5	43,9	36,6	43,7	44,6	45,0	25,6	45,1
Kreatinin [mg/dl]	0,58	0,82	1,6	0,78	0,94	1	1	0,56	0,84	0,87	0,52	0,75	1
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	222	174	196	200	157	177	255	149	137	244	223	114	275
Triglyzeride [mg/dl]	147	216	205	121	136	139	197	202	84	158	208	63	359
HDL-Cholesterin [mg/dl]	71	59	61	48	52	48	63	42	62	71	51	42	40
LDL-Cholesterin [mg/dl]	122	72	94	128	78	101	153	67	58	141	130	59	163
c-reaktives Protein [mg/l]	5	5	5	7	5	11	5	16	16	5	5	30	11
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	nd	0	0	0	nd	0	0	0	0	1	nd	0	nd
Einblutung, 0=nein 1=ja	nd	1	0	0	nd	0	0	0	1	1	nd	0	nd
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	nd	1	0	0	nd	0	1	0	1	0	nd	0	nd
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	nd	0	0	0	nd	0	1	0	0	0	nd	0	nd

Patientennummer	353	354	355	356	359	360	361	364	366	368	371	374	376
Alter	72	61	77	58	77	71	70	63	81	69	52	67	72
Geschlecht m=0; w=1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
Gewicht [kg]	56	85	72	106	86	85	45	81	54	139	52	52	82
Größe [m]	1,68	1,87	1,59	1,78	1,79	1,83	1,66	1,60	1,58	1,96	1,65	1,60	1,78
BMI [kg/m ²]	19,8	24,3	28,5	33,5	26,8	25,4	16,3	31,6	21,6	36,2	19,1	20,3	25,9
W_S1PR1	nd	nd	nd	nd	0,89	2,03	nd	nd	nd	nd	nd	1,50	0,74
W_S1PR2	nd	nd	nd	nd	- 0,12	0,04	nd	nd	nd	nd	nd	- 0,03	- 1,30
W_S1PR3	nd	nd	nd	nd	0,62	2,07	nd	nd	nd	nd	nd	1,82	2,81
W_CD31	nd	nd	nd	nd	4,59	5,26	nd	nd	nd	nd	nd	4,72	4,39
W_CD68	nd	nd	nd	nd	5,54	3,32	nd	nd	nd	nd	nd	3,83	2,93
W_Myh11	nd	nd	nd	nd	5,33	7,85	nd	nd	nd	nd	nd	6,78	8,30
W_CD45	nd	nd	nd	nd	- 2,64	- 4,13	nd	nd	nd	nd	nd	- 3,25	- 3,97
P_S1PR1	nd	nd	nd	nd	nd	0,62	0,86	nd	nd	nd	- 0,15	nd	- 0,31
P_S1PR2	nd	nd	nd	nd	nd	- 0,49	- 1,28	nd	nd	nd	1,99	nd	- 1,03
P_S1PR3	nd	nd	nd	nd	nd	0,37	2,10	nd	nd	nd	- 0,85	nd	0,26
P_CD31	nd	nd	nd	nd	nd	3,93	4,04	nd	nd	nd	2,94	nd	3,45
P_CD68	nd	nd	nd	nd	nd	5,34	4,35	nd	nd	nd	4,57	nd	4,26
P_Myh11	nd	nd	nd	nd	nd	6,20	8,00	nd	nd	nd	5,81	nd	5,74
P_CD45	nd	nd	nd	nd	nd	- 3,27	- 5,77	nd	nd	nd	- 3,83	nd	- 5,31
Restenosegrad 3M	0	0	nd	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Restenosegrad 6M	0	0	nd	0	0	nd	0	0	1	0	0	0	3
Restenosegrad 12M	2	0	nd	0	2	nd	0	1	1	0	0	0	0
höchster Restenosegrad	2	0	nd	0	2	1	0	1	1	0	0	0	3
Serum S1P	2,26	1,82	2,08	2,23	1,21	1,92	1,86	2,17	2,13	1,59	2,25	1,33	2,35
Plasma S1P	1,62	0,89	1,29	1,13	0,58	2,00	1,31	1,10	1,08	0,94	0,85	0,91	1,09
ASS, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NOAK, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
Statin, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Betablocker, 0=nein 1=ja	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Erythrozyten [Mrd/ml]	4,73	3,91	4,19	4,59	3,93	3,96	4,63	4,67	4,22	4,14	4,10	4,65	4,41
Leukozyten [Mrd/l]	6,7	5,9	7,9	7,8	5,3	10,2	7,5	7,2	5,3	4,9	8,4	6,9	7,2
Thrombozyten[Mrd/l]	213	167	250	142	173	312	258	338	335	195	228	230	349
Hämoglobin [g/dl]	15,1	13,4	13,6	15,7	12,4	12,7	14,6	13,6	11,8	12,7	13,9	14,8	12,6
Hämatokrit [%]	46,7	40,0	39,7	44,0	37,9	37,1	45,0	42,1	37,9	38,3	42,3	44,1	38,0
Kreatinin [mg/dl]	0,75	0,88	0,86	0,81	1,3	2,1	0,82	0,92	1,3	1,2	4,5	0,71	1
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	110	133	159	157	131	158	223	154	214	178	151	158	214
Triglyzeride [mg/dl]	423	343	132	466	106	783	103	154	313	243	162	88	282
HDL-Cholesterin [mg/dl]	34	39	45	26	51	23	119	62	36	36	73	63	43
LDL-Cholesterin [mg/dl]	nd	25	88	nd	59	nd	83	61	115	93	46	77	115
c-reaktives Protein [mg/l]	5	5	5	8	5	5	5	5	14	5	15	5	5
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	0	0	1	nd	1	nd	nd	nd	1
Einblutung, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	0	0	1	nd	1	nd	nd	nd	0
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	0	0	1	nd	0	nd	nd	nd	0
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	1	0	0	nd	0	nd	nd	nd	0

Patientennummer	377	380	381	385	387	388	389	391	394	395	398	399	400
Alter	68	68	55	69	72	78	79	79	72	83	85	51	72
Geschlecht m=0; w=1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gewicht [kg]	94	104	81	55	108	65	72	77	53	70	70	71	111
Größe [m]	1,90	1,75	1,75	1,60	1,85	1,75	1,68	1,96	1,78	1,83	1,66	1,80	1,80
BMI [kg/m ²]	26,0	34,0	26,4	21,5	31,6	21,2	25,5	20,0	16,7	20,9	25,4	21,9	34,3
W_S1PR1	2,49	- 1,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,35	nd	nd	nd	1,88
W_S1PR2	- 0,57	- 2,06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 1,62	nd	nd	nd	- 0,29
W_S1PR3	0,54	3,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,83	nd	nd	nd	1,90
W_CD31	6,21	2,48	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,84	nd	nd	nd	4,55
W_CD68	3,22	0,60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,35	nd	nd	nd	4,33
W_Myh11	5,91	9,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,57	nd	nd	nd	7,17
W_CD45	- 2,02	- 6,85	nd	nd	nd	nd	nd	nd	- 5,35	nd	nd	nd	- 3,32
P_S1PR1	- 0,64	0,45	- 0,93	- 3,43	0,85	- 0,35	nd	nd	- 0,76	- 2,60	nd	nd	0,71
P_S1PR2	- 1,85	- 0,45	- 0,46	- 2,19	- 0,63	- 1,12	nd	nd	- 1,66	- 2,17	nd	nd	0,54
P_S1PR3	2,20	0,87	0,80	- 1,99	- 0,17	0,47	nd	nd	1,71	1,36	nd	nd	2,24
P_CD31	2,16	nd	- 0,26	0,74	3,35	2,20	nd	nd	2,66	1,33	nd	nd	3,81
P_CD68	3,58	nd	3,15	4,00	4,79	3,47	nd	nd	4,22	3,69	nd	nd	6,15
P_Myh11	7,97	7,09	7,23	1,40	4,43	7,21	nd	nd	7,69	6,87	nd	nd	6,43
P_CD45	- 5,61	nd	nd	- 6,96	- 2,13	- 5,86	nd	nd	- 5,55	- 8,78	nd	nd	- 4,12
Restenosegrad 3M	0	0	3	0	1	nd	0	0	0	0	0	4	3
Restenosegrad 6M	0	4	nd	nd	nd	nd	0	0	nd	0	0	nd	nd
Restenosegrad 12M	0	nd	nd	0	0	nd	0	nd	nd	nd	0	nd	nd
höchster Restenosegrad	0	4	3	0	1	nd	0	0	0	0	0	4	3
Serum S1P	1,94	2,28	3,57	1,48	1,29	1,65	2,51	2,21	1,62	1,76	2,15	2,30	2,22
Plasma S1P	1,23	1,07	1,05	0,61	0,80	0,80	1,49	1,36	0,84	1,23	1,25	1,25	1,47
ASS, 0=nein 1=ja	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
NOAK, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Statin, 0=nein 1=ja	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
Betablocker, 0=nein 1=ja	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Erythrozyten [Mrd/ml]	6,71	4,21	4,68	3,09	4,80	4,21	4,81	4,52	3,81	5,32	4,03	3,76	4,92
Leukozyten [Mrd/l]	8,8	8,4	13,3	8,3	7,5	10,5	8,9	5,6	7,2	6,7	6,7	10,7	7,6
Thrombozyten[Mrd/l]	165	345	490	261	186	257	323	238	296	285	190	701	236
Hämoglobin [g/dl]	17,6	12,4	14,0	8,9	14,6	13,5	14,3	13,9	10,3	15,1	12,3	9,6	14,7
Hämatokrit [%]	54,7	38,5	44,6	26,0	43,8	40,6	43,0	42,0	32,1	45,7	36,6	31,0	44,8
Kreatinin [mg/dl]	1,9	1,7	0,97	0,48	0,86	1,40	0,77	0,92	1,00	1,20	2,10	0,86	2,30
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	206	255	294	nd	129	169	180	239	142	207	nd	229	130
Triglyzeride [mg/dl]	255	256	368	nd	294	108	83	132	55	121	nd	177	195
HDL-Cholesterin [mg/dl]	38	57	35	nd	36	74	66	84	80	54	nd	39	26
LDL-Cholesterin [mg/dl]	117	147	185	nd	34	73	97	129	51	129	nd	155	65
c-reaktives Protein [mg/l]	5	5	9	53	5	5	5	5	32	5	5	35	11
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	nd	nd	0
Einblutung, 0=nein 1=ja	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	nd	nd	0
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	nd	nd	0
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	nd	0

Patientennummer	401	402	403	404	405	406	407	410	411	415	416	418	419
Alter	82	72	59	81	71	65	63	64	75	72	74	73	69
Geschlecht m=0; w=1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Gewicht [kg]	55	90	95	80	118	64	64	69	81	nd	nd	nd	nd
Größe [m]	1,65	1,82	1,82	1,78	1,80	1,64	1,60	1,62	1,80	nd	nd	nd	nd
BMI [kg/m ²]	20,2	27,2	28,7	25,2	36,4	23,8	25,0	26,3	25,0	nd	nd	nd	nd
W_S1PR1	nd	nd	nd	nd	nd	1,72	nd	1,95	1,71	nd	nd	nd	nd
W_S1PR2	nd	nd	nd	nd	nd	- 0,91	nd	2,30	- 0,34	nd	nd	nd	nd
W_S1PR3	nd	nd	nd	nd	nd	2,37	nd	1,79	2,08	nd	nd	nd	nd
W_CD31	nd	nd	nd	nd	nd	5,27	nd	3,92	4,06	nd	nd	nd	nd
W_CD68	nd	nd	nd	nd	nd	2,71	nd	3,76	2,29	nd	nd	nd	nd
W_Myh11	nd	nd	nd	nd	nd	8,78	nd	7,20	7,68	nd	nd	nd	nd
W_CD45	nd	nd	nd	nd	nd	- 5,88	nd	- 3,60	- 6,68	nd	nd	nd	nd
P_S1PR1	- 1,23	- 3,16	1,76	nd	nd	0,67	0,23	0,01	- 0,01	nd	nd	nd	nd
P_S1PR2	- 0,16	- 2,41	2,28	nd	nd	0,30	- 1,10	0,22	- 0,69	nd	nd	nd	nd
P_S1PR3	- 2,08	3,52	2,66	nd	nd	- 0,72	- 0,13	0,38	0,31	nd	nd	nd	nd
P_CD31	3,47	- 0,30	nd	nd	nd	4,56	3,69	3,27	3,13	nd	nd	nd	nd
P_CD68	4,84	1,07	nd	nd	nd	5,04	5,64	4,39	5,19	nd	nd	nd	nd
P_Myh11	5,21	8,80	nd	nd	nd	5,23	4,73	6,59	4,94	nd	nd	nd	nd
P_CD45	- 5,05	- 6,86	3,10	nd	nd	- 4,45	- 2,62	- 4,13	- 4,36	nd	nd	nd	nd
Restenosegrad 3M	1	2	0	0	2	0	0	0	0	nd	nd	nd	0
Restenosegrad 6M	1	3	0	0	2	0	0	0	0	nd	nd	nd	0
Restenosegrad 12M	nd	nd	0	0	0	0	0	nd	0	nd	nd	nd	nd
höchster Restenosegrad	1	3	0	0	2	0	0	0	0	0	nd	0	0
Serum_S1P	2,09	1,93	1,92	1,29	1,69	2,40	1,66	1,49	nd	1,80	1,19	1,17	1,69
Plasma_S1P	0,92	1,31	1,01	0,74	1,32	1,25	0,73	0,99	nd	1,39	0,58	0,92	1,04
ASS, 0=nein 1=ja	1	1	0	0	0	1	0	0	1	nd	nd	nd	nd
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	0	0	1	0	1	0	0	1	1	nd	nd	nd	nd
Marcumar, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	0	0	0	1	0	nd	nd	nd	nd
NOAK, 0=nein 1=ja	1	0	0	1	1	0	0	1	0	nd	nd	nd	nd
Statin, 0=nein 1=ja	0	1	1	1	1	0	1	1	0	nd	nd	nd	nd
Betablocker, 0=nein 1=ja	0	1	0	1	1	1	1	1	1	nd	nd	nd	nd
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	1	1	1	0	1	1	1	1	0	nd	nd	nd	nd
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	0	0	0	0	1	0	0			nd	nd	nd	nd
Erythrozyten [Mrd/ml]	4,24	4,79	5,13	4,90	4,13	5,02	3,64	3,69	4,11	nd	nd	nd	nd
Leukozyten [Mrd/l]	5,6	8,4	12,1	5,5	8,0	6,4	4,5	7,8	6,9	nd	nd	nd	nd
Thrombozyten [Mrd/l]	245	197	263	141	235	216	258	331	319	nd	nd	nd	nd
Hämoglobin [g/dl]	12,4	14,3	16,7	14,5	11,8	12,7	10,0	9,6	13,0	nd	nd	nd	nd
Hämatokrit [%]	38,0	42,8	47,1	44,0	37,0	39,7	31,5	30,9	39,0	nd	nd	nd	nd
Kreatinin [mg/dl]	0,64	0,81	1,10	1,10	3,00	0,90	1,10	1,50	2,50	nd	nd	nd	nd
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	247	134	164	189	208	174	162	130	150	nd	nd	nd	nd
Triglyzeride [mg/dl]	148	100	392	220	229	205	95	212	171	nd	nd	nd	nd
HDL-Cholesterin [mg/dl]	76	47	47	35	38	47	96	38	56	nd	nd	nd	nd
LDL-Cholesterin [mg/dl]	141	67	39	110	124	86	47	50	60	nd	nd	nd	nd
c-reaktives Protein [mg/l]	5	5	8	10	6	5	44	29	5	nd	nd	nd	nd
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	1	0	0	nd	nd	1	0	0	1	nd	nd	nd	nd
Einblutung, 0=nein 1=ja	0	0	0	nd	nd	0	0	0	0	nd	nd	nd	nd
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	0	0	0	nd	nd	0	0	0	0	nd	nd	nd	nd
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	0	0	0	nd	nd	0	0	0	0	nd	nd	nd	nd

Patientennummer	420	421	422	424	425	426	427	429	430	431	432	433	434
Alter	73	72	67	83	69	74	76	63	74	73	59	79	63
Geschlecht m=0; w=1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Gewicht [kg]	nd	67	nd	nd	nd	nd	104	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Größe [m]	nd	1,59	nd	nd	nd	nd	1,80	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BMI [kg/m2]	nd	26,5	nd	nd	nd	nd	32,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W_S1PR1	nd	nd	0,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W_S1PR2	nd	nd	- 1,18	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W_S1PR3	nd	nd	1,97	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W_CD31	nd	nd	3,44	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W_CD68	nd	nd	2,24	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W_Myh11	nd	nd	8,04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W_CD45	nd	nd	- 5,92	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P_S1PR1	nd	nd	- 1,09	nd	nd	nd	- 0,51	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P_S1PR2	nd	nd	- 1,26	nd	nd	nd	- 0,39	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P_S1PR3	nd	nd	- 0,63	nd	nd	nd	- 1,43	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P_CD31	nd	nd	3,26	nd	nd	nd	3,45	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P_CD68	nd	nd	5,85	nd	nd	nd	5,79	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P_Myh11	nd	nd	6,09	nd	nd	nd	3,08	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P_CD45	nd	nd	- 4,40	nd	nd	nd	- 4,30	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Restenosegrad 3M	2	1	nd	0	nd	0	0	nd	0	0	nd	nd	nd
Restenosegrad 6M	2	1	0	3	nd	0	0	nd	0	0	3	nd	nd
Restenosegrad 12M	nd	nd	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
höchster Restenosegrad	2	1	4	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Serum S1P	1,32	1,59	3,69	1,50	1,53	1,16	1,61	1,29	1,50	1,98	1,71	1,43	1,52
Plasma S1P	0,63	0,91	1,65	1,11	0,83	0,44	1,11	0,65	1,07	1,00	1,72	0,73	0,81
ASS, 0=nein 1=ja	nd	nd	0	nd	nd	nd	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	nd	nd	1	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Marcumar, 0=nein 1=ja	nd	nd	0	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NOAK, 0=nein 1=ja	nd	nd	0	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Statin, 0=nein 1=ja	nd	nd	1	nd	nd	nd	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Betablocker, 0=nein 1=ja	nd	nd	1	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	nd	nd	0	nd	nd	nd	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	nd	nd		nd	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Erythrozyten [Mrd/ml]	nd	nd	5,50	nd	nd	nd	3,71	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Leukozyten [Mrd/l]	nd	nd	10,2	nd	nd	nd	6,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Thrombozyten [Mrd/l]	nd	nd	296	nd	nd	nd	325	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hämoglobin [g/dl]	nd	nd	15,4	nd	nd	nd	11,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hämatokrit [%]	nd	nd	47,6	nd	nd	nd	35,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Kreatinin [mg/dl]	nd	nd	0,91	nd	nd	nd	1,60	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	nd	nd	178	nd	nd	nd	156	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Triglyzeride [mg/dl]	nd	nd	144	nd	nd	nd	236	nd	nd	nd	nd	nd	nd
HDL-Cholesterin [mg/dl]	nd	nd	50	nd	nd	nd	44	nd	nd	nd	nd	nd	nd
LDL-Cholesterin [mg/dl]	nd	nd	99	nd	nd	nd	65	nd	nd	nd	nd	nd	nd
c-reaktives Protein [mg/l]	nd	nd	5	nd	nd	nd	60	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	nd	nd	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Einblutung, 0=nein 1=ja	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Patientennummer	435	436	437	438	439
Alter	78	65	80	69	46
Geschlecht m=0; w=1	0	0	1	0	0
Gewicht [kg]	nd	nd	nd	nd	nd
Größe [m]	nd	nd	nd	nd	nd
BMI [kg/m2]	nd	nd	nd	nd	nd
W_S1PR1	nd	nd	nd	nd	nd
W_S1PR2	nd	nd	nd	nd	nd
W_S1PR3	nd	nd	nd	nd	nd
W_CD31	nd	nd	nd	nd	nd
W_CD68	nd	nd	nd	nd	nd
W_Myh11	nd	nd	nd	nd	nd
W_CD45	nd	nd	nd	nd	nd
P_S1PR1	nd	nd	nd	nd	nd
P_S1PR2	nd	nd	nd	nd	nd
P_S1PR3	nd	nd	nd	nd	nd
P_CD31	nd	nd	nd	nd	nd
P_CD68	nd	nd	nd	nd	nd
P_Myh11	nd	nd	nd	nd	nd
P_CD45	nd	nd	nd	nd	nd
Restenosegrad 3M	0	nd	nd	nd	0
Restenosegrad 6M	0	nd	1	nd	nd
Restenosegrad 12M	nd	nd	nd	nd	nd
höchster Restenosegrad	0	0	1	0	0
Serum S1P	1,54	1,69	1,14	0,97	1,89
Plasma S1P	0,97	0,89	0,65	0,51	nd
ASS, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
Clopidogrel, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
Marcumar, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
NOAK, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
Statin, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
Betablocker, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
Antihypertensivum, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
Antidiabetikum, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
Erythrozyten [Mrd/ml]	nd	nd	nd	nd	nd
Leukozyten [Mrd/l]	nd	nd	nd	nd	nd
Thrombozyten[Mrd/l]	nd	nd	nd	nd	nd
Hämoglobin [g/dl]	nd	nd	nd	nd	nd
Hämatokrit [%]	nd	nd	nd	nd	nd
Kreatinin [mg/dl]	nd	nd	nd	nd	nd
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	nd	nd	nd	nd	nd
Triglyzeride [mg/dl]	nd	nd	nd	nd	nd
HDL-Cholesterin [mg/dl]	nd	nd	nd	nd	nd
LDL-Cholesterin [mg/dl]	nd	nd	nd	nd	nd
c-reaktives Protein [mg/l]	nd	nd	nd	nd	nd
Intimahyperplasie, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
Einblutung, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
Kalzifizierung, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd
Nekrotischer Kern, 0=nein 1=ja	nd	nd	nd	nd	nd

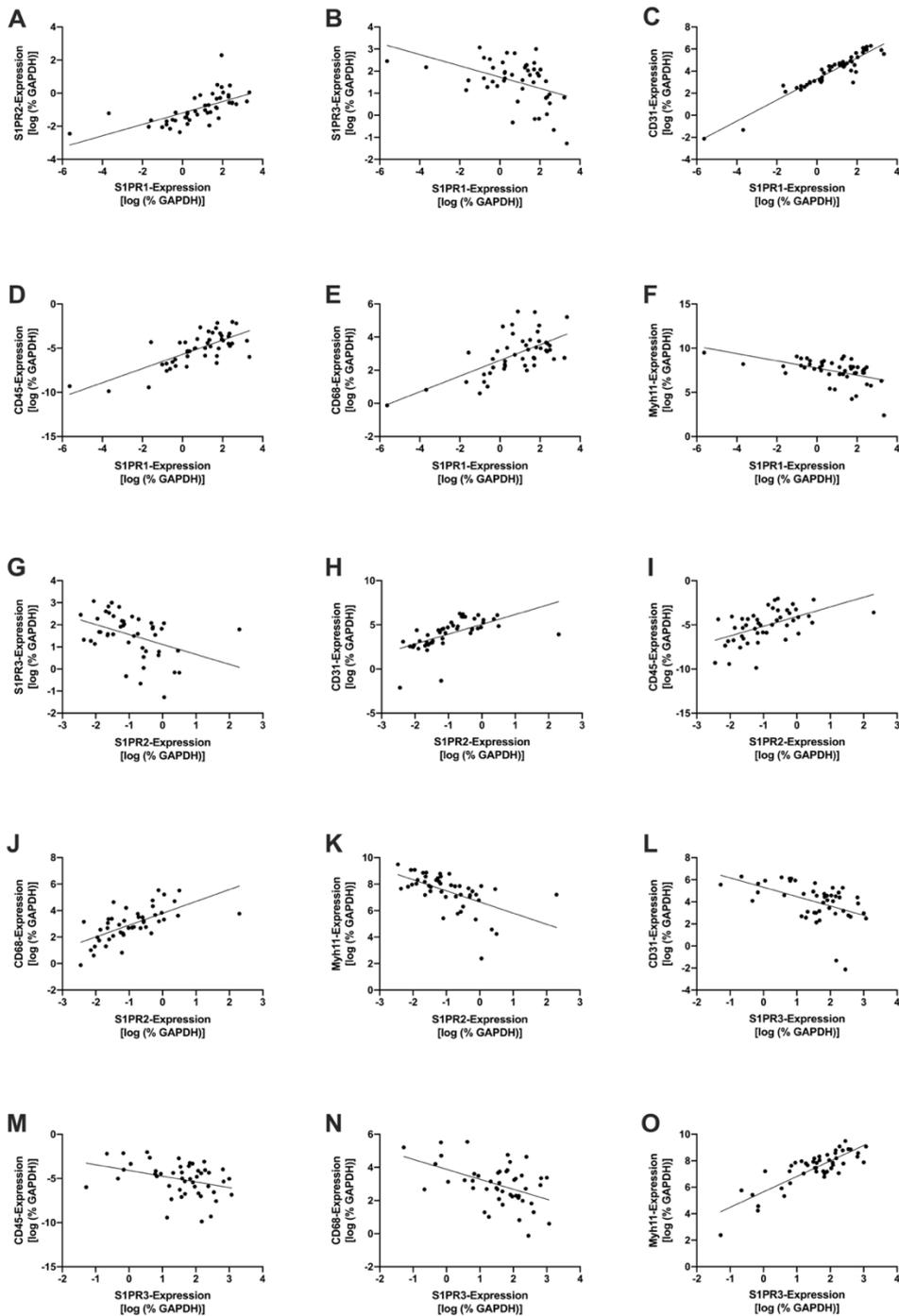


Abbildung 20: Korrelationsdiagramme der Genexpressionen innerhalb der Vollwand. Die Genexpressionen der Vollwand-Proben ($n=47$) wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Die korrespondierenden Korrelationskoeffizienten und p-Werte sind der Abbildung 16 zu entnehmen. Die Steigungsgerade wurde mittels linearer Regression berechnet. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

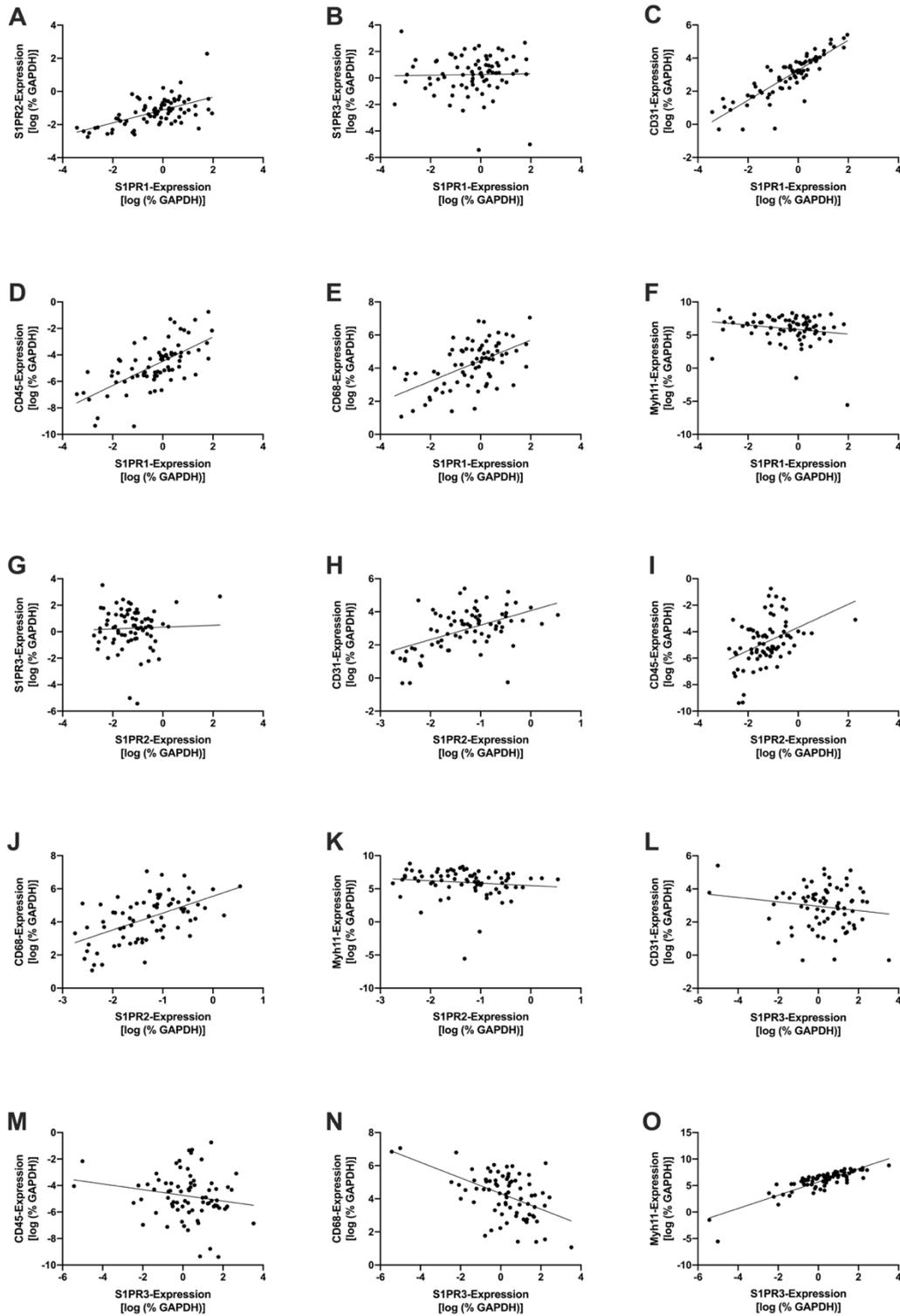


Abbildung 21: Korrelationsdiagramme der Genexpressionen innerhalb der Plaque. Die Genexpressionen der Plaque-Proben (n=77) wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Die korrespondierenden Korrelationskoeffizienten und p-Werte sind der Abbildung 16 zu entnehmen. Die Steigungsgerade wurde mittels linearer Regression berechnet. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Tabelle 28: Verteilung der Restenosegrade pro Beobachtungszeitpunkt sowie der höchsten Restenosegrade über den gesamten Beobachtungszeitraum. Der relative Anteil bezieht sich jeweils auf die Gesamtzahl der Untersuchungen pro Beobachtungszeitraum. n, Anzahl aller untersuchten Patienten pro Untersuchungszeitpunkt.

	Restenosegrad	Anzahl	Anteil [%]
3 Monate (n=140)	0	113	80,7
	1	15	10,7
	2	6	4,3
	3	5	3,6
	4	1	0,7
6 Monate (n=132)	0	97	73,5
	1	14	10,6
	2	6	4,5
	3	14	10,6
	4	1	0,8
12 Monate (n=101)	0	77	76,2
	1	9	8,9
	2	11	10,9
	3	2	2,0
	4	2	2,0
höchster Restenosegrad (n=162)	0	106	65,4
	1	17	10,5
	2	15	9,3
	3	20	12,3
	4	4	2,5

Tabelle 29: Korrelationsanalyse der Genexpressionswerten aus Vollwand und Plaque. Die Genexpressionen aus der Vollwand und Plaque (n=32) wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Waren bei einer Korrelationsanalyse beide zu untersuchende Datensätze normalverteilt, wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson sowie der korrespondierende p-Wert berechnet. Im Fall nicht normalverteilter Genexpressionsdaten (V-S1PR3, V-Myh11, P-CD45), wurde eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Die Korrelationsmatrix zeigt die Korrelationskoeffizienten r. Statistisch signifikante Korrelationen wurden mit einem * gekennzeichnet, wobei $*p \leq 0,05$. W, Vollwand; P, Plaque.

	W-S1PR1	W-S1PR2	W-S1PR3	W-CD31	W-CD45	W-CD68	W-Myh11
P-S1PR1	0,228	0,047	-0,168	0,130	0,210	0,092	-0,184
P-S1PR2	0,090	0,301	0,098	-0,055	0,031	0,017	-0,002
P-S1PR3	0,066	-0,036	-0,223	0,088	0,279	0,287	-0,160
P-CD31	0,258	0,016	-0,128	0,206	0,094	-0,030	-0,128
P-CD45	0,321	0,366*	-0,062	0,222	0,243	0,214	-0,176
P-CD68	-0,117	-0,076	0,364*	-0,221	-0,110	-0,164	0,220
P-Myh11	0,044	-0,085	-0,328	0,075	0,077	-0,003	-0,104

Tabelle 30: Vergleich der Genexpressionen in der Vollwand anhand des Vorkommens einer Intimaverdickung in den korrespondierenden Plaques. Die Genexpressionen wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (\pm SD). Die statistische Berechnung der Gruppenvergleiche erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigen T-Test (a) oder Mann-Whitney-Test (b). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

	Intimaverdickung				p-Wert
	Nein		Ja		
	Anzahl	MW (\pm SD)	Anzahl	MW (\pm SD)	
S1PR1	23	1,056 (\pm 1,184)	11	0,363 (\pm 2,837)	0,319 ^a
S1PR2	23	-0,729 (\pm 1,012)	11	-1,060 (\pm 0,7264)	0,340 ^a
S1PR3	23	1,584 (\pm 0,852)	11	1,405 (\pm 1,516)	0,717 ^b
CD31	23	4,311 (\pm 1,248)	11	3,455 (\pm 2,797)	0,222 ^a
CD45	23	-4,496 (\pm 1,495)	11	-5,984 (\pm 2,238)	0,028^a
CD68	23	3,271 (\pm 1,168)	11	2,391 (\pm 1,544)	0,074 ^a
Myh11	23	7,463 (\pm 1,117)	11	7,220 (\pm 2,087)	0,738 ^b

Tabelle 31: Vergleich der Genexpressionen in der Vollwand anhand des Vorkommens einer Kalzifizierung in den korrespondierenden Plaques. Die Genexpressionen wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (\pm SD). Die statistische Berechnung der Gruppenvergleiche erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigen T-Test (a) oder Mann-Whitney-Test (b). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

	Kalzifizierung				p-Wert
	Nein		Ja		
	Anzahl	Mittelwert (\pm SD)	Anzahl	Mittelwert (\pm SD)	
S1PR1	27	1,105 (\pm 1,557)	7	-0,2243 (\pm 2,648)	0,119 ^b
S1PR2	27	-0,6930 (\pm 0,923)	7	-1,389 (\pm 0,793)	0,078 ^a
S1PR3	27	1,453 (\pm 1,174)	7	1,810 (\pm 0,663)	0,448 ^a
CD31	27	4,237 (\pm 1,635)	7	3,250 (\pm 2,677)	0,224 ^a
CD45	27	-4,738 (\pm 1,723)	7	-5,897 (\pm 2,275)	0,147 ^a
CD68	27	3,287 (\pm 1,237)	7	1,824 (\pm 1,151)	0,008^a
Myh11	27	7,133 (\pm 1,513)	7	8,357 (\pm 0,771)	0,021^b

Tabelle 32: Vergleich der Genexpressionen in der Plaque anhand der Statineinnahme. Die Genexpressionen wurden mittels qPCR gemessen und anschließend logarithmiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (\pm SD). Die statistische Berechnung der Gruppenvergleiche erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigen T-Test (a) oder Mann-Whitney-Test (b). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

	Statineinnahme	Anzahl	Mittelwert (\pm SD)	p-Wert
S1PR1	nein	13	-1,203 (\pm 1,313)	0,005^a
	ja	64	-0,162 (\pm 1,141)	
S1PR2	nein	13	-1,354 (\pm 1,002)	0,626 ^a
	ja	64	-1,228 (\pm 0,801)	
S1PR3	nein	13	-0,744 (\pm 1,776)	0,007^a
	ja	64	0,459 (\pm 1,366)	
CD31	nein	13	2,212 (\pm 1,488)	0,025^a
	ja	62	3,075 (\pm 1,180)	
CD45	nein	12	-5,293 (\pm 1,528)	0,273 ^a
	ja	63	-4,695 (\pm 1,748)	
CD68	nein	13	4,356 (\pm 1,274)	0,687 ^a
	ja	62	4,189 (\pm 1,382)	
Myh11	nein	13	4,985 (\pm 2,520)	0,059 ^b
	ja	63	6,154 (\pm 2,032)	



Universitäres Herzzentrum
Hamburg

Ein Unternehmen des UKE

Klinik und Poliklinik für
Gefäßmedizin

Prof. Dr. E. Sebastian Debus
Klinikdirektor

Martinstraße 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 7410-58478
Telefax: (040) 7410-53272

Universitäres Herzzentrum Hamburg GmbH Martinstraße 52 20246 Hamburg

Studienleiter: Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda (Tel.: 040-7410-58478)

Patientenaufkleber

Datenschutzerklärung und Einwilligungserklärung

zur Teilnahme an der Studie:

Die Rolle von Sphingosin-1-phosphat und seinen Rezeptoren in Atherosklerose und Restenose

DATENSCHUTZERKLÄRUNG:

Die im Rahmen der Studie nach Einverständniserklärung des Studienteilnehmers erhobenen persönlichen Daten, insbesondere Befunde, unterliegen der Schweigepflicht und den datenschutzrechtlichen Bestimmungen.

Sie werden in Papierform und auf Datenträgern im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda aufgezeichnet und pseudonymisiert¹ (verschlüsselt) für die Dauer von 10 Jahren gespeichert. Bei der Pseudonymisierung¹ (Verschlüsselung) werden der Name und andere Identifikationsmerkmale (z.B. Teile des Geburtsdatums) durch z.B. eine mehrstellige Buchstaben- oder Zahlenkombination, auch Code genannt, ersetzt, um die Identifizierung des Studienteilnehmers auszuschließen oder wesentlich zu erschweren.

Zugang zu dem „Schlüssel“, der eine persönliche Zuordnung der Daten des Studienteilnehmers ermöglicht, hat der Studienleiter Prof. Dr. Larena-Avellaneda.

Die Auswertung und Nutzung der Daten durch den Studienleiter und seine Mitarbeiter erfolgt in pseudonymisierter¹ Form. Eine Weitergabe der erhobenen Daten im Rahmen der Studie erfolgt nur in

¹ Pseudonymisieren ist das Ersetzen des Namens und anderer Identifikationsmerkmale durch ein Kennzeichen zu dem Zweck, die Bestimmung des Betroffenen auszuschließen oder wesentlich zu erschweren (§ 3 Abs. 6a BDSG).

Version 1.3 HH, 07.03.2024

Universitäres Herzzentrum Hamburg GmbH
Ein Unternehmen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
IK-Nr.: 260200990
HRB 91981
Steuer-Nr.: 27/256/00030
USt-IdNr.: DE814749718
Finanzamt Hamburg-Nord

Geschäftsführer: Tim Birkwald
Ärztlicher Leiter:
Prof. Dr. med. Hartmann Reichenspumer, Ph. D.

Bankverbindung:
HSH Nordbank
Kto.-Nr.: 1 000 105 293
BLZ: 210 000 00

anonymisierter Form¹. Gleiches gilt für die Veröffentlichung der Studienergebnisse. Die Studienteilnehmer haben das Recht, über die von ihnen erhobenen personenbezogenen Daten Auskunft zu verlangen.

Diese Studie ist durch die zuständige Ethik-Kommission beraten worden. Der zuständigen Landesbehörde kann ggf. Einsichtnahme in die Studienunterlagen gewährt werden. Sobald der Forschungszweck es zulässt, wird der Schlüssel gelöscht und die erhobenen Daten damit anonymisiert¹.

Im Falle des Widerrufs der Einverständniserklärung werden die bereits erhobenen Daten ebenfalls gelöscht oder anonymisiert¹ und in dieser Form weiter genutzt. Ein Widerruf bereits anonymisierter¹ Daten ist nicht möglich.

Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich als Patient/in, dass ich durch den behandelnden Arzt oder einem von Ihm benannten ärztlichen Vertreter

Herrn/Frau Dr. med. _____

über Ziele, Wesen und Tragweite der o.g. klinischen Studie informiert und über die Chancen, Risiken und alternative Behandlungsmethoden aufgeklärt worden bin.

Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen und diese im Gespräch mit dem oben genannten Arzt zu klären. Eine Kopie der Patienteninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Ich hatte ausreichend Zeit, meine Entscheidung über die Teilnahme an der Studie unbeeinflusst zu treffen.

Ich bin mit der Teilnahme an der Studie einverstanden und weiß, dass ich diese Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Patientenname (Druckschrift)

Unterschrift

Ort, Datum

Ich versichere hiermit, die/den o.g. Patientin/Patienten über Wesen, Zweck sowie vorhersehbare Auswirkungen der Studie aufgeklärt zu haben. Sie/Er hat durch Unterschrift einer freiwilligen Teilnahme an der Studie zugestimmt.

Name aufklärender Arzt(Druckschrift)

Unterschrift

Ort, Datum

¹ Anonymisieren ist das Verändern personenbezogener Daten derart, daß die Einzelangaben über persönliche oder sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmaren natürlichen Person zugeordnet werden können (§ 3 Absatz 6 BDSG).



Universitäres Herzzentrum
Hamburg

Ein Unternehmen des UKE

Klinik und Poliklinik für
Gefäßmedizin

Prof. Dr. E. Sebastian Debus
Klinikdirektor

Martinstraße 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 7410-58478
Telefax: (040) 7410-53272
alarena@uke.de
www.uhz.de

Universitäres Herzzentrum Hamburg GmbH Martinstraße 52 20246 Hamburg

Studienleiter: Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda, Tel: 040-7410-58478

Patientenaufkleber

**Information für Patienten
zur Teilnahme an der Studie:**

**Die Rolle von Sphingosin-1-phosphat und seinen Rezeptoren
in Atherosklerose und Restenose**

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient !

Allgemeines:

Bei Ihnen liegt eine arterielle Erkrankung vor, d.h. ein Teil Ihrer Schlagadern ist verschlossen, eingeeengt oder erweitert. Geplant ist eine Operation, bei der der Blutstrom wiederhergestellt werden soll. Hierzu gibt es verschiedene Verfahren (Ausschälung, Bypass=Umgehung, Interponat, etc.). Über die Einzelheiten und Risiken der Therapie werden Sie gesondert aufgeklärt werden.

Nun kann es nach einer solchen Therapie wieder zu Einengungen kommen. Der Körper reagiert auf einen Eingriff an den Adern mit der so genannten „Intimahyperplasie“. Diese kann sogar zu einem späteren erneuten Verschluss der Schlagader oder auch eines Bypasses führen. Bisher ist nicht bekannt, welche Umstände auf die Ausbildung einer solchen „Intimahyperplasie“ Einfluss nehmen, d.h. wir wissen nicht, welcher Patient eine erneute Einengung entwickeln wird und welcher nicht.

Version 1.6, 07.03.2024

Universitäres Herzzentrum Hamburg GmbH
Ein Unternehmen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
IK-Nr.: 250200990
HRB 91961
Steuer-Nr. 27/256/00030
USt-IdNr.: DE814740718
Finanzamt Hamburg-Nord

Geschäftsführer: Tim Birkwald
Ärztlicher Leiter:
Prof. Dr. med. Hans-Jörn Reichenspumer, Ph. D.
Stellv. Ärztlicher Leiter:
Prof. Dr. med. Stefan Willems
Pflegerische Leiterin: Barbara Napp

Bankverbindung:
HSB Nordbank
Kto.-Nr.: 1 030 105 293
BLZ: 210 600 00

Zahlreiche Faktoren können bei der Ausbildung einer solchen Restenose eine Rolle spielen. Es gibt Hinweise, dass ein bestimmtes Molekül im Blut, das Sphingosin-1-Phosphat, und/oder seine Rezeptoren, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Gefäßverkalkung (Atherosklerose) und Restenose spielen.

Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss dieser Faktoren aufzufindig zu machen und so die Prognose nach Operation besser abschätzen zu können. Langfristig können so Therapie und Nachsorge für jeden Patienten individuell und maßgeschneidert angepasst werden.

Neben klinischen Parametern können bestimmte Blutwerte und auch Moleküle im Gewebe hierfür mit verantwortlich sein.

Vorgehen und Ziel:

Die Blutentnahmen sollen vor und nach der Operation sowie zu den Kontrollterminen erfolgen. Die Nachuntersuchungen sollen 3, 6 und 12 Monate nach dem Eingriff stattfinden (dies sind die ohnehin angezeigten routinemäßigen Nachuntersuchungszeitpunkte).

Außerdem werden bei diesen Nachuntersuchungen erneut die Gefäße genau untersucht. Im Ultraschall wird dargestellt, ob sich eine erneute Einengung ausgebildet hat. Diese Nachuntersuchungen finden auch ohne diese Studie statt, zusätzliche, studienbedingte Röntgenuntersuchungen sind also nicht notwendig.

Weiterhin werden bestimmte Daten von Ihnen aufgenommen, die später mit untersucht werden sollen, um einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf auszuschließen. Diese Daten umfassen das u.a. Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen und Vorbehandlungen.

Bei manchen Gefäßoperationen wird Gewebe entfernt (z.B. Ausschälung des Gefäßkalkes, Seitenast einer Vene, Vollwand zur Verbesserung einer Gefäßnaht). Dieses Gewebe wird normalerweise entsorgt, kann aber im Rahmen unserer Studie untersucht werden.

Blut und Gewebe werden bis zur Verarbeitung in deiner Biobank aufbewahrt. Die Verarbeitung umfasst dann die Ermittlung von Blutwerten (Spiegel des Sphingosin-1-Phosphats) und die Untersuchung der so genannten S1P-Rezeptoren im Gewebe mit bestimmten, standardisierten Labortechniken.

Nach Abschluss der letzten Untersuchung werden wir untersuchen, ob die Höhe bestimmter Werte im Blut oder im Gewebe mit der Ausbildung eines erneuten Gefäßverschlusses in Zusammenhang steht. Sollte dies der Fall sein, können anhand der Daten Hochrisiko-Patienten entdeckt werden, die u.U. mit anderen Medikamenten nachbehandelt werden. Auch könnten so Patienten ausgemacht werden, für die eine weniger intensive Nachbetreuung notwendig ist.

Die Bestimmung aller erhobenen Daten wird verschlüsselt („pseudonymisiert“)¹ erfolgen.

Therapie und Nachsorge werden nicht durch diese Studie beeinflusst. Die einzigen Unterschiede bestehen in der zusätzlich Blutentnahme im Rahmen der Nachuntersuchungen.

¹ Pseudonymisieren ist das Ersetzen des Namens und anderer Identifikationsmerkmale durch ein Kennzeichen zu dem Zweck, die Bestimmung des Betroffenen auszuschließen oder wesentlich zu erschweren (§ 3 Abs. 6a BDSG).

Risiken:

Die einzigen Risiken bestehen in den Nebenwirkungen der Blutentnahmen, wobei die erste Blutentnahme im Rahmen der notwendigen Aufnahmeuntersuchung erfolgt. Die Nebenwirkungen können sein:

- Bluterguss (selten)
- Infektion (sehr selten)
- Thrombosierung der Vene (sehr selten)
- Nervenverletzung (sehr selten)
-
- Bei dem Gewebe, das wir bei der Untersuchung gewinnen, handelt es sich um Restgewebe, welches ohnehin entsorgt wird. Für diese Studie ist keine zusätzliche Gewebeprobenentnahme notwendig.

13 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda für die Möglichkeit der Promotion im Labor der Gefäßchirurgie sowie für das Überlassen dieses interessanten Dissertationsthemas meinen Dank aussprechen. Außerdem gilt mein Dank meinem Betreuer Herrn Dr. Günter Daum, der mir während der Zeit im Labor sowie beim Auswerten und Schreiben der Arbeit durch regen Austausch und mit konstruktiver Kritik stets zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Team aus dem Labor für Gefäßmedizin, v.a. bei Dr. Markus Geißen für die Einführung in die Feinheiten der Genexpressionsanalysen sowie bei Sophia Deden für die Anleitung bei der histologischen Aufarbeitung der Gewebeproben. Ebenso bedanke ich mich bei Yu Jiang, der mich stets motivierte noch schneller und effizienter zu pipettieren und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Herrn Prof. Dr. Edzard Schwedhelm und Mirjam von Lucadou aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich ganz herzlich für die S1P-Messungen der Serum- und Plasmaproben.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei der Klinik für Gefäßmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, die mir die Gewebeproben zur Verfügung gestellt haben, und insbesondere bei Savitri Stellmacher für die Organisation und Durchführung der Nachsorgeuntersuchungen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher aus dem Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die Benutzung des Mikroskop-Slide-Scanners bedanken.

Meinem Freund und Kommilitonen Dr. Dr. Daniel Smit danke ich für seine fortwährende, große Hilfsbereitschaft und Motivation, wodurch ich meine Ziele nie aus den Augen verloren habe.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Freundin für ihre unermüdliche Geduld und Rücksichtnahme während des gesamten Studiums und des Verfassens dieser Arbeit bedanken. Sie schaffte es, mich zu motivieren und gleichzeitig darauf zu achten, dass ich nicht den Fokus auf mich selbst verlor und mir Auszeiten gönnte. Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir immer bedingungslos zur Seite stehen, mir den Traum des Medizinstudiums erfüllt haben und ohne die ich auch nicht in der Lage gewesen wäre, diese Arbeit zu verfassen.

14 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird auf eine Veröffentlichung des Lebenslaufs verzichtet.

15 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum

Unterschrift