

Aus der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikum Heidelbergs

(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Markus A. Weigand)

**Die Bedeutung von Leukozyten-Subpopulationen in der
Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse nach nicht-
kardiochirurgischen Operationen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des *Doctor scientiarum humanarum* (Dr. sc. hum.)

an der

Medizinischen Fakultät Heidelberg

der

Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von

M.Sc. Jessica Handke

aus

Frankfurt (Oder)

2020

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Hans-Georg Kräusslich

Doktorvater: Herr apl. Prof. Dr. med. habil. Johann Motsch

Für meine Familie.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1 Kardiovaskuläre Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Eingriffen	3
1.1.1 Epidemiologie	3
1.1.2 Präoperative Risikoevaluierung für kardiovaskuläre Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Eingriffen	4
1.2. Atherosklerose als Ursache perioperativer kardiovaskulärer Ereignisse	11
1.2.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen	11
1.2.2 Pathophysiologie der Atherosklerose	11
1.2.3 Ätiologie perioperativer Myokardinfarkte	14
1.2.4 Atherosklerose unter dem Einfluss perioperativen Stresses	15
1.3 Rolle des angeborenen und adaptiven Immunsystems in der Atherosklerose	17
1.3.1 Monozyten und Makrophagen	17
1.3.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	20
1.3.3 T-Lymphozyten	21
1.4 Atheroprotektive Funktionsmechanismen regulatorischer T-Zellen	27
1.5 Presepsin (sCD14-ST, PSEP)	29
1.6 Fragestellung	31
2. Materialien	32
2.1 Software	32
2.2 Geräte und Instrumente	32
2.3 Verbrauchsmaterialien	33
2.4 Chemikalien	33
2.5 Kits	34
2.6 Medikamente	35
2.7 Antikörper	35
2.8 Tierfutter	36
2.9 Versuchstiere	36
3. Methoden	37
3.1 Klinische Studie: LeukoKAPE-1 – Leukozyten und kardiovaskuläre perioperative Ereignisse	37
3.1.1 Ethische Beurteilung	37
3.1.2 Studiendesign	37
3.1.3 Aufarbeitung der Blutproben	39
3.1.4 Klinische Endpunkte	43
3.1.5 Fallzahlberechnung	45
3.2 Post-hoc Analyse: LeukoKAPE-2 – Leukozyten und kardiovaskuläre perioperative Ereignisse	45
3.2.1 Ethische Beurteilung	45

3.2.2 Studiendesign	45
3.2.3 Aufarbeitung der Blutproben.....	45
3.2.4 Klinische Endpunkte.....	46
3.2.5 Fallzahlberechnung.....	46
3.3 Tierexperimentelle Arbeiten	46
3.3.1 Ethische Beurteilung.....	46
3.3.2 Tierhaltung.....	47
3.3.3 Versuchsaufbau und Berechnung der Gruppengrößen	47
3.3.4 Perioperatives Stressmodell	48
3.3.5 <i>In vivo</i> Modulation regulatorischer T-Zell-Level	49
3.3.6 Finalisierung und Organentnahme	51
3.3.7 Histologische Aufarbeitung.....	52
3.3.8 Durchflusszytometrische Quantifizierung muriner Zellen	55
3.4 Statistik	58
4. Ergebnisse	60
4.1 Klinische Studie: LeukoKAPE-1 – Leukozyten und kardiovaskuläre perioperative Ereignisse 1	60
4.1.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs	60
4.1.2 Perioperativer Anstieg von Gesamt-Leukozyten, klassischen und intermediären Monozyten	63
4.1.3 Perioperative Reduktion der HLA-DR-Expression auf Monozyten.....	65
4.1.4 Perioperativer Anstieg klassischer Monozyten in Patienten mit MACCE	66
4.1.5 Assoziation von Presepsin mit kardiovaskulären Ereignissen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen.....	66
4.1.6 Präoperatives Presepsin verbessert die perioperative kardiovaskuläre Risikoprädiktion in LeukoKAPE-1 Kohorte.....	68
4.1.7 Präoperativ niedrige Treg-Level in Patienten mit perioperativem MACCE	70
4.2 Post-hoc Analyse: LeukoKAPE-2 – Leukozyten und kardiovaskuläre perioperative Ereignisse 2	72
4.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs	73
4.2.2 Präoperativ erhöhtes Presepsin in Patienten mit MACCE	75
4.2.3 Präoperatives Presepsin ist mit dem Auftreten von MACCE nach nicht-kardiochirurgischen Operationen assoziiert	76
4.2.4 Presepsin zur perioperativen kardiovaskulären Risikoprädiktion.....	79
4.2.5 <i>Post-hoc</i> Poweranalyse.....	82
4.3 Tierexperimentelle Arbeiten	82
4.3.1 Perioperativer Stress-induzierter Anstieg regulatorischer T-Zellen in Blut und Thymus....	82
4.3.2 Etablierung der <i>in vivo</i> Modulation regulatorischer T-Zell-Level.....	84
4.3.3 Histomorphometrische Beurteilung postoperativer atherosklerotischer Plaques in Abhängigkeit des präoperativen Treg-Levels	88
5. Diskussion	99
5.1 Selektive Zunahme einzelner atherogener Leukozyten-Subpopulationen während nicht-kardiochirurgischer Operationen.....	99
5.2 Perioperativer Anstieg des Monozyten-Aktivierungsmarkers PSEP in MACCE-Patienten	102
5.3. Präoperatives PSEP zur perioperativen kardiovaskulären Risikoprädiktion	103

5.4 Assoziation präoperativ niedriger Treg-Level mit MACCE nach nicht-kardiochirurgischer Operation	110
5.5 Perioperativer Treg-Anstieg zum Schutz vor überschießender Immunreaktion?	111
5.6 Tregs und perioperative Plaquestabilisierung.....	113
5.7 Therapeutische Optionen zur Induktion präoperativ hoher Treg-Level	116
5.8 Schlussfolgerung	118
6. Zusammenfassung _____	120
7. Literaturverzeichnis _____	122
8. Eigenanteil und Veröffentlichungen _____	149
Anhang _____	152
Danksagung _____	153
Eidesstaatliche Versicherung_____	155

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym	HLA-DR	humanes Leukozyten-Antigen DR
ACS	American College of Surgeons	hs-TnT	hoch-sensitives Troponin T
ADP	Adenosindiphosphat	HSP	Hitzeschockprotein
ALP	alkalische Phosphatase	i.p.	intraperitoneal
Apo	Apolipoprotein	IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E-defizient	ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
ACC/AHA	Amerikanische Gesellschaft für Kardiologie	IDI	Integrated Discrimination Improvement
ATP	Adenosintriphosphat	IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
AUC	Fläche unter der Kurve	IFN	Interferon
BMI	Body-Mass-Index	Ig	Immunglobulin
BNP	B-type natriuretisches Peptid	IL	Interleukin
CCS	Kanadische Gesellschaft für Kardiologie	KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
CD	Cluster of differentiation	KEB	Klinisch experimenteller Bereich
CEA	Carotis-Endarteriektomie	KG	Körpergewicht
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	KHK	Koronare Herzkrankheit
CRP	C-reaktives Protein	KI	Konfidenzintervall
CT	Computertomographie	LAG-3	Lymphozyten-Aktivierungsgen-3
CTLA-4	cytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4	LOX-1	Lektin-artiger oxLDL Rezeptor-1
cTn	kardiales Troponin	LPS	Lipopolysaccharid
CV-Tod	kardiovaskulärer Tod	LSB	Linksschenkelblock
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung	Ly6C	Lymphozyten-Antigen 6-Komplex
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate	MACCE	major adverse cardiovascular and cerebrovascular event
EKG	Elektrokardiogramm	MCP-1	Monozyten Chemoattractant Protein-1
ESC/ESA	Europäische Gesellschaft für Kardiologie/Anästhesiologie	MET	metabolisches Äquivalent
FCS	fetales Kälberserum	MI	Myokardinfarkt
FCS/SSC	Vorwärts-/Seitwärtsstreuung	MICA	Myocardial Infarction or Cardiac Arrest
FVD	fixierbarer Lebendfarbstoff	MRT	Magnetresonanztomographie
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor	NaCl	Natriumchlorid
GV-	Gesellschaft für	NK	Natürliche Killerzellen
SOLAS	Versuchstierkunde/ Society of Laboratory Animal Science	NOS	reaktive Stickstoffspezies
NaCl	Natriumchlorid	NP	natriuretisches Peptid
HIPC	Human ImmunoPhenotyping Consortium	NRI	Net Reclassification Improvement
		NSQIP	National Surgical Quality Improvement Program

NT-	N-terminales pro-brain	RCRI	Revised Cardiac Risk Index
proBNP	natriuretisches Peptid	ROC	Receiver Operating Characteristic
NTP	nicht-technische Projektzusammenfassung	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
OP	Operation	rpm	Umdrehungen pro Minute
OR	Odds ratio	RR	Riva-Rocci
(ox)LDL	(oxidiertes) low-density Lipoprotein	RT	Raumtemperatur
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit	SD	Standardabweichung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	SMC	glatte Muskelzellen
PD-1	programmed cell death protein-1	SR	Scavenger-Rezeptor
PFA	Paraformaldehyd	TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (-Tween)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat	TGF	Transforming Growth Factor
PRR	Pattern Recognition Receptor	TH	T-Helfer-Lymphozyt
PSEP	Presepsin	TIA	transiente ischämische Attacke
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron- System	TLR-4	Toll-like Rezeptor-4
		TNF	Tumornekrosefaktor
		Treg	regulatorische T-Zelle
		VCAM-1	Vaskuläres Adhäsionsmolekül-1

1. EINLEITUNG

1.1 Kardiovaskuläre Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Eingriffen

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit werden jährlich mehr als 300 Millionen Operationen durchgeführt und die Tendenz ist weiter steigend (Weiser et al. 2016). Im Zuge des demographischen Wandels sehen sich Krankenhäuser zukünftig mit zunehmend älteren und multimorbiden Patienten konfrontiert (Naughton und Feneck 2007). Allein in Deutschland betrug die Zahl operativer Eingriffe in 2017 etwa 15,5 Millionen (Statistisches Bundesamt 2019). Schätzungen zufolge erfordere es 143 Millionen zusätzliche chirurgische Eingriffe jährlich, um den medizinischen Bedarf in Ländern niedrigen und mittleren Einkommens zu decken (Nepogodiev et al. 2019).

Handle es sich um eine offiziell erfasste Todesursache, bilde die perioperative Letalität mit etwa 4,2 Millionen Fällen pro Jahr die dritthäufigste Todesursache (7,7 %) weltweit (Nepogodiev et al. 2019). Nicht-kardiochirurgische Operationen sind mit einer 30-Tage-Letalität zwischen 0,8 und 1,5 % assoziiert (Devereaux et al. 2017; Haynes et al. 2009; Smilowitz et al. 2017). Leiden Patienten zudem an einer kardiovaskulären Grunderkrankung, steigt die perioperative Mortalität auf bis zu 9,3 % (van Diepen et al. 2011).

Kardiovaskuläre Komplikationen sind eine der häufigsten Ursachen für perioperative Morbidität und Letalität nach nicht-kardialen Operationen (Devereaux et al. 2012; Puelacher et al. 2018). Jeder 33. nicht-kardiochirurgische Patient erleidet mindestens ein kardiovaskuläres oder zerebrovaskuläres Ereignis (*major adverse cardiovascular and cerebrovascular event*, MACCE) innerhalb eines postoperativen Beobachtungszeitraumes von 30 Tagen. Am häufigsten betroffen sind gefäß- (7,7 %), thorax- (6,5 %) und transplantationschirurgische Patienten (6,3 %) (Smilowitz et al. 2017).

In kardiovaskulären Risikopatienten beträgt die Inzidenz perioperativer Myokardinfarkte (MI) zwischen 5 und 16 %. Die 30-Tage-Mortalität steigt mit Auftreten eines perioperativen MIs um das Fünf- bis Sechsfache (von 1,6-2,2 % auf 9,8-11,6 %) (Devereaux et al. 2011b; Puelacher et al. 2018). Die perioperative analgetische und sedierende Therapie sowie die Tatsache, dass viele Patienten nach einer Operation ohnehin Schmerzen erleiden, führt jedoch dazu, dass bei lediglich 18 bis 42% aller perioperativen MI-Patienten Ischämie-typische Symptome detektiert werden (Botto et al. 2014; Devereaux et al. 2011b; Puelacher et al. 2018). Die Mehrzahl perioperativ auftretender MIs erfüllt die allgemeine Definition eines MIs (Thygesen et al. 2018) nicht und bliebe ohne perioperatives Troponin-Monitoring unerkannt. Diese klinisch inapparente Form des Ischämie-bedingten Myokardschadens, gekennzeichnet durch Troponin-Konzentrationsveränderungen innerhalb von 30 Tagen postoperativ, ist als Myokardschädigung nach nicht-kardiochirurgischer Operation (*myocardial*

injury after non-cardiac surgery, MINS) definiert. MINS erwies sich als unabhängiger Risikofaktor für die 30-Tage-Letalität nach nicht-kardiochirurgischen Eingriffen (Botto et al. 2014; Devereaux et al. 2012). Patienten mit MINS und klinisch manifesten perioperativen MI weisen vergleichbare Mortalitätsraten von 10,4 bis 12,5 % bzw. 8,7 bis 9,7 % auf (Devereaux et al. 2011b; Puelacher et al. 2018).

1.1.2 Präoperative Risikoevaluierung für kardiovaskuläre Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Eingriffen

Gegenstand der präoperativen Risikoevaluierung ist die Identifizierung und Behandlung der für den operativen Eingriff relevanten kardiovaskulären Risikofaktoren mit dem Ziel der Prävention perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen (Leschke et al. 2017). Nach Möglichkeit sollte diese zum Zeitpunkt der Stellung der Operationsindikation, jedoch nicht länger als sechs Wochen vor dem geplanten Eingriff stattfinden (Zwissler 2017).

Das individuelle kardiovaskuläre Risiko eines nicht-kardiochirurgischen Patienten basiert im Wesentlichen auf vier Faktoren (Zwissler 2017):

- Schwere und Komplexität des geplanten chirurgischen Eingriffes (Kristensen et al. 2014)
- Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren
- Stabilität des kardialen Zustandes bzw. Vorliegen einer akut symptomatischen kardialen Erkrankung
- Funktionelle Leistungs- bzw. Belastungskapazität des Patienten

Art und Umfang der präoperativen Evaluierung orientieren sich am Risiko des Patienten und der bevorstehenden Operation. Das kardiale Risiko eines nicht-kardiochirurgischen Eingriffes richtet sich maßgeblich nach Art und Länge der Intervention sowie dem erwarteten Flüssigkeits- bzw. Blutverlust und Flüssigkeitsverschiebungen. Die European Society of Anaesthesiology differenziert zwischen Eingriffen mit geringen (<1 %), mittlerem (1-5 %) und hohem (>5 %) kardialen Risiko. Die Einteilung erfolgt unabhängig patientenspezifischer Komorbiditäten (Kristensen et al. 2014).

Die initiale Evaluierung eines Patienten mit bevorstehendem elektivem, nicht-kardialen Eingriff besteht hingegen in der sorgfältigen Anamnese, einer orientierenden körperlichen Untersuchung sowie in der Erhebung des funktionellen Patientenstatus nach standardisiertem Schema. Die Anamnese beinhaltet zudem die Erfassung und Dokumentation kardiovaskulärer Risikofaktoren, die zur Berechnung kardiovaskulärer Risikoindizes herangezogen werden können (Zwissler 2017).

1.1.2.1 Kardiovaskuläre Risikoindizes zur Vorhersage perioperativer Ereignisse

Präoperative kardiovaskuläre Risikoindizes erlauben eine Einschätzung der Eintrittswahrscheinlichkeit kardiovaskulärer Komplikationen nach chirurgischen Eingriffen. Ein

sachdienlicher Risikoindex zeichnet sich im Wesentlichen durch die präzise Quantifizierung eines definierten Risikos, die Berücksichtigung eingriffsspezifischer Faktoren sowie eine einfache und kostenneutrale Handhabung aus. Zudem sollte die Validierung getroffener Vorhersagewerte in einer von der Entwicklungskohorte unabhängigen Untersuchung gewährleistet sein (Lehmann 2017).

In der Vergangenheit haben sich kardiovaskuläre Risikoindizes als fester Bestandteil in nicht-kardiochirurgischen Leitlinien internationaler Fachgesellschaften etabliert (Duceppe et al. 2017; Fleisher et al. 2014; Kristensen et al. 2014).

Revised Cardiac Risk Index (RCRI)

Der Revised Cardiac Risk Index (RCRI) gilt aufgrund seiner langjährigen Validierung und leichten Handhabung als der am weitesten verbreitete präoperative kardiovaskuläre Risikoindex (Duceppe et al. 2017; Fleisher et al. 2014; Kristensen et al. 2014). Der RCRI nach Lee (Lee et al. 1999b) bildet die weiterentwickelte Form des lange Zeit als Standard geltenden Goldman-Indexes (Goldman et al. 1977). Er wurde 1999 im Rahmen einer monozentrischen Studie anhand 2893 nicht-kardiochirurgischen Patienten (≥ 50 Jahre) entwickelt. Unter Einbezug fünf kardiovaskulärer Risikofaktoren und der Art des operativen Eingriffes erlaubt er die Vorhersage eines MIs, Lungenödems, Kammerflimmern sowie von Herzrhythmusstörungen und kardialen Arrestes innerhalb eines Jahres nach Operation. Folgende Prädiktoren wurden definiert, wobei das perioperative kardiovaskuläre Risiko mit der Anzahl zutreffender Prädiktoren steigt (RCRI=0: 0,4 %; RCRI=1: 0,9 %; RCRI=2: 6,6 % und RCRI ≥ 3 : >11 %) (Lee et al. 1999b):

- Hoch-Risiko Eingriff (abdominelle, thorakale oder suprainguinale Gefäßoperation)
- Bestehende koronare Herzerkrankung (KHK)
- Bestehende Herzinsuffizienz
- Bestehende zerebrovaskuläre Erkrankung (Z. n. zerebralem Insult/transiente ischämische Attacke (TIA))
- Insulinpflichtiger Diabetes mellitus
- Chronische Niereninsuffizienz (Serumkreatinin >2 mg/dl bzw. >177 $\mu\text{mol/l}$)

Der RCRI weist eine gute Trennschärfe zwischen Patienten mit niedrigem und hohem perioperativem Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen nach nicht-kardialen Operationen auf. In gefäßchirurgischen und kardialen Risikopatienten führt die Erhebung des RCRI jedoch häufig zur Unterschätzung des perioperativen kardiovaskulären Risikos (Devereaux et al. 2011a; Ford et al. 2010). Die Kanadische Fachgesellschaft für kardiovaskuläre Erkrankungen weist aus diesem Grund eine überarbeitete Version des RCRI mit angepassten Risikoklassifikationszuordnungen aus. Diese basiert auf einer Vielzahl externer Validierungsstudien und dient der Vorhersage eines

perioperativen MIs, kardialen Arrestes und Tod innerhalb von 30 Tagen postoperativ (RCRI=0: 3,9 %; RCRI=1: 6,0 %; RCRI=2: 10,1 % und RCRI \geq 3: 15 %) (Duceppe et al. 2017).

American College of Surgeons (ACS) National Surgical Quality Improvement Program (NSQIP) Myocardial Infarction or Cardiac Arrest (MICA)

Neben dem RCRI hat der NSQIP-MICA als weiterer Risikoscore Einzug in internationale perioperative Leitlinien erhalten. Der MICA-Index wurde 2011 auf Basis eines ACS-NSQIP-Datensatzes, bestehend aus mehr als 200 000 chirurgischen Patienten, entwickelt und validiert. Die Berechnung des MICA-Indexes erfolgt mit Hilfe eines interaktiven Online-Risikokalkulators (www.surgicalriskcalculator.com/miorcardiacarrest) und erlaubt die eingriffsspezifische Risikoprädiktion von MI und kardialem Arrest innerhalb von 30 Tagen postoperativ. Das individuelle perioperative kardiale Risiko eines Patienten richtet sich dabei nach folgenden Parametern (Gupta et al. 2011):

- Art des geplanten operativen Eingriffes
- Funktionelle Belastbarkeit des Patienten
- American Society of Anesthesiologists (ASA)-Klassifikation
- Alter des Patienten
- Chronische Niereninsuffizienz (Serumkreatinin >1,5 mg/dl bzw. >133 μ mol/l)

Die prognostische Güte des MICA-Indexes übertrifft jene des RCRI (Gupta et al. 2011). Dennoch führt seine Erhebung zur Unterschätzung des perioperativen MI-Risikos, da bei der Entwicklung des Scores auf postoperatives Troponin-Screening verzichtet und infolgedessen eine Vielzahl perioperativer MIs nicht dokumentiert wurde. Eine weitere Limitation des MICA-Indexes besteht in der noch unzureichenden Validierung des Indexes in unabhängigen Kohorten (Fronczek et al. 2019).

ACS-NSQIP Surgical Risk Calculator

Im Jahr 2013 folgte die Entwicklung des NSQIP Surgical Risk Calculators basierend auf den NSQIP-Datensätzen von mehr als 1,4 Millionen chirurgischen Patienten. Es handelt sich um einen Web-basierten Risikokalkulator (www.riskcalculator.facs.org/RiskCalculator), der neben der Art des operativen Eingriffes, 20 weitere demographische Variablen und Komorbiditäten berücksichtigt. Die Anwendung des NSQIP Surgical Risk Calculators erlaubt die eingriffsspezifische Risikovorhersage acht unterschiedlicher Entitäten, darunter Mortalität, Morbidität und kardiale Komplikationen (MI und kardialer Arrest) während eines postoperativen Zeitraumes von 30 Tagen (Bilimoria et al. 2013). Die für den MICA-Index genannten Einschränkungen treffen jedoch gleichermaßen auf den NSQIP Surgical Risk Calculator zu.

Die Erhebung präoperativer Risiko-Indizes erlaubt eine Abschätzung des perioperativen kardiovaskulären Risikos und kann bei der Identifizierung von Risikopatienten, die von einer weiterführenden präoperativen Evaluierung profitieren, unterstützen (Leschke et al. 2017). Das vorhergesagte kardiovaskuläre Risiko eines Patienten unterscheidet sich jedoch maßgeblich in Abhängigkeit des angewandten Risikoindexes (Glance et al. 2018).

1.1.2.2 Biomarker zur Vorhersage perioperativer kardiovaskulärer Ereignisse

Biomarker gewinnen für die präoperative Risikostratifikation perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen zunehmend an Bedeutung. Die Bestimmung präoperativer Biomarker erfolgt unter Berücksichtigung des operativen Risikos, der präoperativen Anamnese sowie der körperlichen Untersuchung, jedoch nicht routinemäßig. Im Rahmen der präoperativen Risikoevaluierung wird zwischen kardialen Integritätsmarkern, die eine Myokardischämie/-schädigung bzw. eine ventrikuläre Dysfunktion anzeigen, und inflammatorischen Biomarkern differenziert (Kristensen et al. 2014).

Kardiale Troponine (cTn)

Kardiale Troponine (cTn) umfassen die herzmuskelspezifischen Isoformen der Troponin-Untereinheiten I (inhibitorisches Troponin, TnI) und T (Tropomyosin-bindendes Troponin T, TnT). Gemeinsam mit Troponin C, Aktin und Tropomyosin bilden sie die kontraktile Einheit des Myokards (Halwachs-Baumann 2006). Eine Schädigung myokardialen Gewebes führt zur Freisetzung kardialer Troponine ins Blut. Hoch-sensitive Testsysteme zur Bestimmung der cTn-Konzentration erlauben die schnelle, spezifische und sensitive Detektion einer myokardialen Schädigung beispielsweise auf dem Boden einer Ischämie und bilden die Grundlage der Myokardinfarkt-Diagnostik (Thygesen et al. 2018). Ein cTn-Konzentrationsanstieg ist jedoch nicht zwangsläufig auf ein Infarktgeschehen zurückzuführen. In den vergangenen Jahren konnten eine Reihe von Erkrankungen, die ebenfalls eine Troponin-Erhöhung nach sich ziehen, ausgemacht werden. Dies trifft bspw. auf eine Lungenembolie, eine akute Linksherzinsuffizienz, septische Zustandsbilder sowie terminale Niereninsuffizienz zu und sollte bei der Diagnosestellung berücksichtigt werden (Korff et al. 2006).

Im perioperativen Setting weisen Patienten mit präoperativ erhöhtem Troponin (cTnI >100 ng/l; hoch-sensitives (hs)-cTnT >14ng/l) ein erhöhtes Risiko für perioperative kardiale Komplikationen auf (Biccard et al. 2012; Nagele et al. 2013). Der inkrementelle prognostische Wert präoperativer Troponin-Bestimmungen zur RCRI-basierten Risikoprädiktion konnte im Rahmen einer prospektiven multizentrischen Studie an 979 kardialen Risikopatienten nachgewiesen werden (Weber et al. 2013).

Kardiale natriuretische Peptide (NP)

Natriuretische Peptide (NP) stellen die Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) dar. Ihre Funktion besteht in der Senkung des Blutdruckes, um das Herz vor übermäßiger Volumen- und Druckbelastung zu schützen. In der kardialen Diagnostik nehmen B-type natriuretische Peptide (BNP) eine zentrale Rolle unter den natriuretischen Hormonen ein. BNP wird im Wesentlichen von Kardiomyozyten der Herzventrikel exprimiert. Die proteolytische Spaltung des Prohormons pro-BNP führt zur Entstehung von C-terminalen BNP und N-terminalen proBNP (NT-proBNP) (Halwachs-Baumann 2006). Beide Peptide werden infolge einer erhöhten myokardialen Wandspannung vermehrt freigesetzt. Erhöhte BNP- und NT-proBNP-Werte im Plasma stellen Marker einer linksventrikulären Dysfunktion dar und werden zur Diagnose und Prognose einer Herzinsuffizienz herangezogen (Ponikowski et al. 2016). Konzentrationsanstiege können dahingegen auch extrakardiale Ursachen haben, bspw. Lungenembolie, Sepsis, Hyperthyreose oder körperliche Anstrengung (Felker et al. 2006; Hamasaki 2016).

Die Bestimmung präoperativer kardialer NPs erwies sich in den vergangenen Jahren von inkrementeller Bedeutung für die Vorhersage perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardialen Operationen (Karthikeyan et al. 2009; Rodseth et al. 2011). Erst kürzlich konnte im Rahmen einer prospektiven multizentrischen Studie an 10 402 nicht-kardiochirurgischen Patienten eine Assoziation präoperativer NT-proBNP-Werte mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse innerhalb von 30 Tagen postoperativ gezeigt werden (Duceppe et al. 2019). Die zusätzliche Berücksichtigung präoperativer NT-proBNP-Werte zur RCRI-basierten Risikoprädiktion führt zu einer genaueren Vorhersage perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen, die insbesondere auf den hohen negativen Prädiktionswert von NT-proBNP zurückzuführen ist (Choi et al. 2010; Duceppe et al. 2019; Lurati Buse et al. 2011).

Sonstige kardiale Biomarker

Weitere, teils neue kardiale Biomarker, die Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen sind, derzeit jedoch eine untergeordnete Rolle in der präoperativen Risikoevaluierung für kardiovaskuläre Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen einnehmen, umfassen Kreatinin-Kinase MB (CK-MB) (Landesberg et al. 2003), mid-regional Pro-Adrenomedullin (MR-proADM) (Gillmann et al. 2017; Golubović et al. 2018) und den Fibrosemarker soluble suppression of tumorigenicity-2 (sST2) (Yang et al. 2018).

Inflammatorische Biomarker

Systemische Inflammation spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen (Hansson 2005). Die Bestimmung inflammatorischer Biomarker

erlaubt die Beurteilung von Aktivität und Vulnerabilität atherosklerotischer Läsionen (Blankenberg 2005) und folglich eine Abschätzung des Risikos perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen. Für präoperativ erhöhte Werte des Routine-Entzündungsparameters C-reaktives Protein (CRP) konnte eine unabhängige Assoziation mit dem Auftreten perioperativer kardiovaskulärer Ereignisse gezeigt werden (Choi et al. 2010; Scrutinio et al. 2011). Weitere Entzündungsmediatoren, dessen Eignung zur kardiovaskulären Risikoevaluierung vor nicht-kardialen chirurgischen Eingriffen untersucht wird, umfassen Interleukin-6 (IL-6) (Hedman et al. 2007) und das Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten (NLR) (Ackland et al. 2019). Ob und wie die präoperative Bestimmung inflammatorischer Biomarker die perioperative Therapie beeinflusst und damit das Risiko kardiovaskulärer Komplikationen reduzieren kann, ist bislang unklar (Buse et al. 2018).

1.1.2.3 Nicht-invasive kardiale Funktionsuntersuchungen

Am Ende der präoperativen kardiovaskulären Patientenevaluierung steht die Erwägung nicht-invasiver Funktionsuntersuchungen. Diese stehen jedoch nicht im Fokus der hier präsentierten Arbeit und seien nur der Vollständigkeit halber angeführt. Nicht-invasive Funktionsuntersuchungen umfassen die Erhebung eines Belastungs-Elektrokardiogrammes (EKG), pharmakologische Stress-Echokardiographien und -Szintigraphien sowie kardiale Adenosin-Stress-Magnetresonanztomographien (MRT) (Leschke et al. 2017).

1.1.2.4 Präoperative Risikoevaluierung gemäß internationaler Fachgesellschaften

Aktuelle Leitlinien internationaler Fachgesellschaften unterscheiden sich hinsichtlich des Stellenwertes, den sie der funktionellen Belastungskapazität, Biomarkern und nicht-invasiven Funktionsuntersuchungen im Rahmen der präoperativen kardiovaskulären Risikoevaluierung zukommen lassen. Ein wesentlicher Unterschied besteht zudem in der Empfehlung des zu verwendenden Risikoindexes. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Gegenüberstellung der kardiovaskulären Risikoprädiktion vor nicht-kardiochirurgischen Operationen gemäß aktueller Leitlinien der Europäischen Gesellschaften für Kardiologie und Anästhesie (ESC/ESA) (Kristensen et al. 2014), der US-Amerikanischen Gesellschaft für Kardiologie (ACC/AHA) (Fleisher et al. 2014) sowie der Kanadischen Gesellschaft für Kardiologie (CCS) (Duceppe et al. 2017).

	ESC/ESA (Kristensen et al., 2014)	ACC/AHA (Fleisher et al., 2014)	CCS (Duceppe et al., 2017)
Patienten	alle	Patienten • mit KHK • mit KHK-Risiko	Patienten • ≥45 Jahre • 18-44 Jahre mit sign. CVD
Art der OP	Einteilung in • Niedriges Risiko (<1%) • Mittleres Risiko (1-5%) • Hohes Risiko (>5%)	Einteilung in • Niedriges Risiko (<1%) • Hohes Risiko (≥1%)	
Funktionelle Belastungs-kapazität	METs • <4 geringe Belastbarkeit • ≥4 moderate - gute Belastbarkeit	METs • <4 geringe Belastbarkeit • ≥4 moderate - gute Belastbarkeit	
Risikoindizes	RCRI + NSQIP MICA	NSQIP Surgical Risk Calculator	RCRI
Biomarker	Troponin o. BNP/NT-proBNP , wenn • METs <4 • gefäßchirurgisch mit RCRI >1 • nicht-gefäßchirurgisch mit RCRI >2		BNP/NT-proBNP , wenn • Patient ≥65 Jahre • Patient zw. 45-64 Jahren mit sign. CVD o. RCRI >1
Nicht-invasive Funktionsuntersuchung	Ja , in Abhängigkeit von OP-Risiko, funktioneller Belastbarkeit u. RCRI	Ja , wenn METs <4 o. unbekannt	
Post-OP Monitoring	Troponin o. BNP/NT-proBNP in Hoch-Risikopatienten	Troponin + EKG , wenn • Symptome eines MI oder Ischämie	Troponin (48-72 h) , wenn • BNP ≥92 mg/l • NT-proBNP ≥ 300 mg/l • BNP/NT-proBNP unbekannt

Abbildung 1.1. Gegenüberstellung internationaler Leitlinien zur präoperativen Evaluierung des kardiovaskulären Risikos nicht-kardiochirurgischer Patienten. Gezeigt ist der vereinfachte schematische Ablauf der präoperativen Risikostratifikation gemäß den Leitlinien der Europäischen Gesellschaften für Kardiologie und Anästhesiologie (ESC/ESA), der US-Amerikanischen Gesellschaft für Kardiologie (ACC/AHA) sowie der Kanadischen Gesellschaft für Kardiologie (CCS). Wesentliche Unterschiede zwischen den Leitlinien unterschiedlicher Fachgesellschaften sind farblich hervorgehoben. KHK: koronare Herzkrankheit, CVD: kardiovaskuläre Erkrankung, MET: metabolisches Äquivalent, RCRI: Revised Cardiac Risk Index, NSQIP: National Surgical Quality Improvement Program, MICA: Myocardial Infarction or Cardiac Arrest, BNP: B-type natriuretisches Peptid, NT-proBNP: N-terminales pro-brain natriuretisches Peptid, MI: Myokardinfarkt.

1.1.2.5 Risikoadaptierte Prävention und Therapie

Ziel der präoperativen Patientenevaluierung besteht in der Minimierung perioperativer Mortalität und Morbidität. Die Einschätzung des perioperativen kardiovaskulären Risikos verbessert die präoperative Patientenaufklärung und erlaubt die Beurteilung der Notwendigkeit weiterführender diagnostischer Untersuchungen. Umgekehrt kann sie zur Vermeidung überflüssiger Voruntersuchungen und infolgedessen zur Verkürzung der präoperativen Untersuchungsabläufe und Kosteneinsparungen führen. In Patienten mit hohem prognostiziertem perioperativem Risiko können, sofern alternative Therapiemethoden zur Verfügung stehen, risikoärmere

Operationsverfahren in Erwägung gezogen werden. Dies könnte mitunter die Absage des operativen Eingriffes zugunsten einer konservativen Behandlung (Bestrahlung, Chemotherapie, etc.) zur Folge haben. Eine Reduktion des kardiovaskulären Risikos kann darüber hinaus durch gezielte Initiierung bzw. Intensivierung medikamentöser Therapien erreicht werden. Die präoperative Patientenevaluierung erlaubt zudem eine Anpassung des peri- und postoperativen Monitorings, bspw. durch Einplanung eines postoperativen Intensivaufenthaltes (Lehmann 2017). Ob die präoperative Evaluierung nicht-kardiochirurgischer Patienten tatsächlich zur Anpassung der perioperativen Therapie bzw. des Monitorings und damit zur verbesserten Prognose des Patienten führt, ist unzureichend belegt (Auerbach et al. 2007; Johansson et al. 2013; Mol et al. 2019).

1.2. Atherosklerose als Ursache perioperativer kardiovaskulärer Ereignisse

1.2.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen bilden die häufigste Todesursache weltweit (WHO 2016). Allein in Deutschland konnten 2017 knapp 37 % aller Todesfälle auf die Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen zurückgeführt werden (Statistisches Bundesamt 2017). Darunter ist Atherosklerose mit ihren Folgeerscheinungen MI und Schlaganfall für etwa 85 % der kardiovaskulären Mortalität verantwortlich (WHO 2016).

1.2.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung der arteriellen Gefäßwand. Sie manifestiert sich vorrangig in großen und mittleren Arterien wie Aorta, Carotiden und Koronararterien (Libby und Hansson 2015).

Anatomie der Gefäßwand

Die arterielle Gefäßwand besteht aus drei Schichten, die sich in Aufbau und Funktion unterscheiden. Das Innere der Gefäßwand ist mit einem einschichtigen Plattenendothel, der *Tunica intima* (Intima) ausgekleidet. Endothelzellen sind über dichte Zell-Zell-Kontakte, sog. *Tight junctions*, untereinander verbunden und liegen einer Basallamina auf. Die Intima bildet eine Diffusionsbarriere zwischen Gefäßlumen und Subendothelialraum. Gleichzeitig ist sie an der Regulation der Leukozytenmigration, Blutgerinnung, Gefäßweite, Angiogenese und der Synthese extrazellulärer Matrix beteiligt. Die *Membrana elastica interna* trennt die Intima von der mittleren Schicht der Gefäßwand, der *Tunica media* (Media). Letztere ist aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen (SMC) aufgebaut, die in einer extrazellulären Matrix eingebettet sind. Ihre Hauptfunktion besteht in der Regulation der Lumenweite und des Gefäßwiderstandes. Die äußere, dritte Schicht der Gefäßwand bildet die *Tunica adventitia* (Adventitia). Sie wird durch die *Membrana elastica externa* von der Media abgegrenzt,

besteht aus Bindegewebe, elastischen und kollagenen Fasern und ist für die nervale und metabolische Versorgung des Blutgefäßes verantwortlich (Lusis 2000).

Endotheliale Dysfunktion

Die allgemein anerkannte Theorie zur Pathogenese der Atherosklerose ist auf die US-amerikanischen Wissenschaftler Ross und Glomset zurückzuführen. Gemäß ihrer *response-to-injury* Hypothese von 1977 stellt die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen eine Reaktion des Gefäßes auf eine lokale Schädigung des Endothels, der Intima, dar. Entsprechend prädisponiert für die Bildung atherosklerotischer Plaques sind Gefäßabschnitte, in denen turbulente Strömungswiderstände herrschen (Ross et al. 1977). Im Wesentlichen betrifft dies Bifurkationen, arterielle Gefäßabzweigungen, Aortenbogen und Herzklappen (Dai et al. 2004; Morbiducci et al. 2016). Die durch den turbulenten Blutfluss erzeugten Scherkräfte stellen einen mechanischen Reiz für das Endothel dar, in dessen Folge es zur Aktivierung und Schädigung der Endothelzellen kommen kann. Regionen mit laminarer Strömung bleiben hingegen verschont (McMillan 1985). Neben veränderten Strömungsverhältnissen erhöhen weitere genetische und umweltbedingte Faktoren, wie Dyslipidämie (Hyperlipoproteinämie und -cholesterinämie), Hypertonie, Hyperglykämie, Rauchen sowie Infektionen das Risiko einer Atherosklerose. Allen gemein ist die Ausübung oxidativen, mechanischen, metabolischen, toxischen oder immunologischen Stresses auf Endothelzellen, was die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion begünstigt (Lusis 2000). Im Rahmen dieser verlieren Endothelzellen ihre Fähigkeit zur Synthese und Freisetzung des vasodilatierend wirksamen Stickstoffmonoxids (NO). Aufgrund der daraus resultierenden gesteigerten Empfindlichkeit der Gefäßwand gegenüber Vasokonstriktoren kommt es zur Erhöhung des Gefäßtonus sowie zur vermehrten Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion an das Endothel (Münzel 2008).

Schaumzellläsionen

Die initiale Schädigung des Endothels führt zur Konformationsänderung des endothelialen Zytoskeletts, zur Lockerung der *Tight junctions* und infolgedessen zur gesteigerten parazellulären Permeabilität der Intima (Florian et al. 2003). Makromoleküle, darunter Lipoproteine (v.a. low-density Lipoprotein, LDL) dringen vermehrt in den subendothelialen Raum. Die Folge ist eine intimale Anreicherung von LDL, welches durch myeloische Peroxidasen, freie Sauerstoff- (ROS) oder Stickstoffradikale (NOS) zu oxLDL oxidiert (Leitinger 2003; Marchio et al. 2019) und von sog. *Pattern Recognition Rezeptoren* (PRR) gebunden wird. Es kommt zur Induktion einer lokalen Inflamationsreaktion des Endothels. Die Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), Vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), E- und P-Selektin) und Zytokinen (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), Monozyten-Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Interleukin-8 (IL-8)) wird hochreguliert, was die vermehrte Rekrutierung,

Adhäsion und Migration von Leukozyten, insbesondere von T-Lymphozyten und Monozyten nach sich zieht. In die Gefäßwand eingewanderte Monozyten differenzieren zu Makrophagen. Diese binden und internalisieren oxLDL über Scavenger-Rezeptoren (SR; z.B. CD36, SR-A1, Lektin-artiger oxLDL Rezeptor-1 (LOX-1)). Übersteigt die oxLDL-Zufuhr die metabolische Kapazität von Makrophagen, bilden sich intrazelluläre Lipidtröpfchen. Da diese Makrophagen unter dem Lichtmikroskop schaumig erscheinen lassen, werden sie als Schaumzellen bezeichnet. Die herdförmige Ansammlung der Zellen führt zur Ausbildung der frühstadialen Atherosklerose, sog. Schaumzellläsionen (*fatty streaks*) (Hansson 2005; Lusis 2000).

Progression zum Fibroatherom

Fortgeschrittene atherosklerotische Plaques, sog. *Fibroatherome*, sind durch eine fibröse Kappe und nekrotische Areale charakterisiert. Die im Zuge der chronischen Inflammationsreaktion von T-Lymphozyten und Makrophagen sezernierten Zytokine (Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-1 (IL-1)) und Wachstumsfaktoren (Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Platelet-derived Growth Factor-B (PDGF-B)) führen zur Aktivierung von SMCs. Daraufhin migrieren diese aus der Media in die Intima, beginnen vermehrt zu proliferieren und extrazelluläre Matrix zu sezernieren (Doran et al. 2008). Dies führt in der Regel zur Verdickung der Intima (*Neointima*) und der Ausbildung einer fibrösen Kappe, die maßgeblich für die Integrität und Stabilität des atherosklerotischen Plaques verantwortlich ist. Sie trennt das Gefäßlumen vom stark thrombogenen lipidreichen Kern, der das Ergebnis apoptotischer und nekrotischer Schaumzellen ist (Lusis 2000). Intrazelluläres Cholesterin kann in Form von Cholesterinkristallen präzipitieren, die wiederum die Aktivierung des Inflammasoms und infolgedessen den programmierten Zelltod von Schaumzellen induzieren (Feng et al. 2003). Mit fortschreitender Atherogenese gewinnt der Plaque an Volumen, kann durch eine dicke fibröse Kappe jedoch lange Zeit intakt bleiben. Die zunehmende Okklusion des Gefäßlumens kann sich durch Manifestation klinischer Symptome, bspw. in Form einer belastungsabhängigen stabilen *Angina pectoris* (AP) äußern (van der Wal und Becker 1999).

Instabile, vulnerable atherosklerotische Läsionen

Die Wachstumsgeschwindigkeit atherosklerotischer Plaques wird durch kardiovaskuläre Risikofaktoren bestimmt (Eggen und Solberg 1968). Die Zunahme der Plaquegröße sowie der erhöhte Sauerstoffverbrauch Plaque-ansässiger Immunzellen können eine lokale Hypoxie innerhalb der Läsion auslösen. Die Folge ist Neoangiogenese (Sluimer et al. 2008). Neugebildete Blutgefäße haben ihren Ursprung im *Vasa vasorum* der Adventitia und bieten alternative Eintrittsmöglichkeiten für inflammatorische Zellen in den Plaque. Neoangiogenese und die durch sie verursachten Mikroeinblutungen können zum rapiden Wachstum und zur gesteigerten inflammatorischen Aktivität des atherosklerotischen Plaques beitragen (Kolodgie et al. 2003). Des Weiteren führen proteolytische

Enzyme (Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Cathepsine) und die Inhibierung von SMCs zum Abbau der fibrösen Kappe und infolgedessen zur Abnahme ihrer mechanischen Belastbarkeit (Ketelhuth und Back 2011; Libby 2000). Gleichzeitig nehmen Scherkräfte, die auf den progredienten Plaque wirken, zu (Wang et al. 2016a). Eine atherosklerotische Läsion gilt in diesem Stadium als massiv Rupturgefährdet und wird als vulnerabler Plaque bezeichnet.

Plaqueruptur

Hält der vulnerable atherosklerotische Plaque den mechanischen Scherkräften nicht mehr Stand und wird beschädigt, kann es zur Exposition thrombogener Materialien und infolgedessen zur Aktivierung der Koagulationskaskade mit Thrombosierung kommen. Die Folge ist eine partielle oder vollständige Gefäßokklusion, die sich klinisch, je nach Lokalisation, häufig in Form eines akuten Koronarsyndroms oder eines thromboembolischen Apoplex manifestiert. Weniger häufig ist die Inzidenz peripherer, viszeraler oder retroperitonealer Gefäßverschlüsse.

Pathophysiologisch liegen der Thrombusbildung zwei Mechanismen zugrunde (Libby 2002). Die oberflächliche Erosion einzelner Endothelzellen, verursacht durch den Abbau extrazellulärer Matrix (Rajavashisth et al. 1999) oder Endothelzell-Apoptose (Mallat et al. 1999b), führt zur Freilegung subendothelialen Kollagens und von *Von Willebrand-Faktor*. Die dadurch induzierte Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten haben eine rasche Bildung thrombotischer Auflagerungen zur Folge. Eine solche Plaqueerosion ist häufig und verläuft meist asymptomatisch. Jedoch werden etwa ein Viertel aller akuten Koronarthrombosen auf erodierte Plaques zurückgeführt (Jia et al. 2016; Libby 2002).

Die Mehrheit akut auftretender MIs ist durch eine Ruptur der fibrösen Kappe bedingt. Hierdurch gelangt der lipid-nekrotische Kern mit den Gerinnungsfaktoren des Blutes in Kontakt. Der nekrotische Kern enthält stark thrombogene Proteine, allen voran den von Makrophagen und SMCs sezernierten *Tissue factor*. Die Exposition von subendotheliale Kollagen, extrazellulärer Matrix und *Tissue factor* führt wiederum zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und zur plötzlichen Thrombosierung (Libby 2002). Die Schulterregion der atherosklerotischen Läsion gilt unterdessen als besonders vulnerable, da diese den größten Scherkräften ausgesetzt ist (Pasterkamp et al. 2000; Richardson et al. 1989). Zusätzlich akkumulieren inflammatorische Zellen bevorzugt im Bereich der Plaqueschultern und treiben so die progrediente Ausdünnung und Destabilisierung der fibrösen Kappe voran (Stöger et al. 2012; van der Wal et al. 1994).

1.2.3 Ätiologie perioperativer Myokardinfarkte

MIs sind durch den ischämischen Untergang myokardialer Zellen gekennzeichnet. Die in Verbindung mit nicht-kardiochirurgischen Eingriffen auftretenden MIs lassen sich hinsichtlich ihrer

zugrundeliegenden Pathophysiologie in Typ 1- und Typ 2-MIs unterteilen. Typ-1 MIs werden durch ein akutes atherothrombotisches koronares Ereignis wie Ruptur, Fissur oder Erosion instabiler Koronarplaques verursacht, in deren Folge es zur Ausbildung eines gefäßverschießenden Thrombus kommen kann. Einem Typ 2-MI liegt hingegen ein Ungleichgewicht zwischen myokardialem Sauerstoffangebot und -bedarf zugrunde (Karatolios et al. 2016).

Die Inzidenz perioperativer MIs, die auf eine Plaqueruptur zurückzuführen sind, variiert in verschiedenen angiographischen Studien zwischen 13 und 59 % (Hanson et al. 2013; Helwani et al. 2018; Sheth et al. 2018). Zudem wurde gezeigt, dass gefäßchirurgische KHK-Patienten, die einen perioperativen MI oder kardialen Tod erleiden, präoperativ eine höhere Anzahl Atherosklerose-erkrankter Gefäße, atherosklerotischer Läsionen sowie verschlossener Kollateralgefäße im Vergleich zu KHK-Patienten ohne perioperatives Ereignis aufweisen (Ellis et al. 1996).

Eine weitere vom perioperativen MI abzugrenzende Entität stellt die Ischämie-bedingte Myokardschädigung nach nicht-kardiochirurgischen Operationen, die sog. MINS, dar. MINS ist durch eine Troponin-Konzentrationsveränderung bei gleichzeitiger Abwesenheit Ischämie-typischer Symptome innerhalb von 30 Tagen postoperativ charakterisiert. Pathophysiologisch können dem klinisch inapparenten ischämischen Untergang des Myokards sowohl ein Missverhältnis aus Sauerstoffverbrauch und -angebot als auch transiente Gefäßverschlüsse zugrunde liegen (Devereaux und Szczeklik 2019).

1.2.4 Atherosklerose unter dem Einfluss perioperativen Stresses

Die durch einen operativen Eingriff hervorgerufenen physiologischen Reaktionen eines Organismus werden unter dem Begriff des perioperativen Stresses zusammengefasst (Giannoudis et al. 2006). Pathophysiologisch liegen der Stressantwort weitreichende endokrine, metabolische und immunologische Veränderungen zugrunde (Desborough 2000). Diese werden in erster Linie durch den chirurgischen Stimulus sowie der begleitenden Anästhesie und Analgesie hervorgerufen (Rossaint und Zarbock 2018). Die Schwere des Eingriffes sowie seine Dauer und das Ausmaß des zugefügten Gewebstraumas bestimmen unterdessen die Intensität der Stressantwort (Desborough 2000). Darüber hinaus tragen unmittelbar präoperative sowie postoperativ auftretende Faktoren zur Auslösung und Aufrechterhaltung der Stressreaktion bei (Devereaux und Sessler 2015; Manou-Stathopoulou et al. 2019).

Perioperativ kommt es zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems, infolgedessen zur Freisetzung von Katecholaminen, die wiederum eine Steigerung der Herzfrequenz und des systolischen Blutdrucks bewirken (Priebe 2016). Zusätzlich können Flüssigkeitsverschiebungen Hypovolämie und Minderperfusion betroffener Gewebeabschnitte auslösen. Anästhetika und Analgetika führen zur Verminderung des Herzzeitvolumens, Vasodilatation und Hypotonie,

Hypothermie sowie zu respiratorischen Einschränkungen (Bierle et al. 2019; Rossaint und Zarbock 2018). Das Gewebstrauma und die damit einhergehende Zellschädigung hat die Freisetzung entzündlicher Mediatoren (IL-1, IL-6, TNF- α) durch Leukozyten, Fibroblasten und Endothelzellen zur Folge. Die anfänglich lokale Inflammationsreaktion wird durch den Einsatz von Blutprodukten und künstlicher Beatmung sowie durch die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen verstärkt und entwickelt sich rasch zur systemischen Immunantwort (Desborough 2000; Hughes et al. 2010; Rossaint und Zarbock 2018). Im Rahmen dessen kommt es zur gesteigerten Koagulation, die durch den Anstieg von Gerinnungsfaktoren, verstärkter Thrombozyten-Aggregation sowie verminderter Fibrinolyse gekennzeichnet ist (Collins et al. 1977). Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen, dass die im Rahmen eines operativen Eingriffes auftretenden immunologischen Vorgänge zu einer raschen Progression und Destabilisierung vorbestehender atherosklerotischer Plaques führen (Fuijkschot et al. 2016; Janssen et al. 2015).

Die durch Blutdruckveränderungen und Tachykardie zunehmenden Scherkräfte sowie die systemische Inflammationsreaktion des Körpers können zur Destabilisierung und Ruptur vorbestehender atherosklerotischer Plaques und in Folge der Hyperkoagulabilität zum perioperativen Typ-1 MI führen. Vorerkrankte Gefäßabschnitte reagieren auf die Erhöhung des Sympathikotonus mit Vasokonstriktion, was wiederum die Perfusion nachgeschalteten Gewebes sowie das Sauerstoffangebot reduziert. Gleichzeitig ist der myokardiale Sauerstoffbedarf durch Tachykardie erhöht. Hypotonie, Hypoxie und Anämie verstärken das Missverhältnis zwischen Sauerstoffverbrauch und -angebot zusätzlich, was die Manifestation eines perioperativen Typ-2 MIs zur Folge haben kann (Devereaux und Sessler 2015; Smilowitz und Berger 2016) (Abb. 1.2).

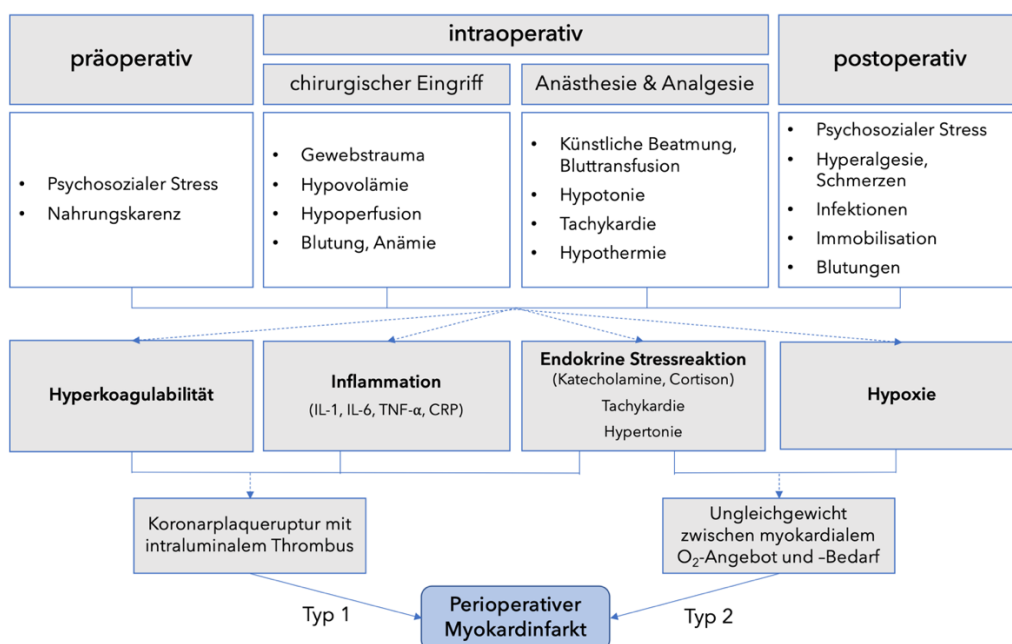


Abbildung 1.2. Komponenten perioperativen Stresses und ihre Assoziation mit perioperativen Myokardinfarkten. IL: Interleukin, TNF- α : Tumornekrosefaktor- α , CRP: C-reaktives Protein.

1.3 Rolle des angeborenen und adaptiven Immunsystems in der Atherosklerose

Die Pathogenese der Atherosklerose ist durch eine fehlgeleitete chronisch-inflammatorische Antwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems gekennzeichnet. Neben Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten wird einigen weiteren Leukozyten-Subpopulationen, darunter Neutrophilen, dendritischen Zellen, Mastzellen, natürlichen Killerzellen (NK) und B-Lymphozyten, eine relevante Rolle im Krankheitsverlauf zugeschrieben (Simon Daniel und Zidar 2012). Zudem zeigen prospektive Langzeitstudien eine Assoziation zwischen hohem Gesamtleukozyten-Wert und kardialem Risiko (Kim et al. 2017; Lee et al. 2001). Im Folgenden wird die Funktion der für die hier vorgelegte Arbeit relevanten Zellpopulationen in der Atherogenese herausgearbeitet. Dies beschränkt sich auf Monozyten und Makrophagen, NKs sowie die den T-Lymphozyten angehörigen Subtypen.

1.3.1 Monozyten und Makrophagen

Als Teil des angeborenen Immunsystems gelten Monozyten und Makrophagen als Hauptakteure der Atherogenese. Sie sind an allen Stadien, von Initiierung über Progression hin zur Komplikation des atherosklerotischen Plaques, beteiligt (Moroni et al. 2019).

Humane Monozyten lassen sich anhand ihrer charakteristischen Oberflächenexpression von Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptor CD14 und des FcγIII-Rezeptors CD16 in drei Subtypen differenzieren, welche sich in Eigenschaften und Funktion unterscheiden. Klassische Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻) sind kurzlebig, bilden mit etwa 85 % den größten Anteil der Gesamtmonozyten-Population, weisen eine starke Phagozytoseaktivität auf und produzieren ROS. Intermediäre Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) machen 2-8 bzw. 2-11 % der Gesamt-Monozyten aus und gelten aufgrund ihrer vermehrten Zytokinproduktion (Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), IL-1β, IL-6) als pro-inflammatorisch. Entgegen des klassischen Subtyps generieren sie keine ROS. Unterdessen weisen intermediäre Monozyten angiogenetische Eigenschaften auf; nicht-klassische Monozyten patrouillieren entlang der Gefäßwand und überwachen die Integrität des Endothels (Hristov und Weber 2011; Sampath et al. 2018). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass es sich weniger um distinkte Zellpopulationen handelt, sondern viel mehr um den Differenzierungsprozess klassischer Monozyten hin zu intermediären und nicht-klassischen Monozyten (Patel et al. 2017).

Aus prospektiven klinischen Langzeitstudien geht hervor, dass ein hoher Gesamt-Monozyten-Wert (Yamamoto et al. 2016) sowie hohe Werte des klassischen (Berg et al. 2012; Höpfner et al. 2019) und intermediären Subtyps (Rogacev et al. 2012) mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergehen. Darüber hinaus konnten hohe klassische Monozyten-Werte nach stattgehabtem MI mit einer verminderten myokardialen Regeneration und eingeschränkter linksventrikulärer

Ejektionsfraktion assoziiert werden (Tsujioka et al. 2009). Regelmäßiges, leichtes körperliches Training korreliert hingegen mit einer Senkung des intermediären Monozyten-Wertes (Timmerman et al. 2008). Nicht-klassische Monozyten werden mit fortgeschrittener endothelialer Dysfunktion, erhöhtem BMI und eine Zunahme der Intima-Media-Dicke assoziiert (Rogacev et al. 2010; Urbanski et al. 2017). Zudem ist die Anzahl CD16⁺ Monozyten in Patienten mit KHK erhöht (Kashiwagi et al. 2010; Schlitt et al. 2004; Zhuang et al. 2017). Umgekehrt weisen Schlaganfall-Patienten mit hohen Werten des intermediären und nicht-klassischen Substyps ein geringeres Risiko für Komplikationen (Infektion, Gesamtmortalität) auf (Urta et al. 2009), was auf die angiogenetischen und wundheilungsfördernden Eigenschaften von CD16⁺ Monozyten zurückzuführen sein könnte. Diese klinischen Daten unterstreichen die Plastizität und Heterogenität der Funktionen, die unterschiedlichen Subpopulationen in der Atherogenese zukommt (Tab. 1.1).

Tabelle 1.1. Übersicht klinischer Studien zur Untersuchung der Assoziation von Monozyten mit kardiovaskulären Ereignissen. KHK: koronare Herzkrankheit, CV-Tod: kardiovaskulärer Tod, MI: Myokardinfarkt, AP: Angina pectoris.

Referenz	Zell-population	Studien-design	Patienten (n)	Kohorte	Endpunkt	Ergebnis
Yamamoto (2016)	Gesamt-Monozyten	prospektiv	389	KHK	CV-Tod, MI, instabile AP, Schlaganfall, Herzinsuffizienz, koronare Revaskularisierung	↑ Monozyten (>360/mm ³) waren unabhängiger Prädiktor des Endpunktes
Höpfner (2019)	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ (klassische)	prospektiv	994	KHK	CV-Tod, MI, Schlaganfall	↑ CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ waren unabhängiger Prädiktor des Endpunktes
Berg (2012)	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ (klassische)	prospektiv	700	Allgemeinbevölkerung	CV-Tod, MI, Schlaganfall	↑ CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ waren unabhängiger Prädiktor des Endpunktes
Rogacev (2012)	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ (intermediäre)	prospektiv	951	Koronarangiographie	CV-Tod, MI, Schlaganfall	↑ CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ waren unabhängiger Prädiktor des Endpunktes
Urbanski (2017)	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ (intermediäre)	prospektiv	130	KHK	Endotheliale Dysfunktion	↑ CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ waren unabhängig mit dem Endpunkt assoziiert
Urta (2009)	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ (intermediäre); CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ (nicht-klassische)	prospektiv	59	Schlaganfall	Infektion/Tod nach Schlaganfall	Assoziation zw. ↓ CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ u. CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ und Endpunkt

In Mäusen werden Monozyten anhand des Lymphozyten-Antigen 6-Komplexes (Ly6C) in zwei Subtypen unterschieden. Die vorherrschende Population ist durch eine hohe Ly6C-Expression (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁺⁺) gekennzeichnet und stellt das murine Äquivalent klassischer Monozyten dar. Im Fall einer Infektion oder Entzündung rekrutieren diese zügig in das betroffene, inflammatorische Gewebe. Den kleineren Anteil bilden CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻ Monozyten. Sie werden als patrouillierende bzw. residierende Monozyten bezeichnet und entsprechen dem nicht-klassischen Subtyp im humanen System. Sie migrieren vorwiegend in nicht-entzündliches Gewebe (Hristov und Weber 2011). Intermediäre Monozyten haben hingegen keinen direkten murinen Gegenpart (Moroni et al. 2019).

Der Atherogenese liegt eine lokale Inflammationsreaktion des Endothels zugrunde. Die damit einhergehende Sekretion von MCP-1 führt zur chemotaktischen Rekrutierung im Blut zirkulierender Monozyten in die Gefäßwand (Moroni et al. 2019). Das Migrationsausmaß unterscheidet sich dabei zwischen einzelnen Monozyten-Subtypen. Tierexperimentelle Daten zeigen, dass Makrophagen innerhalb atherosklerotischer Plaques vorwiegend aus inflammatorischen Ly6C⁺⁺ Monozyten hervorgehen (Swirski et al. 2007; Tacke et al. 2007). In die Gefäßwand transmigrierte Monozyten differenzieren wiederum in Abhängigkeit des umgebenden Milieus in unterschiedliche Makrophagen-Phänotypen. Klassisch aktivierte Typ 1 (M1)-Makrophagen entstehen in Anwesenheit von LPS, IFN- γ und TNF- α und sind durch ihre pro-inflammatorischen Eigenschaften charakterisiert. Sie zeichnen sich durch Sekretion inflammatorischer Mediatoren, darunter IL-1 β , IL-6, TNF- α , ROS, *Tissue factor* und MMPs, aus und gelten als Plaque-destabilisierend. Demgegenüber steht die heterogene Population alternativ aktivierter Typ 2 (M2)-Makrophagen. Diese werden überwiegend durch IL-4 und IL-10 aktiviert. Ihre Plaque-stabilisierenden Eigenschaften sind auf die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine (TGF- β , IL-10), fördernde Wundheilung sowie ein schnelles Abklingen der Entzündung durch Efferozytose zurückzuführen (Back et al. 2015). Andererseits können M2-Makrophagen durch die Sezernierung pro-angiogenetischer Wachstumsfaktoren (Vascular endothelial growth factor (VEGF)) und der dadurch induzierten Neoangiogenese wesentlich zur Destabilisierung atherosklerotischer Läsionen beitragen (Guo et al. 2018).

Makrophagen stellen den vorherrschenden Zelltyp atherosklerotischer Plaques dar. Die während des atherogenetischen Prozesses beobachtete Zunahme des Plaque-Makrophagengehaltes ist überwiegend auf die Proliferation gefäßständiger Makrophagen zurückzuführen (Robbins et al. 2013). Pro-inflammatorische M1-Makrophagen akkumulieren vorrangig in der Schulterregion atherosklerotischer Plaques. Durch die Sezernierung von MMPs fördern sie die progrediente Ausdünnung der fibrösen Kappe und die Destabilisierung der Läsion (Stöger et al. 2012). Zudem konnte ein niedriger M2-Makrophagengehalt mit einer gesteigerten Plaque-Vulnerabilität assoziiert werden (Johnson et al. 2014). In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, dass die biologische

Plastizität von Makrophagen weit über die ursprüngliche Differenzierung hinausgeht. Neben M1- und M2-Makrophagen wird Hämorrhagie- (M-HA), oxLDL- (M-Ox) und CXCL4-induzierten (M4) Makrophagen eine Bedeutung in der Pathophysiologie der Atherosklerose beigemessen (Gleissner 2012; Legein et al. 2013).

1.3.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und bilden 5-10 % der zirkulierenden Lymphozyten. Ihre Hauptfunktion besteht in der Erkennung und Lyse virusinfizierter und tumoröser Zellen durch Apoptose. NK-Zellen sind in der Lage, gesunde, körpereigene von infizierten bzw. entarteten Zellen zu unterscheiden. Ihre Aktivierung durch Interaktion mit betroffenen Zellen führt zur Ausschüttung von Perforinen und Granzymen aus zytoplasmatischen Granula, welche die Apoptose der Zielzelle induzieren. Zeitgleich kommt es zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)), die wiederum die Aktivierung von Makrophagen und T-Lymphozyten regulieren (Sedlacek 2017).

In atherosklerotischen Läsionen konnten NK-Zellen nur in geringer Konzentration nachgewiesen werden (1-2 Zellen pro Plaque) (Nour-Eldine et al. 2018). Sie wurden sowohl in der Plaqueschulter als auch unterhalb der fibrösen Kappe und von nekrotischen Arealen detektiert (Bobryshev und Lord 2005). Ihre Rolle in der Atherogenese ist jedoch weniger gut untersucht. Entgegen früherer tierexperimenteller Untersuchungen, die NK-Zellen einen pro-atherogenen Effekt zuschrieben, wurde kürzlich deutlich, dass sie unter homöostatischen Bedingungen keinen Effekt auf Atherosklerose ausüben. Eine systemische Überaktivierung von NK-Zellen, bspw. verursacht durch eine Virusinfektion oder eine Tumorerkrankung, konnte hingegen mit einer Atherosklerose-fördernden Wirkung assoziiert werden (Nour-Eldine et al. 2018), welche im Wesentlichen auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine zurückzuführen ist. IFN- γ führt zur Inhibierung Matrix-produzierender SMCs; TNF- α stimuliert zudem die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und führt infolgedessen zur verstärkten Rekrutierung von Leukozyten in den subendothelialen Raum. Ferner werden Schaumzellen durch die zytolytische NK-Zell-Aktivierung vermehrt apoptotisch und tragen so zur Plaquestabilisierung bei (Bonaccorsi et al. 2015; Ikeshita et al. 2014).

Klinische Studien, die die Assoziation von NK-Zellen mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen und Ereignisse untersuchten, kommen zu diskrepanten Ergebnissen. Clerc et al. beobachteten eine höhere NK-Zellzahl in KHK-Patienten gegenüber gesunden Probanden (Clerc und Rouz 1997). In einer älteren Kohorte zeigten Patienten mit Atherosklerose, verglichen mit Patienten ohne kardiovaskulärer Grunderkrankung, eine verminderte zytolytische Aktivität bei tendenziell

höheren NK-Leveln (Bruunsgaard et al. 2001). In einer prospektiven Studie an 124 Patienten, die sich einer Carotis-Endarteriektomie (CEA) unterzogen, korrelierten hohe NK-Level, gemessen sechs Stunden nach Intervention, mit einer erhöhten Inzidenz kardiovaskulärer Komplikationen innerhalb eines 30-tägigen Beobachtungszeitraumes (Kotfis et al. 2015). Dem gegenüber stehen eine Reihe retrospektiver klinischer Untersuchungen, in denen Patienten mit KHK bzw. mit akutem Koronarsyndrom gegenüber gesunden Probanden bzw. Patienten mit stabiler *Angina pectoris* niedrigere NK-Level aufwiesen (Backteman et al. 2014; Hak et al. 2007; Jabir et al. 2017; Jonasson et al. 2005; Yan et al. 2015) (Tab. 1.2).

Tabelle 1.2. Übersicht klinischer Studien zur Untersuchung der Assoziation natürlicher Killerzellen mit kardiovaskulären Ereignissen. CEA: Carotis-Endarteriektomie, KHK: koronare Herzkrankheit, CV-Tod: kardiovaskulärer Tod, MI: Myokardinfarkt, NSTEMI/STEMI: (Nicht-) ST-Hebungsinfarkt, TIA: transiente ischämische Attacke, AP: Angina pectoris.

Referenz	Zell-population	Studien-design	Patienten (n)	Kohorte	Endpunkt	Ergebnis
Kotfis (2015)	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	prospektiv	124	CEA	CV-Tod, MI, Schlaganfall/TIA, instabile AP, Arrhythmie innerhalb 30 Tage nach CEA	↑ %CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ /Lymphozyten in Patienten mit Endpunkt
Backteman (2014)	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	retrospektiv	102	KHK, gesunde Probanden	NSTEMI, stabile AP	↓ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ in KHK-Patienten vs. Probanden
Jabir (2017)	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	retrospektiv	190	KHK, gesunde Probanden	NSTEMI, STEMI, instabile AP	↓ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ in KHK-Patienten vs. Probanden

1.3.3 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entstammen hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, reifen im Thymus zu selbsttoleranten, naiven T-Lymphozyten heran und migrieren anschließend über die Blutbahn in sekundäre lymphatische Organe, wo sie eine zentrale Rolle der adaptiven Immunantwort einnehmen (Kruse 2015).

Sie sind durch die Expression des T-Zell-Rezeptors und des Transmembranproteins CD3 gekennzeichnet (Alarcon et al. 2006), bilden etwa 25-35 % aller Leukozyten in atherosklerotischen Plaques (Winkels et al. 2018) und akkumulieren vorwiegend im Bereich der fibrösen Kappe. In älteren Läsionen konnten sie zudem in der Adventitia nachgewiesen werden (Grabner et al. 2009; Hansson et al. 1988). Ein Großteil der T-Lymphozyten im atherosklerotischen Plaque weist Anzeichen vorheriger Aktivierung auf und liegt in Form von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen vor (Hansson und

Hermansson 2011). Das *Priming* der Zellen findet in den peripheren lymphatischen Organen statt. Naive T-Zellen binden an das durch MHC-Moleküle präsentierte Antigen, differenzieren daraufhin in T-Effektorzellen und induzieren eine Antigen-spezifische Immunantwort (Kruse 2015). Im Kontext der Atherosklerose stellen oxLDL, natives LDL, Apolipoprotein B-100 (ApoB-100, Hauptbestandteil von LDL) und Hitzeschockprotein 60 (HSP60) mögliche Antigene dar. Der Verlust der T-Zell-Toleranz gegenüber intrinsischen Proteinen ist auf die Bildung neuer Epitope durch Oxidation zurückzuführen (Lichtman et al. 2013). Inhibiert man die T-Zell-Bindung an ApoB-100, reduziert sich die Größe atherosklerotischer Plaques um 65 % (Hermansson et al. 2010). Die Aktivierung naiver T-Zellen durch Bindung eines passenden MHC-Molekül-Peptid-Komplexes führt zur klonalen Expansion der antigenspezifischen T-Effektorzelle und deren Migration in das betroffene Gewebe. Die Antagonisierung dafür erforderlicher Chemokinrezeptoren (CCR5, CXCR3 und CXCR6) geht wiederum mit einer verminderten Atherosklerosebildung einher (Galkina et al. 2007; Li et al. 2016; van Loosdregt et al. 2006; van Wanrooij et al. 2008). Im Plaque treffen T-Effektorzellen erneut auf antigenpräsentierende Zellen und induzieren infolgedessen eine lokale, antigenspezifische Immunantwort (Wolf und Ley 2019).

T-Lymphozyten differenzieren in Abhängigkeit des MHC-Moleküls (Klasse I oder II), Co-stimulierender Moleküle und des umgebenden Mikromilieus in Effektor-Subtypen, denen unterschiedliche Effekte in der Atherogenese zugeschrieben werden (Ammirati et al. 2015).

T-Helfer 1-Zellen (TH1)

Unter allen CD3⁺ T-Lymphozyten stellen TH1-Zellen (CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺) den häufigsten Zelltyp in atherosklerotischen Plaques dar (Frostegard et al. 1999). Sie entstehen durch die spezifische Interaktion naiver T-Lymphozyten mit Peptid-beladenen MHC-Klasse-II-Molekülen antigenpräsentierender Zellen in einem vorwiegend pro-inflammatorischen Milieu (IL-12, IFN- γ). Die durch IFN- γ induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet legt die Polarisierung zum TH1-Typ fest (Kruse 2015). TH1-Zellen sind durch ihre hohe Expression inflammatorischer Zytokine, insbesondere von IFN- γ charakterisiert. Die Behandlung mit Pentoxifyllin zur Inhibierung der TH1-Polarisierung (Laurat et al. 2001) sowie die genetische Manipulation von IFN- γ /IFN- γ -Rezeptor oder des TH1-definierenden Transkriptionsfaktors T-bet wirkt atheroprotektiv (Buono et al. 2005; Buono et al. 2003; Gupta et al. 1997). Umgekehrt führt die Verabreichung von IL-12 und IFN- γ zur Förderung eines TH1-Phänotyps (Lee et al. 1999a) sowie zur Zunahme atherosklerotischer Plaques (Whitman et al. 2000). In klinischen Studien korreliert der Schweregrad der kardiovaskulären Erkrankung bzw. des koronaren Ereignisses positiv mit der Anzahl zirkulierender TH1-Zellen (Li et al. 2019; Methe et al. 2005). In einer prospektiven Studie war das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse innerhalb eines 30-

tägigen Beobachtungszeitraumes nach CEA mit einer wiederum niedrigen Gesamtzahl CD3⁺CD4⁺ T-Helfer-Zellen assoziiert (Kotfis et al. 2015) (Tab. 1.3).

T-Helfer 2-Zellen (TH2)

TH2-Zellen (CD3⁺CD4⁺IL-4⁺) entstehen gleichermaßen infolge der Aktivierung naiver T-Lymphozyten durch Peptid-beladene MHC-Klasse-II-Moleküle antigenpräsentierender Zellen, jedoch unter dem Einfluss von IL-4 und in Abwesenheit von IL-12. IL-4 vermittelt wiederum die Aktivierung des TH2-definierenden Transkriptionsfaktors GATA-3. TH2-Zellen sind durch Sezernierung von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 charakterisiert (Kruse 2015) und in nur geringer Anzahl in atherosklerotischen Plaques vorzufinden (Frostegard et al. 1999). Zudem wird ihr Stellenwert in der Atherogenese kontrovers diskutiert. IL-10 inhibiert die IL-12- und IFN- γ -Freisetzung und führt infolgedessen zur Reduktion pro-atherogener TH1-Level (Pinderski et al. 2002). Unterdessen werden IL-4 sowohl pro-atherogene (Davenport und Tipping 2003; King et al. 2002) als auch atheroprotektive Effekte zugeschrieben (Huber et al. 2001). In einer weiteren tierexperimentellen Untersuchung bewirkte die IL-4-Defizienz wiederum keine Veränderung der Größe und Architektur atherosklerotischer Plaques (King et al. 2007). In einer kardiologischen Studie korrelierten niedrige TH2-Level mit der Intima-Media-Dicke sowie mit dem Auftreten von MIs in Frauen (Engelbertsen et al. 2013), was eine atheroprotektive Funktion des TH2-Subtyps im Patienten nahelegt (Tab. 1.3).

T-Helfer 17-Zellen (TH17)

Die Polarisierung einer naiven T-Zelle zur TH17-Zelle (CD3⁺CD4⁺IL-17⁺) erfolgt als Reaktion der Interaktion mit Peptid-beladenen MHC-Klasse-II-Molekülen antigenpräsentierender Zellen und in Anwesenheit von IL-6 und TGF- β . Diese induzieren die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ROR γ T und setzen so die Polarisierung zum TH17-Subtyp fest. Wesentliche Zytokine, die von TH17-Zellen produziert werden, umfassen IL-17, IL-21, IL-22 (Kruse 2015). In atherosklerotischen Plaques sind TH17-Zellen nur geringfügig vertreten (Eid et al. 2009) und ihre Funktion in der Atherogenese ist unzureichend untersucht. Tierexperimentelle Studien schreiben ihnen sowohl atheroprotektive als auch pro-atherogene Eigenschaften zu. So führt die Depletion oder Neutralisierung des TH17-Zytokins IL-17 in einigen Untersuchungen zur verstärkten Atherosklerose (Cheng et al. 2011; Danzaki et al. 2012; Madhur et al. 2011), in anderen wiederum zur verminderten Atheroskleroselast (Butcher et al. 2012; Erbel et al. 2009; Nordlohne et al. 2018). Klinische Untersuchungen zur Häufigkeit von TH17-Zellen in Patienten mit kardiovaskulärer Grunderkrankung vermitteln gleichermaßen uneinheitliche Schlüsse. Einige Studien zeigten eine positive Korrelation der TH17-Anzahl mit dem Schweregrad der Atherosklerose (Cheng et al. 2008; Wang et al. 2011), andere wiederum fanden keine Assoziation (Zhao et al. 2011) (Tab. 1.3). Hinweise, dass TH17-Zellen in pro-atherogene TH1-

Zellen re-differenzieren können (Lee et al. 2009), stellen eine mögliche Ursache der bis heute widersprüchlichen Datenlage dar.

Cytotoxische T-Zellen

Cytotoxische T-Zellen (CD3⁺CD4⁻CD8⁺) nehmen eine zentrale Rolle in der Erkennung und Eliminierung virusinfizierter und entarteter Zellen ein. Sie entstehen, anders als TH-Subtypen, durch die Bindung der naiven T-Zelle an Peptid-beladene MHC-Klasse-I-Moleküle. Die Aktivierung cytotoxischer T-Zellen hat die Freisetzung von IFN- γ , TNF- α und IL-17 zur Folge (Kruse 2015). CD8⁺ T-Lymphozyten sind, verglichen mit CD4⁺ Zellen, in deutlich geringerer Anzahl in atherosklerotischen Plaques vertreten. In fortgeschrittenen Läsionen kann ihr Anteil indessen auf bis zu 50 % ansteigen (Kleindienst et al. 1993; van der Wal et al. 1989). Die spezifische Antikörper-vermittelte Depletion von CD8⁺ Zellen führt in atherosklerotischen Mäusen zur Bildung kleinerer Plaques mit stabilerem Phänotyp (Cochain et al. 2015; Kyaw et al. 2013). Umgekehrt steigert die Injektion cytotoxischer T-Zellen die Plaquegröße und -destabilisierung. Der beobachtete Effekt konnte auf die cytolytische Aktivität (Perforine, Granzyme) der CD8⁺ T-Lymphozyten sowie auf deren Sezernierung von TNF- α , nicht jedoch von IFN- γ , zurückgeführt werden (Kyaw et al. 2013). Auch in klinischen Studien korrelieren hohe Werte cytotoxischer T-Zellen mit der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse (Bergstrom et al. 2012; Kolbus et al. 2013) (Tab. 1.3).

Neri Serneri et al. untersuchten zudem die Assoziation aktivierter T-Lymphozyten, gekennzeichnet durch die Expression des MHC-Klasse-II-Moleküls *humanes Leukozyten Antigen DR* (HLA-DR), mit dem Schweregrad der KHK. Verglichen mit Patienten, die an einer stabilen AP litten, wiesen Patienten mit instabiler AP eine erhöhte HLA-DR-Expression von CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten auf (Neri Serneri et al. 1997) (Tab. 1.3).

Tabelle 1.3. Übersicht klinischer Studien zur Untersuchung der Assoziation T-lymphoider Subtypen mit kardiovaskulären Ereignissen. TH: T-Helfer, CEA: Carotis-Endarteriektomie, KHK: koronare Herzkrankheit, CV-Tod: kardiovaskulärer Tod, MI: Myokardinfarkt, NSTEMI/STEMI: (Nicht-) ST-Hebungsinfarkt, TIA: transiente ischämische Attacke, AP: Angina pectoris, PCI: perkutane Koronarintervention, CPS: Chest pain Syndrom.

Referenz	Zell-population	Studien-design	Patienten (n)	Kohorte	Endpunkt	Ergebnis
Kotfis (2015)	CD3 ⁺ CD4 ⁺	prospektiv	124	CEA	CV-Tod, MI, Schlaganfall/TIA, instabile AP, Arrhythmie innerhalb 30 Tage	↓ CD3 ⁺ CD4 ⁺ in Patienten mit Endpunkt
Methe (2005)	CD3 ⁺ IFN- γ ⁺ (TH1)	retrospektiv	81	KHK, gesunde Probanden	MI, Stabile AP, instabile AP	↑ CD3 ⁺ IFN- γ ⁺ in Patienten mit Endpunkt

Li (2019)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ (TH1)	retrospektiv	133	Koronarangiographie, PCI, gesunde Probanden	NSTEMI, STEMI, stabile AP	Assoziation \uparrow CD3 ⁺ CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ mit KHK- Schweregrad
Engelbertsen (2013)	CD56 ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-4 ⁺ (TH2)	prospektiv	700	Allgemeinbevölkerung	CV-Tod, MI, Schlaganfall, Carotis Intima-Media-Dicke	Assoziation \downarrow CD56 ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-4 ⁺ mit Intima-Media-Dicke u. MI-Risiko in Frauen
Cheng (2008)	CD4 ⁺ IL-17 ⁺ (TH17)	retrospektiv	85	KHK	MI, instabile AP, stabile AP, CPS	\uparrow CD4 ⁺ IL-17 ⁺ / CD4 ⁺ in Patienten mit MI und instabiler AP
Neri Serneri (1997)	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ ; CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ ; CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	retrospektiv	95	KHK, gesunde Probanden	Instabile AP, stabile AP	\uparrow HLA-DR- Expression in CD3 ⁺ , CD4 ⁺ u. CD8 ⁺ Zellen in Patienten mit instabiler AP
Kolbus (2013)	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ (Cytotoxische)	prospektiv	700	Allgemeinbevölkerung	CV-Tod, MI	Assoziation \uparrow CD3 ⁺ CD8 ⁺ mit Endpunkt

Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Grundsätzlich werden Tregs in zwei Subpopulationen unterschieden. Natürliche Tregs (nTregs) gehen aus thymischen Vorläuferzellen im Rahmen der T-Zell-Differenzierung hervor und migrieren anschließend in die Peripherie. Induzierte Tregs (iTregs) entstehen hingegen durch die Bindung naiver T-Lymphozyten an Autoantigene oder harmlose Fremd-Peptide, die über den MHC-Klasse-II-Komplex unreifer dendritischer Zellen präsentiert werden. Voraussetzung dafür ist die Anwesenheit von TGF- β bei gleichzeitigem Fehlen inflammatorischer Signale (Kruse 2015). Beide Populationen bilden den peripheren Treg-Pool (Tregs) und werden durch das Expressionsprofil CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ (*Forkhead-box-protein 3*) charakterisiert (Rodriguez-Perea et al. 2016), wobei die Expression von Foxp3 und CD127 invers korreliert (Liu et al. 2006).

Tregs repräsentieren 5-10 % aller im Blut zirkulierenden CD4⁺ T-Lymphozyten (Wang et al. 2016b). Sie sind für die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz und der Homöostase des Immunsystems verantwortlich. Ihre zentrale Aufgabe besteht in der Suppression abnormer, überschießender und gegen körpereigene Zellen gerichteter Immunantworten. Störungen im Treg-Haushalt können zur Autoimmunität und im Zuge dessen zur Immunreaktion gegen körpereigene Zellen führen (Pastrana et al. 2012). Ein Ungleichgewicht zwischen Tregs und T-Effektorzellen konnte mit verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes mellitus (Lindley et al. 2005), rheumatoide Arthritis (Cao et al. 2003) und

Multiple Sklerose (Viglietta et al. 2004) assoziiert werden. Darüber hinaus gehen eine Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen und Ereignisse mit signifikant reduziertem Treg-Level und eingeschränkter immunsuppressiver Funktion von Tregs einher (Cheng et al. 2008; Han et al. 2007; Mor et al. 2006; Zhang et al. 2012). In ischämischen Schlaganfall-Patienten korreliert die Anzahl zirkulierender Tregs invers mit dem Infarkt volumen sowie mit der Inzidenz neurologischer und infektiöser Komplikationen (Santamaría-Cadauid et al. 2020). In einer prospektiven Langzeitstudie wiesen Patienten mit niedrigem Treg-Level ein erhöhtes Risiko für akute Koronareignisse innerhalb eines 15-jährigen Beobachtungszeitraumes auf (Wigren et al. 2012) (Tab. 1.4). Die atheroprotektive Wirkung Foxp3⁺ Tregs und deren zugrundeliegende Mechanismen werden im folgenden Kapitel im Detail dargelegt.

Tabelle 1.4. Übersicht klinischer Studien zur Untersuchung der Assoziation regulatorischer T-Zellen mit kardiovaskulären Ereignissen. Foxp3: forkhead-box-protein 3, KHK: koronare Herzkrankheit, CV-Tod: kardiovaskulärer Tod, MI: Myokardinfarkt, NSTEMI: Nicht-ST-Hebungsinfarkt, AP: Angina pectoris, CPS: Chest pain Syndrom.

Referenz	Zell-population	Studien-design	Patienten (n)	Kohorte	Endpunkt	Ergebnis
Cheng (2008)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	retrospektiv	85	KHK	MI, instabile AP, stabile AP, CPS	↓ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ in Patienten mit MI, instabiler u. stabiler AP
Han (2007)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	retrospektiv	70	KHK, gesunde Probanden	MI, instabile AP, stabile AP	↓ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ CD25 ⁺ in Patienten mit MI, instabiler u. stabiler AP
Mor (2006)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	retrospektiv	88	KHK, gesunde Probanden	MI, instabile AP, stabile AP	↓ Foxp3-Expression v. CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen in Patienten mit MI u. instabiler AP
Zhang (2012)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low}	retrospektiv	182	KHK	NSTEMI, instabile AP, stabile AP, CPS	↓ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} in Patienten mit NSTEMI u. instabiler AP
Wigren (2012)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	prospektiv	700	Allgemeinbevölkerung	CV-Tod, MI	↓ CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ waren unabhängiger Prädiktor des Endpunktes

1.4 Atheroprotektive Funktionsmechanismen regulatorischer T-Zellen

In geringer Anzahl sind Tregs in allen Stadien der Atherogenese in atherosklerotischen Läsionen nachweisbar (de Boer et al. 2007). Die Anzahl peripherer Tregs korreliert indessen invers mit der Vulnerabilität atherosklerotischer Plaques (Dietel et al. 2013; Liu et al. 2012; Rohm et al. 2015). Eine zugrundeliegende Kausalität ließ sich aus tierexperimentellen Untersuchungen ableiten. Die anti-CD25-vermittelte Treg-Reduktion führt in atherosklerotischen Apolipoprotein E-defizienten (ApoE^{-/-}) Mäusen zur verstärkten Bildung atherosklerotischer Läsionen sowie zur Zunahme der Plaquevulnerabilität (Ait-Oufella et al. 2006). Ferner entwickeln vollständig Treg-depletierte DREG-Mäuse über einen Zeitraum von acht Wochen 2,1-fach größere Läsionen im Vergleich zu Kontrolltieren (Klingenberg et al. 2013). Umgekehrt konnte eine Reduktion der Atheroskleroselast und eine dosis-abhängige Zunahme der Plaquestabilität mittels Treg-Adoptivtransfer erzielt werden (Feng et al. 2009; Meng et al. 2013). *In vivo* expandierte Tregs können die Entstehung atherosklerotischer Plaques um 39 % reduzieren, bereits vorbestehende Läsionen nahmen einen stabileren Phänotyp an (Foks et al. 2011).

Mechanistisch liegt der atheroprotektiven Wirkung von Tregs die Suppression autoreaktiver inflammatorischer Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zugrunde (Meng et al. 2016). Tregs inhibieren pro-atherogene T-Effektorzellen (Foks et al. 2011) und üben Effekte auf die Differenzierung und Funktion antigenpräsentierender Zellen aus. Die Co-Kultivierung von Tregs und Makrophagen führt in Makrophagen zur Polarisierung in Richtung des anti-inflammatorischen M2-Phänotyps. Zudem weisen Treg-inkubierte Makrophagen eine geringere Kompetenz zur T-Zell-Aktivierung sowie zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine nach LPS-Stimulation auf (Tiemessen et al. 2007). Tregs hemmen darüber hinaus die Expression von SRs und infolgedessen die intrazelluläre Lipidakkumulation und Schaumzellformation (Lin et al. 2010).

Die durch Tregs initiierten atheroprotektiven Effekte werden Zytokin-abhängig oder durch direkten Zellkontakt vermittelt.

Zellkontakt-unabhängige Effekte

Tregs sezernieren die inhibitorischen Zytokine IL-10, TGF- β und IL-35. IL-10 hemmt die Synthese und Freisetzung inflammatorischer Zytokine in TH1- und antigenpräsentierenden Zellen (Ng et al. 2013). Unterdessen inhibiert TGF- β die IL-1 β - und TNF- α -vermittelte Endothelzellaktivierung, die Migration von SMCs, die Schaumzellformation sowie die Differenzierung atherogener TH-Populationen. Gleichzeitig induziert es die Synthese und Sekretion extrazellulärer Matrix und reduziert den Abbau dieser durch MMP-Inhibierung (Grainger David 2004; Maganto-Garcia et al. 2011). Im Mausmodell induziert die Inhibierung der IL-10- und TGF- β -Signaltransduktion eine Zunahme von Plaquegröße

und -vulnerabilität (Gojova et al. 2003; Mallat et al. 1999a; Mallat et al. 2001; Robertson et al. 2003). IL-35 hemmt die Proliferation von T-Effektorzellen und induziert die Polarisierung naiver T-Lymphozyten in IL-35-induzierte Tregs (iT(R)35), die ihre immunsuppressive Funktion über IL-35, nicht jedoch über IL-10 und TGF- β ausüben (Collison et al. 2010).

Der Wachstumsfaktor IL-2 stellt ein obligates Signal zur Differenzierung, Homöostase und Funktion von T-Lymphozyten dar. Das autokrin wirkende Zytokin wird von aktivierten T-Lymphozyten sezerniert. Tregs weisen im Vergleich zu pro-atherogenen T-Effektorzellen eine verstärkte Expression sowie eine hochaffine Version des IL-2-Rezeptors auf. Die direkte Konkurrenz um IL-2 mit T-Effektorzellen hat den Zusammenbruch metabolischer Prozesse und infolgedessen den Untergang pro-atherogener T-Lymphozyten zur Folge (Burchill et al. 2007). Zusätzlich exprimieren Tregs die ATPase CD39, die die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. Die Folge ist eine Hemmung der ATP-induzierten Reifung dendritischer Zellen (Borsellino et al. 2007). Die Bildung von Adenosindiphosphat (ADP) inhibiert zusätzlich die IL-6-Sekretion durch T-Effektorzellen bei gleichzeitiger Induktion der TGF- β -Synthese (Zarek et al. 2008). Ein weiterer immunregulatorischer Mechanismus besteht in der Granzym B-Freisetzung durch Tregs. Die durch Granzym B-vermittelte Spaltung von Oberflächenproteinen, darunter T- und B-Zell-Rezeptoren, verhindert die Antigen-induzierte Aktivierung und Proliferation pro-atherogener Zellen (Gondek et al. 2005).

Zellkontakt-abhängige Effekte

Zellkontakt-abhängige Effekte werden durch die Oberflächenproteine *cytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4* (CTLA-4), *Lymphozyten-Aktivierungsgen 3* (LAG-3) und *programmed cell death protein-1* (PD-1) vermittelt. Die Bindung von CTLA-4 an von antigenpräsentierenden Zellen exprimiertes CD80/CD86 führt zur Internalisierung der Rezeptoren durch Transendozytose (Qureshi et al. 2011). Die Antigen-induzierte Aktivierung von T-Effektorzellen ist infolgedessen gehemmt. Die Bindung von CTLA-4 führt ferner zur Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in dendritischen Zellen, welches durch den Abbau von Tryptophan eine zusätzlich immunsupprimierende Wirkung auf T-Effektzellen ausübt (Fallarino et al. 2003). LAG-3 bildet ein CD4-Homolog, das mit hoher Affinität an MHC-Klasse-II-Moleküle unreifer dendritischer Zellen bindet. Die Folge ist die Aktivierung einer inhibitorischen Signalkaskade in dendritischen Zellen, die die funktionelle Aktivierung und Reifung der Zellen verhindert (Liang et al. 2008). PD-1 bindet an die Co-stimulierenden Moleküle PD-L1 und PD-L2 auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen und inhibiert so die Aktivierung von T-Effektorzellen (Gotsman et al. 2007) (Abb. 1.3).

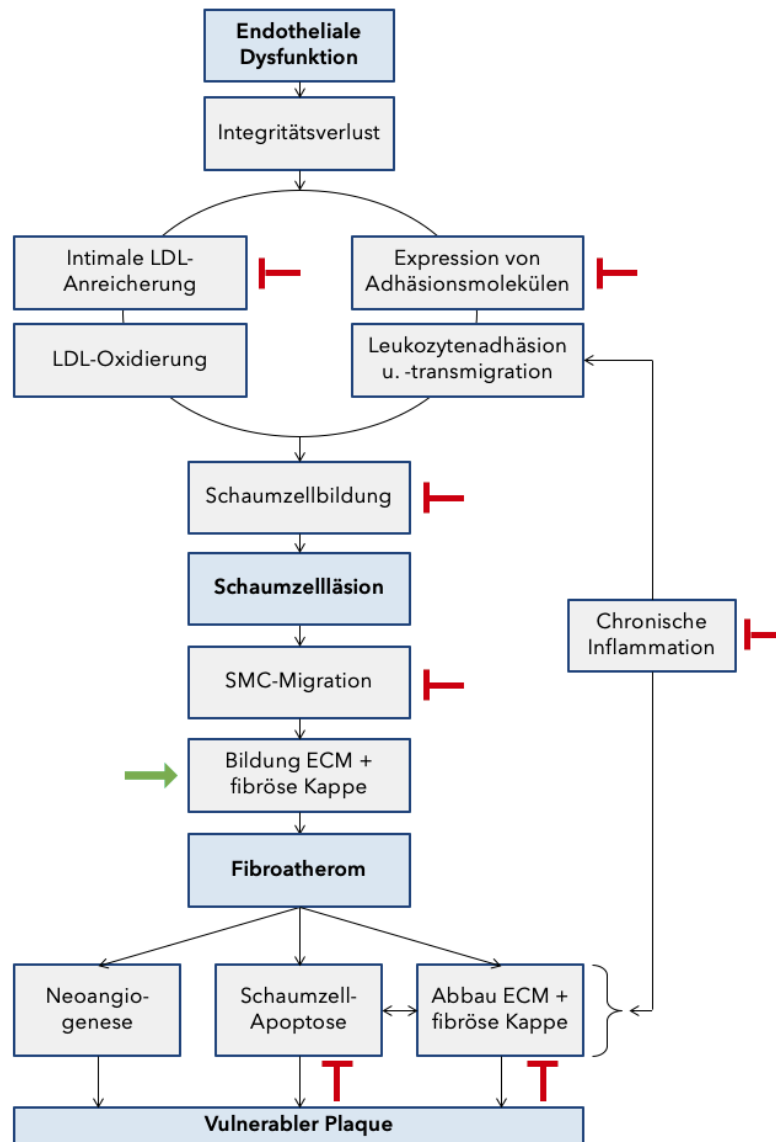


Abbildung 1.3. Atheroprotektive Funktion regulatorischer T-Zellen (Tregs). Dargestellt ist der schematische Prozess der Atherogenese beginnend mit endothelialer Dysfunktion, gefolgt von der Bildung einer frühstadialen Schaumzellläsion, des Fibroatheroms sowie der Progression zum Ruptur-gefährdeten, vulnerablen Plaque. Tregs inhibieren pro-atherogene Prozesse (rot) in allen Stadien der Atherogenese, gleichzeitig fördern sie die Stabilisierung des atherosklerotischen Plaques (grün) durch Stimulation der Synthese und Sekretion extrazellulärer Matrix (ECM) durch glatte Muskelzellen (SMC).

1.5 Presepsin (sCD14-ST, PSEP)

Presepsin bildet das N-terminale Spaltprodukt des löslichen Glykoproteins CD14 (Chenevier-Gobeaux et al. 2015). Die membrangebundene Form (mCD14) wird von myeloiden Zellen, insbesondere von Monozyten und Makrophagen, exprimiert. Darüber hinaus weisen B-Zellen, Chondrozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und intestinale Epithelzellen eine geringe mCD14-Expression auf (Bas et al. 2004). Das über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker auf der Zelloberfläche verankerte Protein liegt im Komplex mit Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) vor (Haziot et al. 1988; Wright et al. 1990), dessen Aktivierung durch Bindung pathogener (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) und

endogener Gefahrensignale (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) die NF- κ B-vermittelte Synthese und Sekretion inflammatorischer Zytokine induziert (Chun und Seong 2010; Kol et al. 2000; Schmitz und Orso 2002). Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung von löslichem CD14 (sCD14) durch die von Phospholipasen-katalysierte Spaltung des GPI-Ankers (Bazil und Strominger 1991). Darüber hinaus wurde die *de novo* Synthese von sCD14 durch Hepatozyten beschrieben (Bas et al. 2004). Die sCD14-Konzentration übersteigt die von mCD14 um ein Vielfaches (Arias et al. 2000). Seine genaue Funktion ist hingegen unbekannt. Diskutiert werden die kompetitive Hemmung der PAMP- und DAMP-vermittelten Aktivierung myeloider Zellen sowie die Übertragung des Gefahrensignals auf CD14-negative Zellen, darunter ECs, SMCs und Epithelzellen (Haziot et al. 1993; Schutt et al. 1992). Ferner beeinflusst sCD14 die T- und B-Zellaktivierung und -funktion (Arias et al. 2000; Rey Nores et al. 1999).

Im Plasma wird sCD14 durch Cathepsine, Elastasen und weitere plasmatische Proteasen zum 13 kDa N-terminalen Fragment, dem sog. Presepsin (sCD14-Subtyp (ST), PSEP), prozessiert (Chenevier-Gobeaux et al. 2015; Yaegashi et al. 2005). Ein weiterer Mechanismus, der zur Entstehung von PSEP beiträgt, besteht in der Internalisierung des aktivierten mCD14 im Komplex mit TLR-4. Phagozytisiertes CD14 wird anschließend im Phagolysosom durch Cathepsin D gespalten und mittels Exozytose freigesetzt (Chenevier-Gobeaux et al. 2015). *In vitro* Studien legen nahe, dass Monozyten die Hauptquelle des sCD14-Spaltproduktes bilden (Arai et al. 2015).

Da der Differenzierungsprozess klassischer Monozyten hin zu intermediären und nicht-klassischen Monozyten von der Freisetzung und Prozessierung von CD14 hin zum PSEP begleitet wird, gilt PSEP als Monozyten-Aktivierungsmarker (Bazil und Strominger 1991; Shive et al. 2015). Referenzwerte reichen von 55 [45; 58] bis 184 [161; 214] pg/ml, sind geschlechtsunspezifisch und tendieren zum Anstieg mit fortschreitendem Alter (Giavarina und Carta 2015). Inflammatorische Krankheitsbilder wie hämophagozytische Lymphohistiozytose, systemische Lupus erythematodes, Pankreatitis und Cholangitis gehen mit erhöhter PSEP-Konzentration einher (Lin et al. 2016a; Lin et al. 2016b; Nanno et al. 2016; Tanimura et al. 2017). Ursprünglich wurde PSEP als Biomarker für die Diagnose und Prognose von Patienten mit Sepsis und systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) etabliert (Yaegashi et al. 2005). Erst kürzlich konnte ein prognostischer Nutzen der präoperativen PSEP-Konzentration zur Vorhersage der Gesamtmortalität und nicht-okklusiver Mesenterialischämie in kardiochirurgischen Patienten demonstriert werden (Bomberg et al. 2017; Stroeder et al. 2018). Ob PSEP einen Nutzen für die Risikoprädiktion kardiovaskulärer Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen hat, ist bislang nicht untersucht.

1.6 Fragestellung

Kardiovaskuläre Komplikationen bilden eine der häufigsten Ursachen für perioperative Morbidität und Letalität nach nicht-kardiochirurgischen Operationen. Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sind ursächlich an der Entwicklung und Progression atherosklerotischer Gefäßveränderungen beteiligt. In Mäusen führen die durch perioperativen Stress induzierten Vorgänge zur raschen Progression und Destabilisierung atherosklerotischer Plaques. Abseits des operativen Kontextes korrelieren einzelne Leukozyten-Subpopulationen langfristig mit dem Auftreten kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Ereignisse. Ob diese Effekte auch perioperativ relevant sind, ist unbekannt und Gegenstand der vorgelegten Arbeit. Diese gliedert sich in drei Teile, zwei klinische Untersuchungen sowie die Kausalitätsanalyse im Tiermodell.

- (1) Im Rahmen der prospektiven Beobachtungsstudie LeukoKAPE-1 wird die quantitative Veränderung von Leukozyten-Subpopulationen, dessen Auftreten langfristig mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist, während nicht-kardiochirurgischer Eingriffe untersucht. Weiterführend wird überprüft, ob präoperativ gemessene Werte einzelner Leukozyten-Subpopulationen oder deren perioperative Veränderung mit der Inzidenz von perioperativem MACCE in kardialen Risikopatienten assoziiert sind. Zudem wird der prognostische Nutzen des Monozyten-Aktivierungsmarkers PSEP für die Vorhersage von MACCE nach nicht-kardiochirurgischen Operationen evaluiert.
- (2) In einer retrospektiven Analyse der LeukoKAPE-2-Kohorte wird der risikoprädiktive Wert des in LeukoKAPE-1 abgeleiteten PSEP Cut-offs validiert.
- (3) Basierend auf den Ergebnissen der LeukoKAPE-1-Studie wird ein kausaler Zusammenhang zwischen präoperativen Treg-Leveln und der Destabilisierung atherosklerotischer Läsionen im perioperativen Mausmodell überprüft. Folgende Hypothesen werden zugrunde gelegt:
 - a. Präoperativ erniedrigte Treg-Level fördern die durch operativen Stress bedingte Destabilisierung atherosklerotischer Plaques.
 - b. Präoperativ erhöhte Treg-Level vermindern die durch perioperativen Stress bedingte Destabilisierung atherosklerotischer Plaques.

2. MATERIALIEN

2.1 Software

CellSens Software	Olympus Life Science Solutions, Waltham, MA, USA
EndNote X7.7.1	Thompson Reuters, New York, NY, USA
FACSuite Software (version 1.0.5.3840)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
GraphPad Prism Version 8.30	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
IBM SPSS Statistics Version 24.0	IBM, New York, NY, USA
MedCalc® Software 19.1.3	MedCalc Software, Ostend, Belgien
Microsoft Office, Version 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

2.2 Geräte und Instrumente

Axioskop HBO 50/AC	Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz
Chirurgische Pinzette OC24 inox	Aesculap AG, Tuttlingen, DE
Cobas E 411 Analyzer	Roche Diagnostics DE GmbH, Mannheim, DE
FACSVerse™ Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Hettich® Mikroliter Zentrifuge MIKRO 200R, Rotor 2428	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
Hot Plate 062	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Göttingen, DE
HSB Mikro-Schere, Vannas, gebogen, 8 cm	Karl Hammacher GmbH, Solingen, DE
HWC Mikroskopische Pinzette, fein, gebogen, aus Wironit, 10,5 cm	Karl Hammacher GmbH, Solingen, DE
Immulite®XP _i Immunoassay-System	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, DE
Isis Aesculap Schermaschine	Albert Kerbl GmbH, Buchbach, DE
Leica M651 Operationsmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Leitz Cryostat MGW Lauda 1720 Digital	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Matrix™ Isoflurane Key-fill VIP 3000® Vaporizer	Midmark Corporation, Versailles, OH, USA
Mikro Nadelhalter, 14,5 cm, gebogen	Medicon eG, Tuttlingen, DE
Multifuge 3 S-R, Rotor 6445	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Olympus BX63	Olympus Life Science Solutions, Waltham, MA, USA
PATHFAST™ Analyzer	LSI Medience Corporation, Tokyo, Japan
PIPETBOY acu 2	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, DE
Präparierschere, Cottle-Knapp, 10,5 cm	Aesculap AG, Tuttlingen, DE
Russel Hobbs Dampfgarer 9,0 l	Spectrum Brands, Madison, WI, USA
S&T Forceps, SuperGrip-Spitzen, 45° abgewinkelt, 11 cm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Schere, spitz, 10,5 cm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Varifuge 3.0R, Rotor 5315	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Vortex-Reagenzglas mixer (7-2020)	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Wundspretzer, Alm Retractor, 7 cm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE

2.3 Verbrauchsmaterialien

Adhäsionsobjektträger, Polysine®, Menzel Gläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BD Microlance3™ (20 G, 23 G, 27 G)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD Neoflon™ Venenverweilkatheter (26 G)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD Plastipak™ (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Cellstar® Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® 6 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cryo.s™ Röhrchen, mit Schraubverschluss (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Dako Pen	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
EASYstrainer™, 70 µm, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Eppendorf Tubes (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
epT.I.P.S.® Reloads 0.1-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Falcon Rundbodenröhrchen, Polystyrol (5 ml)	Corning Science México S.A. de C.V., Reynosa, Mexiko
Henry Schein Blutlanzetten	Henry Schein Inc., Melville, NY, USA
Knittel Gläser Deckgläser, 24x50mm	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, DE
Maxymum Recovery™ Pipettenspitzen, RNase-, DNase-, pyrogenfrei (0.5-10 µl; 1-200 µl, 100-1000 µl)	Axygen® Scientific, Inc.
PATHFAST™ Abwurfbehälter	LSI Medience Corporation, Tokyo, Japan
PATHFAST™ Tips, Pipettenspitzen	LSI Medience Corporation, Tokyo, Japan
PROLENE Polypropylen blau, monofil - Nadeltyp	Ethicon Inc., Somerville, MA, USA
PRIME P1, USP 6-0, Länge 45 cm	
S-Monovette® EDTA (2,7 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
S-Monovette® Lithium-Heparin Gel (2,7 ml; 7,5 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Safety-Multifly®-Kanüle	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Sartorius™ Filterpapier, Klasse 1289	Sartorius AG, Göttingen, DE
Tissue-Tek® Cryomold®, intermediate	Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, USA
VICRYL violett, geflochten - Nadeltyp TF-1, USP 6-0, Länge 70 cm	Ethicon Inc., Somerville, MA, USA

2.4 Chemikalien

Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE
Bouin Fixiergemisch	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE
CellWASH	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Zitronensäure Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako North America, Inc., CA, USA
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), [-] CaCl ₂ , [-] MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 450	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Eosin	
Essigsäure (Eisessig), 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Eukitt® Eindeckmittel	O Kindler, ORSAtec GmbH, Freiburg, DE
FACS Clean Solution	BD Biosciences, Heidelberg, DE
FACS Lysing Solution (10x Konzentrat)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
FACSuite™ CS&T Research Beads	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	Cell Concepts, Umkirch, DE
Honeywell Riedel-de Haen™ Aceton, ≥99,5 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isofluran Baxter	Baxter DE GmbH, Unterschleißheim, DE
Mayers Hämalalaun	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE
Mouse on Mouse (M.O.M.) Blocking Reagent	VECTOR LABORATORIES, INC., Burlingame, CA, USA
Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen, DE
Oil Red O Solution, 0,5 % in Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Perm/Wash™ Buffer	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Pharm Lyse™ (10x Konzentrat)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Roticlear®	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE
Gibco RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™-I [+ 25 mM HEPES]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sheath Fluid (FACSFlow™)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Einbettmedium	Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, USA
Trinatriumcitrat-Dihydrat, J.T. Baker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane PUFFERAN® ≥ 99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE
Triton® X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
UltraPure™ 0.5 M EDTA, pH 8.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.5 Kits

Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug™	BD Biosciences, Heidelberg, DE
eBioscience™ Foxp3 transcription factor staining buffer set	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ImmPRESS®-AP Anti-Rat IgG, Mouse Adsorbed (Alkaline Phosphatase) Polymer Detection Kit, goat	VECTOR LABORATORIES, INC., Burlingame, CA, USA
Masson-Goldner-Trichrome-Färbekit	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE
Permanent Alkaline Phosphatase (AP)-Red-Kit	Zytomed Systems GmbH, Berlin, DE
Presepsin PATHFAST™ Teststreifen	LSI Medience Corporation, Tokyo, Japan

2.6 Medikamente

Ketanest®-S 25 mg/ml Injektionslösung

Pfizer DE GmbH, Berlin, DE

Xylavet® 20 mg/ml Injektionslösung

CP-Pharma Handels GmbH, Burgdorf, DE

2.7 Antikörper

Klinische Studie – LeukoCAPE-1

Antikörper	Fluorophor	Klon	Isotyp (Maus)	eingesetzte Menge (Vol.)	Hersteller	Katalog- nummer
anti-CD3	PE-Cy7	SK7	IgG1, k	5 µl	BioLegend	344816
anti-CD4	APC	RPA-T4	IgG1, k	0,1 µg (2 µl)	BioLegend	300514
anti-CD8	PerCP-Cy5.5	SK1	IgG1, k	0,1 µg (2 µl)	BioLegend	344710
anti-CD14	FITC	M5E2	IgG2a, k	0,8 µg (2 µl)	BioLegend	301804
anti-CD16	PE	3G8	IgG1, k	0,2 µg (2 µl)	BioLegend	302008
anti-CD25	PerCP-Cy5.5	M-A251	IgG1, k	0,5 µg (5 µl)	BioLegend	356112
anti-CD56	PE	HCD56	IgG1, k	0,12 µg (1,5 µl)	BioLegend	318305
anti-CD127	FITC	HIL-7R-M21	IgG1, k	7 µl	BD Biosciences	560549
HLA-DR	APC-Cy7	L243	IgG2a, k	0,3 µg (1,5 µl)	BioLegend	307618
Isotyp HLA-DR	APC-Cy7	MOPC-173	IgG2a, k	0,3 µg (1,5 µl)	BioLegend	400230
anti-IL-4	PE	8D4-8	IgG1, k	0,25 µg (5 µl)	BioLegend	500704
Isotyp IL-4	PE	MOPC-21	IgG1, k	0,25 µg (1,25 µl)	BioLegend	400112
anti-IL-17A	PE	CSPL1362	IgG1, k	0,06 µg (20 µl)	BD Biosciences	560436
Isotyp IL-17A	PE	MOPC-21	IgG1, k	0,06 µg (0,3 µl)	BioLegend	400112
anti-IFN-γ	FITC	B27	IgG1, k	0,25 µg (5 µl)	BioLegend	506504
Isotyp IFN-γ	FITC	MOPC-21	IgG1, k	0,25 µg (0,5 µl)	BioLegend	400108
TruStain FcX™	unkonjugiert			5 µl	BioLegend	422302

*Experimentelles Mausmodell – Durchflusszytometrie (*Wirt Maus)*

Antikörper	Fluorophor	Klon	Isotyp (Ratte)	eingesetzte Menge (Vol.)	Hersteller	Katalog- nummer
anti-CD3	FITC	17A2	IgG2b, k	0,6 µg (1,2 µl)	BioLegend	100204
anti-CD4	PerCP-Cy-5.5	RM4-5	IgG2a, k	0,15 µg (0,75µl)	BioLegend	100540
anti-CD8a	APC-Cy7	53-6.7	IgG2a, k	0,5 µg (2,5 µl)	BioLegend	100714
anti-CD11b	PE	M1/70	IgG2b, k	0,25 µg (1,25 µl)	BioLegend	101208
anti-CD19	APC	1D3	IgG2a, k	0,13 µg (0,63 µl)	BD Biosciences	550992
anti-CD25	APC	3C7	IgG2b, k	0,25 µg (1,25 µl)	BioLegend	101910
Isotyp CD25	APC	RTK4530	IgG2b, k	0,25 µg (1,25 µl)	BioLegend	400612
anti-CD45	eFluor®450	30-F11	IgG2b, k	0,5 µg (2,5 µl)	Thermo Fisher	48-0451
anti-Foxp3	PE	3G3	IgG1, k*	0,13 µg (0,63 µl)	Thermo Fisher	A18690
anti-Ly6-C	PerCP-Cy5.5	HK1.4	IgG2b, k	0,25 µg (1,25 µl)	BioLegend	128012
anti-Ly6-G	FITC	1A8	IgG2a, k	0,25 µg (0,5 µl)	BD Biosciences	551460
anti-NK1.1	APC-Cy7	PK136	IgG2a, k	0,5 µg (2,5 µl)	BioLegend	108724
TruStain FcX™	unkonjugiert			1 µg (2 µl)	BioLegend	101320

Experimentelles Mausmodell - Injektionen

Antikörper	Fluorophor	Klon	Isotyp (Ratte)	eingesetzte Menge (Vol.)	Hersteller	Katalog- nummer
anti-CD25	unkonjugiert	PC61	IgG1, L	250 µg (250 µl)	BioLegend	102040
Isotyp CD25	unkonjugiert	G0114F7	IgG1, L	250 µg (250 µl)	BioLegend	401916
anti-IL-2	unkonjugiert	JES-1A12	IgG2a, k	5 µg (5 µl)	BioLegend	503706
Isotyp IL-2	unkonjugiert	RTK2758	IgG2a, k	5 µg (5 µl)	BioLegend	400544
IL-2	unkonjugiert	NA	NA	1 µg (5µl)	BioLegend	575406

Experimentelles Mausmodell - Immunhistologie

Antikörper	Fluorophor	Klon	Isotyp	eingesetzte Verdünnung	Hersteller	Katalog- nummer
anti-Foxp3	unkonjugiert	FJK-16s	IgG2a, k	1:100	Thermo Fisher	14-5773
anti-Actin	unkonjugiert	1A4	IgG2a	1:400	Merck	A2547
Ziege anti-Maus IgG	Alexa Fluor 488	polyklonal	IgG	1:100	Thermo Fisher	A-11017

2.8 Tierfutter

Altromin 1320 modifiziert
(17,3 % Kakaobutter, 2,8 % Sojaöl, 1,25 %
Cholesterin), 10 mm Pellets, bestrahlt mit 25 kGy

Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, DE

LASQCDiet Rod16, autoklavierbar (16,9 %
Rohprotein, 4,3 % Rohfett, 4,3 % Rohfaser, 7 %
Rohasche

Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, DE

2.9 Versuchstiere

B6.129P2-Apo^{e^{tm1Unc}/J}

Prof. Dr. D. Böckler, Klinik für Gefäßchirurgie und
endovaskuläre Chirurgie, Universitätsklinikum
Heidelberg, DE

3. METHODEN

3.1 Klinische Studie: LeukoKAPE-1 – Leukozyten und kardiovaskuläre perioperative Ereignisse 1

3.1.1 Ethische Beurteilung

Die berufsrechtliche Beratung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg erfolgte am 18.07.2016 unter dem Vorsitz von Prof. Dr. med. T. Strowitzki. Das Forschungsvorhaben (Aktenzeichen S-351/2016) wurde ohne Bedenken gegen die Durchführung der Studie am 04.08.2016 genehmigt. Nach Bekanntgabe des positiven Ethikvotums wurden Patienten in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (Version 10/2013) und gemäß national geltenden gesetzlichen und ethischen Standards rekrutiert. Der Patienteneinschluss erfolgte, nachdem diese über Wesen und Tragweite geplanter Untersuchungen durch ärztliches Personal aufgeklärt wurden und ihre schriftliche Einwilligungserklärung erteilten. Das Studienvorhaben wurde vor Beginn der Patientenrekrutierung bei ClinicalTrials.gov registriert (NCT02874508).

3.1.2 Studiendesign

Bei der hier präsentierten Studie handelt es sich um eine monozentrische, prospektive, nicht-interventionelle Beobachtungsstudie mit explorativem Charakter. Der Patienteneinschluss erfolgte zwischen August und Oktober 2016 in der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Heidelberg.

3.1.2.1 Patientenkollektiv

Patienten wurden rekrutiert, wenn sie zum Zeitpunkt des Einschlusses mindestens 18 Jahre alt waren, an einer diagnostizierten koronaren Herzerkrankung erkrankt waren und sich einem elektiven, nicht-kardiochirurgischen Eingriff unterzogen. Dies umfasste große urologische, allgemein-, viszeral- und gefäßchirurgische Eingriffe. Der Patienteneinschluss erfolgte, wenn keines nachfolgender Ausschlusskriterien zutraf: Schwangerschaft, Stillzeit, chronische oder akute Leukämie, Leukozytose ($>10/nl$), Leukozytopenie ($<4/nl$), Notfalloperation, Operation (OP) einer Karotis-Stenose, stattgehabte Organtransplantation, Splenektomie, Chemotherapie, die kürzer als 14 Tage zurückliegt, oder eine Medikation mit immunmodulierender Wirkung (z.B. Kortison, GM-CSF, Dexamethason). Als weiteres Ausschlusskriterium galt eine Entität des zusammengesetzten Endpunktes (s. 3.1.4.1), die zum Zeitpunkt des Screenings weniger als vier Wochen zurücklag.

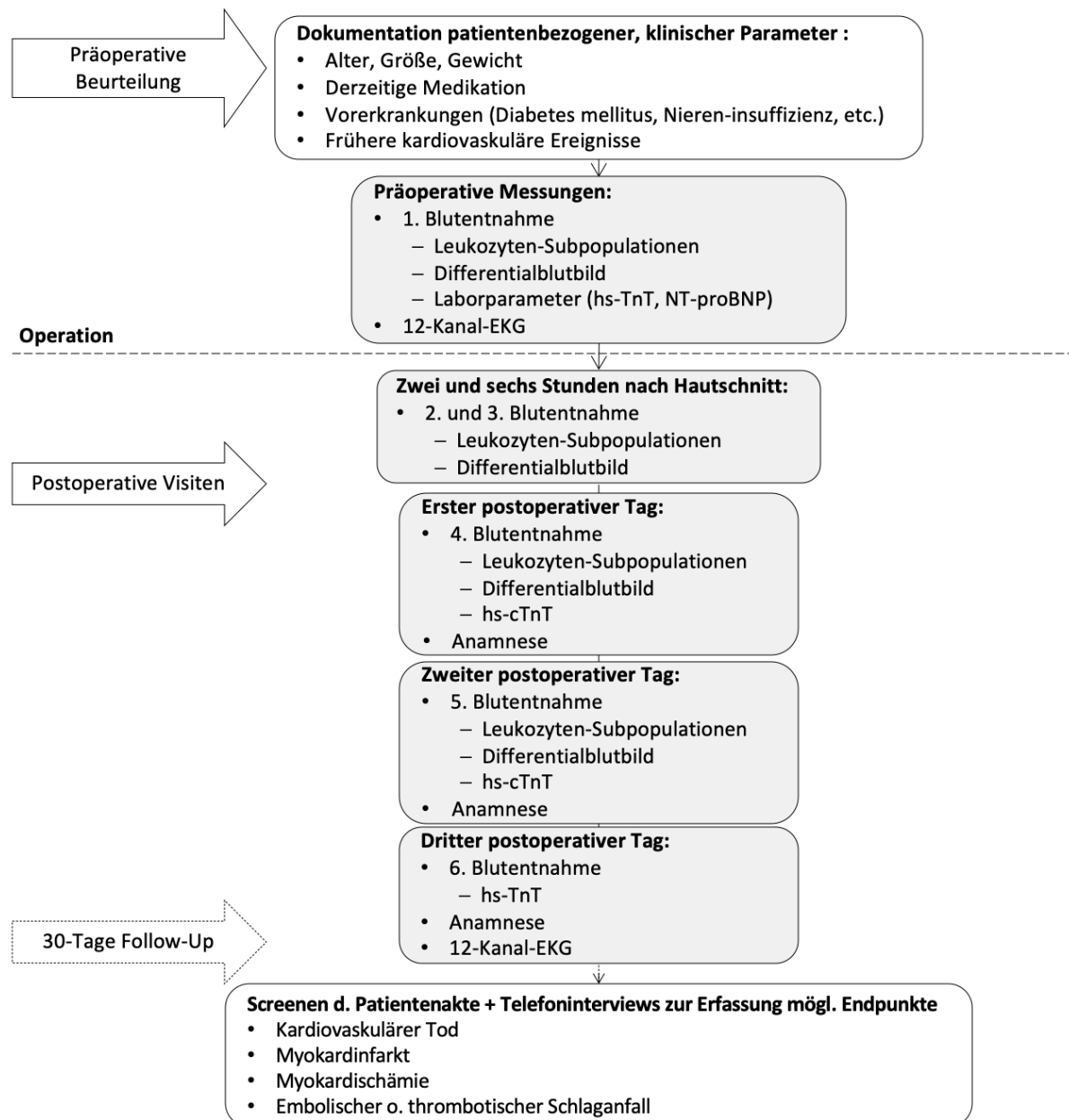


Abbildung 3.1. Studiendesign LeukoKAPE-1. Hs-cTnT: hoch-sensitives kardiales Troponin T; NT-proBNP: N-terminales pro-brain natriuretisches Peptid, EKG: Elektrokardiogramm

3.1.2.2 Studienablauf

Präoperativ wurde eine ausführliche Anamnese zur Erfassung demographischer Basisdaten, derzeitiger Medikation, Vorerkrankungen sowie früherer kardiovaskulärer Ereignisse durchgeführt. Darüber hinaus wurden CRP- und Kreatinin-Werte aus präoperativen Routinelaborbefunden übernommen. Die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) wurde unter Berücksichtigung des Geschlechts, Alters, Körpergewichtes und der -größe sowie des präoperativen Kreatinin-Wertes bestimmt (Levey et al. 2005). Vitalparameter wurden zu Beginn der Narkoseeinleitung dokumentiert. Blutentnahmen erfolgten sowohl venös als auch arteriell zu je sechs verschiedenen Zeitpunkten: präoperativ, zwei und sechs Stunden nach Hautschnitt sowie täglich bis einschließlich des dritten

postoperativen Tages. Diese wurden umgehend nach Abnahme verarbeitet, um mögliche Lagerungseffekte zu vermeiden. Präoperativ sowie am dritten postoperativen Tag wurde ein 12-Kanal-EKG aufgezeichnet. Postoperativ wurden Studienteilnehmer täglich bis zum dritten Tag nach OP visitiert und hinsichtlich neu aufgetretener Ischämie-typischer Symptome befragt. Patienten wurden über eine Dauer von 30 Tagen postoperativ beobachtet. Zur Erfassung des kombinierten Endpunktes wurden prä- und postoperatives EKG, Troponin T-Werte, Visiten mit Anamnese hinsichtlich kardialer Beschwerden bis zum dritten postoperativen Tag sowie Patientenakten und Entlassungsbrief herangezogen. Abschließend wurden Studienteilnehmer oder ihr Hausarzt am Ende des 30-tägigen Beobachtungszeitraumes telefonisch kontaktiert (Abb. 3.1).

3.1.3 Aufarbeitung der Blutproben

3.1.3.1 Durchflusszytometrische Quantifizierung humaner Leukozyten-Subpopulationen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem Zellen mit Hilfe Fluorophor-gekoppelter Antikörper, die sich gegen definierte Zelloberflächenstrukturen oder intrazelluläre Proteine richten, phänotypisiert und quantifiziert werden können. Grundlage dafür besteht in der Expression charakteristischer Oberflächenantigene, anhand derer Leukozyten in individuelle Subpopulationen differenziert werden können. Darüber hinaus geben Lichtstreuung und -beugung Aufschlüsse über Zellgröße und -granularität (Rothe 2007). Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden am FACSVerse™ der Firma BD Biosciences durchgeführt.

Blutproben zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten während der Narkoseeinleitung (präoperativ), zwei und sechs Stunden nach Hautschnitt sowie am Morgen des ersten und zweiten postoperativen Tages entnommen. Insgesamt wurden zehn Leukozyten-Subpopulationen durchflusszytometrisch analysiert und im zeitlichen Verlauf beurteilt.

Färbung von Zelloberflächenmarkern

Die Quantifizierung klassischer, intermediärer und nicht-klassischer Monozyten sowie von zytotoxischen T-Zellen, Tregs, TH- und NK Zellen erfolgte aus heparinisiertem Vollblut. Darüber hinaus wurde die HLA-DR-Expression aller Monozyten-Subpopulationen, zytotoxischer T-Zellen sowie von TH-Zellen charakterisiert. Zur Minimierung unspezifischer Antikörper-Bindung und der daraus resultierenden Generierung eines falsch positiven Signals wurden je 100 µl Vollblut mit 5 µl F_c-Rezeptor-Block (TruStain FcX™) für 10 Minuten (min) inkubiert. Es folgte die Zugabe entsprechender Antikörpercocktails (Tabelle 3.1), dessen jeweilige Konzentration mittels vorangegangener Titrierung optimiert wurde. Für Tube 1 und 3 wurden Isotypkontrollen mitgeführt (Tube 2+4).

Tabelle 3.1. Übersicht Antikörpercocktails Oberflächenfärbung. Die Detektion und Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen erfolgte anhand der Färbung charakteristischer Zelloberflächenmarker im Vollblut. Pro Patient und Zeitpunkt wurden fünf Tubes gerichtet. Tube 2 und 4 dienten als Isotypkontrollen zur Quantifizierung der HLA-DR-Expression in Tube 1 und 3. Tregs: regulatorische T-Zellen, CD: cluster of differentiation, HLA-DR: humanes Leukozytenantigen DR.

Tube #	Zellpopulation	Anti-Oberflächenmarker					
1	kl., intermediäre, nicht-kl. Monozyten	CD14	CD16	HLA-DR			
2	Isotypkontrolle	CD14	CD16	IgG2			
3	T-Helfer, cytotoxische T-Zellen	CD3	CD4	CD8	HLA-DR		
4	Isotypkontrolle	CD3	CD4	CD8	IgG2		
5	Natürliche Killer-Zellen, Tregs	CD3	CD4	CD16	CD25	CD56	CD127

Der 30-minütigen Inkubation bei 4 °C im Dunkeln folgte die Zugabe von 2 ml hypotoner Lösung (FACS™ Lysing Solution) zur Erythrozyten-Lyse für 15 min bei Raumtemperatur (RT). Die Zellen wurden anschließend bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 5 min bei RT gewaschen, in CellWASH resuspendiert und erneut gewaschen. Abschließend wurden das Zellsediment in 300 µl FACSFlow™ resuspendiert und am Durchflusszytometer detektiert (Abb. 3.2A-H).

Intrazelluläre Färbung

Die Differenzierung der TH-Subtypen TH1, TH2 und TH17 erfolgte mittels charakteristischer Zytokinfärbung. Dazu wurden zunächst 500 µl heparinisiertes Vollblut mit 500 µl RPMI-Medium (10 % FCS), 1 µl Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (50 µl/ml) und 1 µl Ionomycin (1 mM) stimuliert. PMA führt gemeinsam mit Ionomycin über die Aktivierung von Proteinkinase C und der Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zur gesteigerten Zytokinproduktion. Zur Hemmung des anterograden Proteintransportes vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat wurde zusätzlich 1 µl des Proteintransporthemmers Brefeldin A (GolgiPlug™) hinzugefügt. Die dadurch verursachte Anreicherung intrazellulärer Zytokine erlaubt eine verbesserte Detektion der Zellen. Die Stimulation erfolgte in einer 6-Well Platte für 4 h bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂). Anschließend wurden 200 µl des stimulierten Vollblutes in FACS-Röhrchen transferiert und mit 2 ml Lyse-Lösung (Pharm Lyse™) für 10 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen bei 1500 rpm für 5 min wurden diese in 100 µl CellWASH resuspendiert und mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3 und CD4 für 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen, um sie anschließend mittels 500 µl Fixierungs- und Permeabilisierungsgemisch (Cytofix/Cytoperm™) für 20 min bei RT zu fixieren. Nach einem weiteren Waschschriff in Perm/Wash™ wurde das Zellsediment in 100 µl Perm/Wash™ resuspendiert und mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern, die sich gegen das jeweilige Zytokin des TH-Subtyps richteten, für 30 min bei RT inkubiert. Zur Kontrolle der Antikörperbindung wurden Isotypkontrollen (Tube 2+4) mitgeführt (Tab. 3.2). Die vorangegangene Titrierung erlaubte die Bestimmung der optimalen Antikörper-Konzentration. Es

folgten zwei abschließende Waschschrte in Perm/Wash™, bevor die Zellen in 300 µl FACSFlow™ resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert wurden (Abb. 3.2I+J).

Tabelle 3.2. Übersicht Antikörpercocktails intrazelluläre Färbung. T-Helfer (TH)-Subpopulationen wurden anhand der intrazellulären Färbung charakteristischer Zytokine detektiert und quantifiziert. Pro Patient und Zeitpunkt wurden vier Ansätze gefärbt. Isotypkontrollen wurden in Form von Tube 2 und 4 mitgeführt. CD: cluster of differentiation, IL: Interleukin, IFN: Interferon, Ig: Immunglobulin.

Tube #	Zellpopulation	Anti-Oberflächenmarker		Anti-Zytokin (intrazellulär)	
1	TH1, TH2	CD3	CD4	IL-4	IFN-γ
2	Isotypkontrolle	CD3	CD4	IgG1(-PE)	IgG1(-FITC)
3	TH17	CD3	CD4	IL-17a	
4	Isotypkontrolle	CD3	CD4	IgG1(-PE)	

Um die Reliabilität und Reproduzierbarkeit der Messungen zu gewährleisten, wurde das Durchflusszytometer täglich vor Gebrauch mittels CS&T Research Beads kalibriert.

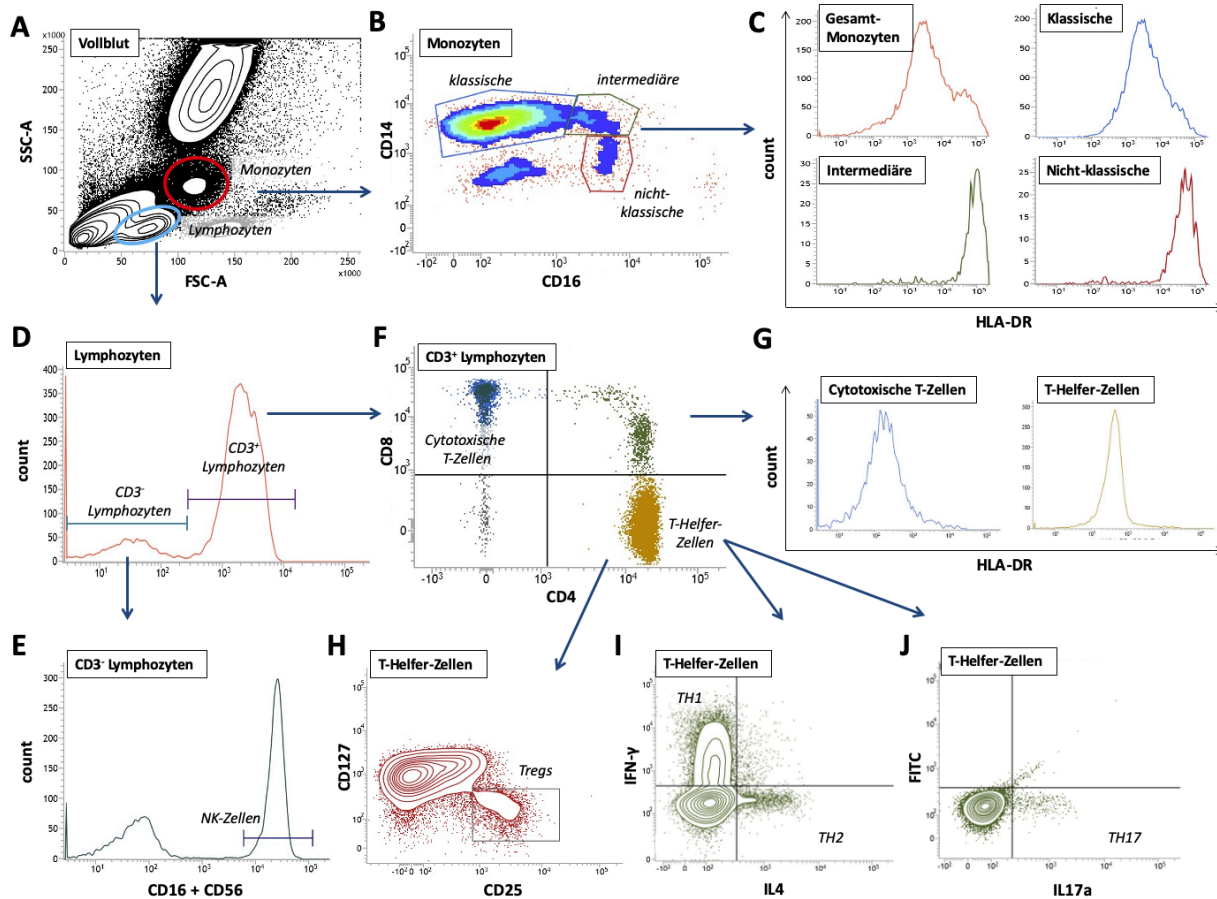


Abbildung 3.2. Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen in humanem Vollblut. (A) Nach Auftrennung der Leukozyten anhand ihrer Zellgröße (Vorwärtsstreuung, FCS) und -granularität (Seitwärtsstreuung, SSC) zeigte sich das typische Bild einer durchflusszytometrischen Vollblutanalyse. Auf dieser Grundlage konnten Monozyten (rot) und Lymphozyten (blau) von anderen Zellfraktionen differenziert werden. (B) Monozyten-Subtypen wurden entsprechend der Expression von CD14 und CD16 in klassische, intermediäre und nicht-klassische Subtypen unterschieden. (C) Die Expression von HLA-DR wurde quantitativ als geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität abzüglich der Isotypkontrolle erfasst. (D) Lymphozyten wurden in CD3-negative und CD3-exprimierende Zellen

differenziert. (E) CD3⁻ NK-Zellen wurden anhand der Expression von CD16 und CD56 identifiziert. (F) CD3⁺ Zellen wurden wiederum anhand ihrer CD4- und CD8-Expression in cytotoxische T-Zellen und TH-Zellen unterschieden (G) und ihre HLA-DR-Expression analog der Monozyten-HLA-DR-Expression erfasst. (H) Regulatorischen T-Zellen (Tregs) wurden als CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Zellen charakterisiert. (I) T-Helfer-Zellen (TH) wurden unterdessen anhand der Färbung intrazellulärer Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-4 (IL-4) und IL-17a in TH1, TH2 und (J) TH17 Zellen differenziert. CD: cluster of differentiation, HLA-DR: humanes Leukozytenantigen DR.

3.1.3.2 Differentialblutbild

Zur Bestimmung absoluter Zellzahlen wurden maschinelle Differentialblutbilder durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Heidelberg unter der Leitung von Prof. Nawroth aus Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-antikoaguliertem Blut erstellt. Blutentnahmen erfolgten analog der durchflusszytometrischen Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten (vgl. 3.1.3.1; Abb. 3.1). Die absolute Zellzahl einer Zellpopulation berechnete sich aus dem Produkt des relativen Anteils der Zellpopulation an der übergeordneten Gesamt-Leukozyten-Subpopulation multipliziert mit der absoluten Zellzahl aus dem Differentialblutbild. Beispielhaft sei hier die Berechnung der Anzahl klassischer Monozyten angeführt. Folgende Annahmen werden zugrunde gelegt:

- Anteil klassischer Monozyten an Gesamt-Monozyten: 78,1 % (Durchflusszytometrie)
- Anzahl Gesamt-Monozyten: 0,3 Zellen/nl Blut (Differentialblutbild)

$$kl. \text{ Monozyten } [/\text{nl}] = kl. \text{ Monozyten}_{\text{Durchflusszytometrie}} \times \text{Gesamt-Monozyten}_{\text{Diff-BB}} = 0,781 \times 0,3/\text{nl} = 0,234 /\text{nl}$$

3.1.3.3 Bestimmung von hoch-sensitivem kardialen Troponin T (hs-cTnT)

Hs-cTnT wurde präoperativ sowie täglich bis einschließlich des dritten postoperativen Tages aus heparinisiertem Vollblut mittels Cobas E 411 Analyzer im Zentrallabor des Universitätsklinikums Heidelberg bestimmt.

3.1.3.4 Bestimmung von N-terminalem pro-brain natriuretischen Peptid (NT-proBNP)

Bei jeder Blutentnahme wurde Lithium-hepariniertes Plasma gewonnen. Dazu wurde Vollblut mit 3000 x g für 15 min bei RT zentrifugiert, in 550 μ l aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Präoperativ gewonnenes Plasma wurde zur NT-proBNP-Bestimmung herangezogen. Diese erfolgte nach Abschluss der Patientenrekrutierung durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Heidelberg mittels Immulite[®]XP_i Immunoassay-Systems.

3.1.3.5 Presepsinbestimmung mittels Chemilumineszenz-Immunoassay

Die Plasma-PSEP-Konzentration wurde mit Hilfe eines Chemilumineszenz-basierten Immunoassays (PATHFAST[™] Immunoanalyzer) mit Magtration[®]-Technologie erhoben. Dazu wurden zunächst 100 μ l heparinisierendes Plasma in die vom Hersteller (LSI Medience Corporation, Tokyo, Japan) vorgesehenen

Reagenzkartuschen gegeben. Die Konzentrationsbestimmung basiert auf der Bindung zweier Antikörper an den zu untersuchenden Analyten. Dabei ist der Capture-Antikörper kovalent an einen magnetischen Bead gebunden; der Detektor-Antikörper ist mit Alkalischer Phosphatase (ALP) konjugiert. Durch die Bindung beider Antikörper an den Analyten bilden sich Bead-Antikörper-Analyt-Antikörper-Komplexe. Diese werden durch Anlegung eines magnetischen Feldes von nicht gebundenem Antikörper sowie anderer Plasmakomponenten separiert. Die Chemilumineszenz wird durch Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates induziert. Die Intensität der daraus resultierenden Lichtemission wird detektiert und dient als Grundlage für die Berechnung der PSEP-Konzentration (Abb. 3.3). Alle Pipettier-, Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten vollautomatisch innerhalb eines etwa 16-minütigen Testzyklus. Das Gerät wurde entsprechend der Herstellervorgaben in regelmäßigen Abständen geeicht, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

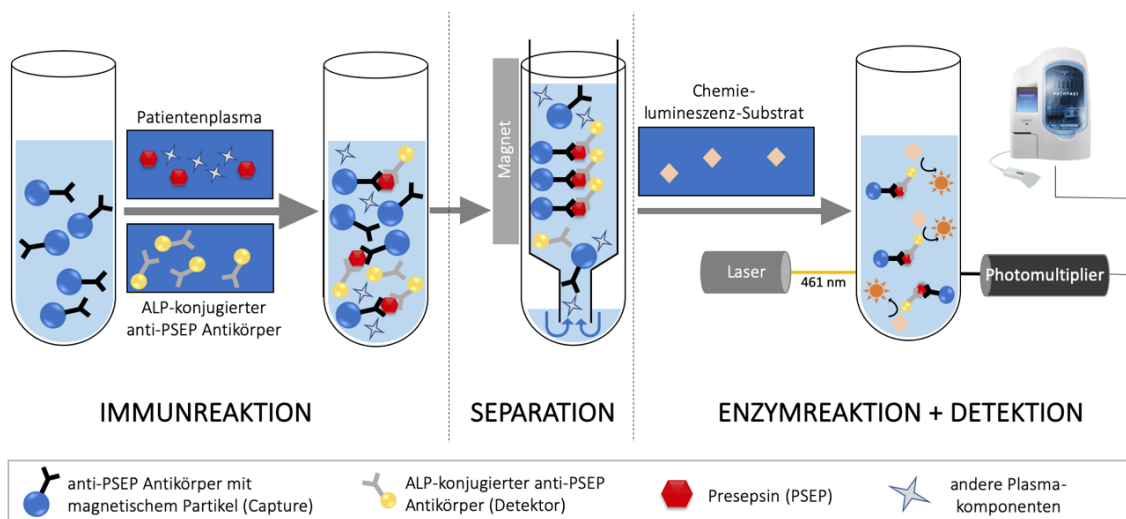


Abbildung 3.3. Schematische Darstellung des PATHFAST™ Immunoanalyser Messprinzips zur Bestimmung der Plasmapresepsin-Konzentration. Abbildung in Anlehnung an (LSI Medience Corporation 2017). PATHFAST™ Immunoanalyser aus <https://bdscientia.com/wp-content/uploads/2019/05/Pathfast-Immunocardiacc-Machine.png>. ALP: alkalische Phosphatase.

3.1.4 Klinische Endpunkte

3.1.4.1 Primärer Endpunkt

Der primäre kombinierte Endpunkt MACCE umfasste den kardiovaskulären Tod, MI, Myokardischämie sowie einen ischämischen Schlaganfall innerhalb des 30-tägigen Beobachtungszeitraums (Jammer et al. 2015).

- Als kardiovaskulärer Tod galt jeder Tod, der mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein akutes kardiovaskuläres Ereignis zurückzuführen war. Dies umfasste den akuten MI, plötzlichen Herztod, Herzversagen, Schlaganfall, kardiovaskuläre Blutungen (bspw. Ruptur eines Aortenaneurysmas) sowie andere kardiovaskuläre Ursachen (z. B. Lungenembolie) (Hicks et al. 2018).

- Die Kriterien eines MI stützten sich auf die *3. Allgemeine Definition des Myokardinfarktes* festgesetzt durch die European Society of Cardiology (ESC). Diese beinhaltet den Anstieg eines kardialen Biomarkers oberhalb des 99. Perzentils. In Bezug auf hs-cTnT umfasst dies einen Anstieg der Konzentration auf ≥ 14 ng/l in Kombination mit mindestens einem folgender Kriterien: Symptome einer Ischämie; neue ST-Strecken-T-Wellen (ST-T)-Veränderung oder neuer Linksschenkelblock (LSB) im EKG; Entwicklung pathologischer Q-Zacken im EKG (Thygesen et al. 2012).
- Die Diagnose einer Myokardischämie wurde auf Grundlage neuauftretener Ischämiebedingten EKG-Veränderungen gestellt. Dies umfasste neue ST-Hebungen (≥ 2 mm in V2-V3; ≥ 1 mm in allen restlichen Ableitungen), ST-Senkungen (≥ 1 mm), symmetrische T-Negativierungen (≥ 1 mm), pathologische Q-Zacken oder einen neuauftretenden LSB (Thygesen et al. 2012).
- Die Diagnose eines thromboembolischen Schlaganfalles wurde gestellt, wenn der Patient neue fokalneurologische Defizite entwickelte und eine thrombotische oder embolische Ursache mittels kranialer Bildgebung (Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT)) nachgewiesen werden konnte (Jammer et al. 2015).

3.1.4.2 Sekundäre Endpunkte

Sekundäre Endpunkte umfassten einzelne Bestandteile des primären Endpunktes sowie MINS, peripherer arterieller Gefäßverschluss, Vorhofflimmern, akutes Nierenversagen und Gesamtmortalität innerhalb der ersten 30 Tage postoperativ.

- MINS wurde als postoperatives hs-cTnT zwischen 20 und 65 ng/l mit einem absoluten perioperativen Anstieg von ≥ 5 ng/l oder einem postoperativen hs-cTnT ≥ 65 ng/l, wobei der präoperativ gemessene Wert nicht unterhalb des maximalen postoperativen Wertes liegen durfte, definiert (Devereaux et al. 2017).
- Die Diagnose eines neuauftretenden peripheren arteriellen Gefäßverschlusses wurde gestellt, sofern dieser angiographisch bestätigt bzw. in der Patientenakte vermerkt wurde.
- Neuauftretenes Vorhofflimmern wurde anhand des postoperativen EKGs diagnostiziert oder aus der Patientenakte übertragen.
- Die Definition des postoperativen akuten Nierenversagens basierte auf den Richtlinien des *Acute Kidney Injury Networks (AKIN)*. Ein Patient erlitt demnach ein akutes Nierenversagen, wenn Serumkreatinin innerhalb der ersten 48 h postoperativ um ≥ 0.3 mg/dl oder innerhalb von sieben Tagen postoperativ um den Faktor $\geq 1,5$ im Vergleich zum Ausgangswert anstieg (National Clinical Guideline Centre 2013).
- Die Gesamtmortalität umfasste jeden Tod unabhängig dessen Ursache.

3.1.5 Fallzahlberechnung

Da es sich um eine explorative Studie handelte, wurde keine Fallzahlanalyse im eigentlichen Sinne vorgenommen. Die angestrebte Fallzahl von n=40 Patienten resultierte vielmehr aus Machbarkeits- und Kostenüberlegungen.

3.2 Post-hoc Analyse: LeukoKAPE-2 – Leukozyten und kardiovaskuläre perioperative Ereignisse 2

Zur unabhängigen Validierung des in der LeukoKAPE-1 abgeleiteten PSEP Cut-offs wurde eine *post-hoc* Analyse der LeukoKAPE-2 Studienkohorte durchgeführt. Primäres Ziel der monozentrischen, prospektiven, nicht-interventionellen Beobachtungsstudie LeukoKAPE-2 Studie bestand in der Validierung präoperativer Treg-Level zur kardiovaskulären Risikoprädiktion in nicht-kardiochirurgischen KHK-Patienten. Die Ergebnisse dieser prospektiven Analyse wurden im Rahmen der Doktorarbeit „Quantifizierung Regulatorischer T-Zellen im Blut von Hochrisikopatienten vor nicht-kardiochirurgischen Operationen zur Risikostratifizierung für kardiovaskuläre Komplikationen“ von A. S. Scholz sowie im *Journal of Leukocyte Biology* veröffentlicht (Scholz et al. 2020).

3.2.1 Ethische Beurteilung

LeukoKAPE-2 stellt die Folgestudie von LeukoKAPE-1 dar. Beide klinischen Studien wurden der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg im Rahmen eines gemeinsamen Antrages (Aktenzeichen S-351/2016) vorgelegt. Dieser wurde in der Sitzung vom 18.07.2016 beraten und mit Bekanntgabe am 04.08.2016 positiv bewertet. Unterlagen zur Änderung des Protokolls hinsichtlich Fallzahl und Anzahl der Blutentnahmen in LeukoKAPE-2 wurden der Ethikkommission am 23.01.2017 vorgelegt und am 23.02.2017 genehmigt. Die Folgestudie LeukoKAPE-2 wurde gesondert und vor Beginn der Patientenrekrutierung bei ClinicalTrials.gov registriert (NCT03105427).

3.2.2 Studiendesign

Beide Studien glichen sich weitestgehend hinsichtlich des Patientenkollektivs sowie im Ablauf der Untersuchungen. In LeukoKAPE-2 stellte Leukozytose (<10/nl) jedoch kein Ausschlusskriterium dar (vgl. 3.1.2.1). Darüber hinaus fanden lediglich vier Blutentnahmen, präoperativ und jeweils täglich bis zum dritten postoperativen Tag, statt (vgl. 3.1.2.2). Die eGFR wurde aus präoperativen Routine-Laborbefunden übernommen.

3.2.3 Aufarbeitung der Blutproben

Die Aufarbeitung der Blutproben erfolgte analog der LeukoKAPE-1 Studie (vgl. 3.1.3.3-5). Zu allen vier Zeitpunkten wurde hs-cTnT aus heparinisiertem Blut durch das Zentrallabor des

Universitätsklinikums Heidelberg unter der Leitung von Herrn Prof. Nawroth bestimmt. NT-proBNP wurde präoperativ gemessen. PSEP wurde mittels PATHFAST™ Analyser aus heparinisiertem Plasma bestimmt. Dieses wurde bis zum Zeitpunkt der Analyse bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Klinische Endpunkte

Der primäre Endpunkt der *post-hoc* Analyse umfasste die gleichen Entitäten des in LeukoKAPE-1 gewählten zusammengesetzten Endpunktes MACCE (vgl. 3.1.4.1). Auch sekundäre Endpunkte deckten sich mit denen der LeukoKAPE-1 Studie (vgl. 3.1.4.2).

3.2.5 Fallzahlberechnung

Die Gesamtheit der aus der prospektiven LeukoKAPE-2 Studie zur Verfügung stehenden Patientendaten wurde für die hier dargestellte *post-hoc* Analyse zur Validierung des PSEP Cut-offs herangezogen. Eine formelle Fallzahlkalkulation wurde nicht durchgeführt.

3.3 Tierexperimentelle Arbeiten

Der Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die perioperative Plaquestabilisierung wurde in homozygoten Apolipoprotein E-defizienten (ApoE^{-/-}) C57BL/6 Mäusen (B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J) untersucht. Die Inaktivierung des endogenen ApoE erfolgte durch Insertion einer Neomycin-Resistenzkassette in das ApoE-Gen, was die partielle Deletion von Exon 3 und Intron 4 zur Folge hatte (Piedrahita et al. 1992). Homozygote ApoE^{-/-} Tiere entwickeln unabhängig von Alter und Geschlecht erhöhte Cholesterinspiegel im Blut. Durch Fütterung einer cholesterinreichen Diät kommt es zur verstärkten Bildung atherosklerotischer Läsionen. Die Zucht der transgenen Tiere erfolgte durch die Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung (IBF) der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg und wurde unter dem Aktenzeichen G-9/17 geführt. Um die Aufrechterhaltung der homozygoten ApoE-Defizienz zu überprüfen, wurden die Tiere stichprobenartig mittels Schwanzbiopsien und Ohrstanzen in regelmäßigen Abständen durch Tansnetyx®, Inc. (Cordova, TN, USA) genotypisiert. Insgesamt wurden 106 ApoE^{-/-} Mäuse, davon 55 männliche und 51 weibliche, für die Untersuchungen einschließlich der Etablierungsexperimente verwendet.

3.3.1 Ethische Beurteilung

Das Tierversuchsvorhaben wurde dem Regierungspräsidium Karlsruhe erstmals am 02.01.2018 vorgelegt und am 01.03.2018 für eine Laufzeit von fünf Jahren genehmigt (Aktenzeichen G-4/18). Darüber hinaus wurden folgende Erweiterungs- bzw. Änderungsanträge gestellt.

- Antrag vom 20.04.2018: Gegenstand des Antrages war die Umstellung der Allgemeinanästhesie auf Inhalationsnarkose mittels Isofluran; Genehmigung am 08.05.2018

- Antrag vom 14.05.2018: Gegenstand der Erweiterung umfasste die Verlängerung der Sonderdiät von sieben auf neun Wochen; Genehmigung am 27.06.2018

Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit dem national geltenden Tierschutzgesetz und der Tierschutz-Versuchstierverordnung in der Fassung von 2013 durchgeführt. Eine nicht-technische Projektzusammenfassung (NTP) des Vorhabens wurde in der Datenbank *AnimalTestInfo* des Bundesinstituts für Risikobewertung veröffentlicht (NTP-ID: 00020224-1-9; 00020224-2-7).

3.3.2 Tierhaltung

Experimentaltiere wurden vor Start der Sonderdiät in den klinisch experimentellen Bereich (KEB) des IBFs transferiert. Die Haltung der Tiere erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen (22 ± 2 °C, 50-60 % Luftfeuchtigkeit, 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus) in Typ 2 Käfigen (Einstreu ABBEDD LT-E-001) mit einer Besetzungsdichte gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde/*Society of Laboratory Animal Science* (GV-SOLAS). Die Käfige wurden mit Nestmaterial ausgestattet. Die Versorgung der Tiere mit Futter und Trinkwasser erfolgte *ad libitum*. Vor Umstellung der Diät erhielten die Tiere Altromin Rod16. Zur Bildung des atherosklerotischen Phänotyps wurde die Fütterung in einem Alter von acht Wochen auf eine cholesterinreiche Sonderdiät umgestellt und bis zum Zeitpunkt der Finalisierung der Tiere aufrechterhalten.

3.3.3 Versuchsaufbau und Berechnung der Gruppengrößen

Die tierexperimentellen Arbeiten gliederten sich in drei Arbeitsblöcke.

- 1) Arbeitsblock 1 umfasste die Untersuchung des Effektes perioperativen Stresses auf das Vorkommen regulatorischer T-Zellen in atherosklerotischen ApoE^{-/-} Mäusen.
- 2) Arbeitsblock 2 bildete die Grundlage für Arbeitsblock 3 und diente der Etablierung der Antikörper-vermittelten Treg-Modulierung in atherosklerotischen ApoE^{-/-} Mäusen.
- 3) In Arbeitsblock 3 wurde der Effekt präoperativer Treg-Level auf die durch perioperativen Stress bedingte Destabilisierung atherosklerotischer Plaques untersucht.

Da es sich bei Arbeitsblock 1 und 2 um Vorversuche handelte, wurde die minimal sinnvoll erscheinende Gruppengröße von n=6 Tieren (3 männlich, 3 weiblich) herangezogen.

In Arbeitsblock 3 bildete das postoperative Plaquevolumen die primäre Zielgröße. Die Fallzahlplanung basierte auf dem Vergleich der Gruppen mit reduziertem und erhöhtem Treg-Level. Folgende Daten wurden für die Kalkulation der Gruppengröße herangezogen.

- mittlere Differenz des Plaquevolumens zwischen operierten und Sham-operierten Mäusen mit unverändertem Treg-Level $32 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ bei einer Standardabweichung (SD) von $27 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ (Janssen et al. 2015)

- Vergrößerung atherosklerotischer Plaques um den Faktor 2,1 nach Treg-Depletion, jedoch unabhängig eines operativen Eingriffes (Klingenberg et al. 2013)
- kein Effekt erhöhter Treg-Level auf bereits bestehende Plaques ebenfalls unabhängig eines operativen Eingriffes (Foks et al. 2011)

Unter Berücksichtigung und Kombination der Daten ergab sich eine zu erwartende Mittelwertsdifferenz von $35 \pm \text{SD } 27 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$. Daraus resultierte eine Effektstärke $d \sim 1,3$. Um ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ und eine Power $1-\beta=0,8$ zu erreichen, wurden 11 Tiere pro Gruppe benötigt. Da geschlechtsspezifische Unterschiede nicht ausgeschlossen werden konnten, ergab sich eine Gruppengröße von $n=12$ Tieren (6 männlich, 6 weiblich). Da sich bei vorläufigen Auswertungen jedoch abzeichnete, dass der Effekt nicht im erwarteten Ausmaß nachgewiesen werden kann, wurde die Gruppengröße auf $n=8$ Tiere pro Gruppe reduziert.

3.3.4 Perioperatives Stressmodell

Neun Wochen nach Beginn der cholesterinreichen Sonderdiät wurden die Tiere im Alter von 17 Wochen einem perioperativen Stressmodell, bestehend aus einem etwa 30-minütigem Eingriff, unterzogen (Janssen et al. 2015). Dieser diente der Simulation perioperativen Stresses und der damit verbundenen Initiierung physiologischer und immunologischer Vorgänge (Abb. 3.4).

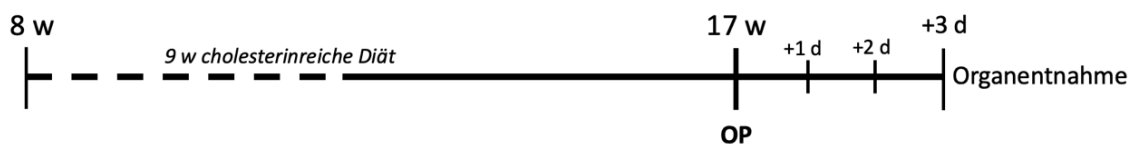


Abbildung 3.4. Prinzipieller Versuchsaufbau des Tiermodells. Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Sonderfütterung, des perioperativen Stressmodells (OP) und der Organentnahme am Beispiel von Arbeitsblock 1. Als Kontrolle dienten Sham-operierte Tiere. W: Wochen, d: Tage

Der Eingriff wurde in Inhalationsanästhesie mittels Isofluran durchgeführt. Zur Einleitung der Narkose wurde das Tier in eine bereits mit 5 % Isofluran unter 600 ml Sauerstofffluss gesättigte Ganzkörperkammer gegeben. Nach Erreichen eines ausreichend tiefen Narkosestadiums wurden dem Tier 400 μl Blut über die *Vena facialis* entnommen. Dies entspricht etwa 20 % des gesamten Blutvolumens und dient der Simulation des intraoperativen Blutverlustes. Die Tiere wurden anschließend auf eine 37 °C warme Heizplatte transferiert, um ein Auskühlen während des Eingriffes zu vermeiden. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie mittels Maskenbeatmung wurde die Narkosegaskonzentration auf etwa 1,5-3 % bei einem Sauerstofffluss von 400 ml reduziert. Anschließend erfolgten die großzügige Rasur und Desinfektion des Bauches gefolgt von der longitudinalen Eröffnung des Abdomens. Der etwa 1,5 cm lange Bauchschnitt wurde mittels Wundspreizer eröffnet. Ein Austrocknen der Wundränder wurde durch mit Natriumchlorid (NaCl)-

Lösung-getränkte Kompressen, die während des Eingriffes auf das geöffnete Abdomen gelegt wurden, verhindert. Etwa 25 Minuten nach Eröffnen der Bauchdecke wurde das Peritoneum mittels fortlaufender Naht wiederverschlossen. Der Verschluss der Bauchdecke erfolgte mit Einzelknopfleften. Als Kontrolle dienten Sham-operierte Tiere, die lediglich rasiert und narkotisiert wurden. Der Allgemeinzustand der Tiere wurde nach Erwachen sowie täglich bis zur Finalisierung am dritten postoperativen Tag überwacht. Zusätzlich wurde das Körpergewicht präoperativ und täglich innerhalb der ersten drei Tage postoperativ erfasst.

3.3.5 *In vivo* Modulierung regulatorischer T-Zell-Level

Im 3. Arbeitsblock wurde der Effekt präoperativer Treg-Level auf die perioperativ-bedingte Destabilisierung atherosklerotischer Plaques untersucht. Dazu wurden atherosklerotische ApoE^{-/-} Mäuse mit reduziertem bzw. erhöhtem Treg-Level generiert.

Anti-CD25-induzierte Treg-Reduktion

Die Reduktion des Treg-Levels wurde mittels anti-CD25 (Klon PC61, IgG1) Antikörper, der sich gegen Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R α) richtete, induziert. Dazu wurde atherosklerotischen ApoE^{-/-} Mäusen in einem Alter von etwa 16 Wochen eine einmalige Dosis von 250 μ g anti-CD25 (PC61) in 250 μ l phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst intraperitoneal (i.p) verabreicht. Die maximale Reduktion des Treg-Levels tritt in Wildtyp C57BL/6 Mäusen acht Tage nach Behandlung auf und wird für etwa zwei bis drei Wochen aufrechterhalten (Setiady et al. 2010). Im Rahmen der Etablierung in transgenen ApoE^{-/-} Mäusen wurde den Tieren sechs, acht und zehn Tage nach Injektion des depletierenden Antikörpers je 100 μ l Blut über die *Vena facialis* entnommen und zur Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Treg-Reduktion durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.5). Als Kontrolle dienten Isotyp (IgG1)-behandelte Tiere.

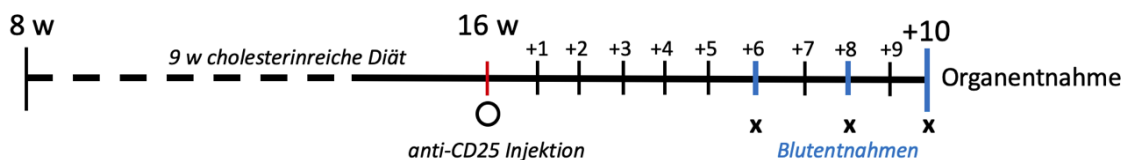


Abbildung 3.5. Versuchsaufbau zur Etablierung der anti-CD25-induzierten Treg-Reduktion. Tregs wurden sechs, acht und zehn Tage nach anti-CD25-Injektion durchflusszytometrisch im Blut quantifiziert. Zusätzlich erfolgte die Treg-Quantifizierung in lymphatischen Organen zum Zeitpunkt der Organentnahme.

Auf Grundlage der Untersuchungen erfolgte die anti-CD25 Injektion im finalen Modell zur Untersuchung des Effektes reduzierter präoperativer Treg-Level auf die perioperative Plaquestabilisierung (Arbeitsblock 3) sechs Tage vor OP (Abb. 3.7A).

IL-2/anti-IL-2-induzierte Treg-Expansion

Zur Generierung atherosklerotischer ApoE^{-/-} Mäuse mit erhöhtem Treg-Level wurden diese im Alter von etwa 16 Wochen täglich über eine Dauer von drei Tagen mit einem Komplex aus IL-2 und anti-IL-2 (Klon JES6-1A12, IgG2a) i.p. behandelt. Tregs exprimieren einen hochaffinen IL-2R (Arce-Sillas et al. 2016). Diese Tatsache ermöglicht es, Tregs selektiv durch Injektion einer subphysiologischen IL-2-Dosis zu boosten (Boyman et al. 2006). Der zugrundeliegende Mechanismus, der die gesteigerte Wirksamkeit von IL-2 durch Vorliegen im Komplex mit anti-IL-2 bedingt, ist unklar. Denkbar sind eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit sowie eine längere Halbwertszeit des Zytokins (Letourneau et al. 2010).

Zur Bildung des IL-Antikörper-Komplexes wurden diese vorab in einem molaren Verhältnis von ~2:1 (1 µg (58 pmol) IL-2 plus 5 µg (33 pmol) anti-IL-2) in 200 µl PBS bei 37 °C für 30 min inkubiert (Webster et al. 2009). Zur Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Treg-Expansion wurden diese drei, vier und fünf Tage nach Beginn der Injektionen durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Entnahme von je 100 µl Blut erfolgte über die *Vena facialis* (Abb. 3.6). IL-2/IgG2- und PBS-behandelte Tiere fungierten als Kontrolle.

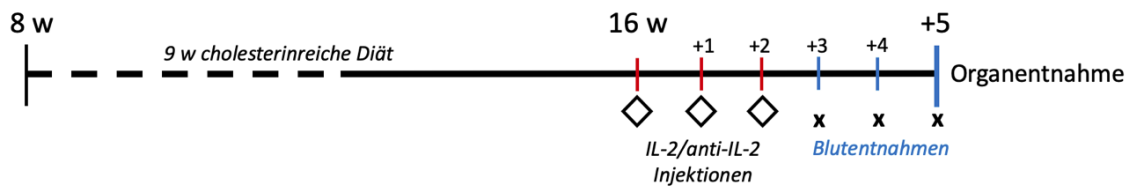
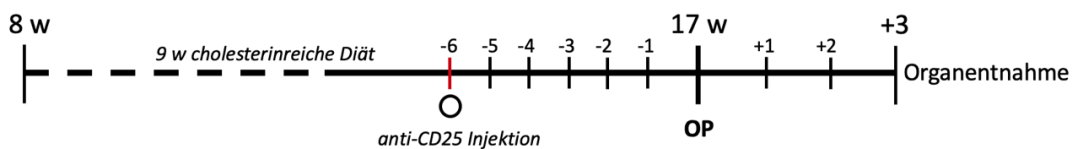


Abbildung 3.6. Versuchsaufbau zur Etablierung der IL-2/anti-IL-2-induzierten Treg-Expansion. Tregs wurden drei, vier und fünf Tage nach erster IL-2/anti-IL-2 Injektion durchflusszytometrisch im Blut quantifiziert. Zusätzlich erfolgte die Treg-Quantifizierung in lymphatischen Organen zum Zeitpunkt der Organentnahme.

Im finalen Modell aus Arbeitsblock 3 erfolgten die Injektionen täglich an drei aufeinanderfolgenden Tagen beginnend drei Tage vor OP (Abb. 3.7B).

A TREG REDUKTION



B TREG EXPANSION

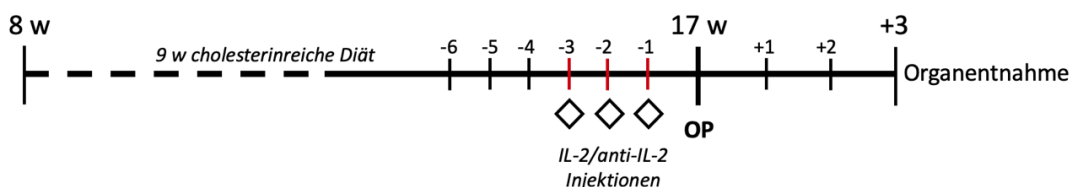


Abbildung 3.7. Schematische Darstellung des finalen Modells zur Untersuchung des kausalen Zusammenhangs zwischen präoperativen regulatorischen T-Zell (Treg)-Level und perioperativer Plaquestabilisierung (Arbeitsblock 3). Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der Treg-modulierenden Behandlung am Beispiel der OP-Interventionsgruppen. (A) Die Reduktion des Treg-Levels wird durch einmalige anti-CD25-Injektion sechs Tage vor OP initiiert. (B) Die Erhöhung des Treg-Levels wird durch tägliche Injektionen des IL-2/anti-IL-2-Komplexes an drei aufeinanderfolgenden Tagen, beginnend drei Tage präoperativ, induziert. Der operative Eingriff (OP) wurde zum Zeitpunkt der maximalen Treg-Modulierung an 17 Wochen alten atherosklerotischen ApoE-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Verabreichung der jeweiligen Isotypkontrollen bzw. die Durchführung der Sham-Intervention erfolgte analog. Organe wurden am dritten postoperativen Tag entnommen.

3.3.6 Finalisierung und Organentnahme

Die Tötung der Tiere zur Organentnahme erfolgte in tiefer Ketamin/Xylazin-Narkose. Dazu wurden 120 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 16 mg/kg KG Xylazin auf 10 ml NaCl-Lösung verdünnt und mit einer Dosis von 100 µl pro 10 g KG i.p. injiziert. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurden die Tiere laparotomiert. Die finale Blutentnahme erfolgte durch Punktion der *Vena cava inferior* mittels 24G Kanüle und führte zum Tod des Tieres. Um die Koagulation des Blutes zu unterbinden, wurden Spritze und Kanüle zuvor mit 0,5 M EDTA-Lösung benetzt. Nach Entnahme des Blutes für die durchflusszytometrische Messung wurde das Restvolumen bei 2500 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert, die Plasmafraktion abgenommen und bei -80 °C gelagert. Anschließend folgte die Gewebepfusion durch Herzpunktion mittels NaCl-Lösung. Die Organe wurden daraufhin entnommen, in Cryo-Röhrchen und/oder Einbettmedium überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefren (Tab. 3.3). Das Gewebe wurde bis zum Zeitpunkt der Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Präparation des Aortenbogens

Zur Präparation des Aortenbogens samt supraaortaler Arterien wurden Aortenbogen und Thorakalaorta chirurgisch dargestellt, grob vom Fett befreit und auf Ebene der Bifurkation abgesetzt. Das Herz wurde oberhalb der Herzklappen auf Höhe der Herzohren von der *Aorta ascendens* getrennt; der Aortenbogen wurde etwa 2 mm unterhalb des Abganges der *A. subclavia sinistra* von der *Aorta descendens* abgesetzt.

Tabelle 3.3. Übersicht und Konservierung entnommener Organe.

Konservierung in Cryo-Röhrchen	Konservierung in Einbettmedium
Milz	Milz
Thymus (linker Lappen)	Thymus (rechter Lappen)
Lymphknoten (inguinal, rechts)	Lymphknoten (axial, rechts)
Aorta (thorakal)	Aortenbogen mit <i>A. brachiocephalica</i> , <i>A. carotis communis sinistra</i> und <i>A. subclavia sinistra</i>
Herzspitze	Herzbasis
Leber (rechter Leberlappen)	

Darüber hinaus wurden Teile lymphatischer Organe in 30 ml PBS mit 0,1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 2 mM EDTA auf Eis überführt. Dies diente der Generierung von Einzelzellsuspensionen zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von Tregs (vgl. 3.3.8.1).

3.3.7 Histologische Aufarbeitung

3.3.7.1 Herstellung von Schnittpräparaten

Die in Einbettmedium eingedeckten Brachiozephalarterien wurden mit Hilfe des Mikrotoms bei -24 °C vertikal mit einer Schnittdicke von 5 µm geschnitten und auf Adhäsionsobjektträger übertragen. Dabei bildete die Bifurkation den Startpunkt zur Abnahme der Gewebeschnitte; Endpunkt stellte die Mündung der Brachiozephalarterie in den Aortenbogen dar. Die Gefrierschnitte wurden in Serien von 15 Objektträgern mit je vier Präparaten pro Objektträger angefertigt und bei -80 °C gelagert. Je nach Länge der Brachiozephalarterie wurden vier bis sechs Serien pro Tier angefertigt.

3.3.7.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Zur Beurteilung des Plaquevolumens und der Stenose wurde der jeweils erste Objektträger einer Serie, d.h. jeder 15. Gewebsschnitt, HE gefärbt. Nach vollständiger Trocknung der Schnitte bei RT erfolgte die Färbung mittels Hämalaun nach Mayer für 5 min. Hämalaun färbt alle basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne und raue endoplasmatische Retikula. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 min gebläut. Die Erhöhung des pH-Wertes durch Spülen in Leitungswasser führt zur Entwicklung des typisch blauvioletten Farbtons. Es folgt die Färbung in 0,1 %iger Eosinlösung für 4 min. Eosin färbt alle eosinophilen Strukturen rot, darunter vor allem Zellplasmaproteine. Daraufhin wurden die Schnitte kurz in Leitungswasser gespült und über eine aufsteigende Alkoholreihe in das organische Lösungsmittel Roticlear® überführt. Die entwässerten und geklärten Schnitte wurden abschließend in Eukitt® Eindeckmittel eingedeckt. Beide Färbelösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

Die histologische Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte am automatisierten Olympus BX63 Mikroskop. Bilder wurden in 100-facher Vergrößerung aufgenommen und mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware CellSens ausgewertet. Die Bestimmung des Plaquevolumens erfolgte anhand folgender Formel mit n gleich der Anzahl Plaque-tragender Schnitte:

$$\text{Plaquevol. [x } 10^{-3} \text{ mm}^3] = \frac{(\text{Plaquefläche}_n [\mu\text{m}^3] \times 75) + (\text{Plaquefläche}_{n+1} [\mu\text{m}^3] \times 75) + (\text{Plaquefläche}_{n+n} [\mu\text{m}^3] \times 75)}{10^6}$$

Die Berechnung der Stenose ergab sich aus dem Anteil der Plauefläche am Gefäßlumen abgegrenzt durch die *Membrana elastica interna*.

$$\%Stenose = \frac{\text{Plauefläche } [\mu\text{m}^2]}{\text{Gefäßlumen } [\mu\text{m}^2]} \times 100$$

3.3.7.3 Masson-Goldner Trichomefärbung

Der Kollagengehalt atherosklerotischer Läsionen wurde mittels Trichomefärbung nach Masson-Goldner dargestellt. Pro Maus wurde ein Objektträger gefärbt. Dabei handelte es sich um den jeweils zweiten Objektträger jener Serie, die in der Auswertung der HE-Färbung die maximale Stenose aufwies. Nachdem die Schnitte vollständig an der Luft getrocknet waren, wurde das Gewebe mittels Bouin-Fixiergemisch bestehend aus Pikrinsäure, Formaldehyd und Essigsäure für 2 h bei RT fixiert. Nach 10-minütigem Spülen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser folgte die 3-minütige Kernfärbung des Gewebes mittels Weigerts Eisenhämatoxylinlösung. Die Lösung enthält zusätzlich salzsaure Eisen (III)-Nitrat-Lösung, um ein Entfärben der Kerne durch die im späteren Verlauf des Protokolls zur Anwendung kommenden sauren Goldner-Lösungen zu verhindern. Die Färbung wurde anschließend unter fließendem Leitungswasser für 15 min differenziert. Daraufhin folgte die eigentliche Trichomefärbung bestehend aus drei Farbstoffen, die sich in ihrer Molekülgröße unterscheiden und entsprechend unterschiedlich schnell in verschiedene Gewebsstrukturen eindringen. Zunächst wurden die Schnitte in Ponceau-Säurefuchsin überführt und für 10 min inkubiert. Nach kurzem Spülen in 1%iger Essigsäure folgte die Differenzierung und Entfärbung des Bindegewebes mittels Phosphorwolframsäure-Orange G für 30 s. Abschließend und einem weiteren kurzen Waschschrift in 1%iger Essigsäure folgend, wurden bindegewebsartige Strukturen für 5 min durch grobdisperses, azidophiles Lichtgrün gefärbt. Es folgte die Dehydrierung, Klärung und Eindeckung der Schnitte analog der HE-Färbung (vgl. 3.3.7.2). Alle Färbelösungen wurden gemäß Herstellerangaben vor Gebrauch sterilfiltriert. Im Ergebnis zeigte sich eine braunschwarze Färbung der Zellkerne; Muskulatur und Plasma erschienen rot, Erythrozyten orange und kollagenes Bindegewebe grün.

Die Auswertung des Kollagengehaltes erfolgte anhand 100-fach vergrößerter lichtmikroskopischer Aufnahmen der atherosklerotischen Läsionen. Durch Festlegen eines Schwellenwertes wurde der relative Anteil des Kollagengehaltes an der Gesamtfläche des Plaques bestimmt. Trichome-gefärbte Präparate wurden ebenfalls zur Bestimmung nekrotischer Areale anteilig der Plauefläche herangezogen. Die Auswertung erfolgte verblindet.

3.3.7.4 Ölrot O-Färbung

Die Quantifizierung von Lipidablagerungen innerhalb atherosklerotischer Läsionen erfolgte mittels Ölrot O-Färbung. Pro Tier wurde der jeweils dritte Objektträger jener Serie, die in der Auswertung der HE-Färbung die maximale Stenose aufwies, gefärbt. Die Ölrot O-Stocklösung wurde zunächst im Verhältnis 3:2 mit destilliertem Wasser verdünnt und sterilfiltriert. Die Fixierung der luftgetrockneten Gewebspräparate erfolgte für 10 min in 4 %igem eiskaltem Paraformaldehyd (PFA; pH=7,4). Nach 10-minütigem Spülen unter fließendem Leitungswasser und einem kurzen Waschschrift in destilliertem Wasser wurden die Schnitte erneut luftgetrocknet, bevor diese in Ölrot O-Färbelösung überführt wurden. Nach 10-minütiger Färbezeit wurden die Präparate dreimal 30 s in 60 %igem Isopropanol gewaschen, mit destilliertem Wasser gespült und mittels Mayers Hämatoxylin 3 min gegengefärbt. Es folgte das Bläuen der Kernfärbung unter fließendem Leitungswasser für 10 min. Abschließend wurden die feuchten, erneut in destilliertem Wasser gespülten Schnitte mittels Permanenteindeckmedium für etwa 4 min bei 65 °C eingedeckt.

Die Quantifizierung der Ölrot O-positiven Plaquefläche erfolgte anhand 100-fach vergrößerter lichtmikroskopischer Aufnahmen der gefärbten Brachiozephalarterien mittels Olympus BX63. Durch Festlegen eines Schwellenwertes in der Bildanalysesoftware konnte der relative Anteil des Lipidgehaltes an der Gesamtfläche des atherosklerotischen Plaques bestimmt werden. Als weiteres Stabilitätsmerkmal wurde die Anzahl im Plaque enthaltener Zellen anhand der Kernfärbung ermittelt. Die Auswertung erfolgte verblindet.

3.3.7.5 Immunhistologische Foxp3-Färbung

Zusammensetzung Pufferlösungen

- Citratpuffer (10 mM, pH 6): 9 ml 0,1 M Zitronensäure-Monohydrat-Lösung, 41 ml 0,1 M Trinatriumcitrat-Dihydrat-Lösung, 450 ml destilliertes Wasser
- Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS): 50 ml 1M Tris Stocklösung (pH 7,6), 150 ml 1M NaCl-Lösung, 800 ml destilliertes Wasser
- 0,05%iges TBS-Tween (TBST): 100 ml TBS (pH 7,6), 50 µl Tween 20
- 0,3%iges Triton X-100: 970 µl TBS, 30 µl Triton X-100 Stocklösung (10 %)

Zum Nachweis regulatorischer T-Zellen im Plaque wurde ein gegen den von Tregs konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktor Foxp3 gerichteter Antikörper verwendet. Die Schnitte wurden zunächst luftgetrocknet, für 10 min in 4 %igem eiskaltem PFA fixiert, zweifach in TBS und destilliertem Wasser gewaschen, um sie anschließend in Citratpuffer zu überführen. In dieser Form wurden die Präparate für 30 min in einen vorgeheizten Dampfgerar inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf RT wurden diese in destilliertem Wasser gespült und mittels Dako Pen umrandet. Alle

folgenden Schritte wurden in einer Feuchtkammer durchgeführt, um ein Austrocknen der Gewebepräparate zu verhindern. Die Schnitte wurden in TBS rehydriert, in TBST gewaschen und für 30 min in 0,3%igem Triton X-100 zur Permeabilisierung der Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST, folgte die 30-minütige Inkubation mittels 2,5%igem Ziegenserum, um die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu unterbinden. Anschließend wurden die Proben mit anti-Foxp3 Primärantikörper (1:100 Verdünnung) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal 5 min in TBST gewaschen und mit dem mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Sekundärantikörper für 30 min bei RT inkubiert. Zur Detektion gebildeter Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexe folgte die Behandlung mit Substratlösung für weitere 10 min. Abschließend wurden die Präparate mit Mayers Hämalaun gegengefärbt, 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und analog der Ölrot-O Färbung mittels Permanenteindeckmedium für etwa 4 min bei 65 °C eingedeckt. Zur Validierung und Kontrolle aller Analyseschritte und des Färbeverfahrens wurden Positivkontrollen in Form von Thymusgewebe mitgeführt (Anhang 1).

Zur Detektion Foxp3-positiver Zellen wurden 200-fach vergrößerte lichtmikroskopische Bilder der Brachiozephalarterien aufgenommen. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte manuell und verblindet.

3.3.7.6 α -SMC Immunfluoreszenzfärbung

Die Detektion glatter Muskelzellen in atherosklerotischen Plaques erfolgte mittels eines gegen α -Actin gerichteten monoklonalen Antikörpers. Pro Tier wurde der jeweils vierte Objektträger jener Serie, die in der Auswertung der HE-Färbung die maximale Stenose aufwies, gefärbt. Nach Lufttrocknung der Schnitte wurden diese mittels eiskalten Acetons fixiert, erneut getrocknet, mit dem DakoPen umrandet und in 0,05%igem PBS-T rehydriert. Zur Minimierung unspezifischer Bindung des Primärantikörpers folgte die 30-minütige Inkubation in Mouse-on-mouse Blocking Reagenz. Anschließend wurden die Präparate mit dem anti-Actin Primärantikörper (Verdünnung 1:400) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS folgte die Inkubation mit dem anti-Maus Sekundärantikörper (Verdünnung 1:100) für 2 h bei RT. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch Zugabe von DAPI. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Präparate erneut in PBS gewaschen, in destilliertes Wasser überführt und mittels Fluorescence Mounting Medium eingedeckt.

3.3.8 Durchflusszytometrische Quantifizierung muriner Zellen

Die Bestimmung regulatorischer T-Zell-Level erfolgte aus Vollblutproben und frisch gewonnenen Einzelzellsuspensionen lymphatischer Organe. Um die Spezifität der Treg-modulierenden Behandlung beurteilen zu können, wurden weitere Immunzellpopulation anhand charakteristischer Differenzierungsmarker im Vollblut analysiert.

3.3.8.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen lymphatischer Organe

Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen wurden die in eiskaltem PBS aufgenommenen Gewebstücke (vgl. 3.3.6) aus Milz, Lymphknoten und Thymus mit Hilfe eines Spritzenstempels vorsichtig durch ein 70 µm feines Nylonsieb in 50 ml Falcon-Röhrchen gerieben. Sieb und Spritzenstempel wurden in regelmäßigen Abständen mit insgesamt 30 ml PBS/BSA/EDTA-Lösung gespült. Die Zellsuspension wurde bei 1600 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment anschließend in 30 ml PBS resuspendiert. Milzzellpräparate wurden einem zusätzlichen Arbeitsschritt zur Erythrozyten-Lyse unterzogen. Dazu wurden die Proben mit 2 ml 37 °C warmer PharmLyse™-Lösung versetzt und im Wasserbad bei 37 °C für 3 min inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 30 ml PBS gestoppt. Die Einzelzellsuspensionen wurden erneut zentrifugiert und zur weiteren Verarbeitung in 2 ml PBS resuspendiert. Mit Ausnahme der Lyse, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

3.3.8.2 Quantifizierung muriner Tregs aus Vollblut und lymphatischen Organen

Zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von Tregs wurden 100 µl Vollblut bzw. 100 µl der vereinzelt Milz-, Lymphknoten- und Thymuszellsuspension eingesetzt (entspricht etwa 10⁶ Zellen). Zur Minimierung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen zunächst für 10 min bei 4 °C mit Fc-Block (Maus TruStain FcX™) behandelt. Es folgte die Färbung der Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD25 mittels monoklonaler Antikörper. Zur Unterscheidung lebendiger und toter Zellen wurde dieser um einen fixierbaren Lebendfarbstoff (FVD) ergänzt. Nach 30-minütiger, lichtgeschützter Inkubation bei 4 °C folgte die Lyse der Erythrozyten in Vollblutproben durch Zugabe von 2 ml FACS Lyse-Lösung und 15 min Inkubation im Dunkeln bei RT. Alle Proben wurden anschließend in 2 ml CellWash resuspendiert und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes folgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mittels 1 ml Fixier- und Permeabilisierungsgemisch innerhalb eines 30-minütigen Inkubationsschrittes, lichtgeschützt bei 4 °C. Anschließend wurden die Proben zweifach in Foxp3-Waschpuffer gewaschen, in 100 µl Waschpuffer resuspendiert und mit anti-Foxp3 inkubiert. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen erneut gewaschen, mit 200 µl FACSFlow™ versetzt und im Durchflusszytomter analysiert. Um das Ausmaß der unspezifischen Bindung berücksichtigen und eine möglichst exakte Quantifizierung von Tregs vornehmen zu können, wurden Isotypkontrollen für anti-CD25 mitgeführt.

Tregs wurden anhand ihres charakteristischen Expressionsprofils CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ identifiziert. Die Analyse erfolgte durch Einteilung in Quadranten unter Berücksichtigung der Isotypkontrolle. Die Anzahl regulatorischer T-Zellen wurde in Form ihres relativen Anteils an der CD4⁺ Zellpopulation ausgewertet (Abb. 3.8).

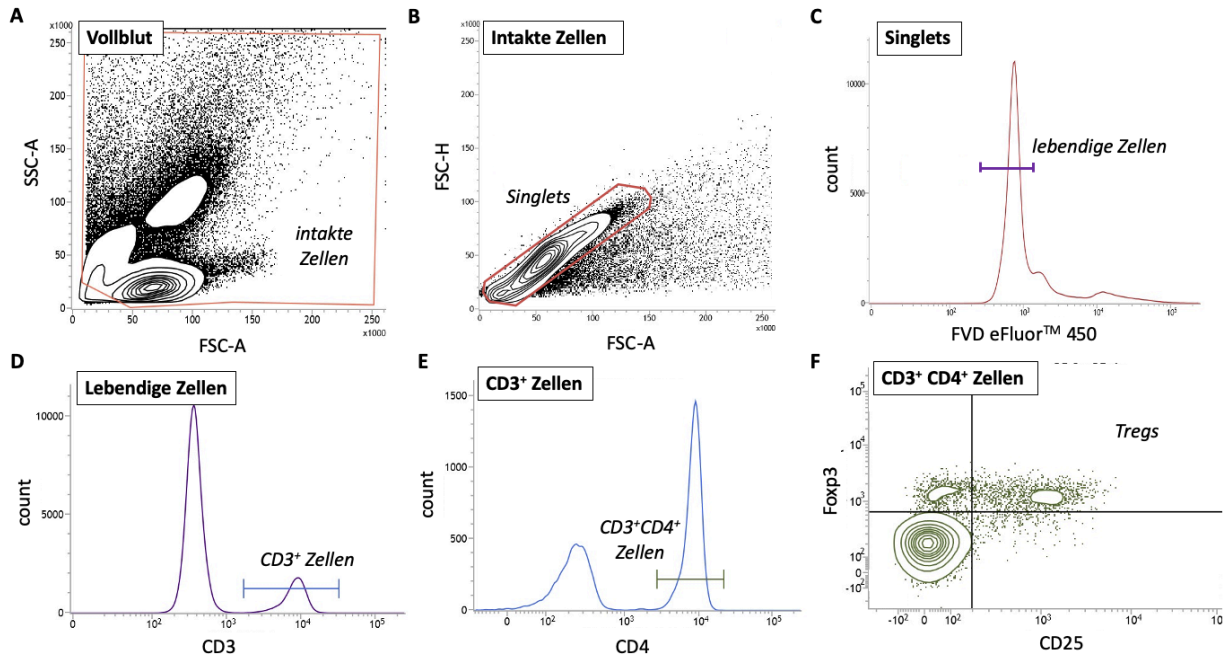


Abbildung 3.8. Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Quantifizierung regulatorischer T-Zellen (Tregs). Dargestellt ist die Gating-Strategie zur Identifikation und Quantifizierung muriner Tregs am Beispiel von Vollblut. (A) Nach Ausschluss von Zelltrümmern und (B) Zell-Dubletten wurden (C) lebendige Zellen anhand der Oberflächenmarker (D) CD3 und (E) CD4 selektiert. (F) Die Identifizierung von Tregs erfolgte daraufhin anhand ihres charakteristischen Expressionsprofils: CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Die Quantifizierung von Tregs in Thymus, Milz und Lymphknoten wurde analog durchgeführt.

3.3.8.3 Quantifizierung muriner Leukozyten-Subpopulationen aus Vollblut

Um die Selektivität der Treg-modulierenden Behandlung beurteilen zu können, wurden Neutrophile Granulozyten, inflammatorische und patrouillierende Monozyten, NK-, TH-, cytotoxische T-Zellen und B-Zellen anhand der Färbung ihrer Differenzierungsmarker durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden je 100 µl EDTA-antikoaguliertes Vollblut mit 2 µl Fc-Block (Maus TruStain FcX™) versetzt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe des jeweiligen Antikörpercocktails (Tab. 3.4).

Tabelle 3.4. Übersicht Antikörpercocktails zur Färbung muriner Leukozyten-Subpopulationen. Die Detektion und Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen erfolgte anhand der Färbung charakteristischer Zelltypmarker im Vollblut. Pro Tier wurden zwei Färbungen angesetzt. CD: cluster of differentiation.

Tube #	Zellpopulation	Anti-Oberflächenmarker				
1	Neutrophile, Monozyten, Natürliche Killer	CD45	CD11b	Ly6-C	Ly6-G	NK1.1
2	T-Helfer, cytotoxische T-Zellen, B-Zellen	CD45	CD3	CD4	CD8	CD19

Im Anschluss der 30-minütigen, lichtgeschützten Inkubation bei 4 °C erfolgte die Erythrozyten-Lyse durch Behandlung und Inkubation der Zellen mit 2 ml FACSlysing™-Lösung für 15 min bei RT. Die Proben wurden abschließend bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, in CellWash gewaschen und nach Resuspension des Zellsedimentes in 300 µl FACSFlow™ im Durchflusszytometer analysiert.

Die Anzahl der jeweiligen Immunzellpopulation wurde in Form ihres relativen Anteils an der Gesamt-Leukozytenzahl, gekennzeichnet durch die Expression von CD45, ausgewertet (Abb. 3.9).

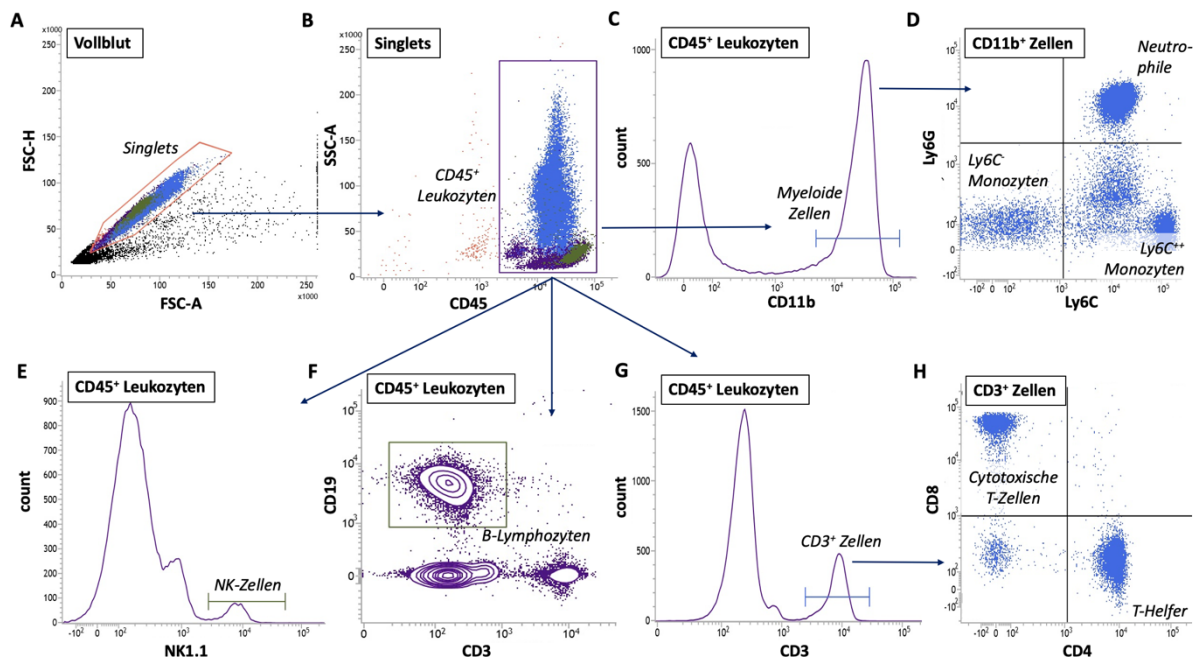


Abbildung 3.9. Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Quantifizierung muriner Leukozyten-Subpopulationen in Vollblut. (A) Nach Ausschluss von Zell-Dubletten (B) erfolgte die Selektion CD45⁺ Leukozyten. (C) Myeloide Zellen wurden anhand der Expression von CD11b identifiziert. (D) Die Differenzierung CD11b-exprimierender Zellen anhand der phänotypischen Marker Ly6G und Ly6C ermöglichte die Detektion Neutrophiler Granulozyten, patrouillierender (Ly6C⁻) und inflammatorischer (Ly6C⁺⁺) Monozyten. (E) Natürliche Killer (NK)-Zellen wurden anhand der Expression von NK1.1 charakterisiert; (F) B-Zellen anhand des CD45⁺CD19⁺-Expressionsprofils. (G) CD3⁺ T-Lymphozyten (H) wurden zusätzlich anhand der Marker CD8 und CD4 in cytotoxische und T-Helfer-Zellen unterschieden.

3.4 Statistik

Die statistische Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte in IBM SPSS Statistics, GraphPad Prism und MedCalc®. Sofern nicht anders angegeben, sind kontinuierliche Daten in Form des Medians [Interquartilbereich (IQR)], kategoriale Variablen als Absolut- und Relativzahlen dargestellt. Boxplots markieren den IQR, die Länge der Whiskers kennzeichnet das 95 % Konfidenzintervall (KI) und Mittelwerte sind durch Kreuze gekennzeichnet; Balkendiagramme repräsentieren Median und IQR;

Alle Datensätze wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Da nicht alle einer Normalverteilung folgten, wurden Gruppenvergleiche ausschließlich mittels nicht-parametrischer Testverfahren durchgeführt. Davon ausgeschlossen sind Kurvenvergleiche, die mittels mehrfaktorieller Varianzanalyse (2-Wege-ANOVA) analysiert wurden. Mittelwerte zweier Gruppen wurden unter Annahme gleicher Varianzen mit Hilfe des zweiseitigen Mann-Whitney U- und Chi²-Tests für kontinuierliche bzw. kategoriale Variablen miteinander verglichen. Der Vergleich zweier verbundener Stichproben wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests durchgeführt.

Mehrfachgruppenvergleiche erfolgten mittels nicht-parametrischen Kruskal-Wallis- und Friedman-Test für unverbundene bzw. verbundene Stichproben. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Aufgrund der beobachteten Streuung wurden histologische Daten mittels ROUT-Methode analysiert, um mögliche Ausreißer zu identifizieren (Motulsky und Brown 2006). Diese wurden in der Analyse nicht berücksichtigt.

Auswertung klinischer Studienergebnisse

Die quantitative Veränderung von Leukozyten-Subpopulationen über den perioperativen Verlauf wurde mittels Friedman-Test für verbundene Stichproben bewertet. Zeigten diese nach Bonferroni-Korrektur einen statistisch signifikanten Unterschied, wurden die postoperativen Werte der jeweiligen Immunzellpopulation einzeln unter Anwendung des Dunn *Post-hoc* Tests mit ihrem präoperativen Ausgangswert verglichen. Fehlende Werte wurden mittels *Last-Observation-Carried Forward*-Methode imputiert. Um die prognostische Güte des jeweiligen Risikoparameters zu evaluieren, wurden Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurvenanalysen durchgeführt und mit Hilfe der DeLong Methode einander gegenübergestellt. Cut-offs wurden mittels Youden-Statistik abgeleitet. Des Weiteren wurden Sensitivität, Spezifität, positive und negative prädiktive Werte berechnet. Kaplan-Meier-Kurven wurden in Abhängigkeit der präoperativen PSEP-Konzentration erstellt und mittels Log-Rang (Mantel-Cox) -Test verglichen. Die Assoziation präoperativer Risikoparameter mit dem Outcome wurde mittels uni- und multivariater logistischer Regressionsmodelle bewertet. Abschließend wurden Net Reclassification Improvement (NRI)- und Integrated Discrimination Improvement (IDI)-Analysen durchgeführt (Pencina et al. 2008)

4. ERGEBNISSE

4.1 Klinische Studie: LeukoKAPE-1 – Leukozyten und kardiovaskuläre perioperative Ereignisse 1

Zwischen August und Oktober 2016 wurden 44 Patienten gescreent. Vier Patienten konnten aufgrund zutreffender Ausschlusskriterien nicht eingeschlossen werden; die Einwilligung verweigerte kein Patient. Insgesamt wurden 40 KHK-Patienten rekrutiert. Wiederum zwei Patienten zogen ihre Einwilligungserklärung im weiteren Verlauf der Studie zurück und wurden infolgedessen ausgeschlossen. Zwei Patienten wurden vor der dritten postoperativen Visite entlassen, ein Patient verließ bereits vor der zweiten postoperativen Visite das Krankenhaus. Das finale Analyse-Set setzte sich aus 38 Patienten zusammen (Abb. 4.1).

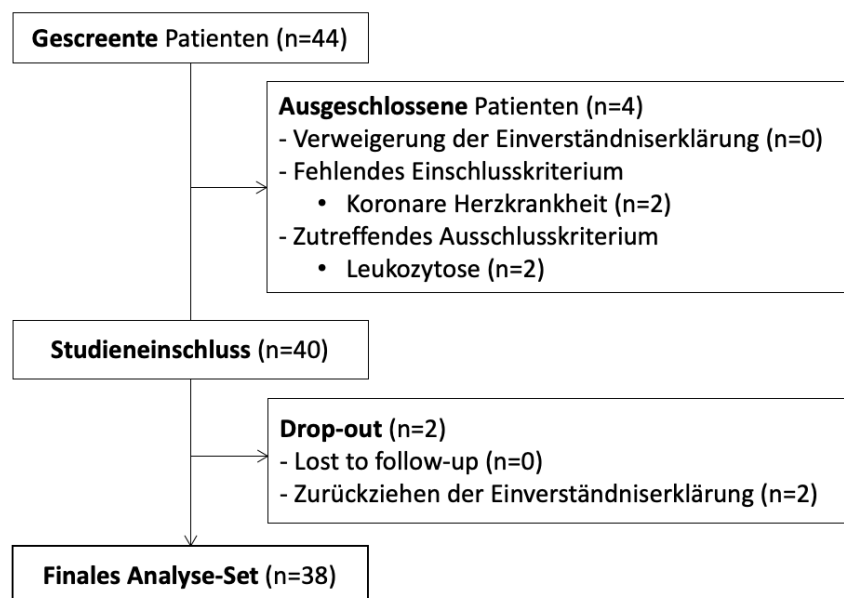


Abbildung 4.1. Übersicht des LeukoKAPE-1-Studienkollektivs.

4.1.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Demographische und klinische Basisdatencharakteristika sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Das mittlere Alter der Gesamtstudienpopulation betrug $69 \pm \text{SD } 8$ Jahre; 82 % der Patienten waren männlich. Die Mehrzahl der Patienten wies kardiovaskuläre Risikofaktoren auf und etwa drei Viertel des Patientenkollektivs erlitt bereits frühere kardiovaskuläre Ereignisse. Entsprechend häufig war die Einnahme kardiovaskulärer Medikation.

Während des 30-tägigen Beobachtungszeitraums erlitten fünf Patienten (13 %) ein perioperatives kardiovaskuläres Ereignis (kardiovaskulärer Tod (n=0), MI (n=3), Myokardischämie (n=1), Schlaganfall (n=1)). Beide Gruppen glichen sich weitestgehend im Hinblick klinischer Basisdaten. Patienten der Endpunktgruppe (MACCE) wiesen im Schnitt jedoch ein höheres Niereninsuffizienzstadium auf und

zeigten höhere Kreatinin-Werte. Die gesamte Studienpopulation wies vergleichsweise hohe Konzentrationen der kardialen Biomarker hs-cTnT und NT-proBNP auf. Zudem wurden in MACCE-Patienten deutlich höhere hs-cTnT- und NT-proBNP-Werte gemessen, was auf eine bereits vorbestehende, fortgeschrittene Erkrankung der Koronararterien bzw. des Myokards im Vergleich zu Patienten ohne MACCE hindeutete (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1. Demographische und klinische Basisdaten der LeukoKAPE-1-Studienkohorte. Kontinuierliche Variablen sind als Median [IQR] angegeben; kategorische Daten als Absolut- und Relativzahlen. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Patienten mit und ohne MACCE sind in Form von Fettdruck hervorgehoben. ASA: Risikoklassifikation nach der American Society of Anesthesiologists, RCRI: Revised Cardiac Risk Index, ESC/ESA: European Society of Cardiology/European Society of Anaesthesiology; KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes, ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym, ADP: Adenosindiphosphat, RR: Riva-Rocci, hs-cTnT: hoch-sensitives kardiales Troponin T, NT-proBNP: N-terminales pro-B natriuretisches Peptid.

Variable	Studienkohorte	MACCE	kein MACCE	p-Wert
n (%)	38	5 (13)	33 (87)	
Alter (Jahren)	71 [63; 75]	79 [67; 83]	70 [63; 74]	0,095
männlich, n (%)	31 (82)	3 (60)	28 (85)	0,182
Body-Mass-Index (kg/m ²)	27 [23; 32]	23 [20; 31]	27 [23; 33]	0,307
<i>ASA, n (%)</i>				
ASA ≤ 2	6 (16)	0 (0)	6 (18)	0,299
ASA 3	31 (82)	5 (100)	26 (79)	0,254
ASA ≥ 4	1 (3)	0 (0)	1 (3)	0,693
<i>RCRI, n (%)</i>				
RCRI 1	4 (11)	1 (20)	3 (9)	0,459
RCRI 2	17 (45)	3 (60)	14 (42)	0,461
RCRI 3	15 (40)	1 (20)	14 (42)	0,339
RCRI 4	2 (5)	0 (0)	2 (6)	0,572
<i>ESC/ESA Operationsrisiko, n (%)</i>				
Geringes Risiko	3 (8)	1 (20)	2 (6)	0,281
Intermediäres Risiko	17 (45)	1 (20)	16 (49)	0,233
Hohes Risiko	18 (47)	3 (60)	15 (46)	0,544
<i>Vorerkrankungen, n (%)</i>				
Arterieller Hypertonus	34 (90)	4 (80)	30 (91)	0,459
Diabetes mellitus	7 (18)	1 (20)	6 (18)	0,922
Niereninsuffizienz (KDIGO ≥3)	13 (34)	4 (80)	9 (27)	0,021
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	10 (26)	2 (40)	8 (24)	0,456
Herzrhythmusstörungen	17 (45)	4 (80)	13 (39)	0,089
Schlaganfall	3 (8)	0 (0)	3 (9)	0,482
Kardiale Dekompensation	1 (3)	0 (0)	1 (3)	0,693
<i>Koronare Herzkrankheit</i>				
Perkutane Koronarintervention	15 (40)	1 (20)	14 (42)	0,339
Koronararterien-Bypass	8 (21)	1 (20)	7 (21)	0,951
Myokardinfarkt	17 (45)	2 (40)	15 (46)	0,819
<i>Raucher, n (%)</i>				
aktiv	9 (24)	1 (20)	8 (24)	0,835
aufgehört	15 (40)	2 (40)	13 (39)	0,979

<i>Medikation zum Studieneinschluss, n (%)</i>				
Beta-Blocker	27 (71)	4 (80)	23 (70)	0,636
ACE-Inhibitoren	18 (47)	4 (80)	14 (42)	0,117
Angiotensin II Rezeptor-Blocker	10 (26)	0 (0)	10 (30)	0,152
Calciumantagonisten	19 (50)	4 (80)	15 (46)	0,15
Diuretika	17 (45)	3 (60)	14 (42)	0,461
Statine	26 (68)	3 (60)	23 (70)	0,664
Aspirin	22 (58)	3 (60)	19 (58)	0,919
ADP-Rezeptorantagonisten	7 (18)	1 (20)	6 (18)	0,922
Vitamin K-Antagonisten	5 (13)	0 (0)	5 (15)	0,35
Neue orale Antikoagulanzen	4 (11)	0 (0)	4 (12)	0,41
<i>Präoperative Hämodynamik^{a)}</i>				
RR systolisch (mmHg)	146 [128; 166]	138 [82; 163]	150 [130; 169]	0,38
RR diastolisch (mmHg)	80 [59; 95]	56 [50; 96]	80 [62; 96]	0,428
Herzfrequenz (bpm)	65 [59; 80]	60 [49; 80]	65 [60; 81]	0,429
<i>Präoperative Laborparameter</i>				
hs-cTnT (ng/l)	13 [8; 19]	41 [23; 85]	11 [7,5; 18]	0,002
NT-proBNP (ng/l)	424 [106; 972]	5517 [1062; 15914]	252 [87; 700]	0,002
Kreatinin (mg/dl)	0,9 [0,7; 1,2]	2,5 [1,0; 7,4]	0,9 [0,7; 1,1]	0,027
C-reaktives Protein ^{b)} (mg/dl)	4,5 [1,9; 15]	8,6 [1,9; 33]	4,6 [1,9; 12,7]	0,965
Hämoglobin (g/dl)	12 [10; 13]	10 [9; 13]	12 [11; 13]	0,214

^{a)} während Anästhesieeinleitung bestimmt; ^{b)} aus letzter präoperativer klinischer Routinemessung übernommen; Werte fehlen in n=4 Patienten

Die Wahl des Anästhesieverfahrens sowie der Anästhesie-begleitenden Medikation beeinflusst die perioperative Immunantwort (Cruz et al. 2017). In beiden Gruppen wurden jedoch anteilig gleich viele Patienten unter Allgemein-, Regional- bzw. Kombinationsanästhesie operiert. Ebenso glich sich der Einsatz von Anästhetika und Opioiden zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Anästhesie (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2. Übersicht verwendeter Anästhesieverfahren sowie Einsatz von Anästhetika und Opioiden zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Anästhesie. Angaben entsprechen Absolut- und Relativwerten.

Variable	Studienkohorte	MACCE	kein MACCE	p-Wert
<i>Anästhesieverfahren, n (%)</i>				
Allgemeinanästhesie allein	26 (68)	4 (80)	22 (67)	0,550
Neuroaxial (spinal oder peridural) allein	4 (11)	0 (0)	4 (12)	0,410
Allgemein- u. thorakale Periduralanästhesie	8 (21)	1 (20)	7 (21)	0,951
<i>Anästhesie-Einleitung, n (%)</i>				
Opioide				
Sufentanil	34 (89)	5 (100)	29 (88)	0,411
Sedativum				
Propofol	32 (84)	4 (80)	28 (85)	0,782
Etomidat	2 (5)	1 (20)	1 (3)	0,113
Muskelrelaxanzien				
Rocuronium	29 (76)	3 (60)	26 (29)	0,357
Cisatracurium	2 (5)	1 (20)	1 (3)	0,113
Atracurium	1 (3)	0 (0)	1 (3)	0,693

Aufrechterhaltung der Anästhesie, n (%)

Opioide

Sufentanil	33 (87)	5 (100)	28 (85)	0,350
Remifentanil	4 (11)	0 (0)	28 (85)	0,411

Narkosegas

Sevofluran	25 (66)	5 (100)	20 (61)	0,084
Desfluran	9 (24)	0 (0)	9 (27)	0,181

4.1.2 Perioperativer Anstieg von Gesamt-Leukozyten, klassischen und intermediären Monozyten

Die Auswertung von Differentialblutbildern sowie der durchflusszytometrischen Analyse zeigte einen perioperativen Anstieg von Leukozyten ($p < 0,0001$) und Monozyten ($p < 0,0001$) (Abb. 4.2A+C). Die Zunahme der Gesamt-Monozytenzahl konnte auf einen Anstieg klassischer ($p < 0,0001$) und intermediärer Monozyten ($p < 0,0001$) zurückgeführt werden (Abb. 4.2D+E). Nicht-klassische Monozyten sanken hingegen ($p < 0,0038$) (Abb. 4.2F). Für diese Populationen wurden postoperativ gemessene Werte dem jeweiligen präoperativen Ausgangswert gegenübergestellt. Die Anzahl der Gesamt-Leukozyten stieg sechs Stunden nach Hautschnitt um etwa 59 % im Vergleich zum Ausgangswert (5,48 [3,90; 6,65] vs. 8,73 [6,94; 13,10] $\times 10^9$ Zellen/nl, $p < 0,0001$). Dieser Effekt blieb bis einschließlich des zweiten postoperativen Tages bestehen ($p < 0,0001$) (Abb. 4.2A). Monozyten-Werte stiegen ebenfalls innerhalb sechs Stunden nach Hautschnitt ($p < 0,05$); die maximale Zunahme gegenüber präoperativer Ausgangswerte wurde am ersten postoperativen Tag detektiert (0,40 [0,30; 0,50] vs. 0,50 [0,38; 0,73] Zellen/nl, $p < 0,001$) (Abb. 4.2C). Klassische Monozyten bilden die anteilig größte Monozyten-Population. Entsprechend folgte ihre perioperative Kinetik jener der Gesamt-Monozyten. Der Anstieg klassischer Monozyten manifestierte sich sechs Stunden nach Hautschnitt ($p < 0,01$), erreichte am ersten postoperativen Tag seinen Höhepunkt (0,35 [0,23; 0,43] vs. 0,45 [0,31; 0,66] Zellen/nl, $p < 0,0001$) und blieb bis einschließlich des zweiten postoperativen Tages bestehen ($p < 0,001$) (Abb. 4.2D). Die Zunahme intermediärer Monozyten zeigte sich zeitlich versetzt am ersten postoperativen Tag (0,02 [0,01; 0,02] vs. 0,04 [0,02; 0,04] Zellen/nl, $p < 0,001$) (Abb. 4.2E). Die Anzahl nicht-klassischer Monozyten sank sechs Stunden nach Hautschnitt um etwa 43 % (0,02 [0,01; 0,03] vs. 0,01 [0; 0,02] Zellen/nl, $p < 0,01$), kehrte jedoch innerhalb des ersten postoperativen Tages zum Ausgangswert zurück (Abb. 4.2F).

Lymphozyten ($p = 0,001$) und cytotoxische T-Zellen ($p = 0,001$) zeigten ebenfalls Veränderungen im perioperativen Verlauf, unterschieden sich jedoch nicht im Vergleich zu ihren präoperativen Ausgangswerten (Abb. 4.2B+H). NK-Zellen ($p = 0,045$), Tregs ($p = 0,0124$), TH-Zellen ($p = 0,08$) und TH-Subtypen (TH1: $p = 0,867$; TH2: $p = 0,068$; TH17: $p = 0,549$) blieben ohne signifikante Veränderung (Abb. 4.2G+I-M).

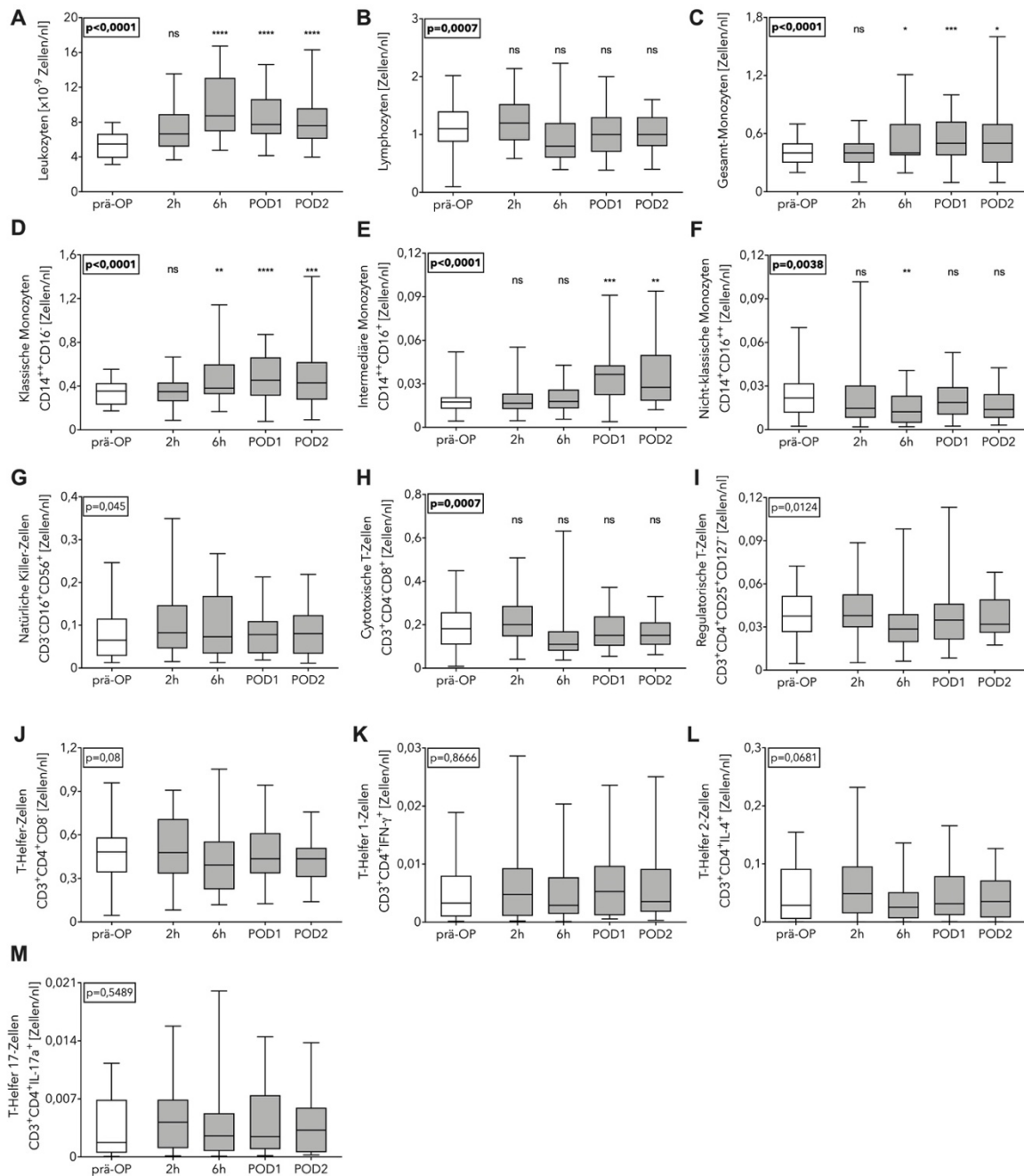


Abbildung 4.2. Perioperativer Verlauf von Leukozyten-Subpopulationen in LeukoKAPE-1-Studienkohorte.

Leukozyten und Leukozyten-Subpopulationen wurden in 38 nicht-kardiochirurgischen KHK-Patienten zu fünf verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert. Die quantitative Veränderung wurde mittels Friedman-Test beurteilt. Populationen, die anhand des Friedman-Tests und nach Bonferroni-Korrektur signifikante Veränderungen aufwiesen ($p < 0,0038$ ($\alpha < 0,05/13$); fett hervorgehoben), wurden mittels Dunn's *Post-hoc* Test analysiert (ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Dafür wurden postoperative Werte (grau) dem jeweiligen präoperativen Ausgangswert (weiß) gegenübergestellt. (A) Leukozyten, (B) Lymphozyten, (C) Gesamt-Monozyten, (D) klassische, (E) intermediäre und (F) nicht-klassische Monozyten, (G) natürliche Killer-Zellen, (H) cytotoxische T-Zellen, (I) regulatorische T-Zellen, (J) T-Helfer-Zellen, (K) T-Helfer 1-, (L) T-Helfer 2- und (M) T-Helfer 17-Zellen. Prä-OP: präoperativ, POD: postoperativer Tag, CD: cluster of differentiation.

Die beobachtete Kinetik als mögliche Reaktion auf den operativen Eingriff stellte ein spezifisches Phänomen dar, welches sich auf einzelne Zellpopulationen beschränkte. Hohe Leukozyten, Gesamt-Monozyten, klassische und intermediäre Monozyten sowie niedrige nicht-klassische Monozyten-

Werte wurden in prospektiven kardiologischen Langzeitstudien mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert (vgl. 1.3). Als Reaktion auf den operativen Eingriff entwickelte die Kohorte eine Tendenz in Richtung eines höheren kardiovaskulären Risikoprofils.

4.1.3 Perioperative Reduktion der HLA-DR-Expression auf Monozyten

Die Quantifizierung von HLA-DR-Rezeptoren auf zirkulierenden Monozyten gilt als valider Marker zur Beurteilung des Funktionszustandes des Immunsystems (Docke et al. 2005). Als Reaktion auf den operativen Eingriff nahm die monozytäre HLA-DR-Expression im Vergleich zum präoperativen Wert und unabhängig des Monozyten-Subtyps ab ($p < 0,0001$). In klassischen (6520 [4029; 8731] vs. 3598 [2579; 5473] MFI, $p < 0,0001$) und nicht-klassischen Monozyten (19703 [10383; 27764] vs. 8100 [3670; 17745] MFI, $p < 0,0001$) manifestierte sich die Reduktion sechs Stunden nach Hautschnitt; in intermediären Monozyten bereits zwei Stunden nach OP-Beginn (36775 [19443; 56909] vs. 27365 [12628; 47387] MFI, $p < 0,05$). Die verminderte HLA-DR-Expression blieb bis einschließlich des zweiten postoperativen Tages bestehen (Abb. 4.3A-D), was auf eine eingeschränkte Immunfunktion als mögliche Reaktion auf das operative Trauma hindeutete.

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass der Anteil HLA-DR-exprimierender Lymphozyten in Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose im Vergleich zu gesunden Individuen erhöht ist (Neri Serneri et al. 1997). Als Reaktion auf den operativen Eingriff veränderte sich die HLA-DR-Expression von cytotoxischen ($p = 0,094$) und T-Helfer-Zellen ($p = 0,151$) jedoch nicht (Abb. 4.3E+F).

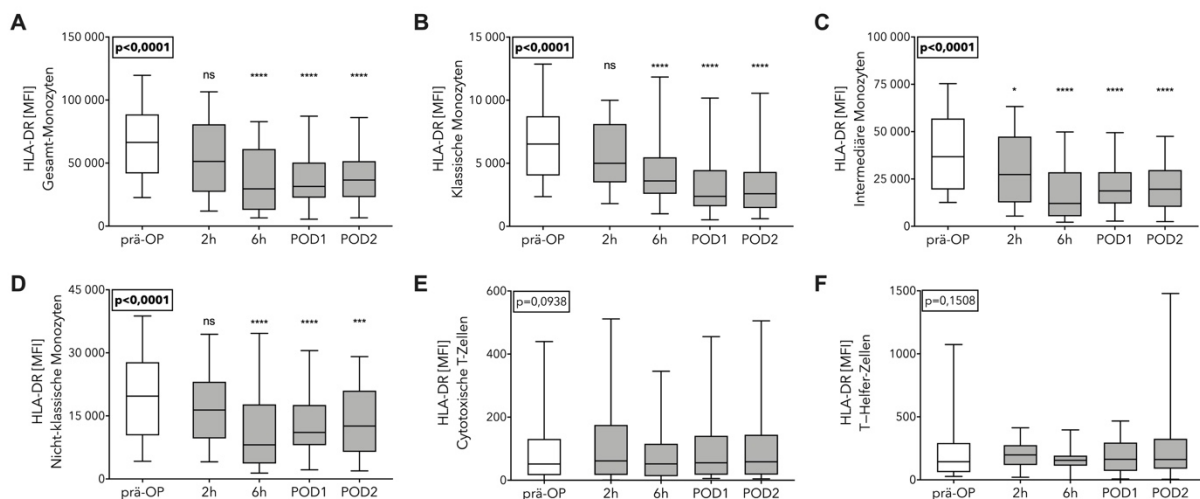


Abbildung 4.3. Perioperative HLA-DR-Expression von Monozyten und T-Lymphozyten in LeukoKAPE-1 Kohorte (n=38). Die HLA-DR-Expression wurde durchflusszytometrisch auf Monozyten, cytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen bestimmt, in Form des geometrischen Mittelwertes der mittleren Fluoreszenzintensität abzüglich der Isotypkontrolle erfasst und mittels Friedman-Test über den zeitlichen Verlauf beurteilt. Populationen, deren HLA-DR-Expression nach Bonferroni-Korrektur signifikante Veränderungen aufwiesen ($p < 0,008$ ($\alpha < 0,05/6$)), wurden mittels Dunn's *Post-hoc* Test analysiert (ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$). Dafür wurden postoperative Werte (grau) ihrem präoperativen Ausgangswert (weiß) gegenübergestellt. (A) HLA-DR-Expression von Gesamt-Monozyten, (B) klassischen Monozyten, (C) intermediären Monozyten, (D) nicht-klassischen Monozyten, (E) cytotoxischen T-Zellen und (F) T-Helfer Zellen.

Prä-OP: präoperativ, POD: postoperativer Tag, HLA-DR: humanes Leukozyten-Antigen DR, MFI: mittlere Fluoreszenzintensität.

4.1.4 Perioperativer Anstieg klassischer Monozyten in Patienten mit MACCE

Patienten der LeukoKAPE-1-Kohorte zeigten unter dem Einfluss des operativen Eingriffes eine quantitative Veränderung der Monozyten-Werte. Um die perioperative Kinetik monozytärer Subpopulationen in Assoziation mit perioperativen kardiovaskulären Komplikationen zu charakterisieren, wurden Studienteilnehmer anhand des primären Endpunktes MACCE stratifiziert. Delta (Δ)-Werte, die die Veränderung zwischen präoperativen und am ersten postoperativen Tag erhobenen Monozyten-Werte darstellen, wurden einander gegenübergestellt. Patienten, die den primären Endpunkt MACCE nicht erreichten, zeigten einen deutlich stärkeren Anstieg der klassischen Monozyten im Vergleich zu MACCE-Patienten (0,18 [0,08; 0,29] vs. 0,08 [-0,16; 0,08] Zellen/nl, $p=0,016$). Hingegen unterschieden sich Δ Intermediäre- ($p=0,093$) und Δ Nicht-klassische Monozyten-Werte ($p>0,999$) zwischen den beiden Patientengruppen nicht (Abb. 4.4).

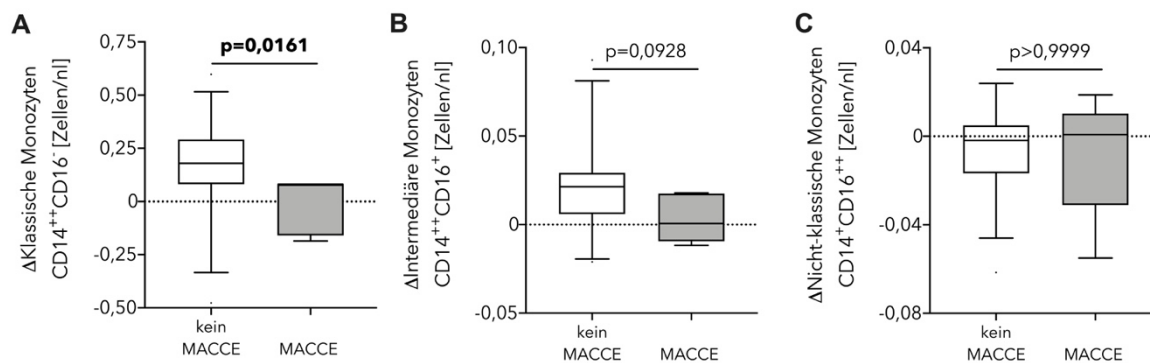


Abbildung 4.4. Delta (Δ)-Monozyten-Werte in nicht-kardiochirurgischen Patienten mit und ohne MACCE. Δ -Werte repräsentieren die Veränderung zwischen präoperativen und am postoperativen Tag 1 gemessenen Werten der jeweiligen Monozyten-Subpopulation. Patienten wurden anhand des primären Endpunktes MACCE (n=5, grau) versus kein MACCE (n=33, weiß) stratifiziert. Gruppenvergleiche wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt und nach Bonferroni für multiples Testen korrigiert. Statistisch signifikante Unterschiede ($p<0,0167$ ($\alpha<0,05/3$)) sind in Form von Fettdruck hervorgehoben. (A) Δ Klassische Monozyten, (B) Δ Intermediäre Monozyten und (C) Δ Nicht-klassische Monozyten. MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular event, CD: cluster of differentiation. Abbildung selbst erstellt nach Handke et al 2019.

4.1.5 Assoziation von Presepsin mit kardiovaskulären Ereignissen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen

Kommt es zur Aktivierung klassischer Monozyten, differenzieren diese über intermediäre hin zu nicht-klassische Monozyten (Patel et al. 2017). Dieser Prozess wird von der Freisetzung und Prozessierung von CD14 zu PSEP (sCD14-ST) begleitet. PSEP gilt aus diesem Grund als monozytärer Aktivierungsmarker (Shive et al. 2015). Wie unter 4.1.2 ausgeführt, war ein operativer Eingriff mit einer rapiden Zunahme klassischer Monozyten assoziiert, gefolgt vom Anstieg intermediärer Monozyten am ersten postoperativen Tag. Nicht-klassische Monozyten sanken hingegen kurzzeitig

(Abb. 4.2). Um zu analysieren, ob die beobachtete perioperative Kinetik monozytärer Subtypen auf die Aktivierung klassischer Monozyten zurückzuführen ist, wurde PSEP zu allen fünf Zeitpunkten *post-hoc* bestimmt.

Die mediane PSEP-Konzentration stieg kontinuierlich bis zum zweiten postoperativen Tag (133 [87,8; 268] vs. 390 [286; 693] pg/ml, $p < 0,0001$) beginnend sechs Stunden nach Hautschnitt (Abb. 4.5A). Stratifizierte man die Patienten anhand des primären Endpunktes, zeigten MACCE-Patienten einen stärkeren Anstieg (Δ Presepsin) der PSEP-Konzentration (942 [408; 1547] vs. 147 [101; 133] pg/ml, $p = 0,002$) am ersten postoperativen Tag (Abb. 4.5B). Zudem wiesen MACCE-Patienten bereits präoperativ deutlich höhere PSEP-Werte auf, verglichen mit Patienten, die den primären Endpunkt nicht erreichten (1528 [406; 1897] vs. 123 [82,2; 174] pg/ml, $p = 0,0001$; Abb. 4.5C).

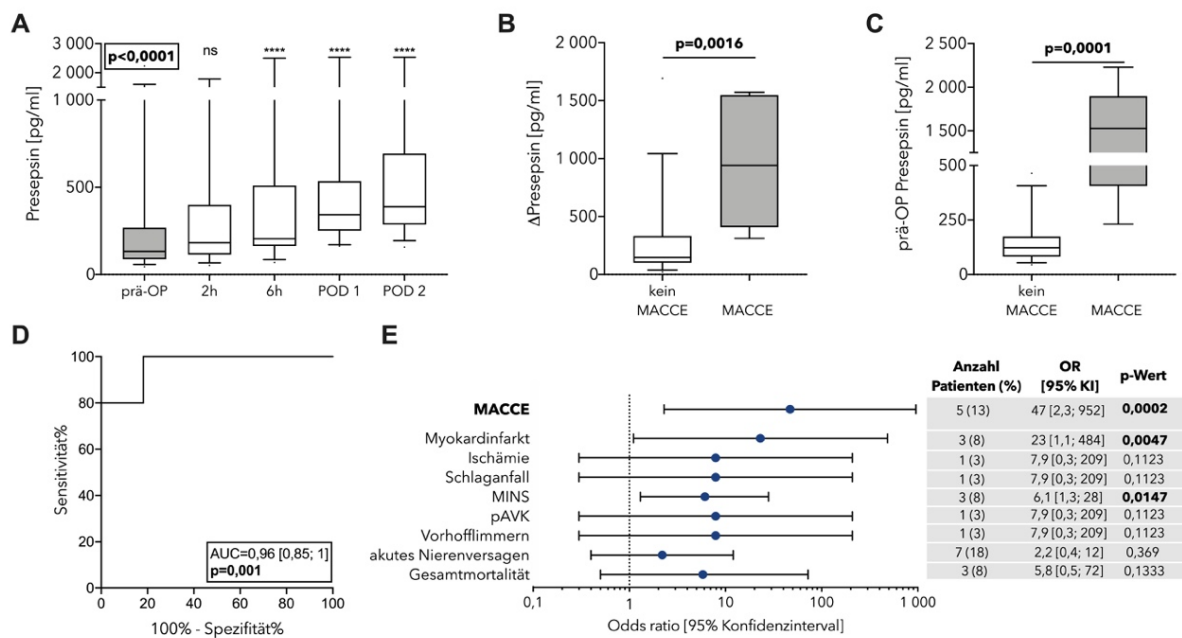


Abbildung 4.5. Presepsin-Plasmakonzentration im perioperativen Verlauf und in Assoziation mit MACCE. Presepsin (PSEP) wurde in 38 nicht-kardiochirurgischen KHK-Patienten zu fünf verschiedenen Zeitpunkten aus Heparin-Plasma bestimmt. (A) Die Konzentrationsänderung über den zeitlichen Verlauf wurde mittels Friedman-Test gefolgt von Dunn's *Post-hoc* Test analysiert (ns: nicht signifikant, **** $p < 0,0001$). Dafür wurden postoperative Werte (grau) ihrem präoperativen Ausgangswert (weiß) gegenübergestellt. (B) Δ Presepsin und (C) präoperative PSEP-Werte von Patienten mit MACCE ($n = 5$, grau) und ohne MACCE ($n = 33$, weiß) wurden mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test verglichen; $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. (D) ROC-Kurven-Analyse zur Beurteilung der prognostischen Güte von präoperativem Presepsin für MACCE. (E) Die Assoziation von präoperativem PSEP > 184 pg/ml mit MACCE und sekundären Endpunkten wurde mittels χ^2 -Test untersucht. AUC: Fläche unter der Kurve, MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular events, MINS: myocardial injury after non-cardiac surgery, pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit, OR: odds ratio, KI: Konfidenzintervall. Abbildung selbst erstellt nach Handke et al. 2019.

Der beobachtete perioperative PSEP-Anstieg suggerierte eine durch den operativen Eingriff induzierte klassische Monozyten-Aktivierung. Dass MACCE-Patienten auch präoperativ erhöhte PSEP-Werte aufwiesen, könnte zudem auf einen präoperativ vorbestehenden, verstärkt inflammatorische Prädisposition des Patienten deuten. Ob präoperatives PSEP einen prädiktiven Nutzen für

kardiovaskuläre Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen hat, wird im Folgenden untersucht.

Die ROC-Kurven-Analyse bestätigte eine gute Trennschärfe von präoperativen PSEP für die Vorhersage von MACCE (AUC=0,96 [0,85; 1,00], p=0,001, Abb. 4.5D). Der mittels Youden-Statistik abgeleitete Cut-off mit der höchsten Trennschärfe lag bei 184 pg/ml, erreichte eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 82 %. Positive und negative Prädiktionswerte lagen bei 45 und 100 %, die Vorhersagegenauigkeit betrug 84 %. Präoperatives PSEP >184 pg/ml war mit dem Auftreten des zusammengesetzten primären Endpunktes MACCE (OR=47 [2,3; 952], p=0,0002), MI (OR=23 [1,1; 484], p=0,005) und MINS (OR=6,1 [1,3; 28], p=0,015) assoziiert. Eine Assoziation zwischen präoperativem PSEP >184 pg/ml und anderen sekundären Endpunkten bestand nicht (Abb. 4.5E).

4.1.6 Präoperatives Presepsin verbessert die perioperative kardiovaskuläre Risikoprädiktion in LeukoKAPE-1 Kohorte

Um zu bewerten, ob präoperatives PSEP einen additiven Nutzen zur perioperativen kardiovaskulären Risikoprädiktion hat, wurde PSEP konventionellen Risikoprädiktoren gegenübergestellt. Gängige Modelle zur präoperativen Einschätzung des kardiovaskulären Risikos umfassen den RCRI sowie die Konzentrationsbestimmung der kardialen Biomarker hs-cTnT und NT-proBNP. Die Kombination dieser drei Variablen wird im Folgenden als Referenzmodell bezeichnet.

Tabelle 4.3. C-Statistik von präoperativem Presepsin, RCRI und kardialen Biomarkern in Abhängigkeit von perioperativem MACCE in LeukoKAPE-1 Kohorte (n=38). Für jedes Prädiktionsmodell wurde die vorhergesagte Wahrscheinlichkeit für ein kardiovaskuläres Ereignis nach nicht-kardiochirurgischer Operation mittels logistischer Regression berechnet und die Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt. Presepsin wurde als binäre Variable (>184 pg/ml), RCRI als ordinale Variable (1-6) und kardiale Biomarker als metrische Variable berücksichtigt. Statistische Signifikanz ist in Form von Fettdruck hervorgehoben. RCRI: Revised cardiac risk index, hs-cTnT: hoch-sensitives kardiales Troponin T, NT-proBNP: N-terminales pro-brain natriuretisches Peptid, KI: Konfidenzintervall

Prädiktionsmodell	AUC [95 % KI]	p-Wert
Presepsin (binär, >184 pg/ml)	0,91 [0,82; 1,00]	0,004
<i>Risikoprädiktion auf Basis des RCRI</i>		
RCRI	0,66 [0,42; 0,91]	0,244
<i>Risikoprädiktion auf Basis des RCRI in Kombination mit einem Biomarker</i>		
RCRI + hs-cTnT	0,91 [0,79; 1,00]	0,003
RCRI + NT-proBNP	0,84 [0,61; 1,00]	0,119
RCRI + Presepsin	0,95 [0,88; 1,00]	0,001
<i>Risikoprädiktion auf Basis des RCRI in Kombination mit zwei Biomarkern</i>		
RCRI + hs-cTnT + NT-proBNP (Referenzmodell)	0,93 [0,84; 1,00]	0,002
RCRI + hs-TnT + Presepsin	0,99 [0,95; 1,00]	0,001
RCRI + NT-proBNP + Presepsin	0,97 [0,91; 1,00]	0,001

Referenzmodell plus Presepsin

RCRI + hs-cTnT + NT-proBNP + Presepsin

0,99 [0,96; 1,00]

0,001

Die prognostische Güte des RCRI wies eine schwache Trennschärfe für MACCE nach nicht-kardiochirurgischen Operationen auf (AUC=0,66 [0,42; 0,91], $p=0,244$). Diese wurde durch Kombination mit hs-cTnT (AUC=0,91 [0,79; 1,00], $p=0,003$; $\Delta AUC=0,25$ [0,01; 0,49], $p=0,043$) und PSEP (AUC=0,95 [0,88; 1,00], $p=0,004$; $\Delta AUC=0,29$ [0,08; 0,49], $p=0,006$) verbessert (Abb. 4.6A). Die Kombination von RCRI und NT-proBNP (0,84 [0,61; 1,00], $p=0,119$) resultierte in einer moderaten, jedoch nicht signifikanten diskriminativen Fähigkeit für MACCE. Das Referenzmodell erreichte mit einer AUC von 0,93 [0,84; 1,00] ($p=0,002$) bereits eine sehr hohe prognostische Güte, welche unter Einbezug des präoperativen PSEP Cut-offs nicht signifikant gesteigert werden konnte ($\Delta AUC=0,05$ [-0,03; 0,14], $p=0,194$), jedoch eine AUC=0,99 [0,96; 1] ($p=0,001$) erreichte (Tab. 4.3, Abb. 4.6B).

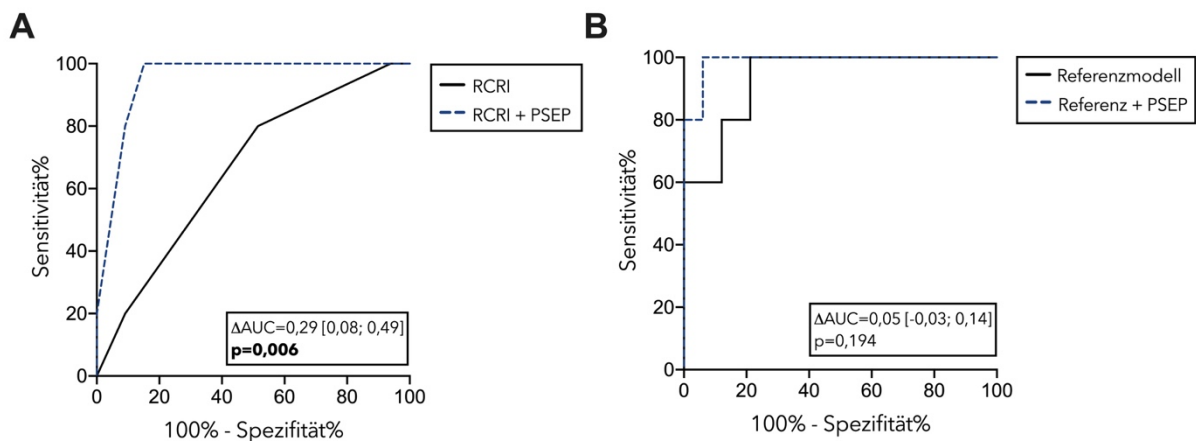


Abbildung 4.6. ROC-Kurven-Vergleiche zur Beurteilung des additiven Nutzens von präoperativem Presepsin (PSEP) >184 pg/ml für die Vorhersage von perioperativem MACCE. Presepsin wurde in 38 nicht-kardiochirurgischen KHK-Patienten präoperativ quantifiziert und anhand des primären Endpunktes MACCE (n=5) versus kein MACCE (n=33) stratifiziert. ROC-Kurven von (A) RCRI versus RCRI plus PSEP und (B) Referenzmodell versus Referenzmodell plus PSEP wurden mit Hilfe der DeLong-Methode miteinander verglichen. RCRI: Revised Cardiac Risk Index; MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular event.

Zur weiteren Evaluation des inkrementellen Wertes von präoperativem PSEP wurden Reklassifizierungsanalysen in Form von NRI und IDI herangezogen. Zur Berechnung des NRI wurden Patienten mit und ohne Ereignis entsprechend ihres vorhergesagten Risikos basierend auf dem Referenzmodell in vordefinierte Risikokategorien klassifiziert. Diese Zuordnung wird anschließend der Klassifizierung basierend auf dem erweiterten Modell (Referenzmodell plus PSEP) gegenübergestellt und statistisch miteinander verglichen. Die Berechnung des IDI basiert hingegen auf dem Vergleich der mittleren prognostizierten MACCE-Wahrscheinlichkeit beider Modelle und verzichtet auf die Einordnung in Risikokategorien.

Die Kombination des Referenzmodells mit präoperativem PSEP >184 pg/ml verbesserte die Vorhersagegenauigkeit für perioperative kardiovaskuläre Ereignisse (NRI_{gesamt}=1,22, $p=0,002$)

insbesondere durch die Reduktion falsch-positiv identifizierter Patienten ($NRI_{\text{kein MACCE}}=0,82$, $p<0,0001$). Die IDI-Analyse bestätigte eine verbesserte Vorhersagegenauigkeit kardiovaskulärer Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen unter Berücksichtigung der präoperativen PSEP-Konzentration ($IDI=0,31$, $p=0,027$) (Abb. 4.7).

Referenzmodell (RCRI, hs-cTnT, NT-proBNP)	Referenzmodell plus Presepsin (>184 pg/ml)				NRI	Gesamt- NRI	IDI
	<1%	≥1-10%	>10-20%	>20%			
MACCE-Patienten (n=5)							
<1%	0	0	0	0	0,4 $p=0,157$	1,22 $p=0,0002$	0,31 $p=0,027$
≥1-10%	0	0	0	2			
>10-20%	0	0	0	0			
>20%	0	0	0	3			
Patienten ohne MACCE (n=33)							
<1%	0	0	0	0	0,82 $p<0,0001$	1,22 $p=0,0002$	0,31 $p=0,027$
≥1-10%	25	2	0	2			
>10-20%	1	0	0	0			
>20%	2	1	0	0			

Abbildung 4.7. Net Reclassification Improvement (NRI)- und Integrated Discrimination Improvement (IDI)-Analyse zur Beurteilung des additiven Nutzens von präoperativem Presepsin (PSEP) >184 pg/ml für die Vorhersage von perioperativem MACCE. Patienten mit (n=5) und ohne MACCE (n=33) wurden anhand des Referenzmodells in vier Risikokategorien (<1 %, ≥1-10 %, >10-20 % und >20 %) eingeordnet (Zeilen). Es folgte die erneute Klassifizierung anhand des Referenzmodells und zusätzlicher Berücksichtigung präoperativer PSEP-Werte (Spalten). Korrekt reklassifizierte Patienten in blau; inkorrekt reklassifizierte Patienten in grau. MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular event, RCRI: Revised Cardiac Risk Index, hs-TnT: hochsensitives kardiales Troponin T, NT-proBNP: N-terminales pro-brain natriuretisches Peptid.

Diese Ergebnisse wurden in einer *post-hoc* Analyse der unabhängigen LeukoKAPE-2 Kohorte verifiziert (vgl. Abschnitt 4.2).

4.1.7 Präoperativ niedrige Treg-Level in Patienten mit perioperativem MACCE

Perioperativ konnte für einzelne Leukozyten-Subpopulationen eine quantitative Veränderung in Richtung eines höheren kardiovaskulären Risikoprofils gezeigt werden (vgl. 4.1.2). Im Folgenden wird untersucht, ob sich Patienten mit und ohne perioperative kardiovaskuläre Komplikationen bereits präoperativ hinsichtlich ihres Leukozyten-Profiles unterschieden.

Unter allen analysierten Zellpopulationen unterschieden sich Patienten mit und ohne Endpunkt lediglich in der Anzahl präoperativer Tregs. Verglichen mit Studienteilnehmern, die den 30-tägigen Beobachtungszeitraum ohne kardiovaskuläre Komplikationen überstanden, wiesen Patienten mit

kardiovaskulärem Ereignis präoperativ etwa 40 % niedrigere Treg-Level auf (0,022 [0,006; 0,025] vs. 0,038 [0,033; 0,052] Zellen/nl, $p=0,0013$) (Abb. 4.8).

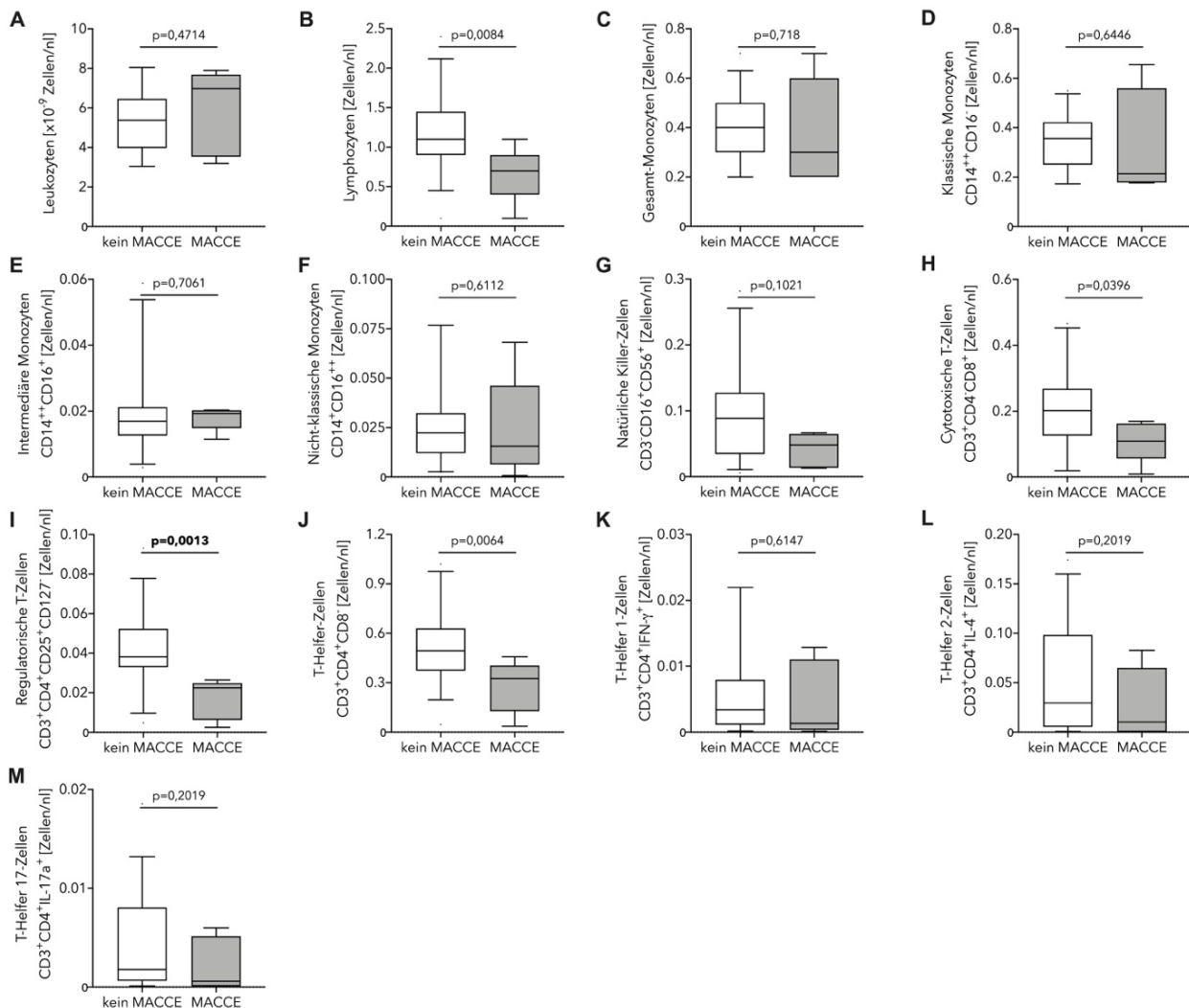


Abbildung 4.8. Präoperative Anzahl leukozytärer Subpopulationen in Patienten mit und ohne MACCE. Leukozyten und Leukozyten-Subpopulationen wurden in 38 nicht-kardiochirurgischen KHK-Patienten präoperativ quantifiziert und anhand des primären Endpunktes MACCE (n=5, grau) versus kein MACCE (n=33, weiß) stratifiziert. Gruppenvergleiche erfolgten mittels Mann-Whitney U-Test und wurden gemäß Bonferroni korrigiert. P-Werte $<0,0038$ ($\alpha<0,05/13$) wurden als statistisch signifikant betrachtet und sind in Form von Fettdruck hervorgehoben. MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular event; CD: cluster of differentiation.

Die ROC-Kurven-Analyse legte eine hohe Trennschärfe präoperativer Treg-Level für MACCE nach nicht-kardiochirurgischen Operationen offen (AUC=0,92 [0,82; 1,00], $p=0,003$) (Abb. 4.9A). Der Trennwert mit der höchsten Sensitivität (100 %) und Spezifität (85 %) lag gemäß Youden-Index bei 0,027 Tregs/nl. Präoperative Treg-Level $<0,027$ Zellen/nl waren mit der Inzidenz des primären Endpunktes MACCE (OR=57 [2,7; 1186], $p<0,0001$) sowie eines perioperativen MIs (OR=27 [1,2; 573], $p=0,003$), jedoch nicht mit anderen sekundären Endpunkten assoziiert (Abb. 4.9B).

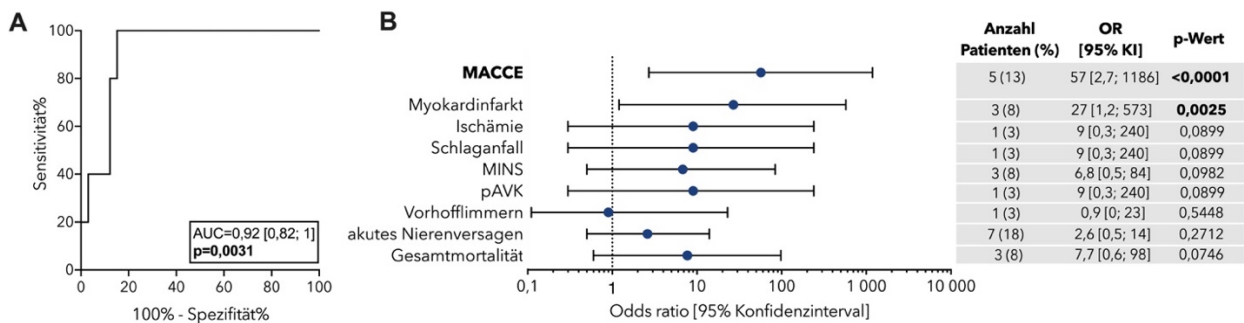


Abbildung 4.9. Diskriminative Fähigkeit und Assoziation präoperativer Treg-Level für MACCE nach nicht-kardiochirurgischen Operationen. Regulatorische T-Zellen (Tregs) wurden in 38 nicht-kardiochirurgischen KHK-Patienten präoperativ quantifiziert und anhand des primären Endpunktes MACCE (n=5) versus kein MACCE (n=33) stratifiziert. (A) ROC-Kurven-Analyse zur Beurteilung der Trennschärfe von präoperativen Treg-Leveln für MACCE. (B) Die Assoziation von Tregs <0,027 Zellen/nl mit MACCE und sekundären Endpunkten wurde mittels Chi²-Test untersucht. AUC: Fläche unter der Kurve, MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular events, MINS: myocardial injury after non-cardiac surgery, pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit, OR: odds ratio, KI: Konfidenzintervall.

Der in der LeukoKAPE-1 Studie abgeleitete Treg-Cut-off zur Vorhersage kardiovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Eingriffen wurde prospektiv in der unabhängigen LeukoKAPE-2-Kohorte unter meiner Beteiligung validiert und gemeinsam von A. S. Scholz und mir in geteilter Erstautorenschaft publiziert (Scholz et al. 2020).

Ob dem beobachteten Effekt zwischen präoperativ reduziertem Treg-Level und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse ein kausaler Zusammenhang zugrunde liegt, wurde im perioperativen Tiermodell untersucht (vgl. 4.3).

4.2 Post-hoc Analyse: LeukoKAPE-2 – Leukozyten und kardiovaskuläre perioperative Ereignisse 2

Die *post-hoc* Analyse diente der Validierung des in der LeukoKAPE-1 Studie abgeleiteten präoperativen PSEP Cut-offs von >184 pg/ml zur Prädiktion kardiovaskulärer Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen. Sie umfasste alle Patienten der prospektiven LeukoKAPE-2 Studie, die die Validierung präoperativer Treg-Level für die Vorhersage von perioperativem MACCE zum Ziel hatte (Scholz et al. 2020).

Zwischen April und November 2017 konnten von 295 gescreenten Patienten 233 Studienteilnehmer erfolgreich rekrutiert werden. Insgesamt 62 Patienten wurden aufgrund der Verweigerung der Einverständniserklärung (n=19), fehlender Einschlusskriterien (n=19), zutreffender Ausschlusskriterien (n=23) oder vorherigem Studieneinschluss (n=1) nicht in die Studie eingeschlossen. Im Nachhinein wurden wiederum elf Patienten ausgeschlossen, da sie ihr Einverständnis zurückzogen (n=7), der operative Eingriff abgesagt (n=2) oder nachträglich Ausschlusskriterien festgestellt wurden (n=2). Das finale Set der *post-hoc* Analyse setzte sich aus 222

KHK-Patienten, die sich einem nicht-kardiochirurgischen Eingriff unterzogen, zusammen (Abb. 4.10). Abweichungen gegenüber der prospektiven LeukoKAPE-2 Analyse (n=220) sind auf den Ausschluss zweier weiterer Patienten zurückzuführen. Dies resultierte aus technischen Schwierigkeiten bei der durchflusszytometrischen Messung, der für die hier präsentierte Analyse keine Relevanz zukam.

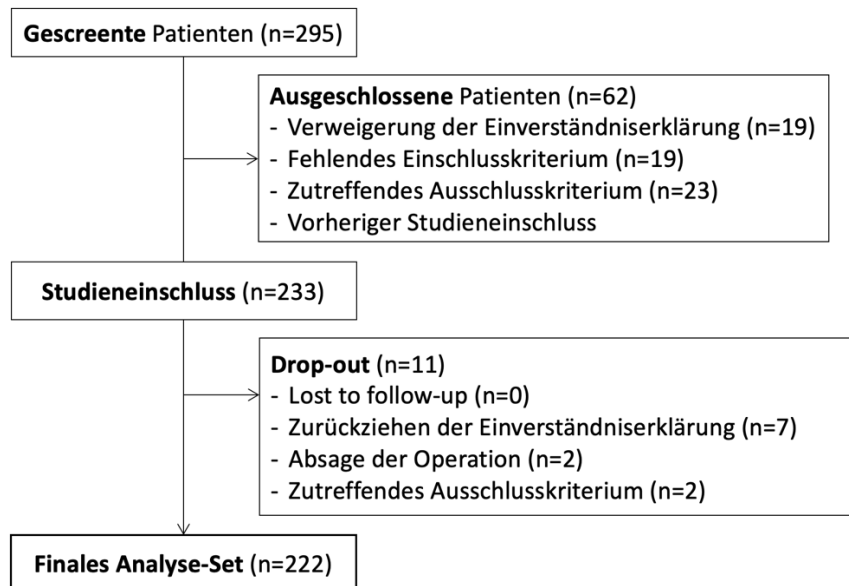


Abbildung 4.10. Übersicht des zur *post-hoc* Analyse herangezogenen LeukoKAPE-2 Studienkollektivs. Abbildung selbst erstellt nach Handke et al. 2020 (Supplement).

4.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

In Tabelle 4.4 sind demographische und klinische Basisdatencharakteristika des gesamten Analyse-Sets sowie der nach MACCE stratifizierten Patienten dargestellt. Wie in LeukoKAPE-1 betrug das mittlere Alter der Kohorte $69 \pm \text{SD } 8$ Jahre, 80 % der Patienten waren männlich und die Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie früherer kardiovaskulärer Ereignisse war hoch (Tab. 4.4).

Während des 30-tägigen Beobachtungszeitraumes erreichten 23 (10 %) Patienten den primären Endpunkt MACCE. Darunter erlitten 15 Patienten einen MI, 15 eine Myokardischämie und ein Patient einen Schlaganfall. Kein Studienteilnehmer starb aufgrund kardiovaskulärer Ursachen. Etwa 91 % der beobachteten kardiovaskulären Ereignisse traten innerhalb der ersten drei Tage postoperativ auf. Acht (4 %) Patienten erlitten mehr als eine Entität des zusammengesetzten primären Endpunktes MACCE. Die Basisdatencharakteristika glichen sich weitestgehend zwischen Patienten mit und ohne Endpunkt. MACCE-Patienten wiesen lediglich höhere präoperative hs-cTnT-Werte auf; NT-proBNP-Werte unterschieden sich hingegen nicht (Tab. 4.4).

Verglichen mit LeukoKAPE-1 ähnelten sich die Kollektive in der Häufigkeit des primären Endpunktes sowie hinsichtlich demographischer und klinischer Basisdaten. Patienten des *post-hoc* Analyse-Sets aus LeukoKAPE-2 tendierten jedoch zu geringfügig höheren RCRI, wiesen höhere CRP-Werte auf,

litten im Schnitt häufiger an Diabetes mellitus und anteilig mehr Patienten nahmen Aspirin ein. Zudem litten anteilig weniger MACCE-Patienten der LeukoKAPE-2 Analyse an chronischer Niereninsuffizienz (KDIGO ≥ 3) (Tab. 4.1 + Tab. 4.4).

Tabelle 4.4. Demographische und klinische Basisdaten des *post-hoc* Analyse-Sets der LeukoKAPE-2 Studienkohorte (n=222). Kontinuierliche Variablen sind als Median [IQR] angegeben; kategorische Daten als Absolut- und Relativzahlen. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Patienten mit und ohne MACCE sind in Form von Fettdruck hervorgehoben. BMI: body mass index, ASA: Risikoklassifikation nach der American Society of Anesthesiologists, RCRI: Revised Cardiac Risk Index, ESC/ESA: European Society of Cardiology/European Society of Anaesthesiology; KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes, ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym, ADP: Adenosindiphosphat, RR: Riva-Rocci, hs-cTnT: hoch-sensitives kardiales Troponin T, NT-proBNP: N-terminales pro-B natriuretisches Peptid. Tabelle selbst erstellt nach Handke et al. 2020.

Variable	Studienkohorte	MACCE	kein MACCE	p-Wert
n (%)	222 (100)	23 (10)	199 (90)	
Alter (Jahren)	69 [64; 75]	73 [68; 77]	69 [63; 75]	0,101
männlich, n (%)	177 (80)	21 (91)	156 (78)	0,145
BMI (kg/m ²)	27 [24; 29]	26 [24; 27]	27 [24; 30]	0,269
<i>ASA, n (%)</i>				
ASA ≤ 2	25 (11)	0 (0)	25 (13)	0,071
ASA 3	189 (85)	22 (96)	167 (84)	0,134
ASA ≥ 4	8 (4)	1 (4)	7 (4)	0,840
<i>RCRI, n (%)</i>				
RCRI 1	48 (22)	4 (17)	44 (22)	0,603
RCRI 2	119 (54)	14 (61)	105 (53)	0,461
RCRI 3	43 (19)	4 (17)	39 (20)	0,800
RCRI 4	12 (5)	1 (4)	11 (6)	0,813
<i>ESC/ESA Operationsrisiko, n (%)</i>				
Geringes Risiko	20 (9)	4 (17)	16 (8)	0,138
Intermediäres Risiko	110 (50)	7 (30)	103 (52)	0,053
Hohes Risiko	92 (41)	12 (52)	80 (40)	0,270
<i>Vorerkrankungen, n (%)</i>				
Arterieller Hypertonus	209 (94)	22 (96)	187 (94)	0,745
Diabetes mellitus	74 (33)	9 (39)	65 (33)	0,533
Niereninsuffizienz (KDIGO ≥ 3)	49 (22)	6 (26)	43 (22)	0,624
Periphere arterielle	69 (31)	7 (30)	62 (31)	0,944
Herzrhythmusstörungen	37 (17)	7 (30)	30 (15)	0,061
Schlaganfall	21 (10)	0 (0)	21 (11)	0,102
Kardiale Dekompensation	4 (2)	0 (0)	4 (2)	0,493
<i>Koronare Herzkrankheit</i>				
Perkutane Koronarintervention	114 (51)	12 (52)	102 (51)	0,934
Koronararterien-Bypass	50 (23)	7 (30)	22 (11)	0,337
Myokardinfarkt	84 (38)	11 (48)	73 (37)	0,297
<i>Raucher, n (%)</i>				
aktiv	51 (23)	4 (17)	47 (24)	0,502
aufgehört	70 (32)	7 (30)	63 (32)	0,905
<i>Medikation zum Studieneinschluss, n</i>				
Beta-Blocker	166 (75)	18 (78)	148 (74)	0,684
ACE-Inhibitoren	113 (51)	12 (52)	101 (51)	0,897

Angiotensin II Rezeptor-Blocker	73 (33)	7 (30)	66 (33)	0,792
Calciumantagonisten	69 (31)	6 (26)	63 (32)	0,585
Diuretika	104 (47)	11 (48)	93 (47)	0,921
Statine	175 (79)	16 (70)	159 (80)	0,251
Aspirin	163 (73)	14 (61)	149 (75)	0,150
ADP-Rezeptorantagonisten	37 (17)	3 (13)	34 (17)	0,622
Vitamin K-Antagonisten	21 (10)	3 (13)	18 (9)	0,535
Neue orale Antikoagulanzen	36 (16)	5 (22)	31 (16)	0,448
<i>Präoperative Hämodynamik^{a)}</i>				
RR systolisch (mmHg)	150 [140; 165]	140 [130; 160]	150 [140; 165]	0,206
RR diastolisch (mmHg)	80 [70; 90]	80 [65; 85]	80 [70; 90]	0,335
Herzfrequenz (bpm)	70 [60; 80]	70 [60; 80]	70 [60; 80]	0,875
<i>Präoperative Laborparameter</i>				
Hs-cTnT (ng/l)	13 [8; 22]	16 [14; 34]	12 [7; 21]	0,018
NT-proBNP (ng/l)	280 [127; 1144]	420 [123; 1735]	271 [127; 1056]	0,187
Kreatinin ^{b)} (mg/dl)	0,9 [0,8; 1,1]	0,9 [0,8; 1,2]	0,9 [0,8; 1,1]	0,952
C-reaktives Protein ^{b), c)} (mg/dl)	3,0 [1,9; 11]	4,6 [1,9; 8,7]	2,7 [1,9; 11]	0,865
Leukozyten (x10 ⁹ /l)	6,1 [5,0; 7,3]	5,8 [4,4; 6,6]	6,1 [5,0; 7,5]	0,077
Hämoglobin (g/dl)	12,4 [11,1; 13,4]	11,9 [11,5; 13,0]	11,0 [12,5; 13,4]	0,548

^{a)} während Anästhesieeinleitung bestimmt; ^{b)} aus letzter präoperativer klinischer Routinemessung übernommen; ^{c)} Werte aus ^{b)} fehlten in n=31 Patienten und wurden *post-hoc* aus Lithium-Heparin-Plasma bestimmt

MACCE-Patienten wurden im Schnitt häufiger in Kombinationsanästhesie operiert. Der Einsatz von Anästhetika und Opioiden zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde in LeukoKAPE-2 hingegen nicht dokumentiert (Tab. 4.5).

Tabelle 4.5. Übersicht verwendeter Anästhesieverfahren. Angaben entsprechen Absolut- und Relativwerten.

Anästhesieverfahren, n (%)	Studienkohorte	MACCE	kein MACCE	p-Wert
Allgemeinanästhesie allein	132 (59)	10 (44)	122 (61)	0,099
Neuroaxial (spinal oder peridural) allein	6 (3)	1 (4)	5 (3)	0,607
Allgemein- u. thorakale Periduralanästhesie	56 (25)	10 (44)	46 (23)	0,033
Spinal- und Epiduralanästhesie	11 (5)	0 (0)	11 (6)	0,247
Analgesiedierung allein	17 (8)	2 (9)	15 (8)	0,843

4.2.2 Präoperativ erhöhtes Presepsin in Patienten mit MACCE

Im gesamten Analyse-Set stieg die mediane PSEP-Konzentration von 162 [103; 274] pg/ml präoperativ auf 291 [200; 468] pg/ml am ersten postoperativen Tag ($p < 0,0001$; Abb. 4.11A). Stratifizierte man die Patienten anhand des primären Endpunktes, wiesen Patienten mit kardiovaskulärem Ereignis präoperativ höhere PSEP-Werte auf (212 [163; 358] vs. 156 [102; 273] pg/ml, $p = 0,023$; Abb. 4.11B). Am ersten postoperativen Tag glichen sich die Werte beider Patienten-Gruppen (322 [242; 536] vs. 282 [196; 468] pg/ml für MACCE vs. kein MACCE, $p = 0,262$; Abb. 4.11C). Denkbar ist, dass die durch den operativen Eingriff ausgelöste akute inflammatorische Reaktion des Körpers und der damit induzierte PSEP-Anstieg präoperativ bestehende Unterschiede maskiert und infolgedessen am ersten postoperativen Tag nicht mehr detektiert werden können.

Auch der Vergleich von Δ PSEP-Werten (POD1 minus prä-OP) zeigte keinen Unterschied zwischen beiden Patienten-Gruppen (100 [14; 245] vs. 104 [36; 226] pg/ml für MACCE vs. kein MACCE, $p=0,717$; Abb. 4.11D). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus LeukoKAPE-1.

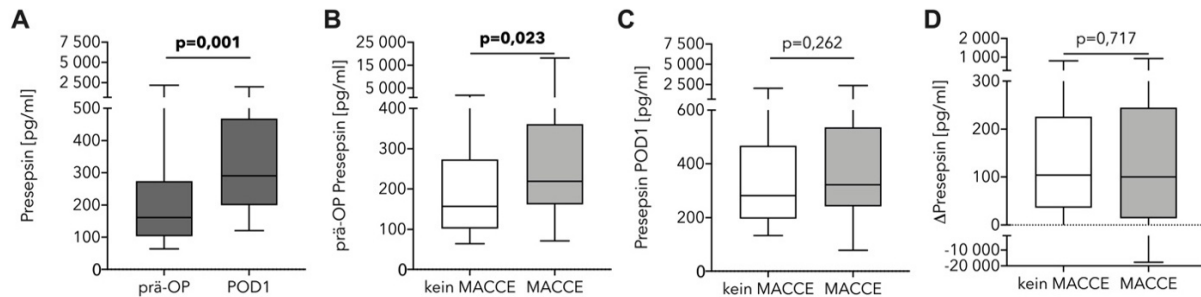


Abbildung 4.11. Presepsin-Plasmakonzentration im perioperativen Verlauf und stratifiziert nach MACCE. Presepsin (PSEP) wurde in 222 KHK-Patienten präoperativ (prä-OP) und am ersten postoperativen Tag (POD1) gemessen. (A) Der perioperative PSEP-Anstieg des gesamten Analyse-Sets (dunkelgrau) wurde mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bewertet. Patienten wurden anhand des primären Endpunktes MACCE (n=23, grau) versus kein MACCE (n=199, weiß) stratifiziert. Gruppenvergleiche für (B) präoperatives PSEP, (C) PSEP-Konzentration an POD1 und (D) Δ -PSEP (POD1 minus prä-OP) wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet und ist in Form von Fettdruck hervorgehoben. Abbildung selbst erstellt nach Handke et al. 2020 (Supplement).

4.2.3 Präoperatives Presepsin ist mit dem Auftreten von MACCE nach nicht-kardiochirurgischen Operationen assoziiert

PSEP allein wies eine schwache bis moderate prognostische Güte für MACCE nach nicht-kardiochirurgischer Operation auf (AUC=0,64 [0,54; 0,75], $p=0,023$; Abb. 4.12A). Der in LeukoKAPE-1 abgeleitete Cut-off von 184 pg/ml erreichte in der *post-hoc* Analyse der LeukoKAPE-2-Studie eine vergleichsweise geringe Sensitivität von 65 % und Spezifität von 60 %; positiver und negativer prädiktiver Wert lagen bei 16 bzw. 94 %.

Stratifizierte man die Patienten hinsichtlich ihres präoperativen PSEP-Wertes in ≤ 184 und > 184 pg/ml, erlitten Patienten der Gruppe mit hohem präoperativem PSEP anteilig häufiger ein kardiovaskuläres Ereignis während des 30-tägigen Beobachtungszeitraumes (6 vs. 16 %). Der statistische Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven bestätigte eine längere MACCE-freie Überlebenszeit in Patienten mit niedrigem präoperativem PSEP (Log-Rang (Mantel-Cox)-Test: $p=0,021$) (Abb. 4.12B).

Betrachtete man den Zusammenhang präoperativen PSEPs mit dem Auftreten perioperativer kardiovaskulärer Ereignisse unabhängig sonstiger präoperativer Einflussfaktoren, korrelierte PSEP > 184 pg/ml mit einem erhöhten Risiko für perioperativen MACCE (OR=2,8 [1,1; 6,9], $p=0,026$). Zudem war eine präoperative PSEP-Konzentration oberhalb des Cut-offs mit dem Auftreten von MINS (OR=3,3 [1,9; 5,9], $p < 0,0001$), jedoch nicht mit anderen sekundären Endpunkten assoziiert (Abb. 4.12C).

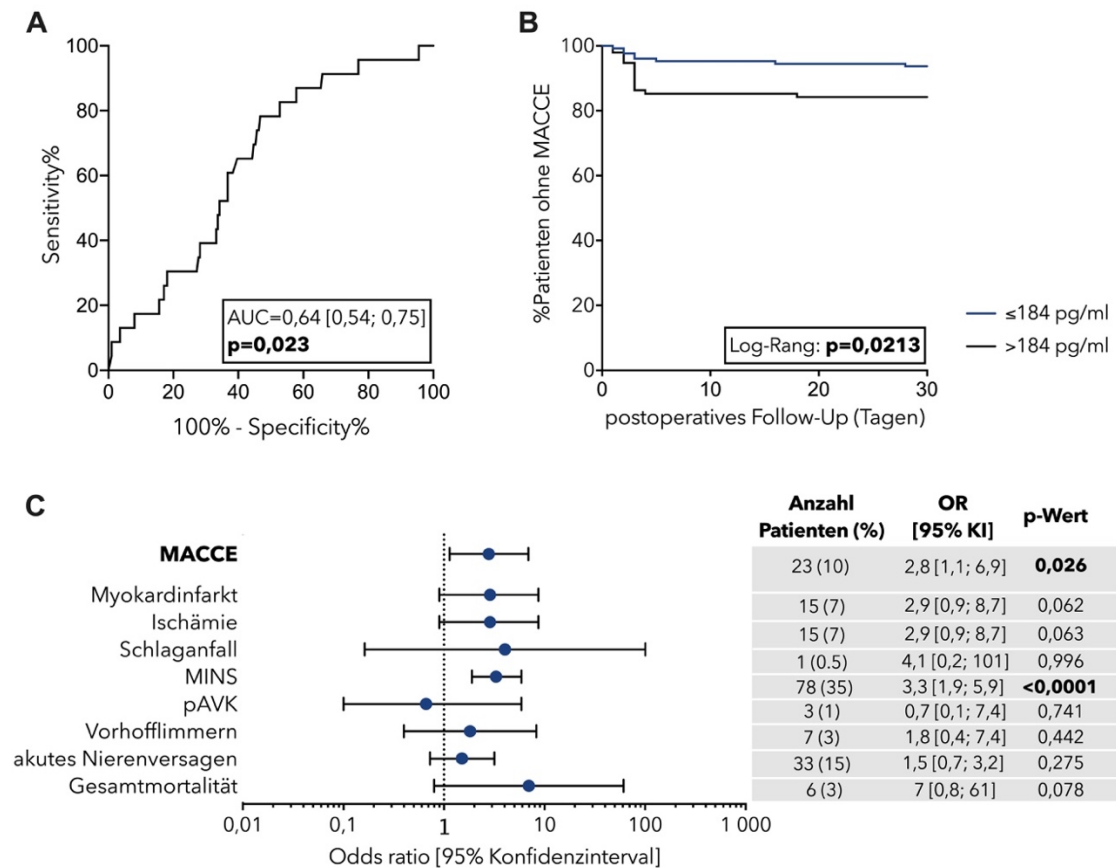


Abbildung 4.12. Validierung der prognostischen Güte und Assoziation von präoperativem Presepsin (PSEP) mit MACCE nach nicht-kardiochirurgischer Operation. Presepsin wurde in 222 nicht-kardiochirurgischen KHK-Patienten präoperativ quantifiziert und anhand des primären Endpunktes MACCE (n=23) versus kein MACCE (n=199) stratifiziert. (A) ROC-Kurven-Analyse zur Beurteilung der prognostischen Güte von präoperativem PSEP für perioperativen MACCE. (B) MACCE-freies Überleben in Abhängigkeit des präoperativen PSEP Cut-offs. Der statistische Vergleich von Kaplan-Meier-Kurven wurde mittels Log-Rang (Mantel-Cox)-Test durchgeführt. (C) Assoziation von präoperativem PSEP >184 pg/ml mit dem Auftreten primärer und sekundärer Endpunkte wurde mittels univariater logistischer Regressionsanalyse beurteilt. Statistische Signifikanz (p<0,05) ist in Form von Fettdruck hervorgehoben. AUC: Fläche unter der Kurve, MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular event, MINS: myocardial injury after non-cardiac surgery, pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit, OR: odds ratio, KI: Konfidenzintervall. Abbildung selbst erstellt nach Handke et al. 2020.

Die beobachtete Assoziation von präoperativem PSEP >184 pg/ml mit kardiovaskulären Ereignissen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen kann durch Störfaktoren beeinflusst werden. Um deren Effekt zu kontrollieren, wurden multivariate logistische Regressionsanalysen durchgeführt.

Mittels univariater Analyse konnten ein fortgeschrittenes Patientenalter (OR=1,9 [0,99; 1,11], p=0,099), präoperative Herzrhythmusstörungen (OR=2,47 [0,94; 6,5], p=0,068), niedrige Leukozyten-Werte (OR=0,77 [0,59; 1], p=0,053) und die Operation in Kombinationsanästhesie (OR=2,56 [1,05; 6,22], p=0,038) als mit dem primären Endpunkt assoziierte Einflussfaktoren identifiziert werden (p<0,1). Unter Einbezug genannter Variablen in das multivariate logistische Regressionsmodell erwies sich präoperatives PSEP >184 pg/ml als einziger unabhängiger Prädiktor (p<0,05) für perioperative kardiovaskuläre Komplikationen (OR=2,84 [1,11; 7,31]; p=0,03). Die kardialen Biomarker, hs-cTnT

($p=0,528$) und NT-proBNP (0,471), waren nicht mit dem Auftreten von perioperativem MACCE assoziiert (Tab. 4.6).

Tabelle 4.6. Uni- und multivariate logistische Regressionsanalyse zur Untersuchung der Assoziation von präoperativem Presepsin >184 pg/ml mit MACCE nach nicht-kardiologischen Operationen. Angaben entsprechen Odds ratio (OR) mit zugehörigem 95 % Konfidenzintervall (KI). Einflussfaktoren mit $p<0,1$ in der univariaten Analyse wurden in der multivariaten Modellierung berücksichtigt. Variablen, die in der multivariaten Analyse signifikant mit dem primären Endpunkt MACCE assoziiert waren, sind in Form von Fettdruck hervorgehoben ($p<0,05$). MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular event, BMI: body mass index, ASA: Risikoklassifikation nach der American Society of Anesthesiologists, RCRI: Revised Cardiac Risk Index, ESC/ESA: European Society of Cardiology/European Society of Anaesthesiology; KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes, ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym, ADP: Adenosindiphosphat, hs-cTnT: hoch-sensitives kardiales Troponin T, NT-proBNP: N-terminales pro-B natriuretisches Peptid. Tabelle selbst erstellt nach Handke et al. 2020.

Variable	Univariat		Multivariat	
	OR [95 % KI]	p-Wert	adjustiertes OR [95 % KI]	p-Wert
Presepsin (binär, >184 pg/ml)	2,79 [1,13; 6,89]	0,026	2,84 [1,11; 7,31]	0,030
Alter (Jahren)	1,05 [0,99; 1,11]	0,099	1,04 [0,97; 1,1]	0,265
männlich	2,89 [0,65; 12,8]	0,162		
BMI (kg/m ²)	0,95 [0,87; 1,05]	0,32		
ASA-Klassifikation	2,83 [0,81; 9,89]	0,104		
RCRI	0,99 [0,58; 1,68]	0,962		
ESC/ESA Operationsrisiko	1,07 [0,54; 2,13]	0,851		
Arterieller Hypertonus	1,41 [0,18; 11,38]	0,746		
Diabetes mellitus	1,33 [0,55; 3,22]	0,534		
Niereninsuffizienz (KDIGO ≥ 3)	1,28 [0,48; 3,45]	0,625		
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	0,7 [0,1; 7,4]	0,739		
Herzrhythmusstörungen	2,47 [0,94; 6,5]	0,068	1,77 [0,63; 5,01]	0,283
Kardiale Dekompensation	6,8 [0,32; 144]	0,101		
Schlaganfall	4,05 [0,16; 101]	0,102		
Koronararterien-Bypass	1,59 [0,61; 4,1]	0,341		
Perkutane Koronarintervention	1,04 [0,44; 2,46]	0,934		
Myokardinfarkt	1,58 [0,67; 3,77]	0,300		
Aktiver Raucher	0,68 [0,22; 2,10]	0,504		
Beta-Blocker	1,24 [0,44; 3,51]	0,685		
ACE-Inhibitoren	1,06 [0,45; 2,51]	0,897		
Angiotensin II Rezeptor-Block	0,88 [0,35; 2,25]	0,792		
Calciumantagonisten	0,76 [0,29; 2,03]	0,586		
Diuretika	1,05 [0,44; 2,48]	0,921		
Statine	0,58 [0,22; 1,49]	0,255		
Aspirin	0,52 [0,21; 1,28]	0,155		
ADP-Rezeptorantagonisten	0,73 [0,21; 2,59]	0,624		
Vitamin K-Antagonisten	1,51 [0,41; 5,57]	0,538		
Neue orale Antikoagulanzen	1,51 [0,52; 4,36]	0,450		
hs-cTnT (ng/l)	1,00 [0,99; 1,01]	0,528		
NT-proBNP (ng/l)	1,00 [1,00; 1,00]	0,471		
Kreatinin (mg/dl)	1,13 [0,75; 1,70]	0,561		
C-reaktives Protein (mg/dl)	1,00 [0,99; 1,01]	0,972		

Leukozyten ($\times 10^{-9}/l$)	0,77 [0,59; 1,00]	0,053	0,77 [0,58; 1,00]	0,053
Allgemeinanästhesie allein	0,49 [0,20; 1,16]	0,104		
Allgemein- u. thorakale Periduralanästhesie	2,56 [1,05; 6,22]	0,038	2,18 [0,85; 5,57]	0,104
Neuroaxial (spinal oder peridural) allein	1,76 [0,20; 15,8]	0,612		
Spinal- und Epiduralanästhesie	0,34 [0,02; 6,11]	0,248		
Analgesiedierung allein	1,17 [0,25; 5,47]	0,843		

Zur Bewertung der Robustheit der beobachteten Assoziation zwischen präoperativem PSEP und perioperativem MACCE gegenüber bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren wurden weitere Sensitivitätsanalysen durchgeführt. PSEP >184 pg/ml blieb auch unter Einbezug mehrerer präoperativer demographischer und klinischer Risikofaktoren unabhängig mit dem primären Endpunkt MACCE assoziiert (Tab. 4.7).

Tabelle 4.7. Sensitivitätsanalyse. Multivariate logistische Regressionsmodelle zur Beurteilung und Adjustierung der Assoziation von präoperativem Presepsin >184 pg/ml mit MACCE nach nicht-kardiochirurgischer Operation unter Berücksichtigung herkömmlicher kardiovaskulärer Risikofaktoren. Daten sind in Form von Odds ratio (OR) und 95 % Konfidenzintervall (KI) angegeben; $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular event, BMI: body mass index, RCRI: Revised Cardiac Risk Index, hs-cTnT: hoch-sensitives kardiales Troponin T, NT-proBNP: N-terminales pro-B natriuretisches Peptid. Tabelle selbst erstellt nach Handke et al. 2020.

Berücksichtigte präoperative Eingangsvariable(n)	adjustiertes OR [95 % KI]	p-Wert
Presepsin (binär, >184 pg/ml)	2,79 [1,13; 6,89]	0,026
Alter, Geschlecht und BMI	2,68 [1,08; 6,74]	0,036
Kreatinin	2,80 [1,11; 7,10]	0,030
C-reaktives Protein, Leukozyten	3,43 [1,33; 8,87]	0,011
RCRI, hs-cTnT, NT-proBNP	2,81 [1,10; 7,20]	0,032
Myokardinfarkt, Schlaganfall, Herzrhythmusstörungen	2,76 [1,10; 6,92]	0,031
Anästhesieverfahren ^{a)}	2,79 [1,11; 6,99]	0,029

^{a)} Adjustierung des Modells durch Einbezug verwendeter Anästhesieverfahren, darunter alleinige Allgemeinanästhesie, Allgemein- u. thorakale Periduralanästhesie, alleinige neuroaxiale Anästhesie, Spinal- und Epiduralanästhesie sowie ausschließliche Analgesiedierung

4.2.4 Presepsin zur perioperativen kardiovaskulären Risikoprädiktion

In LeukoKAPE-1 erwies sich präoperatives PSEP als wertvoller Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse in nicht-kardiochirurgischen Patienten (vgl 4.1.6). Um den inkrementellen Wert des in LeukoKAPE-1 abgeleiteten PSEP Cut-offs von 184 pg/ml für die kardiovaskuläre Risikoprädiktion zu validieren, wurden erneut ROC-Kurven- und Reklassifizierungsanalysen durchgeführt.

Tabelle 4.8. C-Statistik von präoperativem Presepsin, RCRI und kardialen Biomarkern in Abhängigkeit von MACCE in LeukoKAPE-2 Kohorte (n=222). Für jedes Prädiktionsmodell wurde die prognostizierte Wahrscheinlichkeit für MACCE nach nicht-kardiochirurgischer Operation mittels logistischer Regression berechnet und die Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt. Presepsin wurde als binäre Variable (>184 pg/ml), RCRI als ordinale Variable (1-6) und kardiale Biomarker als metrische Variable berücksichtigt. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) ist in Form von Fettdruck hervorgehoben. MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular event, RCRI: Revised cardiac risk index, hs-cTnT: hoch-sensitives kardiales Troponin T, NT-proBNP: N-terminales pro-brain natriuretisches Peptid, KI: Konfidenzintervall. Tabelle selbst erstellt nach Handke et al. 2020.

Prädiktionsmodell	AUC [95 % KI]	p-Wert
Presepsin (binär, >184 pg/ml)	0,63 [0,51; 0,75]	0,05
<i>Risikoprädiktion auf Basis des RCRI</i>		
RCRI	0,50 [0,39; 0,62]	0,954
<i>Risikoprädiktion auf Basis des RCRI in Kombination mit einem Biomarker</i>		
RCRI + hs-cTnT	0,64 [0,52; 0,77]	0,028
RCRI + NT-proBNP	0,57 [0,44; 0,70]	0,273
RCRI + Presepsin	0,63 [0,51; 0,75]	0,039
<i>Risikoprädiktion auf Basis des RCRI in Kombination mit zwei Biomarkern</i>		
RCRI + hs-cTnT + NT-proBNP (Referenzmodell)	0,62 [0,48; 0,75]	0,072
RCRI + hs-TnT + Presepsin	0,66 [0,55; 0,77]	0,012
RCRI + NT-proBNP + Presepsin	0,66 [0,54; 0,77]	0,015
<i>Referenzmodell plus Presepsin</i>		
RCRI + hs-cTnT + NT-proBNP + Presepsin	0,67 [0,56; 0,78]	0,009

Verglichen mit den Resultaten der Ursprungskohorte aus LeukoKAPE-1 (Tab. 4.3) erreichte PSEP als binäre Variable eine deutlich schwächere, entsprechend geringe Trennschärfe für den primären Endpunkt MACCE (AUC=0,63 [0,51; 0,75], $p=0,05$). Ähnlich gering erwies sich die diskriminative Fähigkeit des RCRI allein sowie in Kombination mit jeweils einem Biomarker. Die prognostische Güte des RCRI (AUC=0,50 [0,39; 0,62], $p=0,954$) erreichte durch Adjustierung mittels PSEP eine moderate (AUC=0,63 [0,51; 0,75], $p=0,039$) Trennschärfe, konnte jedoch nicht signifikant verbessert werden (Δ AUC=0,13 [-0,06; 0,32], $p=0,183$) (Abb. 4.13A). Das Referenzmodell aus RCRI, hs-cTnT und NT-proBNP wies mit einer AUC=0,62 [0,48; 0,75] ($p=0,072$) eine deutlich geringere diskriminative Fähigkeit im Vergleich zu den in LeukoKAPE-1 erzielten Werten auf. Diese konnte auch durch Einbezug von präoperativen PSEP (AUC=0,67 [0,56; 0,78], $p=0,009$) nicht signifikant verbessert werden (Δ AUC=0,05 [-0,08; 0,18], $p=0,438$) (Tab. 4.8; Abb. 4.13B).

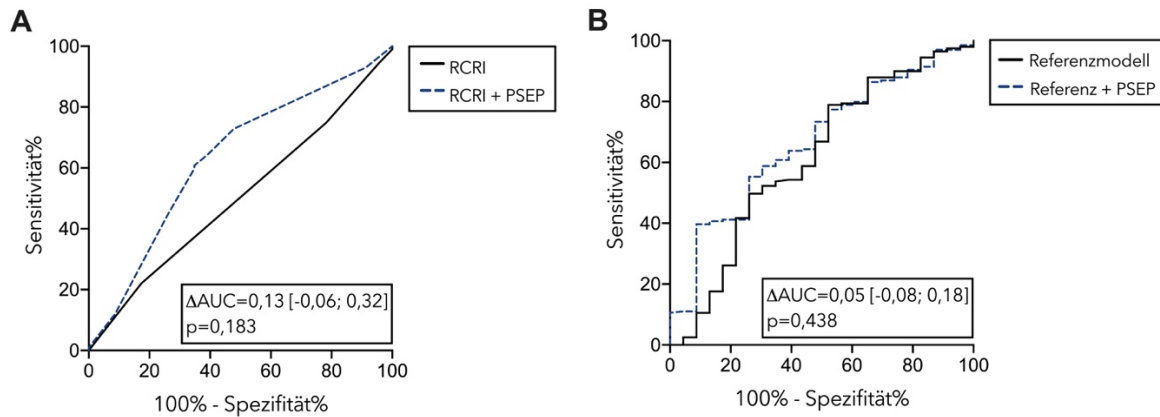


Abbildung 4.13. Vergleich von ROC-Kurven zur Validierung des inkrementellen Wertes von präoperativem Presepsin (PSEP) >184 pg/ml für die perioperative kardiovaskuläre Risikoprädiktion. Presepsin wurde in 222 nicht-kardiochirurgischen KHK-Patienten präoperativ quantifiziert und anhand des primären Endpunktes MACCE (n=23) versus kein MACCE (n=199) stratifiziert. Die Differenz zwischen ROC-Kurven von (A) RCRI versus RCRI plus PSEP und (B) Referenzmodell versus Referenzmodell plus PSEP wurde berechnet und mit Hilfe der DeLong-Methode statistisch bewertet. P<0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. RCRI: Revised Cardiac Risk Index, MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular event.

Die Ergebnisse der Reklassifizierungsanalysen waren indifferent. Die Berechnung des IDI legte eine signifikante Verbesserung der kardiovaskulären Risikoprädiktion auf Basis des Referenzmodells in Kombination mit präoperativen PSEP offen (IDI=0,02, p=0,022). Diese Verbesserung konnte anhand der NRI-Analyse auf die Reduktion falsch-positiv klassifizierter Patienten zurückgeführt werden (NRI_{kein MACCE}=0,13, p=0,004). In der MACCE-Gruppe wurden fünf Patienten durch die zusätzliche Einbeziehung von PSEP zum Referenzmodell korrekt reklassifiziert. Gleichzeitig wurden jedoch sieben Patienten einer niedrigeren Risikokategorie zugeordnet (NRI_{MACCE}=-0,09, p=0,564), sodass insgesamt kein additiver Nutzen von PSEP >184 pg/ml für die Prädiktion kardiovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen nachgewiesen werden konnte (NRI_{gesamt}=0,04, p=0,781) (Abb. 4.14).

Referenzmodell (RCRI, hs-cTnT, NT-proBNP)	Referenzmodell plus Presepsin (>184 pg/ml)				NRI	Gesamt- NRI	IDI
	<1%	≥1-10%	>10-20%	>20%			
MACCE-Patienten (n=23)							
<1%	0	0	0	0	-0,09 p=0,564	0,04	0,02
≥1-10%	0	1	5	0			
>10-20%	0	7	10	0			
>20%	0	0	0	0			
Patienten ohne MACCE (n=199)							
<1%	0	0	0	0	0,13 p=0,004	p=0,781	p=0,022
≥1-10%	0	66	27	0			
>10-20%	0	52	51	0			
>20%	0	1	0	2			

Abbildung 4.14. Net Reclassification Improvement (NRI)- und Integrated Discrimination Improvement (IDI)-Analyse zur Validierung des inkrementellen Wertes von präoperativem Presepsin (PSEP) >184 pg/ml für die Vorhersage von perioperativem MACCE. Patienten mit (n=23) und ohne MACCE (n=199) wurden anhand des Referenzmodells in vier Risikokategorien (<1 %, ≥1-10 %, >10-20 % und >20 %) eingeteilt (Zeilen). Es folgte die erneute Klassifizierung anhand des Referenzmodells und unter zusätzlicher Berücksichtigung präoperativer PSEP-Werte (Spalten). Korrekt reklassifizierte Patienten in blau; inkorrekt reklassifizierte Patienten in grau. MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular event, RCRI: Revised Cardiac Risk Index, hs-TnT: hoch-sensitives kardiales Troponin T, NT-proBNP: N-terminales pro-brain natriuretisches Peptid. Abbildung selbst erstellt nach Handke et al. 2020.

4.2.5 Post-hoc Poweranalyse

Zur Berechnung der Teststärke des Modells wurde eine *post-hoc* Poweranalyse durchgeführt. Unter Berücksichtigung der Fallzahl (n=222), dem Anteil der Patienten mit PSEP >184 pg/ml (43 %) sowie derer mit kardiovaskulären Ereignissen (10 %) erlaubte das Modell bei einem zugrunde gelegtem zweiseitigem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ einen Zusammenhang von $OR \geq 3$ mit einer Teststärke von $1-\beta=0,84$ mittels logistischer Regression nachzuweisen. Dabei stellte MACCE die abhängige, präoperatives PSEP >184 pg/ml die unabhängige Variable dar.

4.3 Tierexperimentelle Arbeiten

4.3.1 Perioperativer Stress-induzierter Anstieg regulatorischer T-Zellen in Blut und Thymus

Zur Untersuchung des Effektes perioperativen Stresses auf Treg-Level in Blut, lymphatischen Organen und atherosklerotischen Läsionen wurden ApoE^{-/-} Mäuse perioperativem Stress unterzogen (Arbeitsblock 1). Das Modell umfasste die Abnahme von 400 μ l Blut sowie die longitudinale Laparotomie in 30-minütiger Isofluran-Narkose. Sham-operierten Tieren wurden lediglich 100 μ l Blut entnommen. Blutabnahmen erfolgten vor Eröffnung des Bauchraumes und wurden zur präoperativen Treg-Bestimmung herangezogen. Die postoperative durchflusszytometrische Treg-Quantifizierung in Blut und lymphatischen Organen wurde zum Zeitpunkt der Organentnahme am dritten postoperativen Tag durchgeführt. Zudem wurde die Anzahl regulatorischer T-Zellen in atherosklerotischen Plaques der Brachiozephalarterien immunhistologisch bestimmt.

Zur Beurteilung des Gesamtzustandes der Tiere wurde das Körpergewicht vor Behandlungsstart sowie täglich bis zum Zeitpunkt der Organentnahme erfasst. Die Verteilung des Körpergewichtes unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht ($p=0,505$). Sowohl operierte (28,2 [26,4; 33,1] vs. 25,8 [24,0; 30,0] g für präoperativ vs. POD1, $p=0,042$) als auch Sham-operierte Tiere (27,3 [24,8; 29,3] vs. 26,0 [23,8; 28,1] g für präoperativ vs. POD1, $p=0,0004$) verloren 5-10 % ihres Körpergewichtes am ersten postoperativen Tag. Es ist anzunehmen, dass die beobachtete Abnahme auf den durch die Intervention induzierten physiologischen Stresszustand der Tiere sowie auf den für den Zeitraum der Intervention eingeschränkten Futter- und Trinkwasserzugang zurückzuführen ist. Operierte Tiere gelangten bis zum dritten postoperativen Tag zu ihrem Ausgangsgewicht zurück (27,2

[24,4; 29,6] g, $p=0,1325$). Sham-operierte Tiere wiesen bis zum Zeitpunkt der Finalisierung ein reduziertes Gewicht auf (25,4 [23,1; 27,7] g, $p=0,0417$), zeigten sich körperlich jedoch unbeeinträchtigt (Abb. 4.15A).

Aus früheren Arbeiten geht hervor, dass perioperativer Stress zu einer Zunahme des Plaquevolumens führt (Janssen et al. 2015). Diese Beobachtungen konnten anhand der untersuchten Tierzahl ($n=6$) nicht repliziert werden. Verglichen mit Sham-Kontrollen (13 [7,4; 58] $\times 10^{-3}$ mm³) wiesen operierte Tiere numerisch größere Plaquevolumina auf (38 [6,5; 82] $\times 10^{-3}$ mm³, $p=0,589$) (Abb. 4.15B). Eine ähnliche Tendenz konnte für die relative Stenose, verursacht durch Läsionen der Brachiozephalarterien, nachgewiesen werden (12 [7,2; 28] vs. 27 [8,5; 41] $\times 10^{-3}$ mm³ für Sham vs. OP, $p=0,394$) (Abb. 4.15C+D). Beide Vergleiche erreichten jedoch kein statistisches Signifikanzniveau ($p<0,05$).

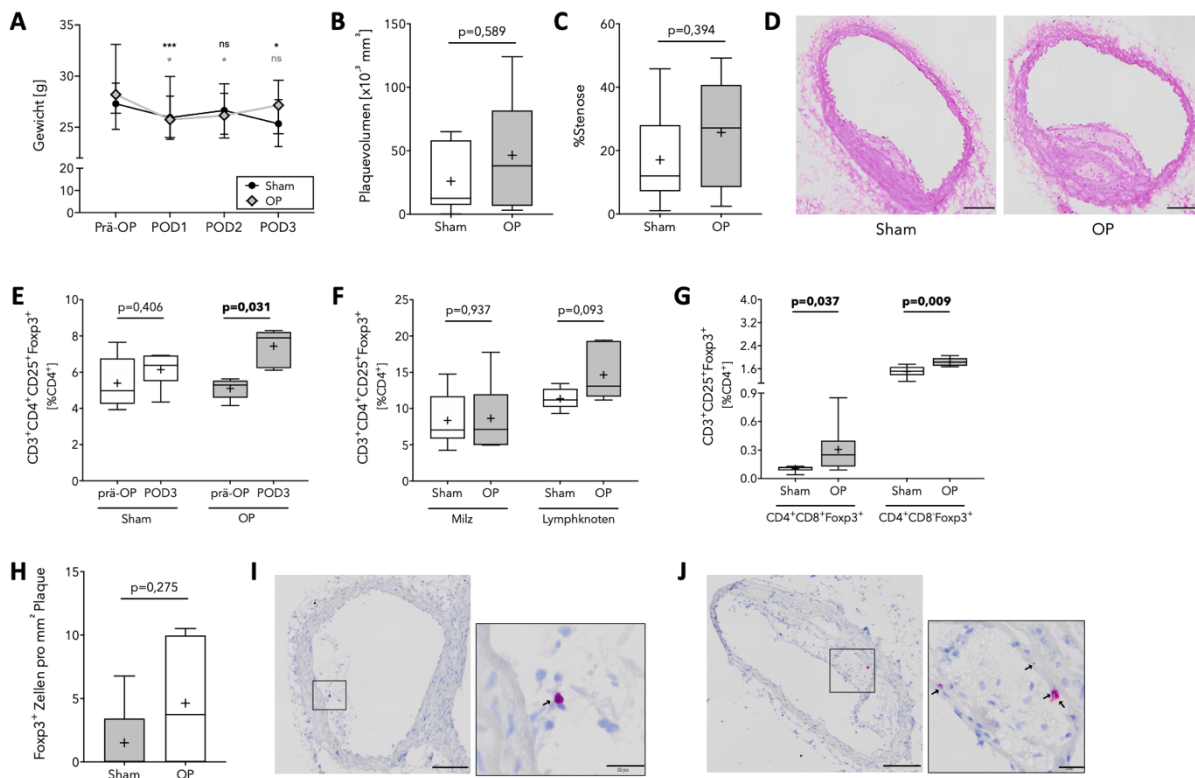


Abbildung 4.15. Effekt perioperativen Stresses auf Plaquegröße und regulatorische T-Zell-Level in atherosklerotischen ApoE^{-/-} Mäusen. Nach neunwöchiger cholesterinreicher Sonderdiät wurden atherosklerotische ApoE^{-/-} Mäuse in einem Alter von 17 Wochen dem perioperativen Stressmodell bzw. der Sham-Intervention unterzogen (je $n=6$). Die Entnahme lymphatischer Organe sowie der Brachiozephalarterien erfolgte am dritten postoperativen Tag. (A) Der Vergleich des Körpergewichtes beider Gruppen erfolgte mittels Varianzanalyse (2-Wege ANOVA; $p=0,505$). Anschließend wurden postoperative Werte dem präoperativen Ausgangswert mittels nicht-parametrischen Friedman-Test (Sham $p<0,0001$; OP $p=0,022$) und Dunn's *Post-hoc* Test (ns: nicht signifikant, * $p<0,05$, *** $p<0,001$) gegenübergestellt. (B) Postoperatives Plaquevolumen und (C) %Stenose von operierten und Sham-intervenierten Tieren. (D) Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Plaques mit repräsentativer %Stenose. (E) Prä- und postoperative Treg-Level im Blut wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für verbundene Stichproben verglichen. (F) Postoperative Treg-Level in peripheren lymphatischen Organen Milz, Lymphknoten und (G) Thymus, differenziert zwischen doppelt (CD4⁺CD8⁺) und einfach positiven (CD4⁺CD8⁻) CD25⁺Foxp3⁺ Tregs. (H) Immunhistologische Auswertung Plaque-residierender Foxp3⁺ Tregs pro mm² Plaquefläche. Repräsentative immunhistologische Foxp3-Färbungen für (I) Sham- und (J) OP-Tiere.

Gruppenvergleiche zwischen Sham und OP erfolgten mit Hilfe des zweiseitigen Mann-Whitney U-Tests. Statistische Signifikanz ist in Form von Fettdruck ($p < 0,05$) hervorgehoben. Messbalken in lichtmikroskopischen Übersichtsaufnahmen entsprechen 100 μm , in Detailaufnahmen 20 μm . OP: perioperatives Stressmodell, POD: postoperativer Tag.

Tregs wurden präoperativ und am dritten postoperativen Tag durchflusszytometrisch quantifiziert und in Form des relativen Anteils $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ Zellen an der Gesamt- CD4^+ -Population analysiert. Tiere der OP-Gruppe wiesen postoperativ erhöhte Treg-Level im Blut (5,3 [4,6; 5,5] vs. 7,9 [6,2; 8,2] % CD4^+ für prä-OP vs. POD3, $p=0,031$) (Abb. 4.14E), jedoch nicht in Milz (7,1 [5,8; 12] vs. 7,1 [5,0; 12] % CD4^+ für Sham vs. OP, $p=0,937$) und Lymphknoten (11 [10; 13] vs. 13 [12; 19] % CD4^+ für Sham vs. OP, $p=0,093$) auf (Abb. 4.15F). Im Thymus wurde zwischen doppelt ($\text{CD4}^+\text{CD8}^+$) und einfach positiven ($\text{CD4}^+\text{CD8}^-$) $\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ Zellen differenziert. Diese unterscheiden sich in der Expression der Co-Rezeptoren CD4 und CD8 und stellen verschiedene Entwicklungsstadien des Treg-Reifungsprozesses im Thymus dar (Caramalho et al. 2015). Operierte Tiere wiesen im Vergleich zu Sham-Kontrollen eine erhöhte Anzahl doppelt- (0,12 [0,09; 0,12] vs. 0,25 [0,13; 0,4] % CD4^+ für Sham vs. OP, $p=0,037$) und einfach-positiver Tregs (1,5 [1,4; 1,7] vs. 1,9 [1,7; 2,4] % CD4^+ für Sham vs. OP, $p=0,009$) auf (Abb. 4.15G). Perioperativer Stress führte zudem zu tendenziell höheren Treg-Werten im Plaque (0,0 [0,0; 0,4] vs. 3,7 [0,0; 10] $\text{Foxp3}^+/\text{mm}^2$ für Sham vs. OP, $p=0,275$), jedoch wurde kein statistisches Signifikanzniveau erzielt ($p < 0,05$) (Abb. 4.15H-J).

In atherosklerotischen $\text{ApoE}^{-/-}$ Mäusen führte perioperativer Stress zur Zunahme regulatorischer T-Zellen in Blut und Thymus. Tendenzuell höhere Treg-Level wurden auch in Lymphknoten und atherosklerotischen Läsionen beobachtet. Nach großen chirurgischen Eingriffen kommt es regelhaft zur Aktivierung des Immunsystems (Desborough 2000). Die perioperativ beobachtete Expansion regulatorischer T-Zellen stellt möglicherweise eine Schutzreaktion des Körpers gegen die inflammatorische Stressantwort dar.

4.3.2 Etablierung der *in vivo* Modulation regulatorischer T-Zell-Level

Um den Effekt präoperativer Treg-Level auf die perioperativ-bedingte Destabilisierung atherosklerotischer Plaques zu untersuchen, wurden $\text{ApoE}^{-/-}$ mit reduzierten bzw. erhöhten Treg-Leveln generiert (Arbeitsblock 2). Zur Treg-Modulation wurden atherosklerotische $\text{ApoE}^{-/-}$ Mäuse in einem Alter von 16 Wochen mit monoklonalen Antikörpern behandelt. Die Treg-Reduktion wurde mittels einmaliger Injektion von anti-CD25 (PC61) induziert; die Expansion durch tägliche Injektionen des Komplexes aus IL-2 und anti-IL-2 (JES-6-1A12) an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Kontrolltiere wurden analog mit den entsprechenden Isotypen IgG1 Ratte, IgG2 Ratte bzw. mit PBS behandelt.

4.3.2.1 Anti-CD25-induzierte Treg-Reduktion

Die Verteilung des Körpergewichts unterschied sich zwischen anti-CD25- und IgG1-behandelter Gruppe nicht ($p=0,507$). Weder die Injektion von IgG1 ($p=0,213$) noch von anti-CD25 ($p=0,110$) beeinflusste das Körpergewicht der Tiere (Abb. 4.16A). Zur Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Treg-Reduktion erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung der Zellen sechs, acht und zehn Tage nach Injektion in Blut sowie zehn Tage nach Injektion in den peripheren lymphatischen Organen Milz und Lymphknoten. Angaben entsprechen dem relativen Anteil $CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Zellen an der Gesamt- $CD4^+$ -Population, jeweils bezogen auf den Median der IgG1-Kontrollgruppe.

Verglichen mit IgG1-behandelten Kontrolltieren wiesen anti-CD25-injizierte Tiere sechs (5,7 [5,0; 6,4] vs. 2,5 [1,7; 3,4] % $CD4^+$ für IgG1 vs. anti-CD25) und zehn Tage (7,8 [6,2; 8,7] vs. 3,1 [2,3; 4,6] % $CD4^+$ für IgG1 vs. anti-CD25) nach Injektion knapp 60 % reduzierte Treg-Level im Blut auf. Die Treg-Reduktion erreichte acht Tage nach Injektion mit 35 % bezogen auf die IgG1-Kontrollgruppe ihren niedrigsten Wert (4,9 [4,4; 6,0] vs. 3,2 [2,4; 3,5] % $CD4^+$ für IgG1 vs. anti-CD25) (Abb. 4.16B). In Milz (9,6 [8,2; 11] vs. 7,4 [3,0; 9,9] % $CD4^+$ für IgG1 vs. anti-CD25) und Lymphknoten (13 [11; 17] vs. 7,6 [4,5; 9,0] % $CD4^+$ für IgG1 vs. anti-CD25) war die anti-CD25-induzierte Depletion mit knapp 25 bzw. 40 % weniger effektiv als im Blut (Abb. 4.16C).

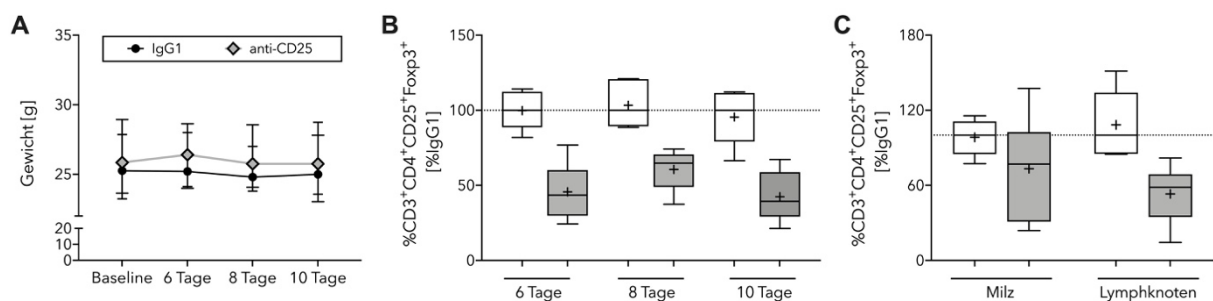


Abbildung 4.16. Etablierung der anti-CD25-induzierten Treg-Reduktion in atherosklerotischen ApoE^{-/-} Mäusen. Atherosklerotische ApoE^{-/-} Mäuse wurden mit IgG1 Ratte oder anti-CD25 (PC61) behandelt (je n=6). (A) Entwicklung des Körpergewichtes in Abhängigkeit der Treg-modulierenden Behandlung. Dargestellt ist das mediane Körpergewicht mit Interquartilbereich vor Beginn der Behandlung (Baseline) sowie über den Zeitraum der Blutentnahmen bis hin zur Finalisierung der Tiere. Der Verlauf des Körpergewichtes in Abhängigkeit der Behandlung wurde mittels Varianzanalyse (2-Wege ANOVA) bewertet ($p=0,507$). Treg-Level IgG1- (weiß) und anti-CD25-behandelter Tiere (grau) in (B) Blut und (C) peripheren lymphatischen Organen. Die Daten wurden auf den Median der jeweiligen IgG1-Kontrollgruppe normalisiert. IgG1: Immunglobulin G1, CD25: cluster of differentiation 25.

Um eine möglichst hohe Reduktion des peripheren Treg-Levels zum Zeitpunkt der OP sowie über den postoperativen Zeitraum sicherzustellen, erfolgte die Injektion des anti-CD25 Antikörpers im finalen Modell zur Untersuchung des Effektes reduzierter präoperativer Treg-Level auf die perioperative Plaquestabilisierung sechs Tage vor OP.

4.3.2.2 IL-2/anti-IL-2-induzierte Treg-Expansion

Alle drei Interventionsgruppen glichen sich hinsichtlich ihres Körpergewichtes zu Behandlungsbeginn sowie dessen Entwicklung über den zeitlichen Verlauf ($p=0,654$). Die tägliche Injektion von PBS ($p=0,512$), IL-2/IgG2 ($p=0,293$) und IL-2/anti-IL-2 ($p=0,048$) über einen Zeitraum von drei Tagen führte unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur ($\alpha<0,017$ (0,05/3)) in keiner der Gruppen zu einer Gewichtsveränderung der Tiere (Abb. 4.17A). Die durchflusszytometrische Quantifizierung von Tregs im Blut wurde drei, vier und fünf Tage nach erster Injektion durchgeführt; in Milz und Lymphknoten fünf Tage nach Behandlungsbeginn. Angaben entsprechen dem prozentualen Anteil $CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Zellen an der Gesamt- $CD4^+$ -Population, jeweils bezogen auf den Median der PBS-behandelten Gruppe.

Sowohl die Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 als auch mit IL-2/IgG2 führten über den gesamten Beobachtungszeitraum zu einer Erhöhung peripherer Treg-Level im Blut. IL-2/anti-IL-2-injizierte Tiere wiesen bereits am dritten Tag nach Injektionsbeginn etwa fünffach erhöhte Treg-Level auf (4,3 [3,3; 5,6] vs. 21 [17; 29] % $CD4^+$ für PBS vs. IL-2/anti-IL-2). Dieses Niveau blieb bis einschließlich des vierten Tages bestehen (4,2 [4,1; 5,1] vs. 28 [18; 34] % $CD4^+$ für PBS vs. IL-2/anti-IL-2), reduzierte sich am fünften Tag nach erster Injektion jedoch auf Faktor vier (5,4 [3,0; 6,3] vs. 21 [11; 29] % $CD4^+$ für PBS vs. IL-2/anti-IL-2). Verglichen mit PBS-Tieren, wiesen IL-2/IgG2-behandelte Tiere konstant geringfügig erhöhte Treg-Werte auf. Der Höchstwert von 55 % wurde vier Tage nach Interventionsbeginn gemessen (6,6 [5,6; 7,5] % $CD4^+$) (Abb. 4.17B). In den peripheren lymphatischen Organen erwies sich die Intervention weniger effektiv als im Blut, erreichte in IL-2/anti-IL-2 Tieren jedoch eine Anstieg um 300 % in Milz (7,1 [6,1; 8,4] vs. 21 [12; 26] % $CD4^+$ für PBS vs. IL-2/anti-IL-2) und 50 % in Lymphknoten (11 [11; 13] vs. 16 [13; 21] % $CD4^+$ für PBS vs. IL-2/anti-IL-2) gegenüber der PBS-Kontrolle. IL-2/IgG2-behandelte Tieren wiesen etwa 30 % erhöhte Tregs in der Milz (9,5 [7,4; 13] % $CD4^+$) auf; die Anzahl der Tregs in Lymphknoten (12 [10; 15] % $CD4^+$) glich jener PBS-behandelter Tiere (Abb. 4.17C).

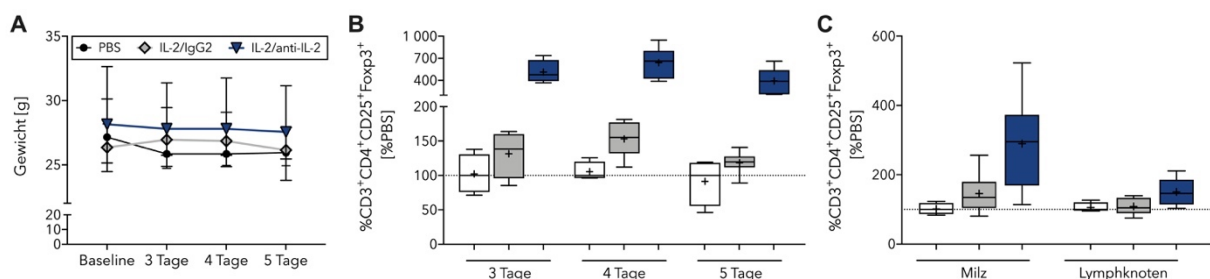


Abbildung 4.17. Etablierung IL-2/anti-IL-2 induzierte Treg-Expansion in atherosklerotischen ApoE^{-/-} Mäusen. Atherosklerotische ApoE^{-/-} Mäuse wurden mit PBS (n=4), IL-2/IgG2 (n=6) oder IL-2/anti-IL-2 (JES6-1A12) behandelt (n=6). (A) Entwicklung des Körpergewichtes in Abhängigkeit der Behandlung. Dargestellt ist das mediane Körpergewicht mit Interquartilbereich vor Beginn der Intervention (Baseline) sowie über den Zeitraum der Blutentnahmen bis hin zur Finalisierung der Tiere. Der Verlauf des Körpergewichtes in Abhängigkeit der Behandlung wurde mittels Varianzanalyse (2-Wege ANOVA) bewertet ($p=0,654$). Treg-Level in (B) Blut und (C) peripheren lymphatischen Organen in den Interventionsgruppen PBS (weiß), IL-2/IgG2 (grau) und IL-2/anti-IL-2

(grau). Die Daten wurden auf den Median der PBS-Gruppe normalisiert. PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, IL-2: Interleukin-2, IgG2: Immunglobulin G2.

Die Expansion peripherer Tregs erreichte vier Tage nach Interventionsbeginn ihren maximalen Wert, sank jedoch bereits am darauffolgenden Tag. Um hohe Treg-Level über einen möglichst langen Zeitraum während und nach der OP zu gewährleisten, begann die Injektion von IL-2/anti-IL-2 sowie entsprechender Kontrollen im finalen Modell zur Untersuchung des Effektes erhöhter präoperativer Treg-Level auf die perioperative Plaquedestabilisierung drei Tage vor OP.

4.3.2.3 *In vivo* Modulation regulatorischer T-Zellen erwies sich als Treg-spezifisch

Um zu überprüfen, ob die Antikörper-vermittelte Modulation regulatorischer T-Zell-Level Treg-spezifisch ist oder unspezifische Effekte auf weitere leukozytäre Zellen zeigt, wurden myeloische und lymphoide Immunzellpopulationen anhand charakteristischer Differenzierungsmarker durchflusszytometrisch analysiert. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte aus präoperativ gewonnenen Blutproben operierter Tiere aus Arbeitsblock 3. Angaben entsprechen dem relativen Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der Gesamt-Leukozytenzahl, gekennzeichnet durch CD45-Expression. Treg-Daten entsprechen den Ergebnissen aus Abb. 4.16B und 4.17B und wurden in Form ihres prozentualen Anteils an der CD4⁺ Zellpopulation ausgewertet.

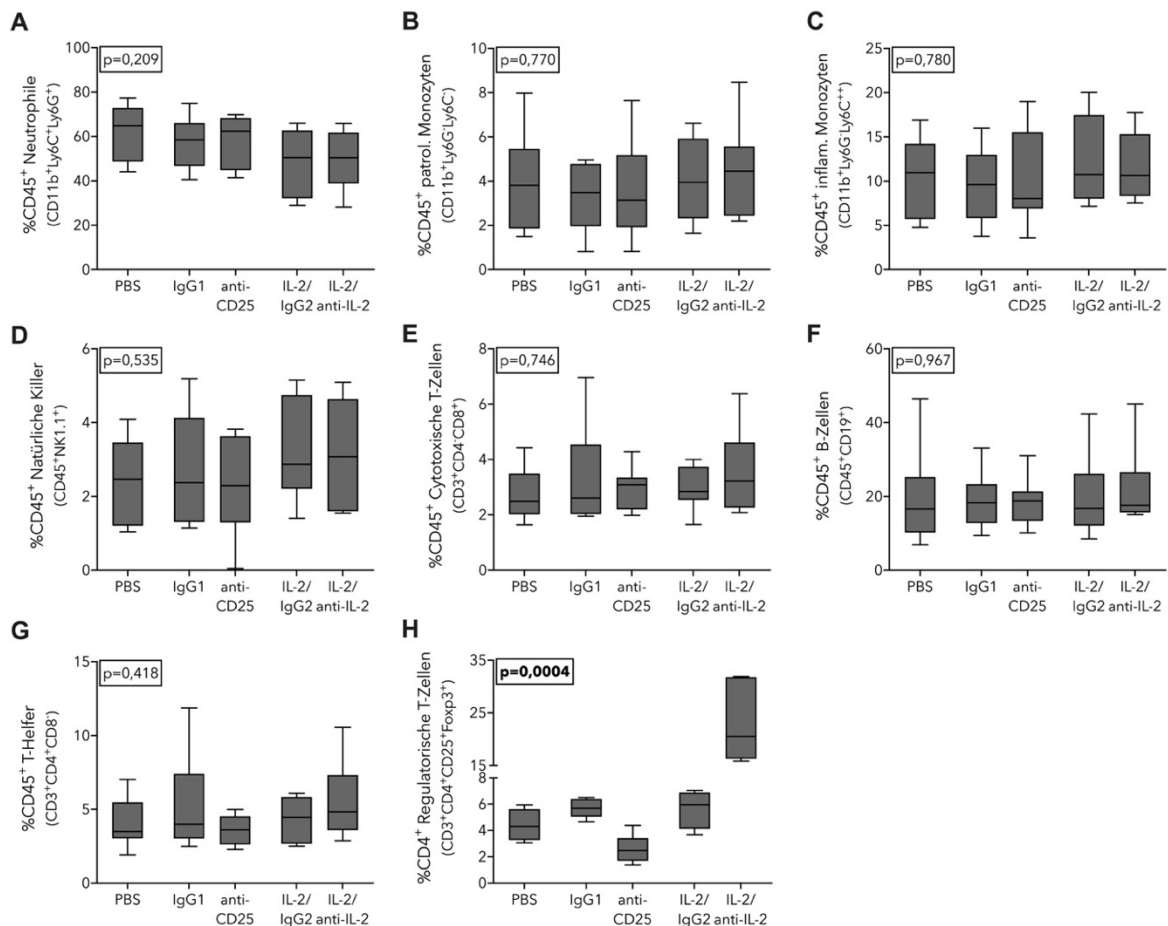


Abbildung 4.18. Quantifizierung muriner Leukozyten-Subpopulationen in Abhängigkeit der Treg-modulierenden Behandlung. Myeloide und lymphoide Immunzellpopulationen wurden aus präoperativ gewonnenen Blutproben atherosklerotischer ApoE^{-/-} Mäuse der unterschiedlichen Interventionsgruppen (je n=8) durchflusszytometrisch anhand charakteristischer Differenzierungsmarker quantifiziert. Gruppenvergleiche erfolgten mittels Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben. P-Werte <0,006 ($\alpha < 0,05/8$) wurden als statistisch signifikant bewertet und sind in Form von Fettdruck hervorgehoben. Angaben entsprechen dem Anteil der jeweiligen Immunzellpopulation an der Gesamt-CD45⁺-Population (A-G). Tregs wurden anteilig der CD4⁺-Zellpopulation ausgewertet (H). (A) Neutrophile, (B) patrouillierende und (C) inflammatorische Monozyten, (D) natürliche Killer-Zellen, (E) cytotoxische T-Zellen, (F) B-Zellen, (G) T-Helfer-Zellen und (H) regulatorische T-Zellen. IgG: Immunglobulin G, CD: cluster of differentiation 25, PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, IL-2: Interleukin-2.

Die Antikörper- bzw. Antikörper-Zytokin-Komplex-induzierte Modulation regulatorischer T-Zell-Level erwies sich als Treg-spezifisch. Die Interventionsgruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich ihres prozentualen Anteils an Neutrophilen ($p=0,209$), patrouillierenden ($p=0,770$) und inflammatorischen Monozyten ($p=0,780$), NK-Zellen ($p=0,535$), cytotoxischen T-Zellen ($p=0,746$), B-Zellen ($p=0,967$) und TH-Lymphozyten ($p=0,418$) (Abb. 4.18A-G). Einzig die relative Anzahl regulatorischer T-Zellen an der CD4⁺-Population unterschied sich zwischen den Interventionsgruppen ($p=0,0004$) (Abb. 4.18H).

4.3.3 Histomorphometrische Beurteilung postoperativer atherosklerotischer Plaques in Abhängigkeit des präoperativen Treg-Levels

Zur Untersuchung des Effektes präoperativer Treg-Level auf die durch perioperativen Stress bedingte Destabilisierung atherosklerotischer Plaques wurden atherosklerotische ApoE^{-/-} mit reduziertem bzw. erhöhtem Treg-Level dem perioperativen Stressmodell unterzogen. Als Kontrolle dienten Sham-operierte Tiere die lediglich narkotisiert wurden, jedoch ebenfalls modulierte Treg-Level aufwiesen. Um den Effekt perioperativen Stresses auf die postoperative Plaquestabilität unabhängig des präoperativen Treg-Levels zu kontrollieren, wurden PBS-behandelte Tiere sowohl der Sham-Intervention als auch dem perioperativen Stressmodell unterzogen. Ergänzend dazu wurden Isotyp-behandelte Tiere der Sham-Intervention unterzogen, um einen Effekt der monoklonalen Antikörper-Injektionen auf das Plaquevolumen *per se* ausschließen zu können.

Der operative Eingriff wirkte sich in allen drei Interventionsgruppen unabhängig der Treg-modulierenden Behandlung identisch auf den perioperativen Gewichtsverlauf der Tiere aus. Statistisch konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden ($p=0,707$). Im Schnitt verloren die Tiere während des Eingriffes 1,4 [0,7; 2,2] g gemessen am ersten postoperativen Tag (Abb. 4.19).

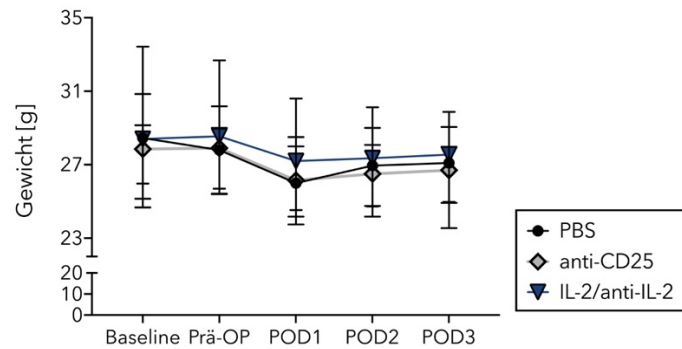


Abbildung 4.19. Gewichtsverlauf der OP-Interventionsgruppen in Abhängigkeit der Treg-modulierenden Behandlung. Dargestellt ist das Körpergewicht der Tiere vor Induktion der Treg-Modulation (Baseline), präoperativ am Tag der OP (prä-OP) sowie täglich bis zum dritten postoperativen Tag (POD) in Abhängigkeit der Intervention PBS, anti-CD25 und IL-2/anti-IL-2 (je n=8). Der Verlauf des Körpergewichtes in Abhängigkeit der Intervention wurde mittels Varianzanalyse (2-Wege ANOVA) bewertet ($p=0,707$). PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, CD25: cluster of differentiation 25, IL-2: Interleukin-2.

Zielgrößen bildeten das postoperative Plaquevolumen, die relative Stenose sowie eine Reihe unterschiedlicher Stabilitätsmerkmale von Plaques der Brachiozephalarterien. Diese umfassten die Quantifizierung des nekrotischen Areals, des Kollagengehaltes, SMCs, verdeckter fibröser Kappen als Zeichen vergangener Plaquerupturen sowie von Lipidablagerungen und Zellularität. Schnittebenen mit einer relativen Stenose $<10\%$ wurden in der Auswertung der Plaquestabilitätsmerkmale nicht berücksichtigt, da es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um morphologisch nicht beurteilbare, frühstadiale Schaumzellakkumulationen handelte. In vier Tieren lag die maximale Stenose unterhalb 10% , was den Ausschluss dieser aus der morphometrischen Analyse zur Folge hatte.

4.3.3.1 Zunahme des nekrotischen Areals durch perioperativen Stress bei präoperativ reduziertem Treg-Level

Die Entstehung eines nekrotischen Kerns durch Akkumulation von Lipiden und Zelldetritus bildet ein morphologisches Charakteristikum fortgeschrittener, vulnerabler atherosklerotischer Läsionen (Lusis 2000). Zur morphologischen Beurteilung des nekrotischen Areals, definiert als Fläche unterhalb der fibrösen Kappe mit vollständigem Verlust intakter Zellen und extrazellulärer Matrix, wurden HE- und Masson-Goldner Trichrome-gefärbte Schnittpräparate herangezogen (Tano et al. 2013). Die Berechnung nekrotischer Flächen anteilig der Gesamt-Plaquefläche erfolgte anhand der Trichrome-Färbungen.

In PBS-behandelten Tieren führte perioperativer Stress zur Zunahme des %nekrotischen Areals verglichen mit Tieren, die der Sham-Intervention unterzogen wurden ($0,0 [0,0; 4,6]$ vs. $11 [5,2; 14]$ %Nekrose für Sham vs. OP, $p=0,014$). Plaques anti-CD25-behandelter, operierter Tiere wiesen gegenüber denen Sham-operierter Tiere einen gleichermaßen höheren Nekroseanteil auf ($1,9 [0,2; 5,2]$ vs. $10 [5,4; 15]$ %Nekrose für Sham vs. OP, $p=0,008$). In IL-2/anti-IL-2-behandelten Tieren mit

erhöhtem präoperativen Treg-Level ließ sich hingegen kein Effekt perioperativen Stresses auf die Bildung nekrotischen Areals nachweisen (4,8 [1,8; 8,3] vs. 5,0 [0,5; 6,8] %Nekrose für Sham vs. OP, $p=0,850$) (Abb. 4.20A). Zudem wiesen Plaques der Tiere mit präoperativ hohem Treg-Level, verglichen mit jenen anti-CD25-behandelter Tiere, einen niedrigeren Nekrosegehalt auf ($p=0,041$). Unter Berücksichtigung der PBS-Gruppe konnte jedoch kein Effekt des präoperativen Treg-Level auf den postoperativen Nekroseanteil atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden ($p=0,052$) (Abb. 4.20B, Tab. 4.9)).

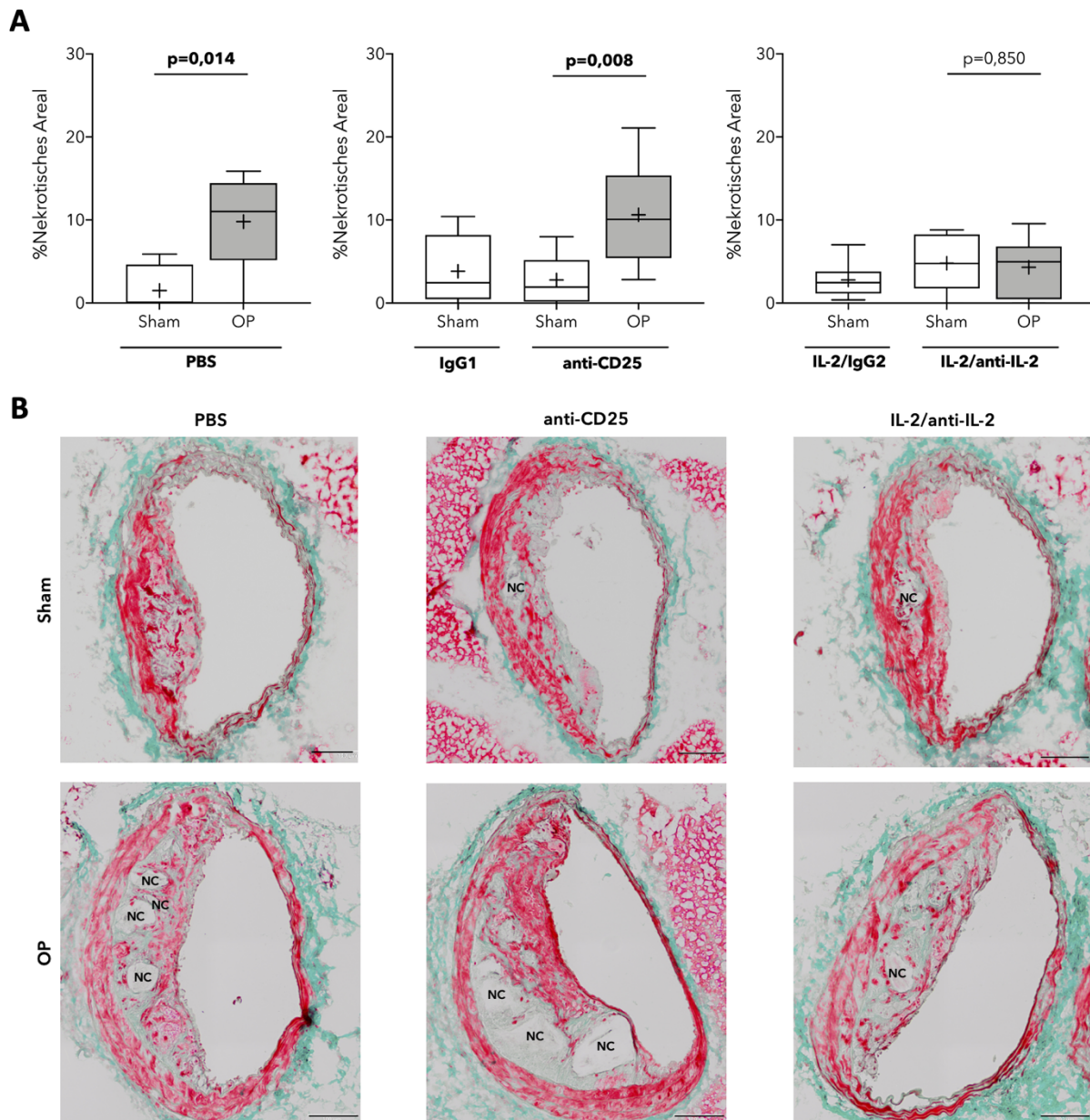


Abbildung 4.20. Effekt perioperativen Stresses auf Nekroseanteil atherosklerotischer Plaques in Abhängigkeit des präoperativen Treg-Level. Dargestellt ist die Fläche des nekrotischen Areals anteilig der Gesamt-Plaquerfläche. Schnittebenen mit Stenose <10% sowie mittels ROUT-Methode identifizierte Ausreißer wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Gruppengrößen reduzierten sich entsprechend auf $n=6-8$. Der statistische Vergleich von Sham- (weiß) und OP-Tieren (grau) erfolgte mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test ($p<0,05$). (A) postoperative %Nekrose, (B) Masson-Goldner Trichrome-gefärbte Plaques der Sham- bzw.

OP-Interventionsgruppen mit repräsentativem Nekroseanteil (NC); Messbalken entsprechen 100 µm. PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, Ig: Immunglobulin, CD25: cluster of differentiation 25, IL-2: Interleukin-2.

Tabelle 4.9. Statistischer Vergleich der OP-Interventionsgruppen hinsichtlich des postoperativen nekrotischen Plaqueareals in Abhängigkeit präoperativer Treg-Level. Der Vergleich zweier OP-Interventionsgruppen wurde mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test durchgeführt; der der OP-Gruppen untereinander mittels Kruskal-Wallis Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

PBS (n=6)	anti-CD25 (n=6)	IL-2/anti-IL-2 (n=8)	p PBS vs. anti- CD25	p PBS vs. IL-2/anti-IL-2	p anti-CD25 vs. IL-2/anti-IL-2
11 [5,2; 14]	10 [5,4; 15]	5,0 [0,5; 6,8]	0,937	0,059	0,041
Kruskal-Wallis-Test $p=0,052$					

4.3.3.2 Abnahme des Kollagengehaltes atherosklerotischer Plaques durch perioperativen Stress

Kollagen verleiht atherosklerotischen Läsionen Stabilität und Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherkräften und Rupturen (Rekhter 2002). Tregs können den Kollagengehalt indirekt durch Aktivierung der Kollagensynthese in SMCs sowie durch Inhibierung des Kollagenabbaus beeinflussen (Grainger David 2004; Maganto-Garcia et al. 2011).

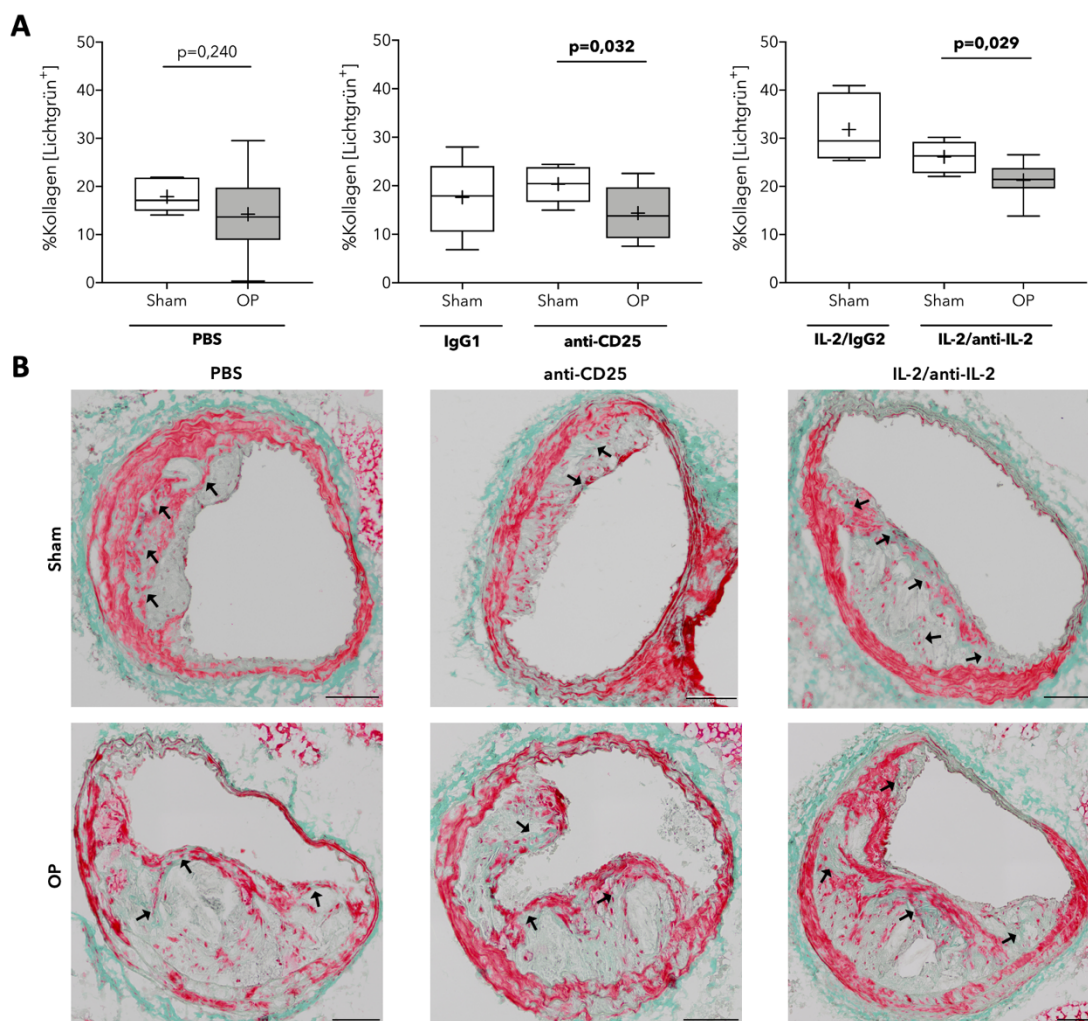


Abbildung 4.21. Masson-Goldner Trichrome-Färbung zur Analyse des Kollagengehaltes atherosklerotischer Plaques nach perioperativem Stress und in Abhängigkeit des präoperativen Treg-Levels. Plaque-Kollagengehalt entspricht Lichtgrün-positiver Fläche anteilig der Gesamt-Plaquesfläche. Schnittebenen mit Stenose <10 % sowie mittels ROUT-Methode identifizierte Ausreißer wurden aus der Analyse ausgeschlossen; Gruppengrößen reduzierten sich entsprechend auf n=6-8. Der statistische Vergleich von Sham- (weiß) und OP-Tieren (grau) erfolgte mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test ($p < 0,05$). (A) Postoperativer Kollagengehalt, (B) Masson-Goldner Trichrome-gefärbte Plaques Sham-intervenierter bzw. operierter Tiere mit repräsentativem %Kollagen (Pfeile); Messbalken entsprechen 100 μm . PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, Ig: Immunglobulin, CD25: cluster of differentiation 25, IL-2: Interleukin-2.

Perioperativer Stress führte in anti-CD25-behandelten Tieren mit präoperativ niedrigem Treg-Level zu einer Reduktion des Plaque-Kollagengehaltes um etwa 30 % verglichen mit der Sham-Interventionsgruppe (20 [17; 24] vs. 14 [9; 20] %Kollagen für Sham vs. OP, $p = 0,032$). In Tieren mit präoperativ hohem Treg-Level (IL-2/anti-IL-2) führte perioperativer Stress ebenfalls zu einer Abnahme des Kollagengehaltes um knapp 20 % (26 [23; 30] vs. 21 [20; 24] %Kollagen für Sham vs. OP, $p = 0,029$). PBS-behandelte Tiere tendierten gleichermaßen zur Abnahme des Plaque-Kollagengehaltes nach OP (17 [15; 22] vs. 14 [9; 20] %Kollagen für Sham vs. OP, $p = 0,240$) (Abb. 4.21A+B), erreichten jedoch kein statistisches Signifikanzniveau ($p < 0,05$). Verglich man die OP-Interventionsgruppen untereinander, wiesen IL-2/anti-IL-2-behandelte Tiere gegenüber anti-CD25-behandelten Tieren einen höheren Kollagengehalt atherosklerotischer Plaques auf ($p = 0,029$). Unter Berücksichtigung der PBS-Gruppe konnte jedoch kein Effekt des präoperativen Treg-Levels auf den postoperative Plaque-Kollagengehalt nachgewiesen werden ($p = 0,051$) (Tab. 4.10).

Tabelle 4.10. Statistischer Vergleich der OP-Interventionsgruppen hinsichtlich des postoperativen Plaque-Kollagengehaltes in Abhängigkeit präoperativer Treg-Level. Der Vergleich zweier OP-Interventionsgruppen wurde mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test durchgeführt; der der OP-Gruppen untereinander mittels Kruskal-Wallis Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

PBS (n=6)	anti-CD25 (n=6)	IL-2/anti-IL-2 (n=8)	p PBS vs. anti- CD25	p PBS vs. IL-2/anti-IL-2	p anti-CD25 vs. IL-2/anti-IL-2
14 [8,9; 20]	14 [9,2; 20]	21 [20; 24]	>0,999	0,081	0,029
Kruskal-Wallis-Test $p = 0,051$					

4.3.3.3 Effekt perioperativen Stresses auf α -SMCs und Anzahl verdeckter fibröser Kappen bei präoperativ moduliertem Treg-Level

Um zu untersuchen, ob der erhöhte Plaque-Kollagengehalt in Tieren mit präoperativ hohem Treg-Level auf die Zunahme Kollagen-sezernierender und Plaque-stabilisierender SMCs zurückzuführen ist, wurden α -SMCs mittels Immunfluoreszenz-Färbung detektiert. Anhand dieser wurde zudem die Anzahl verdeckter fibröser Kappen als Zeichen vergangener Plaquerupturen bestimmt.

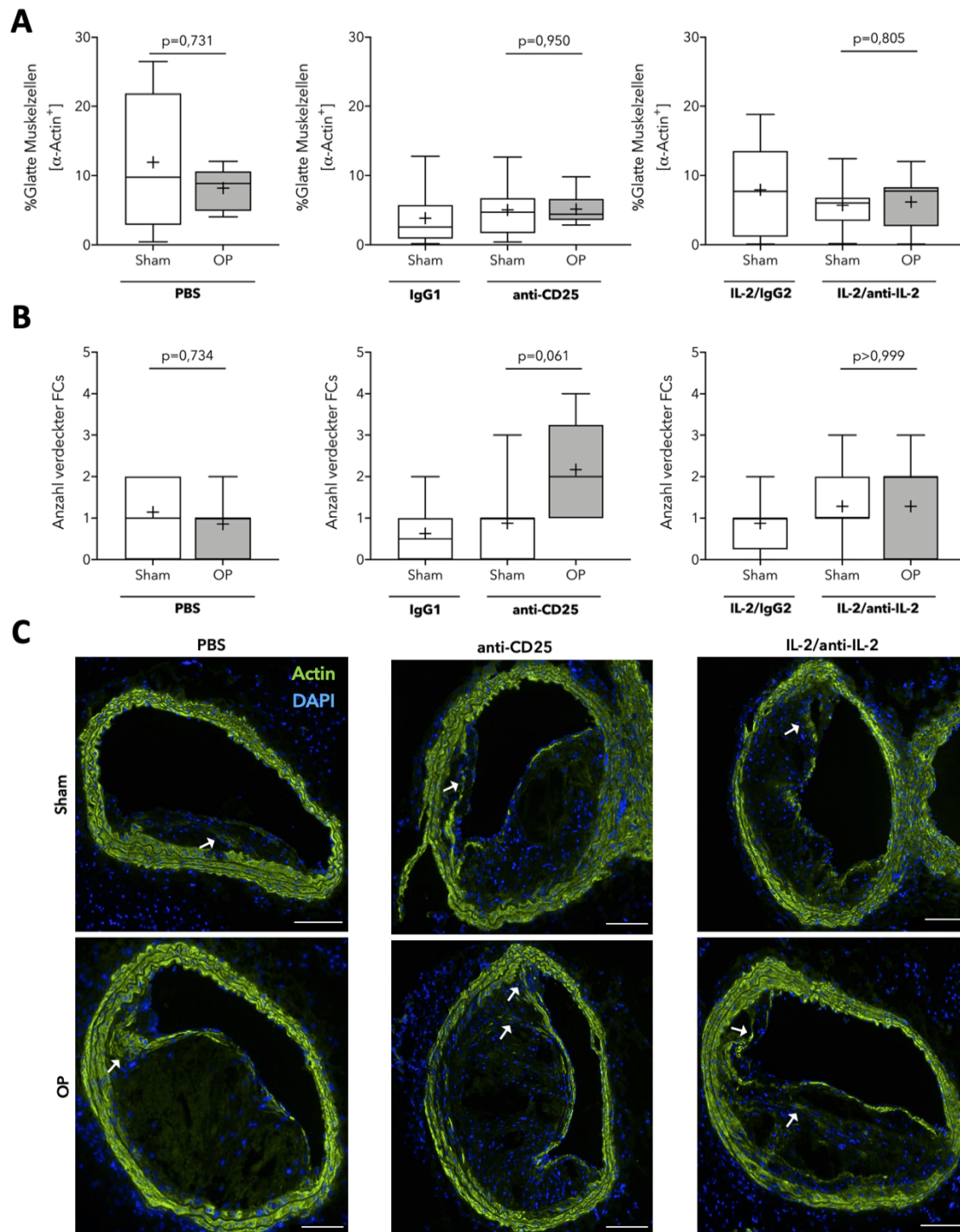


Abbildung 4 22. Effekt perioperativen Stresses auf den Gehalt glatter Muskelzellen und verdeckter fibröser Kappen in atherosklerotischen Plaques in Abhängigkeit des präoperativen Treg-Levels. Glatte Muskelzellen entsprechen Alexa488-positiver Fläche anteilig der Gesamt-Plauefläche. Schnittebenen mit Stenose <10% sowie mittels ROUT-Methode identifizierte Ausreißer wurden aus der Analyse ausgeschlossen; Gruppengrößen reduzierten sich entsprechend auf n=6-8. Der statistische Vergleich von Sham- (weiß) und OP-Tieren (grau) erfolgte mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test ($p < 0,05$). (A) Postoperativer Anteil glatter Muskelzellen an Plauefläche, (B) Anzahl verdeckter fibröser Kappen (FCs), (C) anti-Actin-immunfluoreszenzgefärbte Plaques Sham-intervenierter bzw. operierter Tiere mit repräsentativer Anzahl verdeckter fibröser Kappen (Pfeile); Messbalken entsprechen 100 μ m. PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, Ig: Immunglobulin, CD25: cluster of differentiation 25, IL-2: Interleukin-2.

Unabhängig des präoperativen Treg-Levels führte perioperativer Stress in keiner der Behandlungsgruppen zu einer Veränderung des relativen SMC-Anteils an der Gesamt-Plaquerfläche (PBS: $p=0,731$, anti-CD25: $p=0,950$, anti-IL-2: $p=0,805$) (Abb. 4.22A). Auch zwischen den OP-Interventionsgruppen konnte kein Unterschied im postoperativen SMC-Gehalt nachgewiesen werden ($p=0,307$) (Tab. 4.11).

In Tieren mit präoperativ reduziertem Treg-Level (anti-CD25) führte perioperativer Stress numerisch zu einer Verdopplung der Anzahl verdeckter fibröser Kappen (1 [0; 1] vs. 2 [1;3] für Sham vs. OP), verfehlte mit $p=0,061$ jedoch das statistische Signifikanzniveau von $\alpha<0,05$. Dieser Effekt wurde in PBS- ($p=0,734$) und IL-2/anti-IL-2-behandelten Tieren ($p>0,999$) nicht beobachtet. Postoperativ wiesen Plaques anti-CD25-behandelter Tiere verglichen mit der PBS-Interventionsgruppe eine tendenziell höhere Anzahl verdeckter fibröser Kappen auf ($p=0,053$). Jedoch konnte unter Einbezug IL-2/anti-IL-2-behandelter Tiere zwischen den OP-Interventionsgruppen kein Unterschied in der Anzahl verdeckter fibröser Kappen nachgewiesen werden (Tab. 4.11).

Tabelle 4.11. Statistischer Vergleich der OP-Interventionsgruppen hinsichtlich des postoperativen relativen Anteils glatter Muskelzellen (SMCs) an der Gesamt-Plaquerfläche und der Anzahl verdeckter fibröser Kappen (FCs) in Abhängigkeit des präoperativen Treg-Levels. Der Vergleich zweier OP-Interventionsgruppen wurde mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test durchgeführt; der der OP-Gruppen untereinander mittels Kruskal-Wallis Test (Signifikanzniveau $p<0,05$).

	PBS (n=6)	anti-CD25 (n=6)	IL-2/ anti-IL-2 (n=7)	p PBS vs. anti-CD25	p PBS vs. IL-2/anti-IL-2	p anti-CD25 vs. IL-2/anti-IL-2
%SMC [Alexa488- positives Areal]	8,9 [4,9; 11]	4,4 [3,6; 6,6]	7,8 [2,1; 8,3]	0,093	0,445	0,836
					Kruskal-Wallis-Test $p=0,307$	
Anzahl verdeckter FCs	1 [0; 1]	2 [1; 3]	2 [0; 2]	0,053	0,604	0,302
					Kruskal-Wallis-Test $p=0,204$	

4.3.3.4 Kein Effekt perioperativen Stresses auf Lipidgehalt und Zellularität atherosklerotischer Plaques unabhängig präoperativer Treg-Level

Ein hoher Lipidgehalt sowie geringe Zellularität kennzeichnen instabile atherosklerotische Läsionen (Rekhter 2002; Seimon und Tabas 2009). Tregs sind in der Lage die Schaumzellbildung und -apoptose zu supprimieren und infolgedessen die Zellularität zu steigern (Lin et al. 2010). Zudem führt der adoptive Transfer von Tregs zur dosisabhängigen Senkung von Lipidablagerungen in atherosklerotischen Plaques (Meng et al. 2013).

In allen drei Interventionsgruppen konnte unabhängig des präoperativen Treg-Levels kein Unterschied im Lipidgehalt (PBS: $p=0,240$; anti-CD25: $p=0,491$; anti-IL-2: $p=0,867$; Abb. 4.23A) oder der Zellularität (PBS: $p=0,699$; anti-CD25: $p=0,142$; anti-IL-2: $p=0,463$; Abb. 4.23B) zwischen operierten und Sham-intervenierten Tieren gezeigt werden. Zudem unterschieden sich die OP-

Interventionsgruppen untereinander hinsichtlich ihres postoperativen Lipidgehaltes ($p=0,226$) und der Zellularität ($p=0,140$) atherosklerotischer Plaques nicht (Abb. 4.23C, Tab. 4.12). Es konnte kein Effekt des präoperativen Treg-Levels nachgewiesen werden.

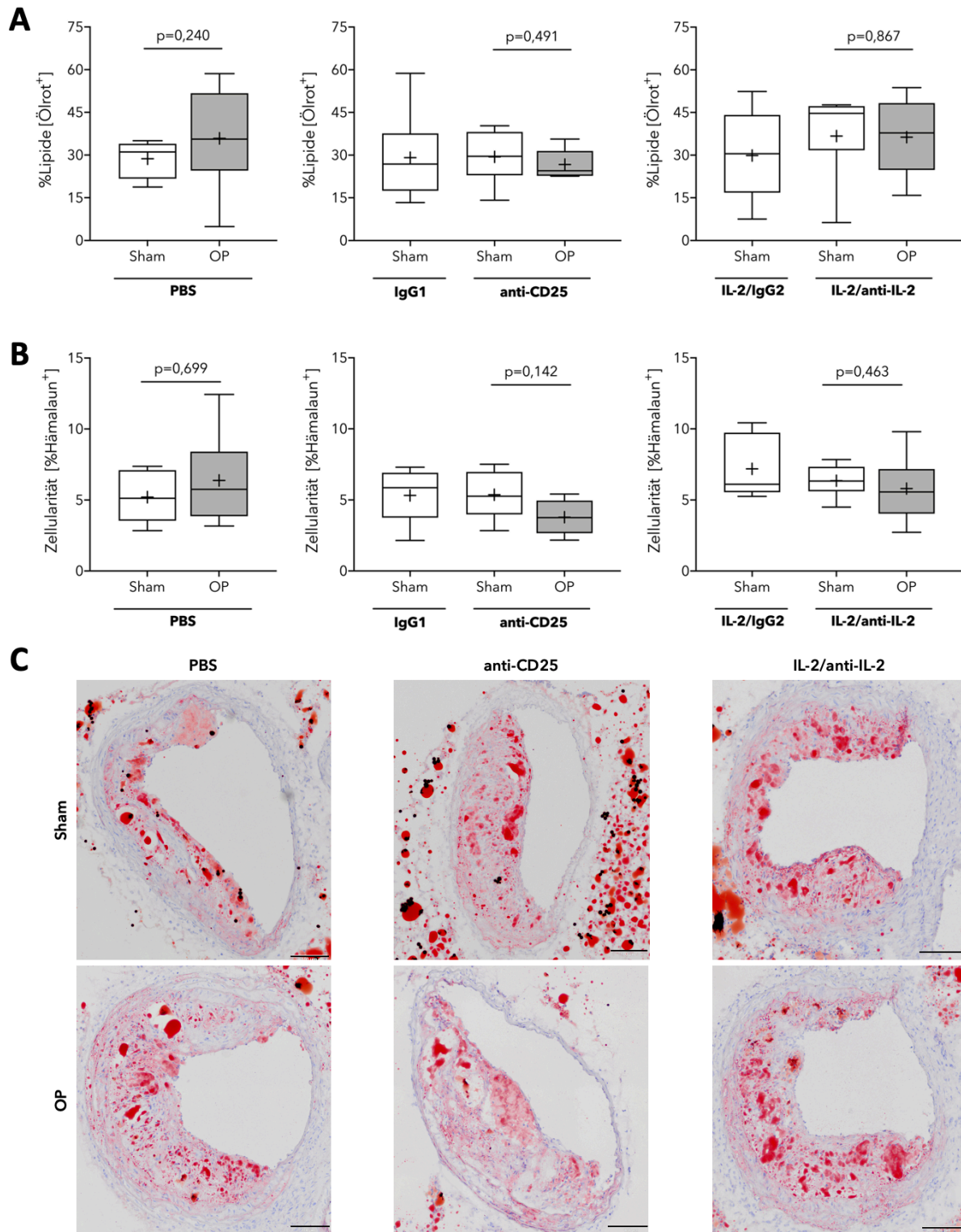


Abbildung 4.23. Ölrot-Färbung zur Analyse von Lipidgehalt und Zellularität atherosklerotischer Plaques nach perioperativem Stress und in Abhängigkeit des präoperativen Treg-Levels. Lipidgehalt entspricht Ölrot-positiver Fläche, Zellularität der Hämalaun-positiven Fläche jeweils anteilig der Gesamt-Plaquerfläche. Schnittebenen mit Stenose <10% wurde in der Analyse nicht berücksichtigt; Gruppengrößen reduzierten sich

entsprechend auf n=6-8. Der Vergleich zwischen operierten (grau) und Sham-operierten (weiß) Tieren erfolgte mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$). (A) Postoperativer Lipidgehalt, (B) postoperative Zellularität, (C) Ölrot-gefärbte Plaques der Sham- bzw. OP-Interventionsgruppen mit repräsentativem %Lipidgehalt; Messbalken entsprechen 100 μm . PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, Ig: Immunglobulin, CD25: cluster of differentiation 25, IL-2: Interleukin-2.

Tabelle 4.12. Statistischer Vergleich der OP-Interventionsgruppen hinsichtlich des postoperativen Plaque-Lipidgehaltes und der Zellularität in Abhängigkeit präoperativer Treg-Level. Der Vergleich zweier OP-Interventionsgruppen wurde mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test durchgeführt; der der OP-Gruppen untereinander mittels Kruskal-Wallis Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

	PBS (n=6)	anti-CD25 (n=6)	IL-2/ anti-IL-2 (n=8)	p PBS vs. anti-CD25	p PBS vs. IL-2/anti-IL-2	p anti-CD25 vs. IL-2/anti-IL-2
<i>%Lipide</i>	36 [25; 52]	25 [23; 31]	38 [25; 48]	0,132	0,949	0,181
					Kruskal-Wallis-Test $p=0,226$	
<i>Zellularität</i> [%Hämalaun- positives Areal]	5,8 [3,9; 8,4]	3,8 [2,7; 5,0]	5,6 [4,0; 7,2]	0,093	0,950	0,108
					Kruskal-Wallis-Test $p=0,140$	

4.3.3.5 Kein Effekt perioperativen Stresses auf postoperatives Plaquevolumen unabhängig präoperativer Treg-Level

Durch Laparotomie und Blutentnahme induzierter perioperativer Stress führte unabhängig der Treg-modulierenden Behandlung zu keiner Veränderung des postoperativen Plaquevolumens verglichen mit der jeweiligen Sham-Interventionsgruppe. In PBS-behandelten Tieren führte die OP zu numerisch kleineren Plaquevolumina (50 [7,9; 88] vs. 20 [3,6; 76] $\times 10^{-3}$ mm^3 für Sham vs. OP, $p=0,574$). Operierte und Sham-operierte Tieren mit präoperativ reduziertem (anti-CD25, 51 [20; 115] vs. 40 [4,8; 63] $\times 10^{-3}$ mm^3 für Sham vs. OP, $p=0,328$) bzw. erhöhtem Treg-Level (IL-2/anti-IL-2, 18 [3,9; 46] vs. 30 [12; 35] $\times 10^{-3}$ mm^3 Sham vs. OP, $p=0,613$) wiesen vergleichbare postoperative Plaquevolumina auf (Abb. 4.24A). Der Vergleich der OP-Interventionsgruppen untereinander zeigte keinen Unterschied zwischen postoperativen Plaquevolumina in Abhängigkeit des präoperativen Treg-Levels ($p=0,980$). Ähnliche Effekte wurden für die prozentuale Stenose, definiert als relativer Anteil der Plaquefläche am Gesamtlumen, beobachtet. In allen drei Interventionsgruppen glichen sich Sham- und OP-Tiere im Ausmaß ihrer postoperativen %Stenose (PBS: $p=0,536$; anti-CD25: $p=0,505$; IL-2/anti-IL2: $p=0,382$). Zwischen den OP-Gruppen konnte ungeachtet des präoperativen Treg-Levels kein Unterschied in der %Stenose nachgewiesen werden ($p=0,852$) (Abb. 4.24B+C, Tab. 4.13).

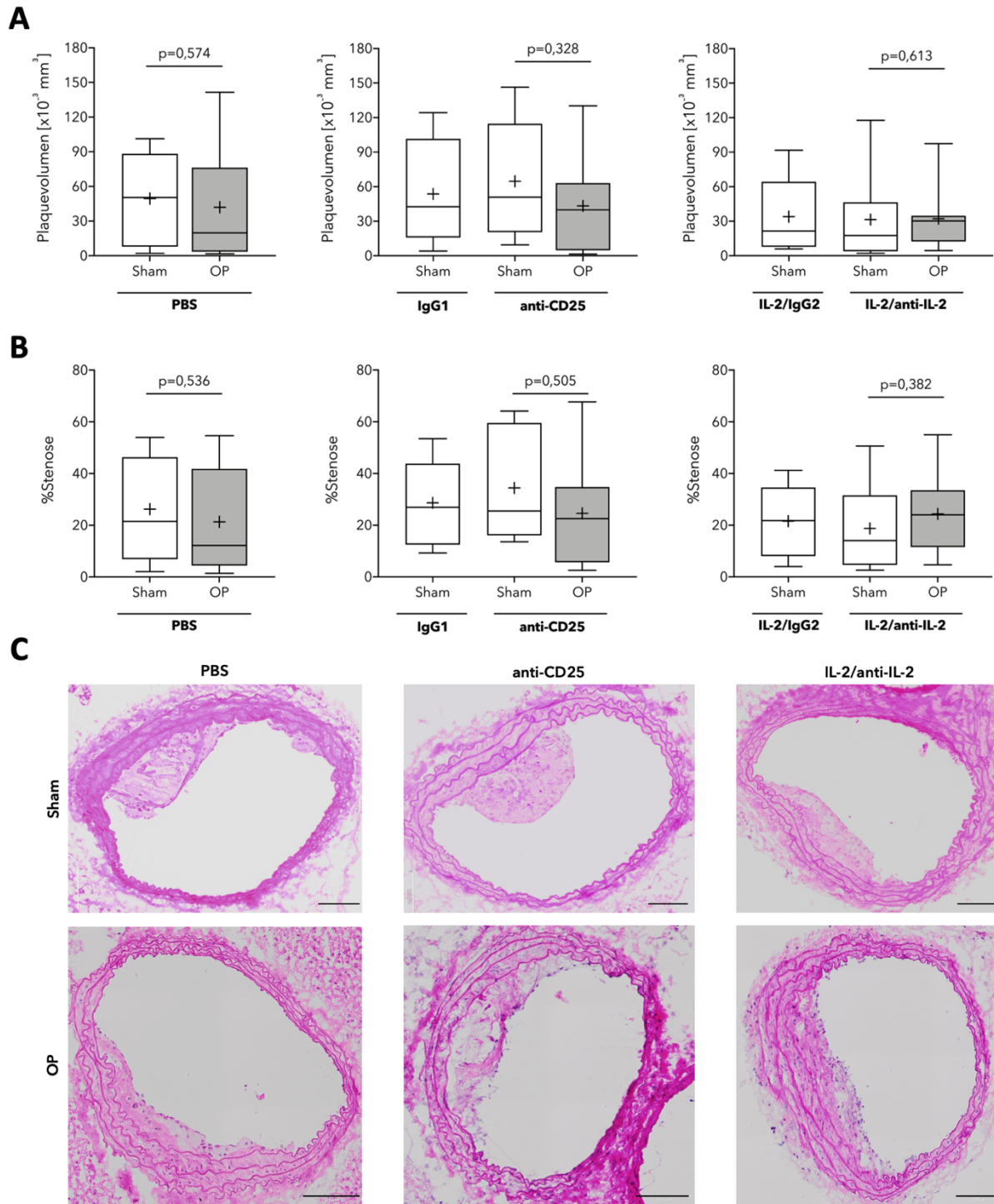


Abbildung 4.24. Effekt perioperativen Stresses auf postoperatives Plaquevolumen und %Stenose in Abhängigkeit des präoperativen Treg-Levels. Atherosklerotische ApoE^{-/-} Mäuse mit präoperativ moduliertem Treg-Level (n=7-8 pro Gruppe) wurden nach neunwöchiger cholesterinreicher Diät dem perioperativen Stressmodell (grau) bzw. der Sham-Intervention (weiß) unterzogen. Es folgte die histomorphologische Begutachtung atherosklerotischer Plaques der Brachiozephalarterien am dritten postoperativen Tag. Mittels ROUT-Methode identifizierte Ausreißer wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Gruppenvergleiche zwischen Sham- und OP-Tieren erfolgten mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test ($p < 0,05$). (A) Postoperatives Plaquevolumen, (B) %Stenose und (C) HE-gefärbte Plaques Sham-intervenierter bzw. operierter Tiere mit repräsentativer %Stenose; Messbalken entsprechen 100 μm . PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, Ig: Immunglobulin, CD25: cluster of differentiation 25, IL-2: Interleukin-2.

Tabelle 4.13. Statistischer Vergleich der OP-Interventionsgruppen hinsichtlich des postoperativen Plaquevolumens und der relativen Stenose in Abhängigkeit präoperativer Treg-Level. Der Vergleich zweier OP-Interventionsgruppen wurde mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test durchgeführt; der der OP-Gruppen untereinander mittels Kruskal-Wallis Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

	PBS (n=8)	anti-CD25 (n=8)	IL-2/anti-IL-2 (n=7)	p PBS vs. anti-CD25	p PBS vs. IL-2/anti-IL-2	p anti-CD25 vs. IL-2/anti-IL-2
<i>Plaquevolumen</i> [$\times 10^{-3}$ mm ³]	20 [3,6; 76]	40 [4,8; 63]	30 [12; 35]	>0,999	0,779	0,955
					Kruskal-Wallis-Test $p=0,980$	
<i>%Stenose</i>	12 [4,4; 42]	23 [5,6; 35]	24 [12; 34]	0,879	0,574	0,879
					Kruskal-Wallis-Test $p=0,852$	

Zusammenfassend ließ sich kein Effekt von perioperativem Stress auf das Volumen, den Lipidgehalt, sowie die Zellularität atherosklerotischer Läsionen in Abhängigkeit des präoperativen Treg-Levels nachweisen. Ungeachtet des präoperativen Treg-Levels konnte eine Reduktion des Kollagengehaltes durch den chirurgischen Stimulus und die Blutentnahme gezeigt werden. Dieser ging nicht mit einer Abnahme glatter Muskelzellen einher. Tiere mit präoperativ niedrigem Treg-Level wiesen postoperativ einen höheren Plaque-Nekroseanteil sowie eine numerisch höhere Anzahl verdeckter fibröser Kappen auf. Zudem waren präoperativ hohe Treg-Level mit einer tendenziell stabileren Plaquearchitektur assoziiert, die sich in Form eines numerisch höheren Kollagengehaltes sowie in einem niedrigeren Nekroseanteil gegenüber der anderen OP-Interventionsgruppen darstellte. Dies könnte auf einen protektiven Effekt präoperativ hoher Treg-Level auf die perioperativ-bedingte Plaquestabilisierung hindeuten.

5. DISKUSSION

Medizinischer Fortschritt und Weiterentwicklungen des chirurgischen und anästhesiologischen Patienten-Managements führten in den vergangenen Jahren zu einer insgesamt rückläufigen Inzidenz kardiovaskulärer Komplikationen nach elektiven, nicht-kardiochirurgischen Operationen (Smilowitz et al. 2017). Nichtsdestotrotz stellen sie weiterhin eine der Hauptursachen für perioperative Morbidität und Letalität dar (Devereaux et al. 2017; Puelacher et al. 2018). Die Ursachen perioperativer Plaquerupturen sind multifaktoriell, jedoch scheinen durch perioperativen Stress induzierte immunologische Vorgänge eine maßgebliche Rolle in der perioperativen Plaquedestabilisierung einzunehmen (Fuijkschot et al. 2016; Janssen et al. 2015). Die vorliegende Arbeit dokumentiert die Bedeutung einzelner Zellpopulationen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in der Entstehung und Prädiktion kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Ereignisse in nicht-kardiochirurgischen Risikopatienten.

5.1 Selektive Zunahme einzelner atherogener Leukozyten-Subpopulationen während nicht-kardiochirurgischer Operationen

Ziel der prospektiven LeukoKAPE-1 Studie war die Untersuchung des Effektes perioperativen Stresses auf die Kinetik einzelner Immunzellpopulationen und deren Bedeutung in der Entstehung kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen.

Die Kohorte entwickelte unter dem Einfluss perioperativen Stresses eine inflammatorische Immunreaktion, die sich in Form erhöhter Leukozyten- und Monozyten-Werte manifestierte. Ähnliche Effekte wurden in kardiochirurgischen Patienten beobachtet (Mossanen et al. 2020). Aus prospektiven kardiologischen Studien geht hervor, dass beide Populationen langfristig mit einer erhöhten Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse einhergehen (Kim et al. 2017; Yamamoto et al. 2016). Es ist anzunehmen, dass der Anstieg des Gesamt-Leukozyten-Wertes auf eine Zunahme Neutrophiler Granulozyten zurückzuführen ist. Diese bilden mit 50-70 % die häufigste Leukozyten-Population und gehören zu den ersten Mediatoren, die im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr rekrutiert werden (Wang und Arase 2014). Ein rascher perioperativer Neutrophilen-Anstieg wurde mehrfach demonstriert (Gawdat et al. 2017; Kim et al. 2011; Mossanen et al. 2020). Der in LeukoKAPE-1 beobachtete perioperative Monozyten-Anstieg resultierte wiederum aus der konsekutiven Zunahme klassischer und intermediärer Monozyten und steht im Einklang mit den Beobachtungen vergleichbarer Arbeiten (Mossanen et al. 2020; Schauer et al. 2014). Beide Populationen wurden in prospektiven Langzeitstudien mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert (Berg et al. 2012; Höpfner et al. 2019; Rogacev et al. 2012). Nicht-klassische Monozyten sanken hingegen kurzzeitig, kehrten am ersten postoperativen Tag jedoch auf ihren Ausgangswert zurück. Mossanen

et al. beobachteten ebenfalls eine perioperative Abnahme des nicht-klassischen Monozyten-Wertes. Diese blieb jedoch bis Ende des Beobachtungszeitraumes einschließlich des vierten postoperativen Tages bestehen (Mossanen et al. 2020). Eine weitere kardiochirurgische Studie demonstrierte einen perioperativen Shift klassischer Monozyten in Richtung CD16-exprimierender intermediärer und nicht-klassischer Monozyten (Gawdat et al. 2017). Die Rolle nicht-klassischer Monozyten in der Atherogenese ist unklar. In unterschiedlichen Studien wurden ihnen sowohl atherogene als auch protektive Effekte zugeschrieben (Rogacev et al. 2010; Urbanski et al. 2017; Urra et al. 2009).

Die durch perioperativen Stress induzierte Dynamik stellte ein spezifisches Phänomen dar, welches sich auf einzelne Immunzellpopulationen beschränkte. Lymphoide Populationen blieben gegenüber ihren präoperativen Ausgangswerten konstant; eine Beobachtung, die sich von anderen relevanten Arbeiten unterscheidet. Patientinnen, die sich einer Laparoskopie-assistierten Hysterektomie unterzogen, wiesen postoperativ eine Verminderung peripherer Lymphozyten auf (Kim et al. 2011). Eine ähnliche Tendenz zeichnete sich auch in Patienten der LeukoKAPE-1 Kohorte ab, erreichte jedoch kein statistisches Signifikanzniveau. Andere Studien demonstrieren eine perioperative Abnahme von T-Lymphozyten, die auf eine gesteigerte Apoptose-Rate bei gleichzeitig verminderter Proliferation zurückgeführt werden konnte (Hensler et al. 1997; Koerner et al. 2008). Ältere, funktionelle Untersuchungen sowie eine kardiochirurgische Studie suggerieren zudem eine Verschiebung des TH1/TH2-Gleichgewichts in Richtung TH2 (Brune et al. 1999; Decker et al. 1996; Markewitz et al. 2001). Diese Beobachtung konnte anhand des LeukoKAPE-1 Kollektivs nicht repliziert werden (Daten nicht gezeigt). In viszeral-chirurgischen Patienten wurde eine Reduktion des relativen Anteils natürlicher Killer-Zellen beschrieben (Decker et al. 2005). In Ratten führte der chirurgische Stimulus zu einem markanten Anstieg der NK-Aktivität. Der beobachtete Effekt wurde durch die Verwendung von Analgetika, insbesondere durch Fentanyl, wiederum inhibiert (Forget et al. 2010). Diese und andere Arbeiten demonstrieren die vielseitigen, teils konkurrierenden Effekte der unterschiedlichen Kausalfaktoren perioperativen Stresses und stellen eine mögliche Ursache diskrepanter Ergebnisse dar. Sowohl die Wahl des Anästhetikums und Analgetikums, der Einsatz mechanischer Beatmung und Blutprodukten als auch die Schwere des chirurgischen Eingriffes bestimmen die Intensität der perioperativen Stressantwort. Unterschiede zwischen LeukoKAPE-1 und anderen Studien sind naheliegend.

Die markante Suppression der monozytären HLA-DR-Expression suggeriert die Ausbildung einer postoperativen Immunparalyse, die in der vorgelegten Untersuchung bereits sechs Stunden nach Hautschnitt einsetzte. Der durch einen operativen Eingriff induzierte transiente Verlust der Immunkompetenz wurde bereits mehrfach beschrieben (Decker et al. 2005; Markewitz et al. 2001). Untersuchungen viszeral-chirurgischer Patienten zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Umfang der HLA-DR-Reduktion und der Größe des operativen Eingriffes (Koerner et al. 2008;

Ordemann et al. 2001). Gleichzeitig korreliert das Ausmaß der Immunparalyse, bedingt durch die gesteigerte Anfälligkeit des Patienten gegenüber opportunistischen Infektionen, mit der Inzidenz septischer Komplikationen (Heidecke et al. 2000; Hensler et al. 1997). Bleibt dieser Zustand über einen postoperativen Zeitraum von zwei Tagen aufrechterhalten, steigt das Risiko post-traumatischer Komplikationen abermals deutlich an (Heidecke et al. 2000; Klava et al. 1997). Trotz reduzierter HLA-DR-Expression weisen Monozyten eine stabile antigenpräsentierende Kapazität auf. Die postoperative Immunsuppression sei folglich weniger auf eine eingeschränkte Monozytenfunktion als auf eine defekte T-Zell-Antwort zurückzuführen (Heidecke et al. 1999).

Der Schweregrad kardiovaskulärer Erkrankungen ist wiederum mit der HLA-DR-Expression von T-Lymphozyten assoziiert (Neri Serneri et al. 1997). Wakefield et al. beobachteten zudem einen Anstieg aktivierter, HLA-DR-exprimierender CD3⁺ T-Lymphozyten während eines elektiven, nicht-kardialen Eingriffes. Die mittlere HLA-DR Fluoreszenzintensität stieg jedoch ausschließlich in Patienten, die eine postoperative infektiöse Komplikation entwickelten (Wakefield et al. 1993). In LeukoKAPE-1 ließ sich perioperativ keine Veränderung der HLA-DR-Expression auf cytotoxischen T-Lymphozyten und TH-Zellen nachweisen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine Stratifikation der Patienten hinsichtlich postoperativer infektiöser Komplikationen den von Wakefield beschriebenen Effekt hervorgebracht hätte.

Die Untersuchung an 38 kardialen Risikopatienten zeigte eine selektive Zunahme einzelner atherogener Immunzellpopulationen während nicht-kardiochirurgischer Operationen und bildet eine mögliche Erklärung für die perioperativ beobachtete inflammatorische Veränderung atherosklerotischer Plaques in dessen Folge es zur Entwicklung kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Komplikationen kommen kann. Limitationen der LeukoKAPE-1 Studie bestehen in der geringen Anzahl eingeschlossener Patienten, von denen lediglich fünf einen primären Endpunkt erreichten. Dies schränkt die Möglichkeiten einer multivariaten Analyse erheblich ein, sodass Subgruppen-spezifische Untersuchungen nicht sinnvoll angewendet werden konnten. Darüber hinaus setzte sich das Studienkollektiv sowohl aus allgemein-, viszeral- und gefäßchirurgischen Patienten zusammen. Da die perioperative Immunantwort in Abhängigkeit der Größe des vorgenommenen operativen Eingriffes variiert, ist nicht auszuschließen, dass der Effekt in der einen oder anderen Subgruppe mehr oder minder ausgeprägt vorlag (Torres et al. 2007). Zudem überwog die Anzahl männlicher Studienteilnehmer mit über 80 %. Es gibt Hinweise darauf, dass sich die perioperative Immunantwort zwischen den Geschlechtern hormonell bedingt unterscheidet (Angele und Chaudry 2005). Prinzipiell sollte die Verwendung sogenannter TruCount Beads (BD Biosciences) oder vergleichbare Alternativen anderer Anbieter zur Bestimmung absoluter Zellzahlen der Kombination von durchflusszytometrischen Daten und Differentialblutbildern vorgezogen werden. In Anbetracht der Anzahl analysierter Proben schien dies aus ökonomischer Sicht nicht gerechtfertigt. Vor diesem

Hintergrund sollten die erzielten Ergebnisse als explorativ betrachtet werden. Nichtsdestotrotz handelt es sich um die erste prospektive Studie, die einen umfassenden Einblick in die Kinetik unterschiedlicher Leukozyten-Subpopulationen während nicht-kardiologischer Operationen in kardiovaskulären Risikopatienten gewährt.

5.2 Perioperativer Anstieg des Monozyten-Aktivierungsmarkers PSEP in MACCE-Patienten

In kardiologischen Patienten korreliert die perioperative Zunahme intermediärer Monozyten mit einer gesteigerten Inzidenz extrakardialer Komplikationen, darunter postoperatives Delir und akutes Nierenversagen, jedoch nicht mit kardiovaskulären Ereignissen (Mossanen et al. 2020). Stratifizierte man die Patienten der LeukoKAPE-1 Kohorte nach dem Auftreten des primären Endpunktes MACCE, wurde deutlich, dass sich der perioperativ beobachtete Anstieg atherogener klassischer und intermediärer Monozyten auf Patienten, die den Endpunkt nicht erreichten, beschränkte. Die Zunahme klassischer Monozyten korrelierte indessen negativ mit der Inzidenz perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen. Für intermediäre Monozyten zeigte sich ein ähnlicher Trend, der jedoch kein statistisches Signifikanzniveau erreichte. Parallel dazu wiesen MACCE-Patienten einen signifikant stärkeren Anstieg des Monozyten-Aktivierungsmarkers PSEP am ersten postoperativen Tag auf. Dem ausbleibenden Monozyten-Anstieg bei gleichzeitig hoher PSEP-Konzentration können zwei Ursachen zugrunde liegen. Einen möglichen Erklärungsansatz bilde die gesteigerte klassische Monozyten-Aktivierung in MACCE-Patienten, in dessen Folge die Plasma-PSEP-Konzentration ansteige. Die Quantifizierung zirkulierender Monozyten-Subtypen gäbe dies jedoch nicht her, da die Zellen vermehrt aus den Blutgefäßen in entzündliches Gewebe überträten und lokal die Plaqueprogression vorantrieben. Unter Berücksichtigung der in LeukoKAPE-2 generierten Daten, die einen gleichermaßen starken Anstieg der PSEP-Konzentration in Patienten mit und ohne MACCE indizieren, ist eine Monozyten-Aktivierung, die sich auf MACCE-Patienten beschränkt, weniger wahrscheinlich. Einen alternativen Erklärungsansatz böte die *de novo* Synthese von sCD14 durch Hepatozyten. Bas et al. demonstrierten eine IL-6-induzierte Neosynthese von sCD14 durch Hepatozyten ähnlich derer von Akute-Phase-Proteinen (Bas et al. 2004). Da die inflammatorische Reaktion des Körpers im Rahmen der perioperativen Stressantwort ebenfalls durch die Ausschüttung von IL-6 charakterisiert ist (Desborough 2000; Janssen et al. 2015), ist ein perioperativer, akuter PSEP-Anstieg, der auf das von Hepatozyten freigesetzte und zu PSEP prozessierte sCD14 zurückzuführen ist, denkbar. Warum MACCE-Patienten der LeukoKAPE-1 Kohorte einen stärkeren perioperativen PSEP-Anstieg verglichen mit Patienten ohne Endpunkt zeigen, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend klären.

5.3. Präoperatives PSEP zur perioperativen kardiovaskulären Risikoprädiktion

MACCE-Patienten wiesen bereits präoperativ erhöhte PSEP-Konzentrationen auf. Ob präoperatives PSEP, als Indikator der inflammatorischen Prädisposition eines Patienten, mit dem Auftreten kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen korreliert und einen additiven Nutzen für die präoperative kardiovaskuläre Risikoprädiktion hat, wurde im Rahmen einer *post-hoc* Analyse des LeukoKAPE-1 Datensatzes evaluiert und anhand der LeukoKAPE-2 Kohorte verifiziert. In beiden Studien wiesen Patienten, die den primären Endpunkt MACCE erreichten, präoperativ erhöhte PSEP-Konzentrationen auf. Zudem war präoperatives PSEP oberhalb des in LeukoKAPE-1 abgeleiteten Cut-offs von 184 pg/ml unabhängig mit perioperativem MACCE assoziiert. In LeukoKAPE-1 wiesen Sensitivitäts- und Reklassifizierungsanalysen auf einen prognostischen Mehrwert präoperativen PSEPs für die kardiovaskuläre Risikostratifizierung hin. Dieser konnte in LeukoKAPE-2 wiederum nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die präoperative Beurteilung des kardiovaskulären Risikos eines Patienten vor elektiven, chirurgischen Eingriffen ist von zentraler Bedeutung in der leitliniengerechten Behandlung von Patienten. Gängige Modelle zur kardiovaskulären Risikoevaluierung umfassen, je nach Fachgesellschaft, die Erhebung kardiovaskulärer Risikoindizes sowie kardialer Biomarker-Konzentrationen (Duceppe et al. 2017; Fleisher et al. 2014; Kristensen et al. 2014).

Klinische Risikoindizes, darunter der RCRI, basieren auf klinischen Risikofaktoren, die in kardialen Risikopatienten eine überdurchschnittlich hohe Prävalenz haben (Lee et al. 1999b). In Konsequenz dessen kommt es häufig zur Unterschätzung des kardiovaskulären Risikos, so auch in LeukoKAPE-1 und -2. Die prognostische Güte des RCRI wies in beiden Kohorten eine schwache bis sehr schwache Diskriminierung für perioperativen MACCE auf (Gorenoi et al. 2009). Eine internationale, multizentrische Kohorten-Studie an 432 nicht-kardiochirurgischen Patienten stellte die prognostizierte Ereignisrate unter Verwendung des RCRI der aufgetretenen Ereignisrate gegenüber. Im Ergebnis überstieg die Anzahl eingetretener vaskulärer Ereignisse (6,3 %) die der prognostizierten (1,0 %) um Faktor 6 [3,5; 9,7] (Devereaux et al. 2011a). Dieses Ergebnis konnte erst kürzlich repliziert werden. In 870 Patienten des VISION-Kollektivs erreichte der RCRI eine Trennschärfe von AUC=0,60 [0,54; 0,65] und führte zu einer systematischen Unterschätzung des prognostizierten kardiovaskulären Risikos ($p < 0,001$) (Fronczek et al. 2019). Eine Metaanalyse fasste die Ergebnisse aus 24 Studien zusammen und berichtete eine moderate Trennschärfe des RCRI (AUC=0,64 [0,61; 0,68]) in gefäßchirurgischen Patienten (Ford et al. 2010). Neben der hohen Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren tragen weitere Faktoren zur geringen diskriminativen Fähigkeit des RCRI in kardialen Risikopatienten bei. Der Index wurde 1999 im Rahmen einer monozentrischen Studie an 2893 nicht-kardiochirurgischen Patienten im Alter von über 50 Jahren und unabhängig des Vorliegens

kardiovaskulärer Vorerkrankungen abgeleitet. Zudem wurde er initial für die Vorhersage kardiovaskulärer Ereignisse innerhalb eines Jahres nach stattgehabtem chirurgischem Eingriff, nicht für einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen entwickelt. Suprainguinale Gefäßoperationen sowie abdominelle und thorakale Eingriffe werden einheitlich als Hoch-Risiko Eingriff definiert und bilden einen der sechs Prädiktoren, aus denen sich der RCRI berechnet. Fortschritte der Operationstechnik, insbesondere der minimalinvasiven Chirurgie, werden nicht berücksichtigt. Nicht zuletzt wurde die Diagnose eines MIs zum Zeitpunkt der Entwicklung des RCRI ausschließlich auf Basis Ischämie-typischer Symptome und neuaufgetretener EKG-Veränderungen getroffen (Lee et al. 1999b). Eine Vielzahl aufgetretener MIs blieb infolgedessen unerkannt (Biccard und Rodseth 2011; Devereaux et al. 2011b; Puelacher et al. 2018).

Kardiale Integritätsmarker führten in den vergangenen Jahren zu einer wesentlichen Verbesserung der Diagnose und Risikostratifizierung kardiovaskulärer Erkrankungen (Duceppe et al. 2019; Weber et al. 2013). Die Bestimmung kardialer Troponine und natriuretischer Peptide hat sich als fester Bestandteil internationaler Leitlinien und klinischer Routine etabliert (Duceppe et al. 2017; Kristensen et al. 2014). In LeukoKAPE-1 und -2 wies die Kombination von RCRI und NT-proBNP eine unzureichende Diskrimination auf. Die zusätzliche Berücksichtigung von hs-cTnT und PSEP führte hingegen zu einer signifikanten Verbesserung der RCRI-basierten Risikoprognose. Ein ähnliches Bild zeigte sich in einer multizentrischen Kohorten-Studie. Weber et al. untersuchten den inkrementellen Wert kardialer Biomarker gegenüber der RCRI-basierten Prädiktion kardiovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen. Unter Anwendung von Cut-offs erwies sich hs-cTnT >14 ng/l als stärkster Prädiktor des Endpunktes. NT-proBNP \geq 300 ng/l führte indessen zu keiner signifikanten Verbesserung der Risikoprognose (Weber et al. 2013).

Eine wesentliche Einschränkung der präoperativen kardialen Biomarker-basierten Risikostratifizierung besteht jedoch im fehlenden Konsens hinsichtlich anzuwendender Schwellenwerte (Kavsak et al. 2011). Für NT-proBNP reicht dieser in unterschiedlichen Studien und Empfehlungen von 35 bis 165 ng/l für BNP bzw. 200 bis 300 ng/l für NT-proBNP (Devereaux 2018; Duceppe et al. 2017; Rodseth et al. 2011). Aus diesem Grund wurde in der hier vorgelegten Arbeit auf die Verwendung von Cut-offs verzichtet. Die hs-cTnT- und NT-proBNP-Konzentration wurden in Form metrisch skalierten Variablen in die Analyse einbezogen. So ist nicht auszuschließen, dass die Wahl eines Cut-offs abweichende Ergebnisse hervorgebracht hätte. Bei der Verwendung kardialer Troponine muss zudem berücksichtigt werden, dass sie zwar herz-, jedoch nicht infarktspezifisch sind. So liegen auch bei anderen Krankheitsbildern, die mit einer Schädigung des Myokards einhergehen können (z. B. Lungenembolie, Aortendissektion, etc.), erhöhte Konzentrationen vor (Kontos et al. 2010). Darüber hinaus konnten in den vergangenen Jahren eine Reihe extrakardialer Ursachen für abnorme Konzentrationsanstiege kardialer Biomarker ausgemacht werden (Felker et al. 2006; Hamasaki 2016;

Korff et al. 2006), deren Interpretation in der klinischen Praxis regelmäßig eine Herausforderung darstellt. Unabhängig der zugrundeliegenden Pathophysiologie erwies sich die kardiale Biomarker-Bestimmung in der Vergangenheit von inkrementeller Bedeutung für die Vorhersage perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardialen Operationen (Karthikeyan et al. 2009; Nagele et al. 2013). Aus diesem Grund besteht nur begrenzt Spielraum für die Verbesserung der präoperativen Risikoevaluierung durch Einbezug weiterer kardialer Biomarker, die lediglich in Folge eines stattgehabten kardiovaskulären Ereignisses ansteigen, jedoch nicht ursächlich an der Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen beteiligt sind.

Atherosklerose ist durch eine chronisch inflammatorische Immunantwort charakterisiert (Hansson 2005). Die Bestimmung inflammatorischer Biomarker ermöglicht die Beurteilung der Aktivität und Vulnerabilität atherosklerotischer Plaques (Mangge et al. 2004). In den vergangenen Jahren konnten eine Reihe großer, epidemiologischer und klinischer Studien einen Zusammenhang zwischen systemisch messbaren Inflammationsmarkern und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse nachweisen (Held et al. 2017; Kaptoge et al. 2014). Monozyten und Makrophagen nehmen eine zentrale Rolle in der Initiierung, Perpetuierung und Komplikation atherosklerotischer Läsionen ein (Moroni et al. 2019). Die Aktivierung von Monozyten vom klassischen zum nicht-klassischen Subtyp wird von der Freisetzung und Prozessierung des CD14-Rezeptors zu PSEP begleitet (Bazil und Strominger 1991). PSEP gilt aus diesem Grund als Monozyten-Aktivierungsmarker (Shive et al. 2015), der den inflammatorischen Status eines Patienten indiziert. Vor diesem Hintergrund gewann die präoperative PSEP-Bestimmung für die Vorhersage perioperativer Komplikationen zunehmend an Interesse.

In kardiochirurgischen Patienten (n=836) korreliert präoperatives PSEP unabhängig mit der Gesamtmortalität innerhalb eines postoperativen Beobachtungszeitraumes von 30 Tagen, sechs Monaten und zwei Jahren. Darüber hinaus wies präoperatives PSEP, verglichen mit herkömmlichen Inflammationsmarkern, darunter Procalcitonin, NT-proBNP und Cystatin C, die höchste Trennschärfe auf (Bomberg et al. 2017). Die gleiche Kohorte (n=839) wurde zur Untersuchung der Assoziation perioperativer PSEP-Konzentrationen und der Inzidenz postoperativer nicht-okklusiver Mesenterialischämie herangezogen. Patienten, die den Endpunkt erreichten, wiesen sowohl prä- als auch postoperativ erhöhte PSEP-Werte auf. Nach statistischer Berücksichtigung zusätzlicher perioperativer Einflussgrößen erwies sich postoperativ erhöhtes PSEP als signifikanter Prädiktor des Endpunktes (Stroeder et al. 2018). Weitere kardiochirurgische Studien zeigen eine Assoziation von perioperativem PSEP-Anstieg mit dem Risiko postoperativer infektiöser Komplikationen (Clementi et al. 2019; Franekova et al. 2017; Popov et al. 2015). Zudem weisen Patienten mit STEMI, verglichen mit Patienten ohne KHK, signifikant höhere PSEP-Konzentrationen auf (Caglar et al. 2017).

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigen erstmals eine unabhängige Assoziation präoperativ erhöhter PSEP-Konzentrationen und dem Auftreten kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Ereignisse nach nicht-kardialen chirurgischen Eingriffen. In LeukoKAPE-1 erwies sich PSEP zudem als wertvolles Prognoseinstrument, das die Risikoprädiktion auf Basis von RCRI und kardialen Biomarkern signifikant verbesserte. Der Cut-off von 184 pg/ml entspricht der oberen Grenze des von Giavarina und Carta ermittelten Referenzbereiches (Giavarina und Carta 2015). In kardiochirurgischen Patienten liegen die Cut-offs zur Vorhersage der perioperativen Gesamtmortalität zwischen 215 und 293 pg/ml (Bomberg et al. 2017); zur Prädiktion einer nicht-okklusiven mesenterialen Ischämie bei 154 und 295 pg/ml, je nach Schwere des aufgetretenen Ereignisses (Stroeder et al. 2018). In Sepsis-Patienten werden Schwellenwerte bis zu 907 pg/ml verwendet (Memar und Baghi 2019); entsprechend übersteigen sie die Konzentration zur Vorhersage perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen um ein Vielfaches.

Die Validierung des Cut-offs anhand der unabhängigen LeukoKAPE-2 Kohorte brachte eine deutlich geringere prognostische Güte präoperativen PSEPs hervor. Auch Testcharakteristika wie Sensitivität, Spezifität, positive und negative Prädiktionswerte blieben weit unterhalb denen der ersten Studie. Mögliche Ursachen liegen im kleinen Stichprobenumfang der LeukoKAPE-1 Kohorte, anhand derer der PSEP Cut-off abgeleitet wurde, begründet. Zudem wiesen präoperative PSEP-Konzentrationen eine große interindividuelle Streuung auf. Vor diesem Hintergrund wurde erwartet, dass die Ergebnisse der Validierungsanalyse schlechter ausfallen würden. Ferner ist anzunehmen, dass die niedrige Anzahl der Patienten, die den primären Endpunkt erreichten (10 %), zum geringen positiven Prädiktionswert beitrug. Andere relevante Studien beobachteten vergleichbare, wenn auch geringfügig niedrigere Ereignisraten zwischen 6,9 und 7,7 % (Poise Study Group et al. 2008; Roshanov et al. 2019). Die Anwendung unterschiedlicher Definitionen des Endpunktes schränkt die Vergleichbarkeit zwischen Studien jedoch maßgeblich ein.

In LeukoKAPE-1 konnte ein prognostischer Mehrwert präoperativen PSEPs gegenüber eines Referenzmodells bestehend auf RCRI, hs-cTnT und NT-proBNP mittels Reklassifizierungsanalysen, nicht jedoch durch den Vergleich entsprechender ROC-Kurven nachgewiesen werden. Da das Referenzmodell *per se* eine hohe diskriminative Fähigkeit erreichte, ist denkbar, dass durch Einbezug der präoperativen PSEP-Konzentration keine signifikante Steigerung mehr erzielt werden konnte. In LeukoKAPE-2 brachte sowohl PSEP als auch das Referenzmodell deutlich niedrigere Prädiktionswerte hervor. Patienten mit und ohne perioperativen MACCE konnten unter Anwendung des Referenzmodells nicht mehr differenziert werden. Dies steht im scheinbaren Widerspruch zur Literatur, in der hs-cTnT (AUC=0,78) und NT-proBNP (AUC=0,71) eine vergleichsweise hohe prognostische Güte für kardiovaskuläre Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen aufweisen. Die Untersuchung umfasste Patienten ab einem Alter von 55 Jahren mit mindestens

einem kardiovaskulären Risikofaktor. Vergleicht man die Basisdatencharakteristika beider Studienkollektive, fällt jedoch auf, dass nur 25 % der Patienten an einer KHK litten (Weber et al. 2013). Zudem wiesen Patienten der LeukoKAPE-2 Studie höhere RCRI und kardiale Biomarker-Konzentrationen auf. Andere Untersuchungen an Patientenkollektiven mit vergleichbarer Risikokonstellation weisen ebenfalls auf einen eingeschränkten prognostischen Nutzen der präoperativen hs-cTnT-Bestimmung hin (Lee et al. 2019). Omland et al. zeigten zudem, dass hs-cTnT keinen prädiktiven Wert für die Vorhersage von MIs in Patienten mit stabiler KHK hat (Omland et al. 2009). Eine weitere Studie an gefäßchirurgischen Patienten zeigte, dass die maximale Trennschärfe durch Erfassung der perioperativen hs-cTnT-Zunahme, hingegen nicht durch eine einzelne präoperative Messung erzielt wird (Gillmann et al. 2014).

In LeukoKAPE-2 zeigte die IDI-Analyse eine signifikante Verbesserung der Risikoprädiktion auf Basis des Referenzmodells unter zusätzlicher Berücksichtigung präoperativen PSEPs. Dieses Ergebnis konnte mittels NRI-Analyse nicht repliziert werden, zeigte jedoch, dass die verbesserte Vorhersagegenauigkeit auf eine Reduktion falsch-positiv kategorisierter Patienten der Gruppe ohne MACCE zurückzuführen war. Den indifferenten Ergebnissen beider Reklassifizierungsanalysen können vielfältige Ursachen zugrunde liegen. Die Berechnung des NRI basiert auf der Einordnung von Patienten in vordefinierte Risikokategorien (Pencina et al. 2008). Da kein allgemeiner Konsens über die Breite und Anzahl zu verwendender Risikoklassen herrscht, wurde die Wahl nach Arbeitsgruppeninternem Bemessen getroffen. Nichtsdestotrotz beeinflusst die Festsetzung der Risikoklassen das Ergebnis der Analyse maßgeblich. Eine ungünstige Wahl der Risikokategorien könnte den Effekt des PSEP-assistierten Modells auf die Risikoprädiktion nachteilig beeinflusst haben. Die IDI-Analyse verzichtet auf die individuelle Einordnung der Patienten in Risikokategorien und basiert auf dem Vergleich der mittleren prognostizierten Ereigniswahrscheinlichkeit des Referenzmodells gegenüber dem erweiterten Modell (Pencina et al. 2008). Kritiker bemängeln jedoch die klinische Relevanz marginaler Risikoverschiebungen in Patienten mit minimalem oder von vornherein hohem prognostiziertem Risiko (Kerr et al. 2014).

Die Konzentration von Plasmabiomarkern hängt stark vom Ausmaß der renalen Ausscheidung des Proteins ab. Bereits milde Einschränkungen der Nierenfunktion können signifikante Konzentrationsanstiege zur Folge haben (Chesnaye et al. 2019; Takase und Dohi 2014). Saito et al. untersuchte die PSEP-Kinetik in Nierentransplantationspatienten. Gegenüber Patienten mit normaler Nierenfunktion wiesen diese deutlich höhere PSEP-Werte auf. Nach Transplantation sank die Konzentration wiederum stetig, was auf eine enge Assoziation PSEPs mit dem Nierenfunktionsstatus hindeutet (Saito et al. 2016). In LeukoKAPE-1 wiesen Patienten, die den primären Endpunkt erreichten, ein fortgeschritteneres Niereninsuffizienzstadium sowie höhere Kreatinin-Werte auf. Ob dies einen Effekt auf die Assoziation präoperativen PSEPs mit perioperativem MACCE ausübte, lässt

sich anhand des kleinen Studienkollektivs nicht nachvollziehen. In LeukoKAPE-2 wiesen Patienten mit und ohne MACCE hingegen eine vergleichbare Nierenfunktion auf. Zudem konnte die multivariate Analyse keine Assoziation des Niereninsuffizienzstadiums mit der Inzidenz des Endpunktes nachweisen. In kardiochirurgischen Studien erwies sich PSEP ebenfalls als ein von der Nierenfunktion unabhängiger Prädiktor von Tod und nicht-okklusiver Mesenterialischämie (Bomberg et al. 2017; Stroeder et al. 2018).

PSEP reflektiert den inflammatorischen Status eines Patienten und damit, so die Hypothese, seine Neigung zur perioperativen Plaqueruptur. Die zugrundeliegende Pathophysiologie erhöhter PSEP-Werte ist unzureichend untersucht. Die Quantifizierung präoperativer Monozyten-Werte brachte in MACCE-Patienten trotz präoperativ hoher PSEP-Konzentrationen keinen Unterschied gegenüber Patienten ohne perioperativem MACCE hervor. Im Zuge des Monozyten-Reifungsprozesses gehen klassische Monozyten vom Knochenmark in den Blutkreislauf über. Dort weisen sie eine Halbwertszeit von etwa einem Tag auf. Knapp 99 % der klassischen Monozyten transmigrieren ins Gewebe oder sterben, nur 1 % differenziert über intermediäre zu nicht-klassischen Monozyten (Patel et al. 2017). Denkbar ist eine gesteigerte Monozyten-Aktivierung bei gleichzeitig erhöhter Gewebsinfiltration bzw. Apoptoserate in MACCE-Patienten, in Folge derer die gemessene Anzahl zirkulierender Zellen keinen Anhalt für eine gesteigerte Aktivierungsrate geben konnte. Alternativ könnten eine fortwährende Freisetzung von sCD14 durch Hepatozyten sowie eine gesteigerte Konzentration oder Funktion von Plasmaproteasen zur präoperativ erhöhten PSEP-Konzentration in MACCE-Patienten beitragen. Gegen eine sCD14-Freisetzung aus der Leber spricht jedoch, dass sich die präoperative CRP-Konzentration, ein weiteres durch die Leber sezerniertes Akute-Phase-Protein, in beiden Studien zwischen Patienten mit und ohne Endpunkt nicht unterschied.

Wie in LeukoKAPE-1 bestand die LeukoKAPE-2 Kohorte zu mehr als 80 % aus männlichen Studienteilnehmern, sodass eine Generalisierung der Ergebnisse nicht vorgenommen werden kann. Das umfassendere Studienkollektiv erlaubte die unabhängige Beurteilung der Assoziation präoperativen PSEPs mit perioperativem MACCE, dennoch limitiert die niedrige Ereignisrate von 10 % die Robustheit der multivariaten Regressionsanalyse. Zudem wurde die Validierung des PSEP Cut-offs anhand der LeukoKAPE-2 Kohorte *post-hoc* geplant und durchgeführt. Trotz dessen keine *a priori* Fallzahlkalkulierung zugrunde gelegt wurde, konnte eine Power von 84 % erreicht werden. Die Verwendung eines kombinierten Endpunktes, bestehend aus kardiovaskulärem Tod, MI, Myokardischämie und thromboembolischem Schlaganfall, führte zur Erhöhung der Ereignisrate und damit zur Zunahme der statistischen Effizienz unter Verwendung einer kleineren Stichprobengröße (Kleist 2010). Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass sich die einzelnen Komponenten in ihrer klinischen Relevanz unterscheiden. Zudem lag die Inzidenz des kardiovaskulär-bedingten Todes sowie des Schlaganfalls in beiden klinischen Studien deutlich unterhalb der eines MIs bzw. einer

Myokardischämie. In LeukoKAPE-2 war präoperatives PSEP >184 pg/ml zudem lediglich mit dem kombinierten Studienendpunkt, doch mit keiner seiner Entitäten assoziiert. Folglich konnte zwar ein signifikanter Gesamteffekt nachgewiesen werden; ob präoperatives PSEP auch mit einzelnen MACCE-Komponenten assoziiert ist, muss hingegen anhand größerer Studienkollektive untersucht werden.

Die vollautomatisierte PSEP-Konzentrationsbestimmung mittels 24/7 Bedside-Test gestalte die Implementierung des Testverfahrens in den klinischen Alltag praktikabel. Der PATHFAST™ Immunoanalyzer in Form eines kompakten Tischgerätes erlaubt die gleichzeitige Messung von sechs Patientenproben innerhalb eines 15-minütigen Testzyklus. Zudem garantieren gebrauchsfertige Test-Kartuschen die zuverlässige, robuste Konzentrationsbestimmung aus Vollblut oder Plasma (LSI Medience Corporation 2017).

Die präoperative Patientenevaluierung erlaubt eine Abschätzung des perioperativen kardiovaskulären Risikos und kann bei der Identifizierung von Risikopatienten, die von einer weiterführenden präoperativen Evaluierung profitieren, unterstützen (Leschke et al. 2017). Ob und unter welchen Umständen die Risikostratifizierung zur Anpassung der perioperativen Therapie bzw. des Monitorings und damit zur verbesserten Prognose des Patienten führt, ist hingegen unzureichend belegt (Auerbach et al. 2007; Johansson et al. 2013; Mol et al. 2019). Das Ergebnis einer retrospektiven Studie an 6030 nicht-kardiochirurgischen Patienten deutet darauf hin, dass bei geringfügig erhöhtem präoperativem Troponin eine Verschiebung des operativen Eingriffs auf einen späteren Zeitpunkt mit der Reduktion des 30-Tage Mortalitätsrisikos einhergeht (Maile et al. 2016). Transparente und verbindliche Absprachen sowie die einheitliche Gestaltung der Risikostratifizierung zwischen fachlichen Disziplinen und Standorten ist indessen von zentraler Bedeutung, da unterschiedliche Risikoprognosemodelle abweichende Ergebnisse hervorbringen und damit das perioperative Vorgehen beeinflussen (Glance et al. 2018). Angesichts der fortwährend hohen Inzidenz kardiovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen stellen inflammatorische Biomarker ein vielversprechendes Hilfsmittel zur Verbesserung der präoperativen Risikoevaluierung dar. Die *post-hoc* Analysen der LeukoKAPE-1 und -2 Studie geben Hinweise auf einen möglichen prognostischen Mehrwert der präoperativen PSEP-Bestimmung zur Vorhersage kardiovaskulärer Komplikationen in nicht-kardiochirurgischen Risikopatienten. Eine prospektive, multizentrische Beobachtungsstudie wird zeigen (NCT03489486), ob sich präoperatives PSEP als Surrogat-Marker der inflammatorischen Disposition eines Patienten für die präoperative kardiovaskuläre Risikoprädiktion qualifiziert.

5.4 Assoziation präoperativ niedriger Treg-Level mit MACCE nach nicht-kardiochirurgischer Operation

Das präoperative Leukozyten-Profil sowie dessen Assoziation mit perioperativem MACCE wurde in einer *post-hoc* Analyse des LeukoKAPE-1 Kollektivs untersucht. Unter 13 analysierten Zellpopulationen, denen eine relevante Rolle in der Atherogenese zugeschrieben wird, unterschieden sich Patienten mit und ohne Endpunkt lediglich in der Anzahl präoperativer Tregs. MACCE-Patienten wiesen gegenüber Studienteilnehmern, die den primären Endpunkt nicht erreichten, um etwa 40 % niedrigere Treg-Level auf. Zudem konnten präoperative Tregs unterhalb des abgeleiteten Cut-offs von 0,027 Zellen/nl mit einem erhöhten perioperativen MACCE-Risiko assoziiert werden. Diese Ergebnisse sowie ein prognostischer Mehrwert präoperativer Treg-Level zur perioperativen kardiovaskulären Risikoprädiktion konnten in der prospektiven LeukoKAPE-2 Studie durch A. S. Scholz repliziert und validiert werden (Scholz et al. 2020).

Kotfis et al. untersuchten die Inzidenz kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Komplikationen innerhalb 30 Tage nach CEA in Abhängigkeit präoperativer Lymphozyten-Level. Entgegen der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie der daraus resultierenden Folgestudie LeukoKAPE-2, unterschied sich die Anzahl regulatorischer T-Zellen zwischen Patienten mit und ohne Endpunkt nicht (Kotfis et al. 2015). Abseits des operativen Kontextes belegen zahlreiche klinische und experimentelle Studien die atheroprotektive Wirkung von Tregs (Feng et al. 2009; Foks et al. 2011; Meng et al. 2013). Niedrige Treg-Level sowie die Beeinträchtigung ihrer immunsuppressiven Funktion gehen mit einer erhöhten Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse einher (Wigren et al. 2012). Tregs indizieren den inflammatorischen Status eines Patienten und sind kausal in die Genese atherosklerotischer Plaques involviert. Es ist daher denkbar, dass ihr Einbezug in die perioperative Risikostratifikation, trotz subklinischer Atherosklerose, zur Identifizierung von Patienten mit Ruptur-gefährdeten Läsionen beitragen kann (George et al. 2012). Nichtsdestotrotz gestalten sich die klinische Implementierung der präoperativen Treg-Quantifizierung aufwendig. Unter Berücksichtigung der angewandten Methodik sowie des aktuellen technischen Standes bedarf die Bestimmung der absoluten Zellzahl einer aufwendigen durchflusszytometrischen Färbung in Verbindung mit der Erhebung eines Differentialblutbildes. Die Entwicklung eines Immunoassays, vergleichbar mit dem der PSEP-Konzentrationsbestimmung, würde die Integration und Akzeptanz der Treg-assistierten Risikoprädiktion in die klinische Routine mutmaßlich beschleunigen.

Die Untersuchung von Faktoren und zugrundeliegenden Mechanismen, die eine Reduktion des peripheren Treg-Pools in kardialen Risikopatienten nach sich ziehen, geht über den Rahmen dieser Arbeit hinaus und bedarf umfassender epidemiologischer Studien. Angesichts der Ergebnisse einer Beobachtungsstudie an 182 Patienten stellen die Beeinträchtigung der Thymusfunktion sowie eine

gesteigerte Treg-Apoptose mögliche Ursachen niedriger Treg-Level in Patienten mit akutem Koronarsyndrom dar (Zhang et al. 2012). Die übermäßige Freisetzung von Granzymen durch Tregs kann zudem zur autoreaktiven Schädigung der Zellen führen (Sula Karreci et al. 2017). Ferner können Verschiebungen des Zytokinmilieus sowie die Inhibierung der IL-2/IL-2R Signaltransduktion zur verminderten peripheren Treg-Differenzierung und Homöostase beitragen (Inomata et al. 2016; Tang et al. 2015). Die rückläufige Tendenz zirkulierender Tregs bei gleichzeitiger Zunahme des T-Effektorzell-Pools im fortschreitenden Krankheitsverlauf der Atherosklerose führte zur Formulierung der Treg-Umschalthypothese. Sie beschreibt den partiellen bis vollständigen Verlust der Foxp3-Expression sowie der immunsuppressiven Funktion von Tregs. Stattdessen begannen diese Effektorzell-spezifische Transkriptionsfaktoren zu exprimieren und vermehrt pro-atherogene Effekte auszuüben. Mögliche Ursachen der Foxp3-Instabilität seien auf epigenetische Modifikationen des *foxp3* Locus zurückzuführen (Wolf und Ley 2019). Dass dieser Mechanismus auch in LeukoKAPE-2 zu präoperativ niedrigen Treg-Leveln in MACCE-Patienten beitrug, ist unwahrscheinlich, da sich der KHK-Schweregrad, die Inzidenz sowie der Zeitraum seit der letzten Koronarintervention zwischen Patienten mit niedrigem und hohem Treg-Level nicht unterschied und entsprechend ähnlich fortgeschrittene Krankheitsstadien zugrunde gelegt werden können (Scholz et al. 2020).

Die in dieser *post-hoc* Analyse dargelegten Ergebnisse sowie jene aus der daraus resultierenden Folgestudie LeukoKAPE-2 geben erstmals Hinweise auf die Implikation von Tregs in der Entstehung perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen in kardialen Risikopatienten. Ob ein kausaler Zusammenhang zugrunde liegt, wurde im perioperativen Mausmodell untersucht.

5.5 Perioperativer Treg-Anstieg zum Schutz vor überschießender Immunreaktion?

Atherosklerotische ApoE^{-/-} Mäuse entwickelten unter Einfluss perioperativen Stresses eine Zunahme regulatorischer T-Zellen in Blut und Thymus. Ein tendenziell ähnlicher Effekt wurde in Lymphknoten und atherosklerotischen Läsionen beobachtet, erreichte jedoch kein statistisches Signifikanzniveau. Ein durch perioperativen Stress induzierter Treg-Anstieg konnte auch in laparotomierten BALB/c Mäusen nachgewiesen werden (Sun et al. 2019). Denkbar ist, dass es sich um eine Schutzreaktion des Organismus gegen die akute perioperative Inflamationsreaktion handelt, um so einer überschießenden, langfristig schädigenden Immunantwort entgegen zu treten.

Nicht-kardiochirurgische Patienten des LeukoKAPE-1 Kollektivs zeigten hingegen keine Veränderung der Treg-Anzahl über den zweitägigen postoperativen Analysezeitraum. Neben einer allgemein limitierten direkten Übertragbarkeit tierexperimenteller Daten auf den Patienten, können der beobachteten Diskrepanz vielzählige Ursachen zugrunde liegen. Eine klinische Studie an 33 nicht-kardiochirurgischen Patienten deutet auf eine perioperative Treg-Expansion zu einem späteren postoperativen Zeitpunkt hin. Während am ersten postoperativen Tag keine Veränderung des

peripheren Treg-Levels gegenüber präoperativer Ausgangswerte nachgewiesen werden konnte, entwickelte die Kohorte am sechsten postoperativen Tag einen signifikanten Anstieg der Zellen (Saito et al. 2013). Bei größeren abdominal-chirurgischen Operationen unterscheidet sich die Kinetik regulatorischer T-Zellen in Abhängigkeit des untersuchten Probenmaterials. Wie in LeukoKAPE-1 ließ sich im Blut keine quantitative Veränderung des Treg-Levels am zweiten postoperativen Tag nachweisen. Die Analyse der Peritonealflüssigkeit, die die lokale Inflammationsreaktion im Operationsfeld abbildete, brachte hingegen einen persistierenden Anstieg innerhalb des ersten postoperativen Tages hervor (Decker et al. 2005). Möglicherweise führt die rasche Migration der Zellen aus dem Blut zum Entzündungsort zur Maskierung der peripheren Treg-Expansion. Dass Tregs als Reaktion auf die inflammatorische Stressantwort in entzündliches Gewebe übertreten, legt auch die numerische höhere, wenngleich nicht signifikant gestiegene Anzahl regulatorischer T-Zellen im atherosklerotischen Plaque operierter Tiere nahe. Ferner zeigten Saito et al., dass der Effekt der perioperativen Treg-Expansion insbesondere auf maximal- bis moderatinvasive Operationen zurückgeht (Saito et al. 2013). Die LeukoKAPE-1 Studie umfasste indessen Patienten, die sich unterschiedlich schweren chirurgischen Eingriffen unterzogen. Darüber hinaus ist denkbar, dass die 30-minütige Laparotomie in Verbindung mit einem Blutverlust von etwa 20 % ohne Volumensubstitution eine vergleichsweise schwere Belastung für das Tier darstellt, in dessen Folge die Treg-Expansion am dritten postoperativen Tag detektiert werden konnte. Die Anwendung divergierender durchflusszytometrischer Färbe- und Analyseverfahren behindert den direkten Vergleich zwischen tierexperimentellen und klinischen Daten zusätzlich. In Anlehnung an die Empfehlung des *Human ImmunoPhenotyping Consortium* (HIPC) wurden Tregs in LeukoKAPE-1 anhand ihrer hohen CD25- und niedrigen CD127-Expression charakterisiert (Finak et al. 2016). Die Quantifizierung muriner Tregs erfolgte hingegen mittels intrazellulären Foxp3-Nachweises. Grundsätzlich korreliert die Expression von Foxp3 invers mit jener von CD127. Nichtsdestotrotz exprimieren etwa 15 % der CD25⁺CD127⁻ Tregs kein Foxp3; umgekehrt behalten knapp 10 % der CD25⁺Foxp3⁺ Tregs die CD127-Expression bei (Rodriguez-Perea et al. 2016). Infolge dessen ist nicht auszuschließen, dass die Anzahl gemessener Tregs in Abhängigkeit der angewandten Methodik variierte. Nicht zuletzt wurde die Anzahl regulatorischer T-Zellen in LeukoKAPE-1 in Form absoluter Zellzahlen, im Tiermodell hingegen als relativer Anteil der CD3⁺CD4⁺ Population analysiert. Es ist möglich, dass der beobachtete relative Treg-Anstieg auf eine Abnahme der CD3⁺CD4⁺ Population zurückzuführen ist. Die Auswertung des relativen Treg-Anteils/CD3⁺CD4⁺ in LeukoKAPE-1 brachte gegenüber der absoluten Zellzahl jedoch keine Abweichung hervor (Daten nicht gezeigt).

Was dem in Mäusen beobachteten perioperativem Anstieg des Treg-Levels mechanistisch zugrunde liegt, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nur mutmaßen. Die Zunahme doppelt und einfach positiver Tregs im Thymus sowie die ausbleibende Expansion in sekundären lymphatischen Organen

deutet auf die Neubildung natürlicher Tregs im Thymus hin. Eine längere Überlebensdauer, die periphere Proliferation der Zellen sowie eine gesteigerte Polarisierung naiver T-Lymphozyten scheinen von nachrangiger Bedeutung, sind aber ebenso denkbar.

5.6 Tregs und perioperative Plaquestabilisierung

Die atheroprotektive Funktion von Tregs ist durch zahlreiche Studien belegt und allgemein anerkannt. In Mäusen führt eine anhaltende Reduktion peripherer Tregs zur Zunahme von Plaquegröße und -vulnerabilität (Ait-Oufella et al. 2006; Klingenberg et al. 2013). Umgekehrt konnte eine Abnahme der Atheroskleroselast sowie eine Steigerung der Plaquestabilität in Tieren mit längerfristig hohem Treg-Level nachgewiesen werden (Feng et al. 2009; Foks et al. 2011; Meng et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob Tregs der perioperativ bedingten Plaquestabilisierung entgegenwirken können.

Perioperativer Stress führte in atherosklerotischen Mäusen mit präoperativ niedrigem Treg-Level innerhalb eines Zeitraumes von nur drei Tagen zur Zunahme des nekrotischen Arealis sowie zur Abnahme des Plaque-Kollagengehaltes, beides Kennzeichen reduzierter Plaquestabilität. Diese Beobachtungen fügen sich in die bestehende Literatur ein. Tregs können den Kollagengehalt atherosklerotischer Plaques indirekt durch Aktivierung der Kollagensynthese in SMCs sowie durch Inhibierung des Kollagenabbaus erhöhen (Grainger David 2004; Maganto-Garcia et al. 2011). Zudem weisen Plaques atherosklerotischer Mäuse, die über einen Zeitraum von vier bis acht Wochen einer Treg-depletierenden Behandlung unterzogen wurden, etwa 50 % weniger Kollagen sowie eine Verdopplung des nekrotischen Arealis im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Ait-Oufella et al. 2006; Klingenberg et al. 2013). Tiere mit präoperativ hohem Treg-Level zeigten hingegen keine Zunahme des nekrotischen Plaqueareals unter perioperativem Stress. Gleichzeitig sank der Kollagengehalt atherosklerotischer Plaques, blieb jedoch oberhalb jenem anti-CD25-behandelter Tiere. Die Beobachtung, dass sich der Anteil glatter Muskelzellen zwischen den OP-Interventionsgruppen nicht unterschied, weist auf eine gesteigerte Aktivität Kollagen-sezernierender SMCs bei präoperativ erhöhtem Treg-Level hin. Darüber hinaus ist ein reduzierter Abbau extrazellulärer Matrixmoleküle durch die Treg-vermittelte Inhibierung von MMPs denkbar. Ungeachtet des präoperativen Treg-Levels ließ sich kein Effekt perioperativen Stresses auf das Volumen, den Lipidgehalt, sowie die Zellularität atherosklerotischer Läsionen nachweisen.

Aus der Literatur sowie aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe geht hervor, dass die im Rahmen perioperativen Stresses auftretenden immunologischen Vorgänge zu einer raschen Progression und Destabilisierung vorbestehender atherosklerotischer Plaques führen (Fuijkschot et al. 2016; Janssen et al. 2015). Dieser Effekt konnte anhand der untersuchten Tierzahl nicht repliziert werden. Das

postoperative Plaquevolumen unterschied sich in keiner der Behandlungsgruppen von jenem Sham-operierter Tiere. Mögliche Ursachen werden im Folgenden diskutiert.

Das perioperative Stressmodell geht auf die Arbeit von Janssen et al. zurück. Zur Untersuchung des Effektes perioperativen Stresses auf die Atherogenese wurden acht Wochen alte ApoE^{-/-} Mäuse auf eine siebenwöchige cholesterinreiche Sonderdiät gesetzt. Anschließend wurden die Tiere dem Stressmodell, bestehend aus Laparotomie und 400 µl Blutentnahme, einer Einzelintervention bestehend aus Laparotomie oder Blutentnahme, oder der Sham-Intervention unterzogen. Die Auswertung atherosklerotischer Plaques der Brachiozephalarterien erfolgte am dritten postoperativen Tag. Zwar führte bereits der Blutverlust zur signifikanten Zunahme des Plaquevolumens; der größte Effekt wurde jedoch durch die kombinierte Intervention aus Laparotomie und Blutentnahme erzielt (Janssen et al. 2015). Die Chronologie des Modells lehnt an die Ergebnisse einer Untersuchung zur Bildung von Plaquerupturen in Abhängigkeit der Diätdauer. Demnach treten Rupturen vermehrt in der achten Woche der Sonderfütterung auf (Johnson et al. 2005). Verglichen mit den Daten von Johnson et al. gingen aus Voruntersuchungen der vorliegenden Arbeit nach einer 7,5-wöchigen Fütterungsperiode deutlich kleinere Läsionen hervor. Zwar reduziert die Verwendung eines Inzuchtstammes die genetische Variabilität auf ein Minimum, jedoch sind Unterschiede zwischen einzelnen Zuchtpopulationen sowie durch äußere Einflussfaktoren (Jahreszeit, Haltungsbedingungen, etc.), in deren Folge es zu abweichenden Ergebnissen kommen kann, möglich. Hinzu kommt, dass der Schwellenwert von acht Wochen ausschließlich anhand männlicher ApoE^{-/-} Mäuse abgeleitet wurde (Johnson et al. 2005). In weiblichen Tieren unterliegt die Bildung atherosklerotischer Plaques hingegen einer abweichenden Kinetik (Johnson und Jackson 2001; Smith et al. 2010). Um den Effekt des präoperativen Treg-Levels auf die perioperative Destabilisierung bestehender atherosklerotischer Plaques beurteilen zu können, wurde die Dauer der Sonderdiät in der hier vorgelegten Arbeit auf insgesamt 9,5 Wochen verlängert. Es ist denkbar, dass der von Janssen et al. beschriebene Effekt nur auf frühstadiale Läsionen, nicht jedoch auf komplexe atherosklerotische Plaques zutrifft (Janssen et al. 2015).

Atherosklerotische ApoE^{-/-} Mäuse, die einem orthopädischen Operationsmodell, bestehend aus Osteotomie und anschließender Drahtosteosynthese des Femurs, unterzogen wurden, wiesen postoperativ größere Plaques der Aortenwurzel im Vergleich zur Sham-Kontrolle auf. Dieser Effekt manifestierte sich erst fünfzehn Tage postoperativ und war auf eine Zunahme des nekrotischen Areals zurückzuführen (Fuijkschot et al. 2016). Vor diesem Hintergrund ist anzunehmen, dass ein postoperativer Zeitraum von drei Tagen möglicherweise nicht ausreicht, um einen deutlichen Effekt präoperativer Treg-Level auf die perioperative Plaquestabilisierung nachweisen zu können. Ob sich dieser zu einem späteren Zeitpunkt manifestiert, werden Folgeprojekte zeigen.

Die Reduktion des Foxp3⁺ Treg-Levels fiel in ApoE^{-/-} Mäusen verglichen mit publizierten Daten aus C57BL/6 Wildtyp-Tieren geringer aus. Unter Anwendung des gleichen Protokolls konnte in C57BL/6 Wildtyp-Mäusen acht Tage nach Injektion eine maximale Reduktion zirkulierender CD25⁺Foxp3⁺ Tregs um 80 % und 47 % in Blut und Milz erzielt werden; in der vorliegenden Arbeit an ApoE^{-/-} Mäusen um lediglich 60 bzw. 25 %. In Lymphknoten erreichte die Reduktion sowohl in C57BL/6 Wildtyp als auch in ApoE^{-/-} Tieren Werte um 40 % (Setiady et al. 2010). ApoE^{-/-} Mäuse weisen *per se* etwa 20 % niedrigere Treg-Level als ihr Wildtyp Äquivalent auf (Mor et al. 2007). Dieser Effekt wird durch die Fütterung der cholesterinreichen Diät zusätzlich verstärkt (Xue-Mei et al. 2017). Der Vergleich von %CD4⁺CD25⁺Foxp⁺ Tregs in Isotyp-behandelten Tieren verdeutlicht die unterschiedliche Ausgangssituation in Wildtyp (10,9 ± 0,4 %) und ApoE^{-/-} (5,7 [5,0; 6,4]) Mäusen (Setiady et al. 2010). Es ist denkbar, dass der anti-CD25-vermittelte Treg-depletierende Effekt aufgrund des niedrigeren Ausgangswertes in ApoE^{-/-} Tieren weniger effizient ausfiel. Die IL-2/anti-IL-2-induzierte Expansion regulatorischer T-Zell-Level blieb ebenfalls unterhalb jener Werte, die in C57BL/6 Wildtyp Tieren erzielt wurden. Während aus publizierten Daten eine Treg-Expansion um Faktor 10-20 hervorgeht (Webster et al. 2009), wurde in der vorgelegten Arbeit lediglich ein fünffacher Anstieg des peripheren Treg-Levels beobachtet. Nichtsdestotrotz wiesen IL-2/anti-IL-2 injizierte Tiere zum Zeitpunkt der OP etwa neunfach höhere periphere Treg-Level im Vergleich zur anti-CD25-behandelten Gruppe auf. Es ist nicht auszuschließen, dass die vollständige Depletion, bspw. mittels *foxp3* siRNA oder durch Anwendung eines transgenen Mausmodells mit Diphtherietoxin-induzierbarer Treg-Depletion (DEREG), sowie der Adoptivtransfer regulatorischer T-Zellen einen deutlicheren Effekt präoperativer Treg-Level auf die perioperative Plaquestabilisierung hervorgerufen hätte.

Komplexe Plaques der Brachiozephalarterie in atherosklerotischen ApoE^{-/-} Mäusen stellen ein anerkanntes und weit verbreitetes Modell zur Untersuchung humaner Plaquestabilität dar (Matoba et al. 2013). Dennoch muss berücksichtigt werden, dass sie kein vollständiges Bild der Atheroskleroselast liefern (VanderLaan et al. 2004). Darüber hinaus unterliegen tierexperimentelle Daten fortwährend der Limitation eingeschränkter Übertragbarkeit auf den Patienten. Murine Läsionen unterscheiden sich in ihrer Größe, die sie relativ zum Gefäßlumen einnehmen, sowie in Aufbau und Zusammensetzung von humanen atherosklerotischen Plaques. Daraus resultieren unterschiedlich starke mechanische Kräfte, in dessen Folge humane Plaques einem 20-fach höheren Scherstress ausgesetzt seien (Matoba et al. 2013). Aus ethischen Gründen ist es nicht möglich, Untersuchungen am lebendigen Patienten durchzuführen. Gleichzeitig erlauben *in vitro* Systeme die zugrundeliegende Komplexität der Atherogenese nicht abzubilden. Vorteile der Verwendung eines murinen Modells bestehen in kurzen Generationszeiten sowie der einfachen und kostengünstigen Haltung der Tiere. Zudem überkommt ihr hohes Maß der Reproduzierbarkeit die oftmals

unvermeidlichen, durch demographische Variabilität und Begleiterkrankungen hervorgerufene Unschärfe klinischer Untersuchungen.

5.7 Therapeutische Optionen zur Induktion präoperativ hoher Treg-Level

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse geben erstmals Hinweise auf die Implikation von Tregs in die Entstehung perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen in kardialen Risikopatienten. Sollte sich in Folgeprojekten ein protektiver Effekt präoperativ hoher Treg-Level auf die perioperative Plaquestabilisierung bestätigen, könnte dies die Grundlage neuer Therapieansätze zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen bilden.

IL-2-induzierte Treg-Expansion

Dass die Hemmung inflammatorischer Signalkaskaden eine wirksame Therapie zur Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse darstellen kann, hat die CANTOS-Studie eindrücklich bewiesen (Ridker et al. 2017). In der LILACS-Studie wird derzeit untersucht, ob eine geringdosierte IL-2-Verabreichung, für die eine Erhöhung des peripheren Treg-Levels gezeigt werden konnte, vor dem Auftreten eines erneuten MIs oder dem Versterben aufgrund kardiovaskulärer Ursachen schützt (Zhao et al. 2018). Rekombinant hergestelltes humanes IL-2 ist in einigen Ländern bereits seit 1989 unter dem Namen Aldesleukin (Proleukin) zugelassen. Hochdosiert induziert es die Aktivierung von T-Effektorzellen und wird zur Behandlung von metastasierenden Nierenzellkarzinomen eingesetzt. Seine geringdosierte Wirksamkeit zur selektiven Treg-Expansion wurde in zwei klinischen Pilotprojekten an Patienten mit Graft-versus-Host Erkrankung und Hepatitis-C-Virus-induzierten Vaskulitis bestätigt. Über einen kurzen Zeitraum von fünf Tagen konnte eine Verdopplung des Treg-Pools sowie eine Verbesserung des Krankheitsbildes erzielt werden (Matsuoka et al. 2013; Saadoun et al. 2011). Aufgrund seiner schnellen Wirksamkeit eigne sich die kurzzeitige, geringdosierte Aldesleukin-Therapie auch zur präoperativen Optimierung von kardialen Risikopatienten, denen ein elektiver, nicht-kardiochirurgischer Eingriff bevorsteht.

Treg-Adoptivtransfer

Der Adoptivtransfer *ex vivo* expandierter Tregs zur Behandlung einer Reihe unterschiedlicher Autoimmunerkrankungen, darunter Morbus Crohn, Typ 1 Diabetes und autoimmune Hepatitis, wird bereits seit einigen Jahren umfangreich untersucht. Trotz vielversprechender Ergebnisse, die aus präklinischen Untersuchungen und Phase-I-Studien hervorgehen, scheint der Treg-Transfer derzeit noch fernab der Zulassung und Implementierung in das klinische Behandlungsspektrum (Romano et al. 2019).

Statine

Statine üben über ihre cholesterinsenkenden Eigenschaften hinaus eine Reihe lipid-unabhängiger Funktionen aus. Diese werden allgemein unter pleiotropen Effekten zusammengefasst und umfassen unter anderem ihre immunmodulatorische Wirkung auf Tregs. Aus einer aktuellen Meta-Analyse an Patienten mit akutem Koronarsyndrom geht hervor, dass Atorva- und Rosuvastatin-behandelte Patienten gegenüber der Placebo-Gruppe zweifach höhere Treg-Level aufweisen (Sorathia et al. 2019). Eine vier- bzw. achtwöchige Behandlung hyperlipidämischer Patienten mit Simvastatin oder Pravastatin resultiert in einer Zunahme CD4⁺CD25⁺ Zellen um Faktor 2,5 bis 4,5. Gleichzeitig weisen mononukleare Zellen eine erhöhte Foxp3-Expression auf (Mausner-Fainberg et al. 2008). In Mäusen führt eine sechswöchige Simvastatin-Therapie zur Zunahme regulatorischer T-Zellen in atherosklerotischen Läsionen. Darüber hinaus steigt die Konzentration anti-inflammatorischer Zytokine im Plaque. Diese Beobachtung wurde von einer verminderten TH1- und TH17-Antwort begleitet und stellt einen möglichen Mechanismus der lipidunabhängigen Plaquestabilisierung durch Statine dar (Meng et al. 2012). Janssen et al. zeigten zudem, dass eine hochdosierte Atorvastatin-Substitution über einen kurzen Zeitraum von drei Tagen prä- und postoperativ der perioperativen Plaquestabilisierung in atherosklerotischen ApoE^{-/-} Mäusen entgegenwirken kann (Janssen et al. 2015). *In vitro* Experimente legen nahe, dass der Statin-induzierte Treg-Anstieg auf eine verstärkte Polarisierung von CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ zu CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen zurückzuführen ist (Mausner-Fainberg et al. 2008). Mechanistisch liegt der Treg-Expansion die Inhibierung kleiner GTPasen zugrunde. Statine inhibieren die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG)-CoA-Reduktase (Istvan 2003), in dessen Folge die Zwischenprodukte der Cholesterin-Biosynthese Geranyl- und Farnesylpyrophosphat vermindert gebildet werden (Horn 2018). Dies hat die Inhibierung der GTPasen *Ras* und *Rho* zur Folge, was wiederum in einer verstärkten Foxp3-Aktivierung resultiert (Mor et al. 2008; Saoudi et al. 2014). Statine sind aufgrund ihrer risikomindernden Wirkung bereits fester Bestandteil internationaler Leitlinien (Duceppe et al. 2017; Fleisher et al. 2014; Kristensen et al. 2014). Vor diesem Hintergrund stellt eine perioperative Statintherapie keinen neuen, innovativen Therapieansatz zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen dar (Hindler et al. 2006; O'Neil-Callahan et al. 2005; Poldermans et al. 2003). Es ist jedoch denkbar, dass der Plaque-stabilisierende Effekt einer kurzzeitigen Statintherapie zumindest anteilig auf ihre Treg-modulierende Wirkung zurückzuführen ist.

Sonstige

Weitere Treg-modifizierende Therapieoptionen umfassen die Behandlung mit anti-CD3 und G-CSF. In Mäusen führt eine fünftägige anti-CD3-vermittelte orale Prækonditionierung von Tregs zur erhöhten TGF- β -Sekretion, was langfristig die reduzierte Bildung atherosklerotischer Plaques zur Folge hat

(Sasaki et al. 2009). Die Behandlung mit rekombinanten hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie G-CSF erfolgt üblicherweise zur Stimulation der Hämatopoese. In Mäusen wirkt eine chronische G-CSF-Therapie atheroprotektiv (Sinha et al. 2014). Die Behandlung über einen Zeitraum von sechs Tagen führt zur verstärkten Mobilisierung von Tregs aus dem Knochenmark. Darüber hinaus weisen mobilisierte Tregs ein verstärktes Autophagozytose-Verhalten auf, in dessen Folge sich die Lebensdauer der Zellen verlängert (Le Texier et al. 2016). Die Wirkung beider Therapieansätze konnte im Patienten bisher nicht bestätigt werden.

5.8 Schlussfolgerung

Chirurgische Eingriffe stellen eine hohe Belastung für kardiovaskulär vorerkrankte Patienten dar, in deren Folge es regelhaft zur Ausbildung einer systemischen Immunantwort kommt. Einzelne Leukozyten-Subpopulationen konnten abseits des operativen Kontextes mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert werden. Unter dem Einfluss perioperativen Stresses entwickelten kardiale Risikopatienten eine Tendenz in Richtung eines höheren kardiovaskulären Risikoprofils, das durch die Zunahme atherogener Monozyten-Subtypen charakterisiert war. Diese Kinetik konnte jedoch nicht mit dem Auftreten kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Ereignisse assoziiert werden. Vielmehr scheint die präoperative inflammatorische Disposition eines Patienten das Risiko kardiovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen zu determinieren.

Eine präoperativ hohe Konzentration des Monozyten-Aktivierungsmarkers PSEP erwies sich als unabhängiger Prädiktor des primären Endpunktes, dessen zusätzliche Berücksichtigung einen potentiellen Mehrwert für die präoperative kardiovaskuläre Risikoevaluierung hat. Dieser muss im Rahmen multizentrischer Studien validiert werden, bevor die präoperative PSEP-Bestimmung in den klinischen Alltag implementiert werden kann. Ob präoperatives PSEP auch in anderen Patientenkollektiven einen prognostischen Nutzen hat, bleibt zu untersuchen. Darüber hinaus bedarf die Aufklärung der zugrundeliegenden Pathophysiologie, in dessen Folge es zum PSEP-Anstieg kommt, grundlegender Untersuchungen. Da Mäuse von Natur aus kein PSEP exprimieren, gestaltet sich die Analyse im Tiermodell komplex.

Die Auswertung klinischer Daten wies zudem erstmals auf eine Assoziation präoperativ niedrigerer Treg-Level mit der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen hin. Ihr prognostischer Nutzen zur kardiovaskulären Risikostratifikation wurde bereits prospektiv im Rahmen der monozentrischen Beobachtungsstudie LeukoKAPE-2 validiert (Scholz et al. 2020). Sollte sich dieser multizentrisch bestätigen lassen, steht die klinische Implementierung bevor. Tregs weisen gegenüber kardialen Biomarkern den Vorteil auf, kausal an der Genese atherosklerotischer Plaques beteiligt zu sein. Es ist denkbar, dass die präoperative Quantifizierung regulatorischer T-Zellen die Identifizierung von Patienten mit vulnerablen Läsionen, die unter dem Einfluss perioperativen

Stresses zur Ruptur neigen und in dessen Folge ein akutes thrombotisches Ereignis verursachen können, ermöglicht.

Die Abschätzung des kardiovaskulären Risikos allein führt in der Regel jedoch nicht dazu, das individuelle Risiko eines Patienten für perioperative Komplikationen zu senken. Derzeit herrscht kein Konsens über den Umgang mit Patienten, denen ein hohes perioperatives Risiko prognostiziert wurde (Auerbach et al. 2007; Johansson et al. 2013; Mol et al. 2019). Zukünftige Studien müssen die Wirksamkeit der Initiierung bzw. Intensivierung medikamentöser Therapien, der Anpassung des peri- und postoperativen Monitorings sowie die Verschiebung des operativen Eingriffes auf einen späteren Zeitpunkt zur Senkung des perioperativen Risikos gezielt untersuchen. Die CANTOS-Studie hat gezeigt, dass die Inhibierung inflammatorischer Signalkaskaden mittels Canakinumab in atherosklerotischen Patienten mit hohem CRP zur Reduktion der kardiovaskulären Ereignisrate führt (Ridker et al. 2017). Angesichts des hohen kardiovaskulären Risikos in Patienten mit inflammatorischer Prädisposition stellt sich die Frage, ob und zu welchem Zeitpunkt eine anti-inflammatorische Therapie zur Senkung des perioperativen Risikos führen kann.

Dass präoperativ niedrigere Treg-Level kausal an der Entstehung perioperativer kardiovaskulärer Ereignisse beteiligt sind, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht nachgewiesen werden. Einzelne Ergebnisse deuten hingegen darauf hin, dass präoperativ hohe Treg-Level vor einer durch perioperativen Stress induzierten Destabilisierung atherosklerotischer Plaques schützen könnten. Im Rahmen von Folgeprojekten soll untersucht werden, ob sich dieser Effekt zu einem späteren Zeitpunkt manifestiert. Erweisen sich präoperativ hohe Treg-Level als protektiv, könnte dies die Grundlage neuer Therapieansätze, bspw. in Form Treg-stimulierender bzw. -proliferierender Substanzen, zur Minimierung der perioperativen Mortalität und Morbidität nach nicht-kardiochirurgischen Operationen bilden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit werden jährlich mehr als 312 Millionen Operationen durchgeführt und die Tendenz ist weiter steigend. Dabei stellen kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Komplikationen eine der häufigsten Ursachen für perioperative Morbidität und Letalität dar. Insbesondere Patienten mit vorbestehender kardiovaskulärer Grunderkrankung weisen ein vielfach erhöhtes Risiko auf. Eine zuverlässige und präzise Patientenevaluierung erlaubt die Abschätzung des individuellen Risikos, auf dessen Grundlage gezielt Maßnahmen zur Optimierung des Zustandes und der Prävention perioperativer kardiovaskulärer Ereignisse eingeleitet werden können.

Eine Vielzahl perioperativ auftretender Myokardinfarkte ist auf die Ruptur atherosklerotischer Plaques zurückzuführen, in deren Folge es zur Ausbildung eines gefäßverschließenden Thrombus kommen kann. Die Ursachen sind multifaktoriell, jedoch scheinen durch perioperativen Stress induzierte immunologische Vorgänge eine wesentliche Rolle in der perioperativen Plaquestabilisierung einzunehmen. Abseits chirurgischer Eingriffe korrelieren einzelne Leukozyten-Subpopulationen langfristig mit dem Auftreten kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Ereignisse. Ziel der vorgelegten Arbeit war zu untersuchen, ob diese Effekte auch für die Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen eine relevante Bedeutung einnehmen.

In der prospektiven Beobachtungsstudie LeukoKAPE-1 wurden 13 Leukozyten-Subpopulationen, dessen Auftreten langfristig mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist, in 38 kardialen Risikopatienten, die sich einem nicht-kardiochirurgischen Eingriff unterzogen, bis einschließlich des zweiten postoperativen Tages quantifiziert. Die Kohorte entwickelte unter dem Einfluss perioperativen Stresses eine Tendenz in Richtung eines höheren kardiovaskulären Risikoprofils, was sich in Form einer konsekutiven Zunahme atherogener klassischer und intermediärer Monozyten manifestierte. Nicht-klassische Monozyten sanken hingegen kurzzeitig; lymphoide Zellpopulationen blieben gegenüber ihren präoperativen Ausgangswerten konstant. Der perioperative Monozyten-Anstieg war von einer konstanten Zunahme des Monozyten-Aktivierungsmarkers Presepsin begleitet. Patienten, die den zusammengesetzten primären Endpunkt (kardiovaskulärer Tod, Myokardinfarkt, Myokardischämie und thromboembolischer Schlaganfall) während des 30-tägigen Beobachtungszeitraumes erreichten, wiesen gegenüber Patienten ohne Endpunkt präoperativ höhere Presepsin-Konzentrationen auf. Presepsin oberhalb des abgeleiteten Cut-offs von 184 pg/ml war mit dem Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen assoziiert. Diese Ergebnisse ließen sich im Rahmen einer *post-hoc* Analyse der unabhängigen LeukoKAPE-2 Kohorte (n=222) replizieren. Presepsin >184 pg/ml erwies sich unter Berücksichtigung präoperativer Einflussfaktoren als unabhängiger Prädiktor des primären Endpunktes. Sensitivitäts- und Reklassifizierungsanalysen

deuteten zudem auf einen prognostischen Mehrwert der präoperativen Presepsin-Bestimmung zur leitliniengerechten Risikoevaluierung für kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen hin. Eine prospektive, multizentrische Beobachtungsstudie wird zeigen (NCT03489486), ob sich Prespesin als Surrogat-Marker der inflammatorischen Disposition eines Patienten für die präoperative kardiovaskuläre Risikoprädiktion qualifiziert.

In LeukoKAPE-1 korrelierten präoperative regulatorische T-Zell-Level negativ mit der Inzidenz perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen. In Mäusen führt eine anhaltende Reduktion regulatorischer T-Zellen zur Zunahme von Plaquegröße und -vulnerabilität. Umgekehrt geht die Expansion der Zellen mit einer verminderten Bildung atherosklerotischer Plaques sowie einer stabileren Plaquearchitektur einher. Ob präoperative regulatorische T-Zell-Level in einem kausalen Zusammenhang mit der perioperativ auftretenden Destabilisierung atherosklerotischer Plaques stehen, wurde in einem etablierten atherosklerotischen Mausmodell untersucht. Dazu wurden Apolipoprotein E-defiziente Mäuse mit präoperativ moduliertem regulatorischen T-Zell-Level einer Laparotomie mit moderatem Blutverlust unterzogen. Die Antikörper-vermittelte *in vivo* Modulation regulatorischer T-Zellen erwies sich als spezifisch und resultierte in einer Reduktion der Zellen um etwa 60 % sowie in einer Expansion zirkulierender regulatorischer T-Zellen um Faktor fünf gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Die histomorphometrische Auswertung atherosklerotischer Plaques der Brachiozephalarterien erfolgte am dritten postoperativen Tag. Unabhängig des regulatorischen T-Zell-Levels führte die Intervention zur Abnahme des Plaque-Kollagengehaltes. Operierte Mäuse mit präoperativ reduziertem regulatorischen T-Zell-Level wiesen gegenüber Tieren mit hohem regulatorischen T-Zell-Level tendenziell instabilere Plaques auf, was sich in Form eines höheren Nekrose- und eines niedrigeren Kollagengehaltes manifestierte. Präoperativ niedrige regulatorische T-Zell-Level waren zudem mit einer numerischen Verdopplung der Anzahl verdeckter fibröser Kappen als Zeichen vergangener Plaquerupturen assoziiert. Hingegen konnte kein Effekt des präoperativen regulatorischen T-Zell-Levels auf das postoperative Plaquevolumen, den Anteil glatter Muskelzellen, den Lipidgehalt sowie die Zellularität atherosklerotischer Läsionen nachgewiesen werden. Folgeprojekte werden zeigen, ob die Verlängerung des postoperativen Zeitraumes von drei auf zehn Tage einen deutlicheren Effekt präoperativer Treg-Level auf die perioperative Plaquestabilisierung hervorbringt.

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse geben erstmals Hinweise auf die Implikation von Tregs in der Entstehung perioperativer kardiovaskulärer Komplikationen. Sollte sich in Folgeprojekten ein protektiver Effekt präoperativ hoher Treg-Level auf die perioperative Plaquestabilisierung bestätigen, könnte dies die Grundlage neuer Therapieansätze zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen bilden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ackland, G. L., Abbott, T. E. F., Cain, D., Edwards, M. R., Sultan, P., Karmali, S. N., Fowler, A. J., Whittle, J. R., MacDonald, N. J., Reyes, A., Paredes, L. G., Stephens, R. C. M., Del Arroyo, A. G., Woldman, S., Archbold, R. A., Wragg, A., Kam, E., Ahmad, T., Khan, A. W., Niebrzegowska, E. und Pearse, R. M. (2019). **Preoperative systemic inflammation and perioperative myocardial injury: prospective observational multicentre cohort study of patients undergoing non-cardiac surgery.** *Br J Anaesth* 122, 180-187, doi: 10.1016/j.bja.2018.09.002.
- Ait-Oufella, H., Salomon, B. L., Potteaux, S., Robertson, A. K., Gourdy, P., Zoll, J., Merval, R., Esposito, B., Cohen, J. L., Fisson, S., Flavell, R. A., Hansson, G. K., Klatzmann, D., Tedgui, A. und Mallat, Z. (2006). **Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice.** *Nat Med* 12, 178-180, doi: 10.1038/nm1343.
- Alarcon, B., Swamy, M., van Santen, H. M. und Schamel, W. W. (2006). **T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity.** *EMBO Rep* 7, 490-495, doi: 10.1038/sj.embor.7400682.
- Ammirati, E., Moroni, F., Magnoni, M. und Camici, P. G. (2015). **The role of T and B cells in human atherosclerosis and atherothrombosis.** *Clin Exp Immunol* 179, 173-187, doi: 10.1111/cei.12477.
- Angele, M. K. und Chaudry, I. H. (2005). **Surgical trauma and immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches.** *Langenbeck's Archives of Surgery* 390, 333-341, doi: 10.1007/s00423-005-0557-4.
- Arai, Y., Mizugishi, K., Nonomura, K., Naitoh, K., Takaori-Kondo, A. und Yamashita, K. (2015). **Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of presepsin.** *J Infect Chemother* 21, 564-569, doi: 10.1016/j.jiac.2015.04.011.
- Arce-Sillas, A., Alvarez-Luquin, D. D., Tamaya-Dominguez, B., Gomez-Fuentes, S., Trejo-Garcia, A., Melo-Salas, M., Cardenas, G., Rodriguez-Ramirez, J. und Adalid-Peralta, L. (2016). **Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation.** *J Immunol Res* 2016, 1720827, doi: 10.1155/2016/1720827.
- Arias, M. A., Rey Nores, J. E., Vita, N., Stelter, F., Borysiewicz, L. K., Ferrara, P. und Labetta, M. O. (2000). **Cutting edge: human B cell function is regulated by interaction with soluble CD14: opposite effects on IgG1 and IgE production.** *J Immunol* 164, 3480-3486, doi: 10.4049/jimmunol.164.7.3480.
- Auerbach, A. D., Rasic, M. A., Sehgal, N., Ide, B., Stone, B. und Maselli, J. (2007). **Opportunity missed: medical consultation, resource use, and quality of care of patients undergoing major surgery.** *Arch Intern Med* 167, 2338-2344, doi: 10.1001/archinte.167.21.2338.
- Back, M., Weber, C. und Lutgens, E. (2015). **Regulation of atherosclerotic plaque inflammation.** *J Intern Med* 278, 462-482, doi: 10.1111/joim.12367.
- Backteman, K., Ernerudh, J. und Jonasson, L. (2014). **Natural killer (NK) cell deficit in coronary artery disease: no aberrations in phenotype but sustained reduction of NK cells is associated with low-grade inflammation.** *Clin Exp Immunol* 175, 104-112, doi: 10.1111/cei.12210.
- Bas, S., Gauthier, B. R., Spenato, U., Stingelin, S. und Gabay, C. (2004). **CD14 is an acute-phase protein.** *J Immunol* 172, 4470-4479.
- Bazil, V. und Strominger, J. L. (1991). **Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes.** *J Immunol* 147, 1567-1574.
- Berg, K. E., Ljungcrantz, I., Andersson, L., Bryngelsson, C., Hedblad, B., Fredrikson, G. N., Nilsson, J. und Bjorkbacka, H. (2012). **Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events.** *Circ Cardiovasc Genet* 5, 122-131, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.960385.

- Bergstrom, I., Backteman, K., Lundberg, A., Ernerudh, J. und Jonasson, L. (2012). **Persistent accumulation of interferon-gamma-producing CD8+CD56+ T cells in blood from patients with coronary artery disease.** *Atherosclerosis* 224, 515-520, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.033.
- Biccard, B. M., Naidoo, P. und de Vasconcellos, K. (2012). **What is the best pre-operative risk stratification tool for major adverse cardiac events following elective vascular surgery? A prospective observational cohort study evaluating pre-operative myocardial ischaemia monitoring and biomarker analysis.** *Anaesthesia* 67, 389-395, doi: 10.1111/j.1365-2044.2011.07020.x.
- Biccard, B. M. und Rodseth, R. N. (2011). **Utility of clinical risk predictors for preoperative cardiovascular risk prediction.** *Br J Anaesth* 107, 133-143, doi: 10.1093/bja/aer194.
- Bierle, D. M., Raslau, D., Regan, D. W., Sundsted, K. K. und Mauck, K. F. (2019). **Preoperative Evaluation Before Noncardiac Surgery.** *Mayo Clinic Proceedings*, doi: 10.1016/j.mayocp.2019.04.029.
- Bilimoria, K. Y., Liu, Y., Paruch, J. L., Zhou, L., Kmiecik, T. E., Ko, C. Y. und Cohen, M. E. (2013). **Development and evaluation of the universal ACS NSQIP surgical risk calculator: a decision aid and informed consent tool for patients and surgeons.** *J Am Coll Surg* 217, 833-842.e831-833, doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.07.385.
- Blankenberg, S. (2005). **Biomarker und Atherosklerose.** *Kardio up* 1, 194-199, doi: 10.1055/s-2005-870434.
- Bobryshev, Y. V. und Lord, R. S. A. (2005). **Identification of natural killer cells in human atherosclerotic plaque.** *Atherosclerosis* 180, 423-427, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.01.046.
- Bomberg, H., Klingele, M., Wagenpfeil, S., Spanuth, E., Volk, T., Sessler, D. I., Schafers, H. J. und Groesdonk, H. V. (2017). **Presepsin (sCD14-ST) Is a Novel Marker for Risk Stratification in Cardiac Surgery Patients.** *Anesthesiology* 126, 631-642, doi: 10.1097/ALN.0000000000001522.
- Bonaccorsi, I., De Pasquale, C., Campana, S., Barberi, C., Cavaliere, R., Benedetto, F. und Ferlazzo, G. (2015). **Natural killer cells in the innate immunity network of atherosclerosis.** *Immunol Lett* 168, 51-57, doi: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.09.006>.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M. L., Rossini, P. M., Battistini, L., Rotzschke, O. und Falk, K. (2007). **Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression.** *Blood* 110, 1225-1232, doi: 10.1182/blood-2006-12-064527.
- Botto, F., Alonso-Coello, P., Chan, M. T., Villar, J. C., Xavier, D., Srinathan, S., Guyatt, G., Cruz, P., Graham, M., Wang, C. Y., Berwanger, O., Pearce, R. M., Biccard, B. M., Abraham, V., Malaga, G., Hillis, G. S., Rodseth, R. N., Cook, D., Polanczyk, C. A., Szczeklik, W., Sessler, D. I., Sheth, T., Ackland, G. L., Leuwer, M., Garg, A. X., Lemanach, Y., Pettit, S., Heels-Ansdell, D., Luratibuse, G., Walsh, M., Sapsford, R., Schunemann, H. J., Kurz, A., Thomas, S., Mrkobrada, M., Thabane, L., Gerstein, H., Paniagua, P., Nagele, P., Raina, P., Yusuf, S., Devereaux, P. J., Devereaux, P. J., Sessler, D. I., Walsh, M., Guyatt, G., McQueen, M. J., Bhandari, M., Cook, D., Bosch, J., Buckley, N., Yusuf, S., Chow, C. K., Hillis, G. S., Halliwell, R., Li, S., Lee, V. W., Mooney, J., Polanczyk, C. A., Furtado, M. V., Berwanger, O., Suzumura, E., Santucci, E., Leite, K., Santo, J. A., Jardim, C. A., Cavalcanti, A. B., Guimaraes, H. P., Jacka, M. J., Graham, M., McAlister, F., McMurtry, S., Townsend, D., Pannu, N., Bagshaw, S., Bessissow, A., Bhandari, M., Duceppe, E., Eikelboom, J., Ganame, J., Hankinson, J., Hill, S., Jolly, S., Lamy, A., Ling, E., Magloire, P., Pare, G., Reddy, D., Szalay, D., Tittley, J., Weitz, J., Whitlock, R., Darvish-Kazim, S., Debeer, J., Kavsak, P., Kearon, C., Mizera, R., O'Donnell, M., McQueen, M., Pinthus, J., Ribas, S., Simunovic, M., Tandon, V., Vanhelder, T., Winemaker, M., Gerstein, H., McDonald, S., O'Bryne, P., Patel, A., Paul, J., Punthakee, Z., Raymer, K., Salehian, O., Spencer, F., Walter, S., Worster, A., Adili, A., Clase, C., Cook, D., Crowther, M., Douketis, J., Gangji, A., Jackson, P., Lim, W., Lovrics, P., Mazzadi, S., Orovan, W., Rudkowski, J., Soth, M., Tiboni, M., Acedillo, R., Garg, A., Hildebrand, A., Lam, N., Macneil, D., Mrkobrada, M., Roshanov, P. S., Srinathan, S. K., Ramsey, C., John, P. S., Thorlacius, L., Siddiqui, F. S., Grocott, H. P., McKay, A., Lee, T. W., Amadeo, R., Funk, D., McDonald, H., Zacharias, J., Villar, J. C., Cortes, O. L., Chaparro, M. S., Vasquez, S., Castaneda, A., Ferreira, S., Coriat, P., Monneret, D., Goarin, J. P., Esteve, C. I., Royer, C., Daas, G., Chan, M. T., Choi, G. Y., Gin, T., Lit, L. C., Xavier, D., Sigamani, A., Faruqui, A., Dhanpal, R., Almeida, S., Cherian, J., Furuqah, S., Abraham, V., Afzal, L., George, P., Mala, S., Schunemann, H., Muti, P., Vizza, E.,

- Wang, C. Y., Ong, G. S., Mansor, M., Tan, A. S., Shariffuddin, I., Vasanthan, V., Hashim, N. H., Undok, A. W., Ki, U., Lai, H. Y., Ahmad, W. A., Razack, A. H., Malaga, G., Valderrama-Victoria, V., Loza-Herrera, J. D., De Los Angeles Lazo, M., Rotta-Rotta, A., Szczeklik, W., Sokolowska, B., Musial, J., Gorka, J., Iwaszczuk, P., Kozka, M., Chwala, M., Raczek, M., Mrowiecki, T., Kaczmarek, B., Biccadd, B., Cassimjee, H., Gopalan, D., Kisten, T., Mugabi, A., Naidoo, P., Naidoo, R., Rodseth, R., Skinner, D., Torborg, A., Paniagua, P., Urrutia, G., Maestre, M. L., Santalo, M., Gonzalez, R., Font, A., Martinez, C., Pelaez, X., De Antonio, M., Villamor, J. M., Garcia, J. A., Ferre, M. J., Popova, E., Alonso-Coello, P., Garutti, I., Cruz, P., Fernandez, C., Palencia, M., Diaz, S., Del Castillo, T., Varela, A., de Miguel, A., Munoz, M., Pineiro, P., Cusati, G., Del Barrio, M., Membrillo, M. J., Orozco, D., Reyes, F., Sapsford, R. J., Barth, J., Scott, J., Hall, A., Howell, S., Lobley, M., Woods, J., Howard, S., Fletcher, J., Dewhirst, N., Williams, C., Rushton, A., Welters, I., Leuwer, M., Pearse, R., Ackland, G., Khan, A., Niebrzegowska, E., Benton, S., Wragg, A., Archbold, A., Smith, A., McAlees, E., Ramballi, C., Macdonald, N., Januszewska, M., Stephens, R., Reyes, A., Paredes, L. G., Sultan, P., Cain, D., Whittle, J., Del Arroyo, A. G., Sessler, D. I., Kurz, A., Sun, Z., Finnegan, P. S., Egan, C., Honar, H., Shahinyan, A., Panjasawatwong, K., Fu, A. Y., Wang, S., Reineks, E., Nagele, P., Blood, J., Kalin, M., Gibson, D., Wildes, T., Vascular events In noncardiac Surgery patients cOhort evaluatioN Writing Group, o. b. o. T. V. e. I. n. S. p. c. e. I., Appendix 1. The Vascular events In noncardiac Surgery patients cOhort evaluatio, N. S. I. W. G., Appendix 2. The Vascular events In noncardiac Surgery patients cOhort evaluatio, N. O. C. und Vascular events In noncardiac Surgery patients cOhort evaluatio, N. V. S. I. (2014). **Myocardial injury after noncardiac surgery: a large, international, prospective cohort study establishing diagnostic criteria, characteristics, predictors, and 30-day outcomes.** *Anesthesiology* 120, 564-578, doi: 10.1097/ALN.000000000000113.
- Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M. P., Surh, C. D. und Sprent, J. (2006). **Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes.** *Science* 311, 1924-1927, doi: 10.1126/science.1122927.
- Brune, I. B., Wilke, W., Hensler, T., Holzmann, B. und Siewert, J. R. (1999). **Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery.** *Am J Surg* 177, 55-60, doi: 10.1016/s0002-9610(98)00299-2.
- Bruunsgaard, H., Pedersen, A. N., Schroll, M., Skinhoj, P. und Pedersen, B. K. (2001). **Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans.** *Exp Gerontol* 37, 127-136, doi: 10.1016/s0531-5565(01)00162-0.
- Buono, C., Binder, C. J., Stavrakis, G., Witztum, J. L., Glimcher, L. H. und Lichtman, A. H. (2005). **T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1596-1601, doi: 10.1073/pnas.0409015102.
- Buono, C., Come, C. E., Stavrakis, G., Maguire, G. F., Connelly, P. W. und Lichtman, A. H. (2003). **Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 454-460, doi: 10.1161/01.Atv.0000059419.11002.6e.
- Burchill, M. A., Yang, J., Vang, K. B. und Farrar, M. A. (2007). **Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis.** *Immunol Lett* 114, 1-8, doi: 10.1016/j.imlet.2007.08.005.
- Buse, G. L., Manns, B., Lamy, A., Guyatt, G., Polanczyk, C. A., Chan, M. T. V., Wang, C. Y., Villar, J. C., Sigamani, A., Sessler, D. I., Berwanger, O., Biccadd, B. M., Pearse, R., Urrutia, G., Szczeklik, W., Garutti, I., Srinathan, S., Malaga, G., Abraham, V., Chow, C. K., Jacka, M. J., Tiboni, M., Ackland, G., Macneil, D., Sapsford, R., Leuwer, M., Le Manach, Y. und Devereaux, P. J. (2018). **Troponin T monitoring to detect myocardial injury after noncardiac surgery: a cost-consequence analysis.** *Can J Surg* 61, 185-194, doi: 10.1503/cjs.010217.
- Butcher, M. J., Gjurich, B. N., Phillips, T. und Galkina, E. V. (2012). **The IL-17A/IL-17RA axis plays a proatherogenic role via the regulation of aortic myeloid cell recruitment.** *Circ Res* 110, 675-687, doi: 10.1161/circresaha.111.261784.
- Caglar, F. N. T., Isiksacan, N., Biyik, I., Opan, S., Cebe, H. und Akturk, I. F. (2017). **Presepsin (sCD14-ST): could it be a novel marker for the diagnosis of ST elevation myocardial infarction?** *Arch Med Sci Atheroscler Dis* 2, e3-e8, doi: 10.5114/amsad.2017.66827.

- Cao, D., Malmstrom, V., Baecher-Allan, C., Hafler, D., Klareskog, L. und Trollmo, C. (2003). **Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis.** *Eur J Immunol* 33, 215-223, doi: 10.1002/immu.200390024.
- Caramalho, Í., Nunes-Cabaço, H., Foxall, R. B. und Sousa, A. E. (2015). **Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus.** *Front Immunol* 6, 395-395, doi: 10.3389/fimmu.2015.00395.
- Chenevier-Gobeaux, C., Borderie, D., Weiss, N., Mallet-Coste, T. und Claessens, Y. E. (2015). **Presepsin (sCD14-ST), an innate immune response marker in sepsis.** *Clin Chim Acta* 450, 97-103, doi: 10.1016/j.cca.2015.06.026.
- Cheng, X., Taleb, S., Wang, J., Tang, T. T., Chen, J., Gao, X. L., Yao, R., Xie, J. J., Yu, X., Xia, N., Yan, X. X., Nie, S. F., Liao, M. Y., Cheng, Y., Mallat, Z. und Liao, Y. H. (2011). **Inhibition of IL-17A in atherosclerosis.** *Atherosclerosis* 215, 471-474, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.034.
- Cheng, X., Yu, X., Ding, Y. J., Fu, Q. Q., Xie, J. J., Tang, T. T., Yao, R., Chen, Y. und Liao, Y. H. (2008). **The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome.** *Clin Immunol* 127, 89-97, doi: 10.1016/j.clim.2008.01.009.
- Chesnaye, N. C., Szummer, K., Bárány, P., Heimbürger, O., Magin, H., Almquist, T., Uhlin, F., Dekker Friedo, W., Wanner, C., Jager Kitty, J., Evans, M., Cupisti, A., Sagliocca, A., Ferraro, A., Musiała, A., Mele, A., Naticchia, A., Còsaro, A., Woodman, A., Ranghino, A., Stucchi, A., Jonsson, A., Schneider, A., Pignataro, A., Schrandt, A., Torp, A., McKeever, A., Szymczak, A., Blom, A. L., De Blasio, A., Pani, A., Tsalouichos, A., Ullah, A., McLaren, B., van Dam, B., Iwig, B., Antonio, B., Iorio Biagio Raffaele, D., Rogland, B., Perras, B., Alessandra, B., Harron, C., Wallquist, C., Siegert, C., Barrett, C., Gaillard, C., Abaterusso, C., Beerenhout, C., O'Toole, C., Somma, C., Marx, C., Drechsler, C., Summersgill, C., Blaser, C., D'Alessandro, C., Emde, C., Torino, C., Zullo, C., Pozzi, C., Geddes, C., Verburgh, C., Janmaat, C., Bergamo, D., Ciurlino, D., Motta, D., Glowski, D., McGlynn, D., Vargas, D., Krieter, D., Russo, D., Fuchs, D., Sands, D., Hoogeveen, E., Irmeler, E., Dimény, E., Favaro, E., Platen, E., Olczyk, E., Hoorn, E., Vigotti, F., Caskey, F., Ansali, F., Conte, F., Cianciotta, F., Giacchino, F., Cappellaio, F., Pizzarelli, F., Sundelin, F., Greco, G., Roy, G., Porto, G., Bigatti, G., Marinangeli, G., Cabiddu, G., Hirst, G., Fumagalli, G., Caloro, G., Piccoli, G., Capasso, G., Gambaro, G., Tognarelli, G., Bonforte, G., Conte, G., Toscano, G., Rosso Goffredo, D., Welander, G., Augustyniak-Bartosik, H., Boots, J., Schmidt-Gürtler, H., King, H., McNally, H., Schlee, H., Boom, H., Naujoks, H., Masri-Senghor, H., Murtagh, H., Rayner, H., Miśkowiec-Wiśniewska, I., Schlee, I., Capizzi, I., Căsar, S., Hernandez Isabel, B., Baragetti, I., Manitius, J., Turner, J., Eijgenraam, J. W., Kooman, J., Beige, J., Pondel, J., Wilcox, J., Berdeprado, J., Röthele, J., Wong, J., Rotmans, J., Banda, J., Mazur, J., Hahn, K., Jędrzejak, K., Nowańska, K., Blouin, K., Neumeier, K., Jones, K., Anding-Rost, K., Grøntoft, K. C., Oldrizzi, L., Haydock, L., Vogt, L., Wilkinson, L., Gesualdo, L., Schramm, L., Biancone, L., Nowak, Ł., Raasveld, M., Szymczak, M., Durlík, M., Magnano, M., Vervloet, M., Ricardi, M., Carmody, M., Di Bari, M., Laudato, M., Sirico Maria, L., Stendahl, M., Svensson, M., Weetman, M., van Buren, M., Joinson, M., Ferraresi, M., Dutton, M., Postorino, M., van Diepen, M., Matthews, M., Provenzano, M., Hopf, M., Malaguti, M., Wuttke, N., Morgan, N., Palmieri, N., Frischmuth, N., Bleakley, N., Murrone, P., Cockwell, P., Leurs, P., Roderick, P., Voskamp, P., Kashioulis, P., Ichtariis, P., Blankestijn, P., Kirste, P., Schulz, P., Mason, P., Kalra, P., Cirillo, P., Dattolo, P., Acampora, P., Sajith, R., Nigro, R., Boero, R., Scarpioni, R., Sicoli, R., Malandra, R., Aign, S., van Esch, S., Chapman, S., Biribauer, S., Navjee, S., Crosbie, S., Brown, S., Tickle, S., Manan, S., Röser, S., Savoldi, S., Bertoli, S., Borrelli, S., Boorsma, S., Heidenreich, S., Melander, S., Maxia, S., Maffei, S., Mangano, S., Palm, S., Konings, C., Mathavakkannan, S., Schwedler, S., Delrieux, S., Renker, S., Schättel, S., Dorota, S., Cicchetti, T., Nieszporek, T., Stephan, T., Schmiedeke, T., Weinreich, T., Leimbach, T., Rappa, T., Stövesand, T., Bahner, U., Jensen, U., Palazzo, V., De Simone, W., Seeger, W., Kuan, Y., Heleniak, Z. und Aydin, Z. (2019). **Association Between Renal Function and Troponin T Over Time in Stable Chronic Kidney Disease Patients.** *J Am Heart Assoc* 8, e013091, doi: 10.1161/JAHA.119.013091.
- Choi, J. H., Cho, D. K., Song, Y. B., Hahn, J. Y., Choi, S., Gwon, H. C., Kim, D. K., Lee, S. H., Oh, J. K. und Jeon, E. S. (2010). **Preoperative NT-proBNP and CRP predict perioperative major cardiovascular events in non-cardiac surgery.** *Heart* 96, 56-62, doi: 10.1136/hrt.2009.181388.
- Chun, K. H. und Seong, S. Y. (2010). **CD14 but not MD2 transmit signals from DAMP.** *Int Immunopharmacol* 10, 98-106, doi: 10.1016/j.intimp.2009.10.002.

- Clementi, A., Virzì, G. M., Muciño-Bermejo, M. J., Nalesso, F., Giavarina, D., Carta, M., Brocca, A., de Cal, M., Hinna Danesi, T., Zanella, M., Marchionna, N., Brendolan, A., Battaglia, G. G., Salvador, L. und Ronco, C. (2019). **Presepsin and Procalcitonin Levels as Markers of Adverse Postoperative Complications and Mortality in Cardiac Surgery Patients.** *Blood Purif* 47, 140-148, doi: 10.1159/000494207.
- Clerc, G. und Rouz, P. M. (1997). **Lymphocyte subsets in severe atherosclerosis before revascularization.** *Ann Intern Med* 126, 1004-1005, doi: 10.7326/0003-4819-126-12-199706150-00028.
- Cochain, C., Koch, M., Chaudhari Sweena, M., Busch, M., Pelisek, J., Boon, L. und Zerneck, A. (2015). **CD8+ T Cells Regulate Monopoiesis and Circulating Ly6Chigh Monocyte Levels in Atherosclerosis in Mice.** *Circ Res* 117, 244-253, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.304611.
- Collins, G. J., Jr., Barber, J. A., Zajtchuk, R., Vanek, D. und Malogne, L. A. (1977). **The effects of operative stress on the coagulation profile.** *Am J Surg* 133, 612-616, doi: 10.1016/0002-9610(77)90022-8.
- Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomini, P. R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C. J., Brown, S. A., Rehg, J. E., Jones, M. L., Ni, H.-T., Artis, D., Turk, M. J. und Vignali, D. A. A. (2010). **IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population.** *Nat Immunol* 11, 1093-1101, doi: 10.1038/ni.1952.
- Cruz, F. F., Rocco, P. R. M. und Pelosi, P. (2017). **Anti-inflammatory properties of anesthetic agents.** *Crit Care* 21, 67-67, doi: 10.1186/s13054-017-1645-x.
- Dai, G., Kaazempur-Mofrad, M. R., Natarajan, S., Zhang, Y., Vaughn, S., Blackman, B. R., Kamm, R. D., Garcia-Cardena, G. und Gimbrone, M. A., Jr. (2004). **Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14871-14876, doi: 10.1073/pnas.0406073101.
- Danzaki, K., Matsui, Y., Ikesue, M., Ohta, D., Ito, K., Kanayama, M., Kurotaki, D., Morimoto, J., Iwakura, Y., Yagita, H., Tsutsui, H. und Ueda, T. (2012). **Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 273-280, doi: 10.1161/atvbaha.111.229997.
- Davenport, P. und Tipping, P. G. (2003). **The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.** *Am J Pathol* 163, 1117-1125, doi: 10.1016/s0002-9440(10)63471-2.
- de Boer, O. J., van der Meer, J. J., Teeling, P., van der Loos, C. M. und van der Wal, A. C. (2007). **Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions.** *PLoS One* 2, e779, doi: 10.1371/journal.pone.0000779.
- Decker, D., Schondorf, M., Bidlingmaier, F., Hirner, A. und von Ruecker, A. A. (1996). **Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma.** *Surgery* 119, 316-325, doi: 10.1016/s0039-6060(96)80118-8.
- Decker, D., Tolba, R., Springer, W., Lauschke, H., Hirner, A. und von Ruecker, A. (2005). **Abdominal surgical interventions: local and systemic consequences for the immune system--a prospective study on elective gastrointestinal surgery.** *J Surg Res* 126, 12-18, doi: 10.1016/j.jss.2005.01.006.
- Desborough, J. P. (2000). **The stress response to trauma and surgery.** *Br J Anaesth* 85, 109-117, doi: <https://doi.org/10.1093/bja/85.1.109>.
- Devereaux, P. J. (2018). **PeriOperative ISchemic Evaluation-3 Trial (POISE-3).** URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03505723> [Stand:26.02.2020].

- Devereaux, P. J., Biccard, B. M., Sigamani, A., Xavier, D., Chan, M. T. V., Srinathan, S. K., Walsh, M., Abraham, V., Pearse, R., Wang, C. Y., Sessler, D. I., Kurz, A., Szczeklik, W., Berwanger, O., Villar, J. C., Malaga, G., Garg, A. X., Chow, C. K., Ackland, G., Patel, A., Borges, F. K., Belley-Cote, E. P., Duceppe, E., Spence, J., Tandon, V., Williams, C., Sapsford, R. J., Polanczyk, C. A., Tiboni, M., Alonso-Coello, P., Faruqui, A., Heels-Ansdell, D., Lamy, A., Whitlock, R., LeManach, Y., Roshanov, P. S., McGillion, M., Kavsak, P., McQueen, M. J., Thabane, L., Rodseth, R. N., Buse, G. A. L., Bhandari, M., Garutti, I., Jacka, M. J., Schunemann, H. J., Cortes, O. L., Coriat, P., Dvirnik, N., Botto, F., Pettit, S., Jaffe, A. S. und Guyatt, G. H. (2017). **Association of Postoperative High-Sensitivity Troponin Levels With Myocardial Injury and 30-Day Mortality Among Patients Undergoing Noncardiac Surgery.** *J Am Med Assoc* 317, 1642-1651, doi: 10.1001/jama.2017.4360.
- Devereaux, P. J., Bradley, D., Chan, M. T., Walsh, M., Villar, J. C., Polanczyk, C. A., Seligman, B. G., Guyatt, G. H., Alonso-Coello, P., Berwanger, O., Heels-Ansdell, D., Simunovic, N., Schunemann, H. und Yusuf, S. (2011a). **An international prospective cohort study evaluating major vascular complications among patients undergoing noncardiac surgery: the VISION Pilot Study.** *Open Med* 5, e193-200.
- Devereaux, P. J., Chan, M. T., Alonso-Coello, P., Walsh, M., Berwanger, O., Villar, J. C., Wang, C. Y., Garutti, R. I., Jacka, M. J., Sigamani, A., Srinathan, S., Biccard, B. M., Chow, C. K., Abraham, V., Tiboni, M., Pettit, S., Szczeklik, W., Lurati Buse, G., Botto, F., Guyatt, G., Heels-Ansdell, D., Sessler, D. I., Thorlund, K., Garg, A. X., Mrkobrada, M., Thomas, S., Rodseth, R. N., Pearse, R. M., Thabane, L., McQueen, M. J., VanHelder, T., Bhandari, M., Bosch, J., Kurz, A., Polanczyk, C., Malaga, G., Nagele, P., Le Manach, Y., Leuwer, M. und Yusuf, S. (2012). **Association between postoperative troponin levels and 30-day mortality among patients undergoing noncardiac surgery.** *J Am Med Assoc* 307, 2295-2304, doi: 10.1001/jama.2012.5502.
- Devereaux, P. J. und Sessler, D. I. (2015). **Cardiac Complications in Patients Undergoing Major Noncardiac Surgery.** *N Engl J Med* 373, 2258-2269, doi: 10.1056/NEJMra1502824.
- Devereaux, P. J. und Szczeklik, W. (2019). **Myocardial injury after non-cardiac surgery: diagnosis and management.** *Eur Heart J*, doi: 10.1093/eurheartj/ehz301.
- Devereaux, P. J., Xavier, D., Pogue, J., Guyatt, G., Sigamani, A., Garutti, I., Leslie, K., Rao-Melacini, P., Chrolavicius, S., Yang, H., Macdonald, C., Avezum, A., Lanthier, L., Hu, W., Yusuf, S. und Investigators, P. (2011b). **Characteristics and short-term prognosis of perioperative myocardial infarction in patients undergoing noncardiac surgery: a cohort study.** *Ann Intern Med* 154, 523-528, doi: 10.7326/0003-4819-154-8-201104190-00003.
- Dietel, B., Cicha, I., Voskens, C. J., Verhoeven, E., Achenbach, S. und Garlichs, C. D. (2013). **Decreased numbers of regulatory T cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells.** *Atherosclerosis* 230, 92-99, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.06.014.
- Docke, W. D., Hoflich, C., Davis, K. A., Rottgers, K., Meisel, C., Kiefer, P., Weber, S. U., Hedwig-Geissing, M., Kreuzfelder, E., Tschentscher, P., Nebe, T., Engel, A., Monneret, G., Spittler, A., Schmolke, K., Reinke, P., Volk, H. D. und Kunz, D. (2005). **Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study.** *Clin Chem* 51, 2341-2347, doi: 10.1373/clinchem.2005.052639.
- Doran, A. C., Meller, N. und McNamara, C. A. (2008). **Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 812-819, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.159327.
- Duceppe, E., Parlow, J., MacDonald, P., Lyons, K., McMullen, M., Srinathan, S., Graham, M., Tandon, V., Styles, K., Bessissow, A., Sessler, D. I., Bryson, G. und Devereaux, P. J. (2017). **Canadian Cardiovascular Society Guidelines on Perioperative Cardiac Risk Assessment and Management for Patients Who Undergo Noncardiac Surgery.** *Can J Cardiol* 33, 17-32, doi: 10.1016/j.cjca.2016.09.008.
- Duceppe, E., Patel, A., Chan, M. T. V., Berwanger, O., Ackland, G., Kavsak, P. A., Rodseth, R., Biccard, B., Chow, C. K., Borges, F. K., Guyatt, G., Pearse, R., Sessler, D. I., Heels-Ansdell, D., Kurz, A., Wang, C. Y., Szczeklik, W., Srinathan, S., Garg, A. X., Pettit, S., Sloan, E. N., Januzzi, J. L., Jr., McQueen, M., Buse, G. L., Mills, N. L.,

- Zhang, L., Sapsford, R., Pare, G., Walsh, M., Whitlock, R., Lamy, A., Hill, S., Thabane, L., Yusuf, S. und Devereaux, P. J. (2019). **Preoperative N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide and Cardiovascular Events After Noncardiac Surgery: A Cohort Study**. *Ann Intern Med*, doi: 10.7326/m19-2501.
- Eggen, D. A. und Solberg, L. A. (1968). **Variation of atherosclerosis with age**. *Lab Invest* 18, 571-579.
- Eid, R. E., Rao, D. A., Zhou, J., Lo, S. F., Ranjbaran, H., Gallo, A., Sokol, S. I., Pfau, S., Pober, J. S. und Tellides, G. (2009). **Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells**. *Circulation* 119, 1424-1432, doi: 10.1161/circulationaha.108.827618.
- Ellis, S. G., Hertzner, N. R., Young, J. R. und Brener, S. (1996). **Angiographic correlates of cardiac death and myocardial infarction complicating major nonthoracic vascular surgery**. *Am J Cardiol* 77, 1126-1128, doi: 10.1016/s0002-9149(96)00130-0.
- Engelbertsen, D., Andersson, L., Ljungcrantz, I., Wigren, M., Hedblad, B., Nilsson, J. und Bjorkbacka, H. (2013). **T-helper 2 immunity is associated with reduced risk of myocardial infarction and stroke**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 637-644, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300871.
- Erbel, C., Chen, L., Bea, F., Wangler, S., Celik, S., Lasitschka, F., Wang, Y., Bockler, D., Katus, H. A. und Dengler, T. J. (2009). **Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice**. *J Immunol* 183, 8167-8175, doi: 10.4049/jimmunol.0901126.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L. und Puccetti, P. (2003). **Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells**. *Nat Immunol* 4, 1206-1212, doi: 10.1038/ni1003.
- Felker, G. M., Petersen, J. W. und Mark, D. B. (2006). **Natriuretic peptides in the diagnosis and management of heart failure**. *Cmaj* 175, 611-617, doi: 10.1503/cmaj.060236.
- Feng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., Sweeney, M., Rong, J. X., Kuriakose, G., Fisher, E. A., Marks, A. R., Ron, D. und Tabas, I. (2003). **The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages**. *Nat Cell Biol* 5, 781-792, doi: 10.1038/ncb1035.
- Feng, J., Zhang, Z., Kong, W., Liu, B., Xu, Q. und Wang, X. (2009). **Regulatory T cells ameliorate hyperhomocysteinaemia-accelerated atherosclerosis in apoE^{-/-} mice**. *Cardiovasc Res* 84, 155-163, doi: 10.1093/cvr/cvp182.
- Finak, G., Langweiler, M., Jaimes, M., Malek, M., Taghiyar, J., Korin, Y., Raddassi, K., Devine, L., Obermoser, G., Pekalski, M. L., Pontikos, N., Diaz, A., Heck, S., Villanova, F., Terrazzini, N., Kern, F., Qian, Y., Stanton, R., Wang, K., Brandes, A., Ramey, J., Aghaeepour, N., Mosmann, T., Scheuermann, R. H., Reed, E., Palucka, K., Pascual, V., Blomberg, B. B., Nestle, F., Nussenblatt, R. B., Brinkman, R. R., Gottardo, R., Maecker, H. und McCoy, J. P. (2016). **Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human Immunophenotyping Consortium**. *Sci Rep* 6, 20686-20686, doi: 10.1038/srep20686.
- Fleisher, L. A., Fleischmann, K. E., Auerbach, A. D., Barnason, S. A., Beckman, J. A., Bozkurt, B., Davila-Roman, V. G., Gerhard-Herman, M. D., Holly, T. A., Kane, G. C., Marine, J. E., Nelson, M. T., Spencer, C. C., Thompson, A., Ting, H. H., Uretsky, B. F., Wijeyesundera, D. N., American College of, C. und American Heart, A. (2014). **2014 ACC/AHA guideline on perioperative cardiovascular evaluation and management of patients undergoing noncardiac surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines**. *J Am Coll Cardiol* 64, e77-137, doi: 10.1016/j.jacc.2014.07.944.
- Florian, J. A., Kosky, J. R., Ainslie, K., Pang, Z., Dull, R. O. und Tarbell, J. M. (2003). **Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells**. *Circ Res* 93, e136-142, doi: 10.1161/01.Res.0000101744.47866.D5.

- Foks, A. C., Frodermann, V., ter Borg, M., Habets, K. L., Bot, I., Zhao, Y., van Eck, M., van Berkel, T. J., Kuiper, J. und van Puijvelde, G. H. (2011). **Differential effects of regulatory T cells on the initiation and regression of atherosclerosis**. *Atherosclerosis* 218, 53-60, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.029.
- Ford, M. K., Beattie, W. S. und Wijeyesundera, D. N. (2010). **Systematic review: prediction of perioperative cardiac complications and mortality by the revised cardiac risk index**. *Ann Intern Med* 152, 26-35, doi: 10.7326/0003-4819-152-1-201001050-00007.
- Forget, P., Collet, V., Lavand'homme, P. und De Kock, M. (2010). **Does analgesia and condition influence immunity after surgery? Effects of fentanyl, ketamine and clonidine on natural killer activity at different ages**. *Eur J Anaesthesiol* 27, 233-240, doi: 10.1097/EJA.0b013e32832d540e.
- Franekova, J., Secnik, P., Jr., Lavrikova, P., Kubicek, Z., Hoskova, L., Kieslichova, E. und Jabor, A. (2017). **Serial measurement of presepsin, procalcitonin, and C-reactive protein in the early postoperative period and the response to antithymocyte globulin administration after heart transplantation**. *Clin Transplant* 31, doi: 10.1111/ctr.12870.
- Fronczek, J., Polok, K., Devereaux, P. J., Gorka, J., Archbold, R. A., Biccard, B., Duceppe, E., Le Manach, Y., Sessler, D. I., Duchinska, M. und Szczeklik, W. (2019). **External validation of the Revised Cardiac Risk Index and National Surgical Quality Improvement Program Myocardial Infarction and Cardiac Arrest calculator in noncardiac vascular surgery**. *Br J Anaesth* 123, 421-429, doi: 10.1016/j.bja.2019.05.029.
- Frostegard, J., Ulfgren, A. K., Nyberg, P., Hedin, U., Swedenborg, J., Andersson, U. und Hansson, G. K. (1999). **Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines**. *Atherosclerosis* 145, 33-43, doi: 10.1016/s0021-9150(99)00011-8.
- Fuijkschot, W. W., Morrison, M. C., van der Linden, R., Krijnen, P. A., Zethof, I. P., Theyse, L. F., Kleemann, R., Niessen, H. W. und Smulders, Y. M. (2016). **Orthopedic surgery increases atherosclerotic lesions and necrotic core area in ApoE^{-/-} mice**. *Atherosclerosis* 255, 164-170, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.909.
- Galkina, E., Harry, B. L., Ludwig, A., Liehn, E. A., Sanders, J. M., Bruce, A., Weber, C. und Ley, K. (2007). **CXCR6 promotes atherosclerosis by supporting T-cell homing, interferon-gamma production, and macrophage accumulation in the aortic wall**. *Circulation* 116, 1801-1811, doi: 10.1161/circulationaha.106.678474.
- Gawdat, K., Legere, S., Wong, C., Myers, T., Marshall, J. S., Hassan, A., Brunt, K. R., Kienesberger, P. C., Pulnikunnil, T. und Legare, J.-F. (2017). **Changes in Circulating Monocyte Subsets (CD16 Expression) and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Observed in Patients Undergoing Cardiac Surgery**. *Front Cardiovasc Med* 4, doi: 10.3389/fcvm.2017.00012.
- George, J., Schwartzberg, S., Medvedovsky, D., Jonas, M., Charach, G., Afek, A. und Shamiss, A. (2012). **Regulatory T cells and IL-10 levels are reduced in patients with vulnerable coronary plaques**. *Atherosclerosis* 222, 519-523, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.016.
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., Chalidis, B. und Hall, G. M. (2006). **Surgical stress response**. *Injury* 37, S3-S9, doi: 10.1016/S0020-1383(07)70005-0.
- Giavarina, D. und Carta, M. (2015). **Determination of reference interval for presepsin, an early marker for sepsis**. *Biochimica medica* 25, 64-68, doi: 10.11613/BM.2015.007.
- Gillmann, H.-J., Meinders, A., Larmann, J., Sahlmann, B., Schrimpf, C., Aper, T., Lichtinghagen, R., Teebken, O. E. und Theilmeier, G. (2017). **Adrenomedullin Is Associated With Surgical Trauma and Impaired Renal Function in Vascular Surgery Patients**. *J Intensive Care Med* 34, 67-76, doi: 10.1177/0885066616689554.
- Gillmann, H. J., Meinders, A., Grohennig, A., Larmann, J., Bunte, C., Calmer, S., Sahlmann, B., Rustum, S., Aper, T., Lichtinghagen, R., Koch, A., Teebken, O. E. und Theilmeier, G. (2014). **Perioperative levels and changes of high-sensitivity troponin T are associated with cardiovascular events in vascular surgery patients**. *Crit Care Med* 42, 1498-1506, doi: 10.1097/CCM.0000000000000249.

- Glance, L. G., Faden, E., Dutton, R. P., Lustik, S. J., Li, Y., Eaton, M. P. und Dick, A. W. (2018). **Impact of the Choice of Risk Model for Identifying Low-risk Patients Using the 2014 American College of Cardiology/American Heart Association Perioperative Guidelines.** *Anesthesiology* 129, 889-900, doi: 10.1097/aln.0000000000002341.
- Gleissner, C. (2012). **Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis.** *Front Physiol* 3, doi: 10.3389/fphys.2012.00001.
- Gojova, A., Brun, V., Esposito, B., Cottrez, F., Gourdy, P., Ardouin, P., Tedgui, A., Mallat, Z. und Groux, H. (2003). **Specific abrogation of transforming growth factor-beta signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice.** *Blood* 102, 4052-4058, doi: 10.1182/blood-2003-05-1729.
- Goldman, L., Caldera, D. L., Nussbaum, S. R., Southwick, F. S., Krogstad, D., Murray, B., Burke, D. S., O'Malley, T. A., Goroll, A. H., Caplan, C. H., Nolan, J., Carabello, B. und Slater, E. E. (1977). **Multifactorial Index of Cardiac Risk in Noncardiac Surgical Procedures.** *N Engl J Med* 297, 845-850, doi: 10.1056/nejm197710202971601.
- Golubović, M., Janković, R., Sokolović, D., Ćosić, V., Maravić-Stojkovic, V., Kostić, T., Perišić, Z. und Lađević, N. (2018). **Preoperative Midregional Pro-Adrenomedullin and High-Sensitivity Troponin T Predict Perioperative Cardiovascular Events in Noncardiac Surgery.** *Med Princ Pract* 27, 278-284, doi: 10.1159/000488197.
- Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. und Noelle, R. J. (2005). **Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism.** *J Immunol* 174, 1783-1786, doi: 10.4049/jimmunol.174.4.1783.
- Gorenoi, V., Schonermack, M. P. und Hagen, A. (2009). **Assessments tools for risk prediction of cardiovascular diseases.** *GMS Health Technol Assess* 5, Doc11, doi: 10.3205/hta000073.
- Gotsman, I., Grabie, N., Dacosta, R., Sukhova, G., Sharpe, A. und Lichtman, A. H. (2007). **Proatherogenic immune responses are regulated by the PD-1/PD-L pathway in mice.** *J Clin Invest* 117, 2974-2982, doi: 10.1172/jci31344.
- Grabner, R., Lotzer, K., Dopping, S., Hildner, M., Radke, D., Beer, M., Spanbroek, R., Lippert, B., Reardon, C. A., Getz, G. S., Fu, Y. X., Hehlgans, T., Mebius, R. E., van der Wall, M., Kruspe, D., Englert, C., Lovas, A., Hu, D., Randolph, G. J., Weih, F. und Habenicht, A. J. (2009). **Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice.** *J Exp Med* 206, 233-248, doi: 10.1084/jem.20080752.
- Grainger David, J. (2004). **Transforming Growth Factor β and Atherosclerosis: So Far, So Good for the Protective Cytokine Hypothesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 399-404, doi: 10.1161/01.ATV.0000114567.76772.33.
- Guo, L., Akahori, H., Harari, E., Smith, S. L., Polavarapu, R., Karmali, V., Otsuka, F., Gannon, R. L., Braumann, R. E., Dickinson, M. H., Gupta, A., Jenkins, A. L., Lipinski, M. J., Kim, J., Chhour, P., de Vries, P. S., Jinnouchi, H., Kutys, R., Mori, H., Kutyna, M. D., Torii, S., Sakamoto, A., Choi, C. U., Cheng, Q., Grove, M. L., Sawan, M. A., Zhang, Y., Cao, Y., Kolodgie, F. D., Cormode, D. P., Arking, D. E., Boerwinkle, E., Morrison, A. C., Erdmann, J., Sotoodehnia, N., Virmani, R. und Finn, A. V. (2018). **CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis.** *J Clin Invest* 128, 1106-1124, doi: 10.1172/jci93025.
- Gupta, P. K., Gupta, H., Sundaram, A., Kaushik, M., Fang, X., Miller, W. J., Esterbrooks, D. J., Hunter, C. B., Pipinos, II, Johannang, J. M., Lynch, T. G., Forse, R. A., Mohiuddin, S. M. und Mooss, A. N. (2011). **Development and validation of a risk calculator for prediction of cardiac risk after surgery.** *Circulation* 124, 381-387, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.015701.
- Gupta, S., Pablo, A. M., Jiang, X., Wang, N., Tall, A. R. und Schindler, C. (1997). **IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice.** *J Clin Invest* 99, 2752-2761, doi: 10.1172/JCI119465.

- Hak, L., Mysliwska, J., Wieckiewicz, J., Szyndler, K., Trzonkowski, P., Siebert, J. und Mysliwski, A. (2007). **NK cell compartment in patients with coronary heart disease**. *Immun Ageing* 4, 3, doi: 10.1186/1742-4933-4-3.
- Halwachs-Baumann, G. (2006). **Cardiale Labordiagnostik**. In: *Labormedizin - Klinik, Praxis, Fallbeispiele*, Springer-Verlag, Vienna, S. 31-84.
- Hamasaki, H. (2016). **The Effects of Exercise on Natriuretic Peptides in Individuals without Heart Failure**. *Sports (Basel, Switzerland)* 4, 32, doi: 10.3390/sports4020032.
- Han, S. F., Liu, P., Zhang, W., Bu, L., Shen, M., Li, H., Fan, Y. H., Cheng, K., Cheng, H. X., Li, C. X. und Jia, G. L. (2007). **The opposite-direction modulation of CD4+CD25+ Tregs and T helper 1 cells in acute coronary syndromes**. *Clin Immunol* 124, 90-97, doi: 10.1016/j.clim.2007.03.546.
- Hanson, I., Kahn, J., Dixon, S. und Goldstein, J. (2013). **Angiographic and clinical characteristics of type 1 versus type 2 perioperative myocardial infarction**. *Catheter Cardiovasc Interv* 82, 622-628, doi: 10.1002/ccd.24626.
- Hansson, G. K. (2005). **Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease**. *N Engl J Med* 352, 1685-1695, doi: 10.1056/NEJMra043430.
- Hansson, G. K. und Hermansson, A. (2011). **The immune system in atherosclerosis**. *Nat Immunol* 12, 204-212, doi: 10.1038/ni.2001.
- Hansson, G. K., Jonasson, L., Lojstved, B., Stemme, S., Kocher, O. und Gabbiani, G. (1988). **Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques**. *Atherosclerosis* 72, 135-141, doi: 10.1016/0021-9150(88)90074-3.
- Haynes, A. B., Weiser, T. G., Berry, W. R., Lipsitz, S. R., Breizat, A. H., Dellinger, E. P., Herbosa, T., Joseph, S., Kibatala, P. L., Lapitan, M. C., Merry, A. F., Moorthy, K., Reznick, R. K., Taylor, B. und Gawande, A. A. (2009). **A surgical safety checklist to reduce morbidity and mortality in a global population**. *N Engl J Med* 360, 491-499, doi: 10.1056/NEJMsa0810119.
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M. G., Silber, R. und Goyert, S. M. (1988). **The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage**. *J Immunol* 141, 547-552.
- Haziot, A., Rong, G. W., Silver, J. und Goyert, S. M. (1993). **Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide**. *J Immunol* 151, 1500-1507.
- Hedman, A., Larsson, P. T., Alam, M., Wallen, N. H., Nordlander, R. und Samad, B. A. (2007). **CRP, IL-6 and endothelin-1 levels in patients undergoing coronary artery bypass grafting. Do preoperative inflammatory parameters predict early graft occlusion and late cardiovascular events?** *Int J Cardiol* 120, 108-114, doi: 10.1016/j.ijcard.2006.09.004.
- Heidecke, C. D., Hensler, T., Weighardt, H., Zantl, N., Wagner, H., Siewert, J. R. und Holzmann, B. (1999). **Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection**. *Am J Surg* 178, 288-292, doi: 10.1016/s0002-9610(99)00183-x.
- Heidecke, C. D., Weighardt, H., Hensler, T., Bartels, H. und Holzmann, B. (2000). **[Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]**. *Chirurg* 71, 159-165, doi: 10.1007/s001040050028.
- Held, C., White, H. D., Stewart, R. A. H., Budaj, A., Cannon, C. P., Hochman, J. S., Koenig, W., Siegbahn, A., Steg, P. G., Soffer, J., Weaver, W. D., Ostlund, O. und Wallentin, L. (2017). **Inflammatory Biomarkers Interleukin-6 and C-Reactive Protein and Outcomes in Stable Coronary Heart Disease: Experiences From the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) Trial**. *J Am Heart Assoc* 6, doi: 10.1161/jaha.116.005077.

- Helwani, M. A., Amin, A., Lavigne, P., Rao, S., Oesterreich, S., Samaha, E., Brown, J. C. und Nagele, P. (2018). **Etiology of Acute Coronary Syndrome after Noncardiac Surgery**. *Anesthesiology* 128, 1084-1091, doi: 10.1097/aln.0000000000002107.
- Hensler, T., Hecker, H., Heeg, K., Heidecke, C. D., Bartels, H., Barthlen, W., Wagner, H., Siewert, J. R. und Holzmann, B. (1997). **Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery**. *Infect Immun* 65, 2283-2291.
- Hermansson, A., Ketelhuth, D. F., Strodthoff, D., Wurm, M., Hansson, E. M., Nicoletti, A., Paulsson-Berne, G. und Hansson, G. K. (2010). **Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis**. *J Exp Med* 207, 1081-1093, doi: 10.1084/jem.20092243.
- Hicks, K. A., Mahaffey, K. W., Mehran, R., Nissen, S. E., Wiviott, S. D., Dunn, B., Solomon, S. D., Marler, J. R., Teerlink, J. R., Farb, A., Morrow, D. A., Targum, S. L., Sila, C. A., Hai, M. T. T., Jaff, M. R., Joffe, H. V., Cutlip, D. E., Desai, A. S., Lewis, E. F., Gibson, C. M., Landray, M. J., Lincoff, A. M., White, C. J., Brooks, S. S., Rosenfield, K., Domanski, M. J., Lansky, A. J., McMurray, J. J. V., Tcheng, J. E., Steinhubl, S. R., Burton, P., Mauri, L., O'Connor, C. M., Pfeffer, M. A., Hung, H. M. J., Stockbridge, N. L., Chaitman, B. R. und Temple, R. J. (2018). **2017 Cardiovascular and Stroke Endpoint Definitions for Clinical Trials**. *Circulation* 137, 961-972, doi: 10.1161/circulationaha.117.033502.
- Hindler, K., Shaw, A. D., Samuels, J., Fulton, S., Collard, C. D. und Riedel, B. (2006). **Improved postoperative outcomes associated with preoperative statin therapy**. *Anesthesiology* 105, 1260-1272; quiz 1289-1290.
- Höpfner, F., Jacob, M., Ulrich, C., Russ, M., Simm, A., Silber, R. E., Girndt, M., Noutsias, M., Werdan, K. und Schlitt, A. (2019). **Subgroups of monocytes predict cardiovascular events in patients with coronary heart disease. The PHAMOS trial (Prospective Halle Monocytes Study)**. *Hellenic J Cardiol* 60, 311-321, doi: <https://doi.org/10.1016/j.hjc.2019.04.012>.
- Horn, F. (2018). **Cholesterin-Biosynthese**. In: *Biochemie des Menschen*, Hrsg. Horn, F., 7., korrigierte Auflage. Aufl., Georg Thieme Verlag.
- Hristov, M. und Weber, C. (2011). **Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis**. *Thromb Haemost* 106, 757-762, doi: 10.1160/TH11-07-0500.
- Huber, S. A., Sakkinen, P., David, C., Newell, M. K. und Tracy, R. P. (2001). **T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia**. *Circulation* 103, 2610-2616, doi: 10.1161/01.cir.103.21.2610.
- Hughes, S. F., Hendricks, B. D., Edwards, D. R., Maclean, K. M., Bastawrous, S. S. und Middleton, J. F. (2010). **Total hip and knee replacement surgery results in changes in leukocyte and endothelial markers**. *J Inflamm* 7, 2, doi: 10.1186/1476-9255-7-2.
- Ikeshita, S., Miyatake, Y., Otsuka, N. und Kasahara, M. (2014). **MICA/B expression in macrophage foam cells infiltrating atherosclerotic plaques**. *Exp Mol Pathol* 97, 171-175, doi: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.07.002>.
- Inomata, T., Hua, J., Di Zazzo, A. und Dana, R. (2016). **Impaired Function of Peripherally Induced Regulatory T Cells in Hosts at High Risk of Graft Rejection**. *Sci Rep* 6, 39924, doi: 10.1038/srep39924.
- Istvan, E. (2003). **Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view**. *Atheroscler Suppl* 4, 3-8, doi: 10.1016/s1567-5688(03)00003-5.
- Jabir, N. R., Firoz, C. K., Ahmed, F., Kamal, M. A., Hindawi, S., Damanhour, G. A., Almehdar, H. A. und Tabrez, S. (2017). **Reduction in CD16/CD56 and CD16/CD3/CD56 Natural Killer Cells in Coronary Artery Disease**. *Immunol Invest* 46, 526-535, doi: 10.1080/08820139.2017.1306866.

- Jammer, I., Wickboldt, N., Sander, M., Smith, A., Schultz, M. J., Pelosi, P., Leva, B., Rhodes, A., Hoefft, A., Walder, B., Chew, M. S., Pearse, R. M., European Society of, A., the European Society of Intensive Care, M., European Society of, A. und European Society of Intensive Care, M. (2015). **Standards for definitions and use of outcome measures for clinical effectiveness research in perioperative medicine: European Perioperative Clinical Outcome (EPCO) definitions: a statement from the ESA-ESICM joint taskforce on perioperative outcome measures.** *Eur J Anaesthesiol* 32, 88-105, doi: 10.1097/EJA.000000000000118.
- Janssen, H., Wagner, C. S., Demmer, P., Callies, S., Solter, G., Loghmani-khouzani, H., Hu, N., Schuett, H., Tietge, U. J., Warnecke, G., Larmann, J. und Theilmeier, G. (2015). **Acute perioperative-stress-induced increase of atherosclerotic plaque volume and vulnerability to rupture in apolipoprotein-E-deficient mice is amenable to statin treatment and IL-6 inhibition.** *Dis Model Mech* 8, 1071-1080, doi: 10.1242/dmm.018713.
- Jia, H., Dai, J., Hou, J., Xing, L., Ma, L., Liu, H., Xu, M., Yao, Y., Hu, S., Yamamoto, E., Lee, H., Zhang, S., Yu, B. und Jang, I.-K. (2016). **Effective anti-thrombotic therapy without stenting: intravascular optical coherence tomography-based management in plaque erosion (the EROSION study).** *Eur Heart J* 38, 792-800, doi: 10.1093/eurheartj/ehw381.
- Johansson, T., Fritsch, G., Flamm, M., Hansbauer, B., Bachofner, N., Mann, E., Bock, M. und Sönnichsen, A. C. (2013). **Effectiveness of non-cardiac preoperative testing in non-cardiac elective surgery: a systematic review.** *Br J Anaesth* 110, 926-939, doi: <https://doi.org/10.1093/bja/aet071>.
- Johnson, J., Carson, K., Williams, H., Karanam, S., Newby, A., Angelini, G., George, S. und Jackson, C. (2005). **Plaque rupture after short periods of fat feeding in the apolipoprotein E-knockout mouse: model characterization and effects of pravastatin treatment.** *Circulation* 111, 1422-1430, doi: 10.1161/01.CIR.0000158435.98035.8D.
- Johnson, J. L. und Jackson, C. L. (2001). **Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse.** *Atherosclerosis* 154, 399-406, doi: 10.1016/s0021-9150(00)00515-3.
- Johnson, J. L., Jenkins, N. P., Huang, W. C., Di Gregoli, K., Sala-Newby, G. B., Scholtes, V. P., Moll, F. L., Pasterkamp, G. und Newby, A. C. (2014). **Relationship of MMP-14 and TIMP-3 expression with macrophage activation and human atherosclerotic plaque vulnerability.** *Mediators Inflamm* 2014, 276457, doi: 10.1155/2014/276457.
- Jonasson, L., Backteman, K. und Ernerudh, J. (2005). **Loss of natural killer cell activity in patients with coronary artery disease.** *Atherosclerosis* 183, 316-321, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.011.
- Kaptoge, S., Seshasai, S. R., Gao, P., Freitag, D. F., Butterworth, A. S., Borglykke, A., Di Angelantonio, E., Gudnason, V., Rumley, A., Lowe, G. D., Jorgensen, T. und Danesh, J. (2014). **Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis.** *Eur Heart J* 35, 578-589, doi: 10.1093/eurheartj/ehs367.
- Karatolios, K., Rolfes, C., Wulf, H. und Schieffer, B. (2016). **Der perioperative Myokardinfarkt - Eine interdisziplinäre Aufgabe.** *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 51, 518-525, doi: 10.1055/s-0042-102145.
- Karthikeyan, G., Moncur, R. A., Levine, O., Heels-Ansdell, D., Chan, M. T., Alonso-Coello, P., Yusuf, S., Sessler, D., Villar, J. C., Berwanger, O., McQueen, M., Mathew, A., Hill, S., Gibson, S., Berry, C., Yeh, H. M. und Devereaux, P. J. (2009). **Is a pre-operative brain natriuretic peptide or N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurement an independent predictor of adverse cardiovascular outcomes within 30 days of noncardiac surgery? A systematic review and meta-analysis of observational studies.** *J Am Coll Cardiol* 54, 1599-1606, doi: 10.1016/j.jacc.2009.06.028.
- Kashiwagi, M., Imanishi, T., Tsujioka, H., Ikejima, H., Kuroi, A., Ozaki, Y., Ishibashi, K., Komukai, K., Tanimoto, T., Ino, Y., Kitabata, H., Hirata, K. und Akasaka, T. (2010). **Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in**

- patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis* 212, 171-176, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.004.
- Kavsak, P. A., Walsh, M., Srinathan, S., Thorlacius, L., Buse, G. L., Botto, F., Pettit, S., McQueen, M. J., Hill, S. A., Thomas, S., Mrkobrada, M., Alonso-Coello, P., Berwanger, O., Biccari, B. M., Cembrowski, G., Chan, M. T., Chow, C. K., de Miguel, A., Garcia, M., Graham, M. M., Jacka, M. J., Kueh, J. H., Li, S. C., Lit, L. C., Martinez-Bru, C., Naidoo, P., Nagele, P., Pearse, R. M., Rodseth, R. N., Sessler, D. I., Sigamani, A., Szczeklik, W., Tiboni, M., Villar, J. C., Wang, C. Y., Xavier, D. und Devereaux, P. J. (2011). **High sensitivity troponin T concentrations in patients undergoing noncardiac surgery: a prospective cohort study.** *Clin Biochem* 44, 1021-1024, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.05.017.
- Kerr, K. F., Wang, Z., Janes, H., McClelland, R. L., Psaty, B. M. und Pepe, M. S. (2014). **Net reclassification indices for evaluating risk prediction instruments: a critical review.** *Epidemiology* 25, 114-121, doi: 10.1097/ede.0000000000000018.
- Ketelhuth, D. F. und Back, M. (2011). **The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis.** *Curr Atheroscler Rep* 13, 162-169, doi: 10.1007/s11883-010-0159-7.
- Kim, J. H., Lim, S., Park, K. S., Jang, H. C. und Choi, S. H. (2017). **Total and differential WBC counts are related with coronary artery atherosclerosis and increase the risk for cardiovascular disease in Koreans.** *PLoS ONE* 12, e0180332, doi: 10.1371/journal.pone.0180332.
- Kim, W. H., Jin, H. S., Ko, J. S., Hahm, T. S., Lee, S. M., Cho, H. S. und Kim, M. H. (2011). **The effect of anesthetic techniques on neutrophil-to-lymphocyte ratio after laparoscopy-assisted vaginal hysterectomy.** *Acta Anaesthesiol Taiwan* 49, 83-87, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aat.2011.08.004>.
- King, V. L., Cassis, L. A. und Daugherty, A. (2007). **Interleukin-4 does not influence development of hypercholesterolemia or angiotensin II-induced atherosclerotic lesions in mice.** *Am J Pathol* 171, 2040-2047, doi: 10.2353/ajpath.2007.060857.
- King, V. L., Szilvassy, S. J. und Daugherty, A. (2002). **Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor^{-/-} mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 456-461, doi: 10.1161/hq0302.104905.
- Klava, A., Windsor, A., Boylston, A. W., Reynolds, J. V., Ramsden, C. W. und Guillou, P. J. (1997). **Monocyte activation after open and laparoscopic surgery.** *Br J Surg* 84, 1152-1156.
- Kleindienst, R., Xu, Q., Willeit, J., Waldenberger, F. R., Weimann, S. und Wick, G. (1993). **Immunology of atherosclerosis. Demonstration of heat shock protein 60 expression and T lymphocytes bearing alpha/beta or gamma/delta receptor in human atherosclerotic lesions.** *Am J Pathol* 142, 1927-1937.
- Kleist, P. (2010). **Combined endpoints.** *Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen* 104, 239-242, doi: 10.1016/j.zefq.2010.03.007.
- Klingenberg, R., Gerdes, N., Badeau, R. M., Gistera, A., Strodthoff, D., Ketelhuth, D. F., Lundberg, A. M., Rudling, M., Nilsson, S. K., Olivecrona, G., Zoller, S., Lohmann, C., Luscher, T. F., Jauhiainen, M., Sparwasser, T. und Hansson, G. K. (2013). **Depletion of FOXP3⁺ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis.** *J Clin Invest* 123, 1323-1334, doi: 10.1172/JCI63891.
- Koerner, P., Westerholt, A., Kessler, W., Traeger, T., Maier, S. und Heidecke, C. D. (2008). **Operatives Trauma und postoperative Immunsuppression.** *Der Chirurg* 79, 290-294, doi: 10.1007/s00104-008-1465-2.
- Kol, A., Lichtman, A. H., Finberg, R. W., Libby, P. und Kurt-Jones, E. A. (2000). **Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells.** *J Immunol* 164, 13-17, doi: 10.4049/jimmunol.164.1.13.

- Kolbus, D., Ljungcrantz, I., Andersson, L., Hedblad, B., Fredrikson, G. N., Bjorkbacka, H. und Nilsson, J. (2013). **Association between CD8+ T-cell subsets and cardiovascular disease.** *J Intern Med* 274, 41-51, doi: 10.1111/joim.12038.
- Kolodgie, F. D., Gold, H. K., Burke, A. P., Fowler, D. R., Kruth, H. S., Weber, D. K., Farb, A., Guerrero, L. J., Hayase, M., Kutys, R., Narula, J., Finn, A. V. und Virmani, R. (2003). **Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma.** *N Engl J Med* 349, 2316-2325, doi: 10.1056/NEJMoa035655.
- Kontos, M. C., Diercks, D. B. und Kirk, J. D. (2010). **Emergency department and office-based evaluation of patients with chest pain.** *Mayo Clin Proc* 85, 284-299, doi: 10.4065/mcp.2009.0560.
- Korff, S., Katus, H. A. und Giannitsis, E. (2006). **Differential diagnosis of elevated troponins.** *Heart (British Cardiac Society)* 92, 987-993, doi: 10.1136/hrt.2005.071282.
- Kotfis, K., Biernawska, J., Zegan-Baranska, M. und Zukowski, M. (2015). **Peripheral Blood Lymphocyte Subsets (CD4+, CD8+ T Cells, NK Cells) in Patients with Cardiovascular and Neurological Complications after Carotid Endarterectomy.** *Int J Mol Sci* 16, 10077-10094, doi: 10.3390/ijms160510077.
- Kristensen, S. D., Knuuti, J., Saraste, A., Anker, S., Botker, H. E., Hert, S. D., Ford, I., Gonzalez-Juanatey, J. R., Gorenek, B., Heyndrickx, G. R., Hoeft, A., Huber, K., Iung, B., Kjeldsen, K. P., Longrois, D., Luscher, T. F., Pierard, L., Pocock, S., Price, S., Roffi, M., Sirnes, P. A., Sousa-Uva, M., Voudris, V., Funck-Brentano, C. und Authors/Task Force, M. (2014). **2014 ESC/ESA Guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management: The Joint Task Force on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Anaesthesiology (ESA).** *Eur Heart J* 35, 2383-2431, doi: 10.1093/eurheartj/ehu282.
- Kruse, A. (2015). **Die Immunantwort durch Lymphocyten.** In: *Immunologie für Einsteiger*, Springer Spektrum, S. 63-87.
- Kyaw, T., Winship, A., Tay, C., Kanellakis, P., Hosseini, H., Cao, A., Li, P., Tipping, P., Bobik, A. und Toh, B. H. (2013). **Cytotoxic and proinflammatory CD8+ T lymphocytes promote development of vulnerable atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice.** *Circulation* 127, 1028-1039, doi: 10.1161/circulationaha.112.001347.
- Landesberg, G., Shatz, V., Akopnik, I., Wolf, Y. G., Mayer, M., Berlatzky, Y., Weissman, C. und Mosseri, M. (2003). **Association of cardiac troponin, CK-MB, and postoperative myocardial ischemia with long-term survival after major vascular surgery.** *J Am Coll Cardiol* 42, 1547-1554.
- Laurat, E., Poirier, B., Tupin, E., Caligiuri, G., Hansson, G. K., Bariety, J. und Nicoletti, A. (2001). **In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice.** *Circulation* 104, 197-202.
- Le Texier, L., Lineburg, K. E., Cao, B., McDonald-Hyman, C., Leveque-El Mouttie, L., Nicholls, J., Melino, M., Nalkurthi, B. C., Alexander, K. A., Teal, B., Blake, S. J., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Engwerda, C. R., Kuns, R. D., Lane, S. W., Teng, M., Teh, C., Gray, D., Clouston, A. D., Nilsson, S. K., Blazar, B. R., Hill, G. R. und MacDonald, K. P. A. (2016). **Autophagy-dependent regulatory T cells are critical for the control of graft-versus-host disease.** *JCI insight* 1, e86850-e86850, doi: 10.1172/jci.insight.86850.
- Lee, C. D., Folsom, A. R., Nieto, F. J., Chambless, L. E., Shahar, E. und Wolfe, D. A. (2001). **White blood cell count and incidence of coronary heart disease and ischemic stroke and mortality from cardiovascular disease in African-American and White men and women: atherosclerosis risk in communities study.** *Am J Epidemiol* 154, 758-764.
- Lee, S.-H., Park, M. S., Song, Y. B., Park, J., Kim, J., Lee, S. M. und Lee, Y. T. (2019). **Perioperative myocardial injury in revascularized coronary patients who undergo noncardiac surgery.** *PLOS ONE* 14, e0219043, doi: 10.1371/journal.pone.0219043.

- Lee, T.-S., Yen, H.-C., Pan, C.-C. und Chau, L.-Y. (1999a). **The Role of Interleukin 12 in the Development of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 734-742, doi: doi:10.1161/01.ATV.19.3.734.
- Lee, T. H., Marcantonio, E. R., Mangione, C. M., Thomas, E. J., Polanczyk, C. A., Cook, E. F., Sugarbaker, D. J., Donaldson, M. C., Poss, R., Ho, K. K., Ludwig, L. E., Pedan, A. und Goldman, L. (1999b). **Derivation and prospective validation of a simple index for prediction of cardiac risk of major noncardiac surgery**. *Circulation* 100, 1043-1049.
- Lee, Y. K., Turner, H., Maynard, C. L., Oliver, J. R., Chen, D., Elson, C. O. und Weaver, C. T. (2009). **Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage**. *Immunity* 30, 92-107, doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.005.
- Legein, B., Temmerman, L., Biessen, E. A. und Lutgens, E. (2013). **Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis**. *Cell Mol Life Sci* 70, 3847-3869, doi: 10.1007/s00018-013-1289-1.
- Lehmann, K. S. (2017). **Stellenwert von Risiko-Scores**. In: Perioperative Medizin, Hrsg. Schwenk, W., Freys, S. M. und Kalff, J. C., 1. Auflage. Aufl., Georg Thieme Verlag.
- Leitinger, N. (2003). **Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis**. *Curr Opin Lipidol* 14, 421-430, doi: 10.1097/00041433-200310000-00002.
- Leschke, M., Teschler, H., Besa, V., Fistera, D., Strassburg, C. P., Renders, L., Thürmel, K., Wen, M., Heemann, U., Müller-Wieland, D., Burchard, A., Wüllner, U., Meyer zum Büschenfelde, C., Spannagl, M. und Lehmann, K. S. (2017). **Präoperative Risikoeinschätzung**. In: Perioperative Medizin, Hrsg. Schwenk, W., Freys, S. M. und Kalff, J. C., 1. Auflage. Aufl., Georg Thieme Verlag.
- Letourneau, S., van Leeuwen, E. M., Krieg, C., Martin, C., Pantaleo, G., Sprent, J., Surh, C. D. und Boyman, O. (2010). **IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2171-2176, doi: 10.1073/pnas.0909384107.
- Levey, A. S., Eckardt, K.-U., Tsukamoto, Y., Levin, A., Coresh, J., Rossert, J., Zeeuw, D. D. E., Hostetter, T. H., Lameire, N. und Eknoyan, G. (2005). **Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)**. *Kidney Int* 67, 2089-2100, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00365.x>.
- Li, J., McArdle, S., Gholami, A., Kimura, T., Wolf, D., Gerhardt, T., Miller, J., Weber, C. und Ley, K. (2016). **CCR5+T-bet+FoxP3+ Effector CD4 T Cells Drive Atherosclerosis**. *Circ Res* 118, 1540-1552, doi: 10.1161/circresaha.116.308648.
- Li, P., Lei, Y., Li, Q., Lakshmi Priya, T., Gopinath, S. C. B. und Gong, X. (2019). **Diagnosing Perioperative Cardiovascular Risks in Noncardiac Surgery Patients**. *J Anal Methods Chem* 2019, 6097375-6097375, doi: 10.1155/2019/6097375.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B. M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., Tybulewicz, V., Vignali, D. und Clynes, R. (2008). **Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II**. *J Immunol* 180, 5916-5926, doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5916.
- Libby, P. (2000). **Changing concepts of atherogenesis**. *J Intern Med* 247, 349-358, doi: 10.1046/j.1365-2796.2000.00654.x.
- Libby, P. (2002). **Inflammation in atherosclerosis**. *Nature* 420, 868-874, doi: 10.1038/nature01323.
- Libby, P. und Hansson, G. K. (2015). **Inflammation and Immunity in Diseases of the Arterial Tree**. *Circ Res* 116, 307-311, doi: doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.301313.

- Lichtman, A. H., Binder, C. J., Tsimikas, S. und Witztum, J. L. (2013). **Adaptive immunity in atherogenesis: new insights and therapeutic approaches.** *J Clin Invest* 123, 27-36, doi: 10.1172/jci63108.
- Lin, J., Li, M., Wang, Z., He, S., Ma, X. und Li, D. (2010). **The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in macrophage-derived foam-cell formation.** *J Lipid Res* 51, 1208-1217, doi: 10.1194/jlr.D000497.
- Lin, J., Li, Z., Zheng, Y., Zhang, Y., Shao, C., Liu, G. und Li, J. (2016a). **Elevated Presepsin Levels are Associated with Severity and Prognosis of Severe Acute Pancreatitis.** *Clin Lab* 62, 1699-1708, doi: 10.7754/Clin.Lab.2016.160134.
- Lin, J., Sun, H., Li, J., Zheng, Y., Shao, C., Zhang, Y. H. und Chang, H. (2016b). **Role of Presepsin for the Assessment of Acute Cholangitis Severity.** *Clin Lab* 62, 679-687.
- Lindley, S., Dayan, C. M., Bishop, A., Roep, B. O., Peakman, M. und Tree, T. I. (2005). **Defective suppressor function in CD4(+)/CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes.** *Diabetes* 54, 92-99.
- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F. und Bluestone, J. A. (2006). **CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells.** *J Exp med* 203, 1701-1711, doi: 10.1084/jem.20060772.
- Liu, Z. D., Wang, L., Lu, F. H., Pan, H., Zhao, Y. X., Wang, S. J., Sun, S. W., Li, C. L. und Hu, X. L. (2012). **Increased Th17 cell frequency concomitant with decreased Foxp3+ Treg cell frequency in the peripheral circulation of patients with carotid artery plaques.** *Inflamm Res* 61, 1155-1165, doi: 10.1007/s00011-012-0510-2.
- LSI Medience Corporation (2017). **PATHFAST Test Principle**, Presepsin, T. S. M. P., Hrsg. (www.PATHFAST.eu).
- Lurati Buse, G. A., Koller, M. T., Burkhart, C., Seeberger, M. D. und Filipovic, M. (2011). **The predictive value of preoperative natriuretic peptide concentrations in adults undergoing surgery: a systematic review and meta-analysis.** *Anesth Analg* 112, 1019-1033, doi: 10.1213/ANE.0b013e31820f286f.
- Lusis, A. J. (2000). **Atherosclerosis.** *Nature* 407, 233-241, doi: 10.1038/35025203.
- Madhur, M. S., Funt, S. A., Li, L., Vinh, A., Chen, W., Lob, H. E., Iwakura, Y., Blinder, Y., Rahman, A., Quyyumi, A. A. und Harrison, D. G. (2011). **Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 1565-1572, doi: 10.1161/atvbaha.111.227629.
- Maganto-Garcia, E., Bu, D. X., Tarrio, M. L., Alcaide, P., Newton, G., Griffin, G. K., Croce, K. J., Luscinskas, F. W., Lichtman, A. H. und Grabie, N. (2011). **Foxp3+ inducible regulatory T cells suppress endothelial activation and leukocyte recruitment.** *J Immunol* 187, 3521-3529, doi: 10.4049/jimmunol.1003947.
- Maile, M. D., Jewell, E. S. und Engoren, M. C. (2016). **Timing of Preoperative Troponin Elevations and Postoperative Mortality After Noncardiac Surgery.** *Anesth Analg* 123, 135-140, doi: 10.1213/ane.0000000000001309.
- Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M. F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., Staels, B., Duverger, N., Scherman, D. und Tedgui, A. (1999a). **Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis.** *Circ Res* 85, e17-24, doi: 10.1161/01.res.85.8.e17.
- Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamate, C., Merval, R., Fradelizi, D. und Tedgui, A. (2001). **Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice.** *Circ Res* 89, 930-934.
- Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Leseche, G., Freyssinet, J. M. und Tedgui, A. (1999b). **Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity.** *Circulation* 99, 348-353, doi: 10.1161/01.cir.99.3.348.

- Mangge, H., Hubmann, H., Pilz, S. und März, W. (2004). **Inflammatorische Biomarker und Atherosklerose/Inflammatory biomarkers and atherosclerosis**. *J Lab Med* 28, 346-353, doi: <https://doi.org/10.1515/LabMed.2004.051>.
- Manou-Stathopoulou, V., Korbonits, M. und Ackland, G. L. (2019). **Redefining the perioperative stress response: a narrative review**. *Br J Anaesth* 123, 570-583, doi: 10.1016/j.bja.2019.08.011.
- Marchio, P., Guerra-Ojeda, S., Vila, J. M., Aldasoro, M., Victor, V. M. und Mauricio, M. D. (2019). **Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation**. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 8563845, doi: 10.1155/2019/8563845.
- Markewitz, A., Lante, W., Franke, A., Marohl, K., Kuhlmann, W. D. und Weinhold, C. (2001). **Alterations of cell-mediated immunity following cardiac operations: clinical implications and open questions**. *Shock* 16 Suppl 1, 10-15, doi: 10.1097/00024382-200116001-00003.
- Matoba, T., Sato, K. und Egashira, K. (2013). **Mouse models of plaque rupture**. *Curr Opin Lipidol* 24, 419-425, doi: 10.1097/MOL.0b013e3283646e4d.
- Matsuoka, K., Koreth, J., Kim, H. T., Bascug, G., McDonough, S., Kawano, Y., Murase, K., Cutler, C., Ho, V. T., Alyea, E. P., Armand, P., Blazar, B. R., Antin, J. H., Soiffer, R. J. und Ritz, J. (2013). **Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease**. *Sci Transl Med* 5, 179ra143, doi: 10.1126/scitranslmed.3005265.
- Mausner-Fainberg, K., Luboshits, G., Mor, A., Maysel-Auslender, S., Rubinstein, A., Keren, G. und George, J. (2008). **The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on naturally occurring CD4+CD25+ T cells**. *Atherosclerosis* 197, 829-839, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.031.
- McMillan, D. E. (1985). **Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques**. *Stroke* 16, 582-587, doi: 10.1161/01.str.16.4.582.
- Memar, M. Y. und Baghi, H. B. (2019). **Presepsin: A promising biomarker for the detection of bacterial infections**. *Biomed Pharmacother* 111, 649-656, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.124>.
- Meng, X., Li, W., Yang, J., Zhang, K., Qin, W., An, G., Gao, F., Wang, Y., Zhang, C. und Zhang, Y. (2013). **Regulatory T cells prevent plaque disruption in apolipoprotein E-knockout mice**. *Int J Cardiol* 168, 2684-2692, doi: 10.1016/j.ijcard.2013.03.026.
- Meng, X., Yang, J., Dong, M., Zhang, K., Tu, E., Gao, Q., Chen, W., Zhang, C. und Zhang, Y. (2016). **Regulatory T cells in cardiovascular diseases**. *Nat Rev Cardiol* 13, 167-179, doi: 10.1038/nrcardio.2015.169.
- Meng, X., Zhang, K., Li, J., Dong, M., Yang, J., An, G., Qin, W., Gao, F., Zhang, C. und Zhang, Y. (2012). **Statins induce the accumulation of regulatory T cells in atherosclerotic plaque**. *Mol Med* 18, 598-605, doi: 10.2119/molmed.2011.00471.
- Methe, H., Brunner, S., Wiegand, D., Nabauer, M., Koglin, J. und Edelman, E. R. (2005). **Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes**. *J Am Coll Cardiol* 45, 1939-1945, doi: 10.1016/j.jacc.2005.03.040.
- Mol, K. H. J. M., Hoeks, S. E., van Mieghem, N. M., Verhagen, H. J. M., Boersma, E., Stolker, R. J. und van Lier, F. (2019). **Preoperative coronary angiography in vascular surgery patients with asymptomatic elevated high-sensitivity troponin T: a case series**. *Br J Anaesth* 123, 565-569, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.08.013>.
- Mor, A., Keren, G., Kloog, Y. und George, J. (2008). **N-Ras or K-Ras inhibition increases the number and enhances the function of Foxp3 regulatory T cells**. *Eur J Immunol* 38, 1493-1502, doi: 10.1002/eji.200838292.

- Mor, A., Luboshits, G., Planer, D., Keren, G. und George, J. (2006). **Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes.** *Eur Heart J* 27, 2530-2537, doi: 10.1093/eurheartj/ehl222.
- Mor, A., Planer, D., Luboshits, G., Afek, A., Metzger, S., Chajek-Shaul, T., Keren, G. und George, J. (2007). **Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 893-900, doi: 10.1161/01.ATV.0000259365.31469.89.
- Morbiducci, U., Kok, A. M., Kwak, B. R., Stone, P. H., Steinman, D. A. und Wentzel, J. J. (2016). **Atherosclerosis at arterial bifurcations: evidence for the role of haemodynamics and geometry.** *Thromb Haemost* 115, 484-492, doi: 10.1160/th15-07-0597.
- Moroni, F., Ammirati, E., Norata, G. D., Magnoni, M. und Camici, P. G. (2019). **The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis.** *Mediators Inflamm* 2019, 7434376, doi: 10.1155/2019/7434376.
- Mossanen, J. C., Jansen, T. U., Pracht, J., Liepelt, A., Buendgens, L., Stoppe, C., Goetzenich, A., Simon, T.-P., Autschbach, R., Marx, G. und Tacke, F. (2020). **Elevated circulating CD14++CD16+ intermediate monocytes are independently associated with extracardiac complications after cardiac surgery.** *Sci Rep* 10, 947, doi: 10.1038/s41598-020-57700-9.
- Motulsky, H. J. und Brown, R. E. (2006). **Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate.** *BMC Bioinformatics* 7, 123, doi: 10.1186/1471-2105-7-123.
- Münzel, T. (2008). **Endotheliale Dysfunktion: Pathophysiologie, Diagnostik und prognostische Bedeutung.** *Dtsch Med Wochenschr* 133, 2465-2470, doi: 10.1055/s-0028-1100941.
- Nagele, P., Brown, F., Gage, B. F., Gibson, D. W., Miller, J. P., Jaffe, A. S., Apple, F. S. und Scott, M. G. (2013). **High-sensitivity cardiac troponin T in prediction and diagnosis of myocardial infarction and long-term mortality after noncardiac surgery.** *Am Heart J* 166, 325-332.e321, doi: 10.1016/j.ahj.2013.04.018.
- Nanno, S., Koh, H., Katayama, T., Hashiba, M., Sato, A., Makuuchi, Y., Nagasaki, J., Kuno, M., Yoshimura, T., Okamura, H., Nishimoto, M., Hirose, A., Nakamae, M., Nakane, T., Hino, M. und Nakamae, H. (2016). **Plasma Levels of Presepsin (Soluble CD14-subtype) as a Novel Prognostic Marker for Hemophagocytic Syndrome in Hematological Malignancies.** *Intern Med* 55, 2173-2184, doi: 10.2169/internalmedicine.55.6524.
- National Clinical Guideline Centre (2013). **National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance.** In: *Acute Kidney Injury: Prevention, Detection and Management Up to the Point of Renal Replacement Therapy*, Royal College of Physicians (UK) National Clinical Guideline Centre., London.
- Naughton, C. und Feneck, R. O. (2007). **The impact of age on 6-month survival in patients with cardiovascular risk factors undergoing elective non-cardiac surgery.** *Int J Clin Pract* 61, 768-776, doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01304.x.
- Nepogodiev, D., Martin, J., Biccard, B., Makupe, A., Bhangu, A., Nepogodiev, D., Martin, J., Biccard, B., Makupe, A., Ademuyiwa, A., Adisa, A. O., Aguilera, M.-L., Chakrabortee, S., Fitzgerald, J. E., Ghosh, D., Glasbey, J. C., Harrison, E. M., Ingabire, J. C. A., Salem, H., Lapitan, M. C., Lawani, I., Lissauer, D., Magill, L., Moore, R., Osei-Bordom, D. C., Pinkney, T. D., Qureshi, A. U., Ramos-De la Medina, A., Rayne, S., Sundar, S., Tabiri, S., Verjee, A., Yopez, R., Garden, O. J., Lilford, R., Brocklehurst, P., Morton, D. G. und Bhangu, A. (2019). **Global burden of postoperative death.** *Lancet* 393, 401, doi: 10.1016/S0140-6736(18)33139-8.
- Neri Serneri, G. G., Prisco, D., Martini, F., Gori, A. M., Brunelli, T., Poggesi, L., Rostagno, C., Gensini, G. F. und Abbate, R. (1997). **Acute T-cell activation is detectable in unstable angina.** *Circulation* 95, 1806-1812, doi: 10.1161/01.cir.95.7.1806.
- Ng, T. H. S., Britton, G., Hill, E., Verhagen, J., Burton, B. und Wraith, D. (2013). **Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10.** *Front Immunol* 4, doi: 10.3389/fimmu.2013.00129.

- Nordlohne, J., Helmke, A., Ge, S., Rong, S., Chen, R., Waisman, A., Haller, H. und von Vietinghoff, S. (2018). **Aggravated Atherosclerosis and Vascular Inflammation With Reduced Kidney Function Depend on Interleukin-17 Receptor A and Are Normalized by Inhibition of Interleukin-17A.** *JACC Basic Transl Sci* 3, 54-66, doi: 10.1016/j.jacbts.2017.08.005.
- Nour-Eldine, W., Joffre, J., Zibara, K., Esposito, B., Giraud, A., Zeboudj, L., Vilar, J., Terada, M., Bruneval, P., Vivier, E., Ait-Oufella, H., Mallat, Z., Ugolini, S. und Tedgui, A. (2018). **Genetic Depletion or Hyperresponsiveness of Natural Killer Cells Do Not Affect Atherosclerosis Development.** *Circ Res* 122, 47-57, doi: 10.1161/circresaha.117.311743.
- O'Neil-Callahan, K., Katsimaglis, G., Tepper, M. R., Ryan, J., Mosby, C., Ioannidis, J. P. und Danias, P. G. (2005). **Statins decrease perioperative cardiac complications in patients undergoing noncardiac vascular surgery: the Statins for Risk Reduction in Surgery (StaRRS) study.** *J Am Coll Cardiol* 45, 336-342, doi: 10.1016/j.jacc.2004.10.048.
- Omland, T., de Lemos, J. A., Sabatine, M. S., Christophi, C. A., Rice, M. M., Jablonski, K. A., Tjora, S., Domanski, M. J., Gersh, B. J., Rouleau, J. L., Pfeiffer, M. A. und Braunwald, E. (2009). **A Sensitive Cardiac Troponin T Assay in Stable Coronary Artery Disease.** *N Engl J Med* 361, 2538-2547, doi: 10.1056/NEJMoa0805299.
- Ordemann, J., Jacobi, C. A., Schwenk, W., Stosslein, R. und Muller, J. M. (2001). **Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections.** *Surg Endosc* 15, 600-608, doi: 10.1007/s004640090032.
- Pasterkamp, G., Falk, E., Woutman, H. und Borst, C. (2000). **Techniques characterizing the coronary atherosclerotic plaque: influence on clinical decision making?** *J Am Coll Cardiol* 36, 13-21, doi: [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(00\)00677-X](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)00677-X).
- Pastrana, J. L., Sha, X., Virtue, A., Mai, J., Cueto, R., Lee, I. A., Wang, H. und Yang, X. F. (2012). **Regulatory T cells and Atherosclerosis.** *J Clin Exp Cardiol* 2012, 2, doi: 10.4172/2155-9880.S12-002.
- Patel, A. A., Zhang, Y., Fullerton, J. N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A. A., Bigley, V., Flavell, R. A., Gilroy, D. W., Asquith, B., Macallan, D. und Yona, S. (2017). **The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation.** *J Exp Med* 214, 1913-1923, doi: 10.1084/jem.20170355.
- Pencina, M. J., D'Agostino, R. B., Sr., D'Agostino, R. B., Jr. und Vasan, R. S. (2008). **Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond.** *Stat Med* 27, 157-172; discussion 207-112, doi: 10.1002/sim.2929.
- Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagaman, J. R., Oliver, P. M. und Maeda, N. (1992). **Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci of U.S.A* 89, 4471-4475, doi: 10.1073/pnas.89.10.4471.
- Pinderski, L. J., Fischbein, M. P., Subbanagounder, G., Fishbein, M. C., Kubo, N., Cheroutre, H., Curtiss, L. K., Berliner, J. A. und Boisvert, W. A. (2002). **Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes.** *Circ Res* 90, 1064-1071, doi: 10.1161/01.res.0000018941.10726.fa.
- Poise Study Group, Devereaux, P. J., Yang, H., Yusuf, S., Guyatt, G., Leslie, K., Villar, J. C., Xavier, D., Chrolavicius, S., Greenspan, L., Pogue, J., Pais, P., Liu, L., Xu, S., Malaga, G., Avezum, A., Chan, M., Montori, V. M., Jacka, M. und Choi, P. (2008). **Effects of extended-release metoprolol succinate in patients undergoing non-cardiac surgery (POISE trial): a randomised controlled trial.** *Lancet* 371, 1839-1847, doi: 10.1016/S0140-6736(08)60601-7.
- Poldermans, D., Bax, J. J., Kertai, M. D., Krenning, B., Westerhout, C. M., Schinkel, A. F., Thomson, I. R., Lansberg, P. J., Fleisher, L. A., Klein, J., van Urk, H., Roelandt, J. R. und Boersma, E. (2003). **Statins are associated with a reduced incidence of perioperative mortality in patients undergoing major noncardiac vascular surgery.** *Circulation* 107, 1848-1851, doi: 10.1161/01.CIR.0000066286.15621.98.

- Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Falk, V., González-Juanatey, J. R., Harjola, V.-P., Jankowska, E. A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J. T., Pieske, B., Riley, J. P., Rosano, G. M. C., Ruilope, L. M., Ruschitzka, F., Rutten, F. H., van der Meer, P. und Group, E. S. C. S. D. (2016). **2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.** *Eur Heart J* 37, 2129-2200, doi: 10.1093/eurheartj/ehw128.
- Popov, D., Plyushch, M., Ovseenko, S., Abramyan, M., Podshchekoldina, O. und Yaroustovsky, M. (2015). **Prognostic value of sCD14-ST (presepsin) in cardiac surgery.** *Kardiochir Torakochirurgia Pol* 12, 30-36, doi: 10.5114/kitp.2015.50565.
- Priebe, H.-J. (2016). **Pharmacological modification of the perioperative stress response in noncardiac surgery.** *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 30, 171-189, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2016.03.001>.
- Puelacher, C., Buse, G. L., Seeberger, D., Sazgary, L., Marbot, S., Lampart, A., Espinola, J., Kindler, C., Hammerer, A., Seeberger, E., Strebel, I., Wildi, K., Twerenbold, R., Lavallaz, J. d. F. d., Steiner, L., Gurke, L., Breidhardt, T., Rentsch, K., Buser, A., Gualandro, D. M., Osswald, S., Mueller, C., Seeberger, M., Christ-Crain, M., Cuculi, F., Badertscher, P., Nestelberger, T., Wussler, D., Flores, D., Boeddinghaus, J., Sabti, Z., Giménez, M. R., Kozhuharov, N., Shrestha, S., Kloos, W., Lohrmann, J., Reichlin, T., Freese, M., Meissner, K., Kaiser, C. und Buser, A. (2018). **Perioperative Myocardial Injury After Noncardiac Surgery.** *Circulation* 137, 1221-1232, doi: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030114.
- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T. Z., Futter, C. E., Anderson, G., Walker, L. S. und Sansom, D. M. (2011). **Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4.** *Science* 332, 600-603, doi: 10.1126/science.1202947.
- Rajavashisth, T. B., Liao, J. K., Galis, Z. S., Tripathi, S., Laufs, U., Tripathi, J., Chai, N. N., Xu, X. P., Jovinge, S., Shah, P. K. und Libby, P. (1999). **Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase.** *J Biol Chem* 274, 11924-11929, doi: 10.1074/jbc.274.17.11924.
- Rekhter, M. D. (2002). **How to evaluate plaque vulnerability in animal models of atherosclerosis?** *Cardiovasc Res* 54, 36-41, doi: 10.1016/s0008-6363(01)00537-5.
- Rey Nores, J. E., Bensussan, A., Vita, N., Stelter, F., Arias, M. A., Jones, M., Lefort, S., Borysiewicz, L. K., Ferrara, P. und Labeta, M. O. (1999). **Soluble CD14 acts as a negative regulator of human T cell activation and function.** *Eur J Immunol* 29, 265-276, doi: 10.1002/(sici)1521-4141(199901)29:01<265::Aid-immu265>3.0.Co;2-g.
- Richardson, P. D., Davies, M. J. und Born, G. V. R. (1989). **Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques.** *Lancet* 334, 941-944, doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)90953-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)90953-7).
- Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S. D., Kastelein, J. J. P., Cornel, J. H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., Vida-Simiti, L., Flather, M., Shimokawa, H., Ogawa, H., Dellborg, M., Rossi, P. R. F., Troquay, R. P. T., Libby, P. und Glynn, R. J. (2017). **Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease.** *N Engl J Med* 377, 1119-1131, doi: 10.1056/NEJMoa1707914.
- Robbins, C. S., Hilgendorf, I., Weber, G. F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J. L., Gorbатов, R., Sukhova, G. K., Gerhardt, L. M., Smyth, D., Zavitz, C. C., Shikatani, E. A., Parsons, M., van Rooijen, N., Lin, H. Y., Husain, M., Libby, P., Nahrendorf, M., Weissleder, R. und Swirski, F. K. (2013). **Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis.** *Nat Med* 19, 1166-1172, doi: 10.1038/nm.3258.

- Robertson, A.-K. L., Rudling, M., Zhou, X., Gorelik, L., Flavell, R. A. und Hansson, G. K. (2003). **Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis**. *Journal Clin Invest* 112, 1342-1350, doi: 10.1172/JCI18607.
- Rodriguez-Perea, A. L., Arcia, E. D., Rueda, C. M. und Velilla, P. A. (2016). **Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents**. *Clin Exp Immunol* 185, 281-291, doi: 10.1111/cei.12804.
- Rodseth, R. N., Lurati Buse, G. A., Bolliger, D., Burkhart, C. S., Cuthbertson, B. H., Gibson, S. C., Mahla, E., Leibowitz, D. W. und Biccard, B. M. (2011). **The predictive ability of pre-operative B-type natriuretic peptide in vascular patients for major adverse cardiac events: an individual patient data meta-analysis**. *J Am Coll Cardiol* 58, 522-529, doi: 10.1016/j.jacc.2011.04.018.
- Rogacev, K. S., Cremers, B., Zawada, A. M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., Grosse-Dunker, G., Heisel, I., Hornof, F., Jeken, J., Rebling, N. M., Ulrich, C., Scheller, B., Bohm, M., Fliser, D. und Heine, G. H. (2012). **CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography**. *J Am Coll Cardiol* 60, 1512-1520, doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.019.
- Rogacev, K. S., Ulrich, C., Blomer, L., Hornof, F., Oster, K., Ziegelin, M., Cremers, B., Grenner, Y., Geisel, J., Schlitt, A., Kohler, H., Fliser, D., Girndt, M. und Heine, G. H. (2010). **Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis**. *Eur Heart J* 31, 369-376, doi: 10.1093/eurheartj/ehp308.
- Rohm, I., Atiskova, Y., Drobnik, S., Fritzenwanger, M., Kretzschmar, D., Pistulli, R., Zanol, J., Kronert, T., Mall, G., Figulla, H. R. und Yilmaz, A. (2015). **Decreased regulatory T cells in vulnerable atherosclerotic lesions: imbalance between pro- and anti-inflammatory cells in atherosclerosis**. *Mediators Inflamm* 2015, 364710, doi: 10.1155/2015/364710.
- Romano, M., Fanelli, G., Albany, C. J., Giganti, G. und Lombardi, G. (2019). **Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity**. *Front Immunol* 10, doi: 10.3389/fimmu.2019.00043.
- Roshanov, P. S., Sheth, T., Duceppe, E., Tandon, V., Bessissow, A., Chan, M. T. V., Butler, C., Chow, B. J. W., Khan, J. S. und Devereaux, P. J. (2019). **Relationship between Perioperative Hypotension and Perioperative Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease Undergoing Major Noncardiac Surgery**. *Anesthesiology* 130, 756-766, doi: 10.1097/aln.0000000000002654.
- Ross, R., Glomset, J. und Harker, L. (1977). **Response to injury and atherogenesis**. *Am J Pathol* 86, 675-684.
- Rossaint, J. und Zarbock, A. (2018). **Perioperative Inflammation and Its Modulation by Anesthetics**. *Anesth Analg* 126, 1058-1067, doi: 10.1213/ane.0000000000002484.
- Rothe, G. (2007). **Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie**. In: Zellläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, Hrsg. Sack U, T. A., Rothe G, Karger, Basel, S. 27-70.
- Saadoun, D., Rosenzweig, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P. und Klatzmann, D. (2011). **Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis**. *N Engl J Med* 365, 2067-2077, doi: 10.1056/NEJMoa1105143.
- Saito, J., Hashiba, E., Kushikata, T., Mikami, A. und Hirota, K. (2016). **Changes in presepsin concentrations in surgical patients with end-stage kidney disease undergoing living kidney transplantation: a pilot study**. *J Anesth* 30, 174-177, doi: 10.1007/s00540-015-2065-1.
- Saito, Y., Shimada, M., Utsunomiya, T., Morine, Y., Imura, S., Ikemoto, T., Mori, H., Hanaoka, J., Iwahashi, S., Yamada, S. und Asanoma, M. (2013). **Regulatory T cells in the blood: a new marker of surgical stress**. *Surgery Today* 43, 608-612, doi: 10.1007/s00595-013-0517-5.
- Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U. D. und Bethunaickan, R. (2018). **Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection**. *Front Immunol* 9, doi: 10.3389/fimmu.2018.01726.

- Santamaría-Cadavid, M., Rodríguez-Castro, E., Rodríguez-Yáñez, M., Arias-Rivas, S., López-Dequidt, I., Pérez-Mato, M., Rodríguez-Pérez, M., López-Loureiro, I., Hervella, P., Campos, F., Castillo, J., Iglesias-Rey, R. und Sobrino, T. (2020). **Regulatory T cells participate in the recovery of ischemic stroke patients.** *BMC Neurol* 20, 68-68, doi: 10.1186/s12883-020-01648-w.
- Saoudi, A., Kassem, S., Dejean, A. und Gaud, G. (2014). **Rho-GTPases as key regulators of T lymphocyte biology.** *Small GTPases* 5, e28208, doi: 10.4161/sgtp.28208.
- Sasaki, N., Yamashita, T., Takeda, M., Shinohara, M., Nakajima, K., Tawa, H., Usui, T. und Hirata, K. (2009). **Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice.** *Circulation* 120, 1996-2005, doi: 10.1161/circulationaha.109.863431.
- Schauer, D., Starlinger, P., Zajc, P., Alidzanovic, L., Maier, T., Buchberger, E., Pop, L., Gruenberger, B., Gruenberger, T. und Brostjan, C. (2014). **Monocytes with angiogenic potential are selectively induced by liver resection and accumulate near the site of liver regeneration.** *BMC Immunol* 15, 50-50, doi: 10.1186/s12865-014-0050-3.
- Schlitt, A., Heine, G. H., Blankenberg, S., Espinola-Klein, C., Dopheide, J. F., Bickel, C., Lackner, K. J., Iz, M., Meyer, J., Darius, H. und Rupprecht, H. J. (2004). **CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels.** *Thromb Haemost* 92, 419-424, doi: 10.1160/th04-02-0095.
- Schmitz, G. und Orso, E. (2002). **CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors.** *Curr Opin Lipidol* 13, 513-521, doi: 10.1097/00041433-200210000-00007.
- Scholz, A. S., Handke, J., Gillmann, H. J., Zhang, Q., Dehne, S., Janssen, H., Arens, C., Espeter, F., Sander, A., Giannitsis, E., Uhle, F., Weigand, M. A., Motsch, J. und Larmann, J. (2020). **Frontline Science: Low regulatory T cells predict perioperative major adverse cardiovascular and cerebrovascular events after noncardiac surgery.** *J Leukoc Biol* 107, 717-730, doi: 10.1002/JLB.5HI1018-392RR.
- Schutt, C., Schilling, T., Grunwald, U., Schonfeld, W. und Kruger, C. (1992). **Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14.** *Res Immunol* 143, 71-78, doi: 10.1016/0923-2494(92)80082-v.
- Scrutinio, D., Passantino, A., Di Serio, F., Angiletta, D., Santoro, D. und Regina, G. (2011). **High-sensitivity C-reactive protein predicts cardiovascular events and myocardial damage after vascular surgery.** *J Vasc Surg* 54, 474-479, doi: 10.1016/j.jvs.2011.01.041.
- Sedlacek, H.-H. (2017). **Immunologie – die Immunabwehr des Menschen, Schutz, Gefahren, Erkrankungen.**
- Seimon, T. und Tabas, I. (2009). **Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis.** *J Lipid Res* 50 Suppl, S382-387, doi: 10.1194/jlr.R800032-JLR200.
- Setiady, Y. Y., Coccia, J. A. und Park, P. U. (2010). **In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγRIIIb+ phagocytes.** *Eur J Immunol* 40, 780-786, doi: 10.1002/eji.200939613.
- Sheth, T., Natarajan, M. K., Hsieh, V., Valettas, N., Rokoss, M., Mehta, S., Jolly, S., Tandon, V., Bezerra, H. und Devereaux, P. J. (2018). **Incidence of thrombosis in perioperative and non-operative myocardial infarction.** *Br J Anaesth* 120, 725-733, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bja.2017.11.063>.
- Shive, C. L., Jiang, W., Anthony, D. D. und Lederman, M. M. (2015). **Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation.** *AIDS* 29, 1263-1265, doi: 10.1097/QAD.0000000000000735.
- Simon Daniel, I. und Zidar, D. (2012). **Neutrophils in Atherosclerosis.** *Circ Res* 110, 1036-1038, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268367.

- Sinha, S. K., Mishra, V., Nagwani, S. und Rajavashisth, T. B. (2014). **Effects of G-CSF on serum cholesterol and development of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-deficient mice.** *Int J Clin Exp Med* 7, 1979-1989.
- Sluimer, J. C., Gasc, J. M., van Wanroij, J. L., Kisters, N., Groeneweg, M., Sollewijn Gelpke, M. D., Cleutjens, J. P., van den Akker, L. H., Corvol, P., Wouters, B. G., Daemen, M. J. und Bijnens, A. P. (2008). **Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis.** *J Am Coll Cardiol* 51, 1258-1265, doi: 10.1016/j.jacc.2007.12.025.
- Smilowitz, N. R. und Berger, J. S. (2016). **Perioperative Management to Reduce Cardiovascular Events.** *Circulation* 133, 1125-1130, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017787.
- Smilowitz, N. R., Gupta, N., Ramakrishna, H., Guo, Y., Berger, J. S. und Bangalore, S. (2017). **Perioperative major adverse cardiovascular and cerebrovascular events associated with noncardiac surgery.** *JAMA Cardiology* 2, 181-187, doi: 10.1001/jamacardio.2016.4792.
- Smith, E., Prasad, K. M., Butcher, M., Dobrian, A., Kolls, J. K., Ley, K. und Galkina, E. (2010). **Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.** *Circulation* 121, 1746-1755, doi: 10.1161/circulationaha.109.924886.
- Sorathia, N., Al-Rubaye, H. und Zal, B. (2019). **The Effect of Statins on the Functionality of CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T-cells in Acute Coronary Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomised Controlled Trials in Asian Populations.** *Eur Cardiol* 14, 123-129, doi: 10.15420/ecr.2019.9.2.
- Statistisches Bundesamt (2017). **Todesursachen in Deutschland.** URL: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/inhalt.html> [Stand:29.02.2020].
- Statistisches Bundesamt (2019). **Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern (4-Steller) - 2018.** URL: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Publikationen/Downloads-Krankenhaeuser/operationen-prozeduren-5231401187014.html> [Stand:17.02.2020].
- Stöger, J. L., Gijbels, M. J. J., van der Velden, S., Manca, M., van der Loos, C. M., Biessen, E. A. L., Daemen, M. J. A. P., Lutgens, E. und de Winther, M. P. J. (2012). **Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis.** *Atherosclerosis* 225, 461-468, doi: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.013>.
- Stroeder, J., Bomberg, H., Wagenpfeil, S., Buecker, A., Schaeffers, H. J., Katoh, M., Groesdonk, H. V. und Minko, P. (2018). **Presepsin and Inflammatory Markers Correlate With Occurrence and Severity of Nonocclusive Mesenteric Ischemia After Cardiovascular Surgery.** *Crit Care Med* 46, e575-e583, doi: 10.1097/ccm.0000000000003091.
- Sula Karreci, E., Eskandari, S. K., Dotiwala, F., Routray, S. K., Kurdi, A. T., Assaker, J. P., Luckyanchikov, P., Mihali, A. B., Maarouf, O., Borges, T. J., Alkhudhayri, A., Patel, K. R., Radwan, A., Ghobrial, I., McGrath, M., Chandraker, A., Riella, L. V., Elyaman, W., Abdi, R., Lieberman, J. und Azzi, J. (2017). **Human regulatory T cells undergo self-inflicted damage via granzyme pathways upon activation.** *JCI Insight* 2, doi: 10.1172/jci.insight.91599.
- Sun, Z., Du, C., Xu, P. und Miao, C. (2019). **Surgical trauma-induced CCL18 promotes recruitment of regulatory T cells and colon cancer progression.** *J Cell Physiol* 234, 4608-4616, doi: 10.1002/jcp.27245.
- Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R. und Pittet, M. J. (2007). **Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytois and give rise to macrophages in atheromata.** *J Clin Invest* 117, 195-205, doi: 10.1172/JCI29950.
- Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T. J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., Lira, S. A., Habenicht, A. J. und Randolph, G. J. (2007). **Monocyte subsets differentially employ**

- CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques.** *J Clin Invest* 117, 185-194, doi: 10.1172/JCI28549.
- Takase, H. und Dohi, Y. (2014). **Kidney function crucially affects B-type natriuretic peptide (BNP), N-terminal proBNP and their relationship.** *Eur J Clin Invest* 44, 303-308, doi: 10.1111/eci.12234.
- Tang, W., Cui, D., Jiang, L., Zhao, L., Qian, W., Long, S. A. und Xu, K. (2015). **Association of common polymorphisms in the IL2RA gene with type 1 diabetes: evidence of 32,646 individuals from 10 independent studies.** *J Cell Mol Med* 19, 2481-2488, doi: 10.1111/jcmm.12642.
- Tanimura, S., Fujieda, Y., Kono, M., Shibata, Y., Hisada, R., Sugawara, E., Nakamura, H., Ohmura, K., Shimamura, S., Mitani, A., Shida, H., Watanabe, T., Kato, M., Oku, K., Bohgaki, T., Amengual, O., Yasuda, S., Shimizu, C. und Atsumi, T. (2017). **Clinical significance of plasma presepsin levels in patients with systemic lupus erythematosus.** *Mod Rheumatol*, 1-7, doi: 10.1080/14397595.2017.1408755.
- Tano, J.-Y., Solanki, S., Lee, R. H., Smedlund, K., Birnbaumer, L. und Vazquez, G. (2013). **Bone marrow deficiency of TRPC3 channel reduces early lesion burden and necrotic core of advanced plaques in a mouse model of atherosclerosis.** *Cardiovasc Res* 101, 138-144, doi: 10.1093/cvr/cvt231.
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A. und White, H. D. (2018). **Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018).** *J Am Coll Cardiol* 72, 2231-2264, doi: 10.1016/j.jacc.2018.08.1038.
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Simoons, M. L., Chaitman, B. R., White, H. D., Joint, E. S. C. A. A. H. A. W. H. F. T. F. f. U. D. o. M. I., Authors/Task Force Members, C., Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D., Biomarker, S., Jaffe, A. S., Katus, H. A., Apple, F. S., Lindahl, B., Morrow, D. A., Subcommittee, E. C. G., Chaitman, B. R., Clemmensen, P. M., Johanson, P., Hod, H., Imaging, S., Underwood, R., Bax, J. J., Bonow, J. J., Pinto, F., Gibbons, R. J., Classification, S., Fox, K. A., Atar, D., Newby, L. K., Galvani, M., Hamm, C. W., Intervention, S., Uretsky, B. F., Steg, P. G., Wijns, W., Bassand, J. P., Menasche, P., Ravkilde, J., Trials, Registries, S., Ohman, E. M., Antman, E. M., Wallentin, L. C., Armstrong, P. W., Simoons, M. L., Trials, Registries, S., Januzzi, J. L., Nieminen, M. S., Gheorghide, M., Filippatos, G., Trials, Registries, S., Luepker, R. V., Fortmann, S. P., Rosamond, W. D., Levy, D., Wood, D., Trials, Registries, S., Smith, S. C., Hu, D., Lopez-Sendon, J. L., Robertson, R. M., Weaver, D., Tendera, M., Bove, A. A., Parkhomenko, A. N., Vasilieva, E. J., Mendis, S., Guidelines, E. S. C. C. f. P., Bax, J. J., Baumgartner, H., Ceconi, C., Dean, V., Deaton, C., Fagard, R., Funck-Brentano, C., Hasdai, D., Hoes, A., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., McDonagh, T., Moulin, C., Popescu, B. A., Reiner, Z., Sechtem, U., Sirnes, P. A., Tendera, M., Torbicki, A., Vahanian, A., Windecker, S., Document, R., Morais, J., Aguiar, C., Almahmeed, W., Arnar, D. O., Barili, F., Bloch, K. D., Bolger, A. F., Botker, H. E., Bozkurt, B., Bugiardini, R., Cannon, C., de Lemos, J., Eberli, F. R., Escobar, E., Hlatky, M., James, S., Kern, K. B., Moliterno, D. J., Mueller, C., Neskovic, A. N., Pieske, B. M., Schulman, S. P., Storey, R. F., Taubert, K. A., Vranckx, P. und Wagner, D. R. (2012). **Third universal definition of myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol* 60, 1581-1598, doi: 10.1016/j.jacc.2012.08.001.
- Tiemessen, M. M., Jagger, A. L., Evans, H. G., van Herwijnen, M. J., John, S. und Taams, L. S. (2007). **CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19446-19451, doi: 10.1073/pnas.0706832104.
- Timmerman, K. L., Flynn, M. G., Coen, P. M., Markofski, M. M. und Pence, B. D. (2008). **Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise?** *J Leukoc Biol* 84, 1271-1278, doi: 10.1189/jlb.0408244.
- Torres, A., Torres, K., Paszkowski, T., Staśkiewicz, G. J. und Maciejewski, R. (2007). **Cytokine response in the postoperative period after surgical treatment of benign adnexal masses: comparison between laparoscopy and laparotomy.** *Surg Endosc* 21, 1841-1848, doi: 10.1007/s00464-007-9260-6.
- Tsujioka, H., Imanishi, T., Ikejima, H., Kuroi, A., Takarada, S., Tanimoto, T., Kitabata, H., Okochi, K., Arita, Y., Ishibashi, K., Komukai, K., Kataiwa, H., Nakamura, N., Hirata, K., Tanaka, A. und Akasaka, T. (2009). **Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol* 54, 130-138, doi: 10.1016/j.jacc.2009.04.021.

- Urbanski, K., Ludew, D., Filip, G., Filip, M., Sagan, A., Szczepaniak, P., Grudzien, G., Sadowski, J., Jasiewicz-Honkisz, B., Sliwa, T., Kapelak, B., McGinnigle, E., Mikolajczyk, T. und Guzik, T. J. (2017). **CD14(+)CD16(++) "nonclassical" monocytes are associated with endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease.** *Thromb Haemost* 117, 971-980, doi: 10.1160/th16-08-0614.
- Urra, X., Villamor, N., Amaro, S., Gomez-Choco, M., Obach, V., Oleaga, L., Planas, A. M. und Chamorro, A. (2009). **Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke.** *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 994-1002, doi: 10.1038/jcbfm.2009.25.
- van der Wal, A. C. und Becker, A. E. (1999). **Atherosclerotic plaque rupture – pathologic basis of plaque stability and instability.** *Cardiovasc Res* 41, 334-344, doi: 10.1016/S0008-6363(98)00276-4.
- van der Wal, A. C., Becker, A. E., van der Loos, C. M. und Das, P. K. (1994). **Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology.** *Circulation* 89, 36-44, doi: 10.1161/01.cir.89.1.36.
- van der Wal, A. C., Das, P. K., Bentz van de Berg, D., van der Loos, C. M. und Becker, A. E. (1989). **Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response.** *Lab Invest* 61, 166-170.
- van Diepen, S., Bakal, J. A., McAlister, F. A. und Ezekowitz, J. A. (2011). **Mortality and readmission of patients with heart failure, atrial fibrillation, or coronary artery disease undergoing noncardiac surgery: an analysis of 38 047 patients.** *Circulation* 124, 289-296, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.011130.
- van Loosdregt, J., van Oosterhout, M. F., Bruggink, A. H., van Wichen, D. F., van Kuik, J., de Koning, E., Baan, C. C., de Jonge, N., Gmelig-Meyling, F. H. und de Weger, R. A. (2006). **The chemokine and chemokine receptor profile of infiltrating cells in the wall of arteries with cardiac allograft vasculopathy is indicative of a memory T-helper 1 response.** *Circulation* 114, 1599-1607, doi: 10.1161/circulationaha.105.597526.
- van Wanrooij, E. J., de Jager, S. C., van Es, T., de Vos, P., Birch, H. L., Owen, D. A., Watson, R. J., Biessen, E. A., Chapman, G. A., van Berkel, T. J. und Kuiper, J. (2008). **CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL receptor-deficient mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 251-257, doi: 10.1161/atvbaha.107.147827.
- VanderLaan, P. A., Reardon, C. A. und Getz, G. S. (2004). **Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 12-22, doi: 10.1161/01.ATV.0000105054.43931.f0.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (2004). **Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.** *J Exp Med* 199, 971-979, doi: 10.1084/jem.20031579.
- Wakefield, C. H., Carey, P. D., Foulds, S., Monson, J. R. und Guillou, P. J. (1993). **Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery.** *Br J Surg* 80, 205-209, doi: 10.1002/bjs.1800800224.
- Wang, J. und Arase, H. (2014). **Regulation of immune responses by neutrophils.** *Ann NY Acad Sci* 1319, 66-81.
- Wang, Y., Qiu, J., Luo, S., Xie, X., Zheng, Y., Zhang, K., Ye, Z., Liu, W., Gregersen, H. und Wang, G. (2016a). **High shear stress induces atherosclerotic vulnerable plaque formation through angiogenesis.** *Regen Biomater* 3, 257-267, doi: 10.1093/rb/rbw021.
- Wang, Y. M., Ghali, J., Zhang, G. Y., Hu, M., Wang, Y., Sawyer, A., Zhou, J. J., Hapudeniya, D. A., Wang, Y., Cao, Q., Zheng, G., Harris, D. C. und Alexander, S. I. (2016b). **Development and function of Foxp3(+) regulatory T cells.** *Nephrology (Carlton)* 21, 81-85, doi: 10.1111/nep.12652.

- Wang, Z., Lee, J., Zhang, Y., Wang, H., Liu, X., Shang, F. und Zheng, Q. (2011). **Increased Th17 cells in coronary artery disease are associated with neutrophilic inflammation.** *Scand Cardiovasc J* 45, 54-61, doi: 10.3109/14017431.2010.491123.
- Weber, M., Luchner, A., Seeberger, M., Mueller, C., Liebetrau, C., Schlitt, A., Apostolovic, S., Jankovic, R., Bankovic, D., Jovic, M., Mitrovic, V., Nef, H., Mollmann, H. und Hamm, C. W. (2013). **Incremental value of high-sensitive troponin T in addition to the revised cardiac index for peri-operative risk stratification in non-cardiac surgery.** *Eur Heart J* 34, 853-862, doi: 10.1093/eurheartj/ehs445.
- Webster, K. E., Walters, S., Kohler, R. E., Mrkvan, T., Boyman, O., Surh, C. D., Grey, S. T. und Sprent, J. (2009). **In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression.** *J Exp Med* 206, 751-760, doi: 10.1084/jem.20082824.
- Weiser, T. G., Haynes, A. B., Molina, G., Lipsitz, S. R., Esquivel, M. M., Uribe-Leitz, T., Fu, R., Azad, T., Chao, T. E., Berry, W. R. und Gawande, A. A. (2016). **Size and distribution of the global volume of surgery in 2012.** *Bull World Health Organ* 94, 201-209F, doi: 10.2471/BLT.15.159293.
- Whitman, S. C., Ravisankar, P., Elam, H. und Daugherty, A. (2000). **Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice.** *Am J Pathol* 157, 1819-1824, doi: 10.1016/s0002-9440(10)64820-1.
- WHO, W. H. O. (2016). **Cardiovascular diseases (CVDs).** URL: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) [Stand:29.02.2020].
- Wigren, M., Bjorkbacka, H., Andersson, L., Ljungcrantz, I., Fredrikson, G. N., Persson, M., Bryngelsson, C., Hedblad, B. und Nilsson, J. (2012). **Low levels of circulating CD4+FoxP3+ T cells are associated with an increased risk for development of myocardial infarction but not for stroke.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2000-2004, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.251579.
- Winkels, H., Ehinger, E., Vassallo, M., Buscher, K., Dinh, H. Q., Kobiyama, K., Hamers, A. A. J., Cochain, C., Vafadarnejad, E., Saliba, A. E., Zerneck, A., Pramod, A. B., Ghosh, A. K., Anto Michel, N., Hoppe, N., Hilgendorf, I., Zirlik, A., Hedrick, C. C., Ley, K. und Wolf, D. (2018). **Atlas of the Immune Cell Repertoire in Mouse Atherosclerosis Defined by Single-Cell RNA-Sequencing and Mass Cytometry.** *Circ Res* 122, 1675-1688, doi: 10.1161/circresaha.117.312513.
- Wolf, D. und Ley, K. (2019). **Immunity and Inflammation in Atherosclerosis.** *Circ Res* 124, 315-327, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313591.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. und Mathison, J. C. (1990). **CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.** *Science* 249, 1431-1433, doi: 10.1126/science.1698311.
- Xue-Mei, L., Jie, C., Xuan, D., Xiao-Xing, L., Chun-Lin, H. und Yu-Jie, L. (2017). **Changes in CD4(+)CD25(+) Tregs in the pathogenesis of atherosclerosis in ApoE(-/-) mice.** *Exp Biol Med (Maywood)* 242, 918-925, doi: 10.1177/1535370216689826.
- Yaegashi, Y., Shirakawa, K., Sato, N., Suzuki, Y., Kojika, M., Imai, S., Takahashi, G., Miyata, M., Furusako, S. und Endo, S. (2005). **Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis.** *J Infect Chemother* 11, 234-238, doi: 10.1007/s10156-005-0400-4.
- Yamamoto, E., Sugiyama, S., Hirata, Y., Tokitsu, T., Tabata, N., Fujisue, K., Sugamura, K., Sakamoto, K., Tsujita, K., Matsumura, T., Kaikita, K. und Hokimoto, S. (2016). **Prognostic significance of circulating leukocyte subtype counts in patients with coronary artery disease.** *Atherosclerosis* 255, 210-216, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.033.

- Yan, W., Zhou, L., Wen, S., Duan, Q., Huang, F., Tang, Y., Liu, X., Chai, Y. und Wang, L. (2015). **Differential loss of natural killer cell activity in patients with acute myocardial infarction and stable angina pectoris.** *Int J Clin Exp Pathol* 8, 14667-14675.
- Yang, H. S., Hur, M., Yi, A., Kim, H. und Kim, J. (2018). **Prognostic Role of High-sensitivity Cardiac Troponin I and Soluble Suppression of Tumorigenicity-2 in Surgical Intensive Care Unit Patients Undergoing Non-cardiac Surgery.** *Ann Lab Med* 38, 204-211, doi: 10.3343/alm.2018.38.3.204.
- Zarek, P. E., Huang, C. T., Lutz, E. R., Kowalski, J., Horton, M. R., Linden, J., Drake, C. G. und Powell, J. D. (2008). **A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells.** *Blood* 111, 251-259, doi: 10.1182/blood-2007-03-081646.
- Zhang, W. C., Wang, J., Shu, Y. W., Tang, T. T., Zhu, Z. F., Xia, N., Nie, S. F., Liu, J., Zhou, S. F., Li, J. J., Xiao, H., Yuan, J., Liao, M. Y., Cheng, L. X., Liao, Y. H. und Cheng, X. (2012). **Impaired thymic export and increased apoptosis account for regulatory T cell defects in patients with non-ST segment elevation acute coronary syndrome.** *J Biol Chem* 287, 34157-34166, doi: 10.1074/jbc.M112.382978.
- Zhao, T. X., Kostapanos, M., Griffiths, C., Arbon, E. L., Hubsch, A., Kaloyirou, F., Helmy, J., Hoole, S. P., Rudd, J. H. F., Wood, G., Burling, K., Bond, S., Cheriyan, J. und Mallat, Z. (2018). **Low-dose interleukin-2 in patients with stable ischaemic heart disease and acute coronary syndromes (LILACS): protocol and study rationale for a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase I/II clinical trial.** *BMJ Open* 8, e022452-e022452, doi: 10.1136/bmjopen-2018-022452.
- Zhao, Z., Wu, Y., Cheng, M., Ji, Y., Yang, X., Liu, P., Jia, S. und Yuan, Z. (2011). **Activation of Th17/Th1 and Th1, but not Th17, is associated with the acute cardiac event in patients with acute coronary syndrome.** *Atherosclerosis* 217, 518-524, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.043.
- Zhuang, J., Han, Y., Xu, D., Zhu, G., Singh, S., Chen, L., Zhu, M., Chen, W., Xu, Y. und Li, X. (2017). **Comparison of circulating dendritic cell and monocyte subsets at different stages of atherosclerosis: insights from optical coherence tomography.** *BMC Cardiovasc Disord* 17, 270, doi: 10.1186/s12872-017-0702-3.
- Zwissler, B. e. a. (2017). **Präoperative Evaluation erwachsener Patienten vor elektiven, nicht herz-thoraxchirurgischen Eingriffen. Gemeinsame Empfehlung der DGAI, DGCH und DGIM.** *Anästh Intensivmed* 58, 349-364, doi: 10.19224/ai2017.349.

8. EIGENANTEIL UND VERÖFFENTLICHUNGEN

Die klinischen Daten der vorgelegten Arbeit wurden im Rahmen der LeukoKAPE-Projekte erhoben.

LeukoKAPE-1

Der Patienteneinschluss erfolgte durch ärztliches Personal der Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Heidelberg. Patientenproben wurden durch A. S. Scholz oder ärztliches Personal gewonnen. Patientencharakteristika und Daten der durchflusszytometrischen Messungen wurden zu gleichen Teilen von A. S. Scholz und mir erhoben. Die statistische Analyse wurde vollständig von mir durchgeführt und ist in den Abschnitten 4.1.1 – 4.1.7 dargestellt.

LeukoKAPE-2

Die Daten der prospektiven LeukoKAPE-2 Studie wurden im Rahmen eines medizinischen Dissertationsprojektes durch A. S. Scholz erhoben. Die Bestimmung von Presepsin erfolgte eigenständig aus den durch A. S. Scholz gewonnenen Plasmaproben der LeukoKAPE-2 Studienteilnehmer. Die statistische Auswertung der Presepsin-Daten sowie zugehöriger Patientencharakteristika wurde selbstständig von mir durchgeführt und ist unter dem Abschnitt 4.2 zusammengefasst. Die LeukoKAPE-2 Studie wurde durch Drittmittel, die bei der B. Braun Stiftung durch Dr J. Larmann und mich eingeworben wurden, gefördert (BBST-D-17-00039, Fördersumme 28 000 €).

Tierexperimentelle Arbeiten

Der Tierversuchsantrag wurde eigenständig verfasst. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden durch mich und mit freundlicher Unterstützung von U. Krauser durchgeführt. Histologische Färbungen wurden zu gleichen Teilen von K. Stefan und mir angefertigt. Die Datenverarbeitung und -analyse erfolgte selbstständig.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:**Originalpublikation (peer-reviewed)**

1. **J. Handke**, A. S. Scholz, H.-J. Gillmann, H. Janßen, S. Dehne, C. Arens, L. Kummer, F. Uhle, M. Weigand, J. Motsch, J. Larmann; Elevated Presepsin Is Associated with Perioperative Major Adverse Cardiovascular and Cerebrovascular Complications in Elevated-Risk Patients Undergoing Noncardiac Surgery: The Leukocytes and Cardiovascular Perioperative Events Study; *Anesth Analg*, 2019. **128** (6): p. 1344-1353; IF 3,5
2. A. S. Scholz*, **J. Handke***, H.-J. Gillmann, Q. Zhang, S. Dehne, H. Janßen, C. Arens, F. Espeter, A. Sander, E. Giannitsis, F. Uhle, M. Weigand, J. Motsch, J. Larmann; Frontline Science: Low regulatory T cells predict perioperative major adverse cardiovascular and cerebrovascular events after noncardiac surgery; *J Leukoc Biol*, 2020. **107**: 717-730 (*geteilte Erstautorenschaft); IF 4,0
3. **J. Handke**, A. S. Scholz, S. Dehne, J. Krisam, H.-J. Gillmann, H. Janßen, C. Arens, F. Espeter, F. Uhle, J. Motsch, M. Weigand, J. Larmann; Presepsin (sCD14-ST) improves pre-operative prediction of major adverse cardiovascular events in coronary artery disease patients undergoing non-cardiac surgery: Post-hoc analysis of the Leukocytes and Cardiovascular Perioperative Events-2 (LeukoCAPE-2) Study; *Eur J Anaesth*, 2020. **37**:1-13; IF 4,1

Publikation 1 basiert auf der LeukoKAPE-1 Studie, deren Ergebnisse in den Dissertationskapiteln 4.1.1 – 4.1.6 dargestellt sind. Das Manuskript wurde eigenständig durch mich und J. Larmann verfasst.

Publikation 2 beinhaltet die Ergebnisse der *post-hoc* Analyse der LeukoKAPE-1 Studie sowie der prospektiven LeukoKAPE-2 Studie. Es handelt sich um eine geteilte erste Autorenschaft, da das Manuskript sowie die zugrundeliegenden Daten zu gleichen Teilen von A. S. Scholz und mir generiert wurden. Teilergebnisse dieser Publikation werden in abgewandelter Form in Kapitel 4.2 dargestellt.

Publikation 3 basiert auf der *post-hoc* Analyse der LeukoKAPE-2 Studie, deren Ergebnisse im Dissertationskapitel 4.2 dargelegt sind. Die Verfassung des Manuskriptes sowie die zugrundeliegende Datenanalyse erfolgte eigenständig und in enger Absprache mit J. Krisam und J. Larmann.

Übersichtsartikel

1. **J. Handke**, O. Piazza, J. Larmann, S. Tesoro, E. Robertis; Presepsin as a biomarker in perioperative medicine, *Minerva Anestesiol*, 2020; IF 2,8

Bei dieser **Publikation** handelt es sich um einen Übersichtsartikel, der aus einer Kollaboration mit italienischen Kollegen hervorgegangen ist. Sie bietet einen Überblick bezüglich des prognostischen Nutzens von Presepsin für perioperative infektiöse und kardiovaskuläre Komplikationen. Das Kapitel „*Perioperative use of presepsin in cardiac and non-cardiac surgery patients*“ wurde selbstständig verfasst. Große Teil des Manuskriptes wurden durch mich und J. Larmann überarbeitet und vervollständigt.

Abstracts und Poster

1. **J. Handke**, A. S. Scholz, H.-J. Gillmann, S. Dehne, C. Arens, H. Janßen, F. Uhle, M. Weigand, J. Motsch, J. Larmann; Presepsin (sCD14-ST) verbessert die kardiovaskuläre Risikoprädiktion für nicht-kardiochirurgische Operationen, *19. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesie und Intensivmedizin*; September 2017, Berlin, Deutschland

Die **Präsentation des Posters** wurde durch den DGAI im Rahmen eines wissenschaftlichen Wettbewerbs mit dem 2. Preis in der Kategorie „Klinische Arbeiten“ ausgezeichnet.

2. **J. Handke**, A. S. Scholz, H.-J. Gillmann, S. Dehne, C. Arens, H. Janßen, F. Uhle, M. Weigand, J. Motsch, J. Larmann; S242Regulatorische T-Zellen sind mit dem Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen nach nicht-kardiochirurgischen Operationen assoziiert, *Anästhesiologie & Intensivmedizin* **59**

Dieser Abstract wurde in Form eines **mündlichen Vortrages** auf dem Deutschen Anästhesie Congress (DAC), April 2019, Nürnberg, Deutschland gehalten.

3. **J. Handke**, A. S. Scholz, H.-J. Gillmann, S. Dehne, H. Janßen, C. Arens, N. Hansen, F. Espeter, F. Uhle, M.A. Weigand, J. Motsch, J. Larmann; P6252Preoperative plasma presepsin predicts major adverse cardiac and cerebrovascular complications after elective, non-cardiac surgery - post-hoc analysis from the LeukoCAPE-2 trial, *European Heart Journal* **39** (suppl_1): ehy566.P6252-ehy6566.P6252

Für diesen **Kongress** konnte ein Reisekostenstipendium durch die Graduiertenakademie eingeworben werden.

4. **J. Handke**, U. Krauser, K. Stefan, F. Uhle, M.A. Weigand, J. Larmann; Regulatory T cells and their role in perioperative atherosclerotic plaque progression, *Frontiers in CardioVascular Biomedicine (FCVB) 2020*, April 2020, Budapest, Ungarn

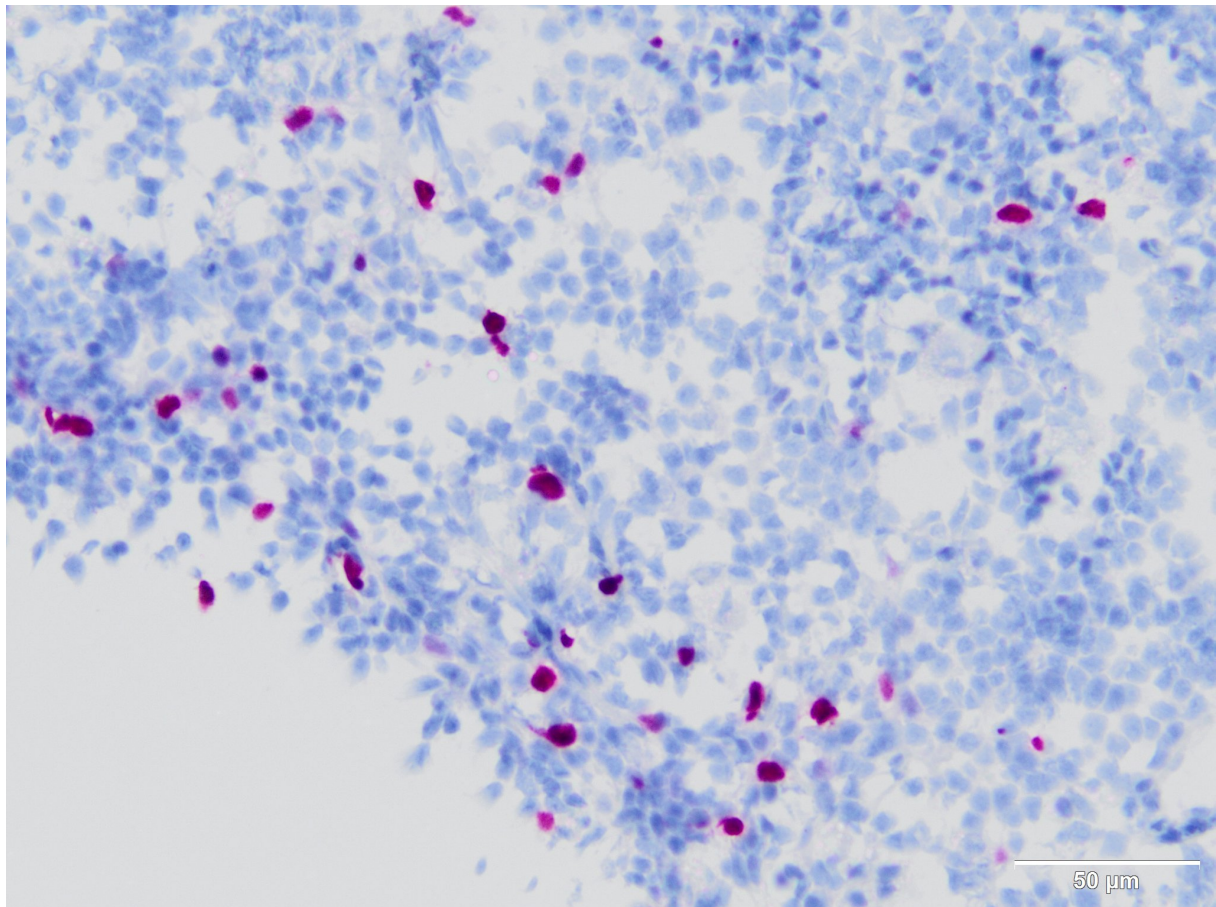
Dieser Abstract enthält vorläufige Daten des Tiermodells und wurde zur moderierten **Poster-Präsentation** auf dem Frontiers in CardioVascular Biomedicine (FCVB) Kongress 2020 akzeptiert, konnte aufgrund der Corona-Pandemie jedoch nicht stattfinden. Der Abstract wird automatisch für den FVCB 2021 angenommen und wird anschließend im Supplement des European Heart Journals veröffentlicht.

Weitere Veröffentlichungen

1. J. Larmann, **J. Handke**, A. Scholz, S. Dehne, C. Arens, H.-J. Gillmann, F. Uhle, M.A. Weigand, J. Motsch, H. Janßen; Preoperative neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio are associated with major adverse cardiovascular and cerebrovascular events in coronary heart disease patients undergoing non-cardiac surgery: Post-hoc analysis of the prospective, observational Leukocytes and Cardiovascular Perioperative Events cohort-1 (LeukoCAPE-1) study; *BMC Cardiovasc Disord*, December 2020; IF 1,6

ANHANG

Anhang 1



Anhang 1. Thymusgewebe als Positivkontrolle der immunhistochemischen Foxp3-Färbung. Pink: Foxp3-positive Zellen, blau: Hämalun gefärbte Zellkerne. Aufnahme wurde in 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

DANKSAGUNG

Mit Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich denjenigen danken, die mich in den vergangenen Jahren begleitet und umfassend unterstützt haben.

Allen voran gilt mein Dank Herrn Dr. med. Jan Larmann, Ph.D., der mir vor vier Jahren das Vertrauen entgegenbrachte und mir die Möglichkeit einräumte, meine Dissertation im Kreis seiner Arbeitsgruppe zu realisieren. Vielen Dank für Deine wissenschaftliche Unterstützung, die Möglichkeit zur Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen sowie an vielfältigen Fortbildungen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater apl. Prof. Dr. med. habil. Johann Motsch, dessen Unterstützung ich mir jederzeit sicher sein durfte. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. med. Markus A. Weigand für die Bereitstellung finanzieller und infrastruktureller Mittel, ohne die eine Realisierung des Projektes undenkbar gewesen wären, bedanken. Bei Dr. biol. Hom. Florian Uhle, M.Sc. möchte ich mich für sein stets konstruktives Feedback sowie seine Hilfestellung bei der Etablierung durchflusszytometrischer Messungen bedanken.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich zudem Herrn Prof. Dr. med. Volker Daniel und Herrn PD Dr. med. Christian Uhl aussprechen, die sich kurzerhand dazu bereit erklärten, die Rolle meiner Prüfer einzunehmen.

Darüber hinaus gebührt Herrn Dr. sc. hum. Johannes Krisam sowie Herrn Dr. med. Hans-Jörg Gillmann ein aufrichtiger Dank für ihre Unterstützung und Expertise hinsichtlich statistischer Fragestellungen. Vielen Dank für Ihre bzw. Deine Geduld!

Selbstverständlich möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe *Translational Peroperative Vasculäre Biologie* für die konstruktive und stets humorvolle Zusammenarbeit bedanken. Um nur einige zu nennen - Laura Kummer, M.Sc., Dr. med. Anna S. Scholz, Annalena Fischer, Alexander Hermann, Carlo Riede, Dr. med. Christoph Arens und Dr. med. Sarah Dehne. Mein besonderer Dank gilt Ute Krauser und Klaus Stefan für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung tierexperimenteller Versuche und histologischer Färbungen. Zudem danke ich Ilona Krämer, Ulrike Gärtner sowie Klaus Hillesheim für die gewissenhafte und fürsorgliche Pflege der Versuchstiere.

Es ist mir ein besonderes Anliegen, mich bei meinen liebsten und längsten Wegbegleitern aus nah und fern für ihre kontinuierliche Unterstützung zu bedanken: Katharina Wehebrink, Christopher Dächert, Vera Pils, Mario König, Frauke Fenz, Benjamin Wegner und Lucie Lommel. Danke für ausgiebige Gespräche abseits der Wissenschaft, gemeinsame Abenteuer, lange Wanderungen, Spieleabende und unzählige Beachvolleyballstunden. Ihr gebt mir das Gefühl, unabhängig der Distanz, die zwischen uns liegt, jederzeit auf Euch zählen zu können.

Und schließlich gilt meiner Familie ein besonderer Dank für Eure ununterbrochene moralische und emotionale Unterstützung. Eure Hartnäckigkeit, Ermutigungen sowie aufgezeigte Perspektivwechsel trugen maßgeblich zum Fortschritt des Projektes „Dissertation“ bei. Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern, Dany und Michael Handke, die stets und uneingeschränkt hinter mir standen und immer stehen werden. Eure Fürsorge, Aufmerksamkeit, Eure Geduld und Euer Vertrauen machten mich zu dem Menschen, der ich heute bin. Und zuletzt - danke Michael Kläger. Danke, dass Du mir den Rücken freihältst. Danke, dass Du mir zuhörst. Danke, dass Du da bist.

EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

*Die Bedeutung von Leukozyten-Subpopulationen in der Entstehung kardiovaskulärer
Ereignisse nach nicht-kardiochirurgischen Operationen*

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift