

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Definition der Atherosklerose**

Nach Definition der WHO (World Health Organisation 2003) ist die Atherosklerose eine variable Kombination von Veränderungen der Arterienintima. Sie kann mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlehydraten, Blut und Blutbestandteilen sowie mit der Bildung eines fibrösen Gewebes und mit Kalkablagerungen einhergehen und mit Veränderungen der Arterienmedia verbunden sein. Atherosklerose und Arteriosklerose werden häufig synonym gebraucht.

### **2.2 Bedeutung der Atherosklerose**

Atherosklerose ist eine chronische, häufig rezidivierende, nicht selten schon in früher Jugend beginnende Erkrankung vorwiegend der Intima, die lange Zeit asymptomatisch abläuft (WEINMANN 1991). Selbst wenn der Blutfluss durch langsames, aber stetiges Wachstum der Plaque behindert wird, sich z.B. eine Angina pectoris entwickelt, handelt es sich um einen relativ stabilen Zustand, der sich viele Jahre halten kann. Wenn die Plaque allerdings plötzlich aufreißt, kommt es durch thrombotische Prozesse zum akuten Infarkt im von der betroffenen Arterie nunmehr minderversorgten Gebiet, der in vielen Fällen tödlich endet (ARROYO und LEE 1999).

Herzinfarkt, Schlaganfall, Thrombose oder Embolie zählen zu den sogenannten atherosklerotischen Folgeerkrankungen. Gemäß Presseveröffentlichung des Statistischen Bundesamtes (DESTATIS 2004) starben im Jahr 2002 in Deutschland 393.778 Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. Dies sind 46,8 % aller Todesfälle. Einer Neoplasie erlagen zum Vergleich im selben Jahr ca. ein Viertel der Verstorbenen (25,6 %). Weltweit sterben jedes Jahr 16,5 Millionen (ein Drittel), europaweit mehr als 4 Millionen Menschen an Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen (WHO 2003). Trotz bewussterer Lebensweise und der Anwendung neuer Pharmaka zur Blutfettreduzierung (Statine) bleibt die Atherosklerose mit ihren Folgeerkrankungen die Haupttodesursache in der westlichen Welt (ROSS 1999). Atherosklerose erlangt auch erhebliche Bedeutung, wenn man die nicht tödlichen Folgeerscheinungen betrachtet. Im Jahr 2002 entstanden in Deutschland nach der Krankheitskostenrechnung des Statistischen Bundesamtes durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen Kosten von 35,4 Mrd. Euro. Das entsprach rund einem Sechstel oder 16% der gesamten Krankheitskosten im Jahr 2002 in Höhe von 223,6 Mrd. Euro (DESTATIS 2004). In den USA ereignen sich pro Jahr ca. 750.000 Herzinfarkte, ein Drittel davon endet tödlich, die Hälfte der überlebenden zwei Drittel behält bleibende Schäden; so entstehen den USA Kosten von ca. 40 Billionen Dollar. Weltweit beruhen 0,5 % der Berufsunfähigkeit auf Behinderungen durch

Atherosklerose (YUAN et al 2001). Hochrechnungen zufolge werden 2010 Kardiovaskuläre Krankheiten in der westlichen Welt die Todesursache Nr. 1 sein (WHO 2003).

### 2.3 Risikofaktoren der Atherosklerose

Risikofaktoren begünstigen die Entstehung und Progression der Atherosklerose (WHO 2003).

Tabelle 1: Risikofaktoren der Atherosklerose (WEINMANN 1991; WHO 2003)

Beeinflussbare Risikofaktoren	Nicht beeinflussbare Risikofaktoren
• Nikotinkonsum,	• Familiäre Disposition
• Übergewicht	• Alter
• Bewegungsmangel	• Männliches Geschlecht
• Falsche Ernährung (Zucker, gesättigte Fettsäuren)	• Erhöhte Lipoproteinspiegel
	• Diabetes mellitus
	• Hyper- und Dyslipoproteinämien
	• Arterielle Hypertonie

### 2.4 Hypothesen zur Atherogenese

Hinsichtlich der Initiierung der Atherosklerose existieren verschiedene Hypothesen. Hier soll nur eine vereinfachte Darstellung gegeben werden: Die *Infiltrations- oder Perfusions*-Theorie geht von einer starken Lipidanreicherung aufgrund hoher Blutfettwerte aus dem luminalen in den intimalen Raum aus. Die Oxidationsprodukte der Lipide schädigen dann die Endothelzellen von innen (WOLFRAM 1990). Nach der *Atherosclerosis is an inflammatory disease*-These bzw. *Response to Injury*-Hypothese (Endothelläsionstheorie) reichern sich nach initialer Schädigung des Endothels bei gleichzeitig hohen Blutfettwerten LDL-Lipoproteine innerhalb der Intima an. Die Endothelschädigung kann mechanischer, chemischer oder viraler Natur sein (ROSS 1993). Die atherosklerotische Läsion repräsentiert für ROSS weiterhin eine Serie hoch spezifischer, zellulärer und molekularer Reaktionen, die zusammengefasst als Entzündungs-Reaktionen beschrieben werden können und mit einem Intimaödem beginnen (ROSS 1986 und 1999). Durch das Eindringen von Plasma aufgrund einer Endothelschädigung kommt es zu einer Verquellung durch Depolymerisation von Mukopolysacchariden der Grundsubstanz, aus der wiederum eine Wasserbindung resultiert. Auf diesen Reiz reagiert das Gewebe mit einer Proliferation und gesteigerten Synthese von Mukopolysacchariden und Kollagenen. Folge ist eine Verhärtung, eine Sklerose. Außerdem kann Kalk eingelagert werden. Die Schädigung der Wand kann so stark sein, dass es zur Quellungsnekrose durch Zerfall von Bindegewebszellen kommt. Die Anreicherung mit Serumlipiden mit dem Plasma führt zu herdförmigen Fettablagerungen in der Intima und Media, die zwischen dem nekrotischen Material z.T. auskristallisieren zu

Kristallnadeln. Die Fette liegen als Lipoproteine und Cholesterin extrazellulär oder in später wiederum zerfallenden Lipophagen (Schaumzellen) und Mediozyten gespeichert vor. Aus Fettansammlungen und Nekrosen entstehen die Atherome (gr. *athere* = Mehlbrei) der Intima, die gelegentlich auch verkalken (Fettkalk) (BÖCKER et al 2004). Die *Atherosclerosis is an inflammatory disease*-These stützt ROSS auf die Tatsache, dass die frühen Formen der Atherosklerose, sogenannte *fatty Streaks* der Kinder und Jugendlichen, eine reine Entzündungsreaktion darstellen, in der ausschließlich Makrophagen und Monozyten vorkommen. STÜNZI und WEISS (1990) gehen von einer initialen Endothelschädigung als Ursache der Insudation und Thrombozyten-Aggregation aus; bestimmte Thrombozytenfaktoren führen dann zur nachfolgenden Proliferation von Myo- und Fibroblasten, sowie zur Bildung eines fehlerhaften Kollagens, dem starren Kollagenfasertyp I anstelle von III.

## 2.5 Physiologischer Lipidstoffwechsel

Lipide spielen eine wichtige Rolle im Organismus von Menschen und Tieren, ihre Fettsäuren besitzen vier bedeutende physiologische Aufgaben (KARLSON et al 1994):

1. Sie sind Bausteine von Phospholipiden und Glykolipiden und stellen als amphiphatische Moleküle wichtige Bestandteile von Membranen dar.
2. Fettsäurederivate (Cholesterinbausteine) dienen als Hormone und intrazelluläre Signalmoleküle.
3. Fettsäuren werden als energiereiche Brennstoffmoleküle in Form von Triacylglycerinen (Neutralfette) gespeichert.
4. Fettsäuren dienen zur lipophilen Modifikation von Proteinen.

Cholesterin und Triacylglycerine werden in Körperflüssigkeiten in Form von Lipoproteinpartikeln transportiert. Die Proteinkomponenten haben außer der Solubilisierung der hydrophoben Lipide die Funktion der Beeinflussbarkeit durch Signale, die den Transport zu bestimmten Zellen regulieren. Lipoproteine werden nach steigender Dichte klassifiziert (KARLSON et al 1994; STRYER 1995):

- Chylomikronen,
- Chylomikronen-Remnants,
- Lipoproteine sehr geringer Dichte (very-low-density-lipoproteins, VLDL),
- Lipoproteine geringer Dichte (low-density-lipoproteins, LDL) und
- Lipoproteine hoher Dichte (high-density-lipoproteins, HDL).

Lipoproteine bestehen im Kern aus hydrophoben Lipiden, die von einer Hülle polarer Lipide und Apoproteinen umgeben sind. Apoproteine sind Proteine ohne biologisch aktive, fest gebundene und nicht-peptidische Einheiten, den prosthetischen Gruppen.

Die Nahrungsfette können nach Emulgierung durch den Gallensaft als freie Fettsäuren und Monoacylglycerol aus dem Darm resorbiert werden. Zur Löslichkeit im wässrigen Medium an Chylomikronen gebunden gelangen die Triacylglycerine, Cholesterin, Fette und Phosphatide über die Darmlymphe und Ductus thoracicus in das venöse System zur Leber. Die Leber ist das Zentralorgan des Fettstoffwechsels, eine Lipoprotein-Lipase spaltet hier, wie auch bereits im Blut, die Triacylglycerine in freie Fettsäuren. An Albumin gebunden werden diese dann der Peripherie angeboten. In der Leber synthetisierte Lipide werden mit Hilfe von Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL), die ebenfalls in der Leber synthetisiert werden, im Organismus verteilt. VLDL werden im Blut durch Einwirkung einer Lipoproteinase enzymatisch verändert und gehen in Lipoproteine geringer Dichte (LDL) über. Periphere Gewebe können diese rezeptorvermittelt aufnehmen (LDL Rezeptoren sind spezifisch für Apo-B der LDL), die LDL-Partikel in den Lysosomen abbauen und Cholesterin freisetzen. Auf diese Weise werden die Zellen mit Cholesterin versorgt. Erhöhte LDL Blutwerte führen allerdings zur gesteigerten Aufnahme von Cholesterinestern in die Zellen der Blutgefäßwände, in denen sie sich ablagern und die Atherosklerose initiieren (KARLSON et al 1994; STRYER 1995).

HDL (Lipoproteine hoher Dichte) werden in der Leber und im Darm hergestellt; im Blut nehmen die diskoidalen Partikel durch Einlagerung von Apoproteinen, Phospholipiden und Cholesterin eine runde Form an. Freies Cholesterin sowie in Gefäßwänden eingelagertes Cholesterin wird von HDL eingefangen, verestert im hydrophoben Kern gespeichert und zur Leber transportiert. Die Leber baut die überschüssigen Cholesterinester von HDL zu Gallensäuren ab (KARLSON et al 1994).

Phospho- und Glykolipide ordnen sich in wässrigen Medien als Mizellen an: Die polaren Köpfe der Moleküle liegen bei dieser kugeligen Struktur an der Oberfläche, und die lipophilen Kohlenwasserstoffschwänze sind nach innen orientiert. Eine andere Anordnung dieser amphipathischen Moleküle ist eine bimolekulare Schicht, auch Lipiddoppelschicht genannt. Sind die Fettsäureketten zu sperrig, um in das Innere einer Mizelle zu passen, dann bilden sich bevorzugt Lipiddoppelschichten. Fettsäuren, die nur eine Kohlenwasserstoffkette besitzen, bilden bevorzugt Mizellen.

Lipidvesikel sind wässrige Kompartimente, die von einer Lipiddoppelschicht umgeben sind. Biologisch kommen sie als Liposomen vor, künstlich herstellen kann man sie, indem man ein geeignetes Lipid in einem wässrigen Medium suspendiert und diese Mischung dann mit Ultraschall beschallt. Die entstandenen Vesikel sind von relativ einheitlicher Größe. Ionen oder

Moleküle, auch Farbstoffe können im wässrigen Inneren solcher Vesikel eingeschlossen werden, wenn man die Lipidvesikel in ihrer Gegenwart herstellt (STRYER 1995).

## 2.6 Pathogenese / Atherogenese

Als progressive Erkrankung ist die Atherosklerose durch eine Lipidakkumulation und Faserbildung in den großen Arterien charakterisiert. Zu Beginn gelangen Low Density Lipoproteine aufgrund erhöhter LDL-Plasmaspiegel oder aufgrund von Endotheldefekten (Entzündungsgeschehen) in den subendothelialen Raum, wo sie akkumulieren und z.B. durch Sauerstoffradikale oxidiert (PALINSKI et al 1989) oder anderweitig modifiziert werden (HOFF und O'NEIL 1991). Oxidierte LDL Partikel wirken chemotaktisch auf Monozyten, so dass diese adhäsionsvermittelt (Endothelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche) durch Endotheljunctions hindurch rekrutiert werden und sich in lipidphagozytierende Makrophagen differenzieren (GERRITY 1981; GERRITY et al 1985; VAN DER WAL et al 1992; ROSS 1999). Makrophagen nehmen modifizierte LDL über Scavenger-Rezeptoren ungehemmt bis zu ihrer Überladung und Transformation in Schaumzellen auf (HOFF und O'NEIL 1991). Oxidiertes LDL besitzt neben der chemotaktischen Wirkung auf Blutmonozyten auch zytotoxische Wirkungen auf Endothel- und glatte Muskelzellen (MOREL et al 1984). Die im Plaque ansässigen Schaumzellen und aktivierten Makrophagen setzen ihrerseits Radikale frei, die unter anderem die LDL-Partikel oxidieren, es entsteht ein Circulus vitiosus (CATHCART et al 1985; LEAKE und RANKIN 1990; CATHCART et al 1991; YLA-HERTTUALA 1991; CATHCART et al 1995; LIBBY et al 2000).

Elektronenmikroskopische Studien konnten bereits in frühen Stadien eine Lipidakkumulation innerhalb der Intima nachweisen. Die Intima, bestehend aus Kollagenfasern und unterschiedlich dicken Matrixfilamenten (Proteoglykane / Glykosaminoglykane), enthält traubenartig angeordnete, 30 bis 66 nm große Lipidtröpfchen, wobei die kleineren in Größere zusammenfließen. Bemerkenswert ist die Ansammlung der Lipidtröpfchen entlang kollagener Fasern und deren Verbindung mit dünnen Matrixfasern (FRANK und FOGELMANN 1989; HOFF und O'NEIL 1991; NIEVELSTEIN et al 1991; GUYTON und KLEMP 1993; TAMMINEN et al 1999).

Bei der passiven Diffusion von LDL durch Endothelzelljunctions in das Plaueinnere scheinen Interaktionen zwischen Apoprotein B, sulfatierten Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen innerhalb der Plaquematrix eine Rolle zu spielen (BERENSON et al 1984). Durch hohe Blut-LDL-Spiegel diffundieren LDL in die Blutgefäßwände und oxidieren. Das in der Matrix vorliegende oxidierte LDL stimuliert die Endothelzellen zur Heparanase-Synthese, so dass die Fibronectine der Matrix von Heparan-Sulfat-Proteoglykanen durch Heparanase demaskiert werden. Im Beisein

von Kollagen I und Fibronectin wird die Affinität des Proteoglykan Decorin der Matrix zu LDL verstärkt und bewirkt einen verstärkten LDL-Influx (TAMMINEN et al 1999).

Makrophagen sind gewebsständige, fressende und Antigen-präsentierende Zellen, die in atherosklerotischen Läsionen Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Metalloproteinasen und andere hydrolytische Enzyme sezernieren. Wenn die stark lipidhaltigen Schaumzellen absterben, entlassen sie ihren fettigen Inhalt in die Matrix, wo er sich zusammen mit nekrotischen Zellresten zum Lipid Core sammelt (ROSS 1999). Das Lipid Core besteht vorwiegend aus Zeroid und Makrophagenüberresten (BALL et al 1995).

Die Stabilität einer Plaque ist insbesondere abhängig von der Balance zwischen Entzündungs- und Reparationsmechanismen (VAN DER WAL und BECKER 1999). Die Anwesenheit von Entzündungszellen besitzt zunächst einen protektiven Hintergrund, denn die Entzündungsreaktion soll die ursächlichen Faktoren der Atherosklerose beseitigen. Gleichzeitig sezernieren sie aber Entzündungsmediatoren, Radikale und Produkte wie Metalloproteasen, die in der Lage sind, umliegende Gewebe stark zu schädigen (MUNRO und COTRAN 1988; ROSS 1993; GALIS et al 1994; DOLLERY et al 1995; NIKKARI et al 1995; LUSIS 2000; LIBBY 2002).

Als Reparationsmechanismus des Organismus wandern glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima ein und konvertieren in modifizierte glatte Muskelzellen, die innerhalb der Läsion stark proliferieren. Via LDL-Rezeptoren sind sie ebenfalls zur Lipidphagozytose (BUJA et al 1983; GUYTON 1993) befähigt. Neben Wachstumsfaktoren und Zytokinen sezernieren sie vor allem Matrixproteine wie z.B. Kollagen, Elastin und verschiedene Proteoglykane (CAMPBELL et al 1988). Die nekrotischen Schaumzellmassen im Lipid Core stammen vorwiegend von Zellen, die sich immunhistologisch als Makrophagen nachweisen lassen, so dass hier nicht von einer exzessiven Lipidphagozytose und Apoptose glatter Muskelzellen gesprochen werden kann (BALL et al 1995). Das Plaquewachstum entwickelt sich zunächst in Richtung Adventitia, die Media dilatiert hierzu. Erst später wenn die Kompensationskapazität, also ein kritischer Punkt erreicht wird, beginnt die Plaque das Lumen zunehmend einzuengen (GLAGOW et al 1987). Die Proliferation der glatten Muskelzellen sowie die Bildung der Matrix tragen neben der Reparation zur Stabilisierung der Plaquearchitektur bei (LIBBY 1995; NEWBY 1997; VAN DER WAL et al 1997), repräsentieren aber auch die Hauptursache des progressiven Charakters einer Atherosklerose (REKHTER 1999). Durch die Sezernierung von Matrixproteinen und Kollagenen kann sich ein sogenanntes fibrous Cap bilden, das thrombogenes Material des Lipidkerns vom Blut trennt und die Plaquearchitektur stabilisiert. Das fibrous Cap besteht aus Kollagenen vom Typ I, III und V (OOSHIMA und MURAGAKI 1990, REKHTER et al 1998), Elastin und Proteoglykanen (ARROYO et al 1999).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen Verkalkungen innerhalb der Plaque als elektronendichte und rundliche Gebilde inmitten von Cholesterinnadeln, assoziiert mit Lipidablagerungen (GUYTON und KLEMP 1993). Die Mechanismen der atherosklerotischen Verkalkungen sind dystrophischer Natur, d.h. Kalksalze fallen im alkalischen Milieu von Nekrosen aus (STÜNZI und WEISS 1990; DEMER et al 1994). Kalziumgranula wurden in Untersuchungen häufig intrazellulär in modifizierten glatten Muskelzellen gefunden, bei deren Apoptose gelangen diese dann in den Extrazellulärraum. Als zur Verkalkung neigende Strukturen gelten zudem sogenannte Matrixvesikel, Zellmembranen und membranöse Komplexe. Auch die Überbleibsel der Schaumzellen, glatten Muskelzellen und intakten oder veralteten elastischen Fasern neigen zur Verkalkung. Vorhandene Verkalkungen wurden in Untersuchungen immer in der Tiefe und der Nähe des Lipid Core vorgefunden, eine Korrelation erscheint naheliegend (DEMER et al 1994). Aber auch Metaplasien (Differenzierungsänderung) innerhalb von Plaques älterer Menschen sind denkbar. Das Mineral verkalkter Plaques wurde nach seiner Isolierung als Hydroxyapatit identifiziert. Man nimmt an, dass die metaplastische Knochenbildung in Plaques der Osteogenese ähnelt, da auch knochentypische Proteine, wie Osteopontin, Osteonektin und Osteokalzin innerhalb verkalkter Arterienwände nachgewiesen werden konnten. Ein bestimmter Faktor oder ein Signal führt wahrscheinlich zur Proteinexpression, welche die Osteogenese einleitet, indem pluripotente Zellen innerhalb der Arterienwand Knochenmatrix und Hydroxyapatit synthetisieren (STARY 2000a; STARY 2001). In vitro konnten isolierte Mediozyten zur Bildung von Knochensubstanz gebracht werden (DEMER et al 1993). Das Bestehen einer Verkalkung innerhalb der Koronarien ist assoziiert mit einer ungünstigen Prognose. Autopsien ergaben eine Korrelation zwischen Verkalkungen und einem erhöhten Herzinfarktisiko unabhängig vom Alter der Patienten. Man nimmt an, dass Kalkablagerungen innerhalb der Intima zu gesteigertem mechanischem Stress führen und die Gefahr einer Plaqueruptur sich damit erhöht. Ein Kalziumbefund innerhalb von Gefäßwänden lässt zudem immer auf eine sehr fettreiche atherosklerotische Läsion schließen, weshalb Verkalkungen innerhalb atherosklerotischer Läsionen immer auf einen gefährlichen, instabilen Plaque deuten (DEMER et al 1994; STARY 2000 a; STARY 2001).

Eine Thrombose ereignet sich, wenn die subendothelialen Strukturen durch Plaqueruptur in Kontakt mit Blutbestandteilen kommen: Blutplättchen verklumpen und die Fibrinkaskade wird initiiert (FALK 1992). Erst in diesem Stadium treten Symptome einer Atherosklerose, wie Durchblutungsstörungen und Gefäßverschlüsse sowie deren mögliche Folgeerkrankungen für den Betroffenen klinisch in Erscheinung.

## 2.7 Einteilung von Plaquestadien

Es existieren mehrere Möglichkeiten der Einteilung von Plaquestadien, sie orientieren sich jeweils an die Atherogenese beim Menschen.

Anfang des 20. Jahrhunderts waren zwei Typen intimaler Läsionen bekannt: fatty Streaks, dünne Fettablagerungen innerhalb einer nicht verdickten Intima bei Kindern und fibröse Plaques, die dicken, fibrösen und fetthaltigen Läsionen von Erwachsenen. Der Pathologe ASCHOFF (1930) entdeckte zwei Komponenten der Gefäßkrankheit: Er differenzierte morphologisch die fettigen Bestandteile als Atherom und die kollagenen Bestandteile als Fibrose (Sklerose), nur im Falle des Vorkommens beider Bestandteile innerhalb einer Plaque sprach er von Atherosklerose. Er nahm eine Einteilung in drei Stadien vor: Atherosclerosis bei Kindern, Atherosclerosis bei Jugendlichen (intra- und extrazelluläre Lipidansammlungen) und Atherosclerosis (fibrolipid lesions) bei Erwachsenen (STARY et al 1995).

Die weltweit gültige Einteilung der WHO 2003 besteht aus vier Stadien: Mit dem Stadium 0 wird die normale Arterie bezeichnet; Frühe Läsionen, die sogenannten, makroskopisch sichtbaren, fettigen Streifen gehören zum Stadium I, fortgeschrittene Läsionen mit fibrösen Anteilen gehören zum Stadium II und komplizierte Läsionen, die manifeste Folgekrankheiten verursachen, zählt man zum Stadium III.

Weltweit anerkannt ist auch die Einteilung der American Heart Association (VIRMANI et al 2000): Die AHA unterteilt die Atherosklerose in 6 verschiedene Typen:

- **Typ 0** zeigt noch keine Intima-Verdickung.
- Bei **Typ I** treten inapparente, initiale Läsionen auf, die darin befindlichen Makrophagen enthalten oxidierte Lipidtröpfchen.
- Die sogenannten fatty Streaks treten beim **Typ II** auf, diese beinhalten bereits lipidgefüllte Schaumzellen und mit Lipidtröpfchen gefüllte glatte Muskelzellen, so dass dieser Typ bereits klinisch manifest ist.
- **Typ III**, Präatherom genannt, ist bereits makroskopisch als fettiger Streifen sichtbar und enthält viele kleine extrazelluläre Lipidablagerungen, Schaumzellen und eine große Anzahl an Myozyten.
- Bei **Typ IV**, Atherome genannt, sind große und kleinere Lipidablagerungen vorhanden, so dass man bereits von einem fettigen Core spricht. Das Lipid Core wird von einer proteoglykanreichen Schicht überzogen, welche viele Schaumzellen und modifizierte glatte Muskelzellen enthalten kann.
- Typ V teilt sich in **Typ Va, Vb** und **Vc** auf:



- Typ Va wird Fibroatherom bezeichnet, und ist gekennzeichnet durch ein fibrous Cap. Eventuell können kleinere Verkalkungen vorkommen.
- Typ Vb nennt man verkalkte Plaque, sie enthält neben dem Lipid Core und dem fibrous Cap großflächige Verkalkungen.
- Typ Vc wird faserige oder fibröse Plaque genannt, sie enthält viele bindegewebige Fasern, aber kein Lipid Core.
- **Typ VI** ist eine Plaque mit großflächigen Hämorrhagien oder Thrombosen.

Die Einteilung der AHA wurde zur Charakterisierung von Atherosklerose in magnetresonanztomographischen In-vitro-Untersuchungen durch SERFATY et al (2001) folgendermaßen abgewandelt:

- **Typ 0** zeigt keine intimalen Veränderungen
- **Typ I und II** stellen dünne Plaques dar, welche das Gefäßlumen weniger als 10 % einengen
- **Typ III** wird durch ein kleines Lipid Core und nur vereinzelter Verkalkungen charakterisiert
- **Typ IV und Va** sind Plaques mit einem großen Lipid Core und einem fibrous Cap, sowie vereinzelter Verkalkungen
- **Typ V b** sind Plaques mit großem Lipid Core, einem fibrous Cap und großflächiger Verkalkung
- Dagegen stellt **Typ Vc** eine Plaque mit vielen bindegewebigen Fasern und wenig Verkalkungen dar, ein Lipid Core fehlt
- **Typ Vlb-c** stellen Plaques mit Hämorrhagien und/oder Thromben dar

Ein universelles morphologisches Schema für atherosklerotische Läsionen von VIRMANI et al (2000) und STARY (2000b) gewinnt zunehmend an Bedeutung. Es wurde entwickelt, weil sich die mit Buchstaben modifizierten Zahlen schwer einprägen ließen und ihre Anordnung einen linearen Verlauf der Progression implizieren könnte. Die Einteilung erfolgte entsprechend auf Grundlage histologischer Untersuchungen menschlicher Atherosklerose und erfolgte ohne Zahlenvergabe:

- Nicht-atherosklerotische Läsion mit intimaler Verdickung: Glatte Muskelzellen in normaler Anzahl, Lipide und Schaumzellen kommen in der Intima nicht vor.
- Nicht-atherosklerotische Läsion mit intimalem Xanthom (fatty Streaks): Luminal befinden sich Schaumzellen, es ist kein necrotic Core und kein fibrous Cap vorhanden.
- Progressive atherosklerotische Läsion mit pathologischer intimaler Verdickung: Myozyten befinden sich in einer proteoglykanreichen Matrix mit extrazellulären Lipidanteilen; es ist kein Necrotic Core und kein fibrous Cap vorhanden.

- Läsion mit luminaler Thrombose: Progressive, atherosklerotische Läsion mit pathologischer, intimaler Verdickung und Erosion.
- Die progressive atherosklerotische Läsion mit fibrous Cap und Atherom: Die Läsion enthält ein großes nekrotic Core mit einem darüber liegenden fibrous Cap.
- Die progressive atherosklerotische Läsion mit fibrous Cap, Atherom und Erosion: Luminal thrombotische Läsion, zwischen Thrombus und necrotic Core besteht kein Kontakt.
- Die progressive atherosklerotische Läsion mit dünnem fibrous Cap und Atherom besitzt ein dünnes fibrous Cap, welches mit Entzündungszellen infiltriert ist, aber wenig glatte Muskelzellen enthält; darunter liegt das necrotic Core.
- Die progressive atherosklerotische Läsion mit dünnem fibrous Cap und Atherom, Zusatz Plaqueruptur: Fibroatherom mit gerissenem fibrous Cap, der Inhalt des necrotic Core steht mit dem entstehenden Thrombus in Kontakt.
- Die progressive atherosklerotische Läsion mit klumpigen Verkalkungen: Über der fibrokalzifizierten Plaque befinden sich klumpige, eruptive Verkalkungen.
- Die progressive atherosklerotische Läsion mit Verkalkungen (fibrokalzifizierte Plaque) stellt eine kollagenreiche Plaque mit signifikanter Stenose dar, die reich an verkalkten Arealen und arm an Entzündungszellen ist. Ein necrotic Core kommt nicht immer vor.

In eigenen histo-morphologischen Untersuchungen ergaben sich Schwierigkeiten, die Befunde nach den genannten Schemata einzuordnen.

## 2.8 Mechanismen der Plaqueprogression

Die atherosklerotische Plaque wächst progressiv aufgrund verschiedener Mechanismen. Hierzu zählen die kontinuierliche Migration von mononukleären Zellen aus dem Blut, Zellproliferation innerhalb der Läsion, Produktion extrazellulärer Matrix und die ununterbrochene Lipidaufnahme. Halten die externen atherogenen Faktoren, wie Bluthochdruck oder Hypercholesterinämie an, resultiert daraus eine anhaltende Entzündungsreaktion, so dass sich aus einer physiologischen Regeneration geschädigter Gewebe ein überschießendes Ereignis entwickelt, die pathologische Regeneration oder Reparatur (ROSS 1999). Sogenannte Überschussgerate bilden sich bei sehr lang anhaltenden Regenerationsvorgängen oder bei sich wiederholenden oder andauernd einwirkenden Reizen, betroffene Zellen können sich umdifferenzieren (Metaplasie) oder entarten (autonom-neoplastische Entartung). Wo keine Regeneration möglich ist, erfolgt ein Versuch der Heilung durch Reparatur mit Hilfe eines sogenannten Granulationsgewebes (bestehend aus Fibroangioblasten, Granulozyten, Makrophagen, später auch Lymphozyten und Plasmazellen), welches von Fasergewebe durchzogen wird (STÜNZI und WEISS 1990; ROSS 1999).

## 2.9 Mechanismen der Plaqueruptur

Mehr als 70 % der tödlich endenden Herzinfarkte werden ohne klinische Vorwarnung durch eine plötzlich aufreißende Plaque verursacht. Als besonders gefährlich gelten solche Plaques, die aufgrund ihrer Zusammensetzung zum Reißen neigen, das Lumen selbst (Stenose) jedoch noch nicht verengen und deshalb mit herkömmlichen Methoden der bildgebenden Diagnostik nicht feststellbar sind (FALK 1992; SCHROEDER und FALK 1996).

FALK(1983) und DAVIES und THOMAS (1985) benutzten den Ausdruck *plaque disruption* synonym mit *plaque rupture*. Später benutzten MULLER et al (1989 und 1994) den Ausdruck *vulnerable* um *rupture-prone plaques* (zum Reißen neigende Plaques) zu beschreiben (NAGHAVI 2003). Folgende Kriterien erfüllt eine vulnerable Plaque:

- Ein großes atheromatöses Core (FUSTER et al 1992; MORENO et al 2002),
- Ein dünnes fibrous Cap oberhalb des Atheroms (FUSTER et al 1994; MORENO et al 2002),
- Entzündungsprozesse innerhalb des fibrous Cap (WILLERSON et al 1989), bzw. entzündungszellreiche Plaque (MORENO et al 2002),
- Ermüdung des fibrösen, mechanisch stabilisierenden fibrous Cap (SHAH und FORRESTER 1991).

Die Faktoren triggern sich gegenseitig, d.h. je mehr dieser Faktoren erfüllt werden, desto gefährdeter ist die Plaque zu reißen (SHAH 1999, WINDHOVER 2001).

Makrophagenreiche Plaques neigen durch Erweichen der Matrix zum Platzen bzw. Aufreißen, da die freigesetzten lytischen Enzyme zur Degeneration des fibrous Cap führen. In Untersuchungen führten makrophagenreiche Plaques signifikant häufiger zu akuten, klinischen Herz-Kreislaufkrankungen als makrophagenarme Plaques. Eine große Anzahl von Makrophagen ist aufgrund dieser Studie als Marker unstabiler Plaques zu betrachten, da diese scheinbar eine große Rolle in der Pathophysiologie akuter koronarer Syndrome spielen (MORENO et al 1994; VAN DER WAL et al 1994). Von diagnostischer Bedeutung wäre deshalb ein Makrophagenmarker.

Mehr als 50 %vol Fettanteil im Atherom überschreitet nach DAVIES (1995) ebenfalls eine sogenannte kritische Grenze: Die Plaques sind gefährdet zu reißen. Ein großer Lipidkern allein reicht allerdings nicht zum Aufreißen einer Plaque (VAN DER WAL und BECKER 1999). Der atheromatöse Kern ist reich an extrazellulären Lipiden, vor allem an Cholesterin und Cholesterinestern. Die Konsistenz dieses „Schleims“ ist abhängig von der Temperatur und der Fettzusammensetzung: Bei Raumtemperatur post mortem ist sie wie Zahnpasta, bei

Körpertemperatur flüssiger. Theoretisch führt eine festere Konsistenz zu höherer Plaquestabilität (FALK 1992).

SHAH 1996 unterscheidet externe und interne Ruptur-begünstigende Faktoren: Zur Plaque-disruption tragen grundsätzlich die Plaquezusammensetzung selbst und extrinsische, wie biomechanische und hämodynamische Faktoren bei, welche sich ebenfalls gegenseitig triggern (KULLO et al 1998; SHAH 1999).

Als **interne Faktoren** begünstigen vor allem eine große Anzahl Entzündungszellen eine Ruptur, da diese u.a. Metalloproteinasen bilden, welche die stabilisierenden, kollagenen Fasern des fibrous Cap erweichen (NEWBY und ZALTSMAN 1999). Makrophagen bilden zudem Zytokine, welche die Plaquestabilität ebenfalls negativ beeinflussen, da sie die Produktion von Radikalen und proteolytischen Enzymen stimulieren. Auch die Massenapoptose von Entzündungszellen begünstigt eine Plaqueruptur: Die bei der Apoptose frei werdenden Lipide binden sich an extrazelluläre, kollagene Fasern und tragen so zum Wachstum des Lipid Core bei. Die mechanische Stabilität der fibrous Caps reduziert sich signifikant bei Anwesenheit von Makrophagen (FALK et al 1995; LIBBY 1995). Kalkablagerungen innerhalb der Intima führen zu gesteigertem mechanischem Stress, so dass sich die Gefahr einer Plaqueruptur damit erhöht (DEMER et al 1994; STARY 2001).

Der Blutfluss an sich stellt einen **externen Faktor** dar, welcher mechanischen Stress für die Blutgefäßwände bedeutet, weil er permanent gegen die Gefäßwände „prallt“. Andere externe Faktoren sind umgebungsbedingte und pharmazeutische Stressoren.

Die o.g. intrinsischen Faktoren, einschließlich der Größe, der Lokalisation und des Inhaltes des Lipidkerns, genauso wie die Unversehrtheit des fibrous Cap, machen die Gefäßwände erst sensitiv für externe physikalische Einwirkungen (FUSTER und LEWIS 1994; GUTSTEIN und FUSTER 1999).

Stellen, an denen die atherosklerotisch veränderte Intima aufreißt oder erodiert und somit thrombotische Prozesse initiiert, sind in histologischen Studien immer als sehr makrophagen- und T-zellreich charakterisiert worden. Es handelt sich zumeist um die sogenannten Schulterregionen einer Plaque. Diese sind gegenüber Scherkräften sehr gefährdet, so dass die kollagenen Fasern der Plaque hier nicht nur mechanisch stärker beansprucht werden, sondern auch enzymatisch angegriffen werden (FALK 1992; VAN DER WAL et al 1994). Zur Plaqueruptur führt eine Kaskade von Ereignissen. Die Akkumulation von Lipiden in der Läsion führt zur dramatischen Steigerung des Stresses auf das fibrous Cap. Die Lipidanreicherung begünstigt wiederum eine Entzündung durch chemotaktische Faktoren und Synthesesteigerung von Adhäsionsmolekülen. Die daraus resultierende Erweichung der extrazellulären Matrix führt zusammen mit der

vermehrten mechanischen Belastung des fibrous Cap zur Plaqueruptur (ARROYO und LEE 1999).

## 2.10 Tiermodelle

Ein zuverlässiges standardisiertes Tiermodell bei dem die atherosklerotische Läsion wie beim Menschen spontan aufreißt und eine Thrombose initiiert, existiert laut der Vulnerable Plaque Organisation (2001) nicht. Um das Themengebiet der Atherosklerose untersuchen zu können, werden Versuchstiere benötigt, welche Atherosklerose entwickeln, die der des Menschen morphologisch größtmöglich ähnelt. Nur dann sind die Ergebnisse einer Untersuchung am Tier auf den Menschen übertragbar. Folgende Kriterien sollten die atherosklerotischen Läsionen eines Tiermodells erfüllen (LIBBY 2000):

- fibrous Cap,
- $\alpha$ -aktin-positive glatte Muskelzellen in der Basis der Plaques und der Media,
- einen Lipidkern, der aus extrazellulären Lipiden und vielen MMP-1 (Kollagenase) synthetisierende Makrophagen, bzw. fettbeladenen Schaumzellen besteht.

Seit vor etwa 100 Jahren durch MARCHAND (1904), IGNATOVSKI (1908) und kurz danach von BAILEY (1915) gezeigt werden konnte, dass eine fettreiche Diät bei Kaninchen Atherosklerose verursacht, wurden viele Versuchstiermodelle zur Erforschung und zum Verständnis von Atherosklerose etabliert.

Apo-E-Knock-out Mäuse sind genetisch modifizierte Mäuse, denen das Apolipoprotein-E fehlt, welches bei der Regulation des Fettstoffwechsels beteiligt ist (PIEDRAHITA et al 1992). Aufgrund der Hypercholesterinämie entwickeln die Mäuse zuverlässig Atherosklerose, die den Veränderungen beim Menschen histopathologisch stark ähnelt. Trotz Vorhandenseins vieler Anzeichen einer Plaqueinstabilität (dünne fibrous Caps, in einigen Fällen Endothelschäden, lipidreiche Schulterregionen und Hämorrhagien) neigen die Tiere vermutlich aufgrund eines anderen Koagulationssystems nicht zur Thrombose (PIEDRAHITA et al 1992; GETZ 2000; ROSENFELD et al 2000).

Das WHHL (Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbit)-Kaninchen wurde von WATANABE 1980 als Zuchtlinie entwickelt und nach ihm benannt, nachdem er 1973 ein Kaninchen entdeckt hatte, welches aufgrund einer rezessiven Vererbung trotz Fütterung eines normalen Standardfutters eine Hyperlipidämie entwickelte (SHIOMI 2001). WHHL-Kaninchen leiden ähnlich wie der Mensch bei der familiären Hypercholesterinämie aufgrund eines LDL-Rezeptormangels von Geburt an an Hypercholesterinämie, in dessen Folge jedes Kaninchen Atherosklerose in den Aorten entwickelt. Der Defekt beruht auf einer Genmutation (WATANABE 1980, WATANABE

1983, BUJA et al 1983, WATANABE 1985, ARMSTRONG und HEISTAD 1990). Seit dem Bestehen der Zuchtlinie hat das WHHL-Kaninchen als Atherosklerosemodell zur Atheroskleroseforschung viel beigetragen: GOLDSTEIN und BROWN verwandten sie als Tiermodell, um ihre Theorie zur LDL-Rezeptorbeteiligung bei der Atherogenese zu untersuchen. Sie gewannen 1985 den Nobelpreis für Medizin aufgrund ihrer Studien zum Cholesterinmetabolismus.

Die Pathogenese der Atherosklerose bei der humanen familiären Hypercholesterinämie ähnelt der Atherogenese der WHHL-Kaninchen sehr, so dass laut WATANABE (WATANABE 1985) dieses Tiermodell geeignet für Untersuchungen des Lipidmetabolismus im Zusammenhang mit Atherosklerose ist.

Homozygote WHHL-Kaninchen zeigen in histopathologischen Untersuchungen im Alter von zwei Monaten nur geringe Fetteinlagerungen innerhalb der Intima, im Alter von drei Monaten innerhalb der Intima und Media. Bereits bei vier bis fünf Monate alten Tieren entwickeln sich zahlreiche flache und erhabene Xanthome innerhalb der Intima und der Media. Die Läsionen fettreicher Weißer Neuseeländer Kaninchen enthalten im Vergleich weniger Schaumzellen und erscheinen weniger komplex; die Makrophagen der Leber, Milz, Knochenmark und Lymphknoten sind im Gegensatz zu den WHHL-Kaninchen stark fettbeladen (BUJA et al 1983).

Heterozygote WHHL-Kaninchen, die cholesterinreich gefüttert wurden, entwickeln im Gegensatz zu den Weißen Neuseeländer Kaninchen sogenannte komplexe Läsionen mit Nekrose, Cholesterinkristallen, Fibrösen Kappen und Verkalkungen, die den Läsionen der homozygoten Watanabe Kaninchen und den menschlichen Plaques sehr ähneln (ATKINSON et al 1989).

Andere genetisch veränderte Kaninchen-Tiermodelle sind das St. Thomas Kaninchen, AX/JU Linie und IIIVO/JU Linie von Jackson Laboratory und Houston RT Kaninchen. Weiße Neuseeländer Kaninchen entwickeln diätinduziert Plaques (ARMSTRONG und HEISTAD 1990).

### **2.10.1 Kaninchen versus Mensch**

Die Lipidzusammensetzung der atherosklerotischen Plaques von Menschen und Kaninchen unterscheiden sich grundsätzlich in ihrem Fettsäuremuster: Mittels NMR wurden die unterschiedlichen Fettsäureverhältnisse zwischen Linolsäure zu Ölsäure zu Palmetinsäure untersucht und herausgefunden, dass aufgrund unterschiedlicher Fettsäureverhältnisse die Aggregatzustände bei Mensch und Kaninchen unterschiedlich sind. Bei fettreich gefütterten Weißen Neuseeländer Kaninchen sowie mittels Ballonkatheterisierung atherogen behandelte Neuseeländer Kaninchen, liegt das Verhältnis zwischen Linolsäure zu Ölsäure zu Palmetinsäure bei 2,5 : 8 : 2,5. Bei Körpertemperatur befinden sich die Fette aufgrund ihrer Zusammensetzung innerhalb der Kaninchenplaques in einem festen, margarineartigen Zustand und sind deshalb im

MRT nicht sichtbar. Ballonkatheterisierung und Fütterungsvariationen können zwar die Fettsäuremuster beeinflussen, jedoch nicht eine Veränderung des o.g. Fettsäureverhältnisses erreichen. Beim Menschen liegt das Fettsäureverhältnis bei 10 : 8 : 2. Die Lipide befinden sich beim Menschen bei Raumtemperatur in einem zahnpasteartigen Zustand, bei Körpertemperatur in einem öligen, also flüssigen Zustand. Eine größere mechanische Instabilität der menschlichen Plaques ist also vorprogrammiert (ROSENFELD et al 1988; TROUARD et al 1997).

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit waren Apo-E Knock out Mäuse zu klein für die Auflösung des MRT. Die Kaninchenarterien gleichen in ihrem Durchmesser zudem eher menschlichen Herzkranzgefäßen, deren magnetresonanztomographische Gefäßwanddiagnostik letztendlich Zielstellung dieser Kontrastmittelentwicklung ist.

## **2.11 Untersuchungsverfahren zur bildgebenden Darstellung der Atherosklerose**

Die meisten herkömmlichen Verfahren zur Untersuchung atherosklerotischer Gefäße sind lediglich geeignet, Lumendurchmesser, Wanddicke, Stenose und Plaquevolumen zu ermitteln. Keines dieser Verfahren ist in der Lage, die genaue Plaquezusammensetzung zu bestimmen, bzw. ihre Gefährlichkeit hinsichtlich einer Plaqueruptur zu ermitteln (PASTERKAMP et al 2000).

Die zur Diagnostik erzeugten medizinischen Bilder werden mit unterschiedlichen Strahlungsarten (Ultraschallwellen, sichtbares Licht oder andere elektromagnetische Wellen wie z.B. Hochfrequenzstrahlung oder Röntgenstrahlung) erzeugt: Allen gemein ist die erzeugte Wechselwirkung von Strahlung und Objekt. Während Röntgenbilder auf der Schwächung von Röntgenstrahlen durch die Gewebe basieren, beruht das Magnetresonanzbild auf der Antwort bestimmter Atomkerne, welche sich in einem äußeren Magnetfeld befinden, auf die Zufuhr von elektromagnetischer Energie in Form von energiearmen Radiowellen (PYKETT 1982). Magnetresonanztomographie, Ultraschall und Computertomographie erzeugen Schnittbilder vom Körper (LENSCH und RINGEL 1988).

### **2.11.1 Röntgen Angiographie**

Ein X-ray Angiogramm basiert auf Röntgenstrahlung und gilt als nicht-invasives Verfahren. Es gibt Auskunft über Gefäßdurchmesser und Gefäßoberflächenveränderungen; fortgeschrittene Plaques können nur im Falle einer Verkalkung, Plaquedisruption und Stenose, bzw. luminaler Thrombose festgestellt werden. Läsionen, die diese Kriterien nicht erfüllen, aber dennoch aufgrund ihrer Zusammensetzung gefährlich sind, können übersehen werden (WORTHLEY et al 2000).

### **2.11.2 Intravaskulärer Ultraschall (IVUS)**

Als invasives Verfahren wird der Ultraschallkatheter mit einem Durchmesser von 0,96 cm bis 1,17 cm direkt in ein Blutgefäß verbracht. Der intravaskuläre Ultraschall kann über drei Kategorien Aufschluss geben:

- Stark echogene Strukturen stellen Verkalkungen dar
- Mittelstark echogene Strukturen stehen für Fibrosen oder Mikroverkalkungen
- Echoarme Strukturen stellen gewebssarme Plaquebereiche dar, z.B. Thromben oder fettige Areale

Empfehlenswert ist diese Methode begleitend bei bereits invasiven Eingriffen wie Arterioektomien und dem Setzen von Stents, künstlichen Röhrchen, welche die Wiederherstellung eines Lumens gewährleisten sollen (WORTHLEY et al 2000). Intravaskulärer Ultraschall (IVUS) ist ein weit verbreitetes und klinisch etabliertes Verfahren zur Detektion von Plaques in Koronargefäßen und Gefäßen der Peripherie. Als Vorzug ist hier das hohe räumliche Auflösungsvermögen zu nennen, nachteilig ist neben der invasiven Natur des Verfahrens, dass fettreiche Areale nur mit 40-50 %-iger Sicherheit diagnostizierbar sind und die Gewebe unterhalb von Verkalkungen durch deren Schallschatten verborgen bleiben (FRANK 2001).

### **2.11.3 Oberflächlicher und transoesophagealer Ultraschall**

Bei der oberflächlichen Ultraschalluntersuchung wird der Schallkopf nicht-invasiv äußerlich angewendet. Beim transoesophagealen Ultraschall werden die Karotiden transoesophageal geschallt; der Schallkopf wird hierfür invasiv in die Speiseröhre verbracht. Mittels Ultraschall können Verkalkungen, Fibrosen, Thromben oder fettige Areale der Gefäße detektiert werden (FAYAD et al 2000a; WORTHLEY et al 2000).

### **2.11.4 Angioskopie**

Intrakoronare Angioskopie erlaubt die Beurteilung der inneren Gefäßoberfläche, bzw. Plaqueoberfläche hinsichtlich ihrer Farbe, dem Vorhandensein eines Thrombus und anderen makroskopisch sichtbaren Geschehen. Es handelt sich wie bei IVUS um ein invasives Verfahren. Kleinkalibrige oder stenosierende Gefäße sind für das Endoskop nicht zugänglich (WORTHLEY et al 2000).

### **2.11.5 Multislice Computer Tomographie (MSCT)**

KOPP et al (2001) führten als erste Forschungsgruppe vergleichende Untersuchungen zur Plaquecharakterisierung mit intravaskulären Ultraschall und Mehrschicht CT durch. Plaques können nach ihren Ergebnissen mittels MSCT nicht-invasiv detektiert und klassifiziert werden.



Allerdings müssen noch histopathologische Studien durchgeführt werden, welche eine präzisere Korrelation der MSCT Ergebnisse mit der tatsächlichen Plaquezusammensetzung erlauben.

### **2.11.6 Nukleare Szintigraphie (SPECT = single photon emission computed tomography)**

Nukleare Scintigraphie ist eine bildgebende Darstellung unter Verwendung möglichst kurzlebiger Radionuklide, bzw. Radiopharmaka, die sich nach Inkorporation in den zu untersuchenden Geweben anreichern. Die emittierten Strahlen können dann mit einer Registriereinrichtung als Scintigraphie registriert werden. In Tierversuchen, aber auch beim Menschen konnte eine Anreicherung von radioaktiv-markiertem LDL in atherosklerotischen Läsionen erreicht werden. Eine langsame Anreicherung, schlechte Auflösung und die große Bloodpool-Aktivität (Lange Bluthalbwertszeit) stellen große Nachteile dieser Methode dar (WORTHLEY et al 2000).

### **2.11.7 Magnetresonanztomographie (MRT)**

#### **2.11.7.1 Grundlagen**

Die Magnetische Resonanz (MR) ist eine der neuesten medizinischen Errungenschaften zur Herstellung von In-vivo-Bildern des menschlichen Körpers für diagnostische Zwecke. Der Effekt der MR wurde 1946 von PURCELL und BLOCH unabhängig voneinander entdeckt und für Spektroskopiemethoden genutzt, beide erhielten hierfür 1952 den Nobelpreis für Physik (PHILIPS 1988).

Mit dem Nobelpreis für Medizin wurden 2003 zwei Forscher ausgezeichnet, deren Ergebnisse bei der Entwicklung der Magnetresonanztomographie bahnbrechend waren: 1973 leistete PAUL LAUTERBUR den entscheidenden Beitrag, die von den Protonen abgegebenen Resonanz-Signale zu orten und daraus zweidimensionale Bilder herzustellen. PETER MANSFIELD erarbeitete in den siebziger Jahren die physikalischen Grundlagen, baute die Theorie LAUTERBURs aus und entwickelte die Nutzung von Gradienten im Magnetfeld weiter. Er zeigte, wie die gemessenen Signale analysiert und zu Abbildungen verarbeitet werden konnten. Die hochauflösende Kernresonanzspektroskopie, aus der sich die MRT entwickelt hat, diente anfangs der Aufklärung von Molekül- und Festkörperstrukturen. Von der Magnetresonanztomographie selbst sind bislang keine schwerwiegenden Nebenwirkungen bekannt. Der Patient wird hierbei nicht durch zusätzliche Röntgenstrahlung belastet wie bei der Computertomographie (WEISHAUPT et al 2003).

MRT differenziert Gewebsbestandteile auf der Basis biophysikalischer und biochemischer Parameter wie chemische Zusammensetzung, Konzentration, Wasseranteil, physikalischer Zustand, molekularer Bewegung oder Diffusion (RINCK et al 1985, PHILIPS 1988, SCHILD 1990). Wasserstoffkerne im Körpergewebe verhalten sich im magnetischen Feld wie kleine

Stabmagneten (spin) und richten sich im Feld aus. Mit Hilfe einer kurzzeitig eingestrahlten Radiowelle lässt sich die Spinrichtung durch Energieaufnahme variieren, bzw. kippen. Schaltet man das Radiosignal wieder aus, kippen die Spins wieder in ihre Ausgangslage zurück und verursachen ihrerseits einen kleinen Wechselstrom, indem sie die zuvor aufgenommene Radiowellen-Energie wieder abgeben. Eine Empfangsspule zeichnet die Signale auf, der Computer setzt sie zu einem Bild zusammen (PHILIPS 1988, SCHILD 1990, WOOD und WEHRLI 1999).

#### **2.11.7.2 MRT zur Diagnostik von Atherosklerose**

In frühen MRT In-vitro-Untersuchungen durch KAUFMANN et al 1982 und In-vivo-Versuchen durch HERFKENS et al (1983) konnten atherosklerotische Aorten nur hinsichtlich einer Wandverdickung und Lumeneinengung (Stenose) beurteilt werden. Mit zunehmender Weiterentwicklung der MRT-Technologie in den letzten Jahren versuchte man, atheromatöse Plaques mittels verschiedener MRT-Sequenzen zu charakterisieren. SOILA et al (1986) und MAYNOR et al (1988) veröffentlichten die ersten Ergebnisse, in denen gezeigt werden konnte, dass die Lipidkomponenten in Plaques mittels MRT identifiziert werden können. 1996 untersuchten YUAN et al 1996 Kaninchen, bei denen eine Atherosklerose durch Ballon-Katheterisierung und lipidreiche Diät induziert wurde, unter anderem mit dem Ergebnis, dass die Gruppe die Gefäßwand klar vom Lumen und dem umgebenden Gewebe differenzieren konnte. TOUSSAINT et al zeigten 1996 die Möglichkeit, das fibrous Cap zu charakterisieren, und faserige, verkalkte und bluthaltige Plaqueanteile in der menschlichen Karotis zu identifizieren. SHINNAR et al (1999) und SERFATY et al (2001) haben atherosklerotische Plaques in einer In-vitro-Studie mit T2-gewichteter High-spatial-resolution-MRT (MRT mit hoher räumlicher Auflösung) klassifiziert und charakterisiert.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde eine an die AHA-Einteilung adaptierte Klassifizierung von Plaquestadien für die Charakterisierung mittels MRT von SERFATY et al (2001) entworfen.

FAYAD et al (2000b) konnten vor kurzem demonstrieren, dass es mittels MRT möglich ist, die Dicke und das Ausmaß, sowie die Zusammensetzung von Plaques einzuschätzen. FAYAD et al begannen ihre Untersuchungen 1998 mit Unterstützung von WORTHLEY et al (2000) zur optimalen Plaque-Charakterisierung mittels MRT an verschiedenen Tiermodellen, wobei sich die Untersuchung herznaher Gefäße durch starke Herz- und Atembewegungen schwerer gestaltete.

Mit großem technischem und zeitlichem Aufwand gelingt es seit 2003, die menschlichen Plaques sowohl in der Karotis (TOUSSAINT et al 1996; YUAN et al 1998, Yuan et al 2001), in der Aorta (FAYAD et al 2000b), in der Peripherie (COULDEN et al 2000) als auch in den Koronargefäßen (FAYAD et al 2000b) mittels MR Multikontrast Plaque Imaging annähernd zu charakterisieren.

MR Multicontrast Plaque Imaging: Unter Verwendung verschiedener MR-Gewichtungen (Protonenwichtung, T1-Wichtung, T2-Wichtung) können jeweils Kalzium, Thrombosen, fette oder lipidreiche Anteile einer Plaque aufgrund ihrer Eigenschaften im Magnetfeld einzeln identifiziert und die entstandenen Bilder anschließend zusammengesetzt werden. Die Plaquezusammensetzung lässt dann wiederum Rückschlüsse auf dessen Vulnerabilität zu (HATSUKAMI et al 2000; FRANK 2001).

### 2.11.7.3 MRT-Kontrastmittel

Die pharmakologischen Anforderungen an ein Kontrastmittel sind hoch. Es wird verlangt, dass sich ein Stoff infolge seiner Eigenschaften an eine ganz bestimmte Stelle im Organismus anreichert, dort seine kontrastgebende Eigenschaft zu einer bestimmten Zeit entfaltet und danach möglichst rasch wieder ausgeschieden wird. Kontrastmittel sind so auszuwählen, dass das Risiko unerwünschter Nebenwirkung möglichst gering gehalten wird. MRT-Kontrastmittel werden immer dann benötigt, wenn Gewebekontraste, die sich aufgrund ähnlicher Relaxationszeiten (für die MRT maßgebliche Parameter) kaum von einander absetzen, verstärkt werden sollen oder zur Beurteilung einer Organfunktion und der Perfusion. Alle MRT-Kontrastmittel stellen sich im Unterschied zu Röntgenkontrastmitteln nicht selbst im Bild dar, vielmehr beeinflussen sie aufgrund ihres Magnetismus das Relaxationsverhalten der umgebenden Protonen. Als MRT-Kontrastmittel finden nur para- und superparamagnetische Substanzen Anwendung (FORTH et al 1996):

- Paramagnetische Substanzen, hierzu gehört das dreiwertige Gadolinium, bezeichnet man auch als positive Kontrastmittel (Weißung),
- superparamagnetische Substanzen, hierzu gehören Eisenoxidkristalle, als negative Kontrastmittel (Schwärzung).

Kontrastmittel können nach ihrer Verteilung im Körper eingeteilt werden. Die Verteilung der Kontrastmittel ist nach FORTH et al. (1996) zunächst abhängig von Wechselwirkungen zwischen Kontrastmittel und Organismus, ihrer Resorption (intravenöse, intrapulmonale, lymphogene, arterielle, orale Applikation) und des Zeitraums. Bei intravenöser oder arterieller Applikation befindet sich das Kontrastmittel zunächst innerhalb der Blutgefäße, erst nach einer gewissen Zeit kann eine Anreicherung durch Membranpermeation stattfinden. Mögliche Mechanismen zur Membranpermeation sind:

- Diffusion, abhängig von hydrophoben Eigenschaften und dem Ionisationsgrad eines Stoffes, passiver Prozess.
- Filtration, passiver Prozess.
- Carrier-vermittelter Transport, aktiver Prozess und ATP-abhängig.

- Vesikulärer Transport: Aktiver Transport, ATP-abhängig, der die Bindung der zu transportierenden Substanz an Membranrezeptoren voraussetzt.

Der Ionisationsgrad beeinflusst die Membranpermeation per Diffusion: Ionisierte Moleküle besitzen ein pH-Optimum in dem sie maximal ionisiert vorliegen. Der ionisierte und der in freier Form vorliegende Anteil eines Arzneimittels unterscheidet sich bezüglich ihrer Lipid- und Wasserlöslichkeit; Ionen sind wasserlöslich, die freie, nicht-ionisierte Form ist lipidlöslich. Biologische Grenzmembranen werden nur von der gut lipidlöslichen, nicht-ionisierten Form überschritten, während die ionisierte Form im wesentlichen auf den Extrazellulärraum beschränkt bleibt. Für die meisten Arzneimittel gilt die Regel, dass sie um so stärker wirken, je weniger sie ionisiert vorliegen, denn Moleküle ohne Ladung diffundieren leichter durch Grenzmembranen hindurch. Die Wirkung solcher Stoffe ist somit pH-abhängig. Die Verweildauer des Kontrastmittels im Organismus ist abhängig von seiner Halbwertszeit. Die Halbwertszeit ist diejenige Zeitspanne, in der die Konzentration eines Pharmakons um die Hälfte abgenommen hat. Durch pharmazeutische Techniken können Kontrastmittel synthetisiert werden, die bestimmte Ziele, sogenannte Targets, im Körper zur Signalverstärkung verfolgen.

Tabelle 2: Möglichkeiten des Durchtritts von Substanzen durch eine biologische Membran (FORTH et al 1996)

Mechanismus	Durchtretende Moleküle
Diffusion durch Lipoidschicht	Hydrophobe Moleküle
Diffusion durch Pore	Kleine hydrophile Moleküle
Filtration	Kleine hydrophile Moleküle
Erleichterte Diffusion	Moleküle mit Affinität zu Carrier
Aktiver Transport	Moleküle mit Affinität zu Carrier
Pinozytose und Phagozytose	Größere Moleküle
Diffusion bzw. Filtration durch interzelluläre „Lücken“	

### Einteilung von MRT-Kontrastmitteln nach WEINMANN et al (2003):

**Extrazelluläre Kontrastmittel (KM)** sind niedermolekulare wasserlösliche Verbindungen, die sich im extrazellulären Raum des Körpers verteilen. Beispiele: Gd-DTPA (Magnevist) und Gd-DOTA (Dotarem). Bilder, welche ca. 30 s nach der i.v. Gabe angefertigt werden, demonstrieren arterielle Durchblutung und Gefäßanatomie. Bilder, die nach ungefähr einer Minute angefertigt werden, stellen den Blut-Pool dar, nach ca. 3 Minuten wird die Verteilung im extrazellulären Raum (vaskulär und interstitiell) sichtbar.

**Intravaskuläre- oder „Blood-Pool“-KM** sind höhermolekulare Verbindungen, die nicht oder nur sehr langsam durch Kapillarwände diffundieren können und deshalb eine lange Verweilzeit in den

Blutgefäßen haben (45 min), es sei denn, die Kapillarbarriere ist zerstört. Beispiel: USPIO = Eisenoxidpartikel, die von einer Kohlenhydrathülle ummantelt sind, Gd-Komplexe, die an Dextran, Polylysin oder Liposomen gebunden sind.

**Hepatozytenspezifische KM** werden in den normalen Leberzellen angereichert, nicht aber in „leberfremden“- Geweben (Mechanismus: Aromatische Anionentransporter). Ihr Einsatz erfolgt zur besseren Erkennung von fokalen Leberläsionen. Es handelt sich um lipophile Gd(III)-, Fe(III)- oder Mn(II)-Komplexe.

**RES-spezifische KM** werden hauptsächlich von Zellen des Retikulo-Endothelialen-Systems (RES) phagozytiert, d.h. vor allem in der Leber und weniger in der Milz. Beispiele: AMI-25 (Endorem / Feridex), SHU 555 A (Resovist), beide KM bestehen aus dextranbeschichteten Eisenoxidpartikeln, die superparamagnetische Eigenschaften besitzen (SPIO).

**Lymphknotenspezifische KM** sind zur Zeit in klinischer Erprobung. Es handelt sich um besonders kleine superparamagnetische Eisenoxidpartikel = MION, die sich in normalen Lymphknoten anreichern und damit einen Signalabfall in normalen Lymphknotengewebe bewirken. Tumorzellen hingegen nehmen dieses KM nicht auf.

**Tumorspezifische KM** sind Verbindungen (z.B. Metallporphyrine), welche sich in rasch teilenden Zellen anreichern. Der Aufnahmemechanismus ist noch ungeklärt. Neben der diagnostischen Möglichkeit ergeben sich auch therapeutische Möglichkeiten bei gleichzeitiger photodynamischer Lichttherapie (PDT), indem die im Tumor angereicherten Metallporphyrine durch energiereiche Strahlung aktiviert werden und das umliegende Tumorgewebe zerstören. Solche KM sind bisher nur tierexperimentell erprobt.

**Antigenspezifische KM** bestehen aus einem paramagnetischen oder superparamagnetischen Signalgeber, einem Trägergerüst (Spacer), sowie einem Steuersystem (monoklonaler Antikörper, Polysaccharidhülle).

**Kompartimentfüller** dienen einerseits als KM für die MR-Arthrographie, andererseits als Marker des Gastrointestinaltraktes. Sie werden dazu lokal verabreicht: zur Arthrographie werden sie in den Gelenkraum injiziert, zur Gastrointestinalgraphie werden sie oral oder anal verabreicht.

#### **2.11.7.4 Kontrastmittel-gestützte MRT zur Bildgebung atherosklerotischer Läsionen**

Verschiedene Forschungsgruppen beschäftigen sich mit Studien verschiedener Kontrastmittel, die Plaques im MRT detektieren sollen. Verbesserte Darstellung atherosklerotischer Läsionen im MRT gelang unter Verwendung folgender MRT-Kontrastmittel:

### **Magnetische Partikel:**

Unter anderem wurden ultrakleine Eisenoxidpartikel (ultrasmall particles of iron oxides = USPIO) eingesetzt, um atherosklerotische Läsionen zu detektieren: WEISSLEDER et al konnten 1990 elektronenmikroskopisch einen intra- und interendothelialen, vesikulären Transport von 5-10 nm großen Eisenoxidpartikeln demonstrieren. Sie fanden eine Anreicherung vor allem in Lymphknoten, Knochenmark, Leber und Milz. Basierend auf diesen Ergebnissen untersuchten später RUEHM et al (2001b; 2002), SCHMITZ et al (2001 a und b) und SCHMITZ (2003) atherosklerotische Plaques hyperlipidämischer Kaninchen nach Verabreichung von USPIOs im MRT. Das Ergebnis der Studie zeigte histologisch intrazelluläre Eisenoxidpartikel innerhalb von Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (MPS) in Plaques. Fünf Tage nach Verabreichung der USPIOs stellt sich die Läsion unter Verwendung eines zweiten Blood-Pool-Kontrastmittels im MRT als raue Gefäßwand dar. In eigenen, von der vorliegenden Arbeit unabhängigen Untersuchungen konnte histologisch mittels Eisennachweises nach experimenteller In-vivo-Verabreichung von USPIO-Partikeln gezeigt werden, dass sich die Partikel zunächst nahezu ausschließlich intrazellulär in der Plaque anreicherten. Erst später findet sich Eisen extrazellulär im Schaumzelldebris wieder (unveröffentlichte eigene Untersuchungen 2002).

### **Gadolinium (Gd) -Komplexe:**

Auch paramagnetische Substanzen wurden darauf untersucht, ob sie in der Lage sind, atherosklerotische Läsionen zu detektieren und im günstigsten Falle eine Aussage über die Vulnerabilität zu geben. Das extrazelluläre Kontrastmittel Gadolinium-diethylen-triamino-pentaacetat (Gd-DTPA; Magnevist Schering Berlin) erhöht 5 Minuten nach intravenöser Verabreichung die Signalintensität des fibrous Cap. Aufgrund einer Hypointensität des Lipidkerns können dann Rückschlüsse auf die Gefährlichkeit von Läsionen, welche nicht durch Lumeneinengung detektiert werden können, zulassen, indem das Verhältnis fibrous Cap zum Lipid Core beurteilt wird (WASSERMAN et al 2002).

Untersuchungen, die im Vorfeld dieser Arbeit bereits durch WEINMANN et al (2003) und BARKHAUSEN et al (2003) bei Schering Berlin stattfanden, befassten sich mit der Suche nach einem geeigneten Gd-haltigen Kontrastmittel zur Plaquedetektion. Als Kriterium zur Auswahl eines Kontrastmittels wurde eine große pharmakologische Bluthalbwertszeit gewählt, da hierbei eine Anreicherung in der Plaque aufgrund einer erhöhten endothelialen Permeabilität atherosklerotisch geschädigter Blutgefäße wahrscheinlich erschien. Die Untersuchungen mit Gadofluorine-M waren erfolgreich, die pathologisch veränderten Blutgefäßwände von WHHL-Kaninchen zeigten eine deutliche Signalverstärkung im MRT. Eine Anreicherung von Gadofluorine-M in den Plaques konnte mit Hilfe einer Gd-Messung nachgewiesen werden.

Von drei untersuchten Zeitpunkten kristallisierten sich die Zeitpunkte 24 und 48 Stunden nach Verabreichung des Kontrastmittels als geeignet zur Detektion von atherosklerotischen Läsionen im MRT heraus. Die MR-Technik wurde in diesen Experimenten optimiert: Als geeignete Sequenz wurde eine Inversion-recovery-turbo-FLASH Sequenz erwählt, welche ursprünglich zur Visualisierung von Myokardinfarkten entwickelt wurde (BARKHAUSEN et al 2003). Die genaue histologische Lokalisation des Kontrastmittels in der Plaque ist allerdings unbekannt, ein Zusammenhang mit Makrophagentätigkeit aufgrund der zuvor gelungenen Lymphographie wird bis dato angenommen (MISSELWITZ et al 1999). In beiden Geweben, den Lymphknoten und atherosklerotischen Läsionen kommen als gemeinsame Zellstruktur Makrophagen und Monozyten als Zellen des MPS vor. Dass sich auch USPIO-Partikel nach intravenöser Verabreichung intrazellulär in der Plaque befinden, stützte diese Annahme. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher insbesondere mit der histologischen Lokalisation dieses und eines zweiten Kontrastmittels (Gadophin-2), welches nekroseaffin (SAEED et al 2002, BARKHAUSEN et al 2002) ist.

### **3 Eigene Untersuchungen**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Untersuchte Tiere**

Die Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten an insgesamt 31 männlichen, adulten Kaninchen. Darunter befanden sich 27 homozygote WHHL-Kaninchen, die vom Züchter Covance USA erworben wurden, und 4 Weiße Neuseeländer Kaninchen (SPF) vom Züchter Ch. R. Kißlegg. Die Haltung und Fütterung der Tiere war standardisiert: Alle Kaninchen erhielten Futter der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, D-59494 Soest mit der Bezeichnung V2373-000 ssniff K-H, Ered ad libitum (Ch-Bez. 9612450). Die Haltung erfolgte in Kaninchenkäfigen der Firma Scanbur. Die Käfiggröße betrug bei <3,5 kg KGW 2500 cm<sup>2</sup> und bei >3,5 kg KGW 3500cm<sup>2</sup>. Wasser erhielten die Tiere aus Wasserflaschen, bei Bedarf auch aus Trinknäpfen.

Alle Kaninchen besaßen zum Zeitpunkt der Experimente ein Gewicht von 3,5-4,2 kg. Die untersuchten WHHL Kaninchen waren 12-15 Monate alt, in diesem Alter ist die Wahrscheinlichkeit atherosklerotischer Veränderungen im Aortenbogen sehr hoch.