

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Klinik für Neurologie

**Verhältnis zwischen Anzahl und Apoptose-Rate glatter
Gefäßmuskelzellen und Morphologie stabiler und instabiler
atherosklerotischer Plaques der A. carotis interna**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

**Micha Kablau
aus Hermeskeil**

Frankfurt am Main, 2005

Dekan: Prof. Dr. med. Josef Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. med. M. Sitzer

Korreferent: Prof. Dr. med. Th. Schmitz-Rixen

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2006

Zusammenfassung

Atherosklerotische Stenosen der Karotiden sind eine häufige Erkrankung mit variablem Verlauf und stellen durch ihre potentielle Emboligenität einen wichtigen Risikofaktor für zerebrale Ischämien dar. Klinische und paraklinische Parameter helfen, das individuelle Schlaganfallrisiko bei Patienten mit hochgradigen ACI-Stenosen einzuschätzen, das unmittelbar nach einem thrombembolischen Ereignis besonders hoch ist. Als histomorphologisches Korrelat dieser „Vulnerabilität“ wird die Ruptur der fibrotischen Deckplatte der Plaque propagiert, die häufiger bei symptomatischen Patienten nachzuweisen ist. Sie korreliert mit der Infiltration der Gefäßwand durch aktivierte Leukozyten, die über molekulare und zelluläre Interaktionen die Zell- und Bindegewebskomposition der Plaque verändern können. Die strukturelle Integrität atherosklerotischer Läsionen beruht auf der extrazellulären Vernetzung von kollagenem Bindegewebe, das überwiegend von phänotypisch veränderten glatten Gefäßmuskelzellen produziert wird. Eine Hypothese besagt, dass die im Rahmen der Inflammation stattfindende Zunahme proapoptotischer Mediatoren über eine Ausdünnung der zellulären und bindegewebigen Strukturen zu einem Verlust an mechanischer Stabilität führt und somit eine symptomatische Ruptur begünstigt. Da der Nachweis einer Ruptur mit Exponierung des thrombogenen nekrotischen Kerns allerdings nur in einem Teil der symptomatischen Plaques und umgekehrt auch in einem Teil der asymptomatischen nachgewiesen werden kann, ist aber bislang unklar, ob o.g. Abläufe in der humanen Karotis-Atherosklerose tatsächlich mit einer klinischen Relevanz einhergehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Auftreten der Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen (mittels DNA in situ end labeling Technik, TUNEL-Färbung) in 38 prospektiv gesammelten Endarterektomie-Präparaten hochgradiger Karotisstenosen quantitativ erfasst und statistisch in Beziehung gesetzt zu Parametern der Plaque-Instabilität, klinisch definiert durch kürzliche (< 60 Tage zurückliegende) ischämische Ereignisse (n=19) und histopathologisch definiert über den Nachweis einer Plaque-Ruptur (n=14). Außerdem wurde eine morphometrische Analyse der einzelnen Plaque-Komponenten durchgeführt und deren Ergebnisse zu den zellulären und klinischen Parametern in Beziehung gesetzt.

Die Morphometrie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen symptomatischen vs. asymptomatischen und rupturierten vs. unrupturierten Plaques was die Größe der fibrotischen Deckplatte, die durchschnittliche Dicke (Kern-Lumen-Distanz) und die dünnsten bzw. dicksten Stellen der Deckplatte angeht. Anzahl und Konzentration apoptotischer glatter Muskelzellen war deutlich ($p < 0,001$) erhöht in symptomatischen, klinisch instabilen, Karotisplaques. Allerdings waren die Apoptose-Raten in Präparaten, die eine Plaque-Ruptur aufwiesen, nicht signifikant erhöht. Darüber hinaus fand sich kein Hinweis darauf, dass erhöhte Apoptose-Raten zu einem quantifizierbaren Verlust glatter Gefäßmuskelzellen in der fibrotischen Deckplatte führen.

Auf dem Boden dieser Ergebnisse kann gefolgert werden, dass erhöhten Apoptose-Raten glatter Gefäßmuskelzellen in der humanen Atherosklerose offenbar eine tragende Bedeutung bei der Entwicklung thrombembolischer Ereignisse zukommt. Allerdings wird die Annahme, dass erhöhte Apoptose-Raten über einen Verlust an glatten Gefäßmuskelzellen Einfluss auf die morphometrischen Eigenschaften der fibrotischen Deckplatte atherosklerotischer Karotis-Läsionen nehmen und zu deren Ausdünnung führen durch die vorliegende Untersuchung nicht gestützt. Vielmehr scheint es plausibel, dass die Apoptose glatter Muskelzellen im Rahmen inflammatorischer Prozesse Einfluss auf die Komposition der Karotisplaque nimmt und so über eine Desintegration der zellulären und bindegewebigen Bestandteile zu reduzierter mechanischer Widerstandskraft und Rupturneigung führt.

Summary

Atherosclerotic stenosis of the carotid artery is a frequent disease with varying course and represents an important risk factor for cerebral ischemia by its potential for arterial embolization. Clinical parameters help to assess the individual risk of stroke, which is particularly high immediately after an embolic event. This “vulnerability” of the plaque seems to be characterized by histological signs of fibrotic cap rupture which are more frequent in symptomatic patients. They coincide with an inflammatory response of blood-derived leukocytes to the vessel wall altering its cell and tissue composition via molecular and cellular interaction. Structural stability of atherosclerotic lesions is based on extracellular cross-linking of connective tissue, mainly collagen, which is predominantly produced by smooth muscle cells after changing to a secretoric phenotype. Increase of pro apoptotic factors within atherosclerotic lesions may lead to loss of cellularity and connective tissue and favours thus mechanical instability promoting symptomatic rupture. Because rupture of the fibrotic cap with exposure of the thrombotically active necrotic core is only partially present in symptomatic and conversely in a part of asymptomatic carotid plaques the clinical significance of this event is not clear.

Therefore, 38 prospectively collected specimens from routine endarterectomy for highgrade carotid artery stenosis were examined for the occurrence of smooth muscle cell apoptosis, using the DNA in situ end labeling technique (TUNEL). Quantitative measurements were compared with markers of plaque instability defined clinically (embolic event within last 60 days; n=19) and histologically (fibrotic cap rupture; n=14). Additionally morphometric properties of the fibrotic cap were analyzed and matched up with cellular and clinical findings.

There was no difference between clinically stable/unstable plaques and non-ruptured/ruptured plaques according to size or median, minimum and maximum thickness of the fibrotic cap. Total number and concentration of apoptotic smooth muscle cells were significantly higher ($p < 0,001$) in symptomatic, clinically unstable plaques but showed only light increase in ruptured plaques. Furthermore, high rates of apoptotic smooth muscle cells did not lead to decreasing plaque cellularity according to the average number of vital smooth muscle cells.

This work suggests that smooth muscle cell apoptosis might be a pivotal event in symptomatic carotid artery disease being associated with a history of ischemic events. It does not support the hypothesis that apoptosis in atherosclerotic disease changes smooth muscle cellularity nor leads to a thinning of the fibrous cap. It rather seems plausible that smooth muscle cell apoptosis as a sign of increased cell turnover during inflammatory response to the vessel wall influences composition and structural integrity of carotid plaques. Therefore apoptosis may weaken the mechanical properties of atherosclerotic plaques making them prone to rupture.

Inhaltsverzeichnis:

Zusammenfassung.....	III
Summary	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungen	IX
1. Einleitung	1
2. Wissenschaftlicher Hintergrund	4
2.1. Karotisstenosen - klinische Relevanz	4
2.1.1. Epidemiologischer Hintergrund	4
2.1.2. Definition symptomatischer Karotisstenosen	5
2.1.3. Spontanverlauf und Therapie-Optionen	6
2.2. Karotisstenosen - Manifestation der Atherosklerose.....	7
2.2.1. Atherosklerose - eine entzündliche Gefäßerkrankung.....	7
2.2.2. Strukturelle Komponenten der atherosklerotischen Karotisstenose	9
2.2.3. Glatte Muskelzellen: Strukturgeber der fibrotischen Deckplatte.	11
2.3. Das Konzept der instabilen Karotisstenose.....	13
2.4. Pathomorphologische Korrelate der instabilen Karotisstenose	16
2.4.1. Ruptur.....	16
2.4.2. Oberflächenassoziierte Thrombose.....	18
2.4.3. Inflammation	20
2.5. Apoptose glatter Muskelzellen: Folge molekularer Prozesse der Atherosklerose	23
2.6. Hypothese	28

3. Methoden	33
3.1. Klinische Charakteristika der Studienpopulation	33
3.1.1. Charakteristika der Patienten	34
3.1.2. Zerebrovaskuläre Risikofaktoren	34
3.1.3. Medikation	36
3.2. Materialgewinnung	37
3.3. Histologische Aufarbeitung der Präparate	38
3.3.1. Übersichts-Färbungen und α-Actin-Färbung glatter Muskelzellen	38
3.3.2. DNA in situ end labeling (TUNEL) + PAS-Färbung	39
3.4. Digitale Bildbearbeitung und Auswertung	42
3.5. Statistik	45
4. Ergebnisse	46
4.1. Morphometrie der fibrotischen Deckplatte	46
4.2. Apoptosen glatter Gefäßmuskelzellen	47
5. Diskussion	50
6. Literatur	59
7. Danksagung	66
8. Lebenslauf	67
9. Erklärung	68

Abkürzungen (Teil 1):

ACAS	„Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study“
ACI	Arteria carotis interna
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DAB	Diaminobenzidin
DIG	Digoxigenin
DR	<i>death receptor</i>
EvG	Elastica van Gieson
F(ab)	Antigen bindendes Fragment (eines Antikörpers)
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FD	Fibrotische Deckplatte
GIMP	<i>GNU Image Manipulation Program</i>
GNU	<i>General Public License</i>
GSNO	S-Nitrosoglutathion
HE	Hämatoxilin-Eosin
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
ICD	<i>International Statistical Classification of Diseases</i>
IFN	Interferon
IGF/IGF-R	<i>insulin like growth factor / insulin like growth factor-receptor</i>

Abkürzungen: (Teil 2)

IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO (Stickstoffmonoxid)-Synthetase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRS	<i>modified Rankin Scale</i>
NASCET	“North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial”
NF-κB	<i>kappa-gene binding nuclear factor</i>
oxLDL	Oxidiertes <i>low density</i> -Lipoprotein
PAS (-Färbung)	<i>periodic acid Schiff</i> (-Färbung)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
SSRE	<i>shear stress response element</i>
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TF	<i>tissue factor</i> (Gewebsthromboplastin)
TIA	Transitorische Ischämische Attacke
TNF/TNF-R	Tumor Nekrose Faktor/ Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
WF	Wachstumsfaktoren

1. Einleitung

Atherosklerotische Stenosen der A. carotis interna sind eine häufige Ursache von zerebralen und retinalen Durchblutungsstörungen (Fine-Edelstein et al., 1994). Der wesentliche Pathomechanismus stellt dabei die Thrombembolisierung in ein distal gelegenes Stromgebiet dar (Golledge et al., 2000). Allerdings ist das Risiko eines ischämischen Ereignisses interindividuell und im zeitlichen Verlauf variabel (Barnett et al., 1998). Klinische und paraklinische Parameter helfen zwar, das individuelle Schlaganfallrisiko abzuschätzen. Im Einzelfall ist diese Beurteilung und damit die Indikationsstellung für das weitere therapeutische Vorgehen allerdings oft schwierig. Die klinische Beobachtung, dass atherosklerotische Plaques der Karotiden offenbar klinisch instabile Phasen durchlaufen (E.C.S.T., 1998), in denen sie durch eine erhöhte Emboligenität geprägt sind, führte in den vergangenen Jahren zur Erforschung der zugrunde liegenden funktionellen Veränderungen. Die Korrelation von histologischen Befunden aus humanen Endarterektomie-Präparaten und klinischem Verlauf half pathomorphologische Eigenschaften zu identifizieren, die mit einem erhöhten Embolierisiko einhergehen. Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen sind gekennzeichnet durch die Akkumulation aktivierter Immunzellen (Jander et al., 1998; Spagnoli et al., 2004). Diese wird vermittelt durch Sekretion chemotaktischer Substanzen und die verstärkte endotheliale Exprimierung interzellulärer Adhäsionsmoleküle (DeGraba et al., 1998; Libby et al., 2002). Durch die inflammatorische Infiltration der Gefäßwand verstärkt sich dort die Sekretionsrate von Cytokinen und Wachstumsfaktoren (Wilcox et al., 1994). Sezernierte Metalloproteinasen können zur Degradation der extrazellulären Matrix führen, die das strukturelle Gerüst in

atherosklerotischen Läsionen bildet (Loftus et al., 2000; Molloy et al., 2004). Diese Prozesse finden sich gehäuft in symptomatischen atherosklerotischen Karotisstenosen und gehen dort gehäuft mit histologischen Zeichen einer Ruptur der Karotisplaque, dem potentiell emboligenen Ereignis, einher. Welche Mechanismen im Einzelnen eine Thrombembolie verursachen, ist allerdings noch nicht vollständig erklärt.

Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Apoptose, der so genannte programmierte Zelltod, ein Charakteristikum fortgeschrittener atherosklerotischer Plaques darstellt. Dabei kommt es durch Aktivierung und verstärkter Expression bestimmter Gene zu einer systematischen Auflösung des Zellkerns und schließlich zum Einschmelzen der Zelle in einzelne Membranvesikel. In atherosklerotischen Plaques wird das extrazelluläre Bindegewebe überwiegend von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) gebildet. Dass auch diese in der Atherosklerose vermehrt vom apoptotischen Zelltod betroffen sind (Kockx et al., 1998), ließ sich nicht nur anhand der histologischen Aufarbeitung von Karotisplaques nachweisen, sondern erscheint auch plausibel, da für viele inflammatorische Prozesse gezeigt wurde, dass sie im Rahmen der Atherosklerose eine proapoptotische Wirkung haben (Boyle et al., 2001).

In der humanen Karotisplaque könnten erhöhte Apoptose-Raten der VSMCs über deren quantitativen Verlust zu einer Minderproduktion an kollagenem Bindegewebe führen und damit der Plaque die strukturelle Grundlage der mechanischen Widerstandskraft entziehen. Dies könnte eine Plaque-Ruptur mit der Folge klinisch-neurologischer Symptomatik begünstigen. Inwieweit dieser vielfach diskutierten Hypothese (Newby et al., 1999) eine klinische Relevanz für die humane Karotisstenose zukommt, ist durch klinisch korrelierte Studien noch nicht ausreichend belegt.

Dies ist in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht worden. Dazu wurden Endarterektomie-Präparate von jeweils 19 konsekutiven symptomatischen und asymptomatischen Patienten gesammelt und histologisch aufgearbeitet. Es wurde das Ausmaß der Apoptose von VSMCs bestimmt und in Bezug gesetzt zum klinischen Verlauf der Patienten. Wir untersuchten außerdem, ob die Apoptose-Rate eine Auswirkung auf die Anzahl vitaler Muskelzellen in der Plaque zeigte. Zusätzlich wurde eine computergestützte Morphometrie der so genannten fibrotischen Deckplatte durchgeführt, die eine lumennahe Ansammlung aus überwiegend kollagenem Bindegewebe darstellt und durch die Synthese-Leistung der glatten Muskelzellen in der Plaque entsteht. Wir überprüften inwieweit erhöhte Apoptose-Raten die morphometrischen Eigenschaften der Deckplatte veränderten, insbesondere ob es zu einer globalen oder fokalen Ausdünnung der Deckplatte kommen würde, die möglicherweise ihre Ruptur begünstigen könnte.

Die Ergebnisse und ihre mögliche klinische Bedeutung werden vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur erläutert und diskutiert.

2. Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1. Karotisstenosen - klinische Relevanz

2.1.1. Epidemiologischer Hintergrund

Zerebrale Durchblutungsstörungen stellen weltweit eine häufige Ursache von Morbidität und Mortalität dar. In Deutschland liegt die anhand des Erlangener Schlaganfallregisters ermittelte Inzidenz für erstmalige Schlaganfälle bei 182/100.000 (Kolominsky-Rabas et al., 2001). Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes starben im Jahr 2003 in Deutschland 49.828 Menschen an den Folgen eines Schlaganfalls (ICD10: I63 + I64) (Statistisches-Bundesamt, 2005). Der Schlaganfall stellt damit die dritthäufigste Todesursache in westlichen Industrienationen dar. Durch Invalidisierung führt er bei Betroffenen und deren Angehörigen zu persönlichem Leid und sozialer Einschränkung, in den Sozialsystemen zu hohen Kosten. Die Daten des Bundesgesundheits surveys von 1998 sprechen dafür, dass in Deutschland über eine Million Menschen leben, die einen Schlaganfall erlitten haben (Robert Koch-Institut 2000). Zwar ist 90 Tage nach einem Schlaganfall mehr als die Hälfte der Patienten funktionell (modified Rankin Scale; mRS) nur relativ gering eingeschränkt (mRS 0-2), doch sind knapp 20% der Patienten nur mit Hilfe gehfähig oder bettlägerig (mRS4-5). Mehr als 15% versterben innerhalb von 3 Monaten an den Folgen ihres Schlaganfalls (Grau et al., 2001).

Die hochgradige Stenose der proximalen, extrakraniellen Arteria carotis interna (ACI), als klinisch relevante Manifestation der fortgeschrittenen Atherosklerose, bildet die Ursache von bis zu 15% der Schlaganfälle (Fine-Edelstein et al., 1994). In einem unselektierten Patientenkollektiv (n=348) fand sich eine >50%ige asymptomatische ACI-

Stenose bei rund 4%, eine hochgradige >80%ige Stenosen bei rund 1% (Colgan et al., 1988). Die Prävalenz dieser Erkrankung nimmt mit dem Alter zu. Bei rund 5-10% der über 65jährigen zeigt die Karotis eine atherosklerotisch bedingte Lumenreduktion von mehr als 50% (Fine-Edelstein et al., 1994). Dabei nimmt der Stenosegrad mit dem Alter sowie dem Ausmaß der Risikofaktoren zu (Prati et al., 1992).

2.1.2. Definition symptomatischer Karotisstenosen

ACI-Stenosen können Ursache von zerebralen und retinalen Durchblutungsstörungen in ihrem jeweils distal gelegenen Gefäßstromgebiet sein. Während der Pathomechanismus in der Regel eine Thromb-Embolisierung in ein distal gelegenes Blutgefäß, mit der dortigen Bildung eines Gefäßverschlusses darstellt (Golledge et al., 2000), ist die hämodynamisch bedingte Ischämie aufgrund einer Hypoperfusion eher die Ausnahme (Ringelstein et al., 1988). Der Verlauf dieser Durchblutungsstörungen kann transienter oder dauerhafter Art sein. Aufgrund von Sauerstoff- und Glukosemangel kommt es in einer solchen Situation zunächst zu einem Erliegen des Synthesestoffwechsels, im Verlauf fehlt es an Energie zur Aufrechterhaltung des Strukturstoffwechsels, was zum Untergang des betroffenen Gewebes führt (Acker et al., 2004). Tritt eine spontane oder medikamentös bedingte Wiedereröffnung des okkludierten Gefäßes ein, bevor ein dauerhafter Gewebeschaden entsteht, kann sich der Patient unter Umständen ohne residuelle Gewebedefekte und Symptome von der Durchblutungsstörung erholen. Ist dies nicht der Fall, kommt es durch die Ischämie im betroffenen Stromgebiet zum Zelluntergang mit dauerhaftem Funktionsverlust.

2.1.3. Spontanverlauf und Therapie-Optionen

Große randomisierte Studien haben gezeigt, dass die Endarterektomie, also die operative Sanierung einer Karotisstenose, einen positiven Effekt auf die Prognose von unlängst symptomatischen (Barnett et al., 1998, E.C.S.T., 1998) und mit Einschränkung auch asymptomatischen Karotisstenosen hat (A.C.A.S., 1995).

Während sich das relativ geringe Schlaganfall-Risiko gering- und mittelgradiger symptomatischer Karotisstenosen durch eine Operation nicht signifikant senken lässt, profitieren Patienten mit hochgradigen Stenosen deutlich (Goldstein 2003), denn für sie liegt das Risiko einer erneuten zerebralen Ischämie bei 4-18 % pro Jahr (Barnett et al., 1998; E.C.S.T., 1998). Eine Reihe von Subgruppenanalysen zeigte, dass das individuelle Schlaganfallrisiko aber nicht vom Stenosegrad allein abhängig ist. Begleitende intrakranielle Gefäßprozesse sowie eine schlechte intrakranielle Kollateralisation (Henderson et al., 2000) können das Schlaganfall-Risiko der konservativ behandelten Patienten deutlich erhöhen. Patienten mit transienter retinaler Ischämie, sind offenbar weniger gefährdet einen Schlaganfall zu erleiden als Patienten mit transienter hemisphärischer Ischämie (Streifler et al., 1995).

Der Nutzen des Patienten hängt dabei aber von dem Risiko ab, im Rahmen der Operation, einen Schlaganfall oder eine sonstige lebensbedrohliche Komplikation zu erleiden. Dieses Risiko wird nicht nur davon bestimmt, ob der Patient symptomatisch oder asymptomatisch ist, sondern auch von der Art der ggf. erlittenen Ischämie (TIA, okuläres Ereignis, Schlaganfall) und letztlich von Expertise und Kompetenz des Operationsteams (Bond et al., 2003). Für symptomatische Patienten, die nur ein geringes oder mittelschweres neurologisches Defizit erlitten haben geht eine frühe

Operation nach dem Schlaganfall offenbar nicht mit einem erhöhten perioperativen Risiko einher (Moore et al., 1995). Die Tatsache, dass bis zu 11% der Patienten nach einer erlitten TIA einen Schlaganfall erleiden und dies überwiegend innerhalb der ersten 30 Tage, sollte bei dieser Patientengruppe zu einer zeitnahen Sanierung der Gefäßstenose führen (Johnston et al., 2000).

Bei asymptomatischen Patienten mit einer ACI-Stenose wird die Indikation zur Operation generell zurückhaltender gestellt, da das assoziierte Schlaganfallrisiko deutlich unter dem symptomatischer Patienten liegt (Hennerici et al., 1987). Die Daten der „Asymptomatic Carotid Artery Study“ zeigen, dass Männer im Gegensatz zu Frauen, ein bedingt höheres Schlaganfallrisiko und ein geringeres perioperatives Risiko tragen (A.C.A.S., 1995), so dass hier bei einem perioperativen Risiko kleiner 3% ein operatives Vorgehen erwogen werden kann (Biller et al., 1998). Zudem haben Patienten mit in der Verlaufskontrolle rasch progredienten Stenosegraden bzw. Patienten mit sehr hochgradigen Stenosen (90-99%) (Biller et al., 1998) offenbar ein erhöhtes Risiko, so dass ihnen gemäß den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie eine Operation empfohlen werden kann (Diener et al., 2003).

2.2. Karotisstenosen - Manifestation der Atherosklerose

2.2.1. Atherosklerose - eine entzündliche Gefäßerkrankung

Die humane Karotisstenose entspricht in ihrer Morphologie den typischen atherosklerotischen Läsionen, wie sie in großen und mittleren Blutgefäßen auftreten und seit Jahrzehnten erforscht werden. Sie stellen einen mitunter die gesamte Lebensspanne überdauernden Krankheitsprozess dar, so dass frühe Formen bereits bei Kindern und

Jugendlichen gefunden werden können (Holman et al., 1958). Die Weiterentwicklung (Ross 1999) der von Russel Ross in den 70er Jahren aufgestellten „response-to-injury“-Hypothese (Ross et al., 1977) beschreibt als Ursache der Atherosklerose eine Schädigung des Gefäßendothels aufgrund systemisch wirkender Noxen, bedingt durch vaskuläre Risikofaktoren (Hypertonus, Diabetes mellitus, Nikotin-Abusus, Hypercholesterinämie, Hyperhomocysteinämie, etc.), möglicherweise auch durch genetische Veränderungen und Infektionen (Neureiter et al., 2003). Folge ist die „endotheliale Dysfunktion“, die zu einem Ungleichgewicht der vaskulären Homöostase mit Verlust der vasoprotektiven Eigenschaften wie Vasodilatation, Schutz vor überschießendem Zellwachstum und Inhibierung inflammatorischer Prozesse führt (Davignon et al., 2004). In der Folge können sich die Affinität und Permeabilität des Endothels für Leukozyten und Thrombozyten verändern. Dies geschieht im menschlichen Gefäßsystem nicht überall in gleichem Ausmaß, sondern in Abhängigkeit von den lokalen Strömungsverhältnissen. Im Bifurkationsbereich der A. carotis communis liegen in manchen Abschnitten keine laminaren, sondern turbulente Flüsse vor, mit zeitlich und örtlich wechselnden Scherkräften (Perktold et al., 1991). Die endotheliale Produktion und Sekretion von Integrinen (Urbich et al., 2000) und Adhäsionsmolekülen, wie z.B. ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) (Nagel et al., 1994) kann aufgrund eines genetischen „shear stress response“-Elementes (SSRE) im genetischen Promotor in Abhängigkeit von den wirkenden Scherkräften erfolgen (Nagel et al., 1999). Die Bifurkation der A. carotis stellt somit eine Prädilektionsstelle zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen dar.

Hier bringt die Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren durch die eingewanderten Immunzellen eine Entzündung in Gang, die Migration und Proliferation von glatten

Muskelzellen stimuliert. In Interaktion mit den umgebenden zellulären und extrazellulären Komponenten (Fitzgerald et al., 1999), verändern die VSMCs ihren Phänotyp und erlangen die Fähigkeit zur Produktion von Kollagen (Campbell et al., 1994). Folge ist die subendotheliale Verdickung der Intima. Besteht der inflammatorische Stimulus weiter, wandern anhaltend Makrophagen und Lymphozyten auch in die tieferen Intima-Schichten. Es kommt zu weiterer Sekretion von Proteasen, Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, die den entzündlichen Reiz verstärken. Sie können durch Zelluntergang und Zersetzung des extrazellulären Bindegewebes zu einer fokalen Nekrose in der Gefäßwand führen (Stary et al., 1995). Sind diese Prozesse über Jahre progredient, entwickelt sich die atherosklerotische Läsion zu einer das Gefäßlumen stenosierenden Plaque mit typischer Morphologie.

2.2.2. Strukturelle Komponenten der atherosklerotischen Karotisstenose

Diese Morphologie ist geprägt durch bestimmte Komponenten, die typischerweise Bestandteil einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaque sind. Unter dem Endothel liegen Schichten aus fibrösem Bindegewebe, durchsetzt von sekretorisch aktiven glatten Gefäßmuskelzellen, die gemeinsam die so genannte „fibrotische Deckplatte“ bilden. Sie grenzt die darunter liegende Ansammlung von extrazellulärem Lipid und Überresten nekrotisierter Schaumzellen, das sind lipidüberladene Makrophagen und Muskelzellen, vom verbleibenden Gefäßlumen ab. Dieser im Querschnittspräparat teils schon makroskopisch erkennbare und gut abzugrenzende Bereich wird hier „nekrotischer Kern“ bzw. „Lipid-Kern“ genannt. (Die Klassifikation der American Heart Association von Stary et al. (Stary et al., 1995) bezeichnet eine solche Läsion als ‚Fibroatherom‘ wenn der Kern überwiegend lipidreich ist und unterscheidet davon Läsionstypen mit einem

überwiegend kalzifiziertem Kern.) Die seitlichen Ränder des nekrotischen Kerns werden von Kapillaren flankiert. Die Schulterregionen der fibrotischen Deckplatte, die den nekrotischen Kern seitlich begrenzen weisen typischerweise eine erhöhte Infiltration von Immunzellen auf (Stary et al., 1995).

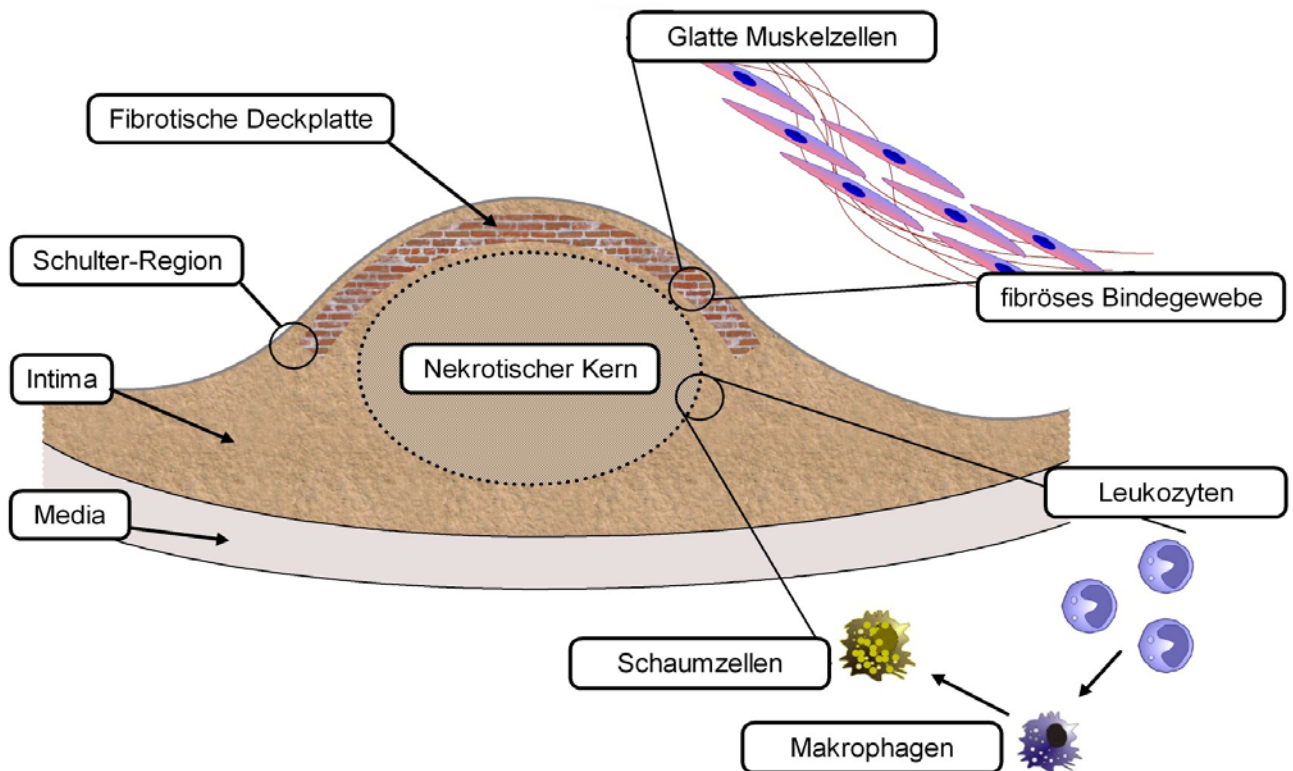


Abbildung 2.2.2.: Schematische Darstellung der Komponenten einer typischen fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaque. In den histologischen Präparaten sind die Übergänge fließend. Die symbolhafte Vergrößerung der zellulären Bestandteile stellt die jeweils überwiegenden, charakteristischen Zellpopulationen dar, die eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Komponenten ermöglichen. Während die fibrotische Deckplatte aus homogen strukturierten Schichten glatter Muskelzellen und dem durch sie produzierten überwiegend kollagenen Bindegewebe besteht, ist der nekrotische Kern eine amorphe Ansammlung von extrazellulärem Lipid und Zelltrümmern. Makrophagen, die von zirkulierenden Blut-Leukozyten abstammen digestieren hier Lipide bis sie zu so genannten Schaumzellen werden und schließlich nekrotisieren (Stary et al., 1995).

2.2.3. Glatte Muskelzellen: Strukturgeber der fibrotischen Deckplatte.

Die fibrotische Deckplatte ist, wie beschrieben, histologisch durch eine Ansammlung geschichteter glatter Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix, überwiegend Kollagenen, charakterisiert. Während die Intima beim Menschen unter physiologischen Bedingungen aber nur wenige Muskelzellen enthält wirken hier im Rahmen der Atherosklerose *Migrations-*, *Proliferations-* und *Sekretions-*Prozesse, die zu einer besonderen Bedeutung der glatten Muskelzellen für Bildung und Erhalt der fibrotischen Deckplatte führen.

Von Makrophagen und Endothelzellen sezernierte Wachstumsfaktoren wirken chemotaktisch auf VSMCs und „locken“ diese von der zellreichen Media aus an (Graf et al., 1997). Interzelluläre Adhäsionsmoleküle, die auf Makrophagen und Endothelzellen exprimiert werden, können die Ausbildung dichter Zellschichten begünstigen (Gilbertson-Beadling 1993). Zusätzlich wird offenbar die *Proliferation* der Muskelzellen stimuliert. Experimente an Zellkulturen sowie an tierexperimentellen und humanen Atherosklerosemodellen zeigen, dass die Proliferation der Muskelzellen durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren beeinflusst werden kann, deren synergistische Wirkung offenbar diesen Krankheitsprozess steuert. Aufgrund des physiologischerweise geringen Zellumsatzes in der Gefäßwand kann bereits eine geringe Erhöhung der Proliferationsrate zu einem relevanten Wachstum der Intima führen. Einen Schutz vor der Wirkung der Wachstumsfaktoren bildet normalerweise die über transmembranäre Integrine vermittelte Interaktion mit Bestandteilen der Basalmembran (Hynes 1992), die die VSMCs umgibt. Heparin bzw. Heparansulfat und assoziierte Proteoglykane sind Bausteine der Basalmembran. Sie können die Aktivität von Wachstumsfaktoren modu-

lieren und so die Vermittlung von proliferativen Reizen hemmen (Tran et al., 2004). Wird das intakte Umfeld durch Proteasen zerstört, fehlt diese wachstumshemmende Wirkung.

Eine weitere Beobachtung scheint mit der Integrität der Basalmembran verknüpft. Gesunde Gefäßwände enthalten überwiegend glatte Gefäßmuskelzellen mit physiologischen kontraktile Eigenschaften. In atherosklerotischen Läsionen dagegen finden sich vermehrt weitere Phänotypen. Gefäßmuskelzellen können sich hier zu einem *sekretorisch* aktiven Phänotyp wandeln. Dafür verantwortlich scheint eine durch die extrazelluläre Matrix vermittelte Modulation des Zellzyklus zu sein (Koyama et al., 1996). Solange die Zellen Kontakt zur umgebenden Basalmembran, mit Laminin und Kollagen IV, haben, wird dieser Shift zum sekretorisch aktiven Phänotyp offenbar gehemmt (Thyberg et al., 1997). Geht er durch Degradation der Basalmembran verloren (Fitzgerald et al., 1999), trifft die Muskelzelle auf interstitielles Bindegewebe z.B. Fibronectin, das den Shift fördert (Hayward et al., 1995). Zusätzlich stimuliert wird er wahrscheinlich durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren (Morisaki et al., 1992). Solche sekretorisch aktiven VSMCs finden sich in atherosklerotischen Plaques vor allem in der fibrotischen Deckplatte (Campbell et al., 1994). Sie zeigen charakteristischerweise eine geringe Anfärbbarkeit für α -Actin und sind elektronenmikroskopisch an ihrem deutlich ausgeprägten rauen endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat zu identifizieren (Thyberg et al., 1997). Neben Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Mediatoren steigern die „aktivierten“ Muskelzellen ihre Produktion von Bindegewebs-Bausteinen (Campbell et al., 1994) wie Kollagen I, Elastin und Fibronectin, so dass sich als Folge eines extrazellulären Remodellings die Plaque-Komposition qualitativ und quantitativ verändern kann.

2.3. Das Konzept der instabilen Karotisstenose

Der klinische Spontanverlauf spricht dafür, dass hochgradige atherosklerotische Karotisstenosen Veränderungen ihrer Konstitution erfahren können, die das Risiko ischämischer Ereignisse erhöhen. Eine stattgefundene transiente oder manifeste Ischämie ist oft der erste Hinweis auf solche Veränderungen. In der Folge behält die Plaque zunächst ein erhöhtes Schlaganfallrisiko, das erst im zeitlichen Verlauf wieder sinkt (Barnett et al., 1998). Aufgrund des überwiegend embolischen Pathomechanismus ist zu erwarten, dass die verantwortlichen Veränderungen in der Plaque ihre Thrombogenität beeinflussen. In der Vergangenheit hat man versucht, zusätzliche paraklinische Kriterien zu etablieren, um über den klinischen Status (symptomatisch vs. asymptomatisch) hinaus besser einschätzen zu können, welches Thrombembolie-Risiko eine ACI-Stenose in sich trägt. Die während des transkraniellen Ultraschall-Monitorings der ipsilateralen Aa. cerebri mediae ableitbaren zerebralen Mikroemboliesignale (Padayachee et al., 1986) stellen ein mögliches Korrelat kleinster, asymptomatischer Thrombembolien dar (Russell et al., 1991; Markus et al., 1993). Dass deren Auftreten im distalen Karotis-Stromgebiet mittels einer medikamentösen Hemmung der Blutplättchen-Funktion durch Acetylsalicyläure und Clopidogrel (Markus et al., 2005) oder S-Nitrosoglutathion (GSNO) (Kaposzta et al., 2002) rapide reduziert werden kann, und dass sie häufiger auftreten, wenn histologisch der Nachweis einer luminalen Thrombose gelingt (Sitzer et al., 1995; Spencer 1996), spricht dafür, dass sie tatsächlich das Korrelat kleinster embolisierender Thrombozytenaggregate darstellen. Das Auftreten dieser mikroembolischen Signale ist quantitativ an den klinischen Verlauf der Patienten gekoppelt, denn sie treten signifikant häufiger ipsilateral zu einer symptomatischen als

zu einer asymptomatischen Karotisstenose auf (Markus et al., 1995) und erreichen unmittelbar nach dem ischämischen Ereignis ihre maximale Anzahl (Ries et al., 1996). Mit zunehmendem zeitlichen Abstand und nach operativer Revision des erkrankten Gefäßes sinkt die Zahl wieder (Siebler et al., 1993). Schließlich scheint ihr Auftreten sowohl bei symptomatischen als auch bei asymptomatischen ACI-Stenosen ein Prädiktor für drohende transiente und manifeste Ischämien zu sein (Markus et al., 2005). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass Patienten mit einer fortgeschrittenen Karotisstenose mitunter zeitlich begrenzt, klinisch vulnerable Phasen durchlaufen, in denen sie, aufgrund einer erhöhten Thrombogenität der atherosklerotischen Läsion, einem erhöhten Schlaganfallrisiko ausgesetzt sind.

Es ist plausibel, dass diesen *vulnerablen Phasen* morphologische oder funktionelle Veränderungen der Plaque zugrunde liegen, die ihre Eigenschaften im Kontakt mit dem Blutstrom verändern.

Die Duplexsonographie identifiziert einige Merkmale atherosklerotischer Plaques, die mit dem klinischen Verlauf der Patienten in Zusammenhang gebracht werden. Die Echogenität nimmt offenbar mit dem Kollagengehalt zu. Zeigen sich einzelne echoreiche, schallschattenwerfende Foci innerhalb der Plaque kann dies auf eine stärkere Kalzifizierung hinweisen. Echoarme Plaques mit eher atheromatöser Histologie (Gronholdt 1999), scheinen in Verlaufskontrollen mit einem im Vergleich erhöhten Schlaganfallrisiko einherzugehen (Gronholdt et al., 2001). Bei der Beurteilung der Plaque/Blut-Grenzfläche werden neben glatten, regelmäßigen Oberflächen duplex-morphologisch auch unregelmäßige Profile oder sogar Ulzerationen beschrieben. Diesen wird zwar klinisch eine erhöhte Thrombogenität zugeschrieben (Moore et al., 1968; Eliasziw et al., 1994;

Adetiloye et al., 2003), doch ist fraglich, ob sie tatsächlich Plaque-Rupturen im histologischen Sinne abbilden (Sitzer et al., 1996). Bislang gibt es keine Methode zur nicht-invasiven Beurteilung der Plaque-Morphologie *in vivo*, die eine Identifizierung der tatsächlichen Morphologie und eine individuelle Risikoabschätzung ermöglichen würde.

Unter Verwendung der genannten klinischen und zusatzdiagnostischen Parameter kann das Schlaganfall-Risiko von Patienten mit hochgradiger Karotisstenose eingeschätzt werden. Eine Karotisstenose gilt als klinisch stabil und ist mit einem geringen Schlaganfallrisiko assoziiert, wenn sie asymptomatisch ist und die Zusatzdiagnostik keinen Hinweis auf erhöhte Thrombogenität ergeben hat. Klinisch instabil sind entsprechend symptomatische Karotisstenosen, bei denen eine erhöhte Thrombogenität zu befürchten ist (Sitzer et al., 1995).

Der tatsächliche Nachweis molekularer, zellulärer, funktioneller und morphologischer Veränderungen innerhalb einer atherosklerotischen Plaque, die die gewandelte Thrombogenität beeinflussen, gelingt derzeit nur mit einer Kombination aus histologischen, immunologischen und experimentellen Verfahren. Diese haben eine Reihe von strukturellen Veränderungen und Mechanismen aufgedeckt, die mit klinischer Destabilisierung einhergehen. Die für die Karotisstenose als relevant eingeschätzten histomorphologischen und histopathologischen Prozesse werden im folgenden Kapitel erklärt und ihre mögliche Bedeutung für thrombembolische Ereignisse diskutiert.

2.4. Pathomorphologische Korrelate der instabilen Karotisstenose

Im Vergleich zur Koronar-Atherosklerose, gibt es weniger Arbeiten, die versuchen die histomorphologischen Eigenschaften speziell der klinisch instabilen Karotisstenose zu identifizieren. Inwieweit kardiovaskuläre Konzepte angesichts der Unterschiede beider Gefäßterritorien übernommen werden können, bleibt offen. Während die Makroangiopathie der Karotiden eher zu embolisch bedingten Ischämien führt, ist die koronare Atherosklerose Ursache von lokalen Lumen okkludierenden Thrombosen (van der Wal et al., 1999). Darüber hinaus unterscheiden sich die Gefäße in Größe und Flussvolumina und einige Autoren weisen auf Unterschiede, bzgl. ontogenetischer bzw. klonaler Entwicklung verschiedener vaskulärer Zellpopulationen und ihrer Phänotypen hin (Frid et al., 1997; Murry et al., 1997), so dass für die Atherosklerose der Koronarien und Karotiden potentiell unterschiedliche Pathomechanismen bedeutsam sein können.

Im Rahmen der Karotis-Endarterektomie gewonnene atherosklerotische Plaques ermöglichen eine Untersuchung der morphologischen, histologischen und teils auch funktionellen Aspekte, denen eine Relevanz im Konzept der Destabilisierung der Karotisstenosen beigemessen wird.

2.4.1. Ruptur

Makroskopisch im Rahmen von Endarterektomien untersuchte Karotisplaques weisen bei symptomatischen Patienten häufiger Zeichen einer Ruptur auf, als bei asymptomatischen (Carr et al., 1996; Ballotta et al., 2000). Durch die untersucherabhängige Einschätzung des intra-operativen Befundes erhält man dabei keine quantitativen Messwerte. Unregelmäßigkeiten und Unterbrechungen der Intima mit Freilegung des

darunter liegenden Lipid-Kerns oder der Media werden als makroskopische Kriterien beschrieben (Ballotta et al., 2000), setzen aber eine ausreichende Größe des Oberflächendefektes voraus um ihn identifizierbar zu machen.

In der histopathologischen Untersuchung können auch kleinere Gewebsdefekte erkannt werden und Strukturen besser identifiziert werden. Die oberflächliche Läsion des Endothels – als Erosion oder Fissur beschrieben – kann von tieferen Rupturen mit Zerstörung der fibrotischen Deckplatte und Freilegung des nekrotischen Kerns unterschieden werden. Solche Ulzerationen finden sich gehäuft in symptomatischen Karotisplaques (Bassiouny et al., 1989; Sterpetti et al., 1991; Eliasziw et al., 1994; Seeger et al., 1995; Sitzer et al., 1995; Bassiouny et al., 1997; Carr et al., 1997). Eine Meta-Analyse (Golledge et al., 2000) vergleichbarer Untersuchungen aus dem Jahr 2000 zeigte Ulzerationen in 48% der symptomatischen, aber nur in 35% der asymptomatischen Plaques (270 Patienten, davon 157 symptomatisch; $p < 0,001$). Oberflächlich fissurale Läsionen werden nur tendenziell in symptomatischen Plaques häufiger gefunden. Fisher et al. (Fisher et al., 2005) beschreiben in ihrer Gegenüberstellung von 170 ACAS-Patienten (Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study) und 71 NASCET-Patienten (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial) ebenfalls, dass Plaque-Ulzerationen häufiger bei symptomatischen Patienten zu finden sind (36% versus 14%; $P < 0,001$). Interessanterweise war der Unterschied signifikant, unabhängig davon, ob die Symptomatik ipsi- oder kontralateral vorlag.

2.4.2. Oberflächenassoziierte Thrombose

Wird die Integrität des Gefäßendothels durch eine Erosion oder Ulzeration beeinträchtigt, wird diese Präsentation einer unphysiologischen Oberfläche die lokale Thrombogenität verändern. Deshalb ist schon früh das Auftreten intraluminaler Thrombosen in humanen Karotisstenosen systematisch untersucht worden (Fisher 1986). Die histologische Untersuchung macht es notwendig die Plaque intraoperativ zu asservieren und der weiteren histologischen Aufarbeitung zuzuführen. Bei der Auswertung muss dann zwischen im Gefäßlumen artifiziell verbliebenem Blut und andererseits tatsächlich oberflächenassoziierten bereits in vivo entstandenen Thromben unterschieden werden. Soweit es definiert wird, fordern die meisten Autoren diesbezüglich einen zugrunde liegenden Endothel- oder Gewebsdefekt, um das thrombotische Material als pathologischen Thrombus zu identifizieren. Solche Thromben sind nach Bassiouny et al. überwiegend ein Phänomen der fortgeschrittenen Karotis-Atherosklerose, da sie vermehrt in hochgradig stenosierenden Plaques zu finden sind (Bassiouny et al., 1989). Wenn durch eine Gefäßverengung höhere Scherkräfte im Blutstrom auftreten, kann dies zu einer Aktivierung der vorbeiziehenden Blutplättchen führen und somit eine oberflächenassoziierte Thrombusbildung begünstigen (Ruggeri 1993). Einen quantitativen Unterschied zwischen symptomatischen und asymptomatischen Plaques fanden Bassiouny et al. (Bassiouny et al., 1989) und Carr et al. (Carr et al., 1996) in ihren Arbeiten nicht. Auch die größte histologische Studie, die dies untersuchte (281 Plaques) definierte einen intraluminalen Thrombus über das Vorhandensein einer darunter liegenden Ulzeration (Milei et al., 2003). Sie fanden nicht-okklusive Thrombosen in etwa einem Viertel der Plaques ohne Unterschiede zwischen

symptomatischen und asymptomatischen Präparaten. Fisher et al. (Fisher et al., 2005), die 241 Präparate untersuchten, nahmen einen wandständigen Thrombus an, wenn dieser in Anlehnung an ihre Vorarbeiten (Fisher et al., 1993) größer als $340 \times 110 \mu\text{m}$ war. In ihrer Auswertung fanden sich diese Thrombusformationen erwartungsgemäß häufiger über ulzerierten Plaques. Aber auch eine intraluminale Thrombose über ulzerierten Plaques fand sich deutlich häufiger über kürzlich symptomatischen Karotisplaques (mittlere Zeitspanne zwischen ischämischem Ereignis und Operation: 48 Tage). In dieser Arbeit wiederum war allerdings kein Zusammenhang zwischen intraluminale Thrombose und Stenosegrad nachweisbar. Über den von gering bis hochgradig stenosierenden Plaques fand sich eine intraluminale Thrombose in 35-39% (Fisher et al., 2005). Spagnoli et al. (Spagnoli et al., 2004) untersuchten 269 Präparate und fanden „thrombotisch aktive Plaques“, definiert durch das Vorliegen eines intraluminale plättchen- oder fibrinreichen Thrombus über einer Endothelerosion oder Plaqueruptur, ebenfalls häufiger nach manifester ipsilateraler zerebraler Ischämie (74%) als nach einer TIA (35.2%) oder einem asymptomatischen Verlauf (14.6%). Da das ischämische Ereignis bis zu zwei Jahre zurücklag, analysierte die Arbeitsgruppe auch die Auswirkung des zeitlichen Abstandes zum ischämischen Ereignis und fanden, dass 100% der kürzlich (< 2 Monate) symptomatischen Plaques „thrombotisch aktiv“ waren und dass dieser Anteil kontinuierlich mit zunehmendem zeitlichen Abstand abnahm (3-6 Monate: 72.2%; 13-24 Monate: 53.8%; 25-30 Monate: 44%).

Zusammenfassend finden nicht alle Autoren einen histopathologischen Zusammenhang zwischen intraluminale Thrombose und klinischer Präsentation. In zwei Arbeiten divergierten die Nachweisraten intraluminale Thromben zudem deutlich. Während Carr

et al. in ihrer histologischen Untersuchung bei 72% aller Plaques thrombotische Wandauflagerungen fanden (Carr et al., 1996), waren es bei Bassiouny et al. (Bassiouny et al., 1997) nur etwa 7%. Möglicherweise besteht aufgrund unterschiedlicher histologischer Kriterien und möglicherweise unterschiedlichen Verarbeitungs-Prozeduren nur eine bedingte Vergleichbarkeit der verschiedenen Arbeiten. Vor allem scheinen intraluminale Thrombosen in hochgradigen Karotisstenosen zeitlich fluktuierende Ereignisse zu sein, die sich mit histologischen Moment-Aufnahmen nicht konsistent nachweisen lassen. Insbesondere die aktuellen Arbeiten von Fisher (Fisher et al., 2005) und Spagnoli (Spagnoli et al., 2004) lassen vermuten, dass zwar zum Zeitpunkt des ischämischen Ereignisses ein relevanter Anteil der Karotisplaques eine intraluminale Thrombose trägt, dass diese sich aber mit zeitlichem Verlauf zurückbilden kann und nach Monaten möglicherweise nicht mehr nachweisbar ist.

2.4.3. Inflammation

Einen weiteren Aspekt der histopathologischen Studien stellt der Nachweis zellulärer Infiltration im Bereich der Ruptur-Stellen dar. Aktivierte Immunzellen bilden dort das Korrelat eines entzündlichen Gewebe-Prozesses mit offenbar resultierender klinischer Konsequenz. Immunhistochemisch (CD68 bzw. HAM56) weist die fibrotische Deckplatte symptomatischer Karotisplaques einen erhöhten Makrophagengehalt auf (Jander et al., 1998; Husain et al., 1999; Spagnoli et al., 2004). Dieser ist umso ausgeprägter je kürzer der zeitliche Abstand zum ischämischen Ereignis ist (Husain et al., 1999; Spagnoli et al., 2004). Als mögliches Zeichen einer interzellulären Aktivierung ist auch die Gesamtzahl der T-Lymphozyten in symptomatischen Karotisplaques erhöht (Jander et al., 1998; Spagnoli et al., 2004). In der Arbeit von Spagnoli et al. zeichneten sich die Rupturstellen

in symptomatischen Plaques durch eine stärkere Inflammation (Monozyten, Makrophagen, und T-Lymphozyten) gegenüber asymptomatischen Plaques aus. Mit Kombination von in situ Hybridisierung und Immunhistochemie zeigten Wilcox et al. (Wilcox et al., 1994), dass in den entzündlich infiltrierten Arealen der fortgeschrittenen Karotis-Atherosklerose Makrophagen inflammatorische und chemotaktisch wirkende Cytokine produzieren und damit ihrerseits den Entzündungsprozess anregen können. Darüber hinaus produzieren sie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die als Zink- bzw. Kalzium-abhängige Proteinase, mit unterschiedlich hoher Spezifität Bestandteile der Extrazellulärschicht degradieren können. Entsprechend zeigt deren Aktivität in Karotisplaques eine Konzentration auf die zellulär infiltrierten Areale, vor allem in den Schulterregionen der fibrotischen Deckplatte (Galis et al., 1994). Die Konzentration aktivierter MMP-8 (Molloy et al., 2004) und MMP-9 (Loftus et al., 2000) in symptomatischen Karotisplaques ist unmittelbar nach einem embolischen Ereignis erhöht im Vergleich zu asymptomatischen Plaques oder solchen, bei denen der zeitliche Abstand zur letzten Symptomatik größer ist als vier Wochen. Dabei korreliert die verstärkte MMP-9-Aktivität signifikant mit dem morphologischen Befund der Plaqueruptur (Loftus et al., 2000).

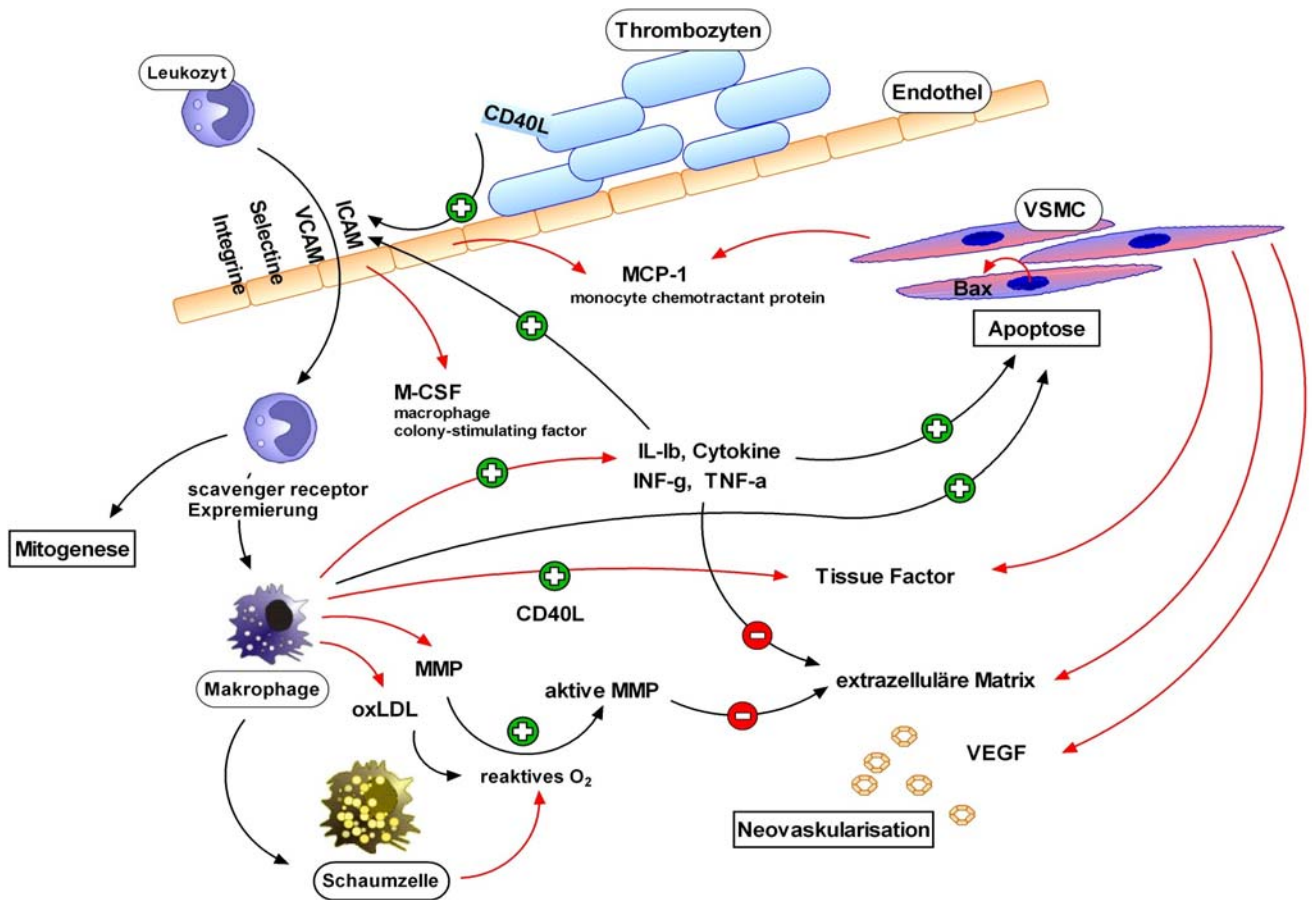


Abbildung 2.4.1.: Synoptische Darstellung der genannten funktionellen Interaktionen auf zellulärer und molekularer Ebene, die auf dem Boden histologischer und experimenteller Daten als Ursache für die klinische Destabilisierung der Karotisstenose gelten können.

Molekulare Interaktionen auf interzellulärer Ebene charakterisieren die klinisch instabile Karotisplaque. Inflammatorische Prozesse verändern dabei die Komponenten und deren strukturelles Gleichgewicht innerhalb solcher Läsionen. Dass Veränderungen in der Morphologie, zu einer Veränderung der mechanischen Eigenschaften führen können zeigten Berechnungen für die Koronarien mit Hilfe von Computermodellen: Die Zunahme der Lipidkern-Größe auf Kosten der Deckplattendicke erhöhte die

mechanische Belastung (Loree 1992) und verlagerte sie auf die Schulterregionen der Deckplatte (Richardson 1989). Dort sind Plaque-Rupturen besonders häufig zu finden.

Die Ruptur der fibrotischen Deckplatte einer atherosklerotischen Plaque stellt sowohl für die Koronarien, als auch für die Karotiden ein wichtiges Ereignis bei der Entstehung einer ischämischen Symptomatik dar (Falk et al., 1995; Carr et al., 1996). Sie stellt das wesentliche histopathologische Korrelat der klinisch instabilen Karotisstenose dar und geht mit der beschriebenen Inflammation einher. Möglicherweise wirken die Prozesse der Inflammation über einen weiteren Mechanismus auf die zelluläre Integrität atherosklerotischer Plaques, wie im folgenden Kapitel erläutert werden soll.

2.5. Apoptose glatter Muskelzellen: Folge molekularer Prozesse der Atherosklerose

Die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren durch infiltrierte Immunzellen ist ein typisches Merkmal symptomatischer Karotisstenosen. Diese Botenstoffe wirken wiederum auf alle enthaltenen Zellen in der Plaque zurück. Sie können die Funktion dieser Zellen modifizieren und sogar zu deren Absterben führen. Der vermehrte Untergang glatter Gefäßmuskelzellen ist ein bekanntes Merkmal der Atherosklerose (Imai et al., 1968). Elektronenmikroskopische Arbeiten der 70er Jahre beschreiben eine Form von Zelltod, die nicht dem Bild der Nekrose entspricht, sondern über eine Kette von bestimmten morphologischen Veränderungen zum systematischen Abbau einer Zelle führt (Wyllie et al., 1973). Zunächst schrumpft die Zelle, es kommt zur Kondensation des Kern-Chromatins und schließlich zur Zell-Fragmentierung. Diese als Apoptose bezeichnete Form des Zelltodes ist in den atherosklerotischen Läsionen der

Karotiden gehäuft zu finden (Bennett et al., 1995; Kockx et al., 2000). Die Apoptose-Rate ist dabei abhängig vom zeitlichen Stadium in dem sich eine atherosklerotische Läsion befindet (Kockx et al., 1998). Während die frühen Stadien der Intimaverdickung und Fettstreifenbildung niedrige Apoptose-Raten zeigen, wird diese in der fortgeschrittenen Plaque mit bis zu 2% angegeben (Kockx 1998). Es wird vermutet, dass dies den kompensatorischen Versuch widerspiegelt, ein Gegengewicht zum überschießenden Zellwachstum zu bilden (Diez et al., 1997).

In fortgeschrittenen Karotisplaques sind glatte Muskelzellen vor allem im Bereich der fibrotischen Deckplatte vom programmierten Zelltod betroffen (Geng et al., 1995). Ihre Apoptose-Raten sind dabei vor allem in den stark von Makrophagen infiltrierten Arealen erhöht (Kockx et al., 1998), die insgesamt von einem erhöhten Zellumsatz geprägt sind (Kockx et al., 1998). Wahrscheinlich sind die Muskelzellen in diesem inflammatorischen Milieu vermehrt proapoptotischen Faktoren ausgesetzt, denn tatsächlich können Makrophagen in Zellkultur über verschiedene Signal-Wege Apoptose in glatten Gefäß-muskelzellen induzieren (Boyle et al., 2001). Wenn diese bereits durch das umgebende Milieu, z.B. durch oxidativen Stress, für die Apoptose „programmiert“, d.h. empfänglich gemacht wurden, könnten wenige weitere proapoptotische Stimuli ausreichend sein, um den programmierten Zelltod zu vollziehen (Schwartz et al., 1995). Experimentelle Arbeiten machen es plausibel, dass zahlreiche der an der Atherosklerose beteiligten molekularen Abläufe die Apoptose-Rate der glatten Muskelzellen beeinflussen können.

Zum Teil liegen die molekularen Werkzeuge, die eine Zelle zur Ausführung des Apoptose-Programms benötigt, bereits in den Zellen in inaktiver Form vor oder es bedarf einer Aktivierung noch inaktiver Gensequenzen.

Zwei wesentliche Effektorwege stehen dabei im Mittelpunkt:

- Die Familie der **Caspasen** stellt eine Gruppe von Enzymen dar, die über eine proteolytische Kaskade zunächst ihre gegenseitige Aktivierung und schließlich die Spaltung wichtiger struktureller und nukleärer Proteine bewirken. Eine Aktivierung der Enzym-Kaskade kann durch die Bindung eines passenden Liganden an einen membran-gebundenen Rezeptor der Tumor Nekrose Faktor-Rezeptoren-Familie (Fas/CD95, TNF-R1 sowie DR3, DR4 und DR5) erfolgen (Cai et al., 1997). Dies bewirkt konsekutiv eine Formationsänderung des Rezeptors und dadurch eine intrazelluläre Aggregation von Adapter-Proteinen wie FADD (Fas-associated death domain) an die „Todes-Domänen“ des Rezeptors und an RIP (receptor-interacting protein) mit konsekutiver Aktivierung der proteolytischen Kaskade.
- Die Familie der **Bcl-2-Proteine** stellt eine heterogene Gruppe von mitochondrialen Membran-Proteinen dar, die sowohl proapoptotische (Bad, Bak, Bik, etc.) als auch antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1, etc.) Wirkung haben können. Zum Teil bilden sie transmembranäre Ionenkanäle und beeinflussen so den Spannungsgradienten entlang der mitochondrialen Membranen. Sie regulieren die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien, das im Komplex mit Caspase 9 den proteolytischen Prozess ebenfalls in Gang setzen kann (Susin et al., 1999).

Abbildung 2.5.1. (Erläuterungen nächste Seite)

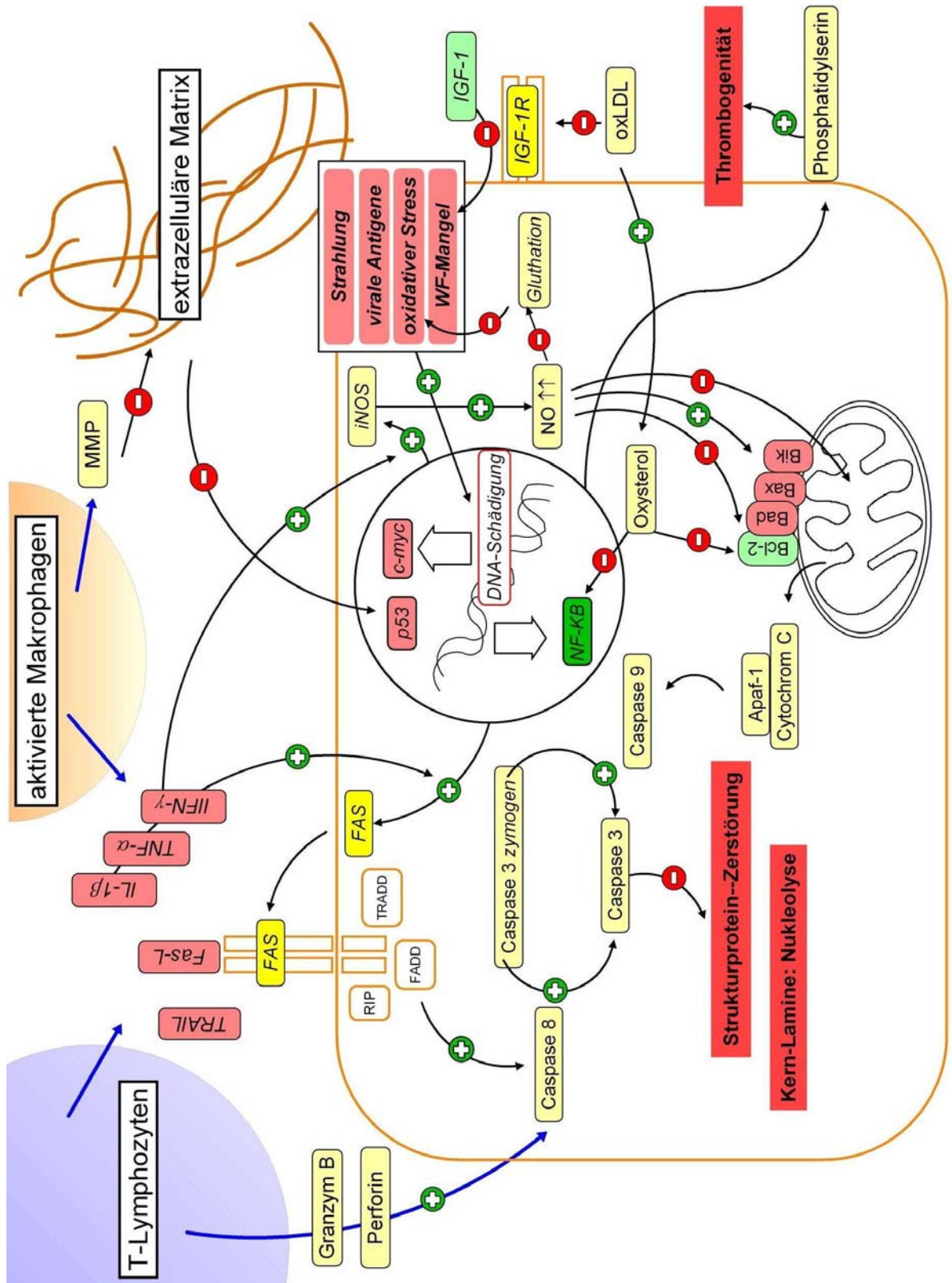


Abbildung 2.5.1.: Die Apoptose glatter Muskelzellen unterliegt der molekularen Interaktion mit umgebenden Zellen und der extrazellulären Matrix. Den hier zusammengestellten Mediatoren und ihren Signalwegen wird eine Relevanz für die Apoptose glatter Muskelzellen in humanen atherosklerotischen Läsionen zugesprochen. Von Immunzellen ausgeschüttete Wachstumsfaktoren (WF) können antiapoptotische Wirkung zeigen: VEGF führt zur „Hoch“-Regulation von antiapoptotischen Mediatoren wie Bcl-2 und zur Expression von IAP (inhibitor of apoptosis protein) (Liu et al., 2000). IGF-1 vermittelt offenbar über seinen Rezeptor IGF-1R eine antiapoptotische Wirkung (Anwar et al., 2002). TNF- α (Wu 1996) und oxLDL (Scheidegger et al., 2000) können diese Wirkung des Rezeptors beeinträchtigen. p53 wird als so genanntem Antionkogen eine überwiegend proapoptotische Wirkung auch auf VSMCs zugeschrieben.

Aktivierete T-Lymphozyten schütten Perforine, Granzyme und Fas-Ligand aus (Cai et al., 1997; Henderson et al., 1999) Da VSMC den Fas-Rezeptor tragen (Geng et al., 1997), kann dies in entzündlich infiltrierten Regionen die VSMC-Apoptose fördern. Die Integrität des zellulären Umfeldes mit hoher Muskelzell-Dichte scheint über einen NF- κ B-abhängigen Mechanismus protektiv auf diese Zellen zu wirken (Erl et al., 1999). Aktivierete Makrophagen und Lymphozyten schütten proinflammatorische Cytokine aus: TNF- α /IFN- γ und IL-1 β steuern Apoptose über den Fas/TNF-Caspase-Signalweg (Geng et al., 1996; Fukuo et al., 1997). In Kombination können Cytokine als Promotoren inaktiver Gene wirken und z.B. die Expression von iNOS anregen (Geng et al., 1992), so dass Stickstoffmonoxid (NO) in der atherosklerotischen Plaque durch verstärkte Expression von iNOS stark akkumuliert (Chester et al., 1998) Es kann in hohen Konzentrationen als freies Radikal oder über die Bildung von Peroxiden nukleäre und

mitochondriale Enzyme angreifen (Cromheeke et al., 1999), sowie zur Freisetzung von Cytochrom C und der Aktivierung Bcl-2-unabhängiger Signalwege führen (Chung et al., 2001).

Atherosklerotische Läsionen enthalten modifizierte Lipoproteine von denen das oxidierte LDL (oxLDL) proapoptotische Wirkung hat (Harada-Shiba et al., 1998). Das aus dem oxLDL-Stoffwechsel stammende Oxysterol vermittelt Apoptose in kultivierten VSMCs wahrscheinlich durch Aktivierung von Caspasen und „Herunter“-Regulation des antiapoptotischen Bcl-2 (Nishio et al., 1996) und kann die Suszeptibilität von Gefäßmuskelzellen für Fas-Liganden vermittelte Apoptose durch Hemmung des Fas-Abbaus erhöhen (Takarada et al., 2003). Die Suppression des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B hebt den Apoptoseschutz in VSMCs auf (Erl et al., 1999).

Es ist anzunehmen, dass die Apoptose glatter Muskelzellen als ein Baustein der Inflammation gemeinsam mit Proliferations- und Migrationsprozessen sowie dem Umsatz der extrazellulären Matrix, die strukturelle Komposition einer atherosklerotischen Plaque bestimmt.

2.6. Hypothese

Apoptotische glatte Gefäßmuskelzellen aus humanen atherosklerotischen Plaques erlangen über die Exprimierung von Phosphatidylserinen eine stark thrombogene Wirkung durch Generierung von Thrombin, wie sie in ihrer Intensität der von Thrombozyten entspricht (Flynn et al., 1997). Außerdem wird der in der Zellmembran verschiedener Zellen kryptisch vorliegende TF offenbar im Rahmen der Apoptose freigesetzt (Greeno et al., 1996). In humanen Atherosklose-Präparaten sind apoptotische

Membranbruchstücke mono- und lymphozytärer Zellen nachweisbar, die aufgrund ihres hohen TF-Gehalts eine stark prokoagulatorische Wirkung zeigen (Mallat et al., 1999). Dementsprechend ist die TF-Aktivität innerhalb atherosklerotischer Läsionen vor allem im Bereich des nekrotischen Kerns lokalisiert, was dessen hohe Thrombogenität mit verursachen kann (Toschi et al., 1997). Die thrombogene Wirkung der subendothelial gelegenen Plaque-Komponenten könnte somit durch apoptotische Prozesse erhöht und bedingt sein. Der fehlende unmittelbare Kontakt zum Blutstrom bei intakter Endothel-Schicht schränkt die vordergründige Auswirkung dieses Pathomechanismus eher ein, betont aber die Bedeutung der im Rahmen der Atherosklerose ebenfalls auftretenden Apoptose der Endothelzellen (Dimmeler et al., 2002).

Rupturstellen fortgeschrittener atherosklerotischer Plaques beim Menschen liegen häufig im Bereich entzündlicher Gewebeveränderungen, die eine Infiltration mit aktivierten Immunzellen zeigen (Davies et al., 1993; Ross 1999). Dies gilt auch für die Atherosklerose der Karotiden und birgt dort eine klinische Relevanz. Denn symptomatische ACI-Stenosen sind häufiger rupturiert (Sitzer et al., 1995) als asymptomatische und weisen eine ausgeprägte Infiltration mit entzündlichen Zellen auf (Jander et al., 1998; Shaalan et al., 2004). In diesen entzündlich veränderten Plaque-Anteilen in den Schulterregionen der fibrotischen Deckplatte (Golledge et al., 2000) zeigen glatte Gefäßmuskelzellen, die in ihrer sekretorisch aktiven Form die Kollagene des extrazellulären Bindegewebes produzieren (Campbell et al., 1994) eine erhöhte Apoptose-Rate (Kockx et al., 1998). Zahlreiche In-vitro-Arbeiten weisen daraufhin, dass in der atherosklerotischen Plaque, durch Inflammation begünstigt, proapoptotische Prozesse ablaufen, die wahrscheinlich auf eine diesbezüglich erhöhte Suszeptibilität bei den Gefäßmuskelzellen treffen (siehe Abbildung 2.5.1.). Zwar sind fortgeschrittene atherosklerotische Plaques insgesamt von einem erhöhten Zellumsatz geprägt,

doch könnte es aufgrund eines Überwiegens proapoptotischer Prozesse gegenüber den regenerativ-proliferativen Prozessen zu einem quantitativen Verlust an Muskelzellen kommen. In einem Atherosklerose-Tiermodell konnte gezeigt werden, dass durch die gezielte Induktion von VSMC-Apoptosen in der fibrotischen Deckplatte deren Ruptur mit intraluminärer Thrombose hervorgerufen werden kann (von der Thusen et al., 2002). Plaques von symptomatischen Patienten mit instabiler Angina pectoris zeigen eine höhere Apoptose-Rate als es in stabilen Plaques der Fall ist (Bauriedel et al., 1999). Inwieweit dieser Pathomechanismus eine klinische Relevanz für die Atherosklerose der Karotiden hat ist noch unklar (Dhume et al., 2003). Der quantitative Verlust an glatten Muskelzellen könnte über eine Abnahme des Kollagengehaltes zu einer globalen oder lokal umschriebenen Ausdünnung der Deckplatte zu einer Abnahme der mechanischen Belastbarkeit und der strukturellen Integrität führen. Es gibt morphometrische Untersuchungen von Carr et al. (Carr et al., 1996) und Bassiouny et al. (Bassiouny et al., 1997), die in symptomatischen Karotis-Präparaten Zeichen einer Ausdünnung der fibrotischen Deckplatte beschrieben haben, allerdings fanden andere Autoren, diesen Zusammenhang nicht (Hatsukami et al., 1997). Die klinische Relevanz dieser Hypothese hinsichtlich der Instabilität von Karotisstenosen ist somit noch nicht geklärt.

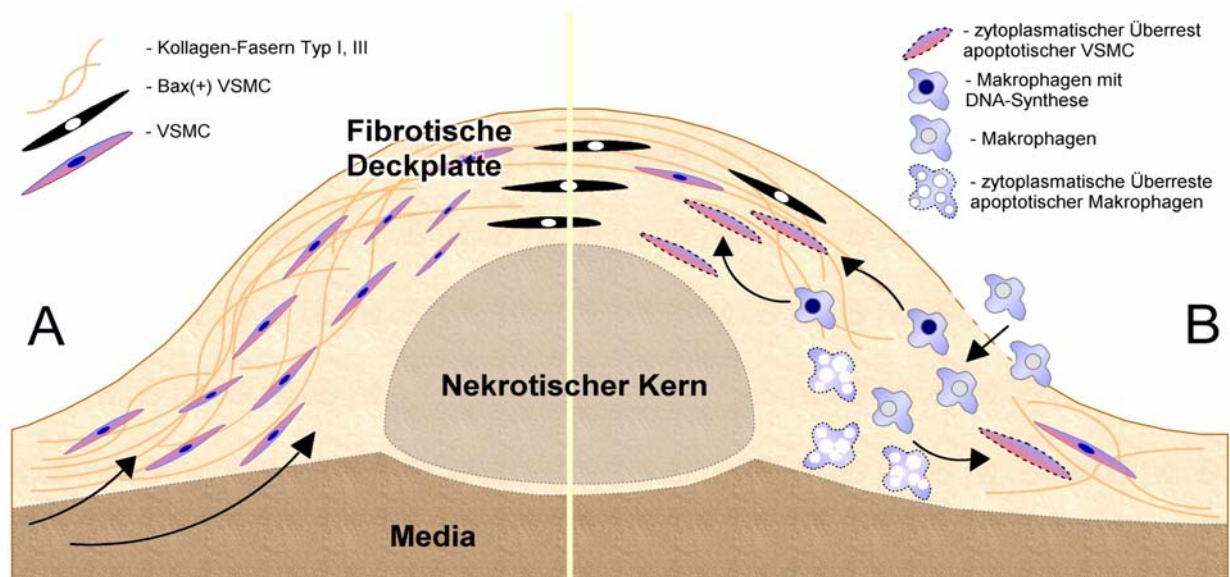


Abbildung 2.6.1. [modifiziert nach (Kockx et al., 2000)]: Die Bedeutung der VSMC-Apoptose für die Destabilisierung atherosklerotischer Plaques. Schematische Darstellung einer stabilen [A] und einer instabilen [B] Plaque. Die fibrotische Deckplatte trennt den nekrotischen Kern vom Lumen. Sie besteht überwiegend aus kollagenem Bindegewebe und glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Diese sind die Produzenten des kollagenen Bindegewebes, das vor allem aus Typ I und Typ III-Fasern besteht und für die mechanische Stabilität der Deckplatte verantwortlich ist. Instabile Plaques sind durch die Akkumulation von Makrophagen charakterisiert. Diese können durch interzelluläre Signaltransduktion zu erhöhten VSMC-Apoptose-Raten führen. Sowohl in stabilen als auch instabilen atherosklerotischen Plaques exprimieren einige Gefäßmuskelzellen Bax, so dass hier möglicherweise eine erhöhte Bereitschaft der Gefäßmuskelzellen zur Apoptose vorliegt. Erhöhte Apoptose-Raten der glatten Gefäßmuskelzellen könnten durch den Verlust an kollagenem Bindegewebe zur Destabilisierung der Plaque führen.

In dieser Arbeit werden symptomatische und asymptotische, hochgradig stenosierende, atherosklerotische Plaques der A. carotis interna histologisch untersucht. Wir hypothetisieren, dass das Ausmaß der Apoptose der glatten Muskelzellen im Bereich der fibrotischen Deckplatte eine Relevanz für das Auftreten embolischer und damit ischämischer Ereignisse hat. Außerdem soll das Ausmaß der Apoptose in Bezug gesetzt werden zu einem etablierten histopathologischen Parameter klinischer

Instabilität, nämlich der Ruptur der fibrotischen Deckplatte. Anhand der beiden wesentlichen morphometrischen Parameter, Größe und Dicke der fibrotischen Deckplatte, soll geprüft werden, inwieweit sich die vielfach propagierte Annahme, dass die Ausdünnung der fibrotischen Deckplatte durch Verlust an glatten Muskelzellen zu Ruptur und klinischer Symptomatik führen kann, anhand unseres Patienten-Kollektivs bestätigen lässt.

3. Methoden

3.1. Klinische Charakteristika der Studienpopulation

Es wurden prospektiv 38 konsekutive Patienten eingeschlossen, die aufgrund einer hochgradigen A. carotis interna (ACI)-Stenose zur elektiven Karotis-Endarterektomie in der chirurgischen Abteilung der Städtischen Kliniken Frankfurt am Main - Höchst, sowie der Gefäßchirurgischen Abteilung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main stationär aufgenommen worden waren. Alle Patienten gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr Einverständnis zum Einschluss in die Studie, die durch die lokale Ethikkommission gemäß der „Deklaration von Helsinki“ der „World Medical Association“ bewilligt wurde.

Alle Patienten wurden einem ausführlichen, Fragebogen-gestützten Interview hinsichtlich neurologischer Anamnese, Begleiterkrankungen, zerebrovaskulärer Risikofaktoren und aktueller Medikation unterzogen. Dopplersonographisch wurde bei allen (in Frankfurt stationären) Patienten präoperativ ein intra- und extrakranieller Gefäßstatus erhoben. Zusätzlich erhielten die Patienten eine intraarterielle zerebrale Angiographie, die gemäß den Kriterien der North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) (1991) der Bestimmung des Stenosegrades diene. Patienten, die eine der ACI-Stenose zuzuordnende transiente oder manifeste zerebrale Ischämie innerhalb der letzten 60 Tage vor der Operation erlitten hatten, wurden als symptomatisch eingestuft. Patienten, die an den Folgen eines schweren Schlaganfalls litten (mRS = 5) wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

Die präoperativ bei allen Patienten routinemäßig durchgeführten kardiologischen und internistischen Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine kardiale Emboliequelle

oder systemische Infektzeichen. Die präoperative Behandlung der beiden Patientengruppen bzgl. antihypertensiver, lipid-senkender und antithrombotischer Therapie war identisch. Thrombozythenaggregationshemmende und antikoagulatorische Therapie wurde bei allen Patienten spätestens sechs Tage vor der Operation abgesetzt, so dass die Gerinnungsparameter am Tag der Operation bei allen Patienten im Normbereich lagen.

3.1.1. Charakteristika der Patienten

Das mittlere Alter der asymptomatischen Patienten lag mit 63 +/- 10 Jahren tendenziell etwas niedriger als das der symptomatischen Patienten (68 +/- 8 Jahre). In beiden Gruppen fanden sich mehr Männer als Frauen (12/19 vs. 15/19). Von den symptomatischen Patienten war der größere Anteil (15 von 19) unmittelbar (<30 Tage) nach dem akuten Ereignis operiert worden. Bei dem Rest lag die der ACI-Stenose zuzuordnende Symptomatik nicht länger als 60 Tage zurück.

Der angiographisch ermittelte Stenosegrad betrug bei den asymptomatischen Patienten 85 +/- 8%, bei den symptomatischen 80 +/- 9%.

Klinik der Patienten	asymptomatisch (n=19)	symptomatisch (n=19)
Alter (Mittelwert +/- SD)	68 +/- 8	63 +/- 10
Geschlecht (männlich in %)	79	63
Stenosegrad (Mittelwert +/- SD)	85 +/- 8	80 +/- 9
Letzte ipsilaterale Symptomatik:		
< 30 Tage	—	79%
30-60 Tage	—	21%

Tabelle 3.1.1.: Klinische Charakteristika der Patienten (SD = Standardabweichung)

3.1.2. Zerebrovaskuläre Risikofaktoren

Beide Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede die vaskulären Risikofaktoren betreffend. Die beiden häufigsten Risikofaktoren waren arterieller Hypertonus und aktueller Nikotin-Konsum, vergleichbar früheren Beschreibungen (Prati et al., 1992). Am stärksten vertreten war ein arterieller Hypertonus, der bei 68% der asymptomatischen und 58% der symptomatischen Patienten vorlag. Bei entsprechend vielen Patienten fand sich ein aktueller Nikotin-Abusus (58% vs. 53%). Medikamentös (Tabletten oder Insulin s.c.) war ein Diabetes mellitus Typ II bei etwa einem Drittel der Patienten eingestellt. Ebenso häufig fand sich eine Hypercholesterinämie mit erhöhten LDL-Cholesterinwerten von > 160mg/dl.

Risiko-Faktoren (in %):	asymptomatisch (n=19)	symptomatisch (n=19)
Arterieller Hypertonus	68	58
Nikotin-Abusus	58	53
Diabetes mellitus	37	26
Hypercholesterinämie	32	37

Tabelle 3.1.2.: Verteilung zerebrovaskulärer Risikofaktoren in der Studienpopulation

3.1.3. Medikation

In der asymptomatischen Gruppe erhielten bei Studieneinschluss alle hypertensiven Patienten eine Blutdruck senkende Therapie, allerdings nur 78% der hypertensiven symptomatischen Patienten. Nur etwa ein Fünftel der Patienten nahm Cholesterin senkende Medikamente ein. 68% der symptomatischen Patienten und 63% der asymptomatischen nahmen dauerhaft Thrombozytenaggregationshemmer ein. Auf eine orale Antikoagulation waren drei Patienten eingestellt.

Aktuelle Medikation (in %):	asymptomatisch (n=19)	symptomatisch (n=19)
Antihypertensiva	53	58
Lipid-Senker	21	16
Orale Antikoagulation	5	11
Thrombozyten-Aggregationshemmer	63	68

Tabelle 3.1.3.: aktuelle Medikation der Studienpopulation

3.2. Materialgewinnung

Alle Karotisplaques wurden im Rahmen einer Routine-Endarterektomie en bloc entnommen. Dabei wurde bei 30 Präparaten die Eversionstechnik angewandt. Bei diesem Verfahren wird die A. carotis interna unmittelbar an ihrem Abgang komplett von der A. carotis communis abgetrennt (Transsektion). Die Plaque wird, wie in Abbildung 3.2.1. gezeigt, durch Umstülpen der A. carotis interna aus ihr „herausgepellt“, so dass eine Beschädigung, die eine histologische Auswertung erschweren würde, vermieden werden kann. Dadurch bleiben das residuelle Lumen und die Integrität der Plaque erhalten. Bei acht Plaques wurde im klassischen Endarterektomieverfahren die ACI der Länge nach inzidiert und die dabei freigelegte Plaque aus dem Gefäß geschält. Alle Präparate wurden unmittelbar nach Entnahme in 4%igem Formalin fixiert, entkalkifiziert und anschließend in 2mm messende Blöcke geschnitten. Diese wurden unter Notierung der Fluss-Richtung standardisiert in Paraffin eingebettet. Im Durchschnitt erhielt man pro Plaque $7,6 \pm 3,7$ Blöcke, was die durchschnittliche Gesamtlänge der Präparate von etwa 1,5 cm widerspiegelt. Auf diese Weise entstanden 288 zu untersuchende Blöcke. Von allen Blöcken wurden mit einem Mikrotom serielle $3\mu\text{m}$ messende Schnitte angefertigt und der weiteren Verarbeitung zugeführt.

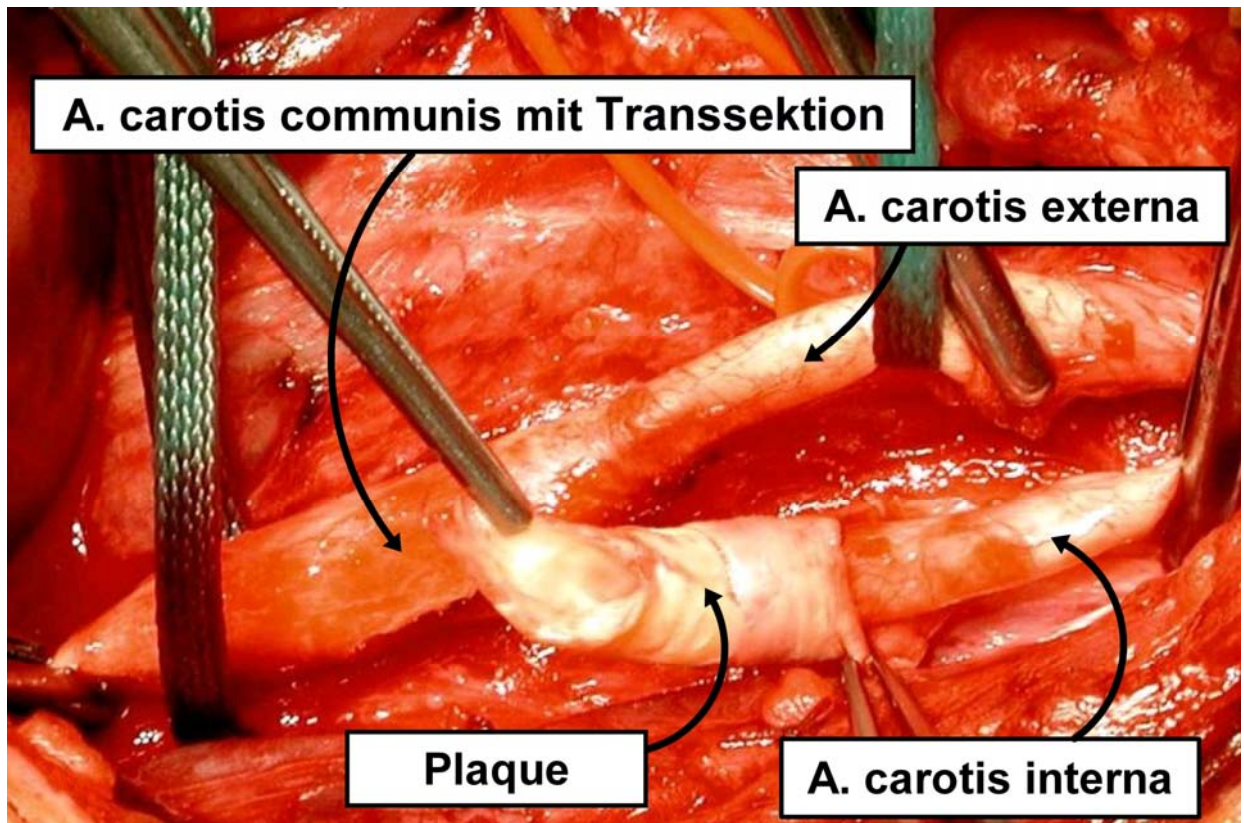


Abbildung 3.2.1.: (mit frdl. Genehm. durch Chirurgische Klinik der Städtischen Kliniken Frankfurt am Main Höchst, Prof. Dr. W. Stelter): Operations-Situs im Rahmen der Eversionstechnik. Die Plaque wird aus dem Lumen der A. carotis interna gepellt und bleibt dabei ohne Inzision en bloc erhalten.

3.3. Histologische Aufarbeitung der Präparate

3.3.1. Übersichts-Färbungen und α -Actin-Färbung glatter Muskelzellen

Die morphometrischen Analysen erfolgten anhand Elastica van Gieson (EvG)- und Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbungen nach Standardprotokoll.

Für die immunohistochemische Anfärbung glatter Muskelzellen wurden primäre monoklonale Antikörper gegen α -Actin (Clone 1A4, Code-Nr. M 0851, DakoCytomation) verwendet. Der Antikörper markiert durch seine Affinität zu der α -glatten Muskel-Isoform

von zytoplasmatischen Actin-Mikrofilamenten die glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Die Schnitte wurden mit einer 1:200 Verdünnung des primären Antikörpers inkubiert, gefolgt von biotinylierten sekundären anti-Maus-Antikörpern. Avidin-Peroxidase-Komplexe (Hsu et al., 1981) (VECTASTAIN-ABC-Peroxidase Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) wurden in einem nächsten Schritt an das Biotin gebunden. Als Substrat zur Darstellung der enzymatischen Aktivität wurde 3,3-Diaminobenzidin (DAB Substrate Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet.

3.3.2. DNA in situ end labeling (TUNEL) + PAS-Färbung

Für die DNA in situ end labeling (TUNEL)-Färbung wurden jeweils unmittelbar benachbarte 3µm-Schnitte verwendet. Zum Einsatz kam das ApopTag *in situ* Apoptosis Detection Kit der Firma Intergen (S7100-Kit, Intergen Company, Oxford, UK). Diese Technik basiert auf der Tatsache, dass im Rahmen der Apoptose die DNA durch Endonukleasen in Fragmente zerlegt wird. Die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) lagert chemisch markierte Nukleotide an die freien 3'-OH-Enden der DNS-Strangbrüche. Die apoptotischen Zellen werden durch spezifische Peroxidasegekoppelte Anti-Nukleotid-Antikörper markiert und in einer Farbreaktion sichtbar gemacht (Gavrieli et al., 1992).

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Um der von Kockx et al. beschriebenen unspezifischen Markierung von in atherosklerotischen Plaques gehäuft zu findenden calciumhaltigen Matrix-Vesikeln (Kockx et al., 1996) entgegen zu wirken, wurden die Schnitte zunächst für jeweils 15 Minuten mit 3%iger Zitronensäure zur Eliminierung freier Calcium-Ionen behandelt (Kockx et al., 1996). Weitere Reaktionsschritte wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (ApopTag Manual

for ApopTag In Situ Apoptosis Detection Kits) durchgeführt. Die Schnitte wurden mit Proteinase K (20 µg/mL, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) inkubiert, die endogene Peroxidase mit 3%igem H₂O₂ blockiert und abschließend der Äquilibrationspuffer appliziert.

Für die eigentliche TUNEL-Färbung wurden die Schnitte für 90 Minuten bei 37°C mit der TdT-Mischung, bestehend aus terminaler Desoxynucleotidyl-Transferase sowie dem Reaktionspuffer, inkubiert. Letzterer enthält teils unmarkierte, teils mit Digoxigenin (DIG) markierte Nukleotid-Triphosphate als Substrat der terminalen Desoxynucleotidyltransferase. Nach Blocken der Reaktion mit Stopp-Puffer und Waschen der Schnitte mit PBS wurden die angelagerten Nukleotide mit Peroxidasegekoppelten anti-DIG F(ab)-Fragmenten markiert und mit Diaminobenzidin (DAB) dargestellt. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit saurer Hämatoxylin-Färbung nach Mayer. Negativ-Kontrollen wurden mit PBS statt mit TdT-Enzymen inkubiert. Als Positiv-Kontrollen wurde Lymphom-Gewebe verwendet.

Um falsch-positive Färbungen aufgrund der hohen Sensitivität der TUNEL-Technik (Hegyí et al., 1997) und möglicher Interferenzen mit physiologischer RNA-Synthese (Kockx et al., 1998) zu vermeiden bzw. identifizieren zu können, wurden die glatten Gefäßmuskelzellen zusätzlich mit Schiff'schem Reagenz einer PAS-Färbung unterzogen (Kockx et al., 1998). Diese markiert Basalmembranen rotviolett, da deren Polysaccharide durch Perjodsäure zu Aldehyden oxidiert werden. Glatte Gefäßmuskelzellen in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques sind von konzentrischen Schichten aus Basalmembranen umgeben (Ross et al., 1984). TUNEL-positiv gefärbte Kerne, die morphologische Merkmale der Apoptose (Zell-Schrumpfung

und apoptotische Körperchen) aufwiesen und von PAS-positiven Basalmembranen umgeben waren, wurden als apoptotische glatte Gefäßmuskelzellen gewertet.

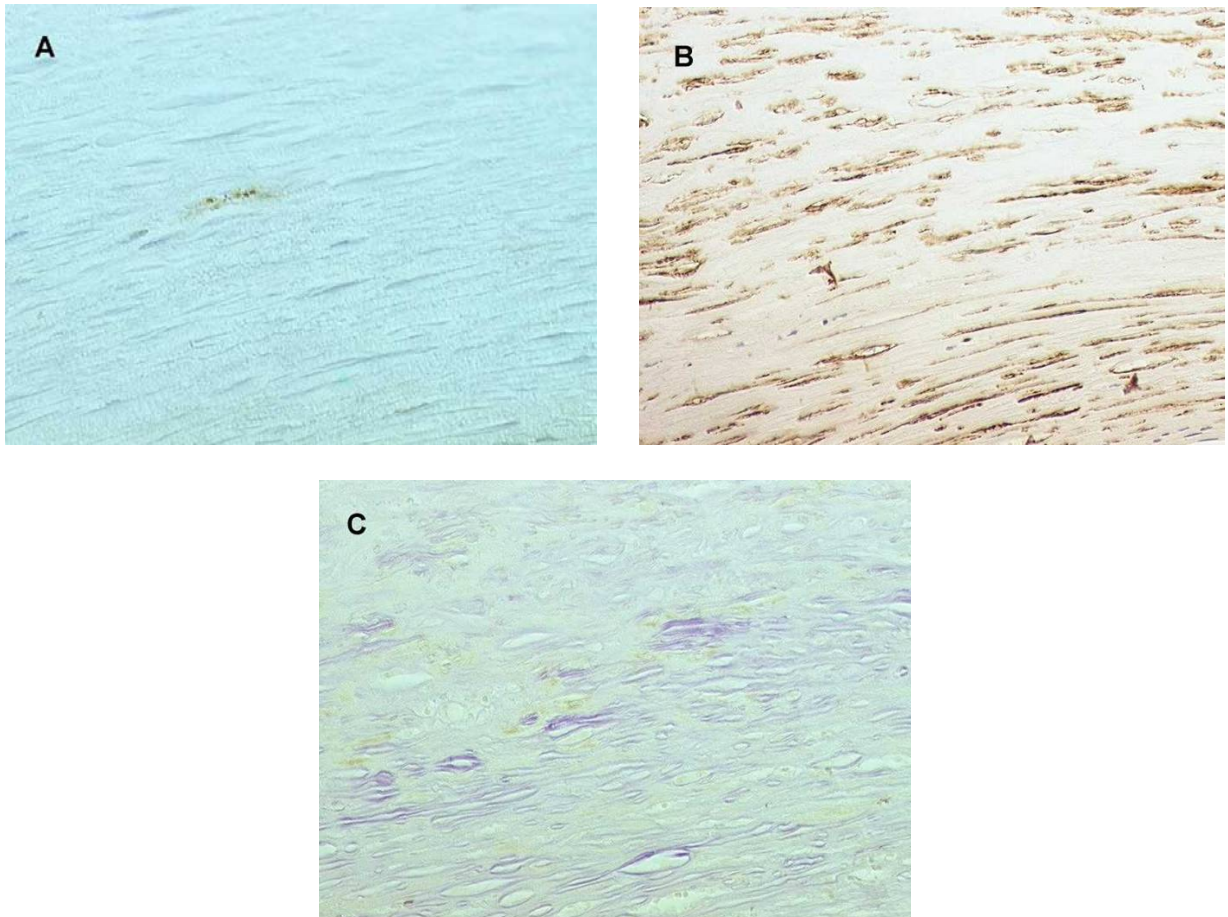


Abbildung 3.3.1.: Darstellung einer apoptotischen VSMC innerhalb der fibrotischen Deckplatte einer Plaque mittels TUNEL-Färbung (A). Korrespondierende α -Actin-Färbung (B) und Darstellung PAS-positiver Basalmembran (C) weisen auf ihren Ursprung als glatte Gefäßmuskelzelle hin.

Die Gesamtzahl an apoptotischen glatten Muskelzellen pro Plaque und Schnitt, sowie pro fibrotische Deckplatte und Schnitt wurde gezählt. Zusätzlich wurde die Dichte der vitalen Muskelzellen innerhalb der fibrotischen Deckplatte bestimmt, indem an drei repräsentativen Stellen (in beiden Schulter-Regionen und im mittleren Bereich) die Anzahl an glatten Muskelzellen innerhalb eines Quadratmillimeters bestimmt wurde.

3.4. Digitale Bildbearbeitung und Auswertung

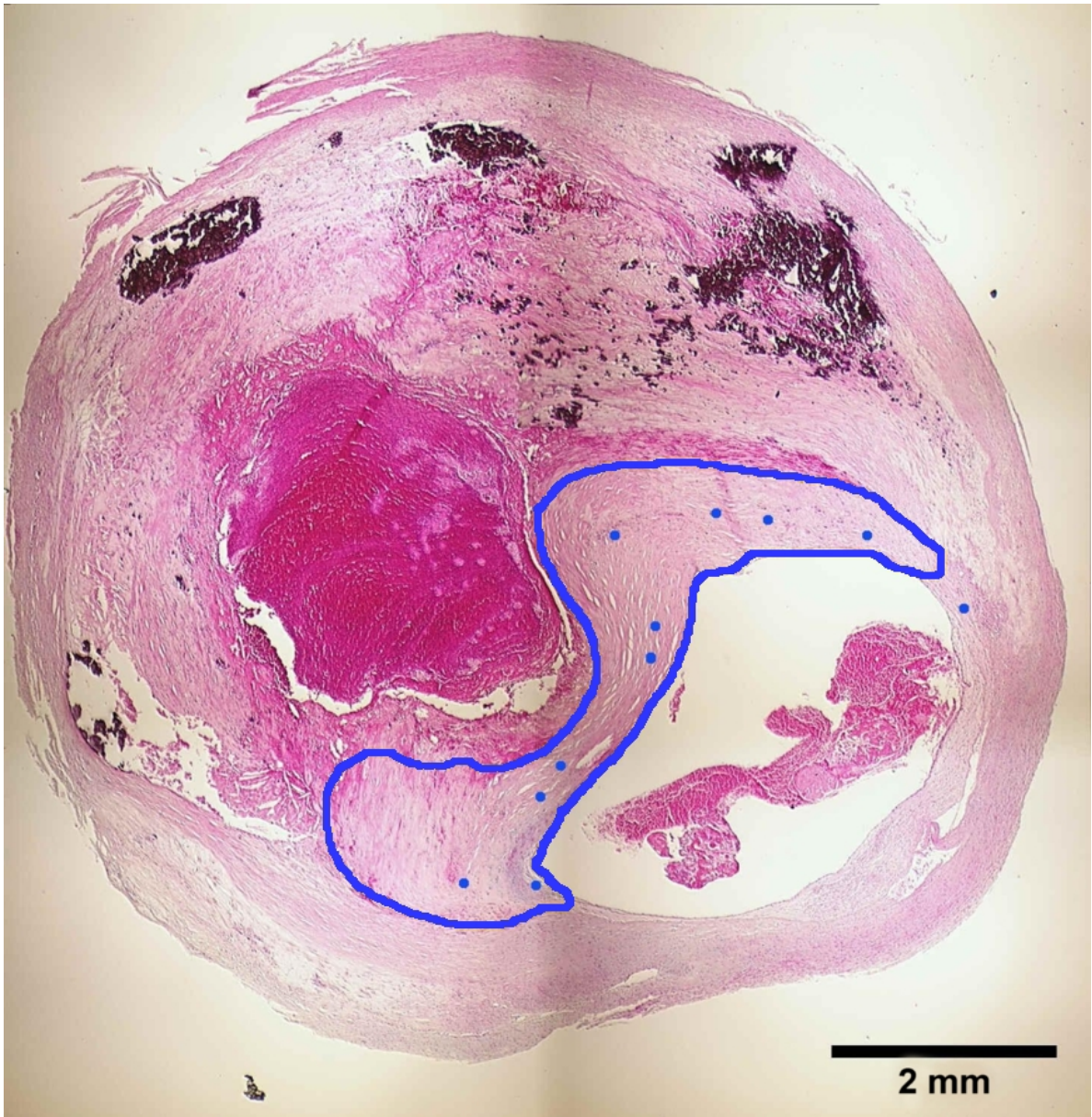


Abbildung 3.4.1.: Die Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer hochgradig stenosierenden Plaque im Querschnitt, das aus sechs einzelnen digitalen Fotos zusammengesetzt wurde. Zusätzlich sind zwei weitere transparente „Layer“ eingeblendet. Auf der einen ist die Umrandung der fibrotischen Deckplatte (blaue Linie) eingezeichnet. Die andere zeigt anhand von blauen Farbpunkten die Lokalisierung der apoptotischen glatten Muskelzellen, wie sie in der parallel erfolgenden Analyse in den Apoptose-Färbungen identifiziert wurden.

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch und computer-gestützt. Dazu wurden alle gefärbten Schnitte bei 40facher Vergrößerung digitalisiert. Der an das Untersuchungs-Lichtmikroskop (Bx50, Olympus Corporation, Tokio, Japan) montierte Kameraaufsatz (HV-C20, Hitachi Ltd., Tokio, Japan) ermöglichte die Darstellung der Bilder auf dem über Graphikkarte (Matrox Graphics Inc., Quebec, Canada) angebundenen Computer (Pentium 2, 266 Mhz) und die digitale Speicherung mittels Bildanalyse-Software (analySIS, Soft Imaging System, Münster, Deutschland). Die analoge Begutachtung am Okular des Mikroskops konnte dabei parallel mit bis zu 400facher Vergrößerung erfolgen. Da bei der zur Beurteilung der zellulären Strukturen mindestens notwendigen 40-fachen Vergrößerung das histologische Präparat nur ausschnittsweise zur Darstellung kam, entstanden zunächst von jedem Schnitt je nach Größe des Plaque-Durchmessers vier bis sechs digitale Einzelbilder, die mit oben genannter Software zu einem Ganzen zusammengefügt wurden. Dadurch entstand ein hoch aufgelöstes, digitales Abbild von jedem histologischen Schnitt (s. Abbildg. 3.4.1.).

Zur Identifizierung der zu untersuchenden Plaque-Strukturen wurden die digitalen Abbilder in das jpg-Format exportiert und ihnen anschließend mit einer Bildbearbeitungssoftware (GIMP, GNU Image Manipulation Programm) so genannte Bild-Layer hinzugefügt. Auf diesen Layern wurde die Plaque-Gesamtfläche und wenn vorhanden die fibrotische Deckplatte sowie die identifizierten apoptotischen glatten Muskelzellen markiert und eingezeichnet, ohne das ursprüngliche hoch aufgelöste Bild zu verändern. Die Layer, die jeweils nur die ausgewählte morphologische Information enthielten wurden anschließend unter Beibehaltung der Größenmaßstäbe nach analySIS reimportiert und dort morphometrisch vermessen.

Die morphometrischen Beurteilungen wurden an den Übersichtsfärbungen vorgenommen. Zunächst wurden die Schnitte (und ihre Anzahl pro Plaque) ermittelt, in denen eine fibrotische Deckplatte zu identifizieren war. Im Anschluss wurde für jeden Schnitt die Plaque-Gesamtfläche (mm^2), die Fläche der fibrotischen Deckplatte (mm^2), die dünnste und dickste Stelle der fibrotischen Deckplatte als minimale und maximale Kern-Lumen-Distanz gemessen (siehe Abbildung 3.4.2.). Die durchschnittliche Fläche der fibrotischen Deckplatte wurde als Summe der einzelnen Flächen, geteilt durch die Anzahl an vermessenen Schnitten, ermittelt. Dickste und dünnste Stelle der fibrotischen Deckplatte pro Plaque war die jeweils größte bzw. kleinste gemessene Kern-Lumen-Distanz pro Plaque.

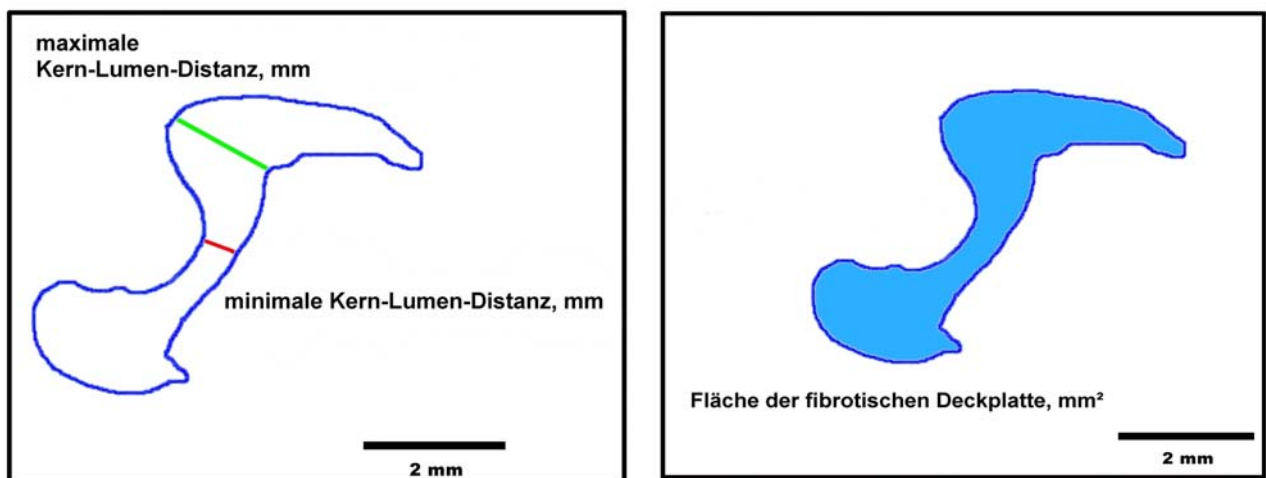


Abbildung 3.4.2.: Die auf separaten Layern markierte Deckplatte wurde maßstabsgetreu exportiert und mittels der Software analySIS, Soft Imaging System, vermessen. Dies wurde für alle histologischen Schnitte durchgeführt, in denen eine fibrotische Deckplatte identifiziert werden konnte.

War in einem Schnitt eine fibrotische Deckplatte abgrenzbar, wurde diese als rupturiert oder nicht-rupturiert eingestuft. Eine Deckplatten-Ruptur wurde definiert als Intima-Defekt von mehr als 1000µm Tiefe, der zu einer Freilegung des nekrotischen Kerns führt (Sitzer et al., 1995; Carr et al., 1996; Fisher et al., 2005).

3.5. Statistik

Alle Berechnungen wurden mit SPSS 9.0 durchgeführt. Für die Ergebnisse der quantitativen Messungen wurden Mittelwert, Standardabweichung und Median bestimmt. Sie wurden nicht-parametrisch mit Mann-Whitney U Test verglichen. Da zum Teil aufeinanderfolgende statistische Berechnungen durchgeführt wurden, erfolgte die Kontrolle des Alpha-Fehlers entsprechend der modifizierten Bonferroni-Prozedur. Die Berechnung der Korrelationen erfolgte nach Pearson. Signifikanzen wurden durch Chi-Quadrat-Test geprüft. Alle quantitativen, statistischen Analysen wurden unter Verblindung für die klinischen Daten durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Morphometrie der fibrotischen Deckplatte

Die beiden folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der quantitativen Messungen der morphologischen Eigenschaften der fibrotischen Deckplatte (FD) in Bezug auf klinische Symptomatik (Tabelle 4.1.1.) und histopathologische Instabilität (Tabelle 4.1.2.). Die Fläche der fibrotischen Deckplatte, gemessen in mm², sowie deren jeweils dünnste und dickste Stelle, gemessen in mm, zeigten keine Unterschiede in den jeweiligen Gruppen. Somit fanden wir keinen Hinweis auf einen quantifizierbaren Unterschied der Morphometrie zwischen rupturierten und nicht-rupturierten Plaques bzw. Plaques symptomatischer und asymptomatischer Patienten.

	asymptomatisch (n=19)	symptomatisch (n=19)	P*
Mittlere Zahl an Schnitten pro Plaque mit FD, n	6.0 (2.0-13.0)	6.0 (2.0-20.0)	0.665
Mittlere Fläche der FD pro Schnitt, mm ²	2.64 (1.54-4.75)	2.22 (1.58-5.36)	0.257
Minimale Dicke (Kern-Lumen-Distanz) der FD an der dünnsten Stelle der FD	0.09 (0.04-0.19)	0.09 (0.03-1.17)	0.510
Maximale Dicke (Kern-Lumen-Distanz) der FD an der dicksten Stelle der FD	0.73 (0.53-1.20)	0.70 (0.49-1.60)	0.795

Tabelle 4.1.1.: Es werden die Fläche, sowie die Kern-Lumen-Distanz an der dicksten und dünnsten Stelle der Plaque in asymptomatischen und symptomatischen Plaques miteinander verglichen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen; * Mann-Whitney U Test mit α -Fehler-Korrektur ($P < 0,05/8 = 0,0063$)

	nicht-rupturiert (n=24)	rupturiert (n=14)	P*
Mittlere Anzahl an Schnitten pro Plaque mit FD, <i>n</i>	6.0 (4.0-13.0)	6.0 (2.0-20.0)	0.950
Mittlere Fläche der FD pro Schnitt, <i>mm</i> ²	2.74 (1.54-4.75)	2.41 (1.58-5.36)	0.254
Minimale Dicke (Kern-Lumen-Distanz) der FD an der dünnsten Stelle der FD	0.09 (0.03-0.19)	0.08 (0.03-0.17)	0.705
Maximale Dicke (Kern-Lumen-Distanz) der FD an der dicksten Stelle der FD	0.75 (0.5-0.12)	0.68 (0.49-1.60)	0.160

Tabelle 4.1.2.: Es werden die Fläche, sowie die Kern-Lumen-Distanz an der dicksten und dünnsten Stelle der Plaque in nicht-rupturierten und rupturierten Plaques miteinander verglichen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen; *Mann-Whitney U Test mit α -Fehler-Korrektur ($P < 0,05/8 = 0,0063$)

4.2. Apoptosen glatter Gefäßmuskelzellen

Die Apoptose glatter Muskelzellen war in den untersuchten fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen insgesamt ein seltener Befund. Es ließen sich in 169 (=58%) der insgesamt 288 3 μ m-Schnitte, jeweils gewonnen von den entsprechenden 2mm-Blöcken, apoptotische Gefäßmuskelzellen nachweisen. Diese lagen annähernd ausschließlich im Bereich der fibrotischen Deckplatte (siehe Abbildung 3.4.1.). Wurde eine Plaque als „apoptosepositiv“ gewertet, wenn sich in mehr als der Hälfte ihrer histologischen Schnitte apoptotische Gefäßmuskelzellen fanden, so waren signifikant mehr symptomatische als asymptotische Plaques apoptosepositiv (16/19 vs. 3/19; $p < 0,001$).

Weiterhin zeigte sich (vgl. Tabelle 4.2.1.), dass auch

- die Gesamtzahl der apoptotischen Gefäßmuskelzellen pro Plaque,
- die durchschnittliche Anzahl pro histologischem Schnitt sowie,
- die durchschnittliche Anzahl pro Plaque-Gesamtfläche und
- die durchschnittliche Anzahl pro Gesamtfläche der fibrotischen Deckplatte

in der Gruppe der symptomatischen Plaques signifikant größer war, als in der asymptotischen Gruppe. Neben diesen absoluten Werten war auch die relative Anzahl apoptotischer Muskelzellen in symptomatischen Plaques größer. Durch Auszählung der Anzahl vitaler Muskelzellen an drei repräsentativen Stellen (beide Schulterregionen und Zentrum) der Deckplatte konnte durch Verrechnung mit der FD-Fläche der näherungsweise Gehalt der fibrotischen Deckplatte an glatten Muskelzellen ermittelt werden. Somit konnte die Gesamtzahl apoptotischer Muskelzellen dem Gehalt an vitalen Muskelzellen gegenübergestellt werden.

- Dabei war die Dichte an apoptotischen Muskelzellen (Apoptose pro 1000 vitale Muskelzellen) in symptomatischen Plaques ebenfalls signifikant erhöht.

Die Dichte der glatten Gefäßmuskelzellen pro Quadratmillimeter innerhalb der fibrotischen Deckplatte unterschied sich in Präparaten symptomatischer und asymptotischer Patienten allerdings nicht. Die erhöhten Apoptose-Raten scheinen somit zu keinem quantifizierbaren Verlust an glatten Gefäßmuskelzellen zu führen.

Tendenziell fand sich eine höhere Anzahl auch in der Gruppe der rupturierten Plaques, allerdings erreichten die Unterschiede keine Signifikanz. Ebenso gingen erhöhte Apoptose-Raten (mittlere Anzahl apoptotischer Gefäßmuskelzellen pro mm² Deckplatte) mit einer geringeren Fläche der Deckplatten einher, ohne dass dieser Zusammenhang

eine statistische Signifikanz erreichte (Korrelationskoeffizient -0,326; p=0,06). Ein Zusammenhang zwischen Apoptose-Raten und Dicke der Deckplatte (minimale Kern-Lumen-Distanz) fand sich dagegen nicht (Korrelationskoeffizient 0,110; p=0,53).

	asymptomatisch (n=19)	symptomatisch (n=19)	P*
Mittlere Anzahl an VSMCs pro mm ² FD, n/mm ²	63.33 (11.73 - 168.40)	39.03 (22.27 - 182.00)	0.791
Gesamtzahl TUNEL positiver VSMCs pro Plaque, n	2.00 (0.00 - 36.00)	24.00 (0.00 - 82.00)	<0.001
Mittlere Zahl TUNEL positiver VSMCs pro Plaque-Gesamtfläche n/mm ² ÷ 10 ²	0.00 (0.00 - 3.00)	5.00 (0.00 - 55.00)	<0.001
Mittlere Anzahl TUNEL positiver VSMCs pro FD-Fläche n/mm ² ÷ 10 ²	0.00 (0.00 - 1.87)	1.71 (0.00 - 4.32)	<0.001
TUNEL positive VSMCs pro 1000 VSMC innerhalb der FD, n/1000	2.19 (0.00 - 37.19)	37.83 (0.00 - 256.76)	<0.001
	nicht-rupturiert (n=24)	rupturiert (n=14)	P*
Mittlere Anzahl an VSMCs pro mm ² FD, n/mm ²	57.97 (22.52 - 168.40)	35.80 (11.73 - 182.00)	0.505
Gesamtzahl TUNEL positiver VSMCs pro Plaque, n	2.50 (0.00 - 82.00)	22.00 (0.00 - 54.00)	0.077
Mittlere Zahl TUNEL positiver VSMCs pro Plaque-Gesamtfläche, n/mm ² ÷ 10 ²	0.00 (0.00 - 6.00)	3.00 (0.00 - 55.00)	0.025
Mittlere Anzahl TUNEL positiver VSMCs pro FD Fläche	0.00 (0.00 - 3.30)	0.66 (0.00 - 4.04)	0.067
TUNEL positive VSMCs pro 1000 VSMCs innerhalb der FD, n/1000	3.55 (0.00 - 256.76)	22.96 (0.00 - 251.50)	0.117

Tabelle 4.2.1.: Vergleich von VSMC-Gehalt und Ausmaß der VSMC-Apoptose in Bezug auf klinische (asymptomatisch vs. symptomatisch) bzw. histopathologische (nicht-rupturiert vs. rupturiert) Stabilität. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen; *Mann-Whitney U Test mit α -Fehler-Korrektur (P < 0,05/10 = 0,005)

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die fibrotische Deckplatte asymptomatischer und unlängst symptomatischer Karotisplaques im Hinblick auf ihre morphometrischen Eigenschaften untersucht. In histologischen Querschnittspräparaten wurde computergestützt die Fläche der fibrotischen Deckplatte, sowie deren dünnste und dickste Stelle (Kern-Lumen-Distanz) ermittelt. Die Gruppen der symptomatischen und asymptomatischen Plaques zeigten hinsichtlich dieser Parameter keine Unterschiede. Zeichen der Ruptur der fibrotischen Deckplatte fanden sich zwar tendenziell häufiger in symptomatischen Plaques. Allerdings unterschied sich die Deckplattendicke und -fläche in rupturierten und intakten Plaques nicht. Diese Ergebnisse unterstützen nicht die Hypothese, dass in fortgeschrittenen Karotisplaques eine quantifizierbare Verkleinerung oder Ausdünnung der fibrotischen Deckplatte zu Plaque-Ruptur und klinischer Symptomatik führt. Allerdings scheint der programmierte Zelltod glatter Muskelzellen im Umfeld atherosklerotischer Karotisprozesse in Zusammenhang mit deren klinischer Instabilität zu stehen. Rupturierte Karotisplaques zeigen eine tendenzielle Erhöhung, symptomatische Plaques sogar eine deutlich signifikante Erhöhung von Gesamtzahl und Dichte dieser apoptotischen Muskelzellen.

Die klinisch instabile Karotisplaque ist durch das Fortschreiten inflammatorischer Prozesse gekennzeichnet. Über welche strukturellen oder funktionellen Änderungen diese zu Plaque-Ruptur und klinischer Symptomatik führen, ist noch nicht geklärt. Einige histopathologische Arbeiten haben das Konzept der Ausdünnung der fibrotischen Deckplatte bislang geprüft. Dabei müssen die den erhobenen Daten zugrunde liegenden Kriterien und Definitionen auf ihre Vergleichbarkeit hin überprüft werden. Neben dem

möglicherweise unterschiedlichen methodischen Vorgehen, gibt es keine den Morphologien immanenten Definitionen oder Kriterien, so dass beim Vergleich der Arbeiten bedacht werden muss, dass unter Umständen identische Terminologien für differierende Morphologien verwendet werden.

Für die Karotis-Atherosklerose hypothetisierten Bassiouny et al. (Bassiouny et al., 1997), dass die Ausdünnung der fibrotischen Kappe über dem stark thrombogenen nekrotischen Kern zur mechanischen Destabilisierung führt. Sie beschrieben, dass in den von ihnen untersuchten symptomatischen Plaques die mittlere Kern-Lumen-Distanz nur halb so groß war wie in asymptomatischen Plaques ($0,27 \pm 0,3$ mm vs. $0,5 \pm 0,5$ mm; $p < 0,01$). Zusätzlich war auch die minimale Deckplattendicke mit $0,2 \pm 0,2$ mm (vs. $0,4 \pm 0,4$ mm; $p < 0,006$) in symptomatischen Plaques ebenfalls deutlich geringer. Zeichen der Deckplatten-Ruptur fanden sich in 32% der symptomatischen und 20% der asymptomatischen Plaques. Die Relation der Standardabweichungen zu den ermittelten Mittelwerten (bzw. der jeweilige in der Literatur angegebene „range“) lassen vermuten, dass in einigen Plaques Null-Messwerte für die Dicke der Deckplatte ermittelt wurden, was definitionsgemäß Zeichen einer Deckplatten-Ruptur wäre. Somit stellt sich hier die Frage inwieweit die morphometrischen Daten nicht die Häufung der Deckplatten-Ruptur in den symptomatischen Präparaten widerspiegeln, zumal sich die Größe der Deckplatten in beiden Gruppen nicht unterschied (prozentualer Anteil der Deckplatte am Gesamtplaque: $11\% \pm 6\%$ vs. $10\% \pm 6\%$). Leider gaben die Autoren keine Auskunft darüber, inwieweit tatsächlich die „dünnen“ Deckplatten Rupturzeichen aufwiesen.

Carr et al. (Carr et al., 1996) indessen berichten von einem Zusammenhang zwischen Ruptur und Ausdünnung der Deckplatte. In ihrer histomorphologischen Analyse der

Karotis-Atherosklerose korrelierten Plaque-Ruptur, Ausdünnung der Deckplatte und inflammatorische Infiltration signifikant miteinander. Allerdings erfolgte die Beurteilung der Deckplatte dabei qualitativ mit einer Einteilung nach Ausdünnung und Normalbefund. Demnach wiesen 48% der asymptomatischen und 95% der symptomatischen Plaques Zeichen der Deckplattenausdünnung ($p=0,003$) auf (Carr et al., 1996). Die Definition des nicht-quantitativen Parameters „fibrous cap thinning“ wurde von den Autoren allerdings nicht beschrieben.

Ausführlichere morphometrische Analysen der fibrotischen Deckplatte führten Dhume et al. (Dhume et al., 2003) durch. Sie fanden, dass die mittlere *maximale* Dicke der Deckplatte in symptomatischen Präparaten ($0,035 \pm 0,003\text{mm}$) signifikant geringer war als in asymptomatischen ($0,129 \pm 0,01 \text{ mm}$; $p<0,001$). Leider machten die Autoren keine Angaben über die jeweils dünnsten Stellen der Deckplatte, die eine tatsächliche Ausdünnung der fibrotischen Deckplatte unter Umständen besser belegen könnten. Inwieweit die *maximale* Deckplattendicke eine Abnahme des Deckplattenvolumens widerspiegelt ist ebenfalls fraglich, zumal sich die Fläche der Deckplatten in symptomatischen ($0,027 \pm 0,001\text{mm}^2$) und asymptomatischen ($0,033 \pm 0,003\text{mm}^2$; $p=0,12$) Plaques nicht unterschied. Darüber hinaus scheint es unwahrscheinlich, dass sich eine am ehesten fokale Ausdünnung der Deckplatte, wie sie aufgrund des Nachweises lokal umschriebener entzündlicher Aktivität zu erwarten ist, in Mittelwerten widerspiegeln würde, die eher eine globale Veränderung der Deckplattendicke widerspiegelt. Dahingehend erklären Dhume et al., dass symptomatische Plaques eine breitere fibrotische Deckplatte zeigten, die einen größeren nekrotischen Kern überspannten und somit bei Reduktion des maximalen Durchmessers keine Änderung der Fläche aufwiesen. In

Übereinstimmung mit Dhume et al. fanden sich in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung in der Querschnittsfläche der fibrotischen Deckplatte. Allerdings zeigte auch die mittlere *maximale* Deckplattendicke keinen signifikanten Unterschied. Bezüglich der Vergleichbarkeit der Daten der beiden Untersuchungen muss kritisch angemerkt werden, dass sich die Größenordnungen der gefundenen Messwerte deutlich unterscheiden. So sind die von Dhume et al. für die symptomatische Gruppe angegebenen Werte der mittleren *maximalen* Dicke der Deckplatte etwa 2-3mal kleiner, als die in der vorliegenden Arbeit für die jeweils *dünnsten* Deckplattenregionen ermittelten Werte. Die mittlere *maximale* Dicke der Deckplatten in den asymptomatischen Präparaten beträgt bei Dhume et al. lediglich etwa ein Zehntel Millimeter, was anhand eines hier gezeigten typischen maßstabsskalierten Beispiels (siehe Abbildung 3.4.1.) deutlich diskrepant erscheint.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten sprechen dagegen, dass eine kontinuierliche *fokale* oder *globale* Ausdünnung der fibrotischen Deckplatte deren Ruptur oder das Auftreten klinischer Symptomatik bewirkt. Sie liegen damit eher in einer Linie mit den Ergebnissen von Hatsukami et al. (Hatsukami et al., 1997), die in ihrer ebenfalls computergestützten Analyse symptomatischer und asymptomatischer Plaques keine signifikanten Unterschiede im Volumen der Plaque-Komponenten nekrotischer Kern ($P>.99$), Kalzifizierung ($P=.29$) und fibröses Bindegewebe ($P=.28$) fanden. Möglicherweise wirken zelluläre und strukturelle Vorgänge innerhalb der fortgeschrittenen Karotisplaque über andere Mechanismen auf Rupturneigung und Klinik als über morphologisch messbare Veränderungen. Eine fokal betonte Modifikation der fibro-elastischen Eigenschaften der fibrotischen Deckplatte kann Ursache einer

erhöhten Rupturneigung sein (Newby et al., 1999). In atherosklerotischen Plaques zeigen die häufiger rupturierten Regionen eine erhöhte zelluläre Infiltration (van der Wal et al., 1994), die möglicherweise zu einer Abnahme der mechanischen Widerstandskräfte führt (Carr et al., 1997). Mittels eines Computermodells zur Berechnung der mechanischen Kräfte in Koronar-Plaques zeigten Richardson et al. (Richardson 1989), dass über den durch zelluläre Infiltration mechanisch geschwächten Arealen erhöhte Dehnungskräfte wirken. Diese Bereiche wiesen histologisch vermehrt Risse und Fissuren auf. Infiltration durch aktive Immunzellen geht mit erhöhter Expressierung von Matrixmetalloproteinasen einher und ist ein Merkmal symptomatischer Karotisplaques (Loftus et al., 2000; Molloy et al., 2004) und scheint die mechanische Widerstandskraft ebenfalls zu beeinträchtigen (Lee et al., 1996).

Dass die inflammatorischen Prozesse in atherosklerotischen Plaques proapoptische Effektorwege beinhalten, ist gut belegt. Die vorliegenden Untersuchungen sprechen dafür, dass der Apoptose glatter Muskelzellen eine Bedeutung im Rahmen der klinischen Destabilisierung der Karotisstenose zukommt, denn Gesamtzahl und Dichte apoptotischer Muskelzellen war in symptomatischen Plaques signifikant erhöht. Sie waren fast ausschließlich in der fibrotischen Deckplatte lokalisiert, zeigten hier aber keine regionale Konzentration, etwa auf die Schulterregionen. Dies bestätigt bisherige Beobachtungen wie die von Dhume et al. (Dhume et al., 2003), die eine erhöhte Apoptose-Rate glatter Muskelzellen in der fibrotischen Deckplatte symptomatischer Plaques fanden ($9,92 \pm 0,55\%$ vs. $23,88 \pm 0,8\%$). Allerdings fand sich in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Gefäßmuskelzell-Apoptose und der durchschnittlichen Deckplattengröße oder der

minimalen Kern-Lumen-Distanz. Obwohl in dieser Untersuchung die Apoptose-Raten der symptomatischen Plaques um das 10fache über denen der asymptomatischen Präparate lagen, scheint dies die morphometrischen Eigenschaften der Deckplatte nicht wesentlich zu verändern. Dementsprechend war auch der Gehalt an glatten Muskelzellen in den apoptosereichen Plaques nicht vermindert, so dass die vorliegende Arbeit keine Bestätigung liefert für die Annahme, dass erhöhte Apoptoseraten der glatten Muskelzellen über einen quantifizierbaren Verlust dieser Muskelzellen zu Ruptur und klinischer Symptomatik führt. Möglicherweise wird hier als Zeichen eines gesteigerten Zell-Umsatzes der Verlust an glatten Muskelzellen durch eine gesteigerte VSMC-Proliferation ausgeglichen (Orekhov et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, aber für atherosklerotische Läsionen als relevant beschriebene molekulare Interaktionen mit der extrazellulären Matrix (Newby et al., 1996) (Tran et al., 2004) könnten ein bedeutsames Gegengewicht zu gesteigerten Apoptoseraten in der humanen Karotis-Atherosklerose darstellen.

Grundlage dieser Arbeit war die quantitativ-morphometrische sowie histologische Untersuchung von humanen Karotisplaques, gewonnen im Rahmen von chirurgischen Endarterektomien. Sie ermöglichen die Beurteilung fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen in enger Korrelation mit der klinischen Symptomatik der Patienten. Allerdings findet die Untersuchung mit einem zeitlich variablen Abstand zum klinischen Ereignis statt. Man muss annehmen, dass destabilisierende Mechanismen, die zu einem klinischen Ereignis führen, in ihrem zeitlichen Verlauf Schwankungen unterworfen sind. Dafür spricht zum Beispiel, dass Karotisplaques einen umso größeren Gehalt an Matrix degradierenden Enzymen (Loftus et al., 2000) und Makrophagen-Infiltration (Spagnoli et

al., 2004) zeigten, je näher der Untersuchungszeitpunkt dem klinischen Ereignis war. Außerdem gibt es bislang keine eindeutigen präoperativen Diagnose-Kriterien, die bei asymptomatischen Patienten eine zuverlässige Aussage über den Grad der vorliegenden Destabilisierung ermöglichen, so dass die Befunde trotz klinischer Stabilität nicht unbedingt eine histopathologische Stabilität widerspiegeln müssen. In dem vorliegend untersuchten Kollektiv lag das klinische Ereignis nicht länger als 60 Tage zurück. Die überwiegende Zahl der Patienten wurde innerhalb eines Monats operiert. Andere Autoren, die dieses Zeitfenster weiter fassten, fanden bezüglich histologischer Parameter keine Unterschiede mehr zwischen symptomatischen und asymptomatischen Patienten (Milei et al., 2003).

Wahrscheinlich stellt die histologische Untersuchung eine Momentaufnahme in einem dynamischen Prozess dar. Eine Verlaufsuntersuchung wäre allenfalls mit bildgebenden Methoden möglich. Aufgrund dieses Problems unternahm die Arbeitsgruppe um Thomas S. Hatsukami (Hatsukami et al., 1997) weitere Initiativen zur Identifizierung klinisch instabiler Karotisstenosen: Mittels Magnetresonanztomographie ist eine In-vivo-Identifizierung einzelner Komponenten atherosklerotischer Plaques, unter anderem des nekrotischen Kerns und der fibrotischen Deckplatte, möglich, sowie Stenosegradbestimmungen und Aussagen über die Zusammensetzung der Plaque (Toussaint et al., 1996), so dass auch Hatsukami et al. (Yuan et al., 2002) den Zusammenhang zwischen dünnen bzw. rupturierten Deckplatten und zurückliegender klinischer Symptomatik untersuchten. Dabei unterschieden qualitative Merkmale der Bildgebung zwischen dünnen/rupturierten und dicken Deckplatten, wie es zuvor in histologischen Vergleichsstudien validiert wurde (Hatsukami et al., 2000). Die Gruppe der Patienten bei denen

die Deckplatte als dünn oder rupturiert eingeschätzt wurde hatte dabei häufiger eine Vergangenheit mit zerebral-ischämischen Ereignissen. Allerdings lässt sich bei dieser Untersuchungsmethode sowohl bei dünnen als auch bei rupturierten Deckplatten, im Gegensatz zur histologischen Referenzmethode, mittels MRT kein Deckplatten-Signal nachweisen. Eine Unterscheidung erfolgte anhand des Vorhandenseins von indirekten Ruptur-Merkmalen (irreguläres Lumen, Nachweis eines intraluminalen Thrombus-Signals). Da aufgrund der bisher bekannten histologischen Studien nicht davon ausgegangen werden kann, dass der Ruptur zwangsläufig eine Ausdünnung vorangeht, ist die Aussagekraft bezüglich der Deckplattenmorphologie mit diesem Ansatz noch begrenzt. Die Ruptur der Karotisplaque ist offenbar auch nach MRT-Kriterien mit ipsilateraler zerebraler Ischämie korreliert, während die Patienten mit Zeichen einer dünnen, nicht rupturierten Deckplatte genau zu einer Hälfte eine Historie zerebraler Ischämie (innerhalb der letzten 90 Tage) aufwiesen (Yuan et al., 2002). Trotz der Attraktivität der potentiellen Möglichkeit paraklinischer Verlaufskontrollen, ist der klinische Einsatz des MRT zum Management von Karotisstenosen bislang noch nicht etabliert.

Bedacht werden muss außerdem, dass womöglich die Beurteilung rein morphologischer Kriterien dem Konzept der instabilen Karotisstenose nicht gerecht wird. Zwar fanden sich auch in dem hier untersuchten Kollektiv Rupturen der fibrotischen Deckplatte, allerdings ohne Nachweis zugrunde liegender, morphometrisch fassbarer, Veränderungen. Dies scheint plausibel, da sich trotz der signifikant erhöhten Apoptose-Raten glatter Muskelzellen kein Hinweis für einen tatsächlichen Verlust an glatten Muskelzellen in den symptomatischen Plaques ergab. Eine sehr gute Evidenz gibt es

aber für die klinische Relevanz einer Reihe von funktionellen Veränderungen, die die entzündlich veränderte Plaque charakterisieren. Wie Abbildung 2.4.1. und 2.5.1. gewiss vereinfacht darstellen, unterliegen diese, ebenso wie die Apoptose, einer komplexen Regulation, so dass anzunehmen ist, dass nicht ein Mechanismus allein zur klinischen Destabilisierung führt. Methodisch bedingt lässt sich in dem hier durchgeführten histopathologischen Ansatz jeweils nur ein Teilaspekt der zugrunde liegenden Pathologie aufdecken.

Die Bedeutung einzelner Signalwege und deren Zusammenwirken wird damit zu unterschiedlichen Zeitpunkten, an unterschiedlichen Lokalisationen und in Bezug auf unterschiedliche Zellen ein unterschiedliches Gewicht haben und sich verändern. Dieses komplexe Zusammenspiel bewirkt schließlich das Fortschreiten der atherosklerotischen Läsion bis hin zur fortgeschrittenen symptomatischen Plaque.

Darüber hinaus sollte womöglich in Zukunft die Erforschung der instabilen Karotistenose nicht auf die atherosklerotische Plaque an sich beschränkt bleiben. Die Identifizierung von Laborparametern die eine Abhängigkeit vom klinischen Zustand einer Karotisplaque zeigen, lassen vermuten, dass auch systemisch wirkende Prozesse den klinischen Verlauf eines Patienten beeinflussen. Möglicherweise bildet nicht die vulnerable *Plaque*, sondern der vulnerable *Patient* (Naghavi et al., 2003) die Grundlage drohender zerebraler Ischämie.

6. Literatur

- A. C. A. S. (1995). *Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. Jama* 273(18): 1421-8.
- Acker, T. and Acker, H. (2004). *Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. J Exp Biol* 207(Pt 18): 3171-88.
- Adetiloye, V. A. and Al Damegh, S. (2003). *Sonographic evaluation of plaque morphology in haemodynamic and non-haemodynamic symptomatic carotid artery stenoses. Afr J Med Med Sci* 32(4): 381-5.
- Anwar, A., Zahid, A. A., Scheidegger, K. J., Brink, M. and Delafontaine, P. (2002). *Tumor necrosis factor- α regulates insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression in vascular smooth muscle. Circulation* 105(10): 1220-5.
- Ballotta, E., Da Giau, G. and Renon, L. (2000). *Carotid plaque gross morphology and clinical presentation: a prospective study of 457 carotid artery specimens. J Surg Res* 89(1): 78-84.
- Barnett, H. J., Taylor, D. W., Eliasziw, M., Fox, A. J., Ferguson, G. G., Haynes, R. B., Rankin, R. N., Clagett, G. P., Hachinski, V. C., Sackett, D. L., Thorpe, K. E. and Meldrum, H. E. (1998). *Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. N Engl J Med* 339(20): 1415-25.
- Bassiouny, H. S., Davis, H., Massawa, N., Gewertz, B. L., Glagov, S. and Zarins, C. K. (1989). *Critical carotid stenoses: morphologic and chemical similarity between symptomatic and asymptomatic plaques. J Vasc Surg* 9(2): 202-12.
- Bassiouny, H. S., Sakaguchi, Y., Mikucki, S. A., McKinsey, J. F., Piano, G., Gewertz, B. L. and Glagov, S. (1997). *Juxtalumenal location of plaque necrosis and neof ormation in symptomatic carotid stenosis. J Vasc Surg* 26(4): 585-94.
- Bauriedel, G., Hutter, R., Welsch, U., Bach, R., Sievert, H. and Luderitz, B. (1999). *Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. Cardiovasc Res* 41(2): 480-8.
- Bennett, M. R., Evan, G. I. and Schwartz, S. M. (1995). *Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. J Clin Invest* 95(5): 2266-74.
- Biller, J., Feinberg, W. M., Castaldo, J. E., Whittemore, A. D., Harbaugh, R. E., Dempsey, R. J., Caplan, L. R., Kresowik, T. F., Matchar, D. B., Toole, J. F., Easton, J. D., Adams, H. P., Jr., Brass, L. M., Hobson, R. W., 2nd, Brott, T. G. and Sternau, L. (1998). *Guidelines for carotid endarterectomy: a statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. Circulation* 97(5): 501-9.
- Bond, R., Rerkasem, K. and Rothwell, P. M. (2003). *Systematic review of the risks of carotid endarterectomy in relation to the clinical indication for and timing of surgery. Stroke* 34(9): 2290-301.
- Boyle, J. J., Bowyer, D. E., Weissberg, P. L. and Bennett, M. R. (2001). *Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-ligand/Fas interactions. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(9): 1402-7.
- Cai, W., Devaux, B., Schaper, W. and Schaper, J. (1997). *The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. Atherosclerosis* 131(2): 177-86.
- Campbell, J. H. and Campbell, G. R. (1994). *The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol* 5(5): 323-30.
- Carr, S., Farb, A., Pearce, W. H., Virmani, R. and Yao, J. S. (1996). *Atherosclerotic plaque rupture in symptomatic carotid artery stenosis. J Vasc Surg* 23(5): 755-65; discussion 765-6.
- Carr, S. C., Cheanvechai, V., Virmani, R. and Pearce, W. H. (1997). *Histology and clinical significance of the carotid atherosclerotic plaque: implications for endovascular treatment. J Endovasc Surg* 4(4): 321-5.
- Chester, A. H., Borland, J. A., Buttery, L. D., Mitchell, J. A., Cunningham, D. A., Hafizi, S., Hoare, G. S., Springall, D. R., Polak, J. M. and Yacoub, M. H. (1998). *Induction of nitric oxide synthase in human vascular smooth muscle: interactions between proinflammatory cytokines. Cardiovasc Res* 38(3): 814-21.

- Chung, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M., Billiar, T. R. and Kim, Y. M. (2001). *Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis*. **Biochem Biophys Res Commun** 282(5): 1075-9.
- Colgan, M. P., Strode, G. R., Sommer, J. D., Gibbs, J. L. and Sumner, D. S. (1988). *Prevalence of asymptomatic carotid disease: results of duplex scanning in 348 unselected volunteers*. **J Vasc Surg** 8(6): 674-8.
- Cromheeke, K. M., Kockx, M. M., De Meyer, G. R., Bosmans, J. M., Bult, H., Beelaerts, W. J., Vrints, C. J. and Herman, A. G. (1999). *Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation/peroxidation in human atherosclerotic plaques*. **Cardiovasc Res** 43(3): 744-54.
- Davies, M. J., Richardson, P. D., Woolf, N., Katz, D. R. and Mann, J. (1993). *Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content*. **Br Heart J** 69(5): 377-81.
- Davignon, J. and Ganz, P. (2004). *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. **Circulation** 109(23 Suppl 1): III27-32.
- DeGraba, T. J., Siren, A. L., Penix, L., McCarron, R. M., Hargraves, R., Sood, S., Pettigrew, K. D. and Hallenbeck, J. M. (1998). *Increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 in symptomatic versus asymptomatic human carotid atherosclerotic plaque*. **Stroke** 29(7): 1405-10.
- Dhume, A. S., Soundararajan, K., Hunter, W. J., 3rd and Agrawal, D. K. (2003). *Comparison of vascular smooth muscle cell apoptosis and fibrous cap morphology in symptomatic and asymptomatic carotid artery disease*. **Ann Vasc Surg** 17(1): 1-8.
- Diener, H. C. H. (2003). *Primäre und sekundäre Prävention der zerebralen Ischämie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2. überarbeitete und erweiterte Auflage*: 129-44.
- Diez, J., Panizo, A., Hernandez, M. and Pardo, J. (1997). *Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats?* **Hypertension** 29(3): 776-80.
- Dimmeler, S., Haendeler, J. and Zeiher, A. M. (2002). *Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis*. **Curr Opin Lipidol** 13(5): 531-6.
- E. C. S. T. (1998). *Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST)*. **Lancet** 351(9113): 1379-87.
- Eliasziw, M., Streifler, J. Y., Fox, A. J., Hachinski, V. C., Ferguson, G. G. and Barnett, H. J. (1994). *Significance of plaque ulceration in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial*. **Stroke** 25(2): 304-8.
- Erl, W., Hansson, G. K., de Martin, R., Draude, G., Weber, K. S. and Weber, C. (1999). *Nuclear factor-kappa B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells*. **Circ Res** 84(6): 668-77.
- Falk, E., Shah, P. K. and Fuster, V. (1995). *Coronary plaque disruption*. **Circulation** 92(3): 657-71.
- Fine-Edelstein, J. S., Wolf, P. A., O'Leary, D. H., Poehlman, H., Belanger, A. J., Kase, C. S. and D'Agostino, R. B. (1994). *Precursors of extracranial carotid atherosclerosis in the Framingham Study*. **Neurology** 44(6): 1046-50.
- Fisher, C. M., Ojemann R.G. (1986). *A clinico-pathologic study of carotid endarterectomy plaques*. **Rev Neurol (Paris)** 142((6-7)): 573-89.
- Fisher, M., Martin, A., Cosgrove, M. and Norris, J. W. (1993). *The NASCET-ACAS plaque project. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study*. **Stroke** 24(12 Suppl): I24-5; discussion I31-2.
- Fisher, M., Paganini-Hill, A., Martin, A., Cosgrove, M., Toole, J. F., Barnett, H. J. and Norris, J. (2005). *Carotid plaque pathology: thrombosis, ulceration, and stroke pathogenesis*. **Stroke** 36(2): 253-7.
- Fitzgerald, M., Hayward, I. P., Thomas, A. C., Campbell, G. R. and Campbell, J. H. (1999). *Matrix metalloproteinase can facilitate the heparanase-induced promotion of phenotype change in vascular smooth muscle cells*. **Atherosclerosis** 145(1): 97-106.
- Flynn, P. D., Byrne, C. D., Baglin, T. P., Weissberg, P. L. and Bennett, M. R. (1997). *Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells*. **Blood** 89(12): 4378-84.
- Frid, M. G., Aldashev, A. A., Dempsey, E. C. and Stenmark, K. R. (1997). *Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities*. **Circ Res** 81(6): 940-52.
- Fukuo, K., Nakahashi, T., Nomura, S., Hata, S., Suhara, T., Shimizu, M., Tamatani, M., Morimoto, S., Kitamura, Y. and Ogihara, T. (1997). *Possible participation of Fas-mediated apoptosis in the*

- mechanism of atherosclerosis. Gerontology* 43 Suppl 1: 35-42.
- Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W. and Libby, P. (1994). *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest* 94(6): 2493-503.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992). *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol* 119(3): 493-501.
- Geng, Y., Hansson, G. K. and Holme, E. (1992). *Interferon-gamma and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. Circ Res* 71(5): 1268-76.
- Geng, Y. J., Henderson, L. E., Levesque, E. B., Muszynski, M. and Libby, P. (1997). *Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(10): 2200-8.
- Geng, Y. J. and Libby, P. (1995). *Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. Am J Pathol* 147(2): 251-66.
- Geng, Y. J., Wu, Q., Muszynski, M., Hansson, G. K. and Libby, P. (1996). *Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(1): 19-27.
- Gilbertson-Beadling, S. K., Fisher, C. (1993). *A potential role for N-cadherin in mediating endothelial cell-smooth muscle cell interactions in the rat vasculature. Lab Invest* 69: 203-9.
- Goldstein, L. B. (2003). *Extracranial carotid artery stenosis. Stroke* 34(11): 2767-73.
- Golledge, J., Greenhalgh, R. M. and Davies, A. H. (2000). *The symptomatic carotid plaque. Stroke* 31(3): 774-81.
- Graf, K., Xi, X. P., Yang, D., Fleck, E., Hsueh, W. A. and Law, R. E. (1997). *Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. Hypertension* 29(1 Pt 2): 334-9.
- Grau, A. J., Weimar, C., Buggle, F., Heinrich, A., Goertler, M., Neumaier, S., Glahn, J., Brandt, T., Hacke, W. and Diener, H. C. (2001). *Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. Stroke* 32(11): 2559-66.
- Greeno, E. W., Bach, R. R. and Moldow, C. F. (1996). *Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. Lab Invest* 75(2): 281-9.
- Gronholdt, M. L. (1999). *Ultrasound and lipoproteins as predictors of lipid-rich, rupture-prone plaques in the carotid artery. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(1): 2-13.
- Gronholdt, M. L., Nordestgaard, B. G., Schroeder, T. V., Vorstrup, S. and Sillensen, H. (2001). *Ultrasonic echolucent carotid plaques predict future strokes. Circulation* 104(1): 68-73.
- Harada-Shiba, M., Kinoshita, M., Kamido, H. and Shimokado, K. (1998). *Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. J Biol Chem* 273(16): 9681-7.
- Hatsukami, T. S., Ferguson, M. S., Beach, K. W., Gordon, D., Detmer, P., Burns, D., Alpers, C. and Strandness, D. E., Jr. (1997). *Carotid plaque morphology and clinical events. Stroke* 28(1): 95-100.
- Hatsukami, T. S., Ross, R., Polissar, N. L. and Yuan, C. (2000). *Visualization of fibrous cap thickness and rupture in human atherosclerotic carotid plaque in vivo with high-resolution magnetic resonance imaging. Circulation* 102(9): 959-64.
- Hayward, I. P., Bridle, K. R., Campbell, G. R., Underwood, P. A. and Campbell, J. H. (1995). *Effect of extracellular matrix proteins on vascular smooth muscle cell phenotype. Cell Biol Int* 19(10): 839-46.
- Hegy, L., Hardwick, S. J., Mitchinson, M. J. and Skepper, J. N. (1997). *The presence of apoptotic cells in human atherosclerotic lesions. Am J Pathol* 150(1): 371-3.
- Henderson, E. L., Geng, Y. J., Sukhova, G. K., Whittemore, A. D., Knox, J. and Libby, P. (1999). *Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. Circulation* 99(1): 96-104.
- Henderson, R. D., Eliasziw, M., Fox, A. J., Rothwell, P. M. and Barnett, H. J. (2000). *Angiographically defined collateral circulation and risk of stroke in patients with severe carotid artery stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) Group. Stroke* 31(1): 128-32.
- Hennerici, M., Hulsbomer, H. B., Hefter, H., Lammerts, D. and Rautenberg, W. (1987). *Natural history of asymptomatic extracranial arterial disease. Results of a long-term prospective study. Brain* 110 (Pt

- 3): 777-91.
- Holman, R. L., Mc, G. H., Jr., Strong, J. P. and Geer, J. C. (1958). *The natural history of atherosclerosis: the early aortic lesions as seen in New Orleans in the middle of the of the 20th century.* **Am J Pathol** 34(2): 209-35.
- Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H. (1981). *A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies.* **Am J Clin Pathol** 75(5): 734-8.
- Husain, T., Abbott, C. R., Scott, D. J. and Gough, M. J. (1999). *Macrophage accumulation within the cap of carotid atherosclerotic plaques is associated with the onset of cerebral ischemic events.* **J Vasc Surg** 30(2): 269-76.
- Hynes, R. O. (1992). *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.* **Cell** 69(1): 11-25.
- Imai, H. and Thomas, W. A. (1968). *Cerebral atherosclerosis in swine: role of necrosis in progression of diet-induced lesions from proliferative to atheromatous stage.* **Exp Mol Pathol** 8(3): 330-57.
- Jander, S., Sitzer, M., Schumann, R., Schroeter, M., Siebler, M., Steinmetz, H. and Stoll, G. (1998). *Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization.* **Stroke** 29(8): 1625-30.
- Johnston, S. C., Gress, D. R., Browner, W. S. and Sidney, S. (2000). *Short-term prognosis after emergency department diagnosis of TIA.* **Jama** 284(22): 2901-6.
- Kaposzta, Z., Clifton, A., Molloy, J., Martin, J. F. and Markus, H. S. (2002). *S-nitrosoglutathione reduces asymptomatic embolization after carotid angioplasty.* **Circulation** 106(24): 3057-62.
- Kockx, M. M. (1998). *Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects.* **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 18(10): 1519-22.
- Kockx, M. M., De Meyer, G. R., Muhring, J., Jacob, W., Bult, H. and Herman, A. G. (1998). *Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques.* **Circulation** 97(23): 2307-15.
- Kockx, M. M. and Herman, A. G. (2000). *Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental?* **Cardiovasc Res** 45(3): 736-46.
- Kockx, M. M. and Knaapen, M. W. (2000). *The role of apoptosis in vascular disease.* **J Pathol** 190(3): 267-80.
- Kockx, M. M., Muhring, J., Bortier, H., De Meyer, G. R. and Jacob, W. (1996). *Biotin- or digoxigenin-conjugated nucleotides bind to matrix vesicles in atherosclerotic plaques.* **Am J Pathol** 148(6): 1771-7.
- Kockx, M. M., Muhring, J., Knaapen, M. W. and de Meyer, G. R. (1998). *RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis.* **Am J Pathol** 152(4): 885-8.
- Kolominsky-Rabas, P. L., Weber, M., Gefeller, O., Neundoerfer, B. and Heuschmann, P. U. (2001). *Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study.* **Stroke** 32(12): 2735-40.
- Koyama, H., Raines, E. W., Bornfeldt, K. E., Roberts, J. M. and Ross, R. (1996). *Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors.* **Cell** 87(6): 1069-78.
- Lee, R. T., Schoen, F. J., Loree, H. M., Lark, M. W. and Libby, P. (1996). *Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. Implications for plaque rupture.* **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 16(8): 1070-3.
- Libby, P., Ridker, P. M. and Maseri, A. (2002). *Inflammation and atherosclerosis.* **Circulation** 105(9): 1135-43.
- Liu, W., Ahmad, S. A., Reinmuth, N., Shaheen, R. M., Jung, Y. D., Fan, F. and Ellis, L. M. (2000). *Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature.* **Apoptosis** 5(4): 323-8.
- Loftus, I. M., Naylor, A. R., Goodall, S., Crowther, M., Jones, L., Bell, P. R. and Thompson, M. M. (2000). *Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption.* **Stroke** 31(1): 40-7.
- Loree, H. M., Kamm, R.D., Stringfellow, R.G., Lee, R.T. (1992). *Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels.* **Circ Res** 71: 850-8.
- Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Leseche, G., Freyssinet, J. M. and Tedgui, A. (1999). *Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity.* **Circulation** 99(3): 348-53.
- Markus, H. S. and Brown, M. M. (1993). *Differentiation between different pathological cerebral embolic*

- materials using transcranial Doppler in an in vitro model. **Stroke** 24(1): 1-5.
- Markus, H. S., Droste, D. W., Kaps, M., Larrue, V., Lees, K. R., Siebler, M. and Ringelstein, E. B. (2005). *Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin in symptomatic carotid stenosis evaluated using doppler embolic signal detection: the Clopidogrel and Aspirin for Reduction of Emboli in Symptomatic Carotid Stenosis (CARESS) trial.* **Circulation** 111(17): 2233-40.
- Markus, H. S. and Mackinnon, A. (2005). *Asymptomatic Embolization Detected by Doppler Ultrasound Predicts Stroke Risk in Symptomatic Carotid Artery Stenosis.* **Stroke.**
- Markus, H. S., Thomson, N. D. and Brown, M. M. (1995). *Asymptomatic cerebral embolic signals in symptomatic and asymptomatic carotid artery disease.* **Brain** 118 (Pt 4): 1005-11.
- Milei, J., Parodi, J. C., Ferreira, M., Barrone, A., Grana, D. R. and Matturri, L. (2003). *Atherosclerotic plaque rupture and intraplaque hemorrhage do not correlate with symptoms in carotid artery stenosis.* **J Vasc Surg** 38(6): 1241-7.
- Molloy, K. J., Thompson, M. M., Jones, J. L., Schwalbe, E. C., Bell, P. R., Naylor, A. R. and Loftus, I. M. (2004). *Unstable carotid plaques exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity.* **Circulation** 110(3): 337-43.
- Moore, W. S., Barnett, H. J., Beebe, H. G., Bernstein, E. F., Brener, B. J., Brott, T., Caplan, L. R., Day, A., Goldstone, J., Hobson, R. W., 2nd and et al. (1995). *Guidelines for carotid endarterectomy. A multidisciplinary consensus statement from the Ad Hoc Committee, American Heart Association.* **Circulation** 91(2): 566-79.
- Moore, W. S. and Hall, A. D. (1968). *Ulcerated atheroma of the carotid artery. A cause of transient cerebral ischemia.* **Am J Surg** 116(2): 237-42.
- Morisaki, N., Koyama, N., Kawano, M., Mori, S., Umemiya, K., Koshikawa, T., Saito, Y. and Yoshida, S. (1992). *Human macrophages modulate the phenotype of cultured rabbit aortic smooth muscle cells through secretion of platelet-derived growth factor.* **Eur J Clin Invest** 22(7): 461-8.
- Murry, C. E., Gipaya, C. T., Bartosek, T., Benditt, E. P. and Schwartz, S. M. (1997). *Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis.* **Am J Pathol** 151(3): 697-705.
- Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W. J., Dewey, C. F., Jr. and Gimbrone, M. A., Jr. (1994). *Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells.* **J Clin Invest** 94(2): 885-91.
- Nagel, T., Resnick, N., Dewey, C. F., Jr. and Gimbrone, M. A., Jr. (1999). *Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors.* **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 19(8): 1825-34.
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S. W., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J. J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., Fayad, Z., Stone, P. H., Waxman, S., Raggi, P., Madjid, M., Zarrabi, A., Burke, A., Yuan, C., Fitzgerald, P. J., Siscovick, D. S., de Korte, C. L., Aikawa, M., Juhani Airaksinen, K. E., Assmann, G., Becker, C. R., Chesebro, J. H., Farb, A., Galis, Z. S., Jackson, C., Jang, I. K., Koenig, W., Lodder, R. A., March, K., Demirovic, J., Navab, M., Priori, S. G., Rekhter, M. D., Bahr, R., Grundy, S. M., Mehran, R., Colombo, A., Boerwinkle, E., Ballantyne, C., Insull, W., Jr., Schwartz, R. S., Vogel, R., Serruys, P. W., Hansson, G. K., Faxon, D. P., Kaul, S., Drexler, H., Greenland, P., Muller, J. E., Virmani, R., Ridker, P. M., Zipes, D. P., Shah, P. K. and Willerson, J. T. (2003). *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I.* **Circulation** 108(14): 1664-72.
- Neureiter, D., Heuschmann, P., Stintzing, S., Kolominsky-Rabas, P., Barbera, L., Jung, A., Ocker, M., Maass, M., Faller, G. and Kirchner, T. (2003). *Detection of Chlamydia pneumoniae but not of Helicobacter pylori in symptomatic atherosclerotic carotids associated with enhanced serum antibodies, inflammation and apoptosis rate.* **Atherosclerosis** 168(1): 153-62.
- Newby, A. C. and George, S. J. (1996). *Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis.* **Curr Opin Cardiol** 11(6): 574-82.
- Newby, A. C. and Zaltsman, A. B. (1999). *Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation.* **Cardiovasc Res** 41(2): 345-60.
- Nishio, E., Arimura, S. and Watanabe, Y. (1996). *Oxidized LDL induces apoptosis in cultured smooth muscle cells: a possible role for 7-ketocholesterol.* **Biochem Biophys Res Commun** 223(2): 413-8.
- Orekhov, A. N., Andreeva, E. R., Mikhailova, I. A. and Gordon, D. (1998). *Cell proliferation in normal and*

- atherosclerotic human aorta: proliferative splash in lipid-rich lesions. Atherosclerosis* 139(1): 41-8.
- Padayachee, T. S., Gosling, R. G., Bishop, C. C., Burnand, K. and Browse, N. L. (1986). *Monitoring middle cerebral artery blood velocity during carotid endarterectomy. Br J Surg* 73(2): 98-100.
- Perktold, K., Resch, M. and Peter, R. O. (1991). *Three-dimensional numerical analysis of pulsatile flow and wall shear stress in the carotid artery bifurcation. J Biomech* 24(6): 409-20.
- Prati, P., Vanuzzo, D., Casaroli, M., Di Chiara, A., De Biasi, F., Feruglio, G. A. and Touboul, P. J. (1992). *Prevalence and determinants of carotid atherosclerosis in a general population. Stroke* 23(12): 1705-11.
- Richardson, P. D., Davies, M.J., Born, G.V. (1989). *Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. Lancet* 21(2): 941-4.
- Ries, S., Schminke, U., Daffertshofer, M. and Hennerici, M. (1996). *High intensity transient signals (HITS) in patients with carotid artery disease. Eur J Med Res* 1(7): 328-30.
- Ringelstein, E. B., Sievers, C., Ecker, S., Schneider, P. A. and Otis, S. M. (1988). *Noninvasive assessment of CO₂-induced cerebral vasomotor response in normal individuals and patients with internal carotid artery occlusions. Stroke* 19(8): 963-9.
- Robert Koch-Institut, B. (2000). *Public Use File BGS98, Bundes-Gesundheitssurvey 1998.*
- Ross, R. (1999). *Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med* 340(2): 115-26.
- Ross, R., Glomset, J. and Harker, L. (1977). *Response to injury and atherogenesis. Am J Pathol* 86(3): 675-84.
- Ross, R., Wight, T. N., Strandness, E. and Thiele, B. (1984). *Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. Am J Pathol* 114(1): 79-93.
- Ruggeri, Z. M. (1993). *Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. Thromb Haemost* 70(1): 119-23.
- Russell, D., Madden, K. P., Clark, W. M., Sandset, P. M. and Zivin, J. A. (1991). *Detection of arterial emboli using Doppler ultrasound in rabbits. Stroke* 22(2): 253-8.
- Scheidegger, K. J., James, R. W. and Delafontaine, P. (2000). *Differential effects of low density lipoproteins on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem* 275(35): 26864-9.
- Schwartz, S. M. and Bennett, M. R. (1995). *Death by any other name. Am J Pathol* 147(2): 229-34.
- Seeger, J. M., Barratt, E., Lawson, G. A. and Klingman, N. (1995). *The relationship between carotid plaque composition, plaque morphology, and neurologic symptoms. J Surg Res* 58(3): 330-6.
- Shaalan, W. E., Cheng, H., Gewertz, B., McKinsey, J. F., Schwartz, L. B., Katz, D., Cao, D., Desai, T., Glagov, S. and Bassiouny, H. S. (2004). *Degree of carotid plaque calcification in relation to symptomatic outcome and plaque inflammation. J Vasc Surg* 40(2): 262-9.
- Siebler, M., Sitzer, M., Rose, G., Bendfeldt, D. and Steinmetz, H. (1993). *Silent cerebral embolism caused by neurologically symptomatic high-grade carotid stenosis. Event rates before and after carotid endarterectomy. Brain* 116 (Pt 5): 1005-15.
- Sitzer, M., Muller, W., Rademacher, J., Siebler, M., Hort, W., Kniemeyer, H. W. and Steinmetz, H. (1996). *Color-flow Doppler-assisted duplex imaging fails to detect ulceration in high-grade internal carotid artery stenosis. J Vasc Surg* 23(3): 461-5.
- Sitzer, M., Muller, W., Siebler, M., Hort, W., Kniemeyer, H. W., Jancke, L. and Steinmetz, H. (1995). *Plaque ulceration and lumen thrombus are the main sources of cerebral microemboli in high-grade internal carotid artery stenosis. Stroke* 26(7): 1231-3.
- Spagnoli, L. G., Mauriello, A., Sangiorgi, G., Fratoni, S., Bonanno, E., Schwartz, R. S., Piepgras, D. G., Pistolesse, R., Ippoliti, A. and Holmes, D. R., Jr. (2004). *Extracranial thrombotically active carotid plaque as a risk factor for ischemic stroke. Jama* 292(15): 1845-52.
- Spencer, M. P. (1996). *Doppler Microembolic Signals for Diagnosis of Ulcerated Carotid Artery Plaques. Echocardiography* 13(5): 551-554.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. and Wissler, R. W. (1995). *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(9): 1512-31.
- Statistisches-Bundesamt (2005). *Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2003.*

(Artikelnummer: 2120400037004).

- Sterpetti, A. V., Hunter, W. J. and Schultz, R. D. (1991). *Importance of ulceration of carotid plaque in determining symptoms of cerebral ischemia*. **J Cardiovasc Surg (Torino)** 32(2): 154-8.
- Streifler, J. Y., Eliasziw, M., Benavente, O. R., Harbison, J. W., Hachinski, V. C., Barnett, H. J. and Simard, D. (1995). *The risk of stroke in patients with first-ever retinal vs hemispheric transient ischemic attacks and high-grade carotid stenosis*. *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial*. **Arch Neurol** 52(3): 246-9.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. and Kroemer, G. (1999). *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. **Nature** 397(6718): 441-6.
- Takarada, S., Imanishi, T., Hano, T. and Nishio, I. (2003). *Oxidized LOW-density lipoprotein sensitizes human vascular smooth muscle cells to FAS (CD95)-mediated apoptosis*. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 30(4): 289-94.
- Thyberg, J., Blomgren, K., Roy, J., Tran, P. K. and Hedin, U. (1997). *Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin*. **J Histochem Cytochem** 45(6): 837-46.
- Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J. T., Gertz, S. D., Fernandez-Ortiz, A., Chesebro, J. H., Badimon, L., Nemerson, Y., Fuster, V. and Badimon, J. J. (1997). *Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques*. **Circulation** 95(3): 594-9.
- Toussaint, J. F., LaMuraglia, G. M., Southern, J. F., Fuster, V. and Kantor, H. L. (1996). *Magnetic resonance images lipid, fibrous, calcified, hemorrhagic, and thrombotic components of human atherosclerosis in vivo*. **Circulation** 94(5): 932-8.
- Tran, P. K., Tran-Lundmark, K., Soininen, R., Tryggvason, K., Thyberg, J. and Hedin, U. (2004). *Increased intimal hyperplasia and smooth muscle cell proliferation in transgenic mice with heparan sulfate-deficient perlecan*. **Circ Res** 94(4): 550-8.
- Trial, N. A. S. C. E. (1991). *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. Methods, patient characteristics, and progress*. **Stroke** 22(6): 711-20.
- Trostdorf, F., Buchkremer, M., Harmjanz, A., Kablau, M., Jander, S., Geiger, K., Schmitz-Rixen, T., Steinmetz, H. and Sitzer, M. (2005). *Fibrous cap thickness and smooth muscle cell apoptosis in high-grade carotid artery stenosis*. **Eur J Vasc Endovasc Surg** 29(5): 528-35.
- Urbich, C., Walter, D. H., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2000). *Laminar shear stress upregulates integrin expression: role in endothelial cell adhesion and apoptosis*. **Circ Res** 87(8): 683-9.
- van der Wal, A. C. and Becker, A. E. (1999). *Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability*. **Cardiovasc Res** 41(2): 334-44.
- van der Wal, A. C., Becker, A. E., van der Loos, C. M. and Das, P. K. (1994). *Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology*. **Circulation** 89(1): 36-44.
- von der Thusen, J. H., van Vlijmen, B. J., Hoeben, R. C., Kockx, M. M., Havekes, L. M., van Berkel, T. J. and Biessen, E. A. (2002). *Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E-/- mice after adenovirus-mediated transfer of p53*. **Circulation** 105(17): 2064-70.
- Wilcox, J. N., Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Gordon, D. and Schall, T. J. (1994). *Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques*. **J Atheroscler Thromb** 1 Suppl 1: S10-3.
- Wu, Y., Tewari, M., Cui, S., Rubin, R. (1996). *Activation of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits tumor necrosis factor-induced cell death*. **J Cell Physiol** 168(3): 499-509.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1973). *Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex*. **J Pathol** 111(4): 255-61.
- Yuan, C., Zhang, S. X., Polissar, N. L., Echelard, D., Ortiz, G., Davis, J. W., Ellington, E., Ferguson, M. S. and Hatsukami, T. S. (2002). *Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke*. **Circulation** 105(2): 181-5.

7. Danksagung

Mein Dank gilt in besonderem Maße Herrn Prof. Dr. M. Sitzer. Als Leiter der „Arbeitsgruppe Vaskuläre Neurologie“ der Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum Frankfurt am Main hat er mich für die Arbeit an diesem interessanten und spannenden Thema begeistert und mich durch anregende Diskussionen sowie durch inhaltliche und organisatorische Ratschläge in der Umsetzung dieser Arbeit begleitet.

Dank sage ich Herrn Prof. Dr. Steinmetz dafür, dass ich in seiner Klinik als Student und Doktorand viel Neurologie erleben und verstehen lernen konnte. Ausdrücklich danke ich Herrn Dr. Frank Trostdorf, der mir jederzeit mit Rat und Tat helfend zur Seite stand und insbesondere die Durchführung der histologischen Arbeiten unterstützte.

Für die freundliche Unterstützung und Mithilfe bei der Gewinnung der hervorragend präparierten Karotisplaques, bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stelter und Herrn Prof. Dr. Schmitz-Rixen und ihren chirurgischen Teams. In der gefäßchirurgischen Abteilung von Herrn Prof. Dr. Schmitz-Rixen durfte ich während meines Praktischen Jahres zwei Monate wertvolle Einblicke in die Vorgehensweise und Techniken der Gefäßchirurgie sammeln. Mein Dank gilt ebenso Frau Prof. Dr. Dimmeler, die diese Arbeit technisch und methodisch unterstützte.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Hennerici für seine Unterstützung und die Gewährung von Freiräumen zur Fertigstellung der Arbeit.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mir durch ihren Zuspruch immer wieder viel Mut gemacht haben, mein Ziel zu verfolgen.

8. Lebenslauf

Persönliche Information:

Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Alter: 29 Jahre
 Geburtsort: Hermeskeil
 Eltern: Dieter Kablau, Realschullehrer; Margrit Kablau, Kinderkrankenschwester

Schule:

1982-1995 Besuch der Grundschule und des Gymnasiums in Hermeskeil
 30.06.1995 Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Ersatzdienst:

03.07.1995 - 31.07.1996 Ausbildung zum Rettungssanitäter und Zivildienst beim DRK Wadern

Studium:

WS 1996/97 - WS 1998/99 Studium der Medizin an der Universität Rostock
 06.04.1999 Physikum in Rostock
 SS 1999 - WS 2002/2003 Studium der Medizin an der JWG-Universität Frankfurt
 19.04.2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Approbationsprüfung
 12.04.2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Approbationsprüfung
 April 2002 bis März 2003 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Frankfurt
 04.06.2003 Abschluss des Studiums mit Ärztlicher Approbation

Beruf:

Seit August 2003 Arzt im Praktikum und Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik am Universitätsklinikum Mannheim der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim

Mannheim, 20.12.2005

9. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel „Verhältnis zwischen Anzahl und Apoptoserate glatter Gefäßmuskelzellen und Morphologie stabiler und instabiler atherosklerotischer Plaques der A. carotis interna“ in der Klinik für Neurologie unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Sitzer mit Unterstützung insbesondere bei der Durchführung der histologischen Arbeiten durch Herrn Dr. med. F. Trostdorf ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht: „European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2005 May;29(5):528-35“

Micha Kablau