

Diplomarbeit

**Der Einfluss von Erythropoietin-Genvarianten auf Marker der  
Erythropoiese und auf die Pathogenese der peripheren  
arteriellen Verschlusskrankheit**

eingereicht von  
Sebastian Khuen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)

an der  
Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am  
Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik

unter der Anleitung von  
Assoz. Prof. Univ.-Doz. Mag. Dr. rer. nat. Wilfried Renner

Graz, 2. Dezember 2020

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, 2. Dezember 2020

Sebastian Khuen eh.

## **Danksagung**

Die Einreichung dieser Diplomarbeit stellt einen Endpunkt dar, dessen Erreichen ich der treuen Unterstützung vieler wunderbarer Menschen verdanke.

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer, Assoz. Prof. Univ.-Doz. Mag. Dr. rer. nat. Wilfried Renner, aussprechen, welcher mir stets umsichtig und mit großer Freundlichkeit seine wertvolle Unterstützung angeboten hat.

Ein spezieller Dank gilt meiner Gemahlin, Briega, die mich auf liebevolle Weise immer wieder ermuntert hat, weitere Abschnitte dieser Arbeit fertigzustellen und mir auf diesem Weg selbstlos und gütig zur Seite gestanden hat.

Zu guter Letzt gebührt ein besonderer Dank meinen Eltern, die mich nicht nur während des Studiums, sondern auch in all den Jahren davor, großzügig und liebevoll unterstützt haben.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungen.....	6
Zusammenfassung.....	8
Abstract.....	10
1) Einleitung.....	11
2) Periphere arterielle Verschlusskrankheit.....	12
2.1 Definition.....	12
2.2 Epidemiologie.....	12
2.3 Risikofaktoren.....	13
2.3.1 Nikotinabusus.....	13
2.3.2 Diabetes mellitus.....	14
2.3.3 Dyslipidämien.....	14
2.3.4 Hypertonie.....	15
2.3.5 Homozysteinämie.....	15
2.3.6 C-reaktives Protein (CRP) .....	16
2.3.7 Andere beteiligte Faktoren.....	16
2.4 Pathophysiologie.....	17
2.5 Symptome.....	17
2.6 Stadieneinteilung.....	19
2.7 Diagnostik.....	19
2.7.1. Anamnese und klinische Untersuchung.....	20
2.7.2. Ankle-brachial-index.....	20
2.7.3. Toe-brachial-index.....	21
2.7.4. Sonographie.....	22
2.7.5. Computertomographie-Angiographie.....	23
2.7.6. Magnetresonanz-Angiographie.....	23
2.7.7. Digitale Subtraktionsangiographie.....	24
2.8 Therapie.....	25
2.8.1. Kausale Therapie.....	25
2.8.1.1. Thrombozytenaggregationshemmer.....	25
2.8.1.2. Antihypertensive Therapie.....	26

2.8.1.3. Statintherapie.....	27
2.8.1.4. Blutzuckereinstellung.....	27
2.8.1.5. Lifestylemodifikation.....	28
2.8.2. Symptomatische Therapie.....	28
2.8.2.1. Konservative Therapie.....	28
2.8.2.2. Percutane transluminale Angioplastie.....	30
2.8.2.3. Operative Therapie.....	31
3) Erythropoietin.....	34
3.1 Synthese.....	34
3.2 Funktion.....	35
3.3 Therapeutischer Einsatz.....	36
3.4 Assoziierte Erkrankungen.....	38
3.4.1 Familiäre Erythrozytose.....	38
3.4.2 Diamond-Blackfan Anämie.....	38
3.4.3 Mikrovaskuläre Komplikationen.....	38
4) Material und Methoden.....	40
4.1 Studienpopulation.....	40
4.2 Genetische Methodik.....	40
5) Ergebnisse.....	42
6) Diskussion.....	43
7) Literaturverzeichnis.....	46

## Abkürzungen

A	Adenin
ABI	Ankle-Brachial Index
ACD	Absolute Claudication Distance
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ASA	Acetylsalicylsäure
C	Cytosin
CI	Claudicatio Intermittens
ceMRA	contrast-enhanced Magnetic Resonance Angiography
CLI	Critical Limb Ischemia
CRP	C-reaktives Protein
CTA	Computertomographie-Angiographie
DIP	Dipyridamol
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietin Rezeptor
ESRD	End-Stage Renal Disease
G	Guanin
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HDL	High Density Lipoprotein
HR	Hazard Ratio
HRT	Hormone Replacement Therapy
ICD	International Classification of Diseases
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
LDL	Low Density Lipoprotein
MRA	Magnetresonanz-Angiographie
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OR	Odds Ratio
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit

PDR	Proliferative Diabetische Retinopathie
PET	Polyethylenterephthalat
PTA	Percutane Transluminale Angioplastie
PTFE	Polytetrafluorethylen
RCT	Randomized Controlled Trial
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Relatives Risiko
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymidin
TBI	Toe-Brachial Index
TOF-MRA	Time-of-Flight-Magnetresonanz-Angiographie
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## Zusammenfassung

Hintergrund: Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) betrifft zurzeit in etwa 200 Millionen Menschen weltweit mit höherer Prävalenz in den älteren Bevölkerungsschichten. Es handelt sich dabei um einen chronischen stenosierenden Prozess, meist auf atherosklerotischer Grundlage, welcher am häufigsten die Becken- und Beinarterien betrifft und eine adäquate Sauerstoffversorgung des Gewebes verhindert. Initiale Symptome sind meist eine Claudicatio intermittens, in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien finden sich auch Ruheschmerzen bis hin zu Gewebnekrosen. Anerkannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer pAVK sind unter anderem Nikotinkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Dyslipidämien. In einer Studie von Tong Z et al wurde eine Assoziation zwischen dem Single Nucleotide Polymorphism (SNP) rs1617640 in der Promoterregion des Erythropoietin (EPO) Gens und einer erhöhten EPO Expression beobachtet. Ziel dieser Diplomarbeit war es, eine mögliche Assoziation zwischen Erythropoietin Genvarianten im SNP rs1617640 (Wildtyp-Allel: Adenin [A], mutiertes Allel: Cytosin[C]) und Markern der Erythropoiese in PatientInnen mit pAVK aufzuzeigen, sowie einen möglichen Einfluss des SNP rs1617640 auf die Pathogenese der pAVK herauszuarbeiten.

Methoden: Mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und zwei verschiedenen TaqMan Sonden wurden Vollblutproben von 945 PatientInnen mit bekannter pAVK auf den jeweiligen Genotyp im SNP rs1617640 hin untersucht. In den Vollblutproben der PatientInnen wurden ebenfalls die Werte für Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit bestimmt. Der Beginn der pAVK Symptomatik wurde durch den Arzt/die Ärztin bei der Erstdiagnose erhoben.

Ergebnisse: Es konnte eine statistisch signifikante Assoziation zwischen Genvarianten im SNP rs1617640 und Markern der Erythropoiese aufgezeigt werden. Der CC-Genotyp war mit signifikant höheren Werten für Erythrozytenanzahl ( $p=0,003$ ), Hämoglobin ( $p=0,029$ ) und Hämatokrit ( $p=0,006$ ) im Vergleich zu den AC- und AA-Genotypen assoziiert. Der Symptombeginn trat bei PatientInnen mit dem CC-Genotyp signifikant früher auf als bei jenen mit dem AA-Genotyp ( $p=0,042$ ).

Conclusio: Die hier untersuchten Genvarianten im SNP rs1617640 nehmen Einfluss auf Marker der Erythropoiese wie Erythrozytenanzahl, Hämoglobin und Hämatokrit. Der CC-Genotyp ist mit einem früheren Symptombeginn assoziiert. Dies könnte potentiell durch

den erhöhten Hämatokrit oder durch eine aufgrund des erhöhten Hämoglobingehaltes veränderte Physiologie in den Kapillaren erklärt werden.

## Abstract

**Background:** Peripheral arterial disease (PAD) currently affects around 200 million people worldwide, with a higher prevalence in the elderly. It is a chronic stenosing process, mostly on atherosclerotic basis, which most frequently affects the pelvic and leg arteries and prevents adequate oxygenation of the tissue. The initial symptoms are usually intermittent claudication; in advanced stages of the disease, rest pain and tissue necrosis. Recognized risk factors for the development of PAD include smoking, arterial hypertension, diabetes mellitus and dyslipidemia. In a study by Tong Z et al, an association between the single nucleotide polymorphism (SNP) rs1617640 in the promoter region of the erythropoietin (EPO) gene and an increased EPO expression was observed. The aim of this study was to show a possible association between erythropoietin gene variants in SNP rs1617640 (wild-type allele: adenine [A], mutated allele: cytosine [C]) and markers of erythropoiesis in patients with PAD, including a possible influence of the SNP rs1617640 on the pathogenesis of PAD.

**Methods:** Using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and two different TaqMan probes, whole blood samples from 945 patients with known PAD were examined for their respective genotype in the SNP rs1617640. The values for erythrocyte count, hemoglobin and hematocrit were also determined in the patients whole blood samples. The onset of the PAD symptoms was recorded by the doctor at the initial diagnosis.

**Results:** It was possible to show a statistically significant association between gene variants in SNP rs1617640 and markers of erythropoiesis. The CC genotype was associated with significantly higher values for erythrocyte count ( $p = 0.003$ ), hemoglobin ( $p = 0.029$ ) and hematocrit ( $p = 0.006$ ) compared to the AC and AA genotypes. The onset of symptoms occurred significantly earlier in patients with the CC genotype than in those with the AA genotype ( $p = 0.042$ ).

**Conclusion:** The gene variants examined in the SNP rs1617640 influence markers of erythropoiesis such as erythrocyte count, hemoglobin and hematocrit. The CC genotype is associated with an earlier onset of symptoms. This could potentially be explained by the increased hematocrit or by a changed physiology in the capillaries due to the increased hemoglobin content.

# 1 Einleitung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) beschreibt einen chronisch stenosierenden Prozess der Extremitätenarterien, welcher zu einer inadäquaten Sauerstoffversorgung des distal der Stenose liegenden Gewebes führt. [1]

Die wichtigste Funktion von Erythropoietin ist die Anregung der Erythropoiese, in deren Rahmen Erythropoietin die erythroiden Vorläuferzellen über deren EPO-Rezeptor (EPO-R) zur Differenzierung anregt und so für eine adäquate Anzahl an zirkulierenden Erythrozyten sorgt. Darüber hinaus kommt dem Erythropoietin auch noch eine Rolle in der Angiogenese zu, welche durch EPO-R auf Endothelzellen vermittelt wird. [25, 72, 74, 89]

In einer Arbeit von Tong Z et al wurde eine Assoziation zwischen dem Single Nucleotide Polymorphism (SNP) rs1617640 im EPO-Gen auf Chromosom 7 und einer erhöhten Expression von EPO nachgewiesen. [92]

Aufgrund dieser Assoziation wäre es möglich, dass der SNP rs1617640 Einfluss auf Marker der Erythropoiese wie die Erythrozytenanzahl, den Hämoglobinwert oder den Hämatokrit nimmt. Des Weiteren wäre es möglich, dass der SNP rs1617640, sowohl durch die Anregung der Erythropoiese als auch der Angiogenese einen Effekt auf die Pathogenese der pAVK hat. Sollte sich eine solche Assoziation zeigen, könnte dies eine potentielle neue Therapieoption für pAVK-PatientInnen darstellen.

Die Nullhypothese  $H_0$  dieser Arbeit ist, dass es keine Assoziation zwischen dem SNP rs1617640 und einer Steigerung der Erythropoiese bzw. einem verzögerten Auftreten der pAVK-Schmerzsymptomatik gibt. Die Alternativhypothese  $H_1$  gilt als bestätigt, wenn sich eine Assoziation zwischen dem SNP rs1617640 und einer Steigerung der Erythropoiese bzw. einem verzögerten Auftreten der pAVK-Schmerzsymptomatik nachweisen lässt.

## **2 Die periphere arterielle Verschlusskrankheit**

### **2.1 Definition**

Bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) handelt es sich um stenosierende und okklusive Prozesse der Aorta und der Extremitätenarterien. Im engeren Sinn bezieht sich der Begriff auf die chronische Atherosklerose der Becken- und Beinarterien. [1]

### **2.2 Epidemiologie**

Die genaue Zahl der Menschen mit pAVK ist schwer abzuschätzen. Einer Hochrechnung von Fowkes FG et al. aus dem Jahr 2013 zufolge dürften im Jahr 2000 annähernd 160 Millionen Menschen von einer pAVK betroffen gewesen sein, im Jahr 2010 bereits ungefähr 200 Millionen. Die Vermutung liegt nahe, dass die Zahl mittlerweile weiter gestiegen ist. [9]

Eine 2017 publizierte Studie von Kalbaugh C et al. gibt vermutlich am verlässlichsten Aufschluss über die derzeitige Prävalenz der pAVK. 10.481 PatientInnen aus der ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) Kohortenstudie mit einem Alter von 65 und darüber wurden über einen Zeitraum von 10 Jahren (2003 – 2012) beobachtet und die Diagnose einer pAVK u.a. anhand der zum damaligen Zeitpunkt gültigen ICD Klassifikation gestellt. Es ergab sich eine durchschnittliche Prävalenz von 12,4%. Über 75-Jährige hatten eine höhere Prävalenz im Vergleich zu den 65- bis 74-Jährigen (16,8% vs. 8,4%). Afroamerikanische StudienteilnehmerInnen hatten mit 15,6% eine höhere Prävalenz als kaukasische StudienteilnehmerInnen mit 11,4%. Außerdem zeigte sich ein leichter Unterschied zwischen den Geschlechtern, wobei afroamerikanische Frauen mit 16,9% die höchste Prävalenz und kaukasische Frauen mit 10,9% die niedrigste Prävalenz aufwiesen. [2] Andere Studien zeigten teils ähnliche, teils jedoch deutlich abweichende Zahlen. Dies könnte durch die unterschiedlichen Kriterien, welche zur Diagnose der pAVK herangezogen wurden, bedingt sein. [3] [4]

In der Studie von Kalbaugh C et al. konnte bezüglich der Inzidenz gezeigt werden, dass diese ähnlich der Prävalenz deutlich altersabhängig ist. So schwankte die Inzidenz bei den über 75-Jährigen in dem beobachteten Zeitraum zwischen 31,6% und 37,2% bezogen auf 1000 Personenjahre, bei den 65- bis 74-Jährigen hingegen bloß zwischen 16,2% und 21,7% bezogen auf 1000 Personenjahre. [2]

## **2.3 Risikofaktoren**

Atherosklerose ist in 95% der Fälle für die Entwicklung einer pAVK verantwortlich. Die restlichen Fälle sind vor allem durch Embolien und Gefäßentzündungen verursacht. [8] Faktoren, welche eine Atherosklerose begünstigen, sind folglich die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer pAVK. Dazu zählen u.a. Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Dyslipidämien, Hypertonie, Hyperhomocysteinämie und erhöhte CRP-Spiegel. [5] [9]

### **2.3.1 Nikotinabusus**

Nikotin wurde in vielen Studien als der markanteste Risikofaktor für die Entwicklung einer pAVK ausgewiesen. In einer systematischen Übersichtsarbeit von Willigendael E et al. 2004 wurden die Daten von 4 prospektiven Studien und 13 Querschnittsstudien ausgewertet, welche sich mit Nikotinabusus als Risikofaktor für eine pAVK auseinandersetzen. [5] [6] [7]

Das gewichtete Mittel aller von Willigendael E et al. beobachteten Studien ergab eine Odds Ratio (OR) von 2,3 für die Entwicklung einer symptomatischen pAVK. In einer der beobachteten Studien stieg das Risiko signifikant bei einem Beginn des Nikotinkonsums vor dem 16. Lebensjahr. [6]

Eine systematische Übersichtsarbeit von Fowkes FG et al. errechnete für TeilnehmerInnen mit laufendem Nikotinkonsum eine OR von 2,09 (95% KI 1,91-2,29), für ehemalige RaucherInnen eine OR von 1,87 (95% KI 1,64-2,18). [9]

In mehreren Studien aus Italien und China konnte nachgewiesen werden, dass die Prävalenz von Nikotinkonsum bei PatientInnen mit pAVK zwischen 21,3% und 64,3% lag. [16, 17, 18, 19]

Eine signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte von Willigendael EM et al aufgezeigt werden. RaucherInnen ohne eine pAVK hatten 23 pack-years, jene mit einer milden asymptomatischen pAVK 25 pack-years, jene mit einer schweren asymptomatischen pAVK 32 pack-years und jene mit einer symptomatischen pAVK 36 pack years. [6]

Interessant und erwähnenswert ist außerdem, dass unter Nikotinkonsum das relative Risiko (RR) für eine pAVK höher war als das RR eine koronare Herzkrankheit (KHK) zu entwickeln. Das RR zur Entwicklung einer pAVK betrug bei mäßigem Nikotinkonsum 1,9, bei schwerem Nikotinkonsum 3,9. Bezogen auf eine KHK war das RR jeweils 1,6 und 1,7. [5][6]

### **2.3.2 Diabetes mellitus**

Mit dem Rückgang des Nikotinkonsums in der westlichen Welt gewinnt der Diabetes mellitus als Risikofaktor für die Entwicklung einer pAVK zunehmend an Gewicht. [10]

In einer Studie von Beks PJ et al. wurden PatientInnen nach zweimaliger Durchführung eines oralen Glukosetoleranztests in drei Gruppen gegliedert, jene mit einer normalen (normal glucose tolerance; NGT), einer beeinträchtigten (impaired glucose tolerance; IGT) und einer diabetischen Glukosetoleranz (newly diagnosed diabetes mellitus; NDM). Zusätzlich gab es eine vierte Gruppe von PatientInnen, bei denen bereits eine antidiabetische Therapie bestand (known diabetes mellitus; KDM). Bei allen vier Gruppen wurde in der Folge der der Knöchel-Arm-Index (ABI) ermittelt. Die Prävalenz von pAVK in diesen Gruppen betrug 18,1% (NGT), 22,4% (IGT), 29,2% (NDM) und 41,8% (KDM) respektive. [11]

Die systematische Übersichtsarbeit von Fowkes FG et al. zeigte ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer pAVK bei bestehendem Diabetes mellitus mit einer OR von 1,68 (95% KI 1,53-1,84). [9]

Criqui M et al. konnten eine signifikante Erhöhung des Nüchternblutzuckers bei PatientInnen mit einer pAVK im Vergleich zur gesunden Normalbevölkerung nachweisen ( $p < 0,05$ ). [7]

### **2.3.3 Dyslipidämien**

Dass Dyslipidämien in der Ätiologie von pAVK eine Rolle spielen, scheint in der Literatur unbestritten zu sein. Es gibt allerdings unterschiedliche Meinungen darüber, welche spezielle Dyslipidämie die wichtigste Rolle spielt. In einer Studie von Criqui M et al. konnte nachgewiesen werden, dass bei PatientInnen mit pAVK ein signifikant erhöhter Triglyzeridspiegel im Vergleich zur gesunden Bevölkerung besteht ( $p < 0,05$ ). Die HDL- und LDL-Spiegel wiesen keinen signifikanten Unterschied auf. [7] Eine Studie von Bainton D et al. konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Claudicatio intermittens (CI) und den Gesamtcholesterinspiegeln und Gesamttriglyzeridspiegeln ( $p < 0,05$  und  $p < 0,01$ ), jedoch nicht in Bezug auf einen erniedrigten HDL-Cholesterinspiegel nachweisen. [12] In der systematischen Übersichtsarbeit von Fowkes FG et al. konnten ebenfalls der Gesamtcholesterinspiegel (OR 1,16; 95% KI 1,08–1,25) und Gesamttriglyzeridspiegel (OR 1,22; 95% KI 1,10-1,35) als signifikante Risikofaktoren für die Entwicklung einer pAVK identifiziert werden. Es

wurden auch Daten bezüglich erhöhter LDL-Cholesterinspiegel und erniedrigter HDL-Cholesterinspiegel ausgewertet, jedoch konnte hier kein signifikanter Zusammenhang mit einer pAVK beobachtet werden ( $p < 0,47$  und  $p < 0,09$ ). [9]

Erhöhte Gesamtcholesterinwerte waren in der seit 1948 andauernden Framingham Study mit einem 2-fach erhöhten Risiko für das Auftreten einer pAVK assoziiert. [13]

In einer Fall-Kontroll-Studie von Novo S. et al. war die Prävalenz für Hypercholesterinämie bei pAVK-PatientInnen mit 48,2% deutlich höher als jene in der Kontrollgruppe mit 21,6%. Gleiches galt auch für die Hypertriglyzeridämie mit 53,7% bei pAVK-PatientInnen und 26,1% bei der Kontrollgruppe. [16]

### **2.3.4 Hypertonie**

In vielen Studien konnte bereits aufgezeigt werden, dass bis zu 55% der PatientInnen mit Hypertonie gleichzeitig an einer peripheren Gefäßerkrankung leiden. [14, 15] In einer Studie von Cheng SW et al. wurden 510 chinesische PatientInnen mit diagnostizierter pAVK hinsichtlich ihrer Risikofaktoren untersucht. Bei 55% der PatientInnen konnte eine arterielle Hypertonie festgestellt werden. [18] In der erwähnten Fall-Kontroll-Studie von Novo S. et al. konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Hypertonie und pAVK aufgezeigt werden. 51,9% der 102 pAVK-PatientInnen hatten eine Hypertonie, bei der 102-köpfigen Kontrollgruppe waren es 9,8%. [16] In einer Studie von Violi F et al. hatten 35% der 1011 pAVK PatientInnen zu Studienbeginn eine Hypertonie. [17] In einer Studie von Binaghi F et al. konnten bei 21,6% der 27 pAVK-PatientInnen eine Hypertonie nachgewiesen werden. [19] Follow-up Daten der Framingham Study fanden bei PatientInnen mit einer Hypertonie ein 2,5 bis vierfach erhöhtes Risiko für ein periphere Gefäßkrankheit. [14]

### **2.3.5 Homozysteinämie**

Erhöhte Konzentrationen der Aminosäure Homozystein im Blut könnten ebenfalls ein Risikofaktor für die Entwicklung einer pAVK sein. Die Studienlage diesbezüglich ist jedoch um einiges schwächer als bei den bereits erwähnten Risikofaktoren für die Entwicklung einer pAVK.

Asfar S et al. zeigten in einer Studie, dass 40,7% von 172 beobachteten PatientInnen mit pAVK eine Hyperhomozysteinämie aufwiesen. Die erhöhten Werte von Homozystein waren signifikant mit männlichem Geschlecht (OR 2,9; 95% KI 1,18-7,12) und Diabetes

mellitus (OR 0,35; 95% KI 0,15-0,79) assoziiert, wobei Diabetes mellitus einen protektiven Effekt zu haben schien. [21] In einer Fall-Kontroll-Studie von Rong D et al. mit 240 chinesischen pAVK-PatientInnen und 240 Kontrollen konnte eine signifikante Assoziation zwischen Hyperhomozysteinämie und dem Risiko einer pAVK aufgezeigt werden. [22] Eine Kohortenstudie von Ridker PM et al. konnte jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Homozystein und der Entwicklung einer pAVK feststellen. [23]

### **2.3.6 C-reaktives Protein (CRP)**

Ob CRP tatsächliche ein ätiologischer Faktor in der Entstehung der pAVK ist, wird in der Literatur noch diskutiert. Es kann jedoch angenommen werden, dass CRP Aufschluss über noch asymptomatische atherosklerotische Prozesse im Körper gibt und somit ein prädiktiver Faktor für eine später symptomatisch werdende pAVK sein kann. [24] Mehrere Studien haben sich mit dieser Fragestellung befasst. Die systematische Übersichtsarbeit von Fowkes FG et al. fand eine signifikante Zunahme des Risikos mit einer OR von 1,11 (95% KI 1,04-1,18) pro mg/dL CRP-Erhöhung. [9] In der Studie von Ridker PM et al. wurde das RR bei ProbandInnen in der obersten Quartil der CRP-Konzentration verglichen mit jenen in der Untersten mit 2,8 beziffert (95% KI 1,3-5,9). [23] In einer drei Jahre früher publizierten prospektiven Studie von Ridker PM. et al. konnten ähnlich Ergebnisse gezeigt werden. Hier war das RR zwischen oberster und unterster Quartil 2,2 (95% KI 1,1-4,8). [24]

### **2.3.7 Andere beteiligte Faktoren**

Fowkes FG et al. zeigten, dass stattgehabte kardiovaskuläre Ereignisse mit einer signifikanten Erhöhung der OR von 2,27 für die Entwicklung einer pAVK assoziiert waren (95% KI 1,98-2,59). Auch wurde gezeigt, dass eine signifikante Erhöhung der OR von 1,39 (95% KI 1,34-1,44) pro 10 verstrichenen Lebensjahren besteht, und dass das geschlechtsabhängige Risiko mit dem Herkunftsland zusammenhängt. In Ländern mit hohem Einkommen war die OR 1,43 (95% KI 1,18-1,73) für männliches Geschlecht, in Ländern mit mittlerem und niedrigem Einkommen war männliches Geschlecht sogar ein protektiver Faktor (OR 0,50; 95% KI 0,43-0,57). [9]

Ein erniedrigtes Risiko, an pAVK zu erkranken, haben laut einer Studie von Rockman CB et al. postmenopausale Frauen, die mit einer Hormonersatztherapie (HRT) behandelt werden. Patientinnen unter HRT hatten mit 3,3% seltener eine pAVK als die restlichen

Studienteilnehmerinnen mit 4,1%, obwohl Letztere ein deutlich besseres Risikoprofil hatten (geringere Prävalenz für Nikotinkonsum, Hypertonus und Hypercholesterinämie). Eine multivariate Analyse unter Beachtung von Alter, Rasse, und für pAVK prädisponierenden Komorbiditäten zeigte, dass eine HRT mit einem erniedrigten Risiko für eine pAVK einhergeht (OR 0,8%; 95% KI 0,78-0,82). [20]

## **2.4 Pathophysiologie**

Pathophysiologische Grundlage der paVK sind die fortschreitenden atherosklerotischen Veränderungen der Arterien der unteren Extremität. Die Trigger für atherosklerotischen Veränderungen sind die bereits erwähnten Risikofaktoren der paVK wie Nikotinabusus, Diabetes mellitus und eine Dyslipidämie, welche alle zu einer verstärkten Adhäsion von Monozyten am Gefäßendothel führen. [26]

Am Beginn einer athrosklerotischen Läsion steht eine vermehrte Ansammlung von Lipoproteinen, vor allem LDL, in der Tunica intima der Gefäßwand. Dies geschieht vermehrt bei erhöhten LDL-Spiegeln und vor allem an Prädilektionsstellen im Gefäßsystem, nämlich dort, wo der Blutfluss durch Gefäßverzweigungen oder -biegungen verlangsamt ist, was den Übertritt von LDL in die Tunica intima erleichtert. LDL wird in den Zellen der Gefäßwand auf vielfältige Weise modifiziert. Am signifikantesten scheint hier die Oxidation durch oxidativen Zellabfall in der Tunica intima zu sein. Infolgedessen lässt sich ein vermehrtes Anhaften von Zellen des Immunsystems, vor allem Monozyten, am Gefäßendothel beobachten, welche dann in die Intima wandern, dort zu Makrophagen differenzieren und das vorhandene LDL aufnehmen. In der Folge sterben diese Makrophagen ab und bilden so mit der Zeit nekrotische Areale in der atherosklerotischen Läsion. Des Weiteren wandern glatte Muskelzellen aus der Tunica media der Gefäßwand ein und durch deren Produktion von Interzellulärschubstanz kommt es zur Entstehung von fibrösen Plaques. Diese fibrösen Plaques nehmen mit der Zeit an Größe zu, wachsen zuerst jedoch noch in Richtung Tunica adventitia und erst nach Erreichen eines kritischen Punktes lumenwärts, wodurch sich dann die charakteristischen Symptome der paVK manifestieren. [27]

## **2.5 Symptome**

Das klassische Symptom, welches mit einer pAVK der unteren Extremität einhergeht, ist die Claudicatio intermittens (CI). Bei der CI kommt es belastungsabhängig zu ischämisch

bedingten krampfartigen Muskelschmerzen jener Muskelgruppen, welche gerade beansprucht werden und sich distal der Stenose bzw. des Verschlusses befinden. Meist sind die PatientInnen vor Belastungsbeginn beschwerdefrei und nach dem Ende der Belastung verschwinden die Beschwerden wieder innerhalb weniger Minuten. Von da hat die umgangssprachliche Bezeichnung „Schaufensterkrankheit“ ihren Ursprung, da pAVK-PatientInnen ihre belastungsinduzierte Pause beim Gehen als Interesse an Schaufensterinhalten kaschieren.

Die Lokalisation der Schmerzen gibt häufig schon einen ersten Anhaltspunkt über den betroffenen Gefäßabschnitt. Kommt es im Rahmen der pAVK zu Durchblutungsstörungen des Musculus triceps surae, so zeigt sich die Symptomatik der CI beim Gehen in der Ebene durch krampfartige Muskelschmerzen in der Wade. Bei Durchblutungsstörungen des Musculus quadriceps femoris zeigt sich die CI-Symptomatik vor allem beim Treppensteigen und Bergaufgehen. Als Ausnahme ist hier das „Walking-Through-Phänomen“ zu nennen. Hierbei verspüren die PatientInnen zwar belastungsabhängige Schmerzen, diese lassen jedoch trotz Beibehalten der Belastung wieder nach und verschwinden in der Folge vollständig.

Bei weiterem Fortschreiten der pAVK kommt es zu einer chronisch kritischen Extremitätenischämie (critical limb ischemia, CLI). Hier kann der Erhaltungstoffwechsel des Gewebes nicht mehr sichergestellt werden und es kommt zu ischämischen Ruheschmerzen und trophischen Störungen. Physiologisch entstehen Ruheschmerzen meist ab einem Perfusionsdruck der A. tibialis posterior oder A. dorsalis pedis von <50mmHg bzw. einem Zehenperfusionsdruck von <30mmHg. Anfänglich kann der Ruheschmerz noch durch Aufstehen und die damit einhergehende Erhöhung des Perfusionsdruckes verbessert werden. Die Schmerzen treten hier noch vor allem im Liegen auf, weshalb die PatientInnen häufig im Sitzen oder mit aus dem Bett hängenden Beinen schlafen. Eine chronisch kritische Extremitätenischämie kann jedoch auch ohne Ruheschmerz bestehen. Bei PatientInnen mit einer diabetischen Polyneuropathie kann dies zum Beispiel der Fall sein.

Kommt es im Rahmen der CLI zu einer trophischen Störung, so beginnt dies meist distal an den Akren und manifestiert sich durch gangränös oder ulzerativ veränderte Areale. [43, 44, 45]

## 2.6 Stadieneinteilung

Die zwei geläufigsten Einteilung sind jene nach Fontaine und jene nach Rutherford. Maßgeblich für die Einteilung sind in beiden Fällen die Klinik des PatientInnen bezüglich ischämischer Belastungs- bzw. Ruheschmerzen und trophischer Störungen.

Stadieneinteilung der pAVK nach Fontaine:

Stadium I: asymptomatisch

Stadium II: Belastungsschmerzen in der distal der Stenose bzw. des Verschlusses gelegenen Muskulatur

Stadium IIa: schmerzfreie Gehstrecke >200m

Stadium IIb: schmerzfreie Gehstrecke <200m

Stadium III: Ruheschmerzen

Stadium IV: trophische Störungen (Gangrän/Ulkus/Nekrose)

Stadieneinteilung der pAVK nach Rutherford:

Grad 0/Kategorie 0: asymptomatisch

Grad I/Kategorie 1: milde Claudicatio intermittens

Grad I/Kategorie 2: mäßige Claudicatio intermittens

Grad I/Kategorie 3: schwere Claudicatio intermittens

Grad II/Kategorie 4: ischämischer Ruheschmerz

Grad III/Kategorie 5: geringer Gewebsdefekt

Grad III/Kategorie 6: großer Gewebsdefekt

Von einer chronischen Ischämie spricht man in den Stadien I und II nach Fontaine und den Kategorien 0 bis 3 nach Rutherford. In den Stadien III und IV nach Fontaine und den Kategorien 4 bis 6 nach Rutherford spricht man von einer chronischen kritischen Extremitätenischämie, wenn die Symptome für mehr als zwei Wochen bestehen. [44]

## 2.7 Diagnostik

Die Diagnostik der pAVK stützt sich sowohl auf klinische als auch apparative nicht-invasive und invasive Methoden. Allein durch eine zielgerichtete Anamnese und klinische Untersuchung kann in 95% der Fälle die Diagnose einer pAVK ohne jegliche apparative Diagnostik gestellt werden. [33, 44]

### **2.7.1 Anamnese und klinische Untersuchung**

In der Anamneseerhebung sollte auf Schmerz auslöser, -charakter und -lokalisation eingegangen werden, mit besonderem Augenmerk auf den Zusammenhang mit der noch möglichen Gehstrecke, zudem eine Erhebung der kardiovaskulären Risikofaktoren und Komorbiditäten und eine ausführliche Familien- und Lifestyleanamnese in Bezug auf die oben genannten Risikofaktoren erfolgen. [33, 42, 44, 45]

Bei der Inspektion der betroffenen Extremität/-en muss auf Hautfarbe und -temperatur sowie möglicherweise gangränöse oder nekrotische Areale geachtet werden.

Die Palpation der Extremitätenpulse ist erst ab einer Lumeneinengung von >90% nicht mehr möglich, wohingegen systolische Stenosegeräusche in der Auskultation bereits bei Lumeneinengungen von ungefähr 65% auftreten können. [33, 34]

Des Weiteren kann die Lagerungsprobe nach Ratschow einen Hinweis auf eine mögliche pAVK der Beinarterien geben. Hierbei beugt der Patient/die Patientin in Rückenlage die Beine im 90° Winkel in der Hüfte und führt entweder bis zur Schmerzgrenze oder für zwei Minuten drehende Bewegungen in den Sprunggelenken durch. Danach werden bei dem/der aufrecht sitzenden Patienten/Patientin und herabhängenden Beinen reaktive Hyperämie und Venenfüllung der Füße beurteilt. Im Regelfall sollte innerhalb von 5 bis 7 Sekunden eine leichte Rötung der Füße eintreten, gefolgt von der Venenfüllung nach ungefähr 20 Sekunden. Beides tritt bei PatientInnen mit einer pAVK erst verspätet ein. [42, 44]

### **2.7.2 Ankle-brachial-index**

Der Ankle-brachial-index (ABI) ist ein wichtiges Verfahren in der Diagnostik der pAVK und vor allem bei unklarer Anamnese und klinischer Untersuchung von Bedeutung. Es handelt es sich dabei um das Verhältnis des systolischen Blutdrucks zwischen oberer und unterer Extremität. [28] Zur Messung des ABI gibt es verschiedene, leicht variierende Methoden. Nach einer Empfehlung der American Heart Association von 2016 soll der systolische Blutdruck in der Arteria brachialis, sowie in der Arteria dorsalis pedis und Arteria tibialis posterior an beiden Füßen gemessen werden. Der ABI wird für beide Beine separat ermittelt, und zwar als Verhältnis des höheren Blutdrucks der oberen Extremitäten im Nenner und dem jeweils höheren Blutdruck am Knöchel eines jeden Beines im Zähler.

[28, 29] Der physiologische Bereich liegt zwischen 1 und 1,40. Ein ABI-Wert von  $<0,9$  wird als beweisend für eine pAVK angesehen, mit schrittweiser Abstufung des Schweregrades von leicht bis mittelschwer, hin zu einer schweren pAVK bei einem ABI  $<0,5$  bzw.  $<0,4$ . [29,30]. Bei 10-30% der DiabetikerInnen können aufgrund einer Mönckeberg-Mediasklerose falsch hohe ABI Werte von  $>1,30$  gemessen werden. Folglich darf hier der ABI nicht zur Diagnose einer pAVK herangezogen werden. [30] Bei PatientInnen, bei denen aufgrund der Anamnese der Verdacht auf eine pAVK besteht, hat die Messung des ABI eine gute Aussagekraft. In vielen Studien wurde hier eine Spezifität zwischen 68% und 84% und eine Sensitivität zwischen 84% und 99% nachgewiesen. [29] Durch eine Kombination des ABI mit gleichzeitiger Messung des Pulsatilitätsindex (Verhältnis der Differenz von maximaler systolischer Dopplerfrequenz und maximaler enddiastolischer Dopplerfrequenz zur mittleren Maximalfrequenz eines Pulszyklus) konnten Lewis J et al. die Sensitivität und Spezifität in der pAVK Diagnostik auf respektive 100% und 76% erhöhen. [32]

Der ABI wird auch abseits der pAVK-Diagnostik eingesetzt, da dadurch relevante prognostische Hinweise auf die Wahrscheinlichkeit zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse und der damit zusammenhängenden Morbidität und Mortalität gefunden werden können. [28, 29].

Bei jungen PatientInnen hat ein ABI  $<1,0$  nicht unbedingt einen pathologischen Wert, weshalb die routinemäßige Bestimmung des ABI in dieser Patientengruppe nicht empfohlen werden kann. [29,31]

### **2.7.3 Toe-brachial-index (TBI)**

Beim TBI wird, ähnlich dem ABI, das Verhältnis von systolischem Druck in der Großzehe zum systolischen Druck des Oberarms errechnet. Aufgrund des physiologisch um etwa 30mmHg niedrigeren systolischen Druckes in der Großzehe im Vergleich zum Knöcheldruck werden beim TBI erst Werte ab  $<0,7$  als pathologisch angesehen. In PatientInnengruppen, welche zu einer Mediasklerose neigen oder jenen, bei denen sich die Stenose weiter distal befindet, hat sich der TBI als verlässlicher Indikator für das Vorliegen einer pAVK erwiesen. In einer Studie von Tehan P et al. wurden der TBI und der ABI hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität untersucht. Die höhere Sensitivität für eine pAVK hatte der TBI mit 71% (ABI 45%), hinsichtlich der Spezifität schnitt der ABI mit 93% besser ab als der TBI mit 78%. [30, 38]

#### **2.7.4 Sonographie**

Bei der Dopplersonographie wird mithilfe des Dopplereffektes die Flussgeschwindigkeit des Blutes in einem bestimmten Stromgebiet ermittelt und graphisch bzw. durch Töne dargestellt. Anhand der Wellenform bzw. der Töne lassen sich physiologische von pathologischen Strömungsverhältnissen unterscheiden. In der Regel zeigen sich bei physiologischen Verhältnissen mehrphasige Wellen mit einem raschen Anstieg der Flussgeschwindigkeit in der Systole und einer diastolischen Flussumkehr. Bei pathologischen Strömungsverhältnissen hingegen finden sich häufig monophasische Wellen mit einem langsamen systolischen Anstieg der Flussgeschwindigkeit und einer fehlenden diastolischen Flussumkehr.

In einer Studie von Tehan P et al. konnten für die Dopplersonographie eine Sensitivität von 81,75% und eine Spezifität von 89,34% für das Vorliegen einer bereits im Vorhinein mittels farbkodierter Duplexsonographie diagnostizierten pAVK festgestellt werden. [4, 37, 44]

Ein weiteres wichtiges nicht-invasives Verfahren in der Diagnostik der pAVK ist die farbkodierte Duplexsonographie, bei der die Ergebnisse der Dopplersonographie und der B-Mode-Sonographie kombiniert dargestellt werden. Aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft der farbkodierten Duplexsonographie für Verschlüsse und Stenosen im Bereich der iliakalen und infrapoplitealen Gefäßabschnitte wird dieses Verfahren in erster Linie zur Erfolgskontrolle nach Intervention und nicht so sehr als Screeningmethode eingesetzt. In einer Studie von Whelan JF et al. hatte die farbkodierte Duplexsonographie eine Sensitivität und Spezifität von 92% und 97% respektive bei der Diagnostik von bereits im Vorhinein mittels peripherer Arteriographie diagnostizierten hämodynamisch relevanten Stenosen. [35] In einer jüngereren Studie von Favaretto E et al. wurde die diagnostische Übereinstimmung zwischen Duplexsonographie und Angiographie überprüft. Es fand sich, dass im Bereich des aorto-iliakalen Gefäßabschnittes eine gute Übereinstimmung gegeben war, genauso im Bereich des femoro-polplitealen Gefäßabschnittes. Einzig im infrapoplitealen Gefäßabschnitt zeigte sich eine schwache Übereinstimmung. [36, 43]

### **2.7.5 Computertomographie-Angiographie (CTA)**

Bei der CTA kann entweder eine native Bildgebung erfolgen oder es wird ein röntgendichtes Kontrastmittel intravenös appliziert und danach eine computertomographische Bildgebung der fraglichen Gefäßregion durchgeführt. Letzteres wurde erst durch die Spiraltechnik möglich, welche die Untersuchungszeit ausreichend verkürzt hat, um einen Datensatz während der arteriellen Bolusphase erstellen zu können. Die Vorteile dieses Verfahrens sind die Möglichkeit der Nichtinvasivität, die dreidimensionale Darstellung des Gefäßbaumes, die relativ kurze Untersuchungszeit und die Darstellung differentialdiagnostisch wichtiger Erkrankungen. Nachteilig sind vor allem die ionisierende Strahlung, die Gabe von Röntgenkontrastmittel mit dem Risiko einer kontrastmittelinduzierten Nephropathie, sowie die Schwierigkeit bei der Beurteilung von kalzifizierten Gefäßabschnitten. In einem systematischen Review von Collins R et al. wurden für die CTA eine Sensitivität und eine Spezifität von jeweils 91% nachgewiesen. [30, 40, 41, 43, 98]

### **2.7.6 Magnetresonanz-Angiographie (MRA)**

Bei der MRA gibt es unterschiedliche Methoden, die am öftesten angewandte ist jedoch die kontrastangehobene MRA (ceMRA). Hierbei werden Bilder vor und nach einer Kontrastmittelgabe angefertigt und diese anschließend voneinander subtrahiert. So lässt sich der zu untersuchende Gefäßabschnitt dreidimensional begutachten. Als Kontrastmittel wird das paramagnetische Gadolinium verwendet, welches aufgrund seiner hohen Toxizität an einen Chelatbildner gebunden ist. Die ceMRA ist sehr gut geeignet, um Lokalisation und Stenosegrad im Rahmen einer pAVK zu beurteilen. In einer systematischen Review von Collins R et al., in der die Spezifität und Sensitivität von ceMRA, CTA und Duplexsonographie verglichen wurden, schnitt die ceMRA mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 95% und 97% am besten ab. [40]

Als kontrastmittelfreie Alternative zur ceMRA hat sich die „Time-of-Flight“-MRA (TOF-MRA) entwickelt. Das Prinzip der TOF-MRA ist die Absättigung der Spins in einem definierten Volumen bei rascher Abfolge mehrere hintereinander gesetzter Impulse. Dadurch kann die Signalstärke stationärer anatomischer Strukturen reduziert werden, die Signalstärke des frisch in das Volumen einströmenden Blutes bleibt jedoch unberührt. Dies führt zu einem starken Kontrast zwischen Blut und den umgebenden Strukturen.

Die Vorteile der MRA liegen in der hohen Untersucherunabhängigkeit des Verfahrens im Vergleich zu sonographischen Verfahren. Der große Nachteil der ceMRA ist die Notwendigkeit der gadoliniumhaltigen Kontrastmittelgabe. Dieses ist zwar nicht nephrotoxisch, wird jedoch mit einem gehäuften Auftreten einer nephrogenen systemischen Fibrose bei PatientInnen im Stadium 4 oder 5 eines chronischen Nierenversagens in Verbindung gebracht. Weiters erweisen sich die eingeschränkte Bildqualität bei Bewegungsunruhe und die möglichen Kontraindikationen für eine Magnetresonanztomographie wie ferromagnetische Implantate als nachteilig. [30, 39, 40, 41, 43]

### **2.7.7 Digitale Subtraktionsangiographie (DSA)**

Die DSA gilt als der diagnostische Goldstandard in Bezug auf die pAVK-Diagnostik. Hierbei wird ähnlich der Coronarangiographie nach Punktion eines arteriellen Gefäßes ein Katheter über einen Führungsdraht bis an die zu untersuchende Gefäßregion vorgeschoben. Vor der Kontrastmittelapplikation über den intravasalen Katheter wird eine native Röntgenaufnahme gefertigt und dann die gleiche Röntgenaufnahme nach Kontrastmittelapplikation wiederholt. Die zwei Bilder werden anschließend digital voneinander subtrahiert, wodurch sich eine sehr genaue Darstellung des Gefäßbaumes ergibt.

Bestehen Kontraindikationen für die Gabe von jodhaltigem Kontrastmittel, können alternativ Kohlenstoffdioxid oder Gadolinium-DTPA eingesetzt werden.

Die Vorteile der DSA sind zum einen ihre hohe diagnostische Aussagekraft, welche durch kein anderes bildgebendes Verfahren zur pAVK Darstellung erreicht wird, und zum anderen die Möglichkeit, über den intraarteriellen Zugang sofort nach der Bildgebung eine therapeutische Ballondilatation oder das Einbringen eines Stents in den pathologisch veränderten Gefäßabschnitt durchzuführen. Nachteilig ist die Invasivität der DSA und damit einhergehend die möglichen Komplikationen einer arteriellen Punktion wie ein Aneurysma spurium, arterio-venöse Fisteln, Nachblutungen, Gefäßdissektionen und arterielle Thrombosen mit evtl. embolischem Gefäßverschluss sowie die Röntgenkontrastmittelgabe mit ihren bereits erwähnten Komplikationen und die Verwendung ionisierender Strahlung. Aufgrund dieser Kehrseiten der DSA und der sehr guten Sensitivität und Spezifität anderer bildgebender Verfahren werden diese im Rahmen

der Diagnostik und therapeutischen Planung der pAVK bevorzugt eingesetzt. [30, 41, 43, 44]

## **2.8 Therapie**

Die wichtigsten Ziele in der Behandlung von pAVK-PatientInnen sind zum einen die Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität und dazu der Versuch einer Verbesserung der Lebensqualität durch zuallererst den Extremitätenerhalt und auch Optimierung von Ruheschmerzen oder Claudicatio-Beschwerden.

Maßgeblich für die Therapieplanung ist das Stadium, in dem sich die Erkrankung befindet, unter Berücksichtigung des individuellen Risikoprofils bezüglich der oben genannten Risikofaktoren, sowie möglicherweise vorhandener Einschränkungen, Kontraindikationen und einer Risiko-Nutzen-Abwägung für gewisse Therapieoptionen. Die Einteilung der Therapien kann zunächst in eine kausale und eine symptomatische Therapie erfolgen.

Bei der kausalen Therapie steht die Behandlung der Grundkrankheit mit sekundärer Prävention durch Lifestylemodifikation und pharmakologische Therapie im Vordergrund.

Die symptomatische Therapie, deren Ziel die Optimierung der Blutversorgung mit Verbesserung der Gehfähigkeit bis hin zum Extremitätenerhalt sind, kann in eine konservative und eine revaskularisierende Therapie eingeteilt werden. Bei Letzterer werden wiederum interventionelle und operative Therapie unterschieden. [44, 45, 56]

### **2.8.1 Kausale Therapie**

Die kausale Therapie dreht sich um die Beeinflussung der oben genannten Risikofaktoren für die Progredienz einer pAVK durch pharmakologische Therapie und Lifestylemodifikation. Wichtige Pfeiler dabei sind, falls indiziert, eine Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern, eine adäquate Kontrolle einer arteriellen Hypertonie, eine Therapie mit Statinen, eine zufriedenstellende Einstellung eine Diabetes mellitus und eine Lifestylemodifikation.

#### **2.8.1.1 Thrombozytenaggregationshemmer**

Eine pharmakologische Therapie mit Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel ist bei PatientInnen mit einer symptomatischen pAVK indiziert und führt zu einem signifikanten Rückgang tödlicher und nicht-tödlicher vaskulärer Ereignisse. Hinsichtlich der Dosierung gibt es unterschiedliche Auffassungen. In einer Metaanalyse der Antithrombotic Trialists‘

Collaboration wurden unterschiedliche Dosen von Acetylsalicylsäure hinsichtlich ihrer Effektivität untersucht. Es fand sich, dass eine Dosis von 75-150mg/d mit einer Reduktion des relativen Risikos für vaskuläre Ereignisse um 32% am Besten abschnitt. Bei Dosierungen über 160mg/d sank die Reduktion des relativen Risikos auf 26% und weniger, bei Dosierungen unter 75mg/d sank diese auf 13%. [46]

Bei PatientInnen mit asymptomatischer pAVK, bei denen ein pathologisch erniedrigter ABI vorliegt, konnte in Studien der Vorteil einer Gabe von Acetylsalicylsäure zur Verbesserung des Outcomes nicht eindeutig belegt werden. In einer randomisierten kontrollierten Studie (randomized controlled trial [RCT]) von Fowkes FG et al. aus dem Jahr 2010 konnte bei PatientInnen mit einem erniedrigten ABI ( $\leq 0,95$ ) keine signifikante Verbesserung des Outcomes hinsichtlich tödlicher und nicht tödlicher vaskulärer Ereignisse durch die tägliche Gabe von 100mg Acetylsalicylsäure im Vergleich mit Placebo erzielt werden. Aufgrund dieses im Vergleich zu Placebo nicht signifikant erniedrigten Risikos für tödliche und nicht tödliche vaskuläre Ereignisse von asymptomatischen pAVK-PatientInnen, scheint eine Therapie mit Acetylsalicylsäure in dieser PatientInnengruppe nicht angemessen zu sein. [29, 45, 46, 47, 48]

### **2.8.1.2 Antihypertensive Therapie**

Ein wichtiger und kausal an der Entstehung einer pAVK beteiligter Faktor ist ein arterieller Hypertonus, dessen adäquate Therapie von großer Bedeutung ist, da die Prognose für pAVK-PatientInnen maßgeblich durch das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen bestimmt ist. In vielen Studien konnten eine erniedrigte Morbidität und Mortalität für pAVK-PatientInnen unter einer antihypertensiven Therapie nachgewiesen werden. Es existieren verschiedene pharmakologische Therapieansätze von ACE-Hemmern über Angiotensin-Rezeptor-Blocker, Kalzium-Antagonisten hin zu Beta-Blockern, welche hinsichtlich ihrer antihypertensiven Wirksamkeit und Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse allesamt zufriedenstellende Ergebnisse zeigen.

Aufgrund ihrer potenziell vasokonstriktorisches Wirkkomponente werden Beta-Blocker jedoch unter Vorbehalt eingesetzt und sind bei schwerer pAVK kontraindiziert. In einer systematischen Review von Khouri et al. wurden Beta-Blocker mit unterschiedlicher Pharmakodynamik hinsichtlich ihrer vasokonstriktorisches Tendenz untersucht. Es fand sich, dass bloß beta-1-selektive (OR 1,67; 95% KI 1,29 – 2,17) und nicht-selektive (OR 2,53; 95% KI 1,39 – 4,61) Beta-Blocker mit einem erhöhten Auftreten peripherer

Vasokonstriktion vergesellschaftet waren, nicht jedoch Beta-Blocker mit intrinsischer sympathomimetischer Aktivität. [51, 52]

Als Ziel für die Einstellung des Blutdrucks werden Werte von <140/90mmHg, bei bekannter Niereninsuffizienz und bei einem Diabetes mellitus Werte von <130/80mmHg angestrebt. [29, 45, 49, 50, 51, 52]

### **2.8.1.3 Statintherapie**

Ein weiterer wichtiger Pfeiler in der Behandlung der pAVK ist die Statintherapie. In einer Studie von Kumbhani DJ et al. wurde der Effekt einer laufenden Statintherapie auf unerwünschte Ereignisse der Extremitäten im Vergleich zu PatientInnen ohne Statintherapie über einen Zeitraum von vier Jahren untersucht. Es zeigte sich, dass eine Statintherapie das Risiko für unerwünschte Extremitätenereignisse insgesamt (HR 0,82; 95% KI 0,72 – 0,92), für die Verschlechterung einer CI oder einer neu auftretenden CLI (HR 0,82; 95% KI 0,70 – 0,95), für eine interventionelle oder operative Revaskularisation (HR 0,83; 95% KI 0,72 – 0,95) und für eine ischämisch bedingte Amputation (HR 0,64; 95% KI 0,48 – 0,86) im Vergleich zu PatientInnen ohne Statintherapie deutlich reduzierte. [53]

Statine sollten erst bei PatientInnen mit symptomatischer pAVK eingesetzt werden. Zielwert ist ein LDL von <100mg/dL. Bei PatientInnen mit mehreren betroffenen Gefäßabschnitten sollte der Zielwert bei <70mg/dL liegen. Bei der Auswahl der verschiedenen verfügbaren Präparate und Dosierungen muss auf präparat- und patientenspezifische Nebenwirkungen und Kontraindikationen, sowie auf die zur Erreichung des Zielwertes notwendige Reduktion der LDL-Werte Rücksicht genommen werden. Eine Tagesdosis von Atorvastatin 80mg oder Rosuvastatin 40mg geht mit einer durchschnittlichen Reduktion der LDL-Cholesterin-Werte um  $\geq 50\%$  des Ausgangswertes einher. Für eine durchschnittliche Reduktion der LDL-Cholesterin-Werte um 30-50% sind Dosierungen von Atorvastatin 20mg und Rosuvastatin 10mg bzw. Simvastatin 40mg notwendig. Um eine durchschnittliche Reduktion der LDL-Cholesterin-Werte von  $\leq 30\%$  zu erreichen, ist Simvastatin 10mg ausreichend.

[29, 45, 53, 54].

#### **2.8.1.4 Blutzuckereinstellung**

Eine adäquate Blutzuckereinstellung und Therapie eines Diabetes mellitus sind ein weiterer wichtiger Pfeiler in der Behandlung einer pAVK. Hinsichtlich des HbA1c-Zielwertes gibt es in der Literatur unterschiedliche Hinweise, meist im Bereich von 6%-7% HbA1c.

In einer Studie von Gerstein et al. zeigte sich, dass eine aggressive Einstellung des HbA1c mit Zielwerten unter 6% zu einer signifikant erhöhten Mortalität (HR 1,22; 95% KI 1,01 – 1,46) im Vergleich zu moderater Blutzuckereinstellung (HbA1c-Zielwerte von 7% - 7,9%) führte. Die StudienautorInnen führten dies unter anderem auf das Erhöhte Vorkommen von hypoglykämischen Episoden und die möglichen Nebenwirkungen der zur Erreichung des HbA1c-Zielwertes von 6% notwendigen Kombinationstherapie oraler Antidiabetika zurück. [45, 55]

#### **2.8.1.5 Lifestylemodifikation**

Als wichtigster Risikofaktor in der Ätiologie der pAVK ist die Beendigung des Nikotinabusus einer der Hauptpfeiler unter dem Punkt Lifestylemodifikation. Obwohl prospektive Studien, welche die Vorteile einer Beendigung des Nikotinabusus unterstreichen, fehlen, ist dieser Punkt der Lifestylemodifikation aus der Therapie für pAVK-PatientInnen nicht wegzudenken, da dadurch die kardiovaskuläre Mortalität dramatisch gesenkt werden kann. In einer Studie von Jonason T et al. wurden 343 PatientInnen mit Claudicatio intermittens und Nikotinabusus hinsichtlich ihres Risikos für einen Myokardinfarkt über einen Zeitraum von 10 Jahren beobachtet. In der Gruppe mit Nikotinabstinenz war das kumulative 10-Jahres-Risiko für einen Myokardinfarkt 11%, in der Gruppe der RaucherInnen 53% und die 10-Jahres-Überlebensrate 82% und 46%. In der Nichtrauchergruppe entwickelte niemand ischämische Ruheschmerzen, in der Rauchergruppe waren es 16% nach 7 Jahren ( $p < 0,05$ ). [56, 57]

#### **2.8.2 Symptomatische Therapie**

Bei der symptomatischen Therapie können sowohl eine konservative als auch eine interventionelle oder operative Therapie unterschieden werden. Das Ziel hierbei ist eine Reduktion der Schmerzsymptomatik, Verbesserung der Lebensqualität und ein Verhindern bzw. ein Hinauszögern von Amputationen.

### **2.8.2.1 Konservative Therapie**

Eine wichtige Rolle im konservativen Therapieansatz der pAVK spielt das Gehtraining. In verschiedenen Studien konnte eine Verlängerung der maximal möglichen Gehstrecke um 150-180% aufgezeigt werden. Ein wichtiger Punkt, der die Effektivität des Gehtrainings maßgeblich beeinflusst, ist, ob das Gehtraining überwacht wird oder nicht. In einer Studie von Nicolai SP et al. aus dem Jahr 2010 wurden 304 PatientInnen mit einer CI hinsichtlich der Effektivität des Gehtrainings untersucht, bezogen auf die mediane ACD (absolute claudication distance; der Patient/die Patientin muss aufgrund der Schmerzen stehenbleiben) nach 12 Monaten Gehtraining, und in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt bloß die Empfehlung für ein Gehtraining, die zweite Gruppe erhielt ein überwachtes Gehtraining und eine dritte Gruppe ein überwachtes Gehtraining mit Feedback. In der ersten Gruppe konnte die mediane ACD von 260m auf 400m verlängert werden, in der Zweiten und Dritten von 260m auf 600m. Es fand sich keine signifikante Verlängerung der Gehstrecke durch ein zusätzliches Feedback. Ein Gehtraining sollte drei Einheiten pro Woche á 30min umfassen und für mindestens 6 bis 12 Monate erfolgen. Mögliche Mechanismen, wodurch die Gehdistanz verlängert werden kann, sind die Bildung von Kollateralen, die Expression von angiogenetischen Faktoren, vor allem in hypoxischem Gewebe, endothelabhängige Vasodilatation und eine Verbesserung des Metabolismus der Skelettmuskulatur. [56, 58]

Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt im Rahmen der konservativen Therapie ist der Einsatz von vasoaktiven Substanzen. Unter den vasoaktiven Substanzen spielt Cilostazol aktuell die einzig bedeutende Rolle. Bis vor wenigen Jahren war auch noch der Wirkstoff Pentoxifyllin zur Therapie der pAVK empfohlen. [29, 45]

Cilostazol wirkt über eine Hemmung der Phosphodiesterase-3. Regensteiner JG et al. konnten in einer Meta-Analyse mit sechs Studien aufzeigen, dass die Distanz bis zum schmerzbedingten Abbruch des Gehens durch Therapie mit Cilostazol um 40-50% verlängert werden konnte. In einer Multicenter-Studie von Dawson DL et al. wurden 698 PatientInnen mit mittelschwerer bis schwerer Claudicatio intermittens entweder mit Cilostazol (100mg zweimal täglich), Pentoxifyllin (400mg, dreimal täglich) oder Placebo therapiert. Die Distanz bis zum schmerzbedingten Abbruch des Gehens konnte unter Cilostazol um durchschnittlich 107m (ein durchschnittlicher Zuwachs von 54%) verlängert werden. Unter Therapie mit Pentoxifyllin waren es 64m (ein durchschnittlicher Zuwachs

von 30%) und unter Placebothherapie 65m (ein durchschnittlicher Zuwachs von 34%). [29, 56, 61, 62]

Pentoxifyllin wirkt über eine Beeinflussung der rheologischen Eigenschaften des Blutes, genauer gesagt über eine Verringerung der Viskosität des Blutes und eine verbesserte Verformbarkeit der Erythrozyten. Zudem soll Pentoxifyllin antiinflammatorische, antiaggregative und antiproliferative Eigenschaften aufweisen. In einer systematischen Übersichtsarbeit von Hood SC et al. wurden 12 Studien untersucht, bei denen bei PatientInnen mit einer Claudicatio intermittens der Therapieeffekt von Pentoxifyllin im Vergleich zu Placebo auf die Gehstrecke beurteilt wurde. Die Dosierung von Pentoxifyllin war in den meisten Studien im Bereich zwischen 600mg und 1200 mg pro Tag. Es konnte gezeigt werden, dass durch Therapie mit Pentoxifyllin die schmerzfrei Gehstrecke um durchschnittlich 29,4m (95% KI 13,0m – 45,9m) verlängert werden konnte. Ebenso konnte die Distanz bis zum schmerzbedingten Abbruch des Gehens um durchschnittlich 48,4m (95% KI 18,3m – 78,6m) verlängert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine systematische Übersichtsarbeit von Girolami et al. Die schmerzfreie Gehstrecke konnte hier um durchschnittlich 21m (95% KI 0,7m – 41,3m), die maximale Gehstrecke um durchschnittlich 43,8m (95% KI 14,1m – 73,6m) verlängert werden. Aufgrund der oben genannten Studie von Dawson DL et al. wird Pentoxifyllin jedoch nicht mehr in der Therapie der pAVK empfohlen. [29, 45, 56, 59, 60, 101]

### **2.8.2.2 Percutane transluminale Angioplastie (PTA)**

In den vergangenen Jahren hat die PTA in der endovaskulären Behandlung der pAVK mehr und mehr an Bedeutung gewonnen. Bei der PTA wird, nach initialem Hautschnitt und Eingehen in die arterielle Strombahn, ein Führungsdraht bis über die Stenose vorgeschoben. Anschließend wird mithilfe eines Ballons die Engstelle dilatiert und eventuell mittels Stentimplantation zusätzlich gesichert. Mögliche Stentformen sind ein drug eluting stent (DES) oder ein bare metal stent (BMS). Postinterventionell ist eine duale Plättchenhemmung indiziert, meist mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel oder Dipyridamol. Dörffler-Melly J et al. konnten in einer systematischen Review eine 60%ige Reduktion für das Risiko von Restenosen durch eine Kombinationstherapie von Acetylsalicylsäure 330mg mit Dipyridamol aufzeigen. Über die Dauer der dualen Plättchenhemmung herrscht Uneinigkeit. In der Literatur finden sich Zeiträume von wenigen Wochen bis zu einem halben Jahr und mehr. [56, 63, 64]

Aus der Literatur geht hervor, dass die PTA und überwachtes Gehtraining ähnlich effektiv in der Behandlung einer CI sind. In einer Studie von Murphy TP et al. wurden PatientInnen mit aortoiliakaler pAVK drei Therapiegruppen zugeteilt. Die erste Gruppe erhielt optimale medizinische Therapie (pharmakologische Therapie und Empfehlung für ein Gehtraining), die zweite Gruppe erhielt optimale medizinische Therapie plus ein überwachtes Gehtraining und die dritte Gruppe eine optimale medizinische Therapie plus PTA. Beobachtet wurde die Verbesserung der maximalen Gehdistanz für diese drei Gruppen von Therapiebeginn bis 18 Monate danach. Die besten Ergebnisse erzielte die Gruppe mit optimaler medizinischer Therapie und überwachtem Gehtraining. In dieser Gruppe konnte die maximale Gehdistanz um 5,0 +/- 5,4 min verbessert werden. In der Gruppe mit optimaler medizinischer Therapie und PTA waren es 3,2 +/- 4,7 min., und in der Gruppe mit nur optimaler medizinischer Therapie 0,2 +/- 2,1 min.. [65, 66]

Dass eine Kombination aus überwachtem Gehtraining und zusätzlicher PTA einen Vorteil gegenüber reinem überwachtem Gehtraining bringt, konnte von Fakhry F et al. in einer RCT aus dem Jahr 2015 mit 212 StudienteilnehmerInnen mit CI aufgezeigt werden. PatientInnen, welche mittels PTA und überwachtem Gehtraining therapiert wurden, zeigten eine signifikant überlegene Verbesserung der maximalen Gehdistanz im Vergleich zu PatientInnen mit nur überwachtem Gehtraining. Die mittlere Differenz zwischen den zwei Gruppen war 566m (99% KI 358m – 774m) nach einem Monat, 409m (99% KI 183m – 636m) nach sechs Monaten und 282m (99% KI 60m – 505m) nach einem Jahr. [65, 66, 67, 68]

### **2.8.2.3 Operative Therapie**

Eine operative Revaskularisation mittels Bypass wird bloß bei PatientInnen in Erwägung gezogen, die nicht für eine PTA in Frage kommen, und die trotz maximaler medizinischer Therapie unter lebensstillimitierenden CI-Beschwerden leiden, oder um bei PatientInnen mit CLI die Ruheschmerzen in den Griff zu bekommen und den Extremitätenerhalt zu gewährleisten. Zudem muss eine strenge Risiko-Nutzen-Abwägung bezüglich des Operationsrisikos stattfinden, da viele der in Frage kommenden PatientInnen zusätzlich zur pAVK auch unter einer koronaren Herzkrankheit leiden. Bei der Auswahl für den Bypass kommen unterschiedliche Materialien in Frage, welche sich alle bezüglich ihrer Durchgängigkeitsraten unterscheiden. Zum einen können Kunststoffmaterialien verwendet

werden, zu denen Polyethylenterephthalat (PET) und Polytetrafluorethylen (PTFE) zählen. Andererseits gibt es auch die Möglichkeit, autologe Venen, sehr häufig die Vena saphena magna, zu verwenden. Ursachen für eine Stenose des Transplantats sind unter anderem Transplantatverletzungen bei der Entfernung der Venenklappen, in situ verbliebene Venenklappen, verfahrenstechnische Fehler während der Bypass-OP, fibröse Intimahyperplasie (meist innerhalb der ersten 6 Monate) und Atherosklerose des venösen Transplantats (meist in den ersten 1 bis 2 Jahren). [45, 56]

Die Überlegenheit von autologen Venen im Vergleich mit Kunststoffmaterialien konnte in mehreren Studien aufgezeigt werden. In einer Meta-Analyse von Pereira CE et al. wurden die Ergebnisse von 73 Studien verglichen, welche die Durchgängigkeitsrate von femoropoplitealen Bypass-Eingriffen mit entweder autologen Venen oder PTFE Transplantaten untersuchten. Es konnte gezeigt werden, dass nach fünf Jahren die primäre Durchgängigkeitsrate von PTFE Transplantaten bei distaler Anastomose oberhalb des Knies 57,4% war. Bei venösen Transplantaten mit distaler Anastomose oberhalb des Knies war die primäre Durchgängigkeitsrate hingegen 77,2% und bei distaler Anastomose unterhalb des Knies 64,8%. [69]

Zu einem ähnlichen Resultat kam auch eine systematische Review und Meta-Analyse von RCTs durch Sharrok M et al. 8 RCTs mit insgesamt 1132 PatientInnen wurden bezüglich der Durchgängigkeitsrate nach 5 Jahren bei Bypassoperationen mit der distalen Anastomose oberhalb des Knies und entweder Kunststofftransplantaten oder venösen Transplantaten untersucht. Nach 5 Jahren hatte die Gruppe mit venösen Transplantaten eine signifikant höhere primäre Durchgängigkeitsrate mit einer OR von 1,78 (95% KI: 1,17–2,55; P=0,006) und auch eine signifikant höhere primär assistierte Durchgängigkeitsrate mit einer OR von 4,02 (95% KI: 2,84-5,70; P<0,0001). Auch konnten Sharrok M et al. aufzeigen, dass die Gruppe mit venösen Transplantaten signifikant weniger Reinterventionen benötigte (OR 0,33, 95% KI: 0,18-0,60; P=0,0003). Bezüglich der Gesamtüberlebensrate zwischen den beiden Gruppen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden (OR 0,95; 95% KI: 0,70-1,30; P=0,76). [70]

Eine pharmakologische Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern oder Antikoagulantien kann die Durchgängigkeitsraten von Transplantaten erhöhen und sollte bei allen PatientInnen, sofern nicht kontraindiziert, durchgeführt werden. Bedenis R et al. untersuchten in einer systematischen Review mehrere verschiedene Studien, in denen unterschiedlich pharmakologische Therapieansätze miteinander verglichen wurden. Sechs der Studien verglichen eine Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASA) bzw.

Acetylsalicylsäure und Dipyridamol (ASA/DIP) mit Placebo bzw. keiner Therapie. Es konnte gezeigt werden, dass es unter Therapie mit ASA bzw. ASA/DIP innerhalb der ersten 12 Monate zu signifikant weniger Verschlüssen des Transplantats kam (OR 0,42; 95% KI: 0,22-0,83; P=0,01). Dieser Effekt zeigte sich nicht, wenn venöse Transplantate allein analysiert wurden, sehr wohl aber, wenn nur Kunststofftransplantate analysiert wurden (OR nach 12 Monaten 0,19; 95% KI: 0,10-0,36; P<0,00001). Zwei Studien verglichen ASA bzw. ASA/DIP mit Vitamin-K-Antagonisten. Hier konnten weder nach 3, 6, 12, oder 24 Monaten signifikant unterschiedlichen Durchgängigkeitsraten aufgezeigt werden und es gab auch keinen Unterschied bezüglich Extremitätenamputation, kardiovaskulären Events oder Mortalität. [71]

## 3 Erythropoietin

### 3.1 Synthese

Das codierende Gen für Erythropoietin ist auf dem langen Arm von Chromosom 7 in der Position 7q22.1 lokalisiert und enthält 5 Exone. Posttranslational werden von dem ursprünglich 193 Aminosäuren umfassenden Prohormon eine Sequenz von 27 Aminosäuren und das C-terminale Arginin abgespalten. Nach Glycosylierung entsteht das zur Sekretion bereite 165 Aminosäuren umfassende Erythropoietin mit einem Molekulargewicht von 30.4 kDa. Die Synthese von Erythropoietin erfolgt vor allem in den peritubulären Zellen der Nieren und zu einem sehr geringen Teil in Leber und Gehirn. Während der Fetalzeit ist die Leber der Hauptsyntheseort von Erythropoietin. Interessanterweise unterscheidet sich der Sekretionsmodus für EPO aus Leber und Niere. Während das in der Fetalzeit in der Leber produzierte EPO parakrin sezerniert wird, wird das nach der Fetalzeit von der Niere produzierte EPO auf endokrine Weise sezerniert. Dies ist in Einklang mit den jeweiligen Zielgeweben von EPO, da perinatal eine Verschiebung der Erythropoese von der Leber hin zum Knochenmark und der Milz erfolgt. [72, 73, 74, 80]

Obwohl Erythropoietin selbst nicht sauerstoffsensitiv ist, ist die Expression von Erythropoietin abhängig vom Sauerstoffpartialdruck im juxtamedullären Cortex der Niere. Eine spezielle Rolle kommt hierbei dem hypoxia-inducible-factor (HIF) zu. HIF wird unter normoxischen Bedingungen von Sauerstoffradikalen oxidiert und in der Folge abgebaut. Sinkt hingegen der Sauerstoffpartialdruck im Blut und folglich auch im Gewebe, entstehen weniger Sauerstoffradikale, HIF wird nicht abgebaut und kann so als Transkriptionsfaktor an die 3' Enhancer Region des EPO-Gens binden und zu einer vermehrten Expression von Erythropoietin führen. [72, 73, 75, 76]

Bei PatientInnen mit einer chronischen Niereninsuffizienz kann es im Verlauf der Erkrankung zu einer renalen Anämie kommen. Die Niere ist nicht mehr in der Lage, eine ausreichende Menge an EPO zu synthetisieren, was zu einem in Bezug auf den Schweregrad der Anämie inadäquaten EPO-Spiegel führt. Wie in einer Review von Wenger RH et al. angeführt, liegt dies mitunter daran, dass es durch die Abnahme des renalen Sauerstoffverbrauchs zu einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck im Nierenparenchym kommt, worauf ein Abbau von HIF folgt und die Synthese von EPO zurückgefahren wird. [75, 102]

### 3.2 Funktion

Zentrale Funktion von Erythropoietin ist die Stimulation der Erythrozytenbildung im Rahmen der Erythropoese. Die erythroiden Vorläuferzellen differenzieren unter EPO-Einfluss von BFU-e (burst-forming-units-erythroid) über CFU-e (colony-forming-units-erythroid) hin zu reifen Erythrozyten. Der Effekt von EPO auf erythroide Vorläuferzellen wird über den EPO-Rezeptor (EPO-R) vermittelt, welcher in großen Mengen in der Zellmembran der Erythrozyten vorhanden ist. [72, 74]

Neben der zentralen Rolle im Rahmen der Erythropoese wirkt Erythropoietin jedoch auch noch auf andere, nicht-hämatopoietische Zellen.

Erste Hinweise auf eine nicht-hämatopoietische Funktion von EPO ergaben sich aus dem Nachweis von EPO-R auf Neuronen des ZNS. Da EPO die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, wurde eine EPO-Synthese von Zellen des ZNS postuliert. Nachdem Masuda S et al. in Studien an Ratten eine vom Sauerstoffpartialdruck abhängige Expression von EPO in Astrozyten zeigen konnten, gelang es Marti HH et al. schließlich, in Biopsien von menschlichem Hippocampusgewebe EPO-mRNA nachzuweisen. [79, 80]

An vielen Stellen können in der zugänglichen Literatur Hinweise auf einen neuroprotektiven Effekt von EPO gefunden werden. Sakanaka M et al. konnten in einer Studie an Wüstenrennmäusen nachweisen, dass eine ischämie-induzierte Lernschwäche durch eine EPO Infusion von 25-250ng/Tag in das zerebrale Ventrikelsystem dosisabhängig vermindert werden konnte. Höhere Dosierungen von EPO konnten keine weitere Verbesserung des ischämischen Schadens zeigen, was auf eine schnelle Downregulation des EPO-R bei hohen EPO Konzentrationen schließen lässt. [78]

Auch in der Behandlung einer diabetischen Neuropathie könnte EPO eine Rolle zukommen. Bianchi R et al. konnten dies in einer Studie an diabetischen Ratten aufzeigen. Durch die Gabe von Streptozotocin wurde ein Diabetes mellitus ausgelöst und nach 5 Wochen zeigte sich im Vergleich zu nicht-diabetischen Ratten eine Reduktion der peripheren Nervenleitungsgeschwindigkeit von 20%. Dieser Rückgang konnte durch eine anschließende fünfwöchige Gabe von rekombinantem humanem EPO (rhEPO) um 50% attenuiert werden. Allerdings zeigte sich nach der fünfwöchigen rhEPO-Therapie auch ein signifikanter Anstieg des Hämatokrit von bis zu 45%. Bianchi R et al. schlossen daraus, dass für die Behandlung der diabetischen Neuropathie ein nicht-erythropoietisches EPO-

Analogon notwendig wäre, um mögliche schwerwiegende Nebenwirkungen durch den erhöhten Hämatokrit zu vermeiden. [86]

Morishita E et al. konnten einen Zusammenhang zwischen EPO-Expositionsdauer und den erythropoietischen und neuroprotektiven Effekten aufzeigen. Eine EPO-Exposition von 5 Minuten hatte in vitro an Neuronen des Cortex und Hippocampus von Ratten bereits einen neuroprotektiven Effekt, wohingegen ein erythropoietischer Effekt erst bei Langzeitexposition mit EPO nachzuweisen war. [87]

Aufgrund der Erkenntnisse von Morishita E et al. versuchten Erbayraktar S et al. durch Modifikation des EPO-Moleküls eine EPO-Variante mit einer kurzen Halbwertszeit zu generieren. Durch Entfernung der Sialinsäuren am EPO-Molekül entwickelten sie das sogenannte asialoEPO, welches nach intravenöser Injektion eine Halbwertszeit von 1,4 Minuten aufweist (Halbwertszeit von rhEPO: ca. 5,6 Stunden), eine mit rhEPO vergleichbare Affinität für den EPO-R hat und genauso wie rhEPO die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. [88]

Ein weiterer Effekt von Erythropoietin betrifft die Angiogenese. Dies konnte unter anderem von Watanabe D et al. aufgezeigt werden. Sie konnten nachweisen, dass die mittlere EPO-Konzentration im Glaskörper von PatientInnen mit einer proliferativen diabetischen Retinopathie signifikant höher war als jene in einer Vergleichsgruppe nicht-diabetischer PatientInnen (464 vs. 36,5 mIU pro Milliliter,  $P < 0,001$ ). Zudem konnten sie an Mäusen mit ischämisch induzierter retinaler Neovaskularisation nachweisen, dass durch die intraokuläre Injektion von löslichem EPO-R die histologisch nachweisbare Neovaskularisation der Retina in einem dosisabhängigen Verhältnis reduziert werden konnte, mit einer maximalen Reduktion von 65% bei intraokulärer Injektion von 25ng EPO-R im Vergleich zu humanem IgG, welches in das kontralaterale Auge injiziert wurde. [89]

### **3.3 Therapeutischer Einsatz**

Die wichtigste Indikation für den therapeutischen Einsatz von EPO stellt die renale Anämie im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz dar, wobei das Stadium der Niereninsuffizienz mit dem Hämatokrit-Level korreliert. Hsu C et al. konnten in einer Studie an 12.055 PatientInnen ein progressives, und bei Männern signifikanteres, Abnehmen des Hämatokrit nachweisen, sobald die geschätzte Kreatinin-Clearance unter 60mL/min sinkt. Mit der Entwicklung von rhEPO in den späten 1980er Jahren konnten

große therapeutische Fortschritte in der Behandlung der renalen Anämie erzielt werden. Neben der Anämiekorrektur wurden unter rhEPO-Therapie auch positive Effekte wie eine Regression linksventrikulärer Hypertrophie und eine Verbesserung kognitiver Funktionen beobachtet. Allerdings ist die Anwendung von rhEPO auch mit verschiedenen Nebenwirkungen wie thrombotischen Komplikationen und arterieller Hypertonie assoziiert. Als Zielwerte für die Einstellung einer renalen Anämie mit rhEPO werden von der Renal Association Hämoglobinwerte von 10-12 g/dL empfohlen. [81, 82, 83]

Auch im Rahmen von Tumoranämien oder Tumortherapie-induzierter Anämie kann rhEPO zur Anämiekorrektur verwendet werden. Welche Auswirkung die Gabe von EPO auf die Prognose bei TumorpatientInnen hat, ist nicht abschließend geklärt. Es sind in der Literatur sowohl Hinweise auf eine Verbesserung als auch eine Verschlechterung der Prognose zu finden. Thews O et al. konnten in einer Studie an Ratten zeigen, dass die Therapie mit rhEPO einen Einfluss auf die Radiosensitivität von Tumorgewebe hat. Eine durch Gabe von Carboplatin induzierte Anämie konnte durch die Applikation von rhEPO verhindert werden und eine darauffolgende Strahlentherapie zeigte in der rhEPO-Gruppe ein im Vergleich zur nicht mit rhEPO behandelten Gruppe höheres Ansprechen auf die Strahlentherapie. Andererseits gibt es auch Daten, dass eine Anämiekorrektur durch Erythropoietingabe die Prognose von onkologischen PatientInnen negativ beeinflussen kann. Dies konnte unter anderem in einem doppelblinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten Trial von Henke M et al. aufgezeigt werden. Unter Gabe von Epoetin beta, einem synthetischen Analogon von Erythropoietin, konnte zwar die bestehende Tumoranämie korrigiert werden, es zeigte sich jedoch in der Epoetin beta Gruppe ein relatives Risiko von 1,69 (95% KI 1,16-2,47; p=0,01) für eine locoregionale Tumorprogression. Eine doppelblinde, randomisierte, Placebo-kontrollierte Studie von Leyland-Jones B et al. zur Abschätzung des Überlebens von PatientInnen mit metastasiertem Mammakarzinom unter first-line Chemotherapie, welche Epoetin alfa zur Anämiekorrektur erhielten, musste aufgrund einer erhöhten Mortalität in der Epoetin-alfa-Gruppe abgebrochen werden. Die abgeschätzte Gesamtüberlebensrate nach 12 Monaten betrug für die Epoetin-alfa-Gruppe 70%, verglichen mit 76% in der Placebo-Gruppe (HR 1,37; p=0,01), wobei eine Progression des Mammakarzinoms in beiden Gruppen die häufigste Todesursache war (27% unter Epoetin alfa, 22% unter Placebo). [77, 84, 85]

## **3.4 Assoziierte Erkrankungen**

### **3.4.1 Familiäre Erythrozytose**

Zmajkovic et al. konnten in einer norwegischen Familie mit autosomal dominanter familiärer Erythrozytose in 10 Familienmitgliedern über vier Generationen eine heterozygote Deletion eines Basenpaares (c.32delG) im Exon 2 des EPO-Gens nachweisen, welche mit einer gain-of-function Mutation und daraus resultierender 8- bis 10-facher erhöhter biologischer Aktivität von EPO einhergeht. Andere Mutationen, welche mit einer familiären Erythrozytose einhergehen, unter anderem eine Mutation im EPO-R, konnten in den betroffenen Familienmitgliedern nicht nachgewiesen werden. [90]

### **3.4.2 Diamond-Blackfan Anämie**

Kim et al. konnten in zwei Geschwistern mit blutsverwandten Eltern einen homozygoten SNP im Exon 5 des EPO-Gens nachweisen, bei dem Guanin durch Adenin ersetzt wird, wodurch in der Folge Arginin durch Glutamin (R150Q) ersetzt wird. Andere bekannte Genvarianten, welche mit Diamond-Blackfan Anämie assoziiert sind, konnten in diesem Fall nicht nachgewiesen werden. In vitro konnten Kim et al. nachweisen, dass im Vergleich zum EPO Wildtyp die R150Q Variante zwar nur eine minimal verringerte Affinität zum EPO-R aufwies, die intrazelluläre Signaltransduktion jedoch signifikant eingeschränkt war. [91]

### **3.4.3 Mikrovaskuläre Komplikationen**

Tong Z et al. konnten in einer Arbeit aus dem Jahr 2008 eine Assoziation zwischen dem SNP rs1617640 in der Promoterregion des EPO-Gens (EPO – 1306A>C) und zwei mikrovaskulären Komplikationen eines Diabetes mellitus, nämlich einer proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR) und einem terminalen Nierenversagen (end stage renal disease, ESRD), aufzeigen. Aufgrund des gehäuften gemeinsamen Auftretens von sowohl PDR als auch ESRD in diabetischen PatientInnen und der familiären Häufung postulierten Tong Z et al. eine ähnliche Pathophysiologie für die beiden Erkrankungen und auch eine genetische Komponente. Bei der PDR kommt es im Rahmen einer progressiven Retinaischämie zu einer vermehrten, Hypoxie-induzierten Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) und folglich zu einer gesteigerten Gefäßproliferation in der Retina. Aufgrund dieser Tatsachen untersuchten Tong Z et al. an 374 PatientInnen mit PDR und ESRD und 239 alters- und ethnizitätsadaptierten diabetischen

KontrollpatientInnen aus einer US-Studienpopulation mit europäischen Wurzeln 19 SNPs in Genen, welche eine angiogenetische Rolle spielen, auf eine Assoziation mit PDR und ESRD. Die einzige signifikante Assoziation ( $P < 0,002$ ) konnte beim SNP rs1617640 gefunden werden. Während eine Heterozygotie für das Risikoallel T mit einer OR von 1,20 einherging, war eine Homozygotie mit einer OR von 2,01 vergesellschaftet. [92]

In der Folge untersuchten Tong Z et al. auch die Auswirkung verschiedener Allele von rs1617640 auf die EPO Expression. EPO Konzentrationen im Glaskörper von nicht-diabetischen PatientInnen mit dem TT Genotyp waren 7,5-mal höher als jene von KontrollpatientInnen mit dem GG Genotyp. Zudem konnten Tong Z et al. zeigen, dass die Aktivität des Luciferase-Reportergens durch das T Allel von rs1617640, im Vergleich zum G Allel, um das 25-fache anstieg. [92]

Tong Z et al. schlossen aus diesen Ergebnissen, dass dem T Allel von rs1617640 eine signifikante funktionelle Rolle in der Expression von EPO zukommt. [92]

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Studienpopulation**

Für die vorliegende Studie wurden 945 PatientInnen der Universitätsklinik Graz mit vordiagnostizierter pAVK eingeschlossen. Bei Erstdiagnose der pAVK wurde von dem/der behandelnden Arzt/Ärztin der Beginn der Schmerzsymptomatik erfragt und festgehalten. Aufgrund der sehr charakteristischen pAVK-Schmerzsymptomatik konnten die PatientInnen bezüglich des Beginns recht genaue Angaben machen.

### **4.2 Genetische Methodik**

Um den Einfluss des SNP rs1617640 im EPO-Gen auf die Pathogenese der pAVK zu überprüfen, wurden tiefgefrorene Vollblutproben von 945 PatientInnen mit pAVK auf diesen Polymorphismus hin untersucht. Die Isolierung der DNA aus den einzelnen Vollblutproben erfolgte durch das Gerät MagNA Pure von Roche Diagnostics.

Bei diesem Prozess werden zuerst die Zellwände lysiert, um danach in einem zweiten Schritt durch die Zugabe einer Proteinase die im Probenmaterial vorhandenen Proteine zu entfernen. Anschließend werden der Probe magnetische Glaspartikel hinzugefügt, welche sich mit der DNA verbinden und eine magnetische Trennung der DNA von anderem unerwünschtem Zellmaterial ermöglichen, welches in mehreren Waschschrritten entfernt wird. Schlussendlich erfolgt die Loslösung der DNA von den magnetischen Glaspartikeln durch eine Elution bei 70°C. [99, 100, 103]

Um nachzuweisen, welches Allel des SNP rs1617640 vorliegt, wurde eine real-time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit zwei verschiedenen TaqMan Sonden durchgeführt. Bei diesen Sonden handelt es sich um Nukleotidketten, welche komplementär zur Nukleotidsequenz um den fraglichen SNP herum sind und sich nur an der Stelle des SNP unterscheiden. In der einen TaqMan Sonde befindet sich an der fraglichen Stelle ein Thymin, in der anderen TaqMan Sonde befindet sich an dieser Stelle ein Guanin. Befindet sich nun ein Adenin im SNP rs1617640 der zu untersuchenden DNA, so bindet eher jene TaqMan Sonde, welche an dieser Stelle ein Thymin hat. Wenn sich hingegen in der zu untersuchenden DNA ein Cytosin im SNP rs1617640 befindet, so bindet eher jene TaqMan Sonde, welche an dieser Stelle ein Guanin hat. Des Weiteren besitzen diese Sonden an ihrem 5' Ende jeweils sogenannte Fluorophore und am 3' Ende

einen Quencher, welcher ein Fluoreszieren der Fluorophore verhindert, solange sie sich in räumlicher Nähe zum Quencher befinden. Der Fluorophor der Thymidin TaqMan Sonde fluoresziert mit einer anderen Wellenlänge, als der Fluorophor der Guanin TaqMan Sonde, wodurch eine Zuordnung ermöglicht wird.

Weiters befindet sich unter den Bestandteilen zur Durchführung der RT-PCR eine Taq-Polymerase, sowie forward und reverse Primer, welche jeweils an DNA Sequenzen kurz vor bzw. kurz nach dem SNP rs1617640 binden können. Die Taq-Polymerase synthetisiert nun vom forward Primer aus einen komplementären DNA Strang in 5'-3' Richtung. Dabei trifft sie auf das 5' Ende der TaqMan Sonde mit dem dort gebundenen Fluorophor. Durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase ist diese nun in der Lage, die TaqMan Sonde in ihre einzelnen Nukleotide aufzutrennen. Somit befindet sich der Fluorophor nach Abspaltung nicht mehr in der Nähe des Quenchers und es kommt zu einer messbaren Fluoreszenz. Je nach Wellenlänge der Fluoreszenz kann in der Folge bestimmt werden, ob eine DNA-Probe den SNP rs1617640 besitzt und ob sie für diesen heterozygot oder homozygot ist. [99, 100, 104]

## 5 Ergebnisse

Mithilfe des oben beschriebenen Verfahrens konnte festgestellt werden, dass die Allele im SNP rs1617640 des EPO Gens in der untersuchten Studiengruppe folgendermaßen verteilt waren: Eine Homozygotie für den Wildtyp, also ein Adenin an der fraglichen Stelle in der Promoterregion des EPO Gens, konnte bei 356 PatientInnen festgestellt werden, was 37,7% entspricht. Eine Homozygotie für die mutierte Variante, sprich ein Cytosin im SNP rs1617640, konnte bei 156 PatientInnen oder 16,5% nachgewiesen werden. 433 PatientInnen waren schließlich heterozygot, entsprechend 45,8%.

Eine Analyse über den Einfluss des EPO Genotyps auf die ebenfalls in der Studienpopulation erhobenen Werte für Erythrozytenanzahl, Hämoglobin und Hämatokrit zeigte, dass der SNP rs1617640 A>C mit einer erhöhten EPO Expression einhergeht. Die Gruppe mit dem CC-Genotyp hatte eine durchschnittliche Erythrozytenanzahl von 4,55 T/l, was einen signifikanten Unterschied ( $p=0,003$ ) zu den anderen Genotypen (AC-Genotyp 4,47 T/l; AA-Genotyp 4,36 T/l) darstellt. Ähnliches konnte auch bezüglich des Hämoglobinwertes festgestellt werden. Hier zeigte sich ein durchschnittlicher Hb von 13,75 g/dl beim CC-Genotyp, verglichen mit 13,53 g/dl beim AC-Genotyp und 13,29 g/dl beim AA-Genotyp, was ebenfalls einem signifikanten Unterschied ( $p=0,029$ ) entspricht. Auch die Analyse bezüglich des Hämatokritwertes zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p=0,006$ ), mit einem durchschnittlichen Hämatokrit von 41,82% beim CC-Genotyp, 41,16% beim AC-Genotyp und 40,28% beim AA-Genotyp.

Eine Auswertung bezüglich des Symptombeginns konnte bei 910 PatientInnen durchgeführt werden. Bei den restlichen 35 PatientInnen konnte der Symptombeginn nicht erhoben werden. Es zeigte sich, dass erste Symptome bei PatientInnen mit dem CC-Genotyp fast 2 Jahre früher (Durchschnittsalter: 64,01 Jahre) auftraten, als bei PatientInnen mit dem AA-Genotyp (Durchschnittsalter: 65,99 Jahre). Dies entspricht einem statistisch signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,042.

## 6 Diskussion

Aus den erhobenen Daten geht hervor, dass der SNP 1617640 A>C in der Promoterregion des EPO-Gens mit erhöhten Werten für Erythrozytenanzahl, Hämoglobinwert und Hämatokrit einhergeht.

Unerwartet war allerdings, dass erste Symptome einer pAVK bei PatientInnen mit dem Wildtyp (AA) um fast zwei Jahre später auftraten, als bei PatientInnen mit dem CC-Genotyp. Aufgrund der erhöhten Erythrozytenzahl und Hämoglobinwerte beim CC-Genotyp wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass eine adäquate Sauerstoffversorgung betroffener Muskelgruppen in dieser PatientInnengruppe länger möglich sein sollte, als beim AA-Genotyp, welcher mit einer geringeren Erythrozytenzahl und Hämoglobinwerten einhergeht, und die pAVK in der Gruppe mit dem CC-Genotyp somit erst später symptomatisch werden sollte.

Bezüglich möglicher Erklärungen für diese Beobachtung kann aus den erhobenen Studiendaten kein definitiver Schluss gezogen werden. Ein möglicher Ansatz, um diese Beobachtung zu erklären, könnte sein, dass der erhöhte Hämatokrit bei PatientInnen mit dem CC-Genotyp zu einer erhöhten Viskosität des Blutes führt. Bei einem gegebenen Perfusionsdruck besteht ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem Blutfluß durch ein Gewebe und der Blutviskosität, wodurch im Fall einer pAVK die ohnehin schon inadäquate Perfusion von betroffenen Muskelgruppen durch eine höhere Viskosität noch weiter beeinträchtigt wäre.

Ob ein Unterschied im Hämatokritwert von 1,6 Prozentpunkten, wie er zwischen dem CC- und AA-Genotyp in unserer Studie zu beobachten ist, ausreicht, um durch die dadurch erhöhte Viskosität erste Symptome einer pAVK zwei Jahre früher auszulösen, müsste in weiterführenden Studien erforscht werden.

Ein anderes Erklärungsmodell für die beobachteten Ergebnisse könnte sein, dass bei einem höheren Hämoglobingehalt der Abtransport von Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) aus der Körperperipherie erleichtert wird. Ungefähr 80% des anfallenden CO<sub>2</sub> wird zwar in Form von Bicarbonat transportiert, an die 25% des im Stoffwechsel anfallenden Kohlendioxids werden jedoch an Hämoglobin gebunden und auf diese Weise zurück zur Lunge transportiert. Steigt nun der Hämoglobingehalt des Blutes, könnte dies zu einem erleichterten Abtransport von CO<sub>2</sub> und folglich zu einem Absinken des CO<sub>2</sub> Partialdruckes in der Peripherie führen, wodurch in der Folge der pH-Wert ansteigen und es zu einer

Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins kommen würde. Die durch diesen Anstieg des pH-Wertes bedingte Linksverschiebung und damit einhergehende Affinitätszunahme des Hämoglobins für Sauerstoff würde zu einer Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung führen und könnte einen Erklärungsansatz für den früheren Symptombeginn in der Gruppe mit dem CC-Genotyp sein.

Bei Begutachtung anderer Studien, welche sich ebenfalls mit dem SNP rs1617640 im EPO-Gen auseinandersetzen, fällt auf, dass die Datenlage bezüglich der beobachteten Effekte nicht einheitlich ist. Während in dieser Arbeit der CC-Genotyp mit erhöhten Werten von Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit assoziiert war und folglich eine erhöhte EPO-Expression durch den SNP rs1617640 nahelegt, war in der Arbeit von Tong Z et al. der AA-Genotyp mit einer 7,5-fach erhöhten EPO-Konzentration im Glaskörper und mit einer OR von 2,01 für die Entwicklung von PDR und ESRD im Vergleich zu PatientInnen mit dem CC-Genotyp assoziiert. [92] In einer Studie von Abhary S et al. bezüglich der Assoziation zwischen Polymorphismen im EPO-Gen und diabetischer Retinopathie wiederum war es der CC-Genotyp, welcher mit der Entwicklung einer diabetischen Retinopathie assoziiert war. Eine Messung der EPO-Spiegel bzw. von damit assoziierten Parametern wurde hier nicht durchgeführt. [93] Zu einem ähnlichen Schluss kamen auch Fan Y et al., die in einer Fall-Kontroll Studie die Auswirkungen von drei verschiedenen Polymorphismen im EPO-Gen in Bezug auf eine diabetische Retinopathie untersuchten. Einer der untersuchten Polymorphismen war der SNP rs1617640 und hier betrug die Häufigkeit des selteneren Allels (C) (minor allele frequency [MAF]) 22,2% bei den KontrollpatientInnen und 27,3% bei PatientInnen mit einer diabetischen Retinopathie, was einem statistisch signifikanten Unterschied ( $p=0,006$ ) und einer OR von 1,87 (95% KI 1,10 – 2,41) entspricht. Auch die Bestimmung der EPO-Spiegel zeigte einen signifikant höheren EPO-Spiegel bei StudienteilnehmerInnen mit dem CC-Genotyp ( $p<0,001$ ) verglichen mit den AC- und AA-Genotypen. [94] Amanzada A et al. untersuchten in PatientInnen mit Hepatitis C die Entwicklung ihrer Hämoglobin- und EPO-Werte unter antiviraler Therapie mit Ribavirin, unter anderem in Bezug auf eine mögliche Korrelation mit dem SNP rs1617640. Es zeigte sich, dass bei PatientInnen mit dem CC-Genotyp ein deutlich höherer Anteil sowohl 4 Wochen ( $p=0,025$ ) als auch 12 Wochen ( $p=0,029$ ) nach Therapiebeginn mit Ribavirin einen Abfall des Hämoglobinspiegels von mehr als 3g/dL verzeichnete, als unter PatientInnen mit dem AC- oder AA-Genotyp. Interessanterweise bestand bei Therapiebeginn zwischen den verschiedenen Genotypen kein signifikanter Unterschied im Hämoglobinspiegel. Auch die

EPO-Spiegel wiesen zu Therapiebeginn zwischen allen Gruppen keinen signifikanten Unterschied auf. Zwar stiegen hier, vermutlich in Reaktion auf die sich entwickelnde Anämie, nach Therapiebeginn die EPO-Spiegel in allen Gruppen an, allerdings war der Anstieg bei PatientInnen mit dem CC-Genotyp signifikant ( $p < 0,01$ ) schwächer ausgeprägt als bei PatientInnen mit dem AC- oder AA-Genotyp. [95]

Wie es dazu kommt, dass derselbe Genotyp von verschiedenen Arbeitsgruppen mit teils gegensätzlichen Auswirkungen assoziiert ist, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Ethnische Heterogenität zwischen den einzelnen Studienpopulationen könnte mitunter eine Rolle dahingehend gespielt haben. Allerdings fällt bei genauerer Analyse der Studienpopulationen auf, dass ein Großteil entweder europäisch oder zumindest europäischer Abstammung ist. Einzig die Studienpopulation von Fan Y et al. bestand gänzlich aus chinesischen Individuen.

Zu beachten ist, dass in der Studie von Tong Z et al. die EPO-Konzentration im Glaskörper bestimmt wurde, in den anderen erwähnten Studien im Plasma. Es könnte der Fall sein, dass EPO-Spiegel in Plasma und Glaskörper nicht korrelieren und erhöhten EPO-Spiegeln im Glaskörper eine gesteigerte lokale EPO Produktion durch Retinazellen zugrunde liegt. [96,97]

Denkbar wäre auch, dass die abweichenden Beobachtungen durch einen Effektmodifikator zustande kommen, möglicherweise eine Pharmakotherapie, ein Lebensstilfaktor oder ein Polymorphismus im EPO-Rezeptor, der die Auswirkungen des jeweiligen EPO Genotyps beeinflusst und so zu den unterschiedlichen Ergebnissen der verschiedenen Arbeitsgruppen beiträgt. In diesem Fall könnte eine Analyse von Subgruppen einen Hinweis auf das Vorliegen eines Effektmodifikators geben.

Noch zu erwähnen ist, dass es sich bei allen genannten Studien um retrospektive Studien, meist Fall-Kontroll Studien handelte. Eine prospektive Kohortenstudie wäre besser geeignet, um einen kausalen Zusammenhang zwischen den untersuchten EPO-Genotypen und der Entwicklung verschiedener Krankheitsbilder herauszustreichen.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Classen M, Diehl V, Kochsiek K. Innere Medizin. 6th ed. Amsterdam: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag; 2009, p. 209.
- [2] Kalbaugh CA, Kucharska-Newton A, Wruck L, et al. Peripheral Artery Disease Prevalence and Incidence Estimated From Both Outpatient and Inpatient Settings Among Medicare Fee-for-Service Beneficiaries in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Am Heart Assoc.* 2017 May;6(5).
- [3] Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation.* 1985;71(3):510-515.
- [4] Olin JW, Sealove BA. Peripheral artery disease: current insight into the disease and its diagnosis and management. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(7):678-692.
- [5] Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzler NR, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation.* 2006 Mar;113(11):463-654.
- [6] Willigendael EM, Teijink JA, Bartelink ML, et al. Influence of smoking on incidence and prevalence of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2004 Dec;40(6):1158-1165.
- [7] Criqui MH, Denenberg JO, Langer RD, Fronek A. The epidemiology of peripheral arterial disease: importance of identifying the population at risk. *Vasc Med.* 1997;2(3):221-226.
- [8] Arasteh K, Baenkler HW, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T, Dill T, et al. Innere Medizin. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012, p. 279-285.

- [9] Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*. 2013 Oct;382(9901):1329-1340.
- [10] Thiruvoipati T, Kielhorn CE, Armstrong EJ. Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes. *World J Diabetes*. 2015 Jul;6(7):961-969.
- [11] Beks PJ, Mackaay AJ, de Neeling JN, de Vries H, Bouter LM, Heine RJ. Peripheral arterial disease in relation to glycaemic level in an elderly Caucasian population: the Hoorn study. *Diabetologia*. 1995 Jan;38(1):86-96.
- [12] Bainton D, Sweetnam P, Baker I, Elwood P. Peripheral vascular disease: consequence for survival and association with risk factors in the Speedwell prospective heart disease study. *Br Heart J*. 1994 Aug;72(2):128-132.
- [13] Kannel WB, McGee DL. Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study. *J Am Geriatr Soc*. 1985 Jan;33(1):13-18.
- [14] Makin A, Lip GY, Silverman S, Beevers DG. Peripheral vascular disease and hypertension: a forgotten association?. *J Hum Hypertens*. 2001 Jul;15(7):447-454.
- [15] Olin JW. Masterclass series in peripheral arterial disease - Hypertension and peripheral arterial disease. *Vasc Med*. 2005;10:241-246.
- [16] Novo S, Avellone G, Di Garbo V, et al. Prevalence of risk factors in patients with peripheral arterial disease. A clinical and epidemiological evaluation. *Int Angiol*. 1992 Jul-Sep;11(3):218-229.
- [17] Violi F, Criqui M, Longoni A, Castiglioni C. Relation between risk factors and cardiovascular complications in patients with peripheral vascular disease. Results from the A.D.E.P. study. *Atherosclerosis*. 1996 Feb;120(1-2):25-35.
- [18] Cheng SW, Ting AC, Lau H, Wong J. Epidemiology of atherosclerotic peripheral arterial occlusive disease in Hong Kong. *World J Surg*. 1999 Feb;23(2):202-206.
- [19] Binaghi F, Fronteddu PF, Cannas F, et al. Prevalence of peripheral arterial occlusive disease and associated risk factors in a sample of southern Sardinian population. *Int Angiol*. 1994 Sep;13(3):233-245.
- [20] Rockman CB, Maldonado TS, Jacobowitz GR, Adelman MA, Riles TS. Hormone replacement therapy is associated with a decreased prevalence of peripheral arterial disease in postmenopausal women. *Ann Vasc Surg*. 2012 Apr;26(3):421-418.

- [21] Asfar S, Safar HA. Homocysteine levels and peripheral arterial occlusive disease: a prospective cohort study and review of the literature. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2007 Oct;48(5):601-605.
- [22] Rong D, Liu J, Jia X, et al. Hyperhomocysteinaemia is an independent risk factor for peripheral arterial disease in a Chinese Han population. *Atherosclerosis*. 2017 Aug;263:205-210.
- [23] Davidson MB. Novel risk factors for atherosclerosis. *JAMA*. 2004 Jan;291(3):301-302.
- [24] Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*. 1998 Feb;97(5):425-428.
- [25] Kimáková P, Solár P, Solárová Z, Komel R, Debeljak N. Erythropoietin and Its Angiogenic Activity. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul;18(7):1519.
- [26] Cooke JP. The pathophysiology of peripheral arterial disease: rational targets for drug intervention. *Vasc Med*. 1997;2(3):227-230.
- [27] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep;407(6801):233-241.
- [28] Khan TH, Farooqui FA, Niazi K. Critical review of the ankle brachial index. *Curr Cardiol Rev*. 2008 May;4(2):101-106.
- [29] Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, et al. 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines [published correction appears in *Circulation*. 2017 Mar 21;135(12):e791-e792]. *Circulation*. 2017 Mar;135(12):726-779.
- [30] Lawall H., Huppert P, Rümenapf G. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. 2015 Nov.
- [31] Watanabe Y, Masaki H, Yunoki Y, et al. Ankle-Brachial Index, Toe-Brachial Index, and Pulse Volume Recording in Healthy Young Adults. *Ann Vasc Dis*. 2015;8(3):227-235.
- [32] Lewis JE, Williams P, Davies JH. Non-invasive assessment of peripheral arterial disease: Automated ankle brachial index measurement and pulse volume analysis compared to duplex scan. *SAGE Open Med*. 2016 Jul;4:1-9
- [33] Herold, G. *Innere Medizin* 2018. Köln: Gerd Herold; 2018, p. 806-809

- [34] Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2018 Mar;39(9):763-816.
- [35] Whelan JF, Barry MH, Moir JD. Color flow Doppler ultrasonography: comparison with peripheral arteriography for the investigation of peripheral vascular disease. *J Clin Ultrasound*. 1992 Jul-Aug;20(6):369-374.
- [36] Favaretto E, Pili C, Amato A, et al. Analysis of agreement between Duplex ultrasound scanning and arteriography in patients with lower limb artery disease. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2007 May;8(5):337-341.
- [37] Tehan PE, Sebastian M, Barwick AL, Chuter VH. How sensitive and specific is continuous-wave Doppler for detecting peripheral arterial disease in people with and without diabetes? A cross-sectional study. *Diab Vasc Dis Res*. 2018 Sep;15(5):396-401.
- [38] Tehan P, Bray A, Keech R, Rounsley R, Carruthers A, Chuter VH. Sensitivity and Specificity of the Toe-Brachial Index for Detecting Peripheral Arterial Disease: Initial Findings. *J Ultrasound Med*. 2015 Oct;34(10):1737-1743.
- [39] Mathew RC, Kramer CM. Recent advances in magnetic resonance imaging for peripheral artery disease. *Vasc Med*. 2018 Apr;23(2):143-152.
- [40] Collins R, Burch J, Cranny G, et al. Duplex ultrasonography, magnetic resonance angiography, and computed tomography angiography for diagnosis and assessment of symptomatic, lower limb peripheral arterial disease: systematic review. *BMJ*. 2007 Jun;334(7606):1257.
- [41] Mishra A, Jain N, Bhagwat A. CT Angiography of Peripheral Arterial Disease by 256-Slice Scanner: Accuracy, Advantages and Disadvantages Compared to Digital Subtraction Angiography. *Vasc Endovascular Surg*. 2017 Jul;51(5):247-254.
- [42] Amboss GmbH. Periphere arterielle Verschlusskrankheit – Anamnese und körperliche Untersuchung. Available from: <https://next.amboss.com/de/article/ch0a1f#Z671a417595318b79417c69bd581028b4> [Accessed 26 August 2020]
- [43] Reiser M, Kuhn FP, Debus J. *Radiologie*. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011, p. 385-433

- [44] Renz-Polster H, Krautzig S. Basislehrbuch Innere Medizin. 4th ed. München: Urban & Fischer Verlag; 2008, p.198-265
- [45] Arastéh K, Baenkler HW, Bieber C. Innere Medizin. 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009, p. 246-288
- [46] Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002 Jan;324(7329):71-86.
- [47] Fowkes FG, Price JF, Stewart MC, et al. Aspirin for prevention of cardiovascular events in a general population screened for a low ankle brachial index: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010 Mar;303(9):841-848.
- [48] Diehm C, Allenberg JR, Pittrow D, et al. Mortality and vascular morbidity in older adults with asymptomatic versus symptomatic peripheral artery disease. *Circulation*. 2009 Nov;120(21):2053-2061.
- [49] Zanchetti A, Julius S, Kjeldsen S, et al. Outcomes in subgroups of hypertensive patients treated with regimens based on valsartan and amlodipine: An analysis of findings from the VALUE trial. *J Hypertens*. 2006 Nov;24(11):2163-2168.
- [50] Ostergren J, Sleight P, Dagenais G, et al. Impact of ramipril in patients with evidence of clinical or subclinical peripheral arterial disease. *Eur Heart J*. 2004 Jan;25(1):17-24.
- [51] Khouri C, Jouve T, Blaise S, Carpentier P, Cracowski JL, Roustit M. Peripheral vasoconstriction induced by  $\beta$ -adrenoceptor blockers: a systematic review and a network meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2016 Aug;82(2):549-560.
- [52] Espinola-Klein C, Weisser G, Jagodzinski A, et al.  $\beta$ -Blockers in patients with intermittent claudication and arterial hypertension: results from the nebulolol or metoprolol in arterial occlusive disease trial. *Hypertension*. 2011 Aug;58(2):148-154.
- [53] Kumbhani DJ, Steg PG, Cannon CP, et al. Statin therapy and long-term adverse limb outcomes in patients with peripheral artery disease: insights from the REACH registry. *Eur Heart J*. 2014 Nov;35(41):2864-2872.
- [54] Robinson JG. Overview of the 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. *Future Cardiol*. 2014 Mar;10(2):149-152.

- [55] Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, Gerstein HC, Miller ME, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008 Jun;358(24):2545-2559.
- [56] Libby P, Bonow RO. Braunwald's heart disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 8<sup>th</sup> ed: Saunders W.B.; p. 1491-1514
- [57] Jonason T, Bergström R. Cessation of smoking in patients with intermittent claudication. Effects on the risk of peripheral vascular complications, myocardial infarction and mortality. *Acta Med Scand*. 1987;221(3):253-260.
- [58] Nicolai SP, Teijink JA, Prins MH; Exercise Therapy in Peripheral Arterial Disease Study Group. Multicenter randomized clinical trial of supervised exercise therapy with or without feedback versus walking advice for intermittent claudication. *J Vasc Surg*. 2010 Aug;52(2):348-355.
- [59] Hood SC, Moher D, Barber GG. Management of intermittent claudication with pentoxifylline: meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ*. 1996;155(8):1053-1059.
- [60] Girolami B, Bernardi E, Prins MH, et al. Treatment of intermittent claudication with physical training, smoking cessation, pentoxifylline, or nafronyl: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 1999 Feb;159(4):337-345.
- [61] Regensteiner JG, Ware JE Jr, McCarthy WJ, et al. Effect of cilostazol on treadmill walking, community-based walking ability, and health-related quality of life in patients with intermittent claudication due to peripheral arterial disease: meta-analysis of six randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc*. 2002 Dec;50(12):1939-1946.
- [62] Dawson DL, Cutler BS, Hiatt WR, et al. A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication. *Am J Med*. 2000 Nov;109(7):523-530.
- [63] Kronlage M, Wassmann M, Vogel B, et al. Short vs prolonged dual antiplatelet treatment upon endovascular stenting of peripheral arteries. *Drug Des Devel Ther*. 2017 Oct;11:2937-2945.
- [64] Dörffler-Melly J, Koopman MM, Prins MH, Büller HR. Antiplatelet and anticoagulant drugs for prevention of restenosis/reocclusion following peripheral endovascular treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005 Jan;(1):CD002071.
- [65] Murphy TP, Cutlip DE, Regensteiner JG, et al. Supervised exercise, stent revascularization, or medical therapy for claudication due to aortoiliac peripheral artery disease: a randomized clinical trial. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Mar;65(10):999-1009.

- [66] Murphy TP, Cutlip DE, Regensteiner JG, et al. Supervised exercise vs primary stenting for claudication due to aortoiliac peripheral artery disease: 6-month outcomes from the CLEVER study. *Circulation*. 2012 Jan;125(1):130-139.
- [67] Vemulapalli S, Dolor RJ, Hasselblad V, et al. Comparative Effectiveness of Medical Therapy, Supervised Exercise, and Revascularization for Patients With Intermittent Claudication: A Network Meta-analysis. *Clin Cardiol*. 2015 Jun;38(6):378-386.
- [68] Fakhry F, Spronk S, van der Laan L, et al. Endovascular Revascularization and Supervised Exercise for Peripheral Artery Disease and Intermittent Claudication: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015 Nov;314(18):1936-1944.
- [69] Pereira CE, Albers M, Romiti M, Brochado-Neto FC, Pereira CA. Meta-analysis of femoropopliteal bypass grafts for lower extremity arterial insufficiency. *J Vasc Surg*. 2006 Sep;44(3):510-517.
- [70] Sharrock M, Antoniou SA, Antoniou GA. Vein Versus Prosthetic Graft for Femoropopliteal Bypass Above the Knee: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Angiology*. 2019 Aug;70(7):649-661.
- [71] Bedenis R, Lethaby A, Maxwell H, Acosta S, Prins MH. Antiplatelet agents for preventing thrombosis after peripheral arterial bypass surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Feb;2015(2):CD000535
- [72] Kleine B, Rossmannith W. *Hormone und Hormonsystem: Lehrbuch der Endokrinologie*. 3. Auflage. Berlin: Springer-Verlag; 2014, p. 139-141
- [73] Singh AK, Williams GH. *Textbook of Nephro-Endokrinology*. 2nd ed. London: Elsevier; 2017, p. 189-205
- [74] Brandes R, Lang F, Schmidt RF. *Physiologie des Menschen*. 32. Auflage. Berlin: Springer-Verlag; 2019, p. 292
- [75] Wenger RH, Hoogewijs D. Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jun;298(6):F1287-F1296.
- [76] Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan;12(2):332-339.
- [77] Thews O, Koenig R, Kelleher DK, Kutzner J, Vaupel P. Enhanced radiosensitivity in experimental tumours following erythropoietin treatment of chemotherapy-induced anaemia. *Br J Cancer*. 1998 Sep;78(6):752-756.

- [78] Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr;95(8):4635-4640.
- [79] Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*. 1994 Jul;269(30):19488-19493.
- [80] Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*. 1996 Apr;8(4):666-676.
- [81] Sato Y, Yanagita M. Renal anemia: from incurable to curable. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Nov;305(9):F1239-F1248.
- [82] Hsu CY, Bates DW, Kuperman GJ, Curhan GC. Relationship between hematocrit and renal function in men and women. *Kidney Int*. 2001 Feb;59(2):725-731.
- [83] Mikhail A, Brown C, Williams JA, et al. Renal association clinical practice guideline on Anaemia of Chronic Kidney Disease. *BMC Nephrol*. 2017 Nov;18(1):345.
- [84] Henke M, Laszig R, Rube C, et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003 Oct;362(9392):1255-1260.
- [85] Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, et al. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J Clin Oncol*. 2005 Sep;23(25):5960-5972.
- [86] Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, et al. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan;101(3):823-828.
- [87] Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*. 1997 Jan;76(1):105-116.
- [88] Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May;100(11):6741-6746.
- [89] Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 2005 Aug;353(8):782-792.
- [90] Zmajkovic J, Lundberg P, Nienhold R, et al. A Gain-of-Function Mutation in EPO in Familial Erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2018 Mar;378(10):924-930.

- [91] Kim AR, Ulirsch JC, Wilmes S, et al. Functional Selectivity in Cytokine Signaling Revealed Through a Pathogenic EPO Mutation. *Cell*. 2017 Mar;168(6):1053-1064
- [92] Tong Z, Yang Z, Patel S, et al. Promoter polymorphism of the erythropoietin gene in severe diabetic eye and kidney complications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May;105(19):6998-7003.
- [93] Abhary S, Burdon KP, Casson RJ, Goggin M, Petrovsky NP, Craig JE. Association between erythropoietin gene polymorphisms and diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 2010 Jan;128(1):102-106.
- [94] Fan Y, Fu YY, Chen Z, Hu YY, Shen J. Gene-gene interaction of erythropoietin gene polymorphisms and diabetic retinopathy in Chinese Han. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016 Aug;241(14):1524-1530.
- [95] Amanzada A, Goralczyk AD, Reinhardt L, Moriconi F, Cameron S, Mihm S. Erythropoietin rs1617640 G allele associates with an attenuated rise of serum erythropoietin and a marked decline of hemoglobin in hepatitis C patients undergoing antiviral therapy. *BMC Infect Dis*. 2014 Sep;14:503.
- [96] Inomata Y, Hirata A, Takahashi E, Kawaji T, Fukushima M, Tanihara H. Elevated erythropoietin in vitreous with ischemic retinal diseases. *Neuroreport*. 2004 Apr;15(5):877-879.
- [97] Katsura Y, Okano T, Matsuno K, et al. Erythropoietin is highly elevated in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2005 Sep;28(9):2252-2254.
- [98] Suzuki M, Tanaka R, Yoshioka K, Abiko A, Ehara S. Subtraction CT angiography for the diagnosis of iliac arterial steno-occlusive disease. *Jpn J Radiol*. 2016 Mar;34(3):194-202.
- [99] Bluch K, Renner W. Die Auswirkungen der Laktoseintoleranz auf das Arthroserisiko. 2012
- [100] Singer C, Renner W. Cadherin-5 als genetischer Risikofaktor für die Chorioretinopathia centralis serosa. 2016
- [101] Kanlop N, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Effects of cilostazol in the heart. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2011 Feb;12(2):88-95.
- [102] Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Oct;23(10):1631-4.

[103] Roche Molecular Systems, Inc – MagNa Pure LC DNA Isolation Kit I. Available from: [https://lifescience.roche.com/en\\_at/products/magna-pure-lc-dna-isolation-kit-i.html#details](https://lifescience.roche.com/en_at/products/magna-pure-lc-dna-isolation-kit-i.html#details) [Accessed 5 October 2020]

[104] Thermo Fisher Scientific Inc – How TaqMan Assays Work. Available from: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html> [Accessed 5 October 2020]