

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Identifikation vulnerabler Carotidplaques mit Hilfe
moderner Ultraschalltechniken**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Charlotte Lisa Schmidt

aus Frankfurt am Main

Datum der Promotion: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Abstract in Deutsch.....	3
Abstract in Englisch.....	5
Eidesstattliche Versicherung.....	7
Ausführliche Anteilserklärung.....	8
Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge).....	9
Druckexemplar der ausgewählten Publikation.....	10
Lebenslauf.....	21
Publikationsliste.....	22
Danksagung.....	23

Abstract

Identifikation vulnerabler Carotisplaques durch Plaque-Neovaskularisation mit Hilfe moderner Ultraschalltechniken

Hintergrund:

Eine Carotisstenose kann lebensgefährliche Komplikationen auslösen, wie zum Beispiel einen Schlaganfall. Die Ruptur von Carotisplaques kann durch die Verschleppung von Plaquematerial zu einem Verschluss von Gefäßen führen einhergehend mit einer Ischämie der betroffenen Regionen. Etablierte Risikofaktoren für das Auftreten eines Schlaganfalls sind der Stenosegrad der Carotisstenose und das Vorliegen einer vorangegangenen zerebralen Ischämie aufgrund der Carotisstenose. Neben diesen etablierten Risikofaktoren spielt die Beschaffenheit der Plaque eine entscheidende Rolle. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Ausmaß an Entzündungsprozessen mit einer vermehrten Plaque-Instabilität einhergeht, wobei Plaque-Neovaskularisation ein wichtiger Faktor zur Aufrechterhaltung lokaler Entzündungsprozesse zu sein scheint.

Zielstellung:

In dieser Pilotstudie wird das Ausmaß an Neovaskularisation von Carotisplaques mittels präoperativ durchgeführten kontrastverstärkten Ultraschalluntersuchungen (contrast-enhanced ultrasound, CEUS) und histologischer Auswertung derselben Plaqueregionen bestimmt. Ziel der Studie ist, die Ergebnisse der beiden Untersuchungen miteinander zu vergleichen, um die Validität von CEUS zur Identifikation vulnerabler Carotisplaques durch Plaque-Neovaskularisation zu überprüfen.

Methoden:

Insgesamt wurden 17 Patienten mit einer hochgradigen Stenose der Arteria carotis interna nach den North American Symptomatic Trial (NASCET) Kriterien in die Studie eingeschlossen. Vor der geplanten Carotisendarteriektomie wurde an allen Patienten eine CEUS-Untersuchung durchgeführt. Die bei der Operation gewonnenen Carotisendarteriektomiezyylinder wurden immunhistochemisch auf Neovaskularisation, T-Zellen- und Makrophageninfiltration markiert. Zur quantitativen Analyse der

Neovaskularisation, T-Zellen und Makrophagen wurden die Präparate histologisch untersucht (Leica Microsystems) und mithilfe des StereoInvestigator Systems (Micro Brightfield Europa) ausgewertet. In den CEUS-Untersuchungen wurde ein vier- bzw. zwei-Stufen basiertes Klassifikationssystem (modifiziert nach Huang et al.) zur Bestimmung des Ausmaßes an Neovaskularisation verwendet.

Ergebnisse:

In dem vier- und zweistufigen Klassifizierungssystem zur Beurteilung des Ausmaßes an Neovaskularisation mittels CEUS konnte eine Korrelation zur histologisch bestätigten Gefäßdichte in den chirurgisch entnommenen Carotisplaques ermittelt werden ($r=0.635$, $p=0.006$ und $r=0.578$, $p=0.015$). Regionen von Carotisplaques mit einem stark prolongierten CEUS-Signal zeigten in den histologischen Proben eine deutliche Neovaskularisation mit einhergehender Plaqueeinblutung. Zudem zeigten Regionen, in denen in der Ultraschalluntersuchung eine hohe Dichte an Neovaskularisation festgestellt wurde, in der histologischen Auswertung eine ausgeprägte Makrophageninfiltration.

Schlussfolgerung:

CEUS scheint eine geeignete Untersuchungsmethode zu sein, um das Ausmaß an Neovaskularisation in Carotisplaques einzuschätzen und vulnerable Plaques zu identifizieren. CEUS ist ein non-invasives, kostengünstiges Untersuchungsverfahren, das zur Beurteilung von Carotisstenosen und zur Risikostratifikation im klinischen Alltag verwendet werden könnte, um Risikopatienten für zerebrovaskuläre Ereignisse besser zu identifizieren. Weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Patienten sind notwendig, um den Nutzen von CEUS im klinischen Alltag zu validieren.

Abstract

Identification of neovascularization by contrast-enhanced ultrasound to detect unstable carotid stenosis

Background:

Stroke is a life-threatening complication of carotid stenosis. The rupture of a plaque can lead to an occlusion of vessels by thromboemboli and lead to a cerebrovascular event. Well-established risk factors are prior ischemic events (stroke or transient ischemic attack) and the degree of internal carotid stenosis. Furthermore, characteristics of a plaque such as elasticity and high number of infiltrated inflammatory cells play a key role in plaque progression and vulnerability. Local inflammation is accompanied by plaque neovascularization and contributes to plaque instability.

Objective:

This pilot study investigates the correlation between pre-surgery contrast-enhanced ultrasound (CEUS) and histological evaluation of carotid plaque specimens to identify neovascularization.

Methods:

We enrolled 17 patients with high-grade internal carotid stenosis according to the North American Symptomatic Trial criteria (NASCET) into the study. Shortly before carotid endarterectomy (CEA), CEUS was performed in all patients. CEA specimens were processed by immunohistochemistry to detect macrophages, T-cells and neovascularization. For quantitative evaluation of neovascularization, infiltration of T-cells and macrophages along with intraplaque hemorrhage, the StereoInvestigator System (Micro Brightfield Europe) in combination with a spectral confocal microscope and a digital camera (Leica Microsystems) was used. In the CEUS, a four-level and two-level classification system for neovascularization (modified by Huang et al.) was used. Histological findings were compared with CEUS findings.

Results:

The density of histologically determined intraplaque vessels correlated with the scores on the CEUS-based four-level and two-level classification system for neovascularization ($r=0.635$, $p=0.006$ and $r=0.578$, $p=0.015$, respectively). Regions with strong and prolonged intraplaque enhancement in the ultrasound approach showed strong intraplaque neovascularization and acute intraplaque hemorrhage in their histological evaluation. Moreover, in CEUS-based classified regions with higher grades of intraplaque neovascularization a higher macrophage density was detected in the histological specimens.

Conclusion:

The study demonstrates that CEUS-based classification of carotid stenosis is a useful technique to measure the degree of neovascularization of carotid plaques confirmed by immunohistochemistry of histological specimens. CEUS may provide an additional risk marker by identifying vulnerable plaques by features such as neovascularization and acute intraplaque hemorrhages. We conclude that CEUS is a non-invasive, cost-effective method to stratify patients at risk for a cerebrovascular event. Studies with a higher number of patients would be of interest to evaluate the reliability and validity of CEUS in clinical practice.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Charlotte Lisa Schmidt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Identifikation vulnerabler Carotiplaques mit Hilfe moderner Ultraschalltechniken“** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Schmidt C, Fischer T, Rückert RI, Oberwahrenbrock T, Harms L, Kronenberg G, Kunte H. **Identification of neovascularization by contrast-enhanced ultrasound to detect unstable carotid stenosis. PloS One.** 2017 Apr 7;12(4):e0175331. Impact Factor: 2,806, Eigenfaktor: 1,924690.

Eigenanteil an der Publikation:

Bei der Erstellung der Publikation war ich maßgeblich an der Datenerhebung und -auswertung beteiligt. Ich führte die mikroskopischen Untersuchungen (Leica Microsystems, Heidelberg) des chirurgisch entnommenen Plaquematerials durch. Zur Quantifizierung der T-Zellen, Makrophagen und Gefäße benutzte ich das Stereoinvestigator System (Micro Brightfield Europe, Magdeburg), in das ich von Dipl.-Ing. Ingo Przesdzing eingeführt wurde. Ich führte die statistische Auswertung und Erstellung der Abbildungen insbesondere mit Unterstützung von Dr. Timm Oberwahrenbrock durch. Die Erstfassung des Manuskripts fertigte ich an. Die Anmerkungen durch die Ko-Autoren wurden von mir angepasst und das Manuskript bis zu seiner Endfassung überarbeitet. Im Rahmen des Review Prozesses bearbeitete ich das Manuskript weiter unter Berücksichtigung der Anmerkungen der Reviewer. Dabei hielt ich mit Prof. Dr. med. Hagen Kunte Rücksprache.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)

Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2016 Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: 'MULTIDISCIPLINARY%20SCIENCES' Selected Category
 Scheme: WoS

Platz 15 von 64 Journals in der Kategorie: „Multidisciplinary Sciences“

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	671,254	40.137	1.433990
2	SCIENCE	606,635	37.205	1.159250
3	Nature Communications	123,958	12.124	0.722290
4	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	620,027	9.661	1.236860
5	National Science Review	512	8.843	0.002740
6	GigaScience	1,145	6.871	0.007590
7	Scientific Data	720	4.836	0.004690
8	Annals of the New York Academy of Sciences	44,545	4.706	0.039810
9	COMPLEXITY	1,429	4.621	0.002090
10	Scientific Reports	101,255	4.259	0.387610
11	Science Bulletin	1,087	4.000	0.003100
12	Journal of the Royal Society Interface	10,469	3.579	0.031990
13	Research Synthesis Methods	850	3.018	0.004300
14	PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY A- MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	16,362	2.970	0.031980
15	PLoS One	508,248	2.806	1.924690
16	PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY SERIES B- PHYSICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES	1,162	2.324	0.002390
17	Royal Society Open Science	864	2.243	0.003380
18	SCIENCE AND ENGINEERING ETHICS	1,050	2.229	0.002780
19	NATURWISSENSCHAFTEN	6,601	2.221	0.004320
20	PeerJ	3,993	2.177	0.017790
21	PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY A- MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	16,771	2.146	0.016750
22	CHINESE SCIENCE BULLETIN	10,996	1.649	0.016680

Copyright © 2017 Thomson Reuters

Druckexemplar der ausgewählten Publikation

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175331>

Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Originalarbeiten:

1. **Schmidt C**, Fischer T, Rückert RI, Oberwahrenbrock T, Harms L, Kronenberg G, Kunte H. Identification of neovascularization by contrast-enhanced ultrasound to detect unstable carotid stenosis. **PloS One**. 2017 Apr 7;12(4):e0175331. Impact Factor (2016): 2.806.
2. Schmidt FA, Maas MB, Geran R, **Schmidt C**, Kunte H, Ruprecht K, Paul F, Goektas O, Harms L. Olfactory dysfunction in patients with primary progressive multiple sclerosis. **Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm**. 2017;4:e369.

Reviews, Case Reports, Letters, Editorials:

1. Kunte H, Rückert RI, **Schmidt C**, Harms L, Kasper AS, Hellweg R, Grigoryev M, Fischer T, Kronenberg G. Detection of unstable carotid plaque by tissue Doppler imaging and contrast-enhanced ultrasound in a patient with recurrent amaurosis fugax. **Case Rep Vasc Med**. 2013;2013:354382. Impact Factor (2016): 1, 866.
2. Kunte H, Rückert RI, **Schmidt C**, Harms L, Grigoryev M, Fischer T. Inverse fly-through technique in ultrasound imaging of carotid stenosis. **Neurology**. 2013 Jan 1;80(1):122.1. Impact Factor (2016): 7.592.
3. Kunte H, **Schmidt C**, Harms L, Rückert RI, Grigoryev M, Fischer T. Contrast-enhanced ultrasound and detection of carotid plaque neovascularization. **Neurology**. 2012 Nov 13;79(20):2081. Impact Factor (2016): 7.592.

Buchkapitel:

1. „Psychosomatische Medizin“, Kapitel 25.5 Schlaganfall, **Schmidt C**, Otte C, Gold S, **Kohlhammer Verlag**. (voraussichtliches Erscheinungsdatum Herbst 2017)

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Hagen Kunte und Prof. Dr. med. Lutz Harms aus der Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin für die Überlassung des Themas und die wertvolle Unterstützung. Ihr großes Engagement, ihre konstruktive Kritik und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft waren mir eine große Hilfe.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Thomas Fischer aus dem Institut für Radiologie und Dipl.-Ing. Ingo Przesdzing aus dem Department of Experimental Neurology der Charité Universitätsmedizin Berlin für die technische Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Zudem möchte ich allen Ko-Autoren meiner Publikationen danken, die die Fertigstellung des Artikels erst ermöglichten.

Mein Dank gilt auch allen Patienten, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mir stets zur Seite stand.