

Aus dem der Klinik und Poliklinik für Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Morphologische Plaqueunterschiede von symptomatischen  
Stenosen der Arteria carotis interna bei Patienten mit  
embolischem und hämodynamischem  
Schlaganfallmechanismus**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gerolf Kunte

aus Berlin

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. L. Harms  
                      2. Prof. Dr. med. M. Grond  
                      3. Prof. Dr. med. J. P. Sieb

Datum der Promotion: 18.11.2011

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Unterschiede hinsichtlich ischämischer Schlaganfallmechanismen bei symptomatischen ACI-Stenosen	7
1.2	Die Bedeutung von Makrophagen, T-Zellen und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bei der Entwicklung destabilisierter arteriosklerotischer Plaques	9
<b>2.</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>11</b>
3.1	Patienteneinschluss, Einteilung der ACI-Stenosen nach den NASCET-Kriterien und Einteilung des Schlaganfallmechanismus	11
3.2	Operatives Vorgehen	13
3.3	Weiterverarbeitung der Operationspräparate und Blutproben	14
3.4	Entparaffinierung und Antigendemaskierung	16
3.5	Verwendete Primärantikörper	17
3.6	Immunhistochemische Färbemethoden	17
3.6.1	Positiv- und Negativkontrollen	17
3.6.2	Immunhistochemie nach der LSAB-Methode zur Detektion humaner Makrophagen und humaner T-Zellen	19
3.6.3	Immunhistochemie nach der UIP-Methode zur Detektion der humanen MMP-9	21
3.7	Bildgenerierung und Analyse der Färbungen	23
3.8	Statistische Analyse der Daten	26
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
4.1	Beschreibung des Patientenkollektivs	27
4.2	Qualitative Beschreibung der Verteilung von Makrophagen-, T-Zellen und MMP-9	30

4.3	Quantitative Beschreibung der Verteilung von Makrophagen, T-Zellen und MMP-9-positiven Regionen	31
4.4	Verteilung der plaquemorphologischen Merkmale Plaqueruptur, Oberflächenthrombus, nekrotischer Lipidkern und Plauehämorrhagien in beiden Gruppen	32
4.5	Vergleich der Häufigkeit von vaskulären Ereignissen und Tod im ersten Jahr nach Operation zwischen beiden Gruppen	34
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>34</b>
5.1	Zur Verteilung der Grundmerkmale in beiden Vergleichsgruppen	34
5.2	Zur Einteilung des Schlaganfallmechanismus	36
5.3	Zur Bewertung der immunhistochemischen und histologischen Methodik	39
5.4	Diskussion der immunhistochemischen und plaquemorphologischen Ergebnisse und deren klinische Interpretation in Hinblick auf die Plauedestabilität	41
5.5	Präinterventioneller Nachweis von Vulnerabilitätsmerkmalen arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen durch moderne Bildgebung und klinischer Ausblick	45
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Schriftenverzeichnis</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>57</b>
8.1	Danksagung	57
8.2	Lebenslauf	58
8.3	Erklärung	59

## 1. Einleitung

Die Prävalenz von Stenosen der Arteria carotis interna (ACI) mit einem Stenosegrad von mehr als 75% in einem unselektionierten Kollektiv beträgt ca. 1% [1]. Mit steigendem Alter nimmt die Häufigkeit der Karotisstenose zu. Bei den über 65 Jährigen haben etwa 5% eine 50-99% Karotisstenose [2]. Mindestens 20% der ischämischen Schlaganfälle werden durch ACI-Stenosen verursacht. Daraus ergibt sich, dass von etwa 200.000 ischämischen Schlaganfällen in Deutschland bis zu 40.000 auf eine Karotisstenose zurückzuführen sind [1].

Somit stellen Stenosen der ACI eine bedeutende Ursache für zerebrale Ischämien dar. In **Abbildung 1** ist eine hochgradige ACI-Stenose dargestellt.



**Abbildung 1:** Kontrastmittelverstärkte MR-Angiografie der supraaortalen Arterien mit Teildarstellung der intrakraniellen Hauptstämme. Der rote Pfeil markiert eine hochgradige Verengung der Arteria carotis interna auf der rechten Seite.

Hochgradige ACI-Stenosen gehen mit einem höchst variablen jährlichen Schlaganfallrisiko einher. Prinzipiell unterscheidet man zwischen symptomatischen und asymptomatischen ACI-Stenosen.

Als symptomatische ACI-Stenosen bezeichnet man unter Berücksichtigung der NASCET-Kriterien (*North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial*) hochgradige Karotisstenosen, die innerhalb der letzten 120 Tage zu einem ischämischen Ereignis im nachgeschalteten Stromgebiet geführt haben [3]. Das Risiko für ein weiteres ischämisches Ereignis bei Patienten mit symptomatischen ACI-Stenosen liegt bei bis zu 32% innerhalb der ersten 12 Wochen nach dem qualifizierenden Event. Patienten mit asymptomatischer ACI-Stenose haben ein deutlich geringeres Risiko für ein ischämisches Ereignis. Das jährliche Risiko aufgrund einer asymptomatischen ACI-Stenose einen ischämischen Schlaganfall zu erleiden wird mit 1-2% angegeben [4-6].

Es erhärten sich zudem die Hinweise, dass das Schlaganfallrisiko von symptomatischen Stenosen bereits innerhalb der ersten Wochen nach qualifizierendem Ereignis sinkt. Dasselbe trifft für den positiven Effekt einer möglichen Thrombendarteriektomie (TEA) zu. Der Operationszeitpunkt ist für die Prognose von entscheidender Bedeutung. Eine Operation, welche später als 14 Tage nach dem letzten Ereignis vorgenommen wird, hat bereits einen verminderten sekundärprophylaktischen Effekt. Bei weiterer Verzögerung einer TEA sinkt deren positiver Effekt auf die Verhinderung weiterer zerebraler Ischämien [7]. Das Risiko aufgrund einer ACI-Stenose einen Schlaganfall zu erleiden hängt von dem Stenosegrad ab. In der Regel steigt das Risiko mit dem Stenosegrad an.

So beträgt die Wahrscheinlichkeit eines ipsilateralen ischämischen Insults bei symptomatischen ACI-Stenosen pro Jahr bei Patienten mit 70-79%igen Stenosen 12,8%, bei Patienten mit 80-89%igen Stenosen 18,5% und bei Patienten mit 90-95%igen Stenosen 35% [3].

Das Risiko für zerebrale Ischämien aufgrund einer ACI-Stenose ist allerdings nicht nur davon abhängig wie hoch der Stenosegrad ist und ob es sich um eine symptomatische Stenose handelt oder nicht, sondern auch von der Plaquemorphologie.

Destabilitätsmerkmale der arteriosklerotischen Plaque ermöglichen eine Einschätzung der Vulnerabilität einer ACI-Stenose und damit des Risikos symptomatisch zu werden. Zu den Plaquedestabilitätsmerkmalen werden gezählt: die Ruptur einer häufig verdünnten fibrösen Kappe, eine wandständiger Thrombusformation, Plauehämorrhagien, ein

erniedrigter Kollagengehalt und die vermehrte Plaqueinfiltration durch Makrophagen und T-Zellen [8-13].

Somit haben die Symptomatik, der Stenosegrad und die Plaquemorphologie eine große Bedeutung für die Beurteilung des mit einer Karotisstenose assoziierten Schlaganfallrisikos und der sich daraus ergebenden therapeutischen Konsequenz.

### **1.1 Unterschiede hinsichtlich ischämischer Schlaganfallmechanismen bei symptomatischen ACI-Stenosen**

Die arterioarterielle Embolie bzw. der embolische Schlaganfallmechanismus stellt bei hochgradigen ACI-Stenosen den häufigsten Grund für einen Schlaganfall dar [14,15] und führt typischerweise zu einem Territorialinfarkt.

Als weiterer Mechanismus, wie eine hochgradige Karotisstenose zu einer zerebralen Ischämie führen kann, wird eine hämodynamische Schlaganfallätiologie angegeben. Deren Anteil an symptomatischen ACI-Stenosen wird mit circa 5% bis 25% beziffert [15-17]. Ein hämodynamischer Schlaganfallmechanismus führt typischerweise zu einem Grenzzonen- oder einem Endstrominfarkt.

Beim arterioarteriellen Schlaganfallmechanismus wird eine Plaqueruptur oder eine Abschwemmung von Plaque- oder Thrombusmaterial von der hochgradigen Stenose als ursächliches Ereignis für die Embolie in das nachgeschaltete Stromgebiet angenommen.

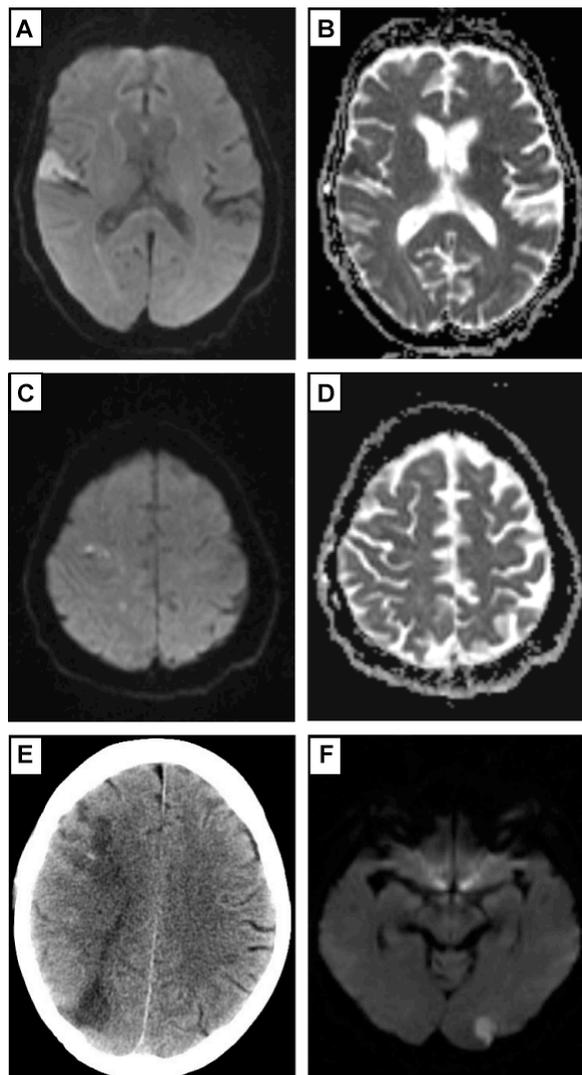
Bei dem embolischen Material handelt es sich meist um Thrombozyten-Fibrinaggregate, Cholesterinkristalle oder Bestandteile der arteriosklerotischen Plaque [18]. Folgen sind ein okkludierender Effekt in der nachgeschalteten Arterie und es entsteht typischerweise ein Territorialinfarkt. Sollte es zu mehreren embolischen Ereignissen gekommen sein, können mehrere Gefäßterritorien im nachgeschalteten Stromgebiet betroffen sein (siehe **Abbildung 2**).

Hämodynamisch bedingte Infarkte werden in Grenzzonen- und Endstrominfarkte unterteilt. Hämodynamisch verursachte Schlaganfälle sind auf die Fernwirkung von Stenosen oder Verschlüssen der ACI zurückzuführen, ohne dass ein embolisches Ereignis vorliegt. Dabei findet sich aufgrund einer eingeschränkten Kollateralisierung eine verminderte Perfusion im betroffenen Stromgebiet. Die Perfusion kann z.B. durch einen systemischen Blutdruckabfall herabgesetzt sein. Durch diesen Mechanismus kann in der Endstrombahn einer langen penetrierten Markarterie, welche keine

kollateralen Gefäße besitzt („letzte Wiese“), ein Endstrominfarkt entstehen. Grenzzoneninfarkte entstehen im Grenzgebiet der Arterie cerebri media (ACM) und Arterie cerebri posterior (ACP) sowie der ACM und der Arterie cerebri anterior (ACA). Im deutschsprachigen Raum wird auch von „Wasserscheideinfarkten“ gesprochen.

In der anglo-amerikanischen Literatur werden hämodynamisch bedingte Infarkte häufig in kortikale und innere Grenzzoneninfarkte (CBI = *cortical borderzone infarct* und IBI = *internal borderzone infarct*) eingeteilt. Dabei wird für den Begriff innere Grenzzoneninfarkte auch das Synonym DWS (DWS = *deep watershed infarction*) verwendet. Zur Vereinheitlichung der Nomenklatur und im Sinne einer verbesserten Übersichtlichkeit wird in der vorliegenden Arbeit von kortikalen und inneren Grenzzoneninfarkten gesprochen.

Die **Abbildung 2** zeigt exemplarisch zerebrale Infarkte, wie sie sich bei embolischen und hämodynamischen Schlaganfallmechanismen finden lassen.



**Abbildung 2 A-F:** Zerebrale Bildgebung mittels MRT (2A-D sowie 2F) und CT (2E). Die Abbildungen 2A und 2C stellen diffusionsgewichtete Sequenzen dar, wobei in 2A ein kortikaler embolisch anmutender MCA-Infarkt rechts mit entsprechender Hypointensität in der ADC-MAP (2B) zur Darstellung kommt. Die Abbildung 2C zeigt multiple kleinste Diffusionsstörungen, die am ehesten einem embolischen Muster im rechten Medialstromgebiet entsprechen. Die Auffälligkeiten betreffen nicht klar die innere Grenzzone und zeigen in der ADC-MAP eine Signalabsenkung (2D). Die Abbildung 2E stellt eine Computertomografie mit kortikalem, bereits deutlich demarkierten, Grenzzoneninfarkt zwischen linken MCA- und ACA- sowie linken MCA- und PCA-Stromgebiet dar. Abbildung 2F zeigt eine Diffusionsstörung in der linken kortikalen Grenzzone zwischen MCA und PCA als Hinweis auf einen hämodynamischen Schlaganfallmechanismus.

## **1.2 Die Bedeutung von Makrophagen, T-Zellen und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bei der Entwicklung destabilisierter arteriosklerotischer Plaques**

Unter physiologischen Bedingungen ist die Endothelschicht der Arterienwand weitgehend resistent gegenüber der Adhäsion von Leukozyten. Wenn sie allerdings durch arteriellen Hypertonus, Insulinresistenz, Rauchen, Adipositas oder entzündliche Vorgänge stimuliert wird, kommt es zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), welche gezielt verschiedene Klassen von Leukozyten rekrutieren [19].

Eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Progredienz arteriosklerotischer Wandveränderungen spielen Makrophagen. Die im Blut zirkulierenden Monozyten binden über Adhäsionsmoleküle an funktionsgestörte Endothelzellen. Mithilfe von Lockstoffen wie z.B. *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) wandern die Monozyten in die subintimale Region. Im anschließenden Differenzierungsprozess wandeln sich die Monozyten in Gewebsmakrophagen um, wobei sie vermehrt proinflammatorische Mediatoren freisetzen. Dabei fördert der durch das Endothel synthetisierte *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) die Differenzierung und Proliferation der Makrophagen [20]. Zusätzlich spielt hierbei die Aufnahme von oxidierten *low density lipoproteins* (oxLDL) mittels *macrophage scavenger receptors* (MSR) eine wichtige Rolle. Dies führt dazu, dass sich Makrophagen in Schaumzellen umwandeln. Schaumzellen sind in der Lage weitere inflammatorische Zytokine freizusetzen, wodurch eine anhaltende Gefäßwandinfiltration durch Entzündungszellen ermöglicht wird. Zudem können Schaumzellen Matrixmetalloproteinasen (MMPs), tissue factor (TF) und Sauerstoffradikale freisetzen [21]. Die überwiegend von Makrophagen produzierten MMPs bauen als Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) und als Kollagenasen

(MMP-1, MMP-8 und MMP-13) extrazelluläre Bestandteile des Bindegewebes ab [9]. Somit besitzen MMPs eine gewebsmodulierende Funktion. Innerhalb einer arteriosklerotischen Plaque kann eine durch MMPs bedingte Proteolyse zu einer Verdünnung und Schwächung der schützenden fibrösen Kappe führen, besonders dann wenn eine verminderte Bildung von extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen vorliegt [22,23]. Der Abbau extrazellulärer Bindegewebsbestandteile kann die Entwicklung einer Plaqueruptur fördern. MMP-9 bauen Gelatine, Kollagen Typ IV und Kollagen Typ V ab. Insbesondere MMP-9 spielt aufgrund ihrer Substratspezifität eine besondere Rolle in arteriosklerotischen Umbauprozessen. Es konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Expression von MMP-9 zur Instabilität von ACI-Stenosen beiträgt [13,24-26]. In einer Studie von Loftus et al. konnte belegt werden, dass die Konzentration von biologisch aktiver MMP-9 in der Gefäßwand von symptomatischen ACI-Stenosen bis zu 4 Wochen nach einer transienten ischämischen Attacke (TIA) deutlich erhöht im Vergleich zu asymptomatischen und älteren symptomatischen ACI-Stenosen war [26]. Für die Überexpression von MMP-9, im Vergleich zu ihrem wichtigsten Gegenspieler, dem *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1* (TIMP-1), wurde eine erhöhte Assoziation zu Einblutungen und Rupturen in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen [27,28].

Als Ursache für die Synthese von MMPs wird ein Kontakt zwischen den CD40-Liganden von T-Zellen und den CD40-Rezeptoren der Makrophagen angenommen [29]. Makrophagen gelten zudem auch als wichtiger Produzent von TF [30]. TF kann durch Bindung an den aktivierten Faktor VII die Bildung lokaler Thromben induzieren [31]. Aus dem o.g. kann man schlussfolgern, dass eine zunehmende Makrophageninfiltration die Aufrechterhaltung des proinflammatorischen Milieus unterstützt und zu einer Progression der Plaqueinstabilität führen kann.

T-Zellen werden durch Interaktion ihrer oberflächlichen *chemokine receptors* (CXCR3) mit verschiedenen Zytokinen in die Gefäßwand rekrutiert. In der Gefäßwand werden sie wahrscheinlich durch den Kontakt mit Antigenen wie z.B. oxLDL und *heat-shock proteins* (HSPs) stimuliert. Durch die Antigen-Stimulation werden T-Zellen zur Sekretion einer Vielzahl von Zytokinen angeregt. Man kann T-Zellen in proinflammatorische (TH1) und antiinflammatorische (TH2) T-Zellen anhand der produzierten Zytokine unterteilen. Der proinflammatorische Zelltyp zeigt sich vermehrt in arteriosklerotischen Läsionen [21,32].

Innerhalb der arteriosklerotischen Plaque produzieren TH1-Zellen proinflammatorische Zytokine und Chemokine, welche die Progression der Arteriosklerose fördern, indem sie zusätzliche Entzündungszellen zur Infiltration anregen. Sie vermindern zudem die Bildung von extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen, hemmen deren Proliferation und fördern die Synthese von MMPs durch die Makrophagen, welche die Plaquestabilität mindern [33].

Zusammenfassend besteht aufgrund einer zunehmenden Infiltration und Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen sowie einer erhöhten Expression von matrixabbauenden Enzymen (wie z.B. MMP-9) in einer arteriosklerotischen Läsion ein erhöhtes Risiko für die Progredienz der Destabilisierung der Plaque.

## **2. Fragestellung der Arbeit**

Aus der vorangegangenen Darstellung ergibt sich für die vorliegende Arbeit unmittelbar folgende Fragestellung:

- 1) Besteht in Hinblick auf etablierte Merkmale einer instabilen Plaque ein Unterschied zwischen symptomatischen ACI-Stenosen in Bezug auf den zugrundeliegenden embolischen bzw. hämodynamischen Schlaganfallmechanismus?

## **3. Methodik**

### **3.1 Patienteneinschluss, Einteilung der ACI-Stenosen nach den NASCET-Kriterien und Einteilung des Schlaganfallmechanismus**

Im Zeitraum von April 2006 bis Oktober 2008 wurden 33 konsekutive Patienten mit hochgradiger symptomatischer Stenose der ACI und Indikation zur TEA eingeschlossen. Die Einteilung der ACI-Stenosen erfolgte unter Berücksichtigung der Kriterien des *North American Symptomatic Endarterectomy Trial* (NASCET) [3], wobei der Stenosegrad dem Durchmesser am Stenosemaximum in Relation zum Durchmesser der normalen ACI distal der Stenose entspricht.

Eine symptomatische ACI-Stenose wurde über einen hochgradigen Stenosegrad von  $\geq 70\%$  und zusätzlich aufgetretener TIA oder manifesten ischämischen Schlaganfall im ipsilateralen Stromgebiet in einem Zeitraum von bis zu 120 Tagen vor der TEA definiert.

Ein manifester Schlaganfall wurde als fokal-neurologisches Defizit definiert, welches länger als 24 Stunden angehalten hat. Eine TIA wurde charakterisiert durch eine monokulare Blindheit oder ein fokales neurologisches Defizit mit vollständiger Rückbildung innerhalb von 24 Stunden nach Beginn der Symptomatik. Sofern in der zerebralen Bildgebung ein zur klinischen Symptomatik passendes ischämisches Korrelat identifiziert wurde, postulierten wir einen manifesten Schlaganfall.

Alle Patienten befanden sich in der Klinik für Neurologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin vom Campus Mitte in Behandlung. Die Zustimmung der lokalen Ethikkommission zur Durchführung der Studie lag vor Einschluss des ersten Patienten vor. Die Studienteilnahme wurde durch eine schriftliche Einwilligungserklärung bestätigt.

Folgende Ausschlusskriterien wurden beachtet:

1. Patient ist nicht in der Lage, wirksam sein Einverständnis zu geben
2. Schwangere und Stillende
3. Patienten, die aktuell oder innerhalb der letzten 30 Tage an einer Studie teilnehmen beziehungsweise teilnahmen
4. Anhalt für akute Infektion
5. ACI-Restenose oder primär nicht arteriosklerotische ACI-Stenose (wie z.B. strahleninduzierte ACI-Stenosen oder ACI-Stenosen aufgrund einer fibromuskulären Dysplasie)
6. Präoperative Evaluation des zugrunde liegenden Schlaganfallmechanismus (embolisch oder hämodynamisch) konnte nicht ausreichend geklärt werden
7. Konkurrierende Schlaganfallätiologie (z.B. kardiale Embolie bei VHF) wahrscheinlich.

Insgesamt konnten 33 konsekutive Patienten in der Studie erfasst werden. Kein Patient erfüllte ein Ausschlusskriterium. Von allen Patienten wurde präoperativ eine ausführliche Anamnese erhoben und die aktuelle Medikation aufgezeichnet. Zudem erfolgte eine engmaschige Überwachung und Dokumentation der klinischen Symptomatik sowie ein Blutdruckmonitoring durch den behandelnden Neurologen.

Die Beurteilung des Schlaganfallmechanismus erfolgte unabhängig von der späteren histologischen Aufarbeitung durch Dr. med. Hagen Kunte (Klinik für Neurologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin).

Für einen hämodynamisch induzierten Infarkt musste mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt sein:

1. Neuer korrespondierender ipsilateraler Endstrom- oder Grenzzoneninfarkt in der Computertomografie (CT) oder in der Magnetresonanztomografie (MRT) ohne zusätzliche Hinweise für einen embolisch bedingten Schlaganfall

2. Zeitlicher Zusammenhang der neurologischen Symptomatik mit einer gleichzeitig dokumentierten Episode einer arteriellen Hypotension.

Ein embolischer Schlaganfallmechanismus bei zugrunde liegender symptomatischer ACI-Stenose wurde definiert, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt war:

1. In der zerebralen Bildgebung Nachweis eines intrakraniellen intraarteriellen Thrombus im ipsilateralen nachgeschalteten Stromgebiet einer ACI-Stenose

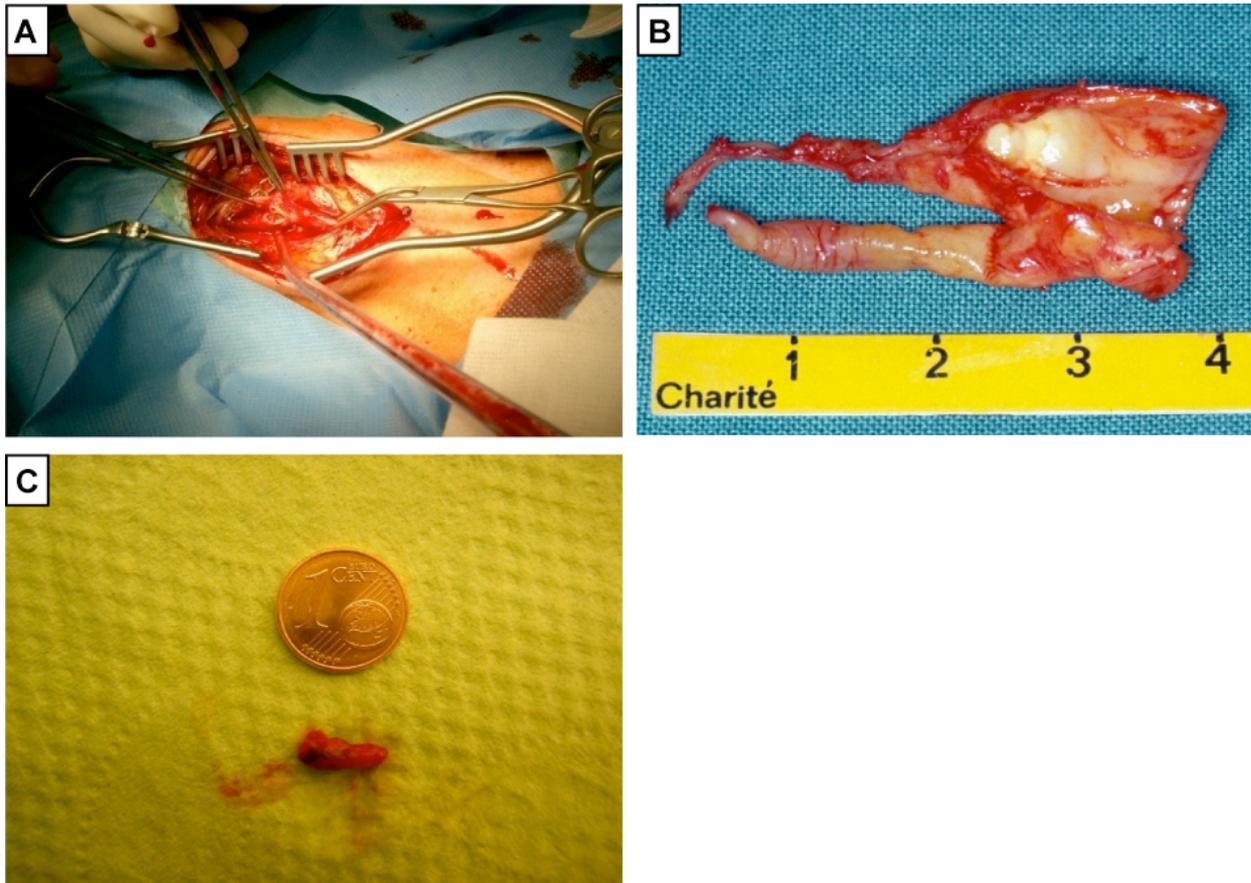
2. Nachweis von multiplen ischämischen Arealen im ipsilateralen nachgeschalteten Stromgebiet, die nicht mit einer hämodynamischen Genese vereinbar waren

3. Ein Schlaganfall oder eine TIA mit klinisch-tomografischem Bezug auf eine einzelne Arterie im ipsilateralen nachgeschalteten Stromgebiet ohne zusätzliche Hinweise für einen hämodynamischen Schlaganfallmechanismus.

Zur Bestimmung des Schlaganfallmechanismus wurde eine zerebrale Bildgebung mittels CT (64 Zeilen Toshiba mit 4 mm Schichtung supratentoriell und 2 mm infratentoriell) genutzt. Wenn die CT-Bildgebung nicht ausreichend war und Restzweifel am Schlaganfallmechanismus bestanden, wurde zusätzlich eine MRT-Untersuchung [(Siemens Avanto 1,5 Tesla Lokalisationssequenzen: PD (axial), T1 (axial), T2 (axial), DWI- EPI (axial), FLAIR (sagittal)] durchgeführt.

### **3.2 Operatives Vorgehen**

Alle Operationen wurden nach dem Verfahren der konventionellen TEA durchgeführt. Bei der konventionellen TEA erfolgt die Inzision im Bereich der Arteria carotis communis und setzt sich über die Bifurkation in die ACI fort. Der im weiteren Verlauf ausgeschälte Plaquezylinder enthält dabei die stenosierende arteriosklerotische Plaque. In der Regel ist es möglich, ein einzelnes zusammenhängendes Operationspräparat zu gewinnen. Bei begleitender Stenosierung der Arteria carotis externa (ACE) wird aus operationstechnischen Gründen diese operativ mitversorgt (siehe **Abbildungen 3**). Anschließend erfolgte die Rekonstruktion der Gefäßstrombahn durch entweder eine Direktnaht oder mithilfe einer Patch-Plastik.



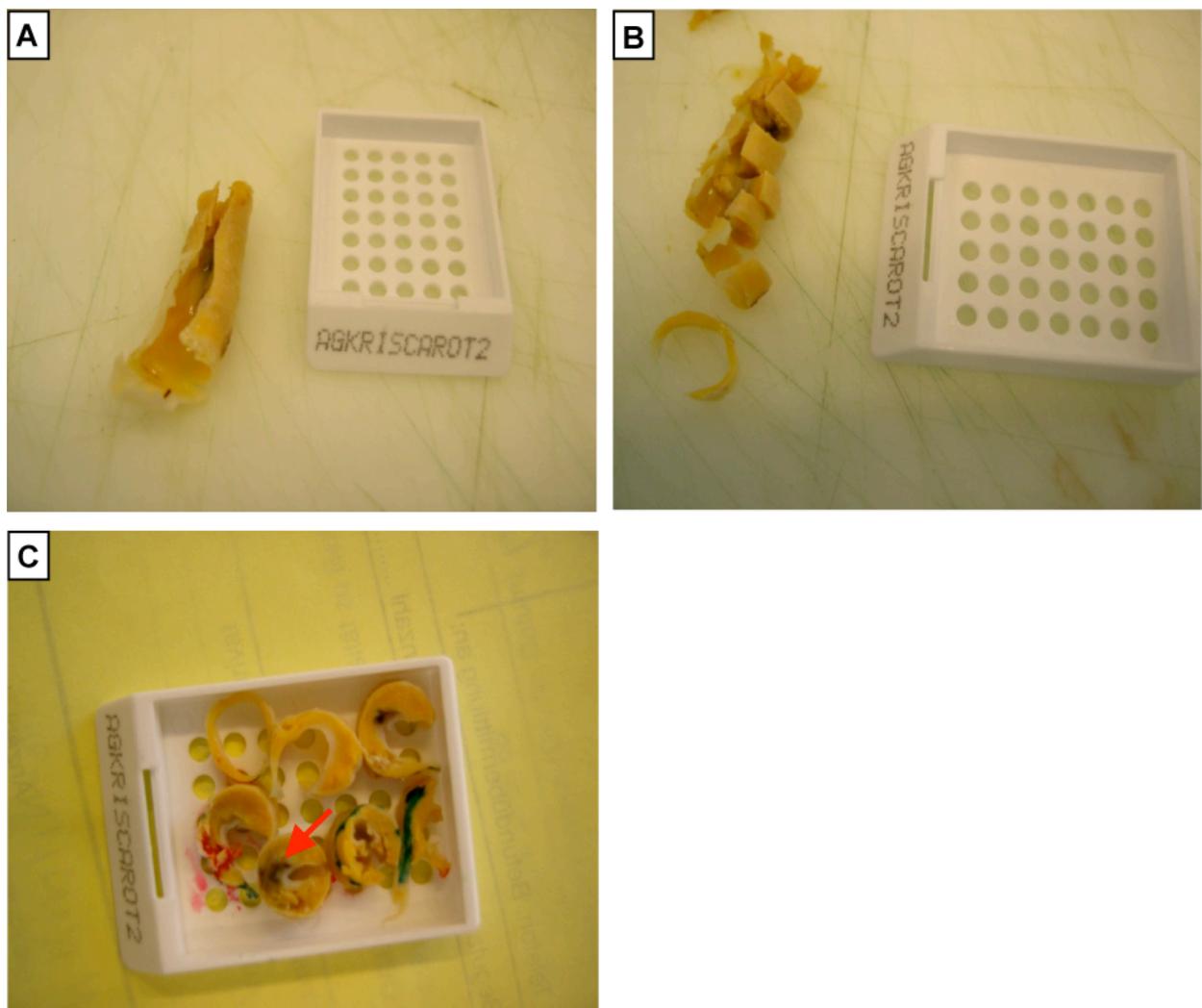
**Abbildung 3A-C:** *Abbildung 3A stellt eine eröffnete ACI auf Höhe der Bifurkation bei konventionellem Vorgehen dar. Abbildung 3B zeigt ein Operationspräparat bei langstreckiger kombinierter Stenosierung der ICA und der ACE. Abbildung 3C zeigt einen isoliert resezierten Thrombus der ICA, der vorab zu einer hochgradigen symptomatischen ACI-Stenose führte.*

### 3.3 Weiterverarbeitung der Operationspräparate und Blutproben

Am Operationstag wurden bei den nüchternen Patienten unmittelbar vor der Narkoseeinleitung Blutproben zur Bestimmung des kardiovaskulären Risikoprofils sowie zum Ausschluss eines begleitenden Infektes abgenommen. Im Routinelabor des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité-Universitätsmedizin Berlin wurden folgende Parameter bestimmt: Gesamtcholesterin, Triglyceride, *low density lipoprotein* (LDL), *high density lipoprotein* (HDL), HbA1c (glykosyliertes Hämoglobin 1<sub>c</sub>) und CRP (C-reaktives Protein).

Die entnommenen Plaquezylinder wurden direkt nach ihrer Entfernung mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um oberflächliche Blutbestandteile zu entfernen. Es folgte eine Fixation für 24 Stunden in 4,5% gepuffertem Formaldehyd. Als

Nächstes wurden die Präparate für 1 bis 7 Tage, je nach makroskopischer Kalzifizierung, in 0.5 mol/l Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung entkalkt. Hierdurch wurde die weitere Präparatverarbeitung erleichtert und das Auftreten von Schnittartefakten vor Übertragung auf die Objektträger gemindert. Über den gesamten Längsverlauf des Operationspräparates wurden 3 mm dicke Querschnitte angefertigt. Diese wurden in einen einzelnen Paraffinblock pro Patient gebettet. Dies führte dazu, dass mit einem Median von 6 Querschnittssegmenten (IQR = Zwischenquartilreichweite von 5-8) pro Patient repräsentative Arterienabschnitte über den Längsverlauf in die Untersuchung eingingen.



**Abbildung 4A-C:** Die Abbildungen 4A-C zeigen einzelne Weiterverarbeitungsschritte des Operationspräparates. Das Präparat ist in diesem Zustand schon durch Formalin fixiert und durch EDTA entkalkt. In Abbildung 4A sieht man ein TEA-Präparat einer hochgradigen ACI-Stenose. Das Präparat enthält die stenosierende arteriosklerotische Plaque. In Abbildung 4B sieht man die abgeschlossene

*Proportionierung über den Längsverlauf der ACI-Stenose. Abbildung 4C zeigt die durch Proportionierung entstandenen Gefäßquerschnitte in einem Gefäß für die spätere Paraffineinbettung. Bereits makroskopisch erkennt man eine Plauehämorrhagie in einem der Gefäßabschnitte (roter Pfeil Abbildung 4C). Weiterhin erkennt man farbliche Markierungen (rot und grün) an der Außenseite der Gefäßquerschnitte. Diese dienen während der weiteren Verarbeitung der Identifizierung der ursprünglichen Position des Gefäßquerschnitts im Längsverlauf.*

Das Eingangslabor des Instituts für Pathologie der Charité Campus Mitte übernahm die Einbettung der Paraffinblöcke. Mithilfe eines Mikrotoms wurden von den Paraffinblöcken circa 3 µm dünne Schnitte angefertigt. Zur Glättung wurden diese kurz in lauwarmes Wasser gelegt und auf spezielle Objektträger fixiert. Nachdem eine entsprechende Anzahl von so genannten Leerschnitten für die 33 Patienten angefertigt wurde, konnte der eigentliche Färbeprozess beginnen.

Um den Einfluss etwaiger Qualitätsschwankungen der angewendeten Reagenzien und wechselnde äußere Einflussfaktoren zu mindern sowie aus praktischen Gründen wurden bis zu 20 Schnitte gleichzeitig gefärbt.

### **3.4 Entparaffinierung und Antigendemaskierung**

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst durch ein Bad in Xylol für dreimal 10 Minuten deparaffiniert. Hierdurch wurde das Einbettmedium entfernt. Dies ist der erste Schritt zur Freilegung der zu detektierenden Antigene. Außerdem wird das Entstehen unspezifischer Hintergrundfärbungen verringert [34]. Danach folgte die Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropylalkohol: 100%, 95% und 80%). Im Anschluss wurden die mit den Schnitten belegten Objektträger in destilliertem Wasser und einer Tris-gepufferten Salzlösung (TBS) zwischengelagert. Nun erfolgte eine Epitopdemaskierung, da eine verminderte Immunreaktivität des Gewebes durch die formalininduzierte Bildung von chemischen Quervernetzungen vorlag.

Durch druckkontrolliertes Kochen in einem Dampfdrucktopf in 0,01 mol/l Zitratpuffer für 5 Minuten wurde eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung nach Cattoretti et al. durchgeführt [35]. Die Schnitte wurden nach dem Kochvorgang durch Zugabe von Leitungswasser langsam wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt und in TBS für den nächsten Schritt gelagert. Durch das Umranden der Proben mit einem hydrophoben Markierstift (PAP Pen®) wurde das Gewebematerial vor dem Auslaufen der

Reagenzien bewahrt. Um während der folgenden Schritte ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden, erfolgte die Weiterbehandlung in einer feuchten Kammer.

### 3.5 Verwendete Primärantikörper

Bei den genutzten Primärantikörpern handelte es sich um Immunglobuline (Ig) der G-Klasse, die spezifisch gegen ein bestimmtes Merkmal humaner Antigene gerichtet sind (siehe **Tabelle 1**).

**Tabelle 1:** Tabellarische Darstellung der verwendeten Primärantikörper mit entsprechendem Klon, Produzent und angewandter Verdünnung bzw. Konzentration

Antikörper	Klon	Hersteller	Verdünnung
anti-human-CD68	KP1	DAKO	1:75
anti-human-MMP-9	15W2	Novocastra	1:25
anti-human-CD3	A0452	DAKO	1:300

### 3.6 Immunhistochemische Färbemethoden

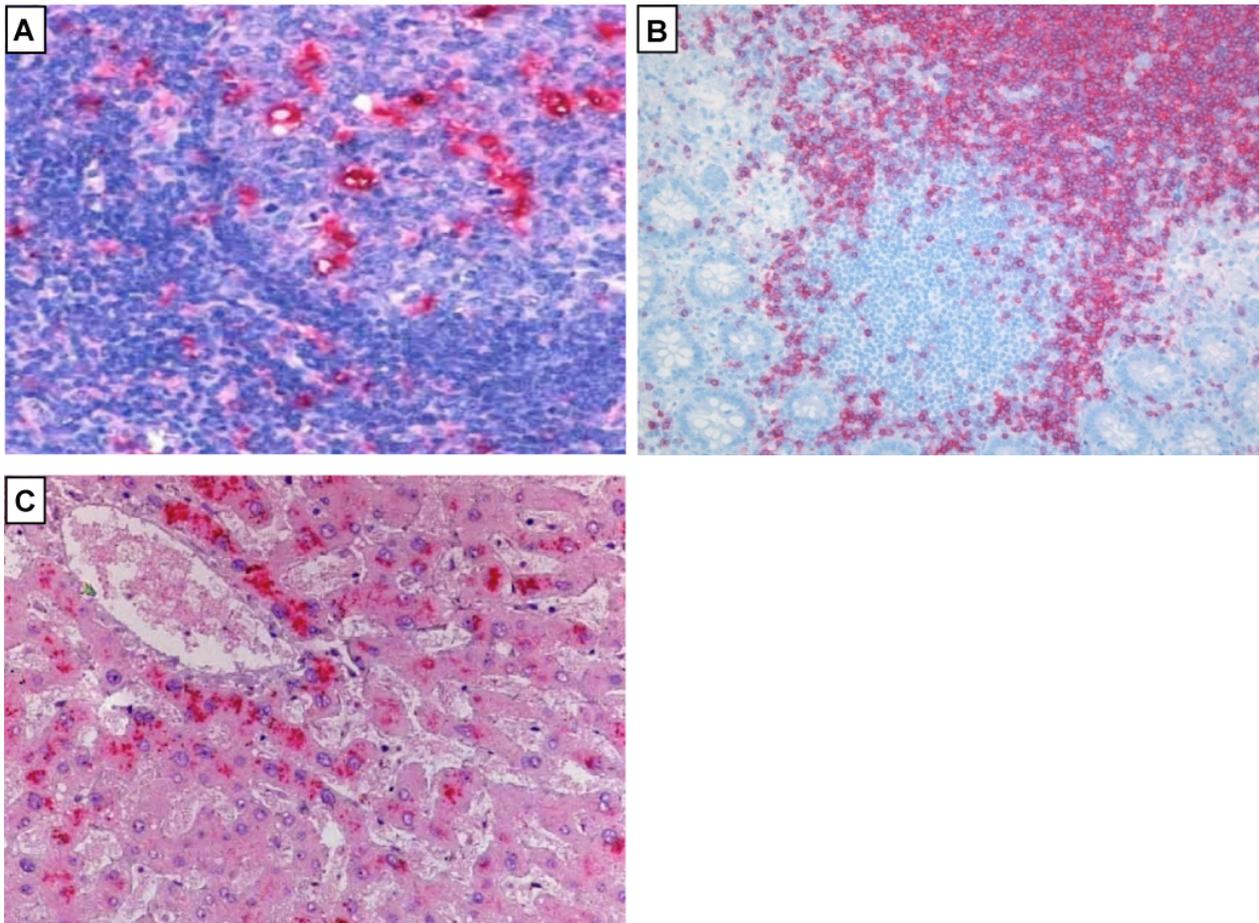
Die immunhistochemische Färbung dient der Sichtbarmachung von antigenen Bindungsstellen (Epitopen). Die vorliegende Arbeit nutzte zwei verschiedene Methoden. Für die CD68- und die CD3-Färbung (zum Nachweis von Makrophagen bzw. T-Zellen) wurde die in **Punkt 3.6.2** erklärte LSAB (*labelled streptavidin-biotin*)-Methode und für die MMP-9 Färbung die in **Punkt 3.6.3** dargestellte UIP (*universal immuno-enzyme polymer*)-Methode angewandt.

#### 3.6.1 Positiv- und Negativkontrollen

Um die Qualität der Färbungen und die Spezifität der Antikörper zu überprüfen, wurden Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Die Kontrollen werden dabei genau wie die eigentlichen Proben behandelt, wobei im Fall der Negativkontrolle kein spezifischer Primär-Antikörper eingesetzt wird. Als Positivkontrolle wurden Gewebeproben

verwendet, von denen sicher bekannt ist, dass sie die zu detektierenden Antigene aufweisen. Zur Detektion von CD68 (Makrophagen) wurde eine Tonsillenstanziopsie, für CD3 (T-Zellen) eine Appendixbiopsie und für MMP-9 die Gewebeprobe einer Leberbiopsie verwendet (siehe **Abbildung 5**). Eine Negativkontrolle inkludiert eine Spezifitätskontrolle der Immunreaktion durch Weglassen eines unverzichtbaren Reaktionsschrittes. Hierfür wurde eine Gewebeprobe, die sicher positiv z.B. für CD68 ist, mit lediglich dem Verdünnungsmedium ohne Primär-Antikörper inkubiert. Eine Positiv-Kontrolle muss ein Farbstoffpräzipitat der zu erwartenden Lokalisation zeigen. Eine Negativ-Kontrolle darf nach der Färbung keine präzipitierten Farbstoffkomplexe aufweisen. Sollte eine Negativ-Kontrolle dennoch eine Färbung aufweisen, ist diese unspezifisch und das Färbeprotokoll muss geändert werden.

Über die gesamte Färbeprozedur liefen stets Positiv- und Negativ-Kontrollen parallel zu den Patientenproben mit, ohne dass es zu relevanten Auffälligkeiten kam.



**Abbildung 5A-C:** Die Abbildungen 5A-C zeigen exemplarisch Positivkontrollen zur Detektion von Makrophagen (5A, Tonsillenstanzbiopsie), T-Zellen (5B, Appendix) und MMP-9 (4C, Leberstanzbiopsie). Mit kräftigem Rot markieren die Farbstoffpräzipitate die nachzuweisenden Strukturmerkmale der Entzündungszellen bzw. der Protease MMP-9. 5A und 5C im Original 100fach vergrößert. Abbildung 5B im Original 50fach vergrößert.

### **3.6.2 Immunhistochemie nach der LSAB-Methode zur Detektion humaner Makrophagen und humaner T-Zellen**

Zum Nachweis von Makrophagen und T-Zellen wurde die LSAB-Methode angewandt. Eine schematische Darstellung dieser Methode zeigt **Abbildung 7**.

Um unspezifische Bindungen des Primär-Antikörpers zu minimieren, wurde die Gewebeprobe für den Nachweis von CD68 zunächst mit einer Proteinblockierungslösung für 10 Minuten behandelt. Die Blockierungsproteine verhindern unspezifische Ionenbindungen zwischen Primär-Antikörper und Gewebe durch Abschirmung stark geladener Bestandteile des Bindegewebes [34]. Bei der in dieser Methodik verwendeten Proteinblockierungslösung handelte es sich um eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), welche 0,25% Kasein, 15 mM Natriumazid und ein Trägerprotein enthielt.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 100 µl Primärantikörperlösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Bei der LSAB-Methode markiert ein spezifischer, ungekoppelter Primärantikörper das gesuchte Epitop. Für z.B. humane Makrophagen das Epitop CD68. Die Konzentration des Primärantikörpers anti-human-CD68 im Verdünnungsmedium betrug stets 1:75.

Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die mit dem Primär-Antikörper inkubierten Schnitte zunächst mit Leitungswasser, dann mit TBS-Tween (TBS mit 0,1% Polysorbat 20) und schließlich mit TBS gespült.

Nun wurde ein zweiter, biotinmarkierter (biotinylierter) Sekundärantikörper aufgetragen, welcher von der Ziege stammt und gegen die Immunglobulinfraktion des benutzten Primär-Antikörpers gerichtet ist.

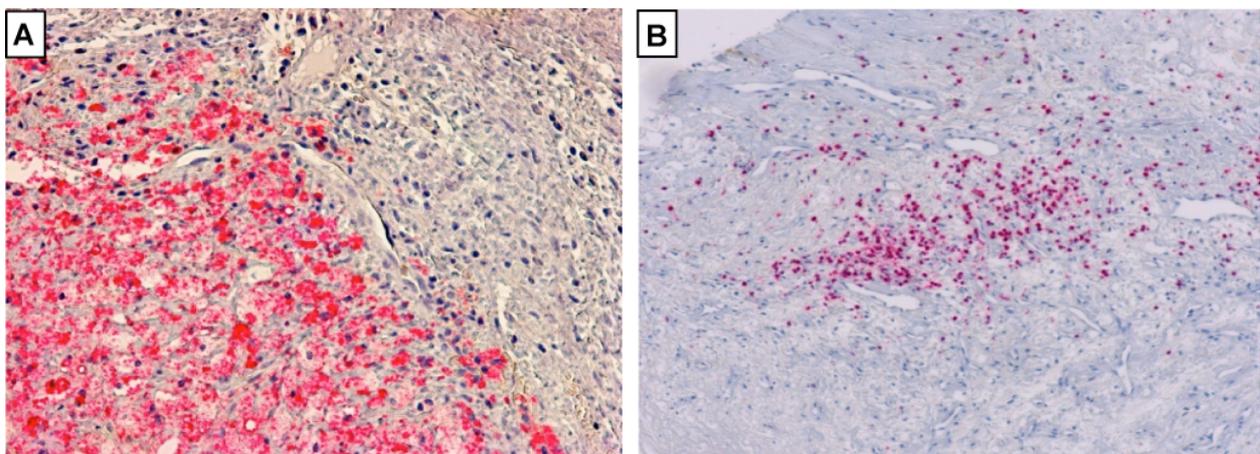
Hierzu erfolgte die Zugabe von 100 µl Link-Reagenz des LSAB®2Kits und eine Inkubation mit dieser für 20 Minuten. Nach gründlicher Spülung mit TBS schloss sich die Beschichtung der Objektträger mit je 100 µl Label-Reagenz des LSAB®2Kits für 20 Minuten an. Durch diesen Schritt wird alkalische Phosphatase (AP) hinzugegeben,

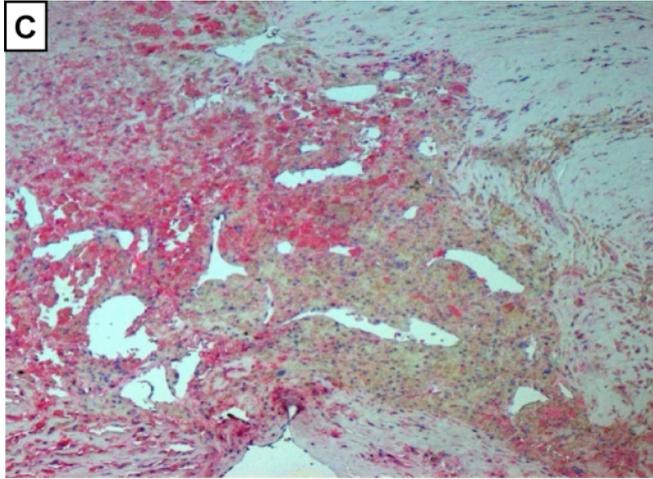
welche an das Protein Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) gekoppelt ist. Streptavidin weist eine hohe Affinität zu den Biotinmolekülen der Sekundär-Antikörper auf und koppelt so an den Sekundär-Antikörper und platziert dort das Enzym AP [34].

Es folgte eine erneute Spülung der Objektträger mit TBS. Nun folgte die Chromogenreaktion durch Zugabe von Substrat/Chromogen-Lösung. Dabei spaltet die AP das Substrat (Naphtholphosphatester) hydrolytisch in Phenolverbindungen und Phosphate. Die Phenole reagieren mit Chromogen (farblose Diazoniumsalze) und es entsteht ein roter Azofarbstoff am Reaktionsort.

Diese Reaktion wurde bei der Makrophagenfärbung durch die Zugabe von TBS nach 3,5 Minuten gestoppt und es erfolgte eine Lagerung in destilliertem Wasser. Nun folgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 90 Sekunden. Hämalaun färbt das Chromatin der Zellkerne blau, wodurch diese optisch hervortreten. Die Unterbrechung der Färbung erfolgte durch Spülung mit Leitungswasser und nachfolgende Lagerung für 10 Minuten in demselben. Abschließend erfolgte die Versiegelung der Schnitte mithilfe eines wasserlöslichen Eindeckmediums (Aquatex-Kleber) und Deckgläschen.

Das Vorgehen für den Nachweis von CD3 (T-Zellen) entsprach den Vorgehensschritten bei der CD68 Detektion. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:300 angewendet. Für die immunhistochemische Färbung wurde der Discovery XT Autostainer (Ventana, Tucson, USA) unter Standardbedingungen genutzt. Beispiele für den positiven Nachweis von Makrophagen und T-Zellen innerhalb arteriosklerotischer Plaques zeigen die **Abbildungen 6A** und **6B**.





**Abbildung 6A-C:** Die Abbildungen 6A zeigt eine durch roten Farbstoff markierte ausgedehnte Makrophageninfiltration. Aufgrund der hohen Zelldichte und der unterschiedlichen Zellgröße imponieren die Infiltrate als Konglomerat. Eine individuelle Zellzählung war daher nicht möglich. Abbildung 6B zeigte mehrere T-Zellen innerhalb eines TEA-Präparates. Aufgrund der lichterem Verteilung wird eine individuelle Zellzählung möglich. In Abbildung 6B werden über 100 T-Zellen sichtbar. Abbildung 6C zeigt eine konfluierende Ansammlung der MMP-9. 6A-6C im Original 50fach vergrößert.

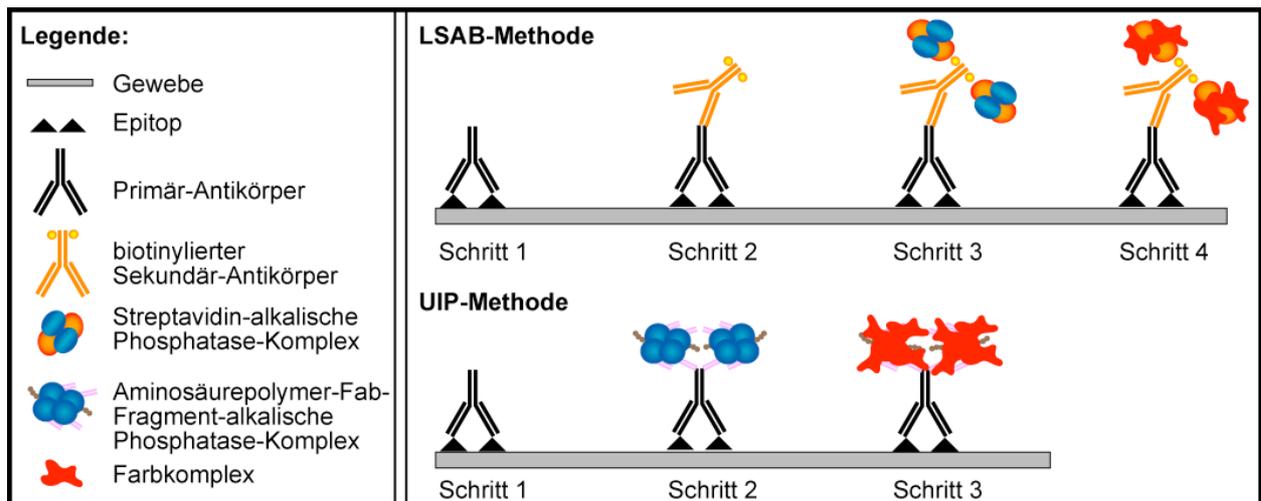
### 3.6.3 Immunhistochemie nach der UIP-Methode zur Detektion der humanen MMP-9

Zur Detektion von MMP-9 kam das Färbesystem Histofine Simple Stain AP Multi® zum Einsatz (schematische Darstellung **Abbildung 7**). Bei dieser Färbemethode wird ein spezifischer, ungekoppelter, monoklonaler Primär-Antikörper der Maus verwendet. Dieser markiert ein Epitop der human MMP-9. Die Vorbehandlung der Gewebeproben erfolgte vorab, wie in **Punkt 3.3** und **3.4** beschrieben. Bei dieser Färbung konnte der Schritt der Proteinblockierung aufgrund der Eigenschaften der Histofine®-Methode eingespart werden. Die vorbehandelten Proben wurden mit 100 µl Primärantikörperdiluent (Verdünnung 1:25) gegen humane MMP-9 für 60 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Objektträger mit Leitungswasser, dann mit TBS-Tween und schließlich mit TBS gespült.

Als nächster Schritt wurde das Reagenz Histofine® Simple Stain AP (MULTI) hinzugegeben. Hierbei handelt es sich um ein Aminosäurepolymer, an welches die Fab-Fragmente eines Sekundär-Antikörpers und AP gekoppelt sind. Das Fab-Fragment bindet spezifisch an den Primär-Antikörper, während die AP für den anschließenden

Umsatz der Substrat-Chromogen-Lösung dient. Nach 30 Minuten Inkubation wurde gründliche mit TBS gespült.

Wie bei der LSAB-Methode in **Abschnitt 3.6.2** beschrieben, folgte die Chromogenreaktion, Gegenfärbung und Eindeckung. Als einziger Unterschied ist festzuhalten, dass die Chromogenreaktion zum Nachweis der humanen MMP-9 15 Minuten andauerte. Ein Beispiel für den positiven Nachweis der MMP-9 innerhalb einer arteriosklerotischen Plaque zeigt die **Abbildungen 6C**.



**Abbildung 7:** Schematische Kurzdarstellung der LSAB- und UIP-Methode zum immunhistochemischen Nachweis von Epitopen.

*LSAB-Methode (angewandt zum Nachweis von Makrophagen und T-Zellen):*

*Schritt 1: spezifischer Primär-Ak. bindet an Epitop*

*Schritt 2: biotinylierter Sekundär-Ak. bindet spezifisch an Primär-Ak.*

*Schritt 3: Streptavidin-alkalische Phosphatase-Komplex bindet an den Sekundär-Ak. über die daran gekoppelten Biotinmoleküle*

*Schritt 4: AP setzt zugegebene Substrat/Chromogen-Lösung um, wodurch Farbstoffpräzipitate am Reaktionsort ausfallen*

*UIP-Methode (angewandt zum Nachweis von MMP-9):*

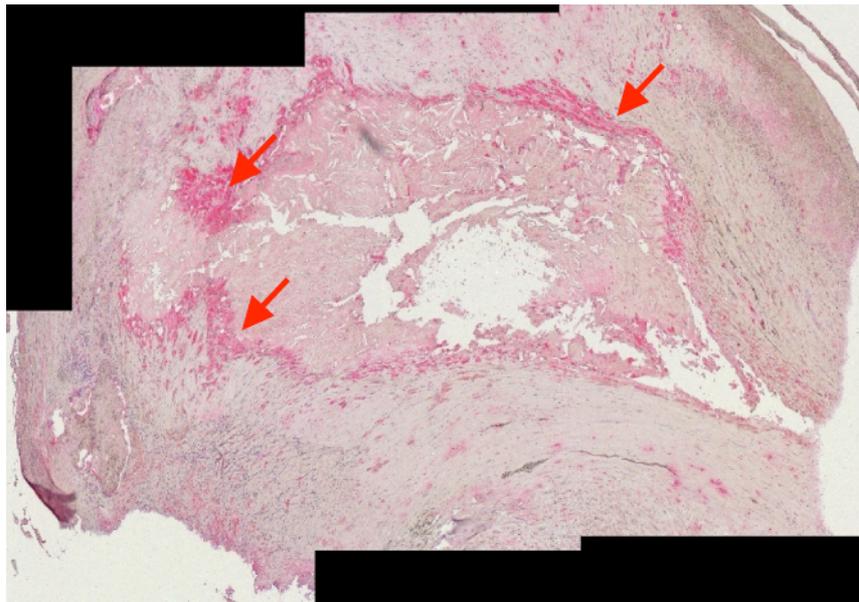
*Schritt 1: spezifischer Primär-Ak. bindet an Epitop*

*Schritt 2: Aminosäurepolymer-Fab-Fragment- AP-Komplex bindet aufgrund der Spezifität des Fab-Fragments zur Immunglobulinfraktion des Primär-Ak.*

*Schritt 3: AP des Aminosäurepolymer-Fab-Fragment-AP-Komplexes setzt das zugegebene Substrat/Chromogen-Lösung um, wodurch Farbstoffpräzipitate am Reaktionsort ausfallen*

### 3.7 Bildgenerierung und Analyse der Färbung

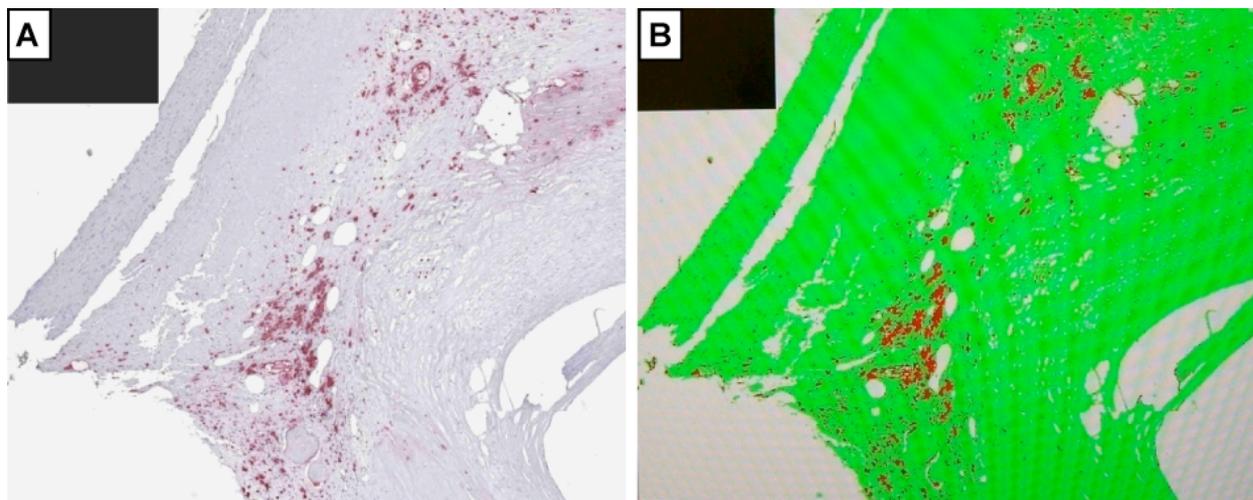
Zur Digitalisierung der gefärbten Schnittpräparate kamen das motorisierte Axioplan 2 Mikroskop-System® in Kombination mit einer Axiocam Digitalkamera® und die Software Axiovision 4.2® zum Einsatz. Bei mindestens 50facher optischer Vergrößerung wurden durch die pixelgenaue Bildfusion von Einzelbildern mithilfe der sogenannten Stitching-Technik des Software-Moduls Panorama® hochaufgelöste Übersichtsbilder angefertigt. Durch diese Übersichtsaufnahmen konnten auch sehr kleine strukturelle Merkmale und Farbstoffpräzipitate analysiert werden. Die durchschnittliche Anzahl von Einzelbildern pro Gefäßquerschnitt belief sich auf circa 40. Somit wurden bei einer Anzahl von 6 Gefäßquerschnitten pro Patient circa 240 Einzelbilder mit 50facher Vergrößerung pro Präparat aufgenommen. **Abbildung 8** zeigt ein Übersichtsbild während der Bildgenerierung.



**Abbildung 8:** Die Abbildungen zeigt ein im Original 50fach mikroskopisch vergrößertes Bild eines Operationspräparates. Diese ist zum Nachweis von Makrophagen rot gefärbt (makrophagenreiche Regionen sind mit einem roten Pfeil markiert). Das Bild wurde mithilfe der pixelgenauen Bildfusion von Einzelbildern durch die Stitching-Technik des Software-Moduls Panorama® angefertigt. Dabei wurden softwaregesteuert einzelne Regionen des Präparates angesteuert und anschließend die Bilder fusioniert. Damit entsteht ein hoch aufgelöstes Übersichtsbild, das man stark vergrößern kann, um Details zu erkennen. Die einzelnen bereits fusionierten Bilder kann man noch aufgrund des schwarzen Hintergrundes erahnen.

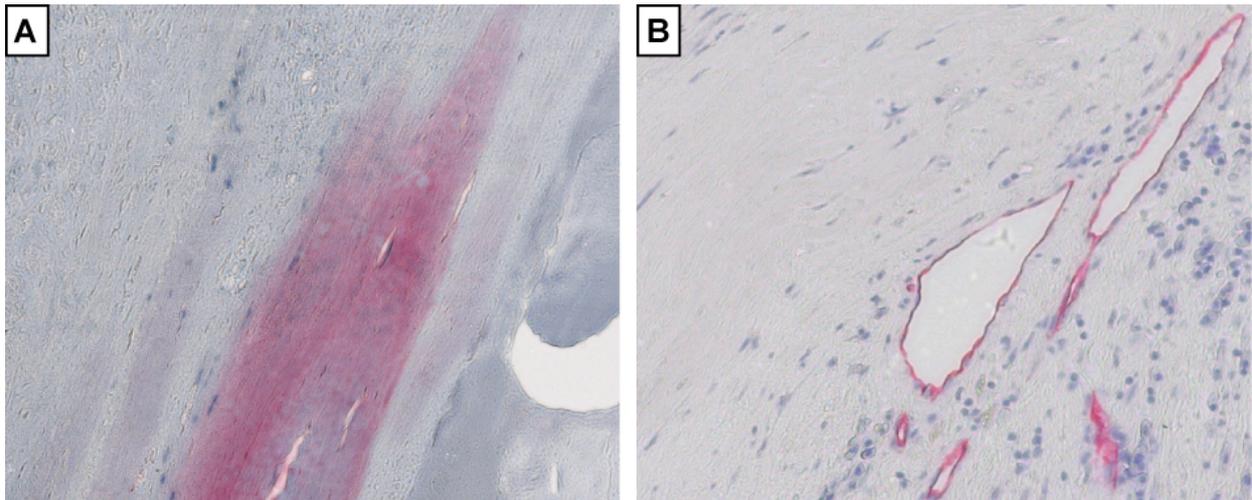
Die Digitalisierung erfolgte unter stets denselben Einstellbedingungen wie Belichtungszeit, Filter, Helligkeit, Kontrast und Farberfassung. Für die Bildanalyse wurde das Softwaremodule Automeasure® genutzt.

Zur Analyse der Färbungen musste eine Farbsegmentierung vorgenommen werden. Durch Definition eines Rotbereiches zur Detektion der Farbstoffpräzipitate wurde eine Farbfrequenzmaske für die drei immunhistochemischen Parameter erstellt. Damit wurden zunächst automatisch die gefärbten Regionen mit Makrophagen, T-Zellen und MMP-9 erfasst.



**Abbildung 9A-B:** Beide Abbildungen stellen denselben Präparatabschnitt dar. Durch die immunhistochemische Färbung wurden Makrophagen in Abbildung 9A rot markiert. In Abbildung 9B ist exemplarisch der Prozess der Farbsegmentierung dargestellt. Die in 9A rot markierten makrophagenpositiven Flächen erscheinen in 9B kräftig rot, während das übrige Gewebe grün markiert ist. Mithilfe der automatischen Bildskalierung und der Software konnten die markierten Flächenanteile berechnet werden. Der Anteil der rot markierten Fläche an der grün markierten Fläche ist somit ein Maß für den Anteil der makrophagenpositiven Fläche im Bezug auf die Gesamtfläche (Originalvergrößerung 50fach).

Da während des Färbevorgangs, trotz optimierter Bedingungen, unspezifische Färbungen nicht völlig ausgeschlossen werden konnten, musste gewährleistet sein, dass diese nicht in den Ergebnispool eingehen. Diese unspezifischen Färbungen lassen sich jedoch leicht erkennen, da sie häufig an typischen Stellen und ohne Zellkörperassoziation auftreten und so während der Analyse ausgeschlossen wurden. Beispiele für typische Artefakte während der immunhistochemischen Färbung zeigen die **Abbildung 10A** und **10B**.



**Abbildung 10A-B:** Beide Abbildungen zeigen typische Artefakte während des immunhistochemischen Färbens. In der Abbildung 10A ist der rote Farbstoff nicht assoziiert zu Zellkörpern. Es handelt sich hierbei am ehesten um eine unzureichende Auswaschung während des Färbens. Ein ähnliches Problem kann an Gewebsrändern oder wie in 10B gezeigt im Bereich von Neovaskularisation auftreten. Solche Artefakte zu erkennen und von realen Färbungen zu differenzieren ist wichtig, da sie Ergebnisse verfälschen können (Originalvergrößerung 50fach).

Zur praktikableren Erkennung von T-Zellen wurde zudem das Suchkriterium Flächeninhalt von 15 – 100  $\mu\text{m}^2$  ergänzt. Dieses Merkmal bezieht sich auf die Durchmesser von T-Zellen, der mit 7-10  $\mu\text{m}$  angegeben wird [36].

Durch Definition einer Farbfrequenzmaske, die das gesamte Farbspektrum der Gewebeprobe erfasste, konnte die Gesamtgefäßquerschnittsfläche bestimmt werden. Somit konnten die Merkmale prozentualer Anteil der Makrophagen- und MMP-9-positiven Fläche an der Gesamtquerschnittsfläche ermittelt werden. Das Ausmaß der T-Zellinfiltration wurde in Zellen/ $\text{mm}^2$  angegeben.

Die Analyse der immunhistochemischen Parameter (Gerolf Kunte) und der plaquemorphologischen Merkmale (Gerolf Kunte und Prof. Dr. med. Wilko Weichert) erfolgte zu den klinischen Merkmalen der Patienten gebündelt. Sofern die beiden Untersucher der plaquemorphologischen Merkmale zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen, wurde ein Konsens ermittelt. Dieser wurde für die statistische Analyse verwendet. Als relevante plaquemorphologische Merkmale wurde vorab definiert: Plaqueruptur, Oberflächenthrombus, nekrotischer Lipidkern und Plauehämorrhagie.

Dabei wurden die Definitionskriterien für plaquemorphologische Merkmale nach Redgrave et al. [8] angewandt.

Eine Plaqueruptur wurde festgestellt, wenn aufgrund eines Einrisses in der fibrotischen Deckplatte eine klare Kommunikation zwischen Lipidkern und Gefäßlumen vorlag. Dabei durfte diese nicht von der TEA herrühren. Ein Oberflächenthrombus stellt eine organisierte Ansammlung von Fibrin und konglomerierten Erythrozyten im Gefäßlumen dar. Ein nekrotischer Lipidkern (im anglo-amerikanischen: *large lipid core*) stellt amorphes Material dar, welches aus Cholesterinkristallen besteht und >50% der Dicke des Plaques oder >25% des Gesamtvolumens der Plaque einnimmt.

Plauehämorrhagien sind extravasale Ansammlungen von Erythrozyten innerhalb der Plaque, die zu einer Störung der Plauearchitektur führen.

Im Hinblick auf die immunhistochemischen Parameter erfolgte keine zusätzliche Evaluation durch einen zweiten Untersucher, da die Übereinstimmung zwischen zwei unabhängigen Untersuchern mit dieser Methodik in einer vorangegangenen Untersuchung exzellent war [13].

### **3.8 Statistische Analyse der Daten**

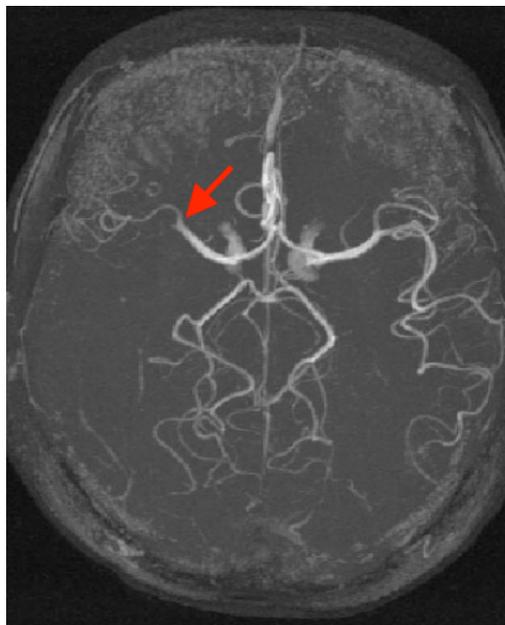
Die statistische Datenanalyse erfolgte mit der Software SPSS 14.0 und Stata für Windows. Kategorische Variablen sind als Anzahl (n) und als Prozent (%) angegeben. Numerische Variablen sind als Median und Zwischenquartilreichweite (IQR=Werte der 25- und 75-Quartile) angegeben, wenn keine Normalverteilung vorlag. Um beide Hauptgruppen miteinander zu vergleichen, wurde für kategorische Variablen der  $\chi^2$  Test und für numerische Variablen der Mann–Whitney *U* Test angewandt. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  festgesetzt.

Eine statistische Beratung und Überprüfung der Ergebnisse erfolgte durch den Neurologen und Epidemiologen Dr. med. Markus A. Busch.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Insgesamt wurden 33 Patienten mit symptomatischen ACI-Stenosen eingeschlossen. Acht Patienten (24%) hatten eine TIA. Der Schlaganfallmechanismus wurde bei 27 Patienten (82%) als embolisch und bei 6 Patienten (18%) als hämodynamisch eingeschätzt. Um den Schlaganfallmechanismus zu identifizieren, wurde eine umfangreiche diagnostische Evaluation zwischen stationärer Aufnahme und Operation vorgenommen. Alle Patienten erhielten eine Dopplersonografie der hirnversorgenden Arterien mit Frage nach hämodynamischer Relevanz der ACI-Stenose. Zusätzlich wurden eine digitale Subtraktionsangiografie bei 39%, eine computertomographisch gestützte Angiografie bei 30% sowie eine Angiografie mittels Magnetresonanztchnik bei 48% der Patienten durchgeführt. **Abbildung 11** stellt eine computertomographisch gestützte Angiografie dar, welche einen Verschluss eines Mediateilastes rechts zeigt. Dieser Verschluss bei ipsilateraler ACI-Stenose kann auf einen embolischen Schlaganfallmechanismus hinweisen.



**Abbildung 11:** Die Abbildung zeigt eine computertomographisch gestützte Angiografie mit Verschluss eines rechtsseitigen Mediateilastes. Der Patient wies eine hochgradige ACI-Stenose rechts auf. Der Schlaganfallmechanismus ist am ehesten arterioarteriell. Das Blutgefäß ist wahrscheinlich durch einen Thrombus oder Plaquematerial verschlossen.

Die zerebrale Bildgebung erfolgte in 91% der Fälle mittels Computertomografie (CT). Ergänzend erhielten 55% eine zerebrale Darstellung durch eine Magnetresonanztomografie. Bei 70% der Patienten aus der embolischen Gruppe wurden multiple akute ischämische Areale im nachgeschalteten Stromgebiet der ACI-Stenose detektiert. Bei 11% der Patienten wurde embolisiertes thrombotisches Material im poststenotischen Bereich nachgewiesen. Ein einzelnes ischämisches Areal im relevanten Karotisstromgebiet, ohne morphologische Merkmale eines Grenzzoneninfarktes, wurde bei 26% der Patienten der embolischen Gruppe nachgewiesen. 83% der Patienten aus der hämodynamischen Gruppe hatten eine Anamnese mit fluktuierender neurologischer Symptomatik als Ausdruck einer zerebralen Ischämie im Karotisstromgebiet bei gleichzeitig dokumentiertem Blutdruckabfall.

Bei 33% aller Patienten mit hämodynamischer Schlaganfallätiologie zeigte sich eine isolierte korrespondierende akute Grenzzonenischämie in der Bildgebung.

Bei allen Patienten wurden im Rahmen der Anamnese und der Untersuchung Daten über Nebendiagnosen und bedeutende Risikofaktoren systematisch erfasst. Die vaskuläre Risikoprofilierung ergab, dass bedeutende Risikofaktoren bei einem Großteil der Patienten vorlagen (siehe **Tabelle 2**). In der Patientengruppe mit hämodynamischem Schlaganfall hatten die Patienten vermehrt einen arteriellen Hypertonus und eine Hyperlipidämie. Es fanden sich keine weiteren Unterschiede zwischen beiden Gruppen in Hinblick auf die in **Tabelle 2** genannten Merkmale und die Begleitmedikation (Nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente, Immunsuppressiva, Antibiotika, Statine, ACE-Hemmer, Calcium-Antagonisten, Sartane, Betablocker, Nitrate, Diuretika, Insuline, orale Antidiabetika). Die kurz vor der Narkoseeinleitung entnommenen Blutproben dienten ebenfalls dazu, mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen festzustellen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen in Hinblick auf die untersuchten Laborparameter. Alle Patienten hatten vergleichbar niedrige CRP-Werte mit 0,2 (0,1-0,4) mg/dl [Referenz: < 0,8 mg/dl] als Ausdruck einer fehlenden relevanten systemisch-entzündlichen Begleiterkrankung. Die mediane Dauer zwischen letztem ischämischem Ereignis einer symptomatischen ACI-Stenose und Operation war in beiden Gruppen mit 17 (embolische Gruppe) und 16 (hämodynamische Gruppe) Tagen annähernd gleich.

**Tabelle 2:** Vergleich Grundmerkmale der beiden Patientengruppen mit embolischem und hämodynamischem Schlaganfallmechanismus.

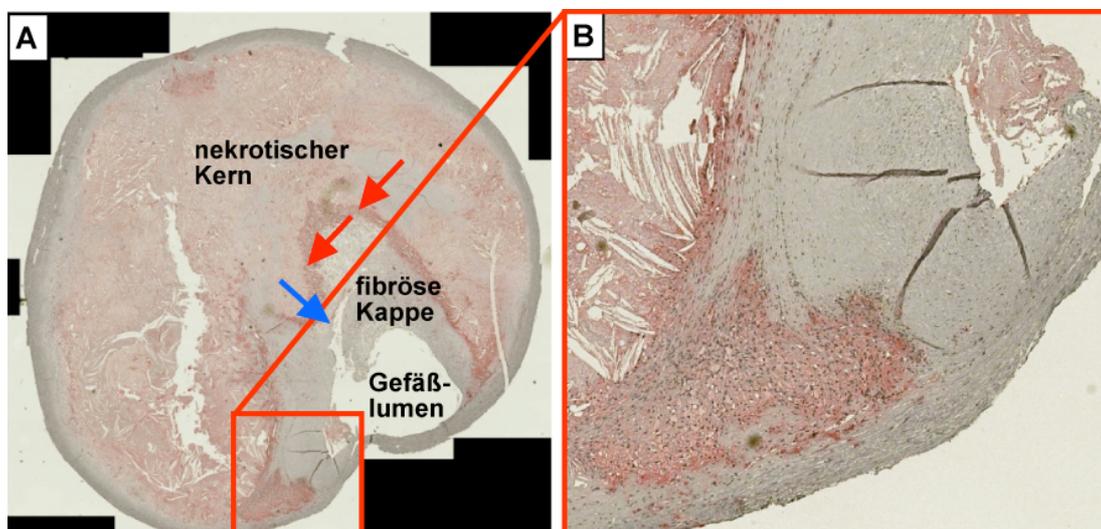
Variablen	Embolischer Schlaganfall-Mechanismus (n=27)	Hämodynamischer Schlaganfall-Mechanismus (n=6)	P
Tage seit letztem Ereignis, Tage	17 (9-28)	16 (7.25-33,5)	0,82 NS*
Alter	63 (57-75)	62 (53-75,25)	0,89 NS*
Männliches Geschlecht, n (%)	15 (56)	5 (83)	0,12 NS†
Koronare Herzkrankheit, n (%)	11 (41)	4 (67)	0,66 NS†
Myokardinfarkt, n (%)	5 (19)	1 (17)	0,75 NS†
pAVK, n (%)	7 (26)	2 (33)	0,61 NS†
Arterieller Hypertonus, n (%)	24 (89)	6 (100)	<b>0,02†</b>
Hyperlipidämie, n (%)	19 (70)	6 (100)	<b>&lt;0,0005†</b>
Diabetes mellitus, n (%)	7 (26)	2 (33)	0,77 NS†
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	25,6/23,2-28,7	23,1/21,4-27,75	0,26 NS*
Aktiver Raucher, n (%)	14 (52)	3 (50)	0,95†
Packungsjahre	5/0-40	27,5/0-76	0,33 NS*
Ehemalige Raucher, n (%)	2 (7)	2 (33)	0,64 NS†
Alkoholabusus, n (%)	2 (7)	2 (33)	0,24 NS†
Positive Familienanamnese, n (%)	14 (52)	6 (100)	0,30 NS†
<b>Serologie</b>			
Chol, mg/dl	165/142-204	176,5/140,5-239,25	0,66 NS*
Tg, mg/dl	160/116-193	129,5/89-148,25	0,09 NS*
Ldl, mg/dl	93/69-123	104/77,75-199,75	0,48 NS*
Hdl, mg/dl	45/38-49	45,5/39,5-52,5	0,56 NS*
Crp, mg/dl	0,14/0,1-0,4	0,275/0,18-0,78	0,30 NS*
Hba1c, %	6,3/5,9-6,7	5,8/5,5-6,78	0,16 NS*

Aufgeführt sind wichtige vaskuläre Risikofaktoren sowie Laborparameter. Die Angaben für beide Gruppen erfolgen in n (n = Anzahl der Patienten mit entsprechendem Merkmal). Für die Merkmale Alter, Body-Mass-Index und Rauchen erfolgen die Angaben in Jahren, kg/m<sup>2</sup> bzw. Packungsjahren. Die Angaben in Klammern geben den prozentualen Anteil dieses Merkmales bzw. das obere und untere Quartil an. Das Merkmal pAVK steht für periphere arterielle Verschlusskrankheit. Zur Erfüllung dieses Merkmales musste eine periphere arterielle Stenose oder ein Arterienverschluss vorliegen, die mit einer Claudicatio intermittens, einem Ruhe-oder Nachtschmerz oder einer Nekrosen einhergeht. Stenosen oder Verschlüsse extra-oder intrakranieller Arterien wurden nicht berücksichtigt. Hyperlipidämie: Einnahme von Statinen bei bekannter Hyperlipidämie oder erhöhtes Gesamtcholesterin oder low-density lipoprotein

cholesterol oder eine Gesamtcholesterin/high-density lipoprotein cholesterol ratio  $\geq 5$ . Rauchen weist auf aktuellen Zigarettenkonsum bis zum Studieneinschluss hin. Die Einheit Packungsjahr bedeutet, dass eine Person ein Jahr lang täglich eine Packung Zigaretten (= 20 Zigaretten) geraucht hat. Das Merkmal chronischer Alkoholabusus war zutreffend, wenn die für die Diagnose notwendigen Kriterien des ICD10-Codes F10.2 erfüllt waren. Das Merkmal positive Familienanamnese traf dann zu, wenn Geschwister oder Eltern des Patienten einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall erlitten hatten oder aufgrund arteriosklerotischer Wandveränderungen operiert worden waren

#### 4.2 Qualitative Beschreibung der Verteilung von Makrophagen, T-Zellen und MMP-9

In allen Operationspräparaten ließ sich eine immunhistochemische Aktivität an Makrophagen, T-Zellen und MMP-9 nachweisen. Das Ausmaß der MMP-9-positiven Regionen an der Gesamtquerschnittsfläche war geringer als das entsprechende Ausmaß der Makrophageninfiltrate. Die Verteilung der Makrophagen, T-Zellen und MMP-9-positiven Regionen war inhomogen über den Längsverlauf des Operationsmaterials verteilt. In Regionen mit Makrophageninfiltration fanden sich in der Regel ebenfalls T-Zellen und in enger räumlicher Beziehung MMP-9. Während sich positive Färbungen für Makrophagen und MMP-9 oft als konfluierend darstellten, waren die T-Zellinfiltrate als einzelne Zellen identifizierbar. Alle drei Parameter fanden sich überwiegend im Grenzbereich des lipidreichen nekrotischen Kerns und der fibrösen Kappe sowie in den Schulterregionen der Plaque. Innerhalb der Patientengruppe mit hämodynamischen Stenosen war die T-Zellinfiltration häufiger weitläufiger und damit weniger dicht verteilt.



**Abbildung 12A-B:** *Abbildung 12A zeigt einen Querschnitt durch einen Thrombendarterektomiezyylinder, der zum Nachweis von Makrophagen gefärbt wurde (Originalvergrößerung 12fach). Wichtige plaquemorphologische Merkmale sind beschriftet. Die roten Pfeile markieren eine dichte Makrophageninfiltration. Der blaue Pfeil zeigt eine artifizielle Plauefissur, die während der TEA entstanden ist. Die rechte Abbildung zeigt eine Ausschnittsvergrößerung der Schulterregion der Plaue. Hier findet sich ebenfalls eine dichte Makrophageninfiltration*

#### 4.3 Quantitative Beschreibung der Verteilung von Makrophagen, T-Zellen und MMP-9

In den Operationspräparaten von Patienten mit embolischem Schlaganfallmechanismus zeigte sich eine signifikant höhere Infiltration von Makrophagen und T-Zellen. Die Expression der MMP-9 war ebenfalls signifikant stärker in der embolischen Gruppe (siehe **Tabelle 3**).

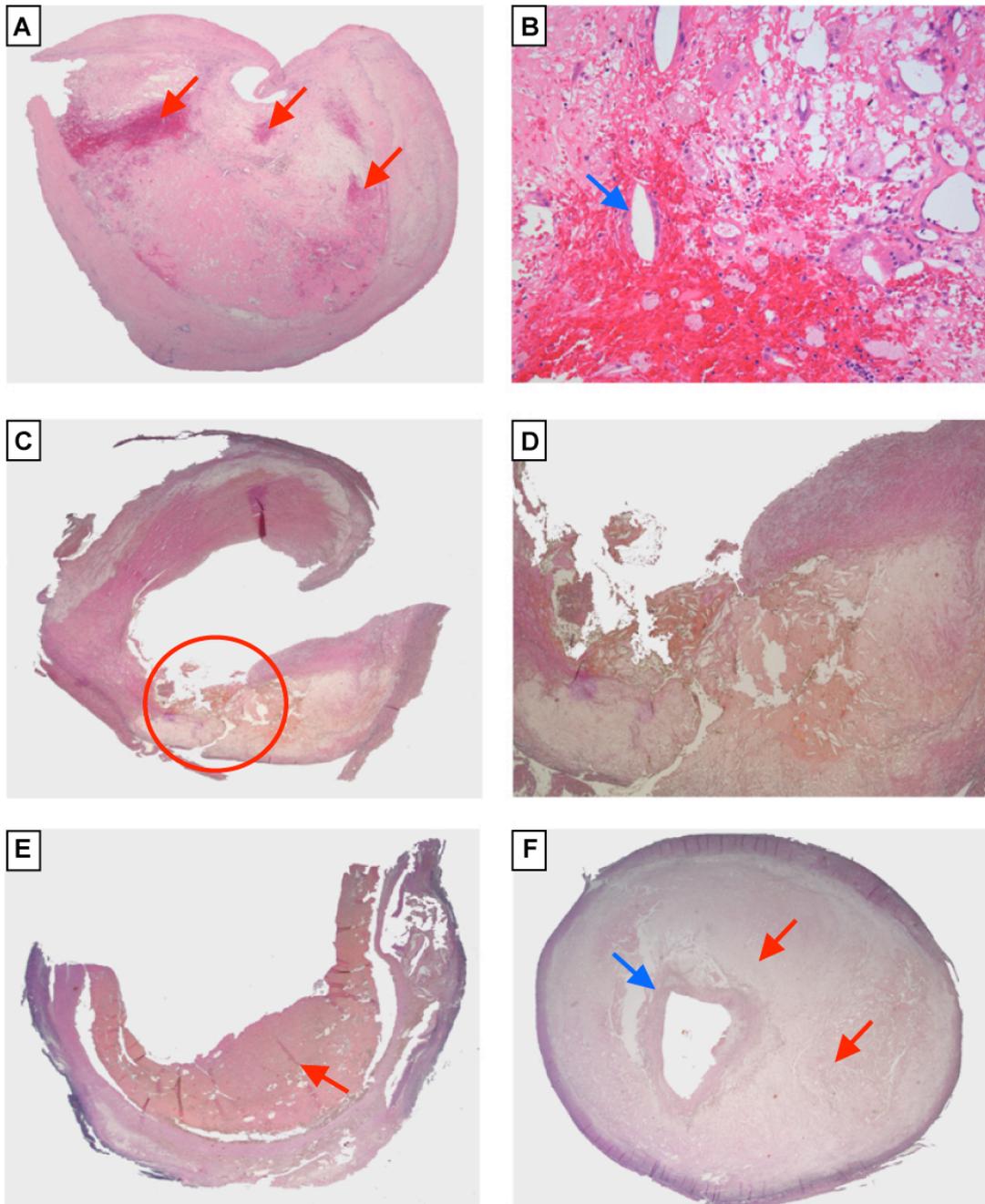
**Tabelle 3:** *Vergleichende Darstellung des Makrophagengehaltes (Anteil der makrophagen-positiven Fläche am Gesamtgefäßquerschnitt) und Ausmaß der T-Zellen (T-Zellen pro mm<sup>2</sup> des Gesamtgefäßquerschnitts) sowie des Gehaltes an MMP-9 (Anteil der MMP-9-positiven Fläche am Gesamtgefäßquerschnitt) zwischen Patienten mit embolischem und hämodynamischem Schlaganfallmechanismus bei symptomatischer ACI-Stenose. Die Angaben erfolgen als Median sowie inter quartile range. Die Einheiten sind Prozent bzw. Zellen/mm<sup>2</sup> bei T-Zellen. In der rechten Tabellenspalte ist das Signifikanzniveau dargestellt. Ein  $p \leq 0,05$  weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen hin.*

Parameter	ACI-Stenosen, embolischer Mechanismus (n = 27)	ACI-Stenosen, hämodynamischer Mechanismus (n = 6)	Signifikanz p
<b>Makrophagen, % (IQR)</b>	2,81% (1,69-4,09)	0,99% (0,57-1,50)	<b>0,003</b>
<b>T-Zellen, n/mm<sup>2</sup> (IQR)</b>	49,66 (21,26-71,39)	10,28 (7,05-13,87)	<b>0,0005</b>
<b>MMP-9, % (IQR)</b>	0,63% (0,42-1,01)	0,25% (0,05-0,45)	<b>0,007</b>

Nach Ausschluss der 8 Patienten mit TIA oder Amaurosis fugax (n=8, 24% vom Gesamtkollektiv) blieb der Unterschied weiterhin signifikant. Die Infiltration von Makrophagen und T-Zellen ergab für Makrophagen 2,46% (1,69-3,72) vs. 0,42% (0,20-0,64);  $p=0,02$  bzw. 34,88 T-Zellen/mm<sup>2</sup> (20.40-59.75) vs. 9.37 (4.22-14.53);  $P=0.045$ . Für die Expression der MMP-9 wurde ein Anteil der Gesamtquerschnittsfläche von 0,61% (0.40-0.88) vs. 0.07% (0.05-0.08);  $P=0.02$  ermittelt.

#### **4.4 Verteilung der plaquemorphologischen Merkmale Plaqueruptur, Oberflächenthrombus, nekrotischer Lipidkern und Plauehämorrhagien in beiden Gruppen**

Die histologische Untersuchung der Operationspräparate ergab strukturelle Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen der Gruppe von Patienten mit embolischem bzw. hämodynamischem Schlaganfallmechanismus. In der embolischen Gruppe fanden sich mehr Plaquerupturen (37% vs. 0%), mehr oberflächliche Thrombusauflagerungen (19% vs. 0%) und mehr Plauehämorrhagien (44% vs. 17%). Aufgrund der geringen Fallzahl und der teilweise fehlenden Merkmalsausprägung in der hämodynamischen Gruppe (Merkmale: Plaqueruptur und Oberflächenthrombus) waren die Unterschiede nicht signifikant. Das Merkmal nekrotischer Lipidkern war in beiden Gruppen in etwa gleich häufig vertreten (96% vs. 100%), wobei im Operationsmaterial bei allen Patienten mit hämodynamischem Schlaganfallmechanismus ein nekrotischer Lipidkern vorhanden war.



**Abbildung 13A-F:** Die Abbildung 13A und 13B zeigen Plaquehämorrhagien. Dabei handelt es sich um Einblutungen innerhalb der arteriosklerotischen Plaque. Abbildung 13A zeigt multiple Einblutungen (siehe rote Pfeile). Abbildung 13B stellt eine Vergrößerung von 13A dar. Dadurch dass einzelne Erythrozyten noch differenziert werden können, ist die Einblutung als frisch einzuschätzen. Auffällig an der Abbildung ist zudem, dass die Einblutung in einer Region mit ausgeprägter Neovaskularisation (blauer Pfeil) liegt. Abbildung 13C zeigt eine Plaqueruptur (roter Kreis). Im Bereich der Ruptur befindet sich eine thrombotische Auflagerung und Bestandteile des nekrotischen Kerns kommunizieren mit dem Gefäßlumen. 13D stellt die o.g. Plaqueruptur detaillierter dar. In 13E ist ein großer wandständiger Thrombus zu sehen (roter Pfeil). Abbildung 13F zeigt einen ausgedehnten nekrotischen Kern (rote Pfeile). Die fibröse Kappe (blauer Pfeil) weist keine Strukturauffälligkeiten auf.

#### **4.5 Vergleich der Häufigkeit von vaskulären Ereignissen und Tod im ersten Jahr nach Operation zwischen beiden Gruppen**

Die Rate der vaskulären Ereignisse (Schlaganfall oder TIA, Herzinfarkt, instabile Angina pectoris, vaskulärer Tod, stationäre Aufnahme für eine vaskuläre Intervention oder Behandlung einer Erkrankung der Blutgefäße) im ersten Jahr nach Operation betrug 41% in der Gruppe von Patienten mit embolischer Schlaganfallgenese. In der hämodynamischen Gruppe hatten 33% der Patienten ein derartiges Ereignis. Die Unterschiede waren sowohl für jedes einzelne Ereignis als auch für die Gesamtheit der Ereignisse nicht signifikant. Ein Patient aus der embolischen Gruppe verstarb während des Beobachtungszeitraumes.

### **5. Diskussion**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit plaquemorphologischen Unterschieden zwischen Patienten mit symptomatischen ACI-Stenosen. Dabei wurde die Hypothese überprüft, ob bei Patienten mit embolischem Schlaganfallmechanismus Plaquestabilitätsmerkmale stärker ausgeprägt sind bzw. häufiger vorkommen als bei Patienten mit hämodynamischem Schlaganfall bei ACI-Stenose. Hierzu wurden Thrombendarterektomiepräparate von 33 Patienten mit symptomatischer ACI-Stenose immunhistochemisch und histologisch untersucht. Der Hintergrund der Fragestellung beruht darauf, dass sich die zugrunde liegenden Schlaganfallmechanismen aus pathophysiologischer Sicht grundlegend unterscheiden und sich daher relevante plaquemorphologische Unterschiede darstellen lassen müssten. Patienten mit embolisch bedingtem Schlaganfallmechanismus zeigten hierbei einen signifikant höheren Gehalt an den etablierten Destabilitätsmerkmalen wie Makrophagen, T-Zellen und MMP-9. Zudem zeigte sich eine nicht signifikante Tendenz, dass Plaquerupturen, Plaqueeinblutungen und Oberflächenthromben häufiger bei embolischem Mechanismus nachzuweisen sind.

#### **5.1 Zur Verteilung der Grundmerkmale in beiden Vergleichsgruppen**

Dieser Punkt ist in der Hinsicht wichtig, da Patientenmerkmale wie vaskuläre Risikofaktoren oder medikamentöse Therapie Einfluss auf die Plaquemorphologie und

auch auf die ebenfalls dokumentierten vaskulären Ereignisse im postoperativen Zeitraum haben könnten. So wäre es möglich, dass aufgrund einer vermehrten Einnahme von z.B. Statinen in einer Gruppe das Destabilitätsmerkmal Makrophageninfiltration erniedrigt ist [13,37]. Oder, dass in einer Gruppe der Anteil an Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) deutlich erhöht ist und diese Patienten daher im postoperativen Beobachtungszeitraum vermehrt Herzinfarkte erleiden. Da ein randomisiertes Studiendesign aufgrund der Fragestellung nicht möglich war, ist das Vorhandensein derartiger Störfaktoren nicht auszuschließen. Außer einer vermehrten Häufigkeit eines arteriellen Hypertonus und einer Hyperlipidämie in der hämodynamischen Gruppe fanden sich keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf die in **Tabelle 2** genannten vaskulären Risikofaktoren. Zudem unterschieden sich der Stenosegrad der zu operierenden ACI sowie die Laborparameter und Begleitmedikation nicht signifikant. Das Zeitintervall zwischen dem letzten ischämischen Ereignis bei symptomatischer ACI-Stenose war zwischen beiden Gruppen nahezu identisch. Auch hatten alle Patienten vergleichbar normale CRP-Werte als Ausdruck einer fehlenden systemisch-entzündlichen Begleiterkrankung, die Einfluss auf die Entzündungsmerkmale innerhalb einer arteriosklerotischen Plaque haben könnte.

Im Hinblick auf den höheren Anteil von Patienten mit arteriellem Hypertonus und Hyperlipidämie in der Gruppe mit hämodynamischen Schlaganfallmechanismus ist zu berücksichtigen, dass beide Merkmale als vaskuläre Risikofaktoren eingestuft werden müssen. Dabei hat der arterielle Hypertonus eine besondere Relevanz als Risikofaktor für einen ischämischen Schlaganfall [38,39]. Zwar disponieren beide Merkmale zur initialen Endothelschädigung [19], allerdings finden sich in der aktuellen Literatur keine Daten auf die von uns untersuchten Plaquemerkmale bei fortgeschrittenen arteriosklerotischen Prozessen. Vermutlich ist allerdings eher ein negativer Effekt auf die untersuchten Plaquemerkmale anzunehmen. Damit erhalten die in der hämodynamischen Gruppe ermittelten weniger stark ausgeprägten Werte für die Infiltration von Makrophagen und T-Zellen sowie die Expression MMP-9 eine zusätzlich höhere Gewichtung.

Insgesamt wies das Gesamtkollektiv ein erhebliches vaskuläres Risikoprofil auf. So hatten 90,9% einen arteriellen Hypertonus, 27,3% hatten Diabetes mellitus, 27,3% hatten eine pAVK und 51,5% der Patienten waren aktive Raucher. 45,5% der Patienten hatten eine bekannte KHK und 18,2% hatten einen Herzinfarkt hinter sich. Dieses

ausgeprägtes Risikoprofil steht weitestgehend im Einklang mit anderen Studien, welche Patientenkollektive mit symptomatischen ACI-Stenosen untersuchten [12,13,26,40-42].

## 5.2 Zur Einteilung des Schlaganfallmechanismus

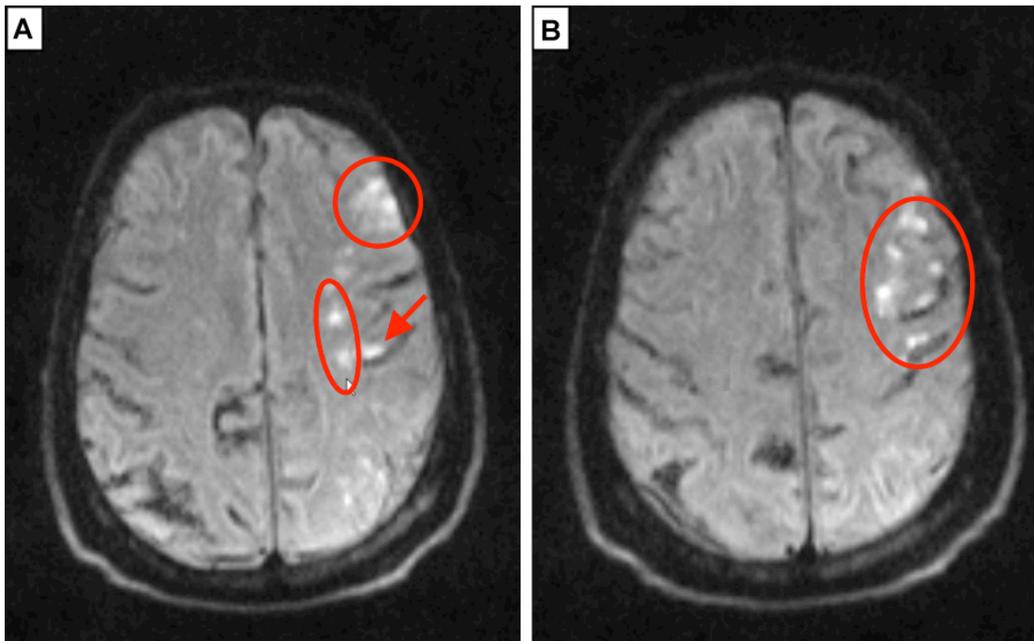
Der zugrunde liegende Schlaganfallmechanismus wurde präoperativ, für die Untersucher der plaquemorphologischen Merkmale geblindet, eingeschätzt.

Bei 27 Patienten wurde er als embolisch und bei 6 Patienten als hämodynamisch zugeordnet. Es wurde eine umfangreiche Evaluation zwischen stationärer Aufnahme und Operation vorgenommen, um den Schlaganfallmechanismus zu identifizieren. Dennoch kann nicht mit letztendlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, dass einzelne Patienten in die falsche Gruppe eingeteilt wurden.

So ist es denkbar, dass z.B. eine als kortikaler Grenzzoneninfarkt imponierende Ischämie komplett oder auch teilweise durch eine arterioarterielle Embolie, also einen embolischen Schlaganfallmechanismus, bedingt ist [43]. Es wäre auch möglich, dass zusätzlich zu einer hämodynamisch relevanten ACI-Stenose im nachgeschalteten Stromgebiet eine rupturierte intrakranielle Plaque in der Arteria cerebri media vorliegt, welche einen embolischen Schlaganfallmechanismus konkurrierend verursacht haben könnte. Allerdings deutet sich im Bezug auf einen inneren Grenzzoneninfarkt an, dass eine arterioarterielle Embolie als Ursache sehr unwahrscheinlich ist [44,45]. Die größere Gefährdung der inneren Grenzzonenregion für hämodynamische Ischämien bei reduzierter zerebraler Perfusion ist auf die Anatomie der dortigen Arteriolen zurückzuführen. Die Arteriae lenticulostriatae stellen die am meisten distalen Aufzweigungen der ACI dar, haben zudem eine relativ schlechte Kollateralisierung und der Perfusionsdruck ist hier wahrscheinlich am geringsten [46]. So zeigten Perfusionsstudien, dass die weiße Substanz paraventriculär am stärksten anfällig bei hämodynamischen Störungen bei Patienten mit ACI-Stenose ist [47].

Im Gegensatz zur inneren liegt die kortikale Grenzzonenregion nahe der Hirnoberfläche, deren Kollateralversorgung durch leptomeningeale und durale Anastomosen deutlich ausgeprägter ist. Dies macht die kortikalen Grenzzonenregionen resistenter gegenüber hämodynamischen Faktoren.

Ferner können bei einigen Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten hämodynamische und embolische Mechanismen bestehen und interagieren (siehe **Abbildung 14**).



**Abbildung 14A-B:** Die Abbildungen zeigen eine diffusionsgewichtete Darstellung des Hirnparenchyms eines Patienten, der mit einem akuten Hemisyndrom rechts aufgenommen und in eine andere Studie eingeschlossen wurde. In Abbildung 14A markiert der rote Kreis ein ischämisches Areal in der vorderen kortikalen Grenzzone. Das rote Oval zeigt frische ischämische Auffälligkeiten in der inneren Grenzonenregion. Der rote Pfeil markiert ein Areal, das nicht sicher einer Grenzonenregion zuzuordnen ist. Abbildung 14B zeigt weitere ischämische Areale, die außerhalb der Grenzonenregion liegen. Anhand der vorliegenden Aufnahmen ist es aus bildmorphologischer Sicht schwierig, den Schlaganfallmechanismus zuzuordnen. Es finden sich gleichzeitig Merkmale eines hämodynamischen und embolischen Schlaganfallmechanismus.

Als zusätzliches Hilfsmittel zur besseren Fahndung nach einem embolischen Mechanismus bietet sich die präoperative Messung von Mikroemboliesignalen (MES) mittels transkranieller Dopplersonografie (TCD) an. Mithilfe der TCD ist es möglich, zerebrale Embolien in intrakraniellen Gefäßen zu detektieren. Die MES sind direkter Ausdruck von Embolien. Es ist bekannt, dass zerebrale Mikroembolien signifikant häufiger bei symptomatischen ACI-Stenosen im Vergleich zu asymptomatischen ACI-Stenosen auftreten [48-50]. Die MES-Rate ist nach einem ersten ischämischen Ereignis deutlich höher und nimmt erst allmählich wieder ab [49]. Nach erfolgreicher TEA bei zuvor symptomatischen ACI-Stenosen fällt die MES-Rate deutlich ab [49]. Zudem zeigten Jander et al. eine signifikante Korrelation zwischen einem erhöhten Makrophagenanteil in Plaques und einer vermehrten Detektion von MES. Für T-Zellen zeigt sich ein nicht signifikanter Trend [12]. Allerdings differenzierten Jander et al.

symptomatische Stenosen nicht in Hinblick auf den zugrunde liegenden Schlaganfallmechanismus, was bei einer möglichen Anwendung zur Identifizierung von embolisch wirkenden ACI-Stenosen berücksichtigt werden muss. Aus pathophysiologischer Sicht wäre es allerdings vorstellbar, dass die Unterschiede im untersuchten Patientenkollektiv (symptomatisch vs. asymptomatisch) größer gewesen wären, wenn er sich bei der Untersuchung von symptomatischen Patienten auf jene mit embolischem Schlaganfallmechanismus beschränkt hätte.

Loftus et al. konnten zeigen, dass Plaques von Patienten, die spontane MES im TCD aufwiesen, einen signifikant höheren MMP-9-Gehalt hatten als Patienten, die keine spontanen MES zeigten [26].

Mithilfe der TCD und der gemessenen MES hätte eine möglicherweise zusätzliche Bestätigung des Schlaganfallmechanismus in der vorliegenden Arbeit vorgenommen werden können. Die Einteilung der Patienten z.B. in die hämodynamische Gruppe wäre durch die Zusatzinformation MES-negative Stenose eventuell noch sicher gewesen.

Weiterhin bietet sich zur Einteilung des Schlaganfallmechanismus die Bestimmung der zerebrovaskulären Reservekapazität (Vasomotorenreserve) an. Die Reservekapazität ist ein Maß für die Dilatationsfähigkeit der intrazerebralen Arteriolen. Kommt es zum Anstieg des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks (pCO<sub>2</sub>) im Blut, erweitern sich die intrazerebralen Arteriolen. Der Durchmesser der MCA bleibt dabei unverändert. Aufgrund der Widerstandsabnahme im nachgeschalteten Gefäßsystem lässt sich mithilfe der Dopplersonografie eine Zunahme der Flussgeschwindigkeit in der MCA bestimmen, die vom noch möglichen Dilatationspotential der Arteriolen abhängig ist. Der Zuwachs wird als Reservekapazität bezeichnet. Bei einer erschöpften Reservekapazität sind die Arteriolen bereits in Ruhe maximal dilatiert und ein Reiz führt zu keiner zusätzlichen Dilatation der Arteriolen. In der MCA ist keine Veränderung der Flussgeschwindigkeit messbar. Im klinischen Alltag wird für die Bestimmung der zerebrovaskulären Reservekapazität der Diamox®-Test angewendet. Acetazolamid (Diamox®) beeinflusst durch Veränderung des Blut-pH-Wertes die Weite der intrazerebralen Arteriolen. Nach der i.v.-Gabe kann man einen mit der zerebrovaskulären Reservekapazität korrelierbaren Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit detektieren. Eine erniedrigte Reservekapazität kann dabei auf eine hämodynamische Wirkung der Stenose hinweisen, schließt aber letztlich eine arterioarterielle Genese nicht aus.

Da der Nutzen einer frühzeitigen TEA bei Patienten mit symptomatischen ACI-Stenosen belegt ist [3,51-53], musste aus ethischen Gesichtspunkten berücksichtigt werden, dass

eine studienbedingte zeitliche Ausweitung durch Zusatzuntersuchungen bis zur Operation bedenklich ist. So schied für uns eine Verzögerung des Operationszeitpunktes aufgrund einer Erweiterung der Diagnostik aus.

Acht der untersuchten Patienten hatten eine TIA. Da sich eine TIA mit den üblichen bildgebenden Verfahren häufig nicht durch ein Defektareal darstellen lässt, wäre insbesondere bei diesen Patienten eine Zuordnung zum falschen Schlaganfallmechanismus möglich gewesen. Nach Ausschluss dieser Patienten blieben unsere Ergebnisse, trotz der weiteren Verringerung der Fallzahl, signifikant.

### **5.3 Zur Bewertung der immunhistochemischen und histologischen Methodik**

Vor den eigentlichen Färbeprozeduren erfolgten die Konservierung und die Aufarbeitung der Proben, welche Einfluss auf die Ergebnisse haben können und daher zunächst diskutiert werden müssen. Unter anderem ist es wichtig, die Fixierdauer in Formalin zu beachten. Bei einer Fixationsdauer von bis zu 26 Stunden in 4% Formalin ist keine signifikante Einschränkungen der Immunreaktivität zu erwarten [54]. In der Regel führt eine längere Fixierdauer zu einer schwächeren Immunreaktivität und kann damit Unterschiede im Färbeverhalten bedingen. Laut Protokoll war eine Lagerung der Operationspräparate von 24 Stunden vorgeschrieben. Bei größeren Präparaten wurde auch eine Inhomogenität der Fixierung beschrieben, was aber aufgrund des geringen Volumens der TEA-Präparate nicht wahrscheinlich ist.

Erwähnt werden sollte auch, dass durch die Operation selbst artifizielle Fissuren in der Plaqueoberfläche erzeugt werden können. Diese können mit Plaquerupturen verwechselt werden und bedürfen daher besonderer Beachtung. Da artifizielle Fissuren häufig ohne besondere anatomische Korrelation zu den plaquemorphologischen Merkmalen wie nekrotischer Kern und fibröse Kappe stehen, ist eine Differenzierung allerdings möglich. Ähnliches trifft für Plaquehämorrhagien zu. Um die Bestimmung der plaquemorphologischen Merkmale nicht nur von der Einschätzung eines einzelnen Untersuchers abhängig zu machen, wurden die Präparate zusätzlich von dem Pathologen Prof. Dr. med. Wilko Weichert untersucht. Seine Ergebnisse wurden bei der Bildung eines späteren Konsensscores berücksichtigt. Im Hinblick auf die plaquemorphologischen Parameter kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass sich wandständiges Thrombusmaterial intraoperativ oder während des Aufbereitungsprozesses gelöst hatte und damit sich der späteren Bewertung entzog. Es

ist auch vorstellbar, dass wandständiges Thrombusmaterial präoperativ durch körpereigene Mechanismen gelöst bzw. abgebaut wurde oder während der zurückliegenden zerebralen Ischämie embolisierte. Unter all diesen Umständen könnte Thrombusmaterial nicht nachweisbar sein.

Weiterhin muss bedacht werden, dass durch verspätete Inanspruchnahme ärztlicher Hilfe sowie durch Diagnostik und Operationsvorbereitungen Zeit vergeht zwischen den auf die symptomatische ACI-Stenose zurückgehenden Symptomen und der TEA. Die Untersuchung des Operationspräparates kann lediglich Auskunft über dessen Zustand zum Zeitpunkt der Operation geben, wodurch die zeitliche Dynamik des zugrunde liegenden pathogenetischen Prozesses nicht beachtet wird. Inwieweit wir auch Heilungsprozesse dokumentierten, zu denen Makrophagen, T-Zellen und MMP-9 durch ihre gewebsgestaltenden Eigenschaften beitragen können, bleibt bei unseren Betrachtungen unklar. Das mediane Zeitintervall zwischen dem letzten zerebralen bzw. retinalen Ereignis und der ACI-TEA betrug für das Gesamtkollektiv 17 (9-29) Tage.

Obwohl dieses Zeitintervall relativ lang erscheint, ist es im Gegensatz zu anderen Publikationen als eher kurz einzuschätzen [12,13,26,40,41]. Der optimale Zeitpunkt für unsere Untersuchung wäre gewesen, wenn der Studieneinschluss, die begleitende Diagnostik und die ACI-TEA am Tag des qualifizierenden Ereignisses für eine symptomatische ACI-Stenose stattgefunden hätten.

Eine der Schwächen der immunhistochemischen Färbemethode ist die Schwierigkeit der Standardisierung. Dies kann zu Ergebnisschwankungen trotz identischen Studienprotokolls führen. So können unterschiedliche Qualitäten der Materialien oder Temperaturschwankungen zwischen einzelnen Färbungen Ergebnisse beeinflussen. Neben der strikten Einhaltung des Färbeprotokolls wurden daher bis zu 20 Proben gleichzeitig gefärbt, um derartige Einflüsse zu minimieren. Bei verschiedenen Studienprotokollen können sich die Ergebnisse quantitativ deutlich unterscheiden. In einer Untersuchung von symptomatischen und asymptomatischen ACI-Stenosen fanden Jander et al. deutlich höhere Makrophageninfiltration im Vergleich zu dieser Untersuchung, trotz identischer Primär- und Sekundärantikörper. Dabei waren sowohl der Anteil der makrophagenpositiven Regionen an der Gesamtplaquequerschnittsfläche bei symptomatischen (n = 21) mit  $18\% \pm 10$  als auch bei asymptomatischen ACI-Stenosen (n = 16) mit  $11\% \pm 4$  deutlich höher [12]. Eine mögliche Ursache für dieses deutlich größere Ausmaß an Makrophagen-positiven Regionen könnte darin liegen, dass Jander et al. durch manuelles Umranden der gefärbten Regionen den

Flächenanteil der Färbung am Gesamtgewebe ermittelten. Hierdurch werden aber innerhalb makrophagenreicher Regionen auch Areale in denen sich keine Makrophagen befinden mitbestimmt. So kann es zu einer Überbewertung des Ausmaßes Makrophagen-positiver Regionen kommen. Durch die Nutzung einer Farbfrequenzmaske, wie bei unserer Untersuchung, werden dagegen nur farblich markierte Bereiche erfasst. Unter Berücksichtigung der hierzu publizierten Literatur erfolgte die quantitative Evaluation der immunhistochemischen Färbung [12,37,55-57]. Unter stets denselben Einstellbedingungen wie Belichtungszeit, Filter, Helligkeit, Kontrast und Farbeinstellungen fand die Bildakquirierung automatisch kontrolliert statt. Damit sind alle Aufnahmen jederzeit unter den gleichen Bedingungen reproduzierbar. Durch das Mitführen einer automatischen Bildskalierung waren Dimensionseinschätzungen unabhängig von der angewandten optischen Vergrößerung jederzeit verfügbar. Zusammenfassend kann man sagen, dass bei identischem Studienprotokoll und gleichen Materialien Ergebnisse gut, bei verschiedener Methodik allerdings quantitativ nur eingeschränkt miteinander verglichen werden können. Bei jeder Färbung wurden zur Beurteilung der Detektionsfähigkeit und zur Überwachung der Qualität der Färbesysteme Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Aufgrund der heutigen modernen hochspezifischen Primärantikörper konnten die gesuchten Zellen und Proteasen relativ sicher detektiert werden. Als Beleg dafür können die mitgeführten hochqualitativen Färbeergebnisse und die in **Abbildung 5** dargestellten Positivkontrollen (Makrophagen (Tonsille), T-Zellen (Appendix), MMP-9 (Leber) dienen.

#### **5.4 Diskussion der immunhistochemischen und plaquemorphologischen Ergebnisse und deren klinische Interpretation in Hinblick auf die Plaquestabilität**

Makrophagen, T-Zellen und MMP-9 waren sowohl bei ACI-Stenosen von Patienten mit embolischem als auch von Patienten mit hämodynamischem Schlaganfallmechanismus zu finden. Dies ist nicht verwunderlich, da Makrophagen, T-Zellen und MMP-9 entzündliche Prozesse innerhalb der arteriosklerotischen Plaque widerspiegeln und ihnen bereits beim Entstehungsprozess derartiger Läsionen eine Rolle zugesprochen wird [8,11,58].

Ein Großteil der vorliegenden Studien über die Untersuchung von ACI-Stenosen unterscheidet zwischen asymptomatischen und symptomatischen Stenosen. Es konnte

gezeigt werden, dass der Gehalt an Makrophagen in symptomatischen ACI-Stenosen höher ist als in asymptomatischen ACI-Stenosen [12,13,40,41]. Zudem zeigte sich, dass die Anzahl an T-Zellen in symptomatischen im Vergleich zu asymptomatischen ACI-Stenosen größer ist [12,41]. Weiterhin konnte im Unterschied zu asymptomatischen ACI-Stenosen eine höhere Konzentration von MMP-9 in symptomatischen ACI-Stenosen gefunden werden [13,26].

Unserem Wissen nach ist die vorliegende Arbeit die Erste, welche sich mit plaquemorphologischen Unterschieden innerhalb von symptomatischen ACI-Stenosen unter Berücksichtigung des zugrunde liegenden Schlaganfallmechanismus beschäftigt.

In einer früheren Studie [13], die den Makrophagen- und MMP-9-Gehalt von 68 asymptomatischen ACI-Stenosen untersuchte, fanden sich nahezu gleiche Ergebnisse an Makrophagen- und MMP-9-Gehalt wie bei Patienten aus unserer hämodynamischen Gruppe. Da asymptomatische ACI-Stenosen ein nur gering erhöhtes Schlaganfallrisiko für arterioarterielle Embolie aufweisen, kann man schlussfolgern, dass dies auch für Patienten mit symptomatischer ACI-Stenose und hämodynamischen Schlaganfallmechanismus zutrifft. Zudem zeigten unsere Ergebnisse eine Tendenz, dass Plaquerupturen, oberflächliche Thrombusauflagerungen und Plauehämorrhagien weniger häufig in der hämodynamischen Gruppe auftraten. Zusammengefasst kann man aus diesen Ergebnissen ableiten, dass ACI-Stenosen mit embolischem Schlaganfallmechanismus häufiger etablierte Plauedestabilitätsmerkmale aufweisen als Stenosen mit hämodynamischem Mechanismus. Diese Resultate können bei der therapeutischen Entscheidungsfindung helfen. So kann es sein, dass ACI-Stenosen mit einem hämodynamischen Schlaganfallmechanismus eher von einer Karotis-Stent-Implantation (CAS) profitieren könnten. Dabei könnte man wie folgt argumentieren: Prinzipiell ist die CAS weniger invasiv als die TEA, dennoch konnte bisher eine generelle Überlegenheit nicht nachgewiesen werden. Während einer CAS treten etwa 50% aller Komplikationen im Zusammenhang mit dem Einbringen des Stents auf, wobei hiervon ein Großteil symptomatische zerebrale Ischämien sind [59]. Hierbei hat vermutlich die Vulnerabilität der ACI-Stenose einen entscheidenden Einfluss auf die Komplikationsrate. Dabei ist es möglich, dass bei der Implantationsprozedur Plauebestandteile abgelöst werden und embolisieren. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit, die eine geringere Plauevulnerabilität in der hämodynamischen Gruppe zeigte,

kann man eine möglicherweise verringerte Komplikationsrate während des Stentings in dieser Patientengruppe erwarten.

Unsere Untersuchungsergebnisse legen somit nahe, dass man durch die Identifikation des zugrunde liegenden Schlaganfallmechanismus bei ACI-Stenose Hinweise auf die Vulnerabilität der ACI-Stenose finden kann.

Bei all diesen Betrachtungsweisen darf allerdings nicht unerwähnt bleiben, dass hämodynamisch wirksame ACI-Stenosen ebenso wie ACI-Stenosen mit embolischem Schlaganfallmechanismus eine klinisch relevante Manifestation einer fortgeschrittenen Arteriosklerose darstellen. Das heißt, man muss prinzipiell bei Patienten mit symptomatischen ACI-Stenosen von einer generalisierten arteriosklerotischen Gefäßerkrankung ausgehen [60,61]. Dies birgt hohe Risiken für zukünftige vaskuläre Ereignisse. So weist etwa ein Drittel der Patienten mit extrakranieller Karotisstenose gleichzeitig eine intrakranielle Gefäßstenose auf. Andererseits haben Patienten mit einer pAVK in 25% bis 50% eine Karotisstenose [62,63]. Dabei versterben bis zu 15% der Patienten mit pAVK aufgrund eines zerebrovaskulären Ereignisses [64]. Patienten mit einer mindestens 50%igen Karotisstenose haben in 20% bis 40% der Fälle eine KHK [15]. Diese Ergebnisse sind mit unserem Patientenkollektiv (27,3% der Patienten hatten eine pAVK und 45,5% eine KHK) vergleichbar. Weiterhin steigt bei Zunahme der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis das Risiko für Patienten, die noch keine manifeste Arteriosklerose aufwiesen, einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu bekommen [65].

Dies weist darauf hin, dass die zerebrovaskuläre Arteriosklerose neben dem ischämischen Schlaganfall mit der koronaren Arteriosklerose assoziiert ist, ein Zusammenhang zwischen koronarer und zerebrovaskulärer Arteriosklerose besteht und dass die Langzeitprognose von Patienten mit Karotisstenosen nur zum Teil von deren Schlaganfallrisiko bestimmt wird. So ist die Haupttodesursache von Patienten mit asymptomatischen ACI-Stenosen der Myokardinfarkt [66].

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass arteriosklerotische Läsionen in anderen Gefäßregionen bei Patienten mit symptomatischer ACI-Stenose ähnlich vulnerable sind. Dabei ähneln sich arteriosklerotische Plaques eines Patienten in verschiedenen Arterienregionen häufig [67].

Mit der Nachkontrolle unserer Patienten über 1 Jahr wollten wir dieser Tatsache Rechnung tragen. Unter der Annahme, eine symptomatische ACI-Stenose birgt ein erhöhtes Risiko für vaskuläre Ereignisse, bestimmten wir die Häufigkeit des Auftretens

von Schlaganfällen, TIAs, Herzinfarkten, instabiler Angina pectoris, vaskulärem Tod sowie die Anzahl von stationären Aufenthalten für eine vaskuläre Intervention oder Behandlung einer Erkrankung der Blutgefäße. Wir stellten die Hypothese auf, dass eine vermehrte Ereignisrate in der embolischen Gruppe zu erwarten ist, sofern wir eine vermehrte entzündliche Aktivität in derartigen Stenosen feststellten. Es fanden sich vermehrt vaskuläre Ereignisse in der embolischen Gruppe. Dort hatten 41% der Patienten ein derartiges Ereignis, während in der hämodynamischen Gruppe 33% den Endpunkt erfüllten. Am ehesten aufgrund der für die Fragestellung zu niedrigen Fallzahl, ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisen. Dennoch verdeutlichen die hohen Ereignisraten das hohe vaskuläre Risiko dieses Patientenkollektivs.

Unsere Untersuchungen berücksichtigen lediglich einen kurzfristigen perioperativen Zeitraum. Dabei ist es möglich, dass aufgrund plaquemorphologischer Veränderungen die Vulnerabilität einer Stenose wieder zu- bzw. abnimmt. So ist mittlerweile gut belegt, dass der Nutzen einer ACI-TEA bei symptomatischen Stenosen mit der Zeit sinkt und sich sogar in einzelnen Untergruppen umkehrt [7].

Im Hinblick auf die gehäuft nachgewiesenen Destabilitätsmerkmale in der embolischen Gruppe könnte man postulieren, dass diese Patienten möglicherweise besonders stark von einem pharmakologischen Therapieansatz zur Plaquestabilisation profitieren würden. Bisherige Daten bestätigen, dass die Einnahme von Statinen zu einer Verminderung der Inflammation und zu einer Stabilisierung der Plaques führt [13,37,68-70]. Neben ihrem cholesterinsenkenden Effekt haben Statine sogenannte pleiotrope Eigenschaften [71]. Eine große Anzahl von Untersuchungen hat nachgewiesen, dass Statine den oxidativen Stress verringern, die endotheliale Funktion verbessern sowie antiproliferative, antiinflammatorische, antithrombotische und immunmodulatorische Effekte haben [71-73].

Crisby et al. untersuchten in einer randomisierten, prospektiven und placebokontrollierten Studie Patienten mit symptomatischen ACI-Stenosen und geplanter TEA auf einen möglicherweise plaquestabilisierenden Effekt von Pravastatin. Patienten aus der Kontrollgruppe, welche drei Monate 40mg Pravastatin pro Tag erhielten, wiesen in ihren Karotisplaquezyklern weniger Makrophagen und T-Zellen auf als Patienten aus der Placebogruppe [37]. Außerdem zeigten Untersuchungen mit Statinen, dass diese Makrophagen bei der Produktion von MMPs inhibieren [13,55,74].

Aufgrund dieser Eigenschaften ist ein direkter Einfluss von Statinen auf die oben beschriebenen inflammatorischen Prozesse in arteriosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten naheliegend und eine Art plaquestabilisierender Effekt könnte aus ihrer Einnahme resultieren. Da sich dieser Effekt auch auf andere Gefäßabschnitte auswirken dürfte, könnten nicht nur Schlaganfallpatienten, sondern z.B. auch Patienten mit KHK und pAVK von einer Statintherapie profitieren. Möglicherweise könnten sich bereits auch kurzfristig Therapieeffekte einstellen, weshalb Patienten mit geplanter invasiver Intervention an der ACI-Stenose profitieren würden.

Durch eine Vielzahl von prospektiven klinischen Studien konnte mittlerweile der Nutzen einer Statintherapie bei Patienten mit Arteriosklerose belegt werden. Hierbei war der Effekt auf Patienten mit begleitender KHK besonders hoch [75].

Eine große Metaanalyse von Amarengo et al. aus dem Jahre 2004 ergab eine relative Risikoreduktion (RRR) von Schlaganfällen von 21% [76].

In der SPARCL-Studie (*Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels*) wurden 4731 Patienten mit Schlaganfall oder TIA ohne zusätzliche KHK eingeschlossen und über durchschnittlich 4,9 Jahre mit 80 mg Atorvastatin oder Placebo behandelt. Es fand sich eine signifikante RRR von 16%. Die RRR in der Patientengruppe ohne bekannte KHK hinsichtlich koronarer Ereignisse und vaskulärem Tod war in SPARCL-Studie mit circa 20% über den Beobachtungszeitpunkt sogar noch höher [77].

## **5.5 Präinterventioneller Nachweis von Vulnerabilitätsmerkmalen arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen durch moderne Bildgebung und klinischer Ausblick**

Moderne bildgebende Verfahren können zur präinterventionellen Risikoprofilierung hochgradiger ACI-Stenosen beitragen und helfen plaquestabilisierende Therapieansätze zu überprüfen. So könnte man gezielter Hochrisikopatienten identifizieren und damit sekundärprophylaktische Optionen (wie z.B. TEA vs. CAS vs. bestmögliche nichtinvasive Therapie) auf diese anpassen, indem man zwischen verschiedenen Graden von arteriosklerotischer Vulnerabilität unterscheidet.

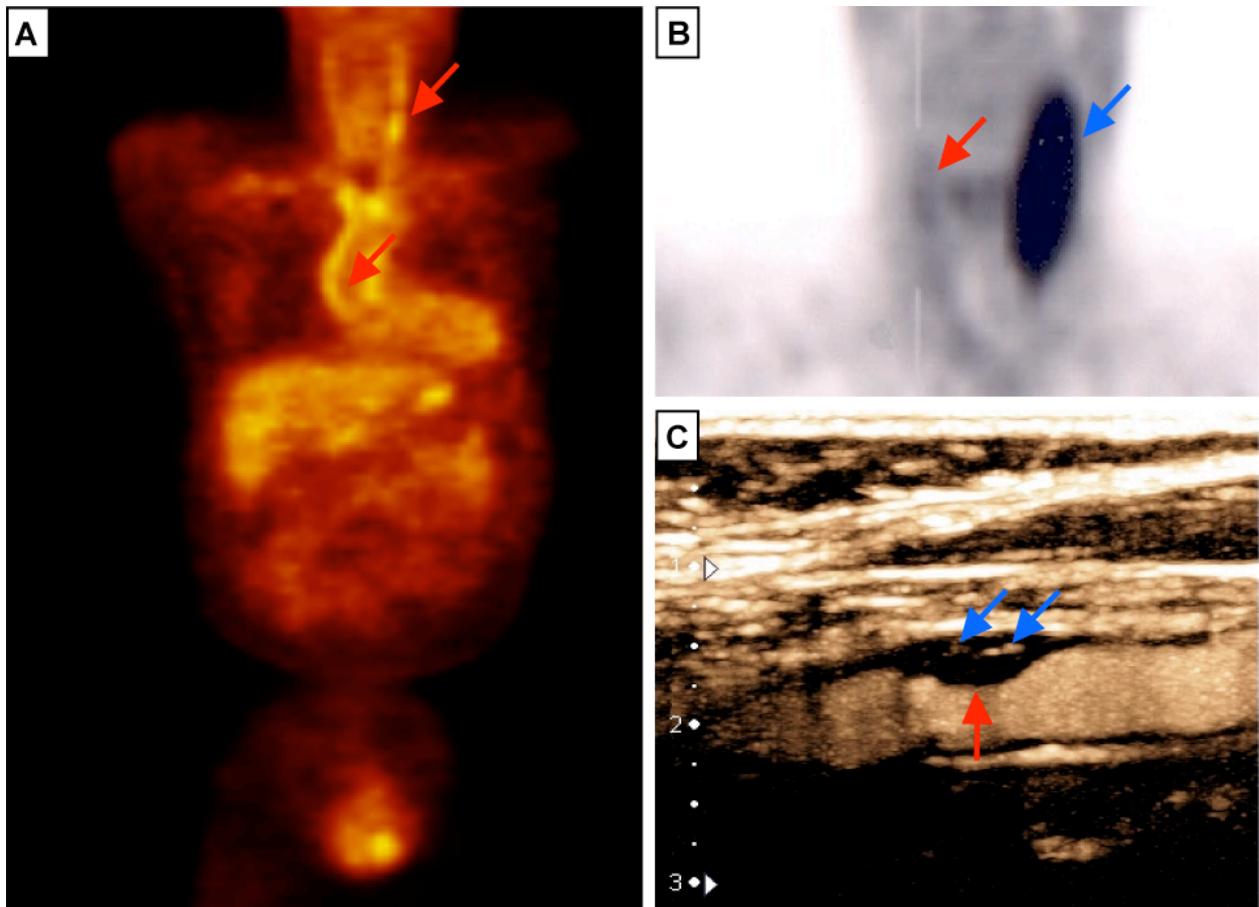
Da Makrophagen eine besondere Bedeutung bei der Entstehung von vulnerablen Plaques spielen [21,78], stellen sie einen interessanten Marker für die Bildgebung dar. Die Positronenemissionstomografie (PET) kann mittels 18-Fluor-Fluorodeoxyglukose

(18-FDG) makrophagenreiche, stoffwechselaktive Plaques identifizieren, da 18-FDG von Plaquemakrophagen stärker verstoffwechselt wird als von anderen zellulären Plaquebestandteilen wie z.B. glatten Muskelzellen und Fibrozyten [79]. Die **Abbildungen 15A** und **15B** zeigen im Bezug hierzu zwei Möglichkeiten der Anwendung einer 18-FDG-PET bei Patienten mit Arteriopathien. Bereits jetzt können mithilfe der FDG-PET Unterschiede zwischen symptomatischen und asymptomatischen ACI-Stenosen gezeigt werden [80], da symptomatische Plaques in dieser Studie vermehrt Makrophageninfiltration aufwiesen. Plaquestabilisierende Therapieansätze konnten ebenfalls mit PET-Techniken überprüft werden. Tahara et al. zeigten in einer prospektiven randomisierten Studie, dass eine Statinbehandlung zu einer Abnahme der FDG-Aufnahme in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen führt [81]. 43 Patienten mit hochgradigen ACI-Stenosen erhielten entweder Simvastatin oder eine Diät. Nach drei Monaten fand sich ein signifikanter Unterschied in der FDG-Aufnahme zwischen beiden Gruppen, wobei die ACI-Stenosen der Simvastatingruppe eine Abnahme der FDG-Anreicherung um ca. 10% zeigten. Hieraus wird deutlich, dass das FDG-PET Plaueinflammationen sichtbar macht und für die Überprüfung von antiinflammatorischen Therapieansätzen genutzt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung von Makrophagen nutzt die Tatsache aus, dass Plaquemakrophagen Eisennanopartikel phagozytieren und diese in der T2-gewichteten MR-Bildgebung zu einer Kontrastverstärkung führen. Mithilfe dieser Kontrastmittel scheint es möglich, eine funktionelle Charakterisierung der entzündlichen Aktivität vorzunehmen, da die Dichte der aufgenommenen Eisennanopartikel bestimmt werden kann [82-84]. Vorteil dieser Methode ist, dass aktive Makrophagen sichtbar werden, da die Eisenpartikel nur dann akkumulieren, wenn diese aktiv durch Makrophagen phagozytiert werden.

Wie **Abbildung 15C** verdeutlicht, bietet mittlerweile auch die moderne Ultraschalldiagnostik interessante Ansätze zur Bestimmung der Plauevulnerabilität. Mithilfe Ultraschallkontrastmittel gestützter Dopplersonografie arteriosklerotischer Plaques kann z.B. das Ausmaß der Neovaskularisation innerhalb von ACI-Stenosen bestimmt werden [85-87]. Eine wachsende Evidenz belegt, dass für die Aufrechterhaltung einer entzündlichen Aktivität innerhalb einer Plaue ein gewisses Ausmaß an Neovaskularisation in der Plaue erforderlich ist [88,89]. Dabei ist belegt, dass proportional zur Neovaskularisation das Ausmaß der Infiltration von

Entzündungszellen ansteigt. Die Neovaskularisation dient dabei der Unterhaltung von stoffwechselaktiven Entzündungsprozessen und der Zellinfiltration [90,91].



**Abbildung 15 A-C:** Die Abbildungen A und B zeigen mit unterschiedlicher farblicher Visualisierung Mehranreicherungen von FDG mittels PET bei Patienten mit Arteriopathien. Bei Abbildung 15A handelt es sich um die Aufnahmen einer jungen Frau mit Takayasu-Arteriitis. Bei dieser Erkrankung finden sich ausgedehnte granulomatöse Entzündungsherde in den Arterienwänden der Aorta und ihren Hauptstämmen. Die roten Pfeile markieren FDG-Mehranreicherungen in der Arteria carotis und dem Aortenbogen. Abbildung 15B zeigt FDG-Mehranreicherungen im ehemaligen Operationsgebiet nach ACI-TEA links (blauer Pfeil) bei einer Patientin mit bilateralen symptomatischen ACI-Stenosen. Der rote Pfeil markiert eine geringe FDG-Mehranreicherung im Bereich der kontralateralen Stenose. Die Abbildung 15C zeigt eine Ultraschallkontrastmittel(USKM) aufnehmende arteriosklerotische Läsion einer Patientin mit ACI-Stenose. Der rote Pfeil markiert die arteriosklerotische Plaque und die blauen Pfeile Regionen mit USKM-Aufnahme, die auf eine lokale Neovaskularisation hinweist. Alle Abbildungen entstammen einem eigenen Archiv.

Aufgrund des hohen Weichteilkontrastes bietet die moderne Magnetresonanzttechnik mit zunehmender Feldstärke und unter Ausnutzung innovativer Softwareapplikation

mittlerweile eine hohe Treffsicherheit bei der Identifizierung der wichtigsten Destabilitätsmerkmale [92,93].

Der Nachweis kollagenabbauender Proteasen, wie bestimmter MMPs, stellt eine weitere interessante Option zur Visualisierung dar. Die Darstellung der MMP-Aktivität in arteriosklerotischen Plaques ist in tierexperimentell bereits gelungen [94,95], befindet sich aber für humane Anwendung noch in der Erprobung.

## **6. Zusammenfassung**

Stenosen der Arteria carotis interna (ACI) sind eine häufige Ursache von zerebralen Ischämien. Die arterioarterielle Embolie bzw. der embolisch bedingte Schlaganfall sind bei symptomatischen ACI-Stenosen der häufigste Grund für eine zerebrale Ischämie, während eine hämodynamisch bedingte Ischämie seltener vorkommt. Aus pathophysiologischer Sicht unterscheiden sich beide Schlaganfallmechanismen grundlegend. Die vorliegende Arbeit überprüfte daher, ob ein Unterschied im morphologischen Aufbau von ACI-Plaques zwischen Patienten mit embolischem und hämodynamischem Schlaganfallmechanismus besteht. Hierzu wurden etablierte Plaquestabilitätsmerkmale in Thrombendarterektomiepräparaten von 33 Patienten mit symptomatischer ACI-Stenose analysiert. Patienten mit zugrunde liegendem embolischem Schlaganfallmechanismus wiesen eine signifikant höhere Infiltration von Makrophagen und T-Zellen auf. Die Expression von kollagenabbauenden MMP-9 war ebenfalls in der embolischen Gruppe signifikant stärker. Das Ausmaß der Plaquestabilitätsmerkmale in der hämodynamischen Gruppe unterschied sich nicht von einem vergleichbaren Patientenkollektiv mit asymptomatischen ACI-Stenosen.

In der embolischen Gruppe zeigte sich zudem ein Trend, dass Plaquerupturen, Plaqueschmörungen und Oberflächenthromben sowie vaskuläre Ereignisse im postoperativen Beobachtungszeitraum häufiger auftraten.

Diese Arbeit verdeutlicht, dass nicht alle symptomatischen ACI-Stenosen stark ausgeprägte Plaquestabilitätsmerkmale aufweisen müssen. Dieses Erkenntnis kann man bei der Risikoprofilierung hochgradiger ACI-Stenosen nutzen, um sekundärprophylaktische Optionen anzupassen, auch wenn die Ergebnisse durch größere Studien erneut bestätigt werden müssten. Moderne bildgebende Verfahren eröffnen hierbei die Möglichkeit auch nichtinvasiv Destabilitätsmerkmale zu identifizieren und im weiteren zeitlichen Verlauf zu beurteilen

## 7. **Schriftenverzeichnis**

1. Eckstein HH, Maeder N, Allenberg JR. [Carotid surgery for prophylaxis of ischemic stroke]. *Chirurg* 1999;70:353-363
2. Golledge J, Siew DA. Identifying the carotid 'high risk' plaque: is it still a riddle wrapped up in an enigma? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;35:2-8
3. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 1991;325:445-453
4. Hennerici M, Hulsbomer HB, Hefter H, Lammerts D, Rautenberg W. Natural history of asymptomatic extracranial arterial disease. Results of a long-term prospective study. *Brain* 1987;110 ( Pt 3):777-791
5. Carotid surgery versus medical therapy in asymptomatic carotid stenosis. The CASANOVA Study Group. *Stroke* 1991;22:1229-1235
6. Hobson RW, 2nd, Weiss DG, Fields WS, et al. Efficacy of carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. The Veterans Affairs Cooperative Study Group. *N Engl J Med* 1993;328:221-227
7. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Warlow CP, Barnett HJ. Endarterectomy for symptomatic carotid stenosis in relation to clinical subgroups and timing of surgery. *Lancet* 2004;363:915-924
8. Redgrave JN, Lovett JK, Gallagher PJ, Rothwell PM. Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: the Oxford plaque study. *Circulation* 2006;113:2320-2328
9. Alber HF, Suessenbacher A, Weidinger F. [The role of inflammation in the pathophysiology of acute coronary syndromes]. *Wien Klin Wochenschr* 2005;117:445-455
10. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-671
11. Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000;31:774-781
12. Jander S, Sitzer M, Schumann R, et al. Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. *Stroke* 1998;29:1625-1630
13. Kunte H, Amberger N, Busch MA, et al. Markers of instability in high-risk carotid plaques are reduced by statins. *J Vasc Surg* 2008;47:513-522

14. Szabo K, Kern R, Hennerici MG. Recent advances in imaging in management of symptomatic internal carotid artery disease. *Int J Stroke* 2007;2:97-103
15. Eckstein HH. [Surgical therapy of extracranial carotid stenosis]. *Chirurg* 2004;75:93-110
16. Mead GE, O'Neill PA. Carotid disease in acute stroke: a review. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 1999;8:197-206
17. Badimon JJ, Ibanez B, Cimmino G. Genesis and dynamics of atherosclerotic lesions: implications for early detection. *Cerebrovasc Dis* 2009;27 Suppl 1:38-47
18. Caplan LR. Brain embolism, revisited. *Neurology* 1993;43:1281-1287
19. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J*;74:213-220
20. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241
21. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874
22. Buja LM, Willerson JT. Role of inflammation in coronary plaque disruption. *Circulation* 1994;89:503-505
23. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365-372
24. Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:402-406
25. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-2503
26. Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 2000;31:40-47
27. Higashikata T, Yamagishi M, Higashi T, et al. Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method. *Atherosclerosis* 2006;185:165-172
28. Tziakas DN, Lazarides MK, Tentas IK, et al. Gelatinases [matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9] induce carotid plaque instability but their systemic levels are not predictive of local events. *Ann Vasc Surg* 2005;19:529-533

29. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 1997;96:396-399
30. Moons AH, Levi M, Peters RJ. Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 2002;53:313-325
31. Tremoli E, Camera M, Toschi V, Colli S. Tissue factor in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999;144:273-283
32. Benaglio M, Azzurri A, Ciervo A, et al. T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6658-6663
33. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006;6:508-519
34. Boenisch T. Handbuch Immunchemischen Färbemethoden 3. Auflage. DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg 2003;5-82
35. Cattoretti G, Suurmeijer AJH. *Adv Anatomic Pathol*; 1994;2:2-9
36. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology* 5.Auflage. Saunders, Philadelphia 2003;65-66
37. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, et al. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 2001;103:926-933
38. Weih M, Muller-Nordhorn J, Amberger N, et al. [Risk factors in ischemic stroke. Review of evidence in primary prevention]. *Nervenarzt* 2004;75:324-335
39. Whisnant JP. Modeling of risk factors for ischemic stroke. The Willis Lecture. *Stroke* 1997;28:1840-1844
40. Bassiouny HS, Sakaguchi Y, Mikucki SA, et al. Juxtalumenal location of plaque necrosis and neof ormation in symptomatic carotid stenosis. *J Vasc Surg* 1997;26:585-594
41. Carr SC, Farb A, Pearce WH, Virmani R, Yao JS. Activated inflammatory cells are associated with plaque rupture in carotid artery stenosis. *Surgery* 1997;122:757-763; discussion 763-754

42. Jander S, Sitzer M, Wendt A, et al. Expression of tissue factor in high-grade carotid artery stenosis: association with plaque destabilization. *Stroke* 2001;32:850-854
43. Forster A, Szabo K, Hennerici MG. Pathophysiological concepts of stroke in hemodynamic risk zones--do hypoperfusion and embolism interact? *Nat Clin Pract Neurol* 2008;4:216-225
44. Yong SW, Bang OY, Lee PH, Li WY. Internal and cortical border-zone infarction: clinical and diffusion-weighted imaging features. *Stroke* 2006;37:841-846
45. Momjian-Mayor I, Baron JC. The pathophysiology of watershed infarction in internal carotid artery disease: review of cerebral perfusion studies. *Stroke* 2005;36:567-577
46. Yamauchi H, Fukuyama H, Kimura J, Konishi J, Kameyama M. Hemodynamics in internal carotid artery occlusion examined by positron emission tomography. *Stroke* 1990;21:1400-1406
47. Isaka Y, Nagano K, Narita M, Ashida K, Imaizumi M. High signal intensity on T2-weighted magnetic resonance imaging and cerebral hemodynamic reserve in carotid occlusive disease. *Stroke* 1997;28:354-357
48. Babikian VL, Hyde C, Pochay V, Winter MR. Clinical correlates of high-intensity transient signals detected on transcranial Doppler sonography in patients with cerebrovascular disease. *Stroke* 1994;25:1570-1573
49. Siebler M, Sitzer M, Rose G, Bendfeldt D, Steinmetz H. Silent cerebral embolism caused by neurologically symptomatic high-grade carotid stenosis. Event rates before and after carotid endarterectomy. *Brain* 1993;116 ( Pt 5):1005-1015
50. Sitzer M, Muller W, Siebler M, et al. Plaque ulceration and lumen thrombus are the main sources of cerebral microemboli in high-grade internal carotid artery stenosis. *Stroke* 1995;26:1231-1233
51. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998;351:1379-1387
52. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA* 1995;273:1421-1428
53. Bond R, Rerkasem K, Rothwell PM. Systematic review of the risks of carotid endarterectomy in relation to the clinical indication for and timing of surgery. *Stroke* 2003;34:2290-2301

54. Fisher CJ, Gillett CE, Vojtesek B, Barnes DM, Millis RR. Problems with p53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer* 1994;69:26-31
55. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001;103:276-283
56. Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gomez-Hernandez A, et al. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke* 2005;36:1796-1800
57. Ruifrok AC. Quantification of immunohistochemical staining by color translation and automated thresholding. *Anal Quant Cytol Histol* 1997;19:107-113
58. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 2006;37:1923-1932
59. Jansen O, Fiehler J, Hartmann M, Bruckmann H. Protection or nonprotection in carotid stent angioplasty: the influence of interventional techniques on outcome data from the SPACE Trial. *Stroke* 2009;40:841-846
60. Dalager S, Falk E, Kristensen IB, Paaske WP. Plaque in superficial femoral arteries indicates generalized atherosclerosis and vulnerability to coronary death: an autopsy study. *J Vasc Surg* 2008;47:296-302
61. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-1695
62. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-1057
63. Hennerici M, Aulich A, Sandmann W, Freund HJ. Incidence of asymptomatic extracranial arterial disease. *Stroke* 1981;12:750-758
64. Smith I, Franks PJ, Greenhalgh RM, Poulter NR, Powell JT. The influence of smoking cessation and hypertriglyceridaemia on the progression of peripheral arterial disease and the onset of critical ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;11:402-408
65. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults.

- Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999;340:14-22
66. Norris JW, Zhu CZ, Bornstein NM, Chambers BR. Vascular risks of asymptomatic carotid stenosis. *Stroke* 1991;22:1485-1490
  67. Vink A, Schoneveld AH, Richard W, et al. Plaque burden, arterial remodeling and plaque vulnerability: determined by systemic factors? *J Am Coll Cardiol* 2001;38:718-723
  68. Tsuchiya A, Nagotani S, Hayashi T, et al. Macrophage infiltration, lectin-like oxidized-LDL receptor-1, and monocyte chemoattractant protein-1 are reduced by chronic HMG-CoA reductase inhibition. *Curr Neurovasc Res* 2007;4:268-273
  69. Capurso A. [The promise of statins]. *Ital Heart J Suppl* 2001;2:224-229
  70. Massaro M, Zampolli A, Scoditti E, et al. Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. *Cardiovasc Res*;86:311-320
  71. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-1719
  72. Endres M. Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:1093-1110
  73. Kwak BR, Mulhaupt F, Mach F. Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. *Autoimmun Rev* 2003;2:332-338
  74. Bellosta S, Via D, Canavesi M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1671-1678
  75. Paciaroni M, Hennerici M, Agnelli G, Bogousslavsky J. Statins and stroke prevention. *Cerebrovasc Dis* 2007;24:170-182
  76. Amarenco P, Labreuche J, Lavallee P, Touboul PJ. Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke* 2004;35:2902-2909
  77. Amarenco P, Goldstein LB, Szarek M, et al. Effects of intense low-density lipoprotein cholesterol reduction in patients with stroke or transient ischemic attack: the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) trial. *Stroke* 2007;38:3198-3204
  78. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 2002;8:1235-1242

79. Tawakol A, Migrino RQ, Bashian GG, et al. In vivo 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging provides a noninvasive measure of carotid plaque inflammation in patients. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1818-1824
80. Rudd JH, Warburton EA, Fryer TD, et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation* 2002;105:2708-2711
81. Tahara N, Kai H, Ishibashi M, et al. Simvastatin attenuates plaque inflammation: evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1825-1831
82. Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, et al. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;107:2453-2458
83. Schmitz SA, Coupland SE, Gust R, et al. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe hereditary hyperlipidemic rabbits. *Invest Radiol* 2000;35:460-471
84. Schmitz SA, Taupitz M, Wagner S, et al. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles. *J Magn Reson Imaging* 2001;14:355-361
85. Shah F, Balan P, Weinberg M, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of atherosclerotic carotid plaque neovascularization: a new surrogate marker of atherosclerosis? *Vasc Med* 2007;12:291-297
86. Staub D, Patel MB, Tibrewala A, et al. Vasa vasorum and plaque neovascularization on contrast-enhanced carotid ultrasound imaging correlates with cardiovascular disease and past cardiovascular events. *Stroke*;41:41-47
87. Staub D, Schinkel AF, Coll B, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of the vasa vasorum: from early atherosclerosis to the identification of unstable plaques. *JACC Cardiovasc Imaging*;3:761-771
88. Coli S, Magnoni M, Sangiorgi G, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of intraplaque neovascularization in carotid arteries: correlation with histology and plaque echogenicity. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:223-230
89. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2054-2061

90. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003;349:2316-2325
91. Sluimer JC, Gasc JM, van Wanroij JL, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1258-1265
92. Wasserman BA. Advanced contrast-enhanced MRI for looking beyond the lumen to predict stroke: building a risk profile for carotid plaque. *Stroke*;41:S12-16
93. Watanabe Y, Nagayama M. MR plaque imaging of the carotid artery. *Neuroradiology*;52:253-274
94. Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH, et al. Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation* 2006;114:55-62
95. Schafers M, Riemann B, Kopka K, et al. Scintigraphic imaging of matrix metalloproteinase activity in the arterial wall in vivo. *Circulation* 2004;109:2554-2559

## **8. Anhang**

### **8.1 Danksagung**

Die vorliegende Arbeit hätte nicht ohne die Hilfe und die Ratschläge eines großen Personenkreises zustande kommen können. Ich möchte allen direkt oder indirekt Beteiligten danken.

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. L. Harms aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Charité–Universitätsmedizin Berlin, für die Anregung zum Thema der Arbeit. Seine Ideen und Vorstellungskraft haben die vorliegende Arbeit nicht nur initiiert, sondern auch ständig mit konstruktiven Gedanken begleitet.

Mein besonderer Dank richtet sich an meinen Bruder Hagen, Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Charité–Universitätsmedizin Berlin. Durch seinen Einsatz und seine vielfältige Unterstützung hatte er am Gelingen dieser Arbeit einen besonderen Anteil hatte.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Weichert aus dem Pathologischem Institut des Universitätsklinikums Heidelberg und Herrn PD Dr. R.-I. Rückert, Chefarzt der Chirurgie des Franziskus-Krankenhauses in Berlin, für die exzellente Zusammenarbeit und die vielen außerordentlich fundierten Ratschläge danken.

Dr. M. A. Busch vom Robert-Koch-Institut gilt mein Dank für die Planung und die statistische Beratung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Schließlich gilt mein herzlichster Dank meiner Familie und meinen Freunden für das entgegengebrachte Verständnis und die stete Unterstützung in jeglicher Beziehung. Abschließend möchte ich mich bei allen Patientinnen und Patienten bedanken, die sich für die Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt haben.

## **8.2 Lebenslauf**

“Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

### 8.3 Erklärung

„Ich, Gerolf Kunte, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Morphologische Plaqueunterschiede von symptomatischen Stenosen der Arteria carotis interna bei Patienten mit embolischem und hämodynamischem Schlaganfallmechanismus** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift