

Chirurgische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
Abteilung für Gefäßchirurgie
(Univ.-Prof. Dr. H.-H.G.U. Eckstein)

***Pregnancy-associated plasma protein A und Perilipin als
Marker für die Plaquestabilität der Arteria carotis mittels im-
munhistochemischen Analysen an Operationspräparaten***

Nicole Pfäffle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H.-H.G.U. Eckstein
2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 30.6.2008 bei der Technischen Universität München einge-
reicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.6.2009 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Epidemiologie zerebraler Durchblutungsstörungen.....	7
1.2	Definition und Ätiologie der Carotisstenose sowie deren klinische Auswirkungen	8
1.2.1	Stadieneinteilung extrakranieller Carotisstenosen.....	8
1.2.2	Indikationen zur Behandlung der Carotisstenose.....	9
1.3	Pathophysiologie der zerebralen Ischämie.....	11
1.4	Die arteriosklerotische Plaque, Entwicklung und Ruptur.....	11
1.4.1	Pathogenese der Arteriosklerose.....	11
1.4.2	Die instabile Plaque.....	14
1.4.3	Die Pathophysiologie einer Plaqueruptur.....	15
1.5	Detektionsmöglichkeiten einer instabilen Plaque.....	16
1.5.1	Marker zur nicht invasiven Beurteilung der Plaquestabilität.....	16
1.5.2	Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A).....	16
1.5.3	Perilipin.....	18
1.6	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	19
1.6.1	Hypothesen.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Studiendesign.....	21
2.1.1	präoperative Datenerhebung und klinische Evaluation.....	21
2.1.2	Ein- und Ausschlußkriterien.....	21

2.2	Thrombendarterektomie und Aufarbeitung der arteriosklerotischen Plaques aus der A. carotis.....	22
2.2.1	Präparatentnahme.....	22
2.2.2	Zuschnitt der Präparate in Blöcke.....	22
2.2.3	Fixierung und Paraffineinbettung der Präparate.....	23
2.2.4	Herstellung der Schnittpräparate.....	24
2.3	Immunhistochemie.....	24
2.3.1	Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB) – eine indirekte Detektionsmethode.....	24
2.3.2	Durchführung und Arbeitsprotokoll der Immunhistochemischen Schnittfärbungen.....	25
2.4	Histomorphometrischen Analysen.....	28
2.5	Statistische Auswertung.....	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Deskriptive Statistik – Patientenkollektiv.....	36
3.2	Histologische Charakterisierung.....	37
3.2.1	Morphologische Charakterisierung nach der AHA-Klassifikation.....	37
3.2.2	Flächenanalyse der Plaques in den einzelnen histologischen Schnitten.....	39
3.2.3	Charakterisierung von PAPP-A und Perilipin.....	39
3.2.4	Die Auswirkung von PAPP-A und Perilipin auf die Stabilität einer Plaque.....	46
3.3	Klinische Charakterisierung.....	53
3.3.1	Die Auswirkung der Atheromqualität auf die klinische Neurologie.....	53
3.3.2	Die Fläche der Atherome und deren Auswirkung auf die klinische Neurologie.....	58

3.3.3	PAPP-A und Perilipin in Korrelation mit der klinischen Neurologie.....	60
4	Diskussion.....	66
4.1	Material und Methoden.....	67
4.1.1	Immunhistochemie.....	67
4.1.2	Morphometrische Vermessung mittels Sigma Scan.....	67
4.2	Diskussion des Patientenkollektiv.....	68
4.3	Diskussion des Ergebnisse.....	69
4.3.1	Die Auswirkung von Plaqueatheromen als Faktoren der Plaqueinstabilität auf die neurologische Symptomatik...	69
4.3.2	Makrophagen und Schaumzellen als Zeichen zellulär aktiver inflammatorischer Entzündungsvorgänge innerhalb arteriosklerotischer Plaques der A. carotis und deren Einfluss auf die Plaquestabilität.....	72
4.3.3	PAPP-A als potentieller indirekter Marker für Plaquestabilität arteriosklerotischer Plaques in der A. carotis.....	75
4.3.4	Die diagnostische Bedeutung von PAPP-A als Marker instabiler arteriosklerotischer Plaques.....	78
4.3.5	Die prädiktive Bedeutung von PAPP-A zur Aussage von cerebrovaskulären Ereignissen.....	80
4.3.6	Perilipin als potentieller indirekter Marker für die Plaquestabilität arteriosklerotischer Plaques in der A. carotis.....	81
4.3.7	Ausblick.....	85
5	Zusammenfassung.....	87
6	Literaturverzeichnis.....	90
7	Danksagung.....	101

Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
ACS	Acute Coronary Syndrom
AHA	American Heart Association
AICS	Acute Ischemic Cerebrovascular Syndrome (AICS)
ASS	Acetylsalizylsäure
CEA	Carotid Endarterectomy
CSA	Cross Section Area
CTA	CT-Angiographie
DGG	Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie
DSA	digitale Subtraktionsangiographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZM	extrazelluläre Matrix
HE	Hämatoxylin Eosin Färbung
hsCRP	hochsignifikantes C-reaktives Protein
HSL	hormone-sensitive lipase
HRP	horse Reddich-Peroxidase
IGF	insulin-like growth factor
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density-Lipoprotein
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode
MBP	Major basic protein
MCP-1	Chemokin Monocyte-Chemoattractant-Protein-1
MMPs	Matrix metalloproteinase
MRA	Magnetresonanzangiographie
NASCET	North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial
PAPP-A	pregnancy-associated plasma protein-A
PRIND	prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit
TEA	Thrombendarterektomie
TIA	transitorisch ischämische Attacke
v.G.	van Giesson Färbung

1. Einleitung

Der Schlaganfall ist einer der häufigsten lebensbedrohenden neurologischen Erkrankungen der westlichen Industrieländer. Laut der Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes dieser Länder steht der Schlaganfall nach den malignen Erkrankungen und den ischämischen Herzerkrankungen an dritter Stelle.

1.1 Epidemiologie zerebraler Durchblutungsstörungen

Nach Angaben des Erlanger Schlaganfallregisters (Stand 01.06.2005) beträgt die jährliche Schlaganfallinzidenz in der Gesamtbevölkerung in der BRD 182 / 100.000 Einwohner. Hochgerechnet bedeutet dies, dass sich in Deutschland unter 82,5 Millionen Einwohnern rund 150.000 neue Schlaganfälle jährlich ereignen. Zu den neu aufgetretenen Fällen müssen zusätzlich noch rund 15.000 Rezidivfälle innerhalb des ersten Jahres hinzugezählt werden. Demnach ereignen sich in Deutschland insgesamt rund 165.000 Schlaganfälle jährlich. Männer sind häufiger von einem Schlaganfall betroffen als Frauen. Die Schlaganfall bedingte Mortalität liegt bei 37% innerhalb des ersten Jahres nach dem Ereignis. Dies hat zur Konsequenz, dass von 165.000 Schlaganfallpatienten rund 66.000 innerhalb des ersten Jahres sterben.

Von den rund 100.000 Schlaganfallpatienten, die das erste Jahr überleben, sind insgesamt 64.000 pflegebedürftig und auf fremde Hilfe angewiesen, 15% müssen am Ende des ersten Jahres in Pflegeeinrichtungen versorgt werden. Damit beansprucht der Schlaganfall bereits beträchtliche Summen des Gesundheits-Etats (65). Wirft man einen Blick auf den zukünftigen Entwicklungsprozess bezüglich der Altersverschiebung in unserer Gesellschaft, so zeichnet sich eine bedenkliche Prognose ab. Angenommen die Schlaganfallinzidenz bliebe bis zum Jahr 2050 ungefähr konstant, käme es zu einem Anstieg von derzeit 24% auf 38% der Gesamtbevölkerung. Die damit einhergehende finanzielle Mehrbelastung für unser Gesundheitssystem wäre enorm.

1.2 Definition und Ätiologie der Carotisstenose sowie deren klinische Auswirkungen

Die Carotisstenose ist eine Erkrankung der zweiten Lebenshälfte. Die Prävalenz relevanter Stenosen liegt in der älteren Bevölkerung bei 3%, dabei entsteht die Verengungen der extracraniellen A. carotis interna („Carotisstenose“) in >90% der Fälle arteriosklerotisch. Bevorzugte Lokalisationen sind der Carotisbulbus und der Abgangsbereich der A. carotis interna. Seltene Ursachen extracranieller Carotisstenosen sind die fibromuskuläre Dysplasie (FMD), Carotidisdissektionen, radiogene Carotisläsionen und höhergradige Rezidivstenosen nach zuvor erfolgter operativer Carotidesobliteration. Risikofaktoren sind ein höheres Lebensalter, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus und Hyperlipoproteinämie.

Bei vielen Patienten zeigen sich Verengungen der Halsschlagader häufig zunächst asymptomatisch, werden aber vielfach symptomatisch im Sinne von transitorisch ischämischen Attacken oder permanenten Schlaganfällen, welche in ca. 40% der Fälle tödlich verlaufen (72).

1.2.1 Stadieneinteilung extrakranieller Carotisstenosen

Traditionell wurden in Deutschland Carotisstenosen nach der Vollmar Klassifikation eingeteilt. Diese orientiert sich an der klinischen Symptomatik im ipsilateralen Stromgebiet der jeweiligen Carotisstenose (112). 1998 wurde diese Klassifikation durch die DGG überarbeitet und modifiziert. Diese vereinfachte Stadieneinteilung der Carotisstenosen war daraufhin im deutschsprachigen Raum als Leitlinie gültig (29).

Zunehmend aufkommende Fragestellungen im klinischen Alltag erforderten eine erneute Überarbeitung der Klassifikation extrakranieller Carotisstenosen. Dabei wurde insbesondere Wert gelegt auf eine exakte zeitliche Definition einer asymptomatischen Stenose, eine Differenzierung der reversiblen Ischämie, die exaktere Quantifizierung eines zum Operationszeitpunkt noch bestehenden neurologischen Defizits und eine klare Definition möglicher Indikationen zur notfallmässigen Desobliteration. Vor dem Hintergrund dieser Kriterien und evidenzbasierter Daten erstellen Eckstein und Allenberg 2001 die aktuell gültige Klassifikation extrakranieller Carotisstenosen. Diese orientiert sich an den Empfehlungen der AHA, an den Ergebnissen der prospektiv-randomisierten Studien (s.h. Kapitel 1.2.2) zur Carotis-TEA sowie einer besseren Differenzierung neurologisch instabiler Patienten (31,32).

Tabelle 1

Klassifikation extrakranieller Carotisstenosen

Stadium	Klinik/Symptomatik
Stadium I	Asymptomatische Carotisstenose
IA	Asymptomatische Stenose ohne hochgradige kontralaterale Carotisstenose oder kontralateralem Verschluss
IB	Asymptomatische Stenose mit hochgradiger kontralateraler Carotisstenose oder kontralateralem Verschluss
Stadium II	Symptomatische Carotisstenose: ipsilaterales transientes Defizit innerhalb der letzten 6 Monate
IIA	Amaurosis fugax
IIB	Reversible Hemisphären-Symptomatik innerhalb von 24h (TIA)
Stadium III	Indikation zur Notfall-Carotis-TEA
IIIA	Crescendo-TIA
IIIB	Progredienter/akuter Apoplex
Stadium IV	Symptomatische Carotisstenose: Ipsilateraler Apoplex innerhalb der letzten 6 Monate
Rankin 0	Apoplex mit vollständig reversiblen neurologischem Defizit (länger als 24h = PRIND)
Rankin 1	Apoplex mit funktionell irrelevantem Defizit
Rankin 2	Leichter Apoplex mit funktionell geringradigem Defizit und/oder leichter Aphasie
Rankin 3	Mittelschwerer Apoplex mit deutlichem Defizit jedoch erhaltener Gehfähigkeit und/oder mittelschwerer Aphasie
Rankin 4	Schwerer Apoplex, Gehen nur mit Hilfe möglich und/oder komplette Aphasie
Rankin 5	invalidisierender Apoplex: Patient ist bettlägrig bzw. rollstuhlpflichtig

Tabelle 1 zeigt die modifizierte Klassifikation extrakranieller Carotisstenosen nach Eckstein und Allenberg unter Berücksichtigung der Stadieneinteilung nach Vollmar, der klinischen Symptomatik und der modifizierten Rankin-Skala.

1.2.2 Indikationen zur Behandlung der Carotisstenose

Aufgrund der Durchführung prospektiv randomisierter Multi-Center-Studien (NASCET/ECST) lassen sich evidenzbasierte Indikationen zur Carotidesobliteration definieren (3,10). 1995 und 1998 definierte die American Heart Society (AHA) vor dem Hintergrund dieser Daten und weiterer nicht-randomisierter Studien (ACAS/ACST) (35,111) das Indikationspektrum zur Carotidesobliteration für symptomatische und asymptomatische Carotisstenosen, welche differenziert dargestellt und in jeweils 4 Gruppen unterteilt wurden. Unter Berücksichtigung bestimmter Obergrenzen periopera-

1.3 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Die chronologische Abfolge neurologischer Ereignisse in Kombination mit dem allgemeinen Operationsrisiko des Patienten, sowie das Ausmaß der Lumenreduktion (Stenosegrad) sind derzeit die einzig bekannten Kriterien zur Stratifizierung des Schlaganfallrisikos.

Der typische instabile, rupturgefährdete Plaque obstruiert jedoch weniger als 50% des Gefäßlumens, größere Plaques sind im Allgemeinen stabiler, enthalten weniger aktive Entzündungsvorgänge und sind von einer dicken fibrösen Kappe bedeckt (45,88). Zahlreiche Studie konnten weiterhin zeigen, dass nicht die Okklusion des Gefäßlumens der A. carotis sondern vielmehr die arterio-arterielle Embolie aus arteriosklerotisch rupturierten Läsionen pathophysiologisch die häufigste Ursache für passagere oder irreversible cerebrale ischämische Symptome darstellt (13,46,85,92,100,110,113). Die Thromben dieser Mikroembolien stammen aus arteriosklerotischen Plaques, bevorzugt im Bereich der A. carotis interna bzw. der Carotisbifurkation, die aufgrund ihrer morphologischen Komposition den gegebenen mechanischen Belastungen nicht mehr Stand halten können und infolgedessen einem hohen Rupturrisiko unterliegen. Eine solche Plaque wird als instabil bezeichnet.

Die Evaluierung der Plaquemorphologie als Ausdruck der Plaqueinstabilität bzw. -Vulnerabilität ist demzufolge zur individuellen Risikoeinschätzung sowohl beim Spontanverlauf asymptomatischer als auch symptomatischer Carotisstenosen in Kombination mit Stenosegrade, klinischer Neurologie und perioperativem Risiko von großem Nutzen und Wert.

1.4 Die arteriosklerotische Plaque, Entwicklung und Ruptur

1.4.1 Pathogenese der Arteriosklerose

Die Hypothesen zur Entstehung der Arteriosklerose haben sich in den letzten Jahrzehnten grundlegend gewandelt. Während wir früher annahmen, dass der arteriosklerotische Prozess im Wesentlichen in der Ablagerung von Lipiden und Lipoproteinen in der Gefäßwand besteht, wissen wir heute, dass Arteriosklerose als ein hochkomplexer, aktiver Prozess betrachtet werden muss und wesentlich durch eine inflammatorische Reaktion in der Gefäßwand charakterisiert ist (72).

Die frühe Phase der Atherogenese ist gekennzeichnet durch die so genannte endotheliale Dysfunktion. Eine Reihe unterschiedlicher Risikofaktoren wie z.B. Nikotinkonsum, Übergewicht, körperliche Inaktivität, Hyperlipoproteinämie und Typ 2 Diabetes

sowie andere, bislang noch nicht identifizierte Faktoren, führen zu einer Schädigung des Endothels wodurch die Permeabilität des Endothels für Lipoproteine und andere zirkulierende Stoffe im Plasma zunimmt. In der Folge werden Endothelzellen aktiviert und exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle, die den Kontakt von Monozyten und T-Lymphozyten mit dem Endothel vermitteln (Abb.1) (72). Insbesondere an Gefäßbifurkationen – den Stellen, an denen gehäuft arteriosklerotische Läsionen entstehen – spielen zudem mechanische Kräfte eine Rolle. Im weiteren Verlauf entsteht der frühe arteriosklerotische Plaque. Dabei dringen vor allem Monozyten in den subintimalen Raum ein (72). Dies wird durch eine andere Gruppe von Molekülen (MCP-1) vermittelt (52). Es kommt zur Differenzierung in Makrophagen und nach Lipidbeladung entstehen Schaumzellen, die charakteristischen Zellen der arteriosklerotischen Plaque (72).

Abbildung 1

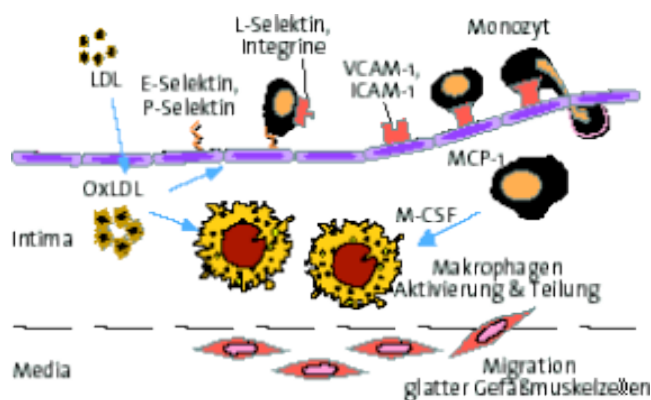


Abbildung 1 zeigt die synoptische Darstellung der Atherogenese

Quelle: Arteriosklerose als inflammatorischer Prozess Dr. med. Armin Imhof, Prof. Dr. med. Wolfgang Koenig, <http://www.cardiovasc.de/hefte/2003/07/30.htm>

Im Rahmen dieses Differenzierungsprozesses setzen die lipidbeladenen, eingewanderten Makrophagen vermehrt proinflammatorische Zytokine, Chemokine sowie Metalloproteinasen frei. Diese „inflammatorische“ Umgebung aktiviert glatte Muskelzellen in der Gefäßwand. Sie wandern aus der Media in die entstehende intimale Läsion – ein weiterer entscheidender Schritt in der Atherogenese – und teilen sich dort weiter (Abbildung 1) (72). Glatte Muskelzellen, aktivierte T-Lymphozyten sowie Schaumzellen reagieren auf Botenstoffe und sind in der Lage, diese zu bilden und auszuschütten (z.B. Metalloproteinasen) (52). Mit ihren aktiven zellulären Leistungen dominieren diese Zellpopulationen damit das histomorphologische Bild des arteriosklerotischen Plaques (Ab-

bildung 2) und pagen in Abhängigkeit von den protektiven Leistungen der Endothelzellen das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Progredienz einer arteriosklerotischen Läsion (16).

Abbildung 2

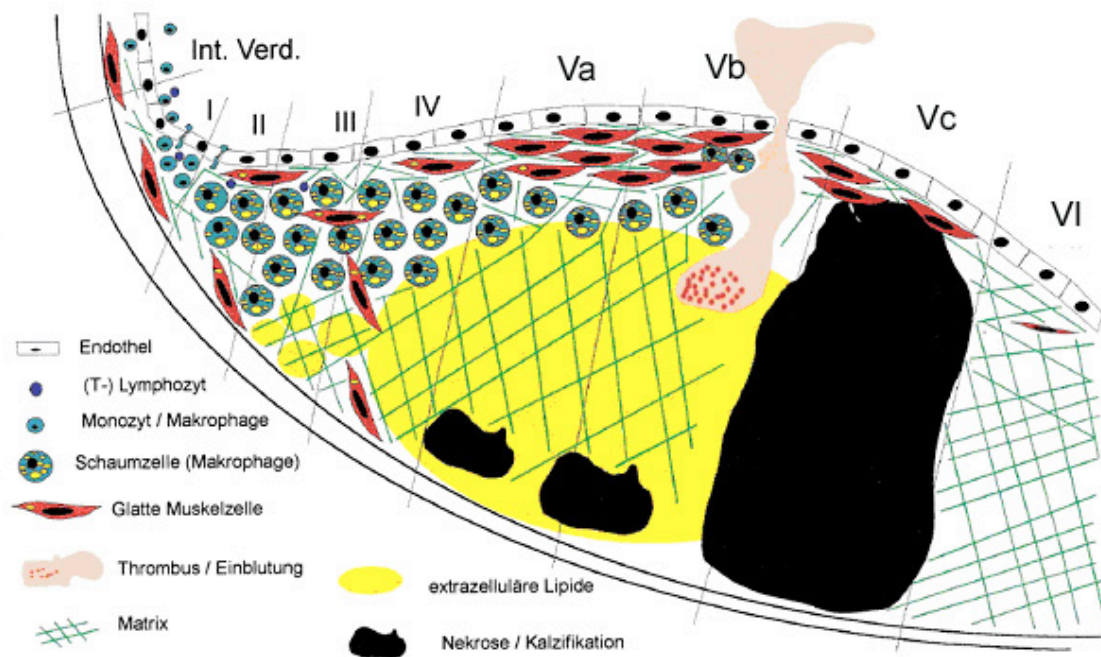


Abbildung 2 zeigt die zelluläre Zusammensetzung einer Plaque unter Berücksichtigung der STARY –Klassifikation

Quelle: J.H. Bräsen · A. Niendorf · Institut für Pathologie der Universität Hamburg Arteriosklerose Formale Pathogenese, Klassifikation und funktionelle Bedeutung; Pathologie 1997 · 18:218–227 Springer-Verlag 1997

Zu Schaumzellen transformierte Makrophagen und T-Lymphozyten akkumulieren in der wachsenden Läsion. Sind Schaumzellen mit oxidierten Lipiden (LDL) überladen entwickelt sich innerhalb der Intima ein Praeatherom, Atherom und schliesslich ein Fibroatherom. Gleichzeitig wandern weitere glatte Muskelzellen ein und bilden zusammen mit extrazellulärer Matrix eine fibröse Kappe, die das zirkulierende Blut und die arteriosklerotische Plaque voneinander trennt (97).

Das klinisch manifeste Stadium der arteriosklerotischen Läsion ist die komplizierte Läsion. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch Plaquekomplikationen wie Einblutung, intramurale Thrombusbildung, Kalzifikation und Plaqueruptur.

1.4.2 Die instabile Plaque

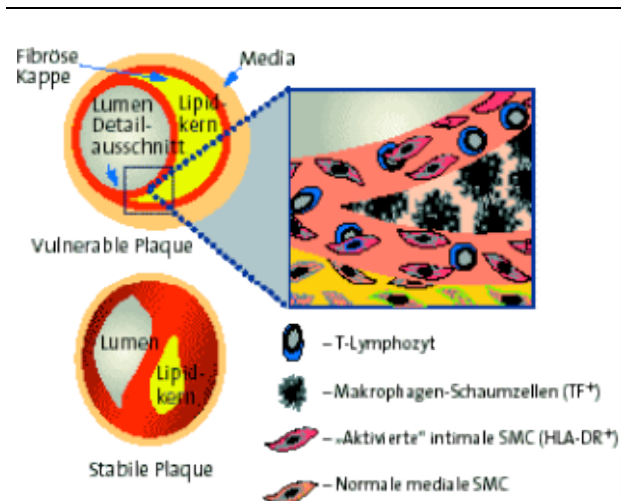
Eine verminderte Bildung von extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen und deren vermehrtem Abbau durch degradierende Enzyme hat zur Folge, dass eine stabile Plaque instabil werden kann.

Makrophagen und Schaumzellen besitzen die Fähigkeit extrazelluläre Matrix im Rahmen phagozytotischer Vorgänge oder durch Sekretion proteolytischer Enzyme, wie Plasminogenaktivatoren oder Matrixmetalloproteinasen (MMP) abzubauen (44,70,87,103).

Glatte Muskelzellen antagonisieren diesen Effekt durch Induktion von extrazellulärer Matrixbildung und Kollagensynthese sowie durch Inhibition matrixabbauender Enzyme.

Aktiviert T-Lymphozyten innerhalb der Plaques produzieren Interferon- γ , welches eine stimulierende Wirkung auf Makrophagen (Metalloproteinasen) hat und die Proliferation glatter Muskelzellen und damit die Kollagensynthese hemmt (1). Das Ungleichgewicht zwischen verminderter Bildung und vermehrtem Abbau der extrazellulären Matrix führt zu einem Circulus Vitiosus und einer zunehmenden Ausdünnung der fibrösen Kappe (Abbildung 3) (71,77). Eine instabile Plaque entsteht.

Abbildung 3



Verminderte Bildung und verstärkter Abbau der extrazellulären Matrix führen zur Ausdünnung der fibrösen Kappe mit konsekutiver Plaquestabilität und drohender Rupturgefahr.

Quelle: Arteriosklerose als inflammatorischer Prozess, Dr. Med. Armin Imhof, Prof. Dr. Med. Wolfgang Koenig, <http://www.cardiovasc.de/hefte/2003/07/30.htm>

1.4.3 Pathophysiologie einer Plaqueruptur

Im Zuge der unter 1.4.2 beschriebenen Entwicklung der instabilen Plaque kann die fibröse Kappe unter dem Einfluss von Scherkräften aufreißen. Neben den passiven Phänomenen der Plaqueruptur werden derzeit auch sogenannte aktive Phänomene diskutiert, die in Zusammenhang mit Makrophagenaktivität und Entzündungsvorgängen stehen (103). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass sich Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen vermehrt in der Schulter arteriosklerotischer Plaques finden. Dies sind Stellen, an denen es gehäuft zu Fissuren und Rupturen kommt (71). Der direkte Nachweis einer verminderten Reißfestigkeit der fibrösen Kappe bei erhöhtem Makrophagengehalt gelang durch Lendon et al (69). Der thrombogene Lipidkern der Plaque und Kollagen in der Gefäßwand werden freigelegt, die Aktivierung des Hämostasesystems führt daraufhin zu okkludierenden oder nicht okkludierenden Thrombembolien (71). Klinisch manifestiert sich die Plaqueruptur mit Thrombusformation je nach Ausmaß des embolischen Ereignisses in Form einer cerebralen Ischämie mit funktionellem Defizit (Tabelle 3).

Tabelle 3

<p>Strukturell: Lipidreicher Kern, dünne fibröse Kappe, reduzierter Kollagengehalt</p> <p>Zellulär: Lokale chronische Entzündungen, erhöhte Makrophagedichte und -aktivität, T-Lymphozyten-Akkumulation an rupturgefährdeten Stellen, erhöhte Neovaskularisation, reduzierte Dichte glatter Muskelzellen, erhöhte Zahl und Aktivität von Mastzellen, Expression von Markern der Entzündungsaktivierung</p> <p>Molekular: Matrixmetalloproteinasesekretion, erhöhte Tissue-Faktor-Expression</p>
--

Tabelle 3 fasst die Merkmale rupturgefährdeter Plaques zusammen

1.5 Detektionsmöglichkeiten einer instabilen Plaque

1.5.1 Marker zur nicht invasiven Beurteilung der Plaquestabilität

Eine instabile Plaque in einem noch frühen Stadium nicht invasiv und vor einem akuten klinischen Ereignis zu detektieren, ist von zentralem Interesse heutiger Arterioskleroseforschung.

Es konnte gezeigt werden, dass nicht der Stenosegrad ausschlaggebend für ein erhöhtes Risiko einer Plaqueruptur und folgender Thrombosierung ist, sondern vielmehr der histomorphologische Aufbau des Plaques entscheidend ist (20,21,105). Wie bereits mehrfach in Studien belegt werden konnte, spielen Entzündungsvorgänge in der Pathogenese der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle (2,12,15,17,39,43,74,90). Rupturierte Plaques in Koronargefäßen haben gezeigt, dass sie vermehrt Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und Schaumzellen enthalten und sich durch diese histomorphologischen Ausprägungen vom stabilen Plaque unterscheiden (38,103). Es wurden bereits mehrere Marker postuliert, um eine Plaquestabilität zu identifizieren. So wurden erhöhte Werte an hochsignifikantem C-reaktivem Protein (hsCRP) an arteriosklerotisch verengten Koronargefäßen und späten Plaquestadien der A. carotis gemessen. Serum Matrix Metalloproteinasen (MMPs), werden vor allem durch verschiedene Stimuli von Makrophagen produziert und sind ebenfalls in arteriosklerotischen Läsionen exprimiert. Metalloproteinasen sind potentielle Marker für Instabilität (9,75,76).

In der vorliegenden Studie haben wir zwei weitere potentielle Instabilitätsmarker näher untersucht. Pregnancy-associated-plasma-protein-A (PAPP-A) und Perilipin.

1.5.2 Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A)

Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) ist eine hochmolekulare, Zink bindende Metalloproteinase, die von aktivierten Makrophagen, Fibroblasten, Osteoblasten, Gefäßmuskelzellen und ovariellen Granulosazellen gebildet wird. Normalerweise wird PAPP-A in der Schwangerschaft im mütterlichen Blut bestimmt, um ein fetales Down Syndrom zu diagnostizieren. Dieses PAPP-A wird von Syncytiotrophoblasten exprimiert und unterscheidet sich von dem PAPP-A welches von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und aktivierten Makrophagen produziert wird und in arteriosklerotischen Läsionen gefunden werden kann. PAPP-A welches in Schwangerschaften gemessen wird, zirkuliert in einer heterotetramerschen Form, gebunden an seinen endogenen Inhibitor pro MBP (proform of the eosinophil major basic protein). Anders verhält sich

PAPP-A welches aus arteriosklerotischen Plaques stammt, es zirkuliert in einer homodimerischen Form und ist an keinen Inhibitor gebunden. Daher ergeben sich keine Interferenzen und speziell entwickelte Immuntest können so mit hoher Spezifität und Sensitivität die verschiedenen PAPP-A Typen im Serum differenzieren (7,93).

Physiologischerweise lässt sich PAPP-A in Frauen und Männern nachweisen. Es ist in fortgeschrittenen arteriosklerotischen Plaques vorhanden und trägt zur Bildung eines speziellen Aktivators, des insulin-like growth factors (IGF-1) bei (67,68).

IGF-1 fördert seinerseits den Aufbau extrazellulärer Matrix sowie die Destabilisierung der fibrösen Kappe (7,28). Der Zusammenhang zwischen PAPP-A und IGF-1 wurde erst kürzlich beschrieben (21). IGF bindet an den Typ 1 IGF Rezeptor (IGF-IR) und wird durch eine Gruppe von 6 high-affinity IGF binding proteins (IGFBP-1 to -6) über endokrine, autokrine und parakrine Mechanismen gesteuert. PAPP-A spaltet IGF binding protein 4 (IGFBP-4) welches auf IGF-1 normalerweise inhibierend wirkt. Weiterhin ist PAPP-A in der Lage, die Expression von freiem IGF-1 zu stimulieren. IGF-1 induziert die Makrophagenaktivierung und LDL-Aufnahme, die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen bewirkt (57,95) und letztendlich die Degradation von Fibrozyten in der fibrösen Kappe, was die Plaqueruptur fördert. Weiterhin unterstützt IGF-1 die Bildung von extrazellulärer Matrix und trägt somit zur Plaquergrößerung bei (Abbildung 4).

Abbildung 4

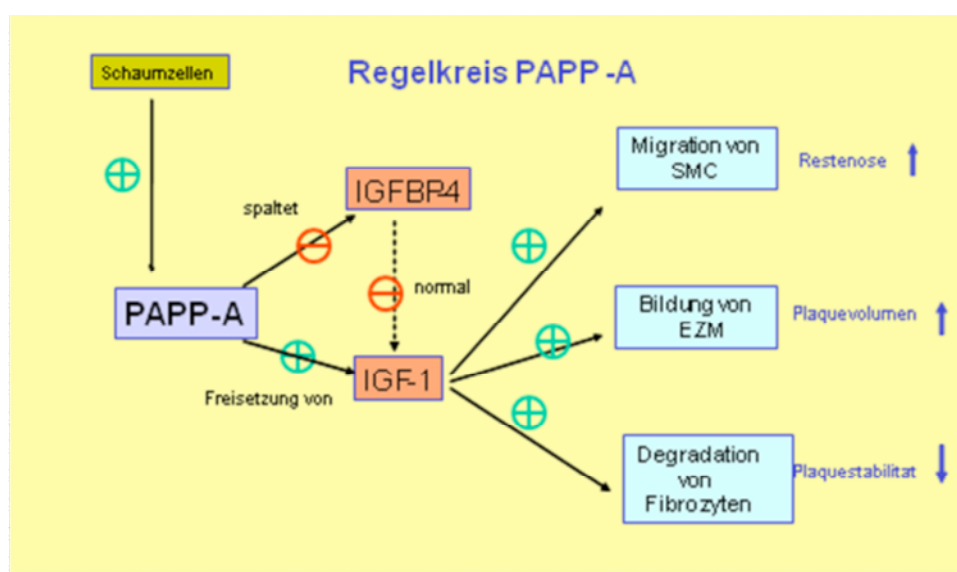


Abbildung 4 zeigt den Regelkreis von Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A)

Bayes-Genis et al konnten zeigen, dass PAPP-A reichlich in rupturierten und instabilen koronaren Plaques von Patienten vorhanden ist, welche plötzlich an einem akuten koronaren Ereignis verstorben waren (6). Es konnte belegt werden, dass sich PAPP-A nicht nur als ein unabhängiger Marker für das Vorhandensein und die Ausprägung der Arteriosklerose eignet (25), sondern dass PAPP-A sich auch als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse bei kardialen Hochrisikopatienten eignet (56). Zur zellulären Expression von PAPP-A in arteriosklerotischen Plaques der A. carotis und ob diese Proteinase ein Marker für Plaqueinstabilität darstellt, ist wenig bekannt.

1.5.3 Perilipin

Perilipin ist ein Phosphoprotein bei Säugetieren und Menschen, welches die Oberfläche der Lipidtropfen in Fettzellen und Steroidzellen umhüllt. Unphosphoryliertes Perilipin schützt den Lipidkern vor dem fettverbrennenden Enzym hormone-sensitive lipase HSL. Perilipin hemmt dadurch die Lipidhydrolyse und trägt somit wesentlich zur Akkumulation von oxidierten Lipiden im Kern bei. Neueste Studien konnten zeigen, dass phosphoryliertes Perilipin wesentlich dazu beiträgt, HSL aus dem Zytosol in den Lipidkern zu transportieren und so die Lipolyse anzuregen (Abbildung 5) (84).

Hohe Perilipin A-Level konnten vor Kurzem in Atheromen von arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (38,42). Somit besteht der Verdacht, dass Perilipin möglicherweise am Prozess der Arterioskleroseentstehung beteiligt ist, indem es die Hydrolyse der akkumulierten Lipide hemmt.

Verschiedene Untersuchungen zur selektiven Expression von Perilipin in rupturierten Plaques von Koronargefäßen scheinen auch für die Carotisstenose von Bedeutung. Die strukturellen Komponenten der fibrösen Kappe enthalten Matrixmoleküle, welche von glatten Muskelzellen stammen.

Die verstärkte Matrixdysregulation wird vorwiegend von Metalloproteinasen bewirkt, welche in der arteriosklerotischen Plaque von Makrophagen und Schaumzellen exprimiert werden. Eine gesteigerte Expression von MMP wird auch durch oxidierte Lipide katalysiert. Dies kann zur Destabilisierung der Kappenmatrix und letztlich zur Ruptur führen. So konnte in mehreren Arbeiten bereits an koronaren Plaques gezeigt werden, dass Perilipin nur in instabilen Plaques nachzuweisen ist und eine Expression an stabilen Plaques nicht vorliegt.

Abbildung 5

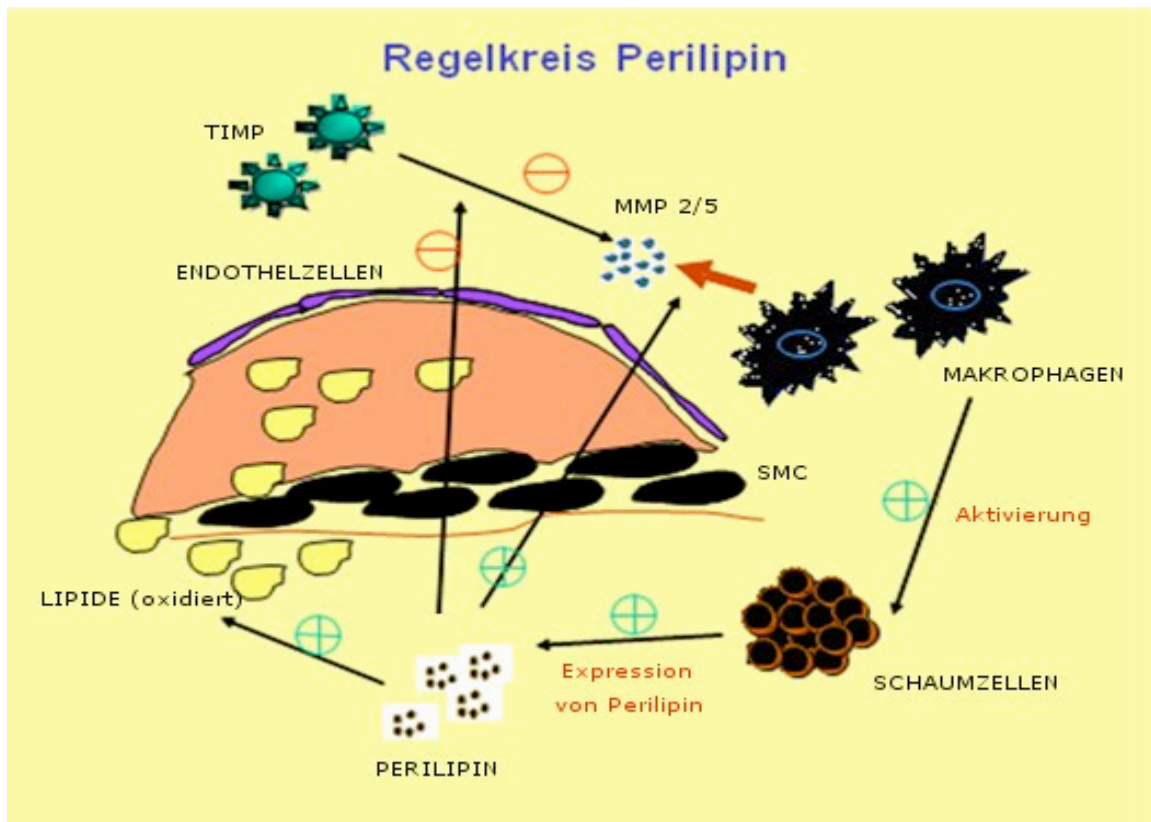


Abbildung 5 zeigt den Regelkreis von Perilipin

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der Studie ist es, die inflammatorischen Vorgänge beim stabilen bzw. instabilen Plaque durch die Einführung spezifischer Stabilitätsdeterminierender Marker wie PAPP-A und Perilipin besser einzuordnen. Dabei wurde die Expression von Perilipin und PAPP-A in den Plaques von symptomatischen und asymptomatischen Patienten nach Carotidesobliteration evaluiert.

1.6.1 Hypothesen

Zur Beurteilung der Bedeutung der o.g. Marker wurden die Plaques hinsichtlich folgender Fragestellungen untersucht.

- Korrelieren PAPP-A und Perilipin positiv mit der Stabilität bzw. Instabilität der Carotis-Plaques?
- Korrelieren PAPP-A und Perilipin mit der klinischen Neurologie der Patienten?
- Gibt es instabile morphologische Plaquekomponenten, die zuverlässig mit der klinischen Neurologie korrelieren?
- Gibt es Unterschiede zwischen PAPP-A und Perilipin bezüglich der Stabilität bzw. der klinischen Neurologie?
- Welche Unterschiede bzw. Merkmale gibt es zwischen PAPP-A und Perilipin bezüglich dem histologischen Stadium der Plaque?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

2.1.1 Präoperative Datenerhebung und klinische Evaluation

Bei der im Folgenden dargestellten Studie handelt es sich um eine experimentelle Untersuchung. Das Patientenkollektiv der Studie umfasste 17 Personen mit asymptomatischen und symptomatischen Stenosen der A. carotis. Diese unterzogen sich im Zeitraum von Juli 2004 – März 2005 im Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München einer gefäßchirurgischen Thrombendarterektomie der A. carotis (TEA). Dabei wurden arteriosklerotische Plaques von 8 Patienten entnommen, die vor Operation neurologische Symptome aufwiesen und 9 Plaques von asymptomatischen Patienten. Eine routinemässige, klinische, präoperative Evaluation aller Patienten einschließlich eines EKG, Röntgen Thorax, kleines Blutbild sowie Bestimmung der Serumelektolyte, wurde durchgeführt, um akute Infekte auszuschließen und eine weitere Blutprobe durch Venenpunktion zur Bestimmung der PAPP-A Serum Level abgenommen. Ein Patientenscreening hinsichtlich der vier Hauptrisikofaktoren für Arteriosklerose: Arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie (Serumcholesterol >240mg/dl), Nikotinabusus und Diabetes mellitus Typ II wurde erstellt. Weiterhin wurden dialysepflichtige Nierenerkrankungen erfasst und die vor stationärer Aufnahme regelmäßig eingenommene Medikation erfragt. Das Ausmaß der Lumenreduktion sowie die intrakraniellen und extrakraniellen Abgänge der A. carotis wurde durch den Stenosegrad nach den NASCET-Kriterien (1) bestimmt, mittels farbkodierter Duplexsonographie beurteilt und vorhandene Stenosen durch eine CT-Angiographie (CTA), MR-Angiographie (MRA) oder digitale Subtraktionsangiographie (DSA) bestätigt.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie eingeschlossen wurden alle Patienten mit symptomatischen und asymptomatischen Carotisstenosen vor Operation. Als symptomatisch wurden Patienten definiert, die sich innerhalb der modifizierten Einteilung extrakranieller Carotisstenosen nach Eckstein (Tabelle 1) Stadien II – IV einteilen ließen. Asymptomatische Patienten entsprachen dem Stadium I dieser Klassifikation. Über die Entnahme der Carotisplaques zur weiteren wissenschaftlichen Untersuchung wurden die Patienten aufgeklärt

und deren schriftliches Einverständnis eingeholt. Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn sie einen der folgenden Punkte erfüllten:

- KHK oder vorausgegangener Myokardinfarkt
- Vorhofflimmern, künstliche Herzklappen, persistierendes Foramen ovale, Ventrikelthromben, Mitralklappenstenose sowie Endokarditis in der Vorgeschichte, als Quelle für Emboli kardialer Ursache
- vorausgegangene kardiochirurgische Operation oder kardiologische Intervention z.B in Form eines Herzkatheters innerhalb der letzten 6 Monate vor TEA der A. carotis
- präoperative Infektionen jeglicher Genese
- Tumorerkrankungen
- Patienten, von welchen keine schriftliche Einwilligung vorlag.
- Symptome, die sich möglicherweise nicht auf ein arteriosklerotisches Geschehen zurückführen ließen (Aneurysmen, Fibromuskuläre Dysplasie)

2.2 Thrombendarterektomie und Aufarbeitung der arteriosklerotischen Plaques aus der A. carotis

2.2.1 Präparatentnahme

Bei allen Patienten wurde eine Thrombendarterektomie (TEA) der A. carotis mit Patchplastik unter Vollnarkose durchgeführt. Die Plaque wurde im Ganzen entnommen um die Plaquestruktur im Gesamten zu erhalten und sofort nach erfolgreicher Entnahme in 4% gepufferter Formalinlösung eingelegt.

2.2.2 Zuschnitt der Präparate in Blöcke

Die weitere Aufarbeitung der Carotidesobliterate erfolgte im Institut für Pathologie. Die Präparate wurden mittels EDTA entkalkt, danach erfolgte der transversale Zuschnitt der Plaquesobliterate in bis zu sechs Blöcke abhängig von der jeweiligen Plaquelänge. Die Blöcke wurden von A bis max. F durchnummeriert, dadurch konnte die Stelle innerhalb des Plaques, an welcher das Schnittpräparat entnommen wurde, später rekonstruiert werden.

Dabei galt (Abbildung 6):

A= Schnitt durch die A. carotis communis

B= Schnitt durch die Bifurkation (falls vorhanden)

C-F= Schnitte durch die A. carotis interna

Abbildung 6

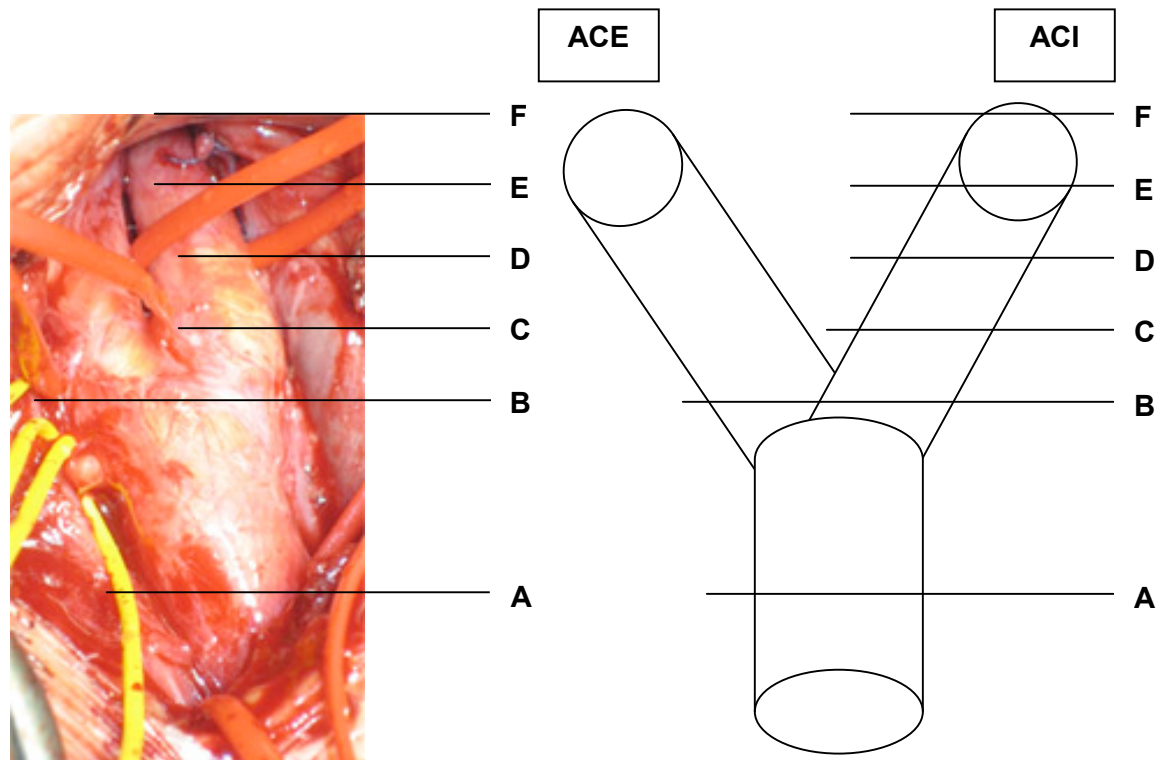


Abbildung 6 zeigt die Darstellung des Zuschnittes der Carotidesobliteration in Blöcke A-F

A =Schnitt durch die A. carotis communis, **B** = Schnitt durch die Bifurkation (wenn vorhanden) **C – F** = Schnitte durch die A. carotis interna

Quelle: Eigene Darstellung

2.2.3 Fixierung und Paraffineinbettung der Präparate

Nach Zuschneidung der A. carotis in Blöcke wurden diese in Einbettkapseln eingelegt. Über Nacht erfolgte die Fixation und Vorparaffinierung (2 Std. Formalin, ca. 5.5 Std. aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol, 2 Std. Xylol, 2 Std. Paraffinbad) im Fixierungsapparat („Pathcentre“ Fa.: Shandon).

Die Präparate wurden dann in flüssigem Paraffin (ca. 60°C) eingebettet und die so entstandenen Paraffinblöcke abgekühlt. („TBC 88 Paraffin Embedding System“:

Thermal Unit, Cool Unit, Dispenser Unit; Fa.: Medite Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Deutschland)

2.2.4 Herstellung der Schnittpräparate

Am Rotationsmikrotom („Microm HM 335 E, Fa.: Microm GmbH, 69190 Walldorf, Deutschland) wurden Gefäßquerschnitte (2-3 µm Dicke) angefertigt und im Wasserbad gestreckt („Paraffin Streckbad, TFB 35“, Medite Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Deutschland).

Es wurde eine Serie von mehreren konsekutiven Schnitten an einer Stelle innerhalb eines Paraffinblockes angefertigt. Mittels dieser Serienschnitte war es möglich, nahezu identische histologische Präparate mit unterschiedlichen immunhistochemischen Markern zu färben und vergleichend auszuwerten.

Als Vorbereitung auf die immunhistochemischen Färbungen erfolgte das Aufziehen der Schnitte auf silanisierte, mit Pritt®-Kleber Mischung (1 Teil Pritt®-Bastelkleber Fa.: Henkel, Düsseldorf, Germany und 2 Teile Poly-L-Lysine-Lösung, Fa.: Sigma Diagnostics Inc., P.O. Box 14508, St. Louis, MO, USA) bestrichene Objektträger („Super-Frost“ PLUS, Fa.: Menzel-Gläser, Deutschland).

Über Nacht wurden die Schnitte im Brutschrank bei ca. 60°C inkubiert. Zur spezifischen Darstellung spezieller histologischer Strukturen oder Zellen wurden derartig hergestellte Schnittpräparate in einem weiteren Schritt gefärbt. (s.h. Kapitel 2.4.3).

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB) – eine indirekte Detektionsmethode

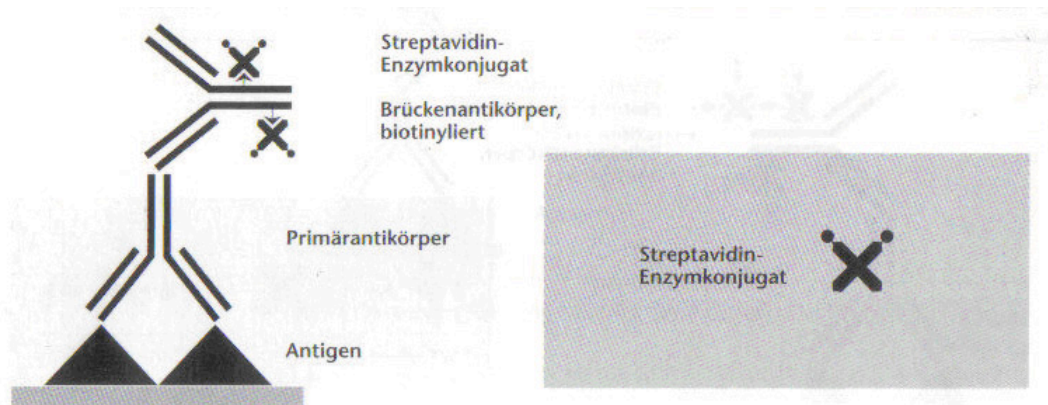
Die Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode basiert auf einer indirekten Detektionsmethode. Bedingt durch die Reaktion aus Enzym und Substrat erhält man ein farbiges Endergebnis. Die grundsätzliche Abfolge der Reagenzien lautet hierbei:

1. unkonjugierter Primärantikörper
2. biotinylierter Sekundärantikörper
3. Strept-Avidin-Biotin-Enzymkomplex bei der sog. LSAB-Methode
4. Substrat-Komplex

Der Einsatz der LSAB-Methode ist derzeit eine der spezifischsten Verfahren und durch ihre einfache Durchführung ein bevorzugtes System. Die LSAB-Methode wurde im

Rahmen der vorliegenden Untersuchung zur Detektion von Perilipin, PAPP-A und CD 68 eingesetzt (Abbildung 7)

Abbildung 7



Schema der LSAB-Methode mit Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und Streptavidin-Enzym-Komplex
Quelle: Praxis der Immunhistochemie, Sabine Noll, Susanne Schaub-Kuhnen, 2000 Urban & Fischer Verlag München – Jena, 1 Auflage Oktober 2000

2.3.2 Durchführung und Arbeitsprotokoll der immunhistochemischen Schnittfärbungen

Nach Zuschneiden und Aufarbeitung der Operationspräparate (s.h. Kapitel 2.2) zu fertigen, auf Objektträger aufgezogenen Schnitten, wurden zur histomorphologischen Beurteilung Hämatoxylin/Eosin (He) und van Giesson (v.G.) Färbungen angefertigt. Da He-Färbungen sowie van Giesson-Färbungen Standardfärbungen darstellen, wird auf deren Färbetechnik hier nicht weiter speziell eingegangen.

Tabelle 4 zeigt einen Überblick über die verwendete Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Detektionssysteme und Verdünnung zur immunhistochemischen Färbung von CD68, PAPP-A und Perilipin

10. Mit TRIS-Puffer (0.01 M, pH 7,6) wurde 3× gespült.
11. Im folgenden Schritt wurde der Streptavidin-Enzym (HRP)-Komplex aufgetragen. Dabei wurde für CD68, Perilipin und PAPP-A das gleiche Detection Kit-Set verwendet: (ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, Code-Nr. K 5001, Bottle B Streptavidin Peroxidase (HRP), Fa.: DAKO ChemMate, Denmark).
12. Inkubationszeit: 30 Minuten
13. Mit TRIS-Puffer (0.01 M, pH 7,6) wurde 3× gespült.
14. Danach wurde das Substrat-/Chromogengemisch aufgetragen. Dabei wurde für CD68, Perilipin und PAPP-A ebenfalls das gleiche Detection Kit-Set verwendet: (ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, Code-Nr. K 5001, Bottle C DAB+Chromogen, Fa.: DAKO ChemMate, Denmark)
15. Inkubationszeit 5 Minuten.
16. Mit TRIS-Puffer (0.01 M, pH 7,6) wurde 3× gespült.
17. Die Präparate wurden mit Hämalaun ca. 1 Min. gegengefärbt und in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Xylol schloß die Alkoholreihe ab.
18. Zum Schluss wurden die Schnittpräparate im Eindeckautomaten eingedeckt („Promounter“ RCM 2000 Coverslipping machine; Fa.: Medite 31303 Burgdorf, Deutschland) und getrocknet.

Tabelle 4

	<u>Primärantikörper</u>	<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Detektions-system</u>
<u>CD68</u>	Monoclonal Mouse Anti-Human Macrophage, CD68 Clone KP1 Code No. M, Fa.: DAKO ChemMate, Denmark	Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), biotinylated goat anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulins Fa.: DakoCytomation, Denmark	1:1000	ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, Code-Nr. K 5001, Fa.: DAKO ChemMate, Denmark
<u>Perilipin</u>	Guinea pig (polyclonal Antibody) to Perilipin Code-Nr.: RDI-PROGP29 Fa.: research diagnostic inc, Flanders, USA	Guinea pig IgG, Rabbit polyclonal to Guinea Pig IgG H&L biotin Fa.: ABCAM, Cambridge UK.	1:400	ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, Code-Nr. K 5001, Fa.: DAKO ChemMate, Denmark
<u>PAPP-A</u>	Rabbit Anti-Human, Pregnancy-Associated Plasma Protein A (PAPP-A), Code-Nr. A 0230, Fa.: DakoCytomation, Denmark	Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-Human PAPP-A, Code-Nr.: P 0042 Fa.: DakoCytomation, Denmark	1:200	ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, Code-Nr. K 5001, Fa.: DAKO ChemMate, Denmark

Tabelle 4 zeigt einen Überblick über die verwendete Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Detektionssysteme und Verdünnung zur immunhistochemischen Färbung von CD68, PAPP-A und Perilipin

2.4 Histomorphometrische Analysen

Sowohl die histomorphologische Auswertung, als auch die Beurteilung von 425 immunhistochemisch angefertigten Schnittpräparaten erfolgte am Zeiss Mikroskop. Zu Beginn der Auswertung wurden die Schnitte am Mikroskop digitalisiert und archiviert (Programm „Axio Vision“ Fa.: Zeiss, Deutschland). Bei der Auswahl des geeigneten Verfahrens zur quantitativen Erfassung der Zellzahlen von PAPP-A, Perilipin und CD68 stellte sich heraus, dass sich die immunhistochemisch gefärbten Zellen in Regionen mit hoher Akkumulation befanden, dies machte eine Gesichtsfeldauszählung unmöglich und ungenau. Um ein möglichst präzises Messergebnis zu erhalten wurden Regionen mit hoher Akkumulation an Zellen morphometrisch vermessen, am Computer wurden diese Regionen unter Vergrößerung und parallelem Mikroskopieren umfahren, die Flä-

chenwerte wurden addiert und in μm^2 angegeben (SigmaScan Pro Image Analysis Version 5.0.0, SPSS® für Windows, Release 11.0.0).

In Abbildung 8-A und -B wurde das Verfahren veranschaulicht und das Vermessen eines Cholesterin-Atheroms sowie das Erfassen von Arealen dichter Zellakkumulation dargestellt.

Dabei wurden 33 histomorphologisch und morphometrisch definierte Charakteristika dokumentiert und statistisch ausgewertet. Die Daten wurden am Zeiss Mikroskop digitalisiert und archiviert (Programm „Axio Vision“ Fa.: Zeiss, Germany). Bei entsprechender Präparatgröße wurden mehrere Einzelaufnahmen angefertigt und diese zusammengesetzt (Adobe Photoshop version 6.0). Die morphometrische Ausmessung wurde mittels Sigma Scan Image Analysis Version 5.0.0 für Windows durchgeführt. Die histologischen Auswertungen wurde von einem unabhängigen Pathologen ohne Kenntnisse der klinische Daten validiert.

Abbildung 8-A

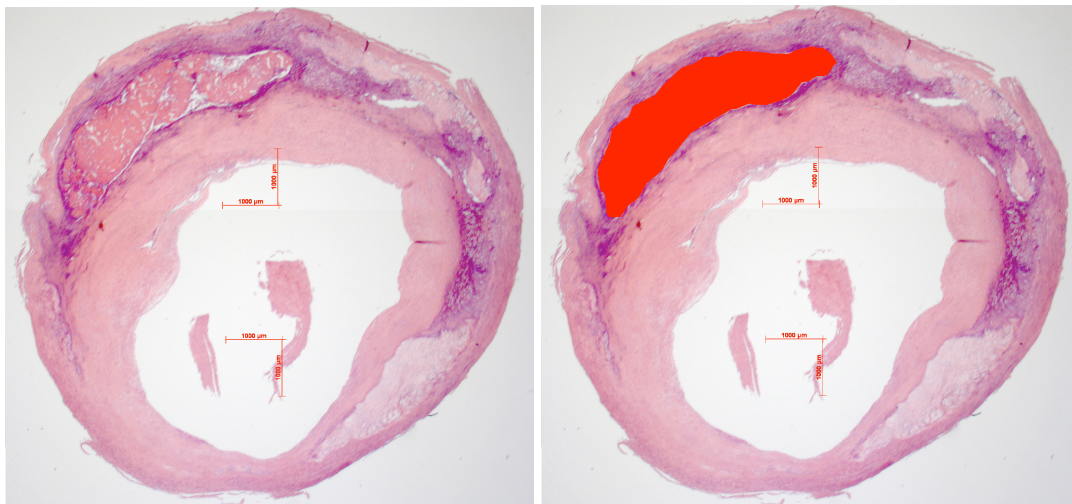


Abbildung 8-A zeigt ein Schnitt durch die A. carotis in Hämatoxylin-Eosin Färbung (He-Färbung) mit Cholesterin Atherom (rote Fläche). Dieses wurde unter mikroskopischer Kontrolle am Computer umfahren und der Flächeninhalt errechnet. In der hier abgebildeten Darstellung beträgt der

Abbildung 8-B

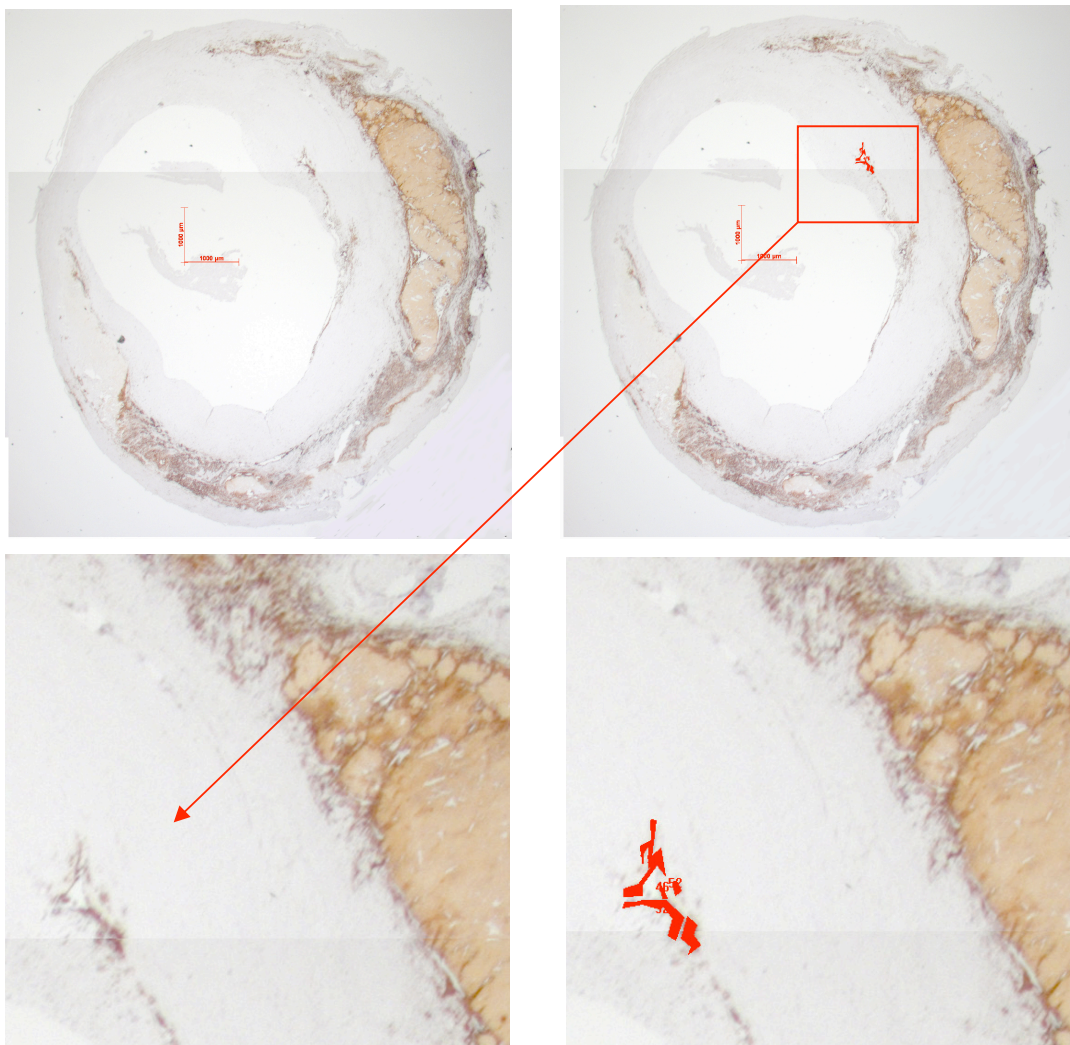


Abbildung 8-B zeigt eine Vergrößerung von Makrophagen (braun) in einer CD68 Färbung. Um verschiedene Färbungen vergleichend auszuwerten, wurde der Schnitt an der gleichen Stelle entnommen wie der HE - Schnitt in der obigen Abb. Mittels dieser Technik lassen sich einzelne zellreiche Makrophagenakkumulationen unter Vergrößerung und mikroskopischer Kontrolle am Computer erfassen und ausmessen.

Um Zusammenhänge zwischen klinischen Symptomen eines Patienten und der histologischen Beschaffenheit der Plaquezusammensetzung beschreiben zu können, wurde jegliche histologische Komponente im Aufbau eines Plaques morphometrisch erfasst und diese Komponenten in einen Zusammenhang mit der Stabilität eines Plaques und der klinischen Neurologie eines Patienten gebracht. Der Neurologie wurden die zwei Variablenausprägungen symptomatisch und asymptomatisch zugeordnet. Die Plaques wurden in stabile und instabile Plaques unterteilt.

Die spezifische Auswertung der einzelnen histologischen Schnitte wird im Folgenden erläutert.

Alle histologischen Schnitte wurden nach der American Heart Association (AHA) Klassifikation von I – VI eingeteilt. Gemeinsam mit Stary wurde von der AHA eine Klassifikation für arteriosklerotische Läsionstypen ausgearbeitet (Tabelle 5) welche mittlerweile international gebräuchlich ist. Diese Klassifikation wurde drei mal modifiziert und zuletzt im Mai 2000 aktualisiert.

Die AHA-Klassifikation bildet die Grundlage der histologischen Auswertung immunhistochemischer Färbungen in der hier vorliegenden Arbeit.

Tabelle 5

Läsionstyp	Bezeichnung	Komposition
I	Initiale Läsion	Intimale Lipoproteine und vermehrt Makrophagen
II	„Fatty streak“	Typ I + Makrophagenakkumulation / intrazelluläre Lipide
III	Präatherom	Typ II + extrazelluläre Lipidpools
IV	Atherom	Typ III + konfluierende extrazelluläre Lipidpools (Atheromkern) + strukturelle Intimaschäden
V	Fibroatherom	Typ IV + fibröse Kappe + Nekrosen
Vb	Kalzifizierte Läsion	Läsion, die vorwiegend aus kalzifizierten Arealen besteht
Vc	Fibrotische Läsion	Läsion mit minimalem Lipidanteil, vorwiegend aus Kollagen bestehend
VI	Thrombohämorrhagische Läsion	TypV + thrombotisches Material und/oder Einblutung und/oder Erosion oder Fissur

Tabelle 5 zeigt die AHA-Klassifikation. Im Zuge der arteriosklerotischen Plaquebildungen werden die einzelnen Stadien I – VI der AHA-Klassifikation durchlaufen.

Stabile Schnitte = grün; instabile Schnitte = rot

Cross section areas (CSA) galten im Stadium I-III nach der AHA Klassifikation als stabil, im Stadium IV-VI als instabil. Auf histologischer Ebene bedeutete dies, sobald in einem histologischen Schnittpräparat ein Atherom vorhanden war, wurde der Schnitt in Stadium IV oder höher eingeteilt und als instabil bezeichnet. Weiterhin wurde jeder histologische Schnitt mit der klinischen Neurologie des zugehörigen Patienten korreliert, somit wurde jeder Schnitt mit dem Begriff symptomatisch oder asymptomatisch klassifiziert.

Zur Auswertung der histomorphometrischen Komponenten eines histologischen Schnittes wurde der Schnitt mikroskopiert und parallel am Computer dargestellt und

ausgewertet, dabei wurde der Flächeninhalt von Areale hoher Zellakkumulation, Atheromen oder des Lumen eines Schnittes erfasst und in μm^2 angegeben. Die folgende Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der morphometrischen Analyse.

Äquivalent zur Auswertung der Cholesterin-Atherome, wie in Tabelle 6 als Beispiel dargestellt, wurde mit Atheromen verfahren, welche aus folgenden Substanzen bestehen:

- Kalzifizierte Atherome bestehend aus Calciumpyrophosphat –Kristallen
- Atherome bestehend aus extrazellulärer Matrix,
- Atherome bestehend aus Kalk und Cholesterin gemischt,
- Atherome bestehend aus extrazellulärer Matrix und Cholesterin gemischt
- Atherome bestehend aus extrazellulärer Matrix, Kalk und Cholesterin gemischt

Äquivalent zur Auswertung der Makrophagen, wie in Tabelle 6 als Beispiel dargestellt wurden Schaumzellen, Perilipin und PAPP-A ausgewertet.

Tabelle 6

Meßparameter	Einheit	Spezifische Einteilung
Zahl der Atheromfläche Cholesterin	keine	Es existierten ein oder mehrere nicht zusammenhängende Atheromflächen, deren Substanz aus Cholesterinkristallen bestand, diese wurden ausgezählt und die Summe wurde gebildet.
Fläche der Atherome Cholesterin:	μm^2	Alle Cholesterin-Atherome innerhalb eines histologischen Schnittes wurden umfahren und deren Flächeninhalte addiert.
Lumenfläche:	μm^2	Die Fläche des Lumens wurde umfahren.
Intimafläche:	μm^2	Die Grenze der Fläche stellte die Lamina elastica interna zwischen der Gefäßintima und Gefäßmedia dar. Entlang dieser Linie wurde das Gefäß umfahren. Von der entstandenen Fläche wurde die Lumenfläche subtrahiert.
Gesamtfläche:	μm^2	Der Schnitt wurde im Gesamten umfahren und von der entstandenen Fläche die Lumenfläche subtrahiert.
Anzahl Makrophagen:	keine	Es existierten ein oder mehrere nicht zusammenhängende zellreiche Makrophagenzellnester, diese wurden ausgezählt und die Summe wurde gebildet.
Fläche Makrophagen:	μm^2	Zellreiche Makrophagenzellnester wurden umfahren und deren Flächeninhalte addiert. Auch kleinste Nester mit nur 3-4 Zellen konnten mit der Methode dokumentiert werden.(s.h. Abb.10)
Atheromassoziation:	keine	Es wurde untersucht welchen Bezug die Zellen zur Lage des Atherom hatten. 1=keine Assoziation der Zellen zur Lage des Atheroms 2=ca.25% der Zellen innerhalb eines Schnittpräparat waren um das Atherom angesiedelt 3=ca.50% der Zellen innerhalb eines Schnittpräparat waren um das Atherom angesiedelt 4=ca.75% der Zellen innerhalb eines Schnittpräparat waren um das Atherom angesiedelt 5=Alle Zellen (100%) waren um das Atherom angesiedelt und hatten somit engen Bezug.

Vorwiegende Lokalisation:	keine	Es wurde festgelegt in welcher Gefäßschicht sich 90% der Zellen befanden. 0=Endothelnah 1=zentrale Intima 2=mittlere Intima 3=periphere Intima 4=zentrale Media 5=periphere Media
Thrombus:	keine	Es wurde unterschieden in 1=kein Thrombus 2=kleiner Thrombus 3=und großer Thrombus im gesamten histologischen Schnittpräparat
Kapillarisierung:	keine	Es wurde in drei Stufen unterteilt Keine Kapillarisierung = Es konnten unter dem Mikroskop im gesamten Schnittpräparat keine Kapillaren gefunden werden Mittlere Kapillarisierung = In weniger als 50% des Schnittpräparates waren Kapillaren sichtbar Starke Kapillarisierung = In mehr als 50% des Schnittpräparates waren Kapillaren sichtbar.
Kappenruptur:	keine	Es wurde beurteilt ob 1=die Kappe intakt ist 2=Kappenbrüche eventuell durch den operativen Eingriff entstanden sind 3=oder ob von einer Ruptur ausgegangen wird.

Tabelle 6 zeigt einen Überblick der quantitativen und qualitativen, histomorphometrischen Analyse der histologischen Schnittpräparate.

2.5 Statistische Auswertung

Mittels SigmaScan Pro Image Analysis Version 5.0.0, SPSS® für Windows, Release 11.0.0 wurden Flächeninhalte im Plaque vermessen und in μm^2 angegeben. Um Assoziationen zwischen kategorialen Merkmalen zu untersuchen wurde der Chi²-Test verwendet. Waren die asymptotischen Voraussetzungen für diesen Test nicht erfüllt, wurde der Exakte Test von Fisher benutzt. Der Mann-Whitney-Test wurde verwendet um die Verteilung metrisch skalierten Merkmale zwischen zwei unabhängigen Stichproben zu vergleichen. Zur Beschreibung, sowie für den illustrativen Vergleich von metrischen Größen, wurden Boxplots erstellt. Um die dreidimensionale Korrelation von PAPP-A, Perilipin und Kappendicke darzustellen wurde das multiple lineare Regressionsmodell verwendet. Es wurden sowohl logarithmische als auch Wurzeltransformationen angewandt, um große Streuung von Ziel- und Einflussgrößen zu reduzieren, es handelt sich dabei um monotone Transformationen. Wenn Null-Werte vorhanden waren musste von einer log-Transformation Abstand genommen werden, in diesem Fall kam die Wurzeltransformation zum Einsatz. Alle Auswertungen wurden zu einem Signifikanzniveau von 5% vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Statistik- Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Studie setzte sich aus 17 Personen zusammen, die aufgrund ihrer klinischen Neurologie in eine symptomatische oder asymptomatische Gruppe eingeteilt wurden. Neun Patienten wurden der asymptomatischen Gruppe zugeordnet, acht Patienten wurden in die symptomatische Gruppe eingeteilt.

Tabelle 7

	Asymptomatisch	Symptomatisch	Total	p-Wert
Patienten	9	8	17	
Geschlecht				
männlich	7 (77.8%)	6 (75.0%)	13	>0.99
weiblich	2 (22.3%)	2 (25.0%)	4	
Alter				
Mittelwert ± Stabw.	68 ± 6.0	65 ± 10.5		0.747
Risikofaktoren				
arterielle Hypertonie	8 (88.9%)	7 (90.0%)	15	>0.99
Hypercholesterinaemie	9 (100.0%)	6 (75.0%)	15	0.206
Nikotinabusus	4 (44.5%)	6 (75.0%)	10	0.335
Diabetes Mellitus	2 (22.3%)	4 (50.0%)	6	0.335
dialysepflichtige				
Niereninsuffizienz	3 (33.4%)	1 (12.5%)	4	0.577
Medikation				
Acetylsalizylsaure	9 (100.0%)	8 (100.0%)	17	>0.99
Beta-Blocker	6 (66.7%)	5 (62.5%)	11	>0.99
ACE-Hemmer	4 (44.5%)	5 (62.5%)	9	0.637
Statine	5 (55.6%)	3 (37.5%)	8	0.637
Nitrate	1 (11.2%)	0 (0.0%)	1	>0.99
Stenosegrad (%)				
Mittelwert ± Stabw	86 ± 7.8	88 ± 11.3		0,904

Tabelle 7 beschreibt das Patientenkollektiv dieser Studie, wobei zwischen symptomatischen und asymptomatischen Patienten unterschieden wurde.

Die gewonnenen Plaques wurden in mehrere Plaquebereiche segmentiert um die Carotisläsion besser charakterisieren zu können und über 400 immunhistochemische Schnitte wurden angefertigt (s.h. Material und Methoden Kapitel 2.2 und 2.3). Diese Schnitte wurden anhand der AHA Klassifikation (Tabelle 8) eingeteilt.

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 68 ± 6.0 in der asymptomatischen Gruppe und 65 ± 10.5 in der symptomatischen Gruppe ($p=0.747$). Das Kollektiv setzte sich aus 13 Männern und 4 Frauen zusammen ($p>0.99$). Bezüglich der individuellen Risikofaktoren, den klinischen Parametern und der Medikation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten. Der durchschnittliche Stenosegrad der A. carotis betrug 86 ± 7.8 in der asymptomatischen Gruppe und 88 ± 11.3 in der symptomatischen Gruppe ($p=0.904$)

3.2 Histologische Charakterisierung

3.2.1. morphologische Charakterisierung der Läsionen nach der AHA-Klassifikation

Tabelle 8

		AHA-Klassifikation						Total
		II	III	IV	Va	Vb	VI	
Stabilität	Stabil (0)	18,2%	81,8%	0	0	0	0	100%
	Instabil (1)	0	0	18,1%	45,8%	27,7%	8,4%	100%
Total		3,8%	17,1%	14,3%	36,2%	6,7%	6,7%	100%

II - III= stabil IV - VI = instabil

Tabelle 8: Festgelegte Bereiche innerhalb der Läsionen wurden nach der AHA-Klassifikation charakterisiert. Demnach galten Bereiche, die der Gruppe I-III zugeteilt werden konnten als stabil, Gruppe IV-VI wurde als instabil betrachtet. Der Gruppe I sowie Vc der AHA Klassifikation konnten keine Schnitte zugeordnet werden

Anhand Tabelle 8 lässt sich die Einteilung von instabilen und stabilen Bereichen innerhalb der einzelnen Läsionen nach der AHA-Klassifikation nachvollziehen. In den Gruppen I-III wurden die Schnitte als stabil (0) bezeichnet, in den Gruppen IV-VI wurden die Schnitte als instabil (1) bezeichnet. Von den AHA-Untergruppen der Gruppe V a/b/c waren in der Studie keine Schnitte der Gruppe Vc vorhanden, ebenso waren keinerlei Schnitte der Gruppe I vorhanden. Um Aussagen innerhalb der instabilen Bereiche IV-VI bezüglich des Grades der Instabilität zu machen, wurde bei jedem dieser

Schnitte an der dünnsten Stelle der fibrösen Kappe die Dicke gemessen und diese mit der AHA- Klassifikation korreliert. Abbildung 9 veranschaulicht diesen Zusammenhang.

Abbildung 9 AHA-Klassifikation und fibröse Kappendicke

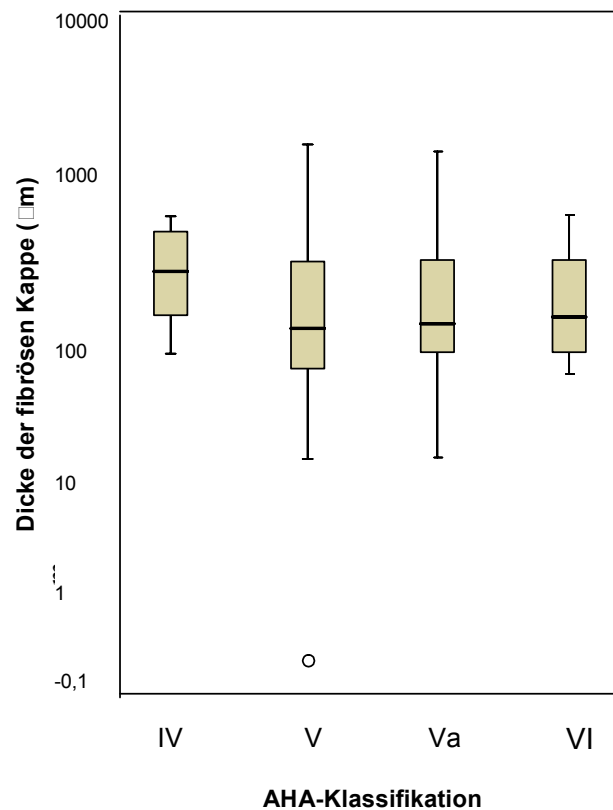


Abbildung 9 beschreibt die Dicke der fibrösen Kappe in Bezug zur AHA-Klassifikation. Eine fibröse Kappe existiert lediglich bei Plaques mit Atherom, welche somit als instabil gelten (AHA-Klassifikation IV-VI).

Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Kappendicke und der AHA-Klassifikation. Allerdings lässt sich ein Unterschied zwischen Gruppe IV und V erkennen, der zeigt, dass die Kappendicke von Stadium IV höher als die von Stadium V der AHA-Klassifikation ist. Dieser Trend setzt sich nicht weiter durch wenn man die Gruppen Va, Vb und VI untereinander vergleicht. Somit eignet sich die Kappendicke nur bedingt als Zusatz der AHA-Klassifikation, um das Ausmaß der Instabilität in den Gruppen IV-VI zu beschreiben.

3.2.2 Flächenanalyse der Plaques in den einzelnen histologischen Schnitten

Abbildung 10

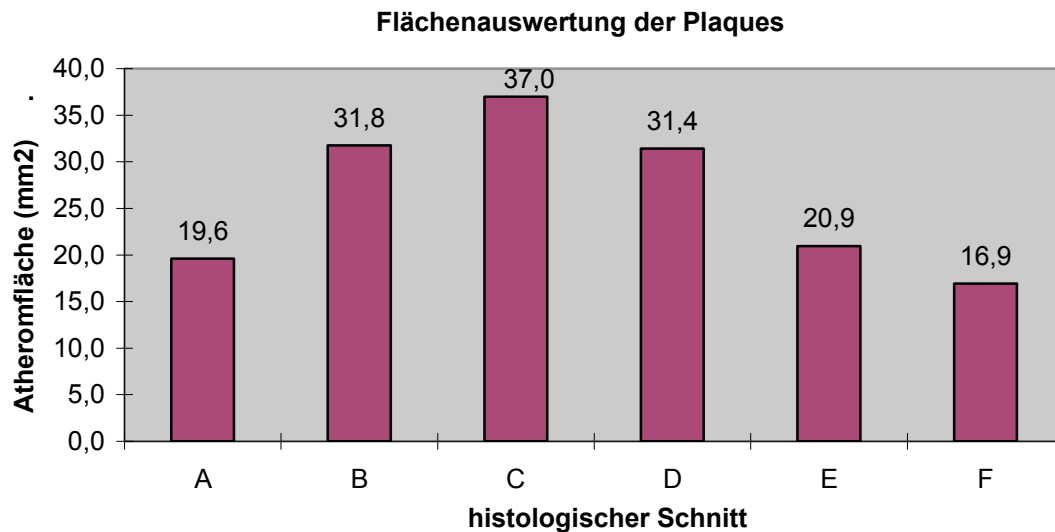


Abbildung 10 zeigt die mittlere Gesamt-Atheromfläche der einzelnen histologischen Schnitte A-F in mm², sowie den Mittelwert der Gesamt-Atheromfläche aller histologischen Schnitte. ★ Mittelwert =26.3 mm²

Im ersten Schritt des histologischen Teils der Ergebnisauswertung wurde die mittlere Gesamt-Atheromfläche der einzelnen histologischen Schnitte A-F, sowie die durchschnittliche mittlere Gesamt-Atheromfläche aller Schnitte berechnet. Diese Mittelwerte stellen in der Erläuterung der Ergebnisse einen Bezugswert dar und dienen als Orientierungsgröße (Abbildung 10).

Durchschnittlich enthielt ein Plaque eine Gesamt-Atheromfläche von 26.3 mm².

Die größte Gesamt-Atheromfläche (37.0 mm²) war durchschnittlich im Schnitt vorhanden, die geringste Gesamt-Atheromfläche befand sich durchschnittlich im Schnitt F (16.9 mm²).

3.2.3 Charakterisierung von PAPP-A und Perilipin

Im Entstehungsprozess der Arteriosklerose spielen inflammatorische Zellen, wie Makrophagen und die aus ihnen hervorgehenden Schaumzellen, eine zentrale Rolle. Makrophagen können LDL zwar konzentrationsunabhängig phagozitieren zirkuliert al-

lerdings zu viel LDL im Körper, wandeln sie sich zu Schaumzellen um. Sind Schaumzellen wiederum mit oxidiertem LDL überladen, gehen sie zugrunde und innerhalb der Intima entstehen ein Präatherom, Atherom und schließlich ein Fibroatherom, überzogen von einer kollagenfaserreichen Kappe (fibröse Kappe), welches dem Plaque Instabilität verleiht und den Patienten dem Risiko des Schlaganfalls aussetzt.

Der Mechanismus der Entstehung von Schaumzellen aus glatten Muskelzellen und Makrophagen ist aber nur zum Teil aufgeklärt. Einig ist man sich über die Beteiligung von chemisch modifiziertem (oxidiertem) LDL, welches von den Makrophagen über Scavenger-Rezeptoren ungehemmt und konzentrationsunabhängig aufgenommen und gespeichert wird. Da der Übergang von Makropagen in Schaumzellen fließend ist, werden in dieser Arbeit Felder mit vorwiegend Makrophagen und Felder mit vorwiegend Schaumzellen beschrieben.

Abbildung 11

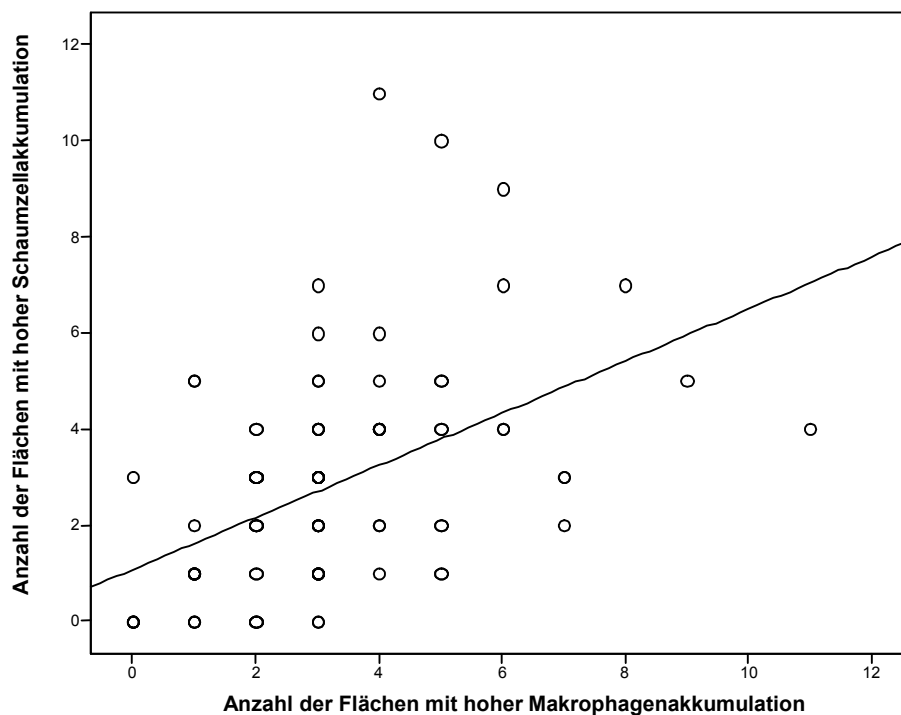


Abbildung 11 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Anzahl von Flächen mit hoher Makrophagenakkumulation und der Anzahl der Flächen mit hoher Schaumzellakkumulation.

p-wert<0.001; r=0.55 (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

Der Zusammenhang zwischen Makrophagen und Schaumzellen konnte in dieser Studie signifikant belegt werden (Abbildung 11, Abbildung 12). Es besteht eine starke positive Korrelation zwischen der Anzahl der ausgezählten Felder mit einer überwiegender Makrophagenakkumulation und der Anzahl der ausgezählten Felder mit einer überwiegender Schaumzellakkumulation ($r=0.55$; $p<0.001$). Dies bedeutet, mit steigender Anzahl Makrophagen nimmt auch die Zahl der Schaumzellen zu.

Dieser signifikante Zusammenhang konnte präziser bestätigt werden, indem sowohl die einzelnen Felder hoher Makrophagenzellakkumulation als auch die einzelnen Felder hoher Schaumzellakkumulation morphometrisch vermessen wurden und die addierten Flächeninhalte innerhalb eines histologischen Schnittpräparates miteinander korreliert wurden. Abbildung 12 spiegelt den signifikanten Zusammenhang der beiden Größen wider ($r=0,582$, $p<0,001$).

Abbildung 12

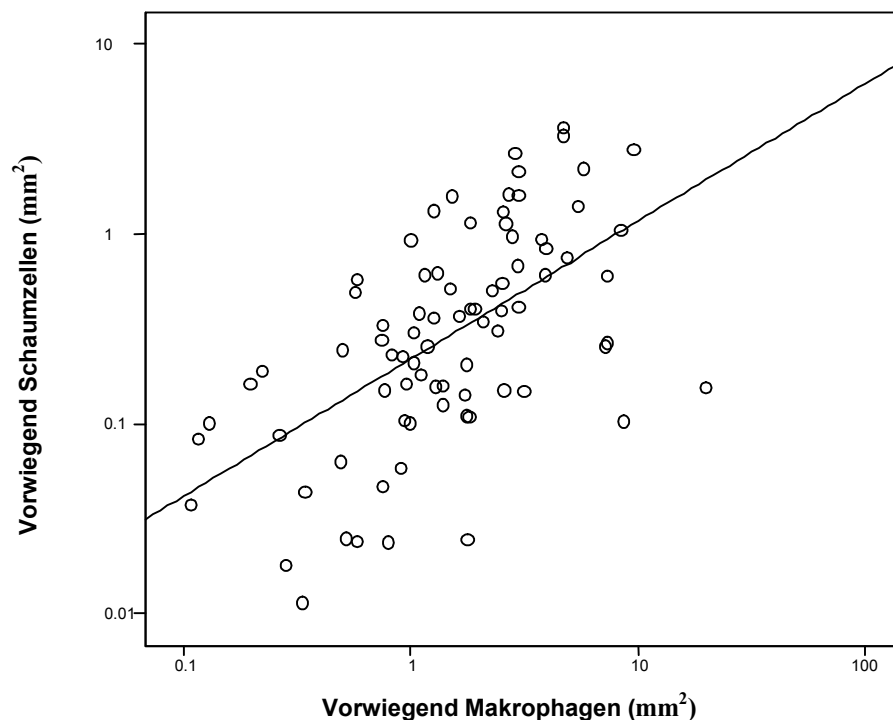


Abbildung 12 beschreibt den linearen Zusammenhang der Fläche hoher Makrophagenakkumulation mit der Fläche hoher Schaumzellakkumulation.

p -wert <0.001 ; $r=0.580$ (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

Schon während der histomorphometrischen Analyse am Mikroskop war auffallend, dass eine große Anzahl an Makrophagen nicht unbedingt mit der Anzahl der Schaumzellen in positiv linearem Zusammenhang steht. Es konnte vielmehr beobachtet

werden, dass die Zahl der Schaumzellen ab einem bestimmten Punkt zu stagnieren begann, unabhängig davon ob die Zahl der Makrophagen weiterhin stieg. Veranschaulicht man die gemessenen Werte grafisch, so lässt sich diese Vermutung einer abnehmenden Grenzproduktion der Makrophagen verifizieren (Abbildung 13). Betrachtet man die beiden Korrelationskoeffizienten (lineare Kurve $r=0,580$; kubische Kurve $r=0,671$) so kann man in der kubischen Darstellung der Abbildung 13 eine stärkere Korrelation der Größen Makrophagen und Schaumzellen erkennen. Dies bedeutet, dass sich mit einer noch höheren Exaktheit eine Größe durch die andere beschreiben lässt.

Abbildung 13

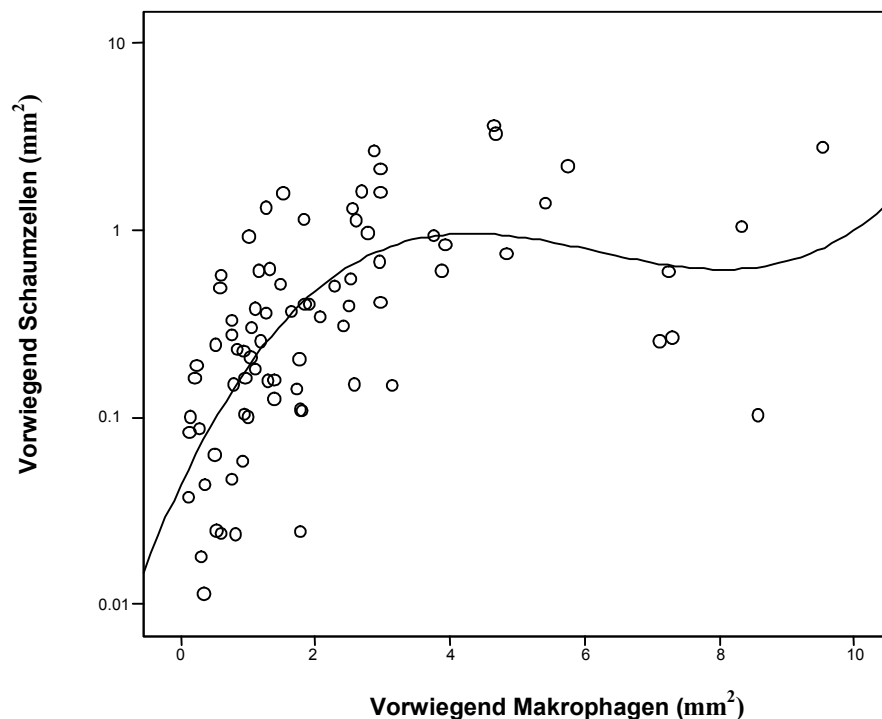


Abbildung 13 beschreibt den Zusammenhang der Fläche hoher Makrophagenakkumulation mit der Fläche hoher Schaumzellakkumulation in einer kubischen Darstellung.

p -wert < 0.001 ; $r = 0.671$ (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

Eine vermehrte Kapillarisation findet sich generell in Geweben, in denen ein Reparaturprozess stattfindet. Im Zuge dessen, werden neutrophile, basophile, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen vermehrt ins entzündete Gewebe eingeschwemmt. Lokal wandeln sich Makrophagen dann in Schaumzellen um und produzieren MMPs.

In Abbildung 14 ist der direkte Zusammenhang einer vermehrten Kapillarisation mit der Fläche der Schaumzellen dargestellt. Abbildung 14 zeigt die signifikante

($p < 0,001$) Heterogenität zwischen der Kapillarisation und der Fläche der Schaumzellen. Ist eine Plaque vermehrt von Kapillaren durchzogen, so lassen sich in ihr auch signifikant mehr Schaumzellen finden.

Abbildung 14

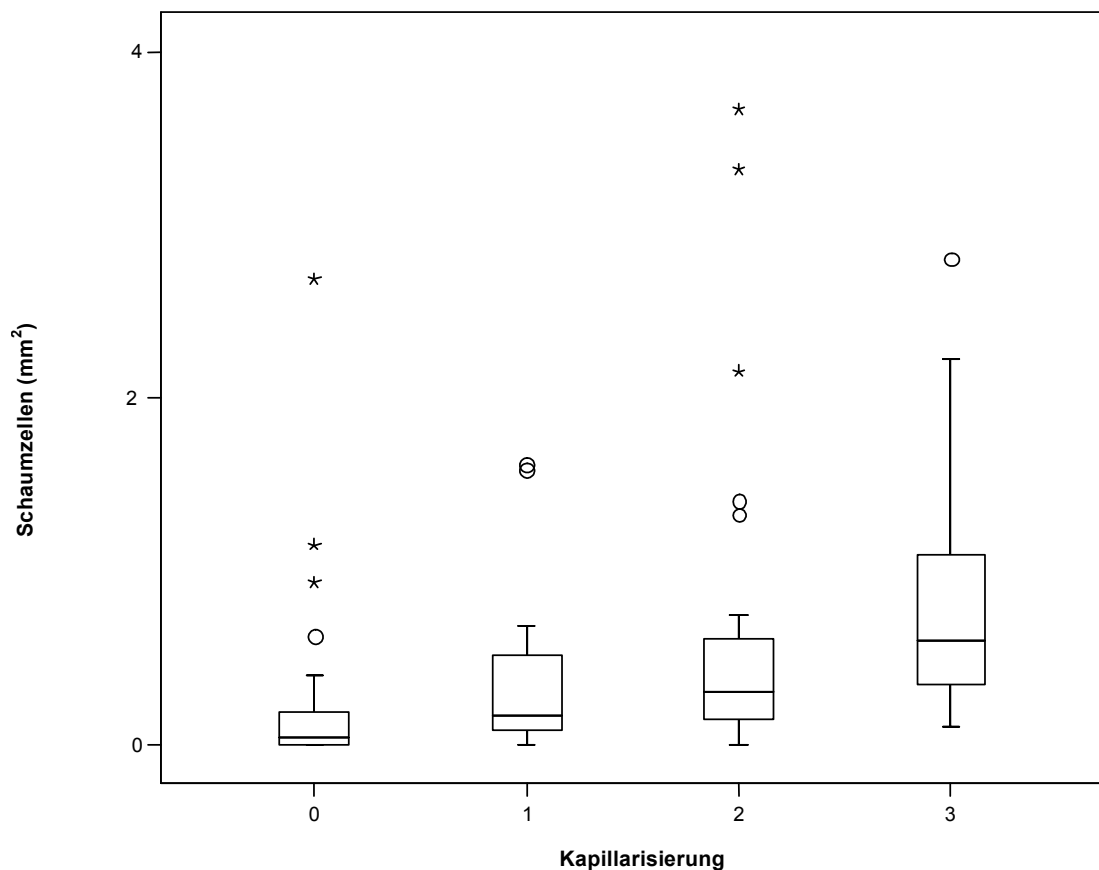


Abbildung 14 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Kapillarisation der histologischen Schnitte und der Fläche hoher Schaumzellakkumulation innerhalb dieser Schnitte.

Kruskal-Wallis-Test, $p\text{-wert} < 0,001$

Legende: 0 = keine Kapillaren im betrachteten histologischen Schnittpräparat

1 = 1/3 des betrachteten histologischen Schnittpräparats enthält Kapillaren

2 = 2/3 des betrachteten histologischen Schnittpräparats enthält Kapillaren

3 = Kapillaren sind im gesamten histologischen Schnittpräparat vorhanden

o = Werte die zwischen 1.5 und 3 Interquartilsabständen vom oberen 0.75 Quantil entfernt sind.

* = Werte die mehr als drei Interquartilsabstände vom oberen 0.75 Quantil entfernt sind.

Die Plaquevulnerabilität ist maßgeblich durch die Anzahl der in der Plaque enthaltenen Entzündungszellen beeinflusst. Aktivierte Makrophagen partizipieren an diesem Entzündungsprozess, indem sie Metalloproteinasen produzieren, welche letztendlich den Prozess der Arteriosklerosebildung und Plaquestabilisierung fördern. PAPP-

A gehört zur Gruppe der Metalloproteinasen, deren metalloproteolytische Aktivität die Plaqueruptur fördert.

Der Zusammenhang zwischen aktivierten Makrophagen (Schaumzellen) und der Sekretion von PAPP-A konnte in unsere Studie signifikant belegt werden. Abbildung 15 zeigt eine signifikante ($r=0,615$; $p<0,001$) Korrelation zwischen der Fläche bestehend aus vorwiegend aktivierten Makrophagen (Schaumzellen) und der Fläche von PAPP-A. Die beiden Flächen konnten in einen signifikant positiv linearen Zusammenhang gebracht werden. Steigt die Anzahl der Schaumzellen, so steigt ebenfalls die Höhe der PAPP-A Expression.

Abbildung 15

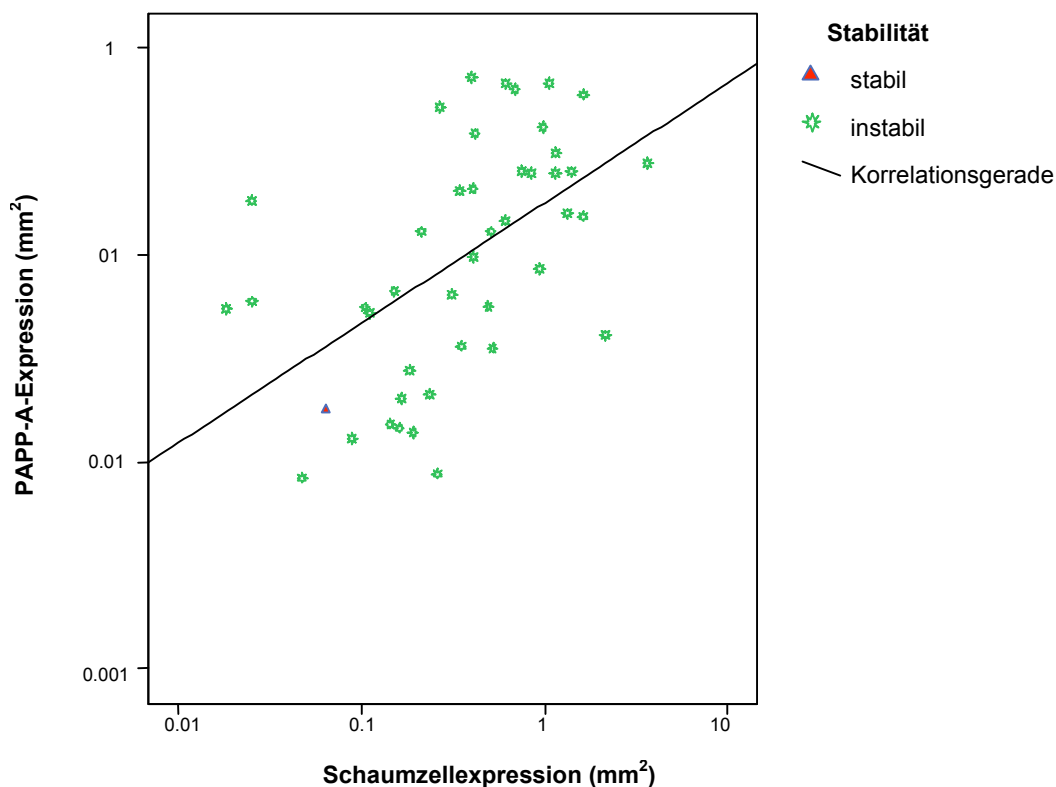


Abbildung 15 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Fläche hoher Schaumzellakkumulation und der Fläche hoher PAPP-A-Akkumulation innerhalb aller ausgewerteten histologischen Schnitte.

p -wert $<0,001$; $r=0,615$ (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

Von Interesse war nicht nur in welchem Zusammenhang diese beiden Größen stehen, sondern vielmehr welche Auswirkung diese spezielle Korrelation auf die Stabilität der Plaques hat. Dies lässt sich ebenfalls anhand Abbildung 15 ableiten. Die Konstellation in der innerhalb eines histologischen Schnittes Schaumzellen in Verbindung mit PAPP-A vorhanden waren, fand sich bis auf eine einzige Ausnahme ausschließlich

in instabilen Plaques also in Plaques der AHA Klassifikation IV-VI. Nur ein Schnitt, in welchem sich sowohl Schaumzellen als auch PAPP-A befanden, war stabil, alle anderen waren instabil. Auf dieses Ergebnis wird in Kapitel 3.2 4 näher eingegangen.

Entsprechend dem PAPP-A wird auch Perilipin von aktivierten Makrophagen, den Schaumzellen im Rahmen eines Entzündungsprozesses, exprimiert. Perilipin trägt wesentlich zur Akkumulation von Triglyceriden und Cholesterinakkumulation in Zellen bei, da Perilipin die Hydrolyse dieser Substanzen durch die Hormon-Sensitive Lipase (HSL) verhindert. Perilipin stellt somit womöglich in seiner Funktion als Inhibitor der Hydrolyse von gespeicherten Lipiden, analog dem PAPP-A, eine Schlüsselrolle im Arterioskleroseprozess dar. In Abbildung 16 wurde die Fläche hoher Schaumzellakkumulation mit der Fläche der Perilipin Akkumulation korreliert. Es konnte ein deutlich positiv linearer, signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Die Korrelation ist signifikant ($r=0,677$; $p<0,001$). Steigt die Anzahl der Schaumzellen in der Plaque, so steigt auch die Perilipin Expression.

Abbildung 16

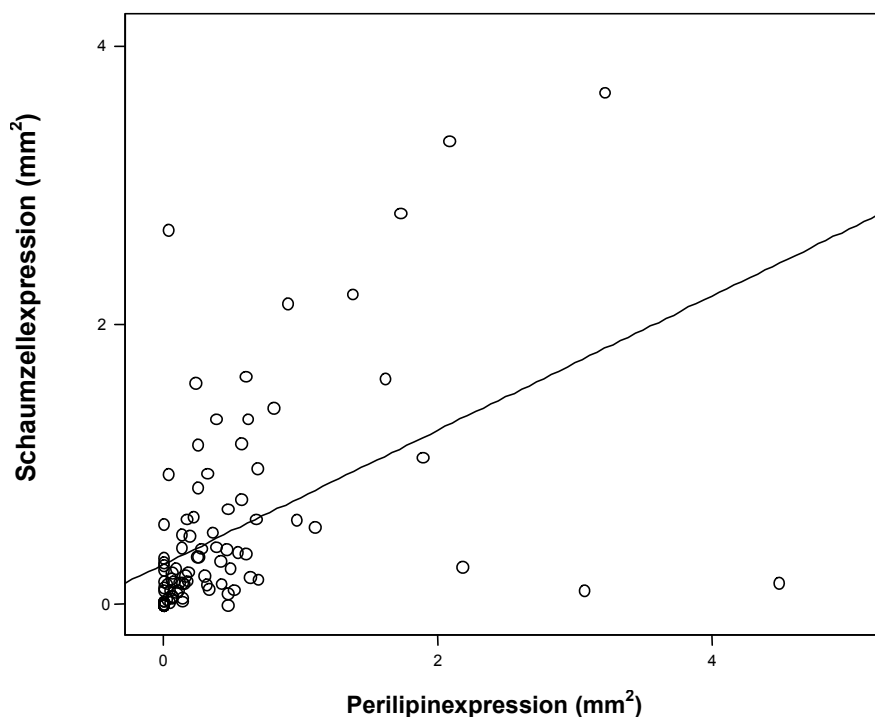


Abbildung 16 zeigt die Korrelation der Fläche hoher Perilipinakkumulation mit der Fläche hoher Schaumzellakkumulation.

p-wert<0.001; $r=0.677$ (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

3.2.4 Die Auswirkung von PAPP-A und Perilipin auf die Stabilität einer Plaque

Es konnte nachgewiesen werden, dass PAPP-A und Perilipin in direkter Verbindung mit Schaumzellen und aktivierten Makrophagen stehen. Die Matrixmetalloproteinasen (PAPP-A und Perilipin) bewirken einen Abbau der extrazellulären Matrix und das so entstehende Ungleichgewicht zwischen verminderter Bildung und vermehrter Degradation der extrazellulären Matrix führt zur Ausdünnung der fibrösen Kappe. Unter dem Einfluss von Scherkräften, insbesondere an Gefäßbifurkationen, kann die fibröse Kappe schneller aufreißen. Immunhistologische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Makrophagen und Schaumzellen vermehrt in der Schulter von arteriosklerotischen Plaques befinden, Stellen, an denen es gehäuft zu Fissuren bzw. Rupturen kommt. Aufgrund dieser Tatsache wurde in der vorliegenden Studie der direkte Zusammenhang zwischen Schaumzellen, PAPP-A und Perilipin mit der Plaquestabilität untersucht.

Abbildung 17 Korrelation der Schaumzellen mit der Plaquestabilität

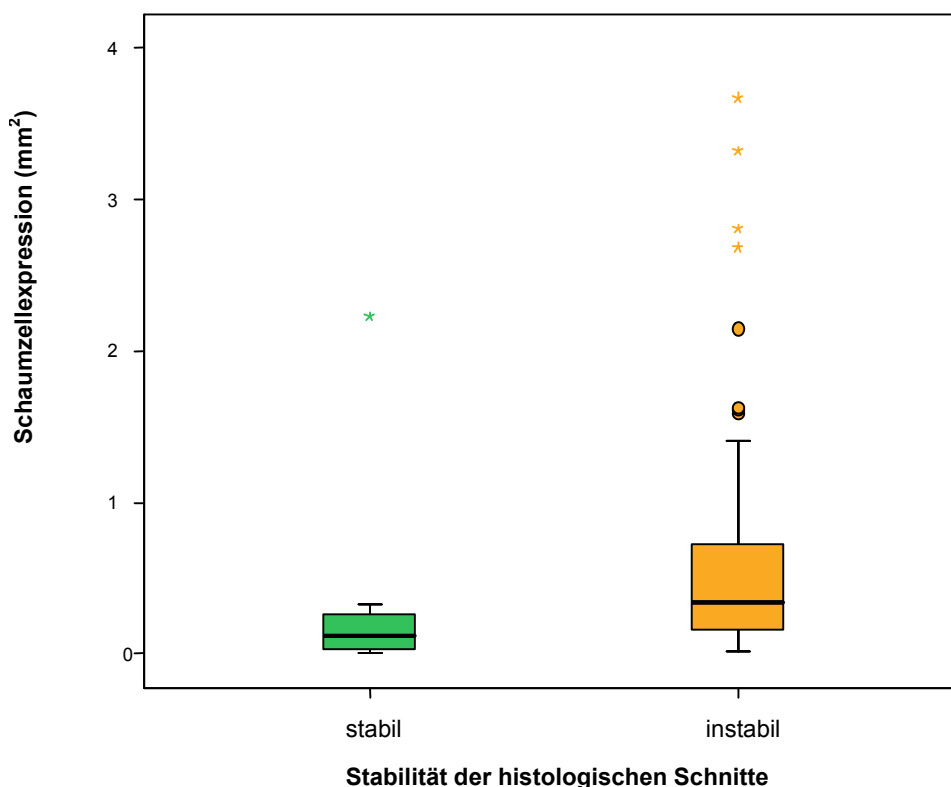


Abbildung 17 zeigt den Zusammenhang zwischen der Stabilität der Plaques und der Schaumzellexpression. Dabei ergibt sich eine signifikant höhere Schaumzellen Expression innerhalb instabiler Plaques.

Mann-Whitney Test; $p=0.033$,

o = Werte die zwischen 1.5 und 3 Interquartilsabständen vom oberen 0.75 Quantil entfernt sind.

* = Werte die mehr als drei Interquartilsabstände vom oberen 0.75 Quantil entfernt sind.

Abbildung 17 gibt den signifikanten ($p=0.033$) Zusammenhang zwischen der Fläche der Schaumzellen und der Stabilität einer Plaque wider. Mit steigender Anzahl an Schaumzellen nimmt die Instabilität einer Plaque signifikant zu. Da die Anzahl der Schaumzellen allerdings nicht im Serum quantifiziert werden kann, eignet sich diese Größe nicht in der klinischen Anwendung zur Evaluierung der Plaquestabilität. PAPP-A und Perilipin erfüllen die Kriterien auch im Serum messbar zu sein und können dadurch zu Aussagen über die Plaquestabilität herangezogen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Perilipin und Schaumzellen signifikant miteinander korrelieren (Abbildung 16). Infolgedessen erlaubt Tabelle 9 die Schlussfolgerung, dass auch Perilipin einen potentiellen Marker für Plaqueinstabilität darstellt.

Tabelle 9

	kein Perilipin	Perilipin
stabiler Plaque	81%	19%
instabiler Plaque	15.70%	84.30%

Tabelle 9 beschreibt die Beziehung zwischen dem Vorhandensein einer Perilipin-Expression und der Plaquestabilität
Chi²-Test; p -wert < 0.001,

Die beobachteten Verteilungen weichen signifikant ($p < 0,001$) von der aus der H_0 -Hypothese (beide Variablen Perilipin und Stabilität sind unabhängig verteilt) erwarteten Verteilung ab. Somit kann die H_0 -Hypothese auf einem Signifikanzniveau von <1% abgelehnt werden.

War in einer Plaque Perilipin vorhanden, so war dieser Plaque in 84,3% instabil. 19% der Plaques, in denen Perilipin nachgewiesen werden konnte, waren stabil. Abbildung 18 veranschaulicht diese Daten.

Abbildung 18

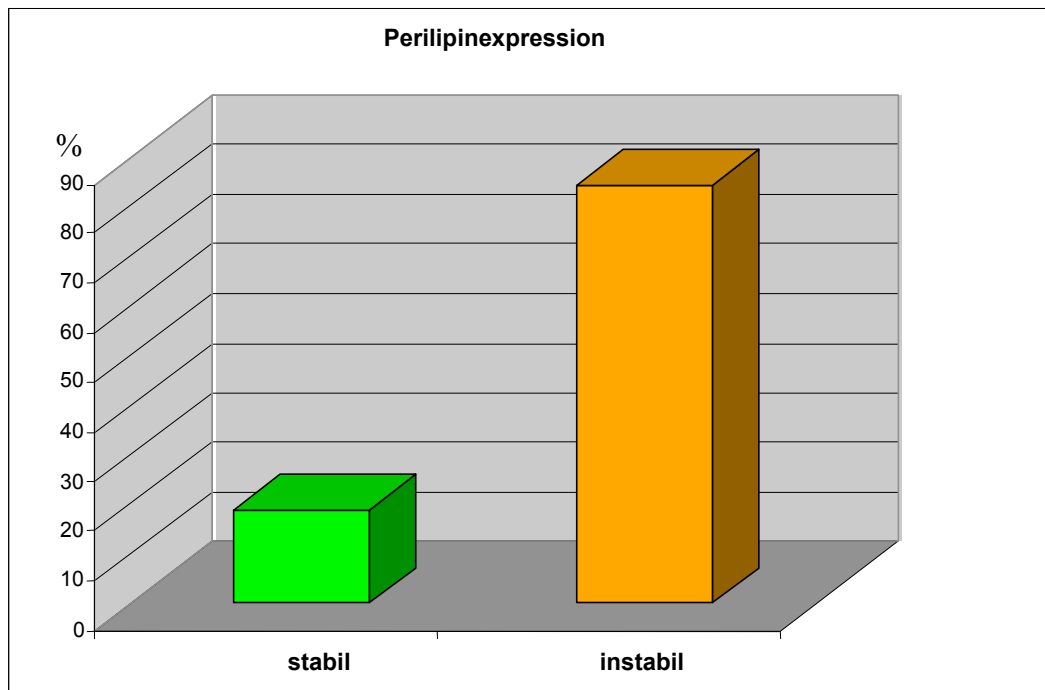


Abbildung 18 veranschaulicht Tabelle 9 als Grafik und zeigt die Perilipinexpression (%) in Korrelation mit Plaquestabilität
Chi²-Test; p-wert<0.001;

Analog der Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkung von Perilipin auf die Stabilität, konnte auch für PAPP-A ein signifikanter Zusammenhang mit der Plaquesstabilität nachgewiesen werden. War in einem Schnitt PAPP-A vorhanden, so war dieser Plaque in 72,7% instabil, nur in 9,1% konnte der Plaque als stabil klassifiziert werden. Dieser Zusammenhang ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Tabelle 10 und Abbildung 19 geben die Korrelation von PAPP-A mit der Plaquestabilität wieder.

Tabelle 10

	kein PAPP-A	PAPP-A
stabiler Plaque	90.90%	9.10%
instabiler Plaque	27.30%	72.70%

Tabelle 10 beschreibt die Beziehung zwischen dem Vorhandensein einer PAPP-A-Expression und der Plaquestabilität
Chi²-Test p-wert<0.001

Abbildung 19

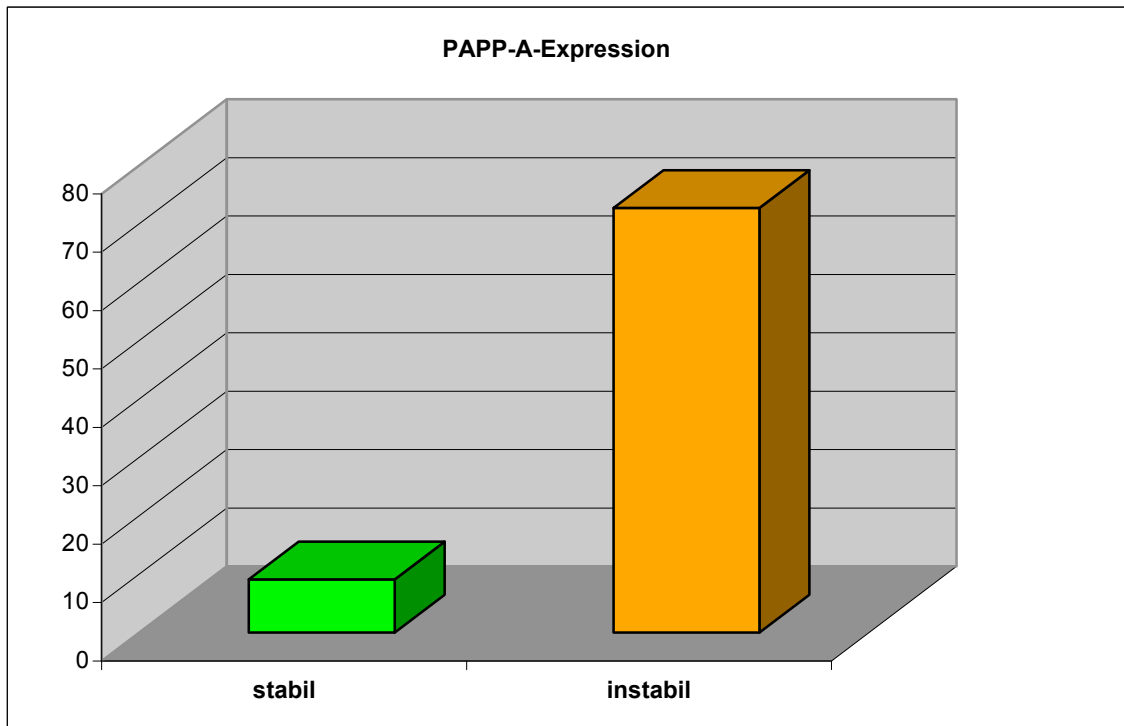


Abbildung 19 veranschaulicht Tabelle 14 als Grafik und zeigt die PAPP-A Expression (%) in stabilen und instabilen histologischen Schnitten.

Chi²-Test; p-wert<0.001

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl PAPP-A als auch Perilipin mit der Stabilität eines Plaques in signifikantem Zusammenhang stehen.

Basierend auf der Tatsache, dass eine erhöhte Plaqueinstabilität die Folge einer abnehmenden Kappendicke darstellt und wir zeigen konnten, dass PAPP-A und Perilipin Marker für Plaqueinstabilität sind, stellt sich die Frage nach einer möglichen Verbindung zwischen den Metalloproteinasen und der Kappendicke. Das Ergebnis dieser Überlegung zeigt Abbildung 20 und 21.

Die Kappendicke nimmt signifikant sowohl mit erhöhter Konzentration an PAPP-A ($p < 0,001$) als auch mit erhöhter Konzentration an Perilipin ($p < 0,001$) ab.

Abbildung 20

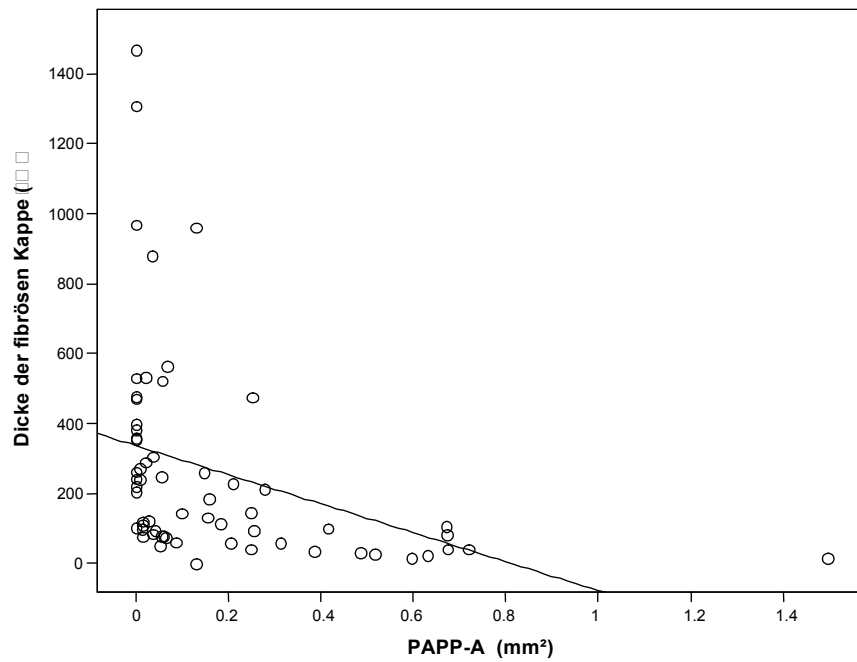


Abbildung 20 beschreibt die Abhängigkeit der Kappendicke von der Expression an PAPP-A
p-wert<0.001; $r=-0.639$ (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

Abbildung 21

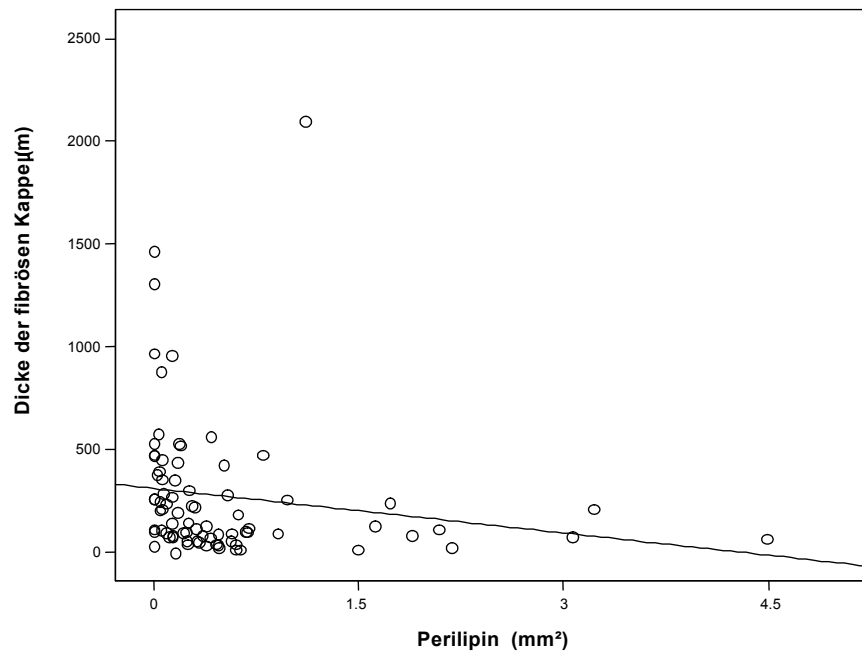


Abbildung 21 beschreibt die Abhängigkeit der Kappendicke von der Expression an Perilipin.
p-wert < 0.001; $r=-0.429$ (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

Die Kaskade der Makrophagen → Schaumzellen → Expression von PAPP-A und Perilipin konnte in der hier vorliegenden Studie signifikant nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Tatsache wurde der Zusammenhang zwischen PAPP-A und Perilipin selbst näher betrachtet.

Abbildung 22 zeigt das Ergebnis. War in einem Schnittpräparat PAPP-A vorhanden, so konnte in 95,92% auch Perilipin nachgewiesen werden, in 4,08% konnte kein Perilipin nachgewiesen werden. Umgekehrt war in der Gruppe, die kein PAPP-A enthielt, nur in 32,14% Perilipin vorhanden. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Es wurde weiterhin untersucht, ob sich die PAPP-A oder Perilipin Expression möglicherweise in den verschiedenen Altersgruppen unterscheidet. Die betrachteten Zusammenhänge waren jedoch weder signifikant noch zeichnete sich ein klarer Trend ab, weshalb auf die Ergebnisse hier nicht näher eingegangen wird.

Abbildung 22 Korrelation zwischen PAPP-A und Perilipin

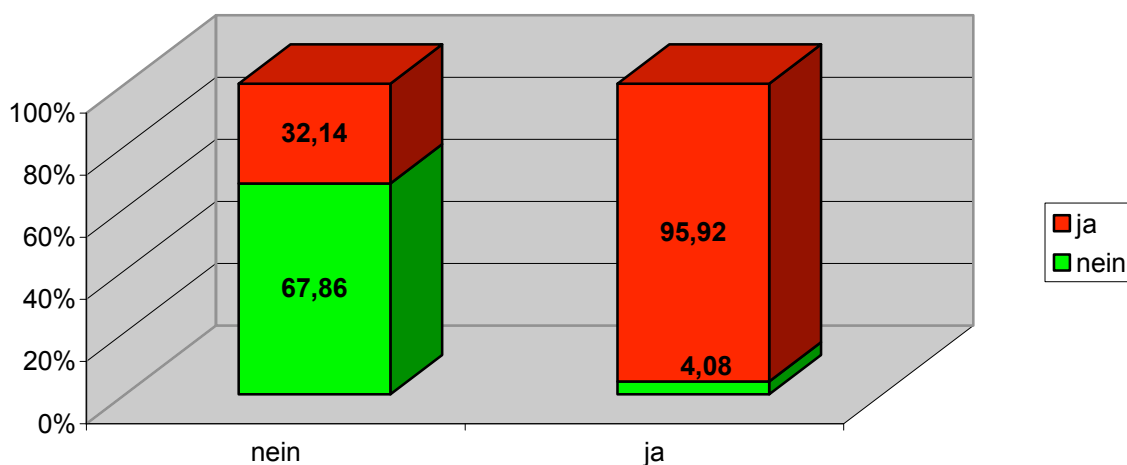


Abbildung 22 beschreibt den signifikanten Zusammenhang der Expression von PAPP-A mit der Expression von Perilipin in der Plaque.

Chi²-Test; p -wert $< 0,001$,

Ausserdem war von Interesse ob PAPP-A und Perilipin möglicherweise innerhalb des Geschlechts unterschiedlich ausgeprägt sind. Das Ergebnis der Korrelation

der Variablen männlich/weiblich mit der Neurologie und der Stabilität erbrachte allerdings keine signifikante Korrelation (weiblich $p=0,469$; männlich $p>0,999$).

Abbildung 23 zeigt abschließend noch einmal die Korrelation von PAPP-A und Perilipin in Bezug auf die fibröse Kappendicke. Das multiple lineare Regressionsmodell:

$$\begin{aligned} (\text{Kappendicke})^{1/2} &= \text{Konstante} + B_{\text{Papp}} * (\text{Fläche PAPP})^{1/2} + B_{\text{Perilipin}} * (\text{Fläche Perilipin})^{1/2} \\ (\text{Kappendicke})^{1/2} &= 20.063106 - 0.014223 \text{ PAPP-A}^{1/2} - 0.002981 \text{ Perilipin}^{1/2} \end{aligned}$$

wird in dreidimensionaler Darstellung durch die Ebene illustriert. Man kann der Darstellung entnehmen, dass der Einfluss von PAPP-A auf Kappendicke größer ist, als derjenige von Perilipin, dies spiegelt ebenfalls der Koeffizient im Modell wider. Die Wurzel-Transformation wurde gewählt, um die große Streuung der Ziel – und Einflussgrößen zu reduzieren, dabei hätte sich auch eine log-Transformation angeboten, aufgrund von Null-Werten musste allerdings davon Abstand genommen werden, da gilt: $\log(0) = -\infty$.

Abbildung 23

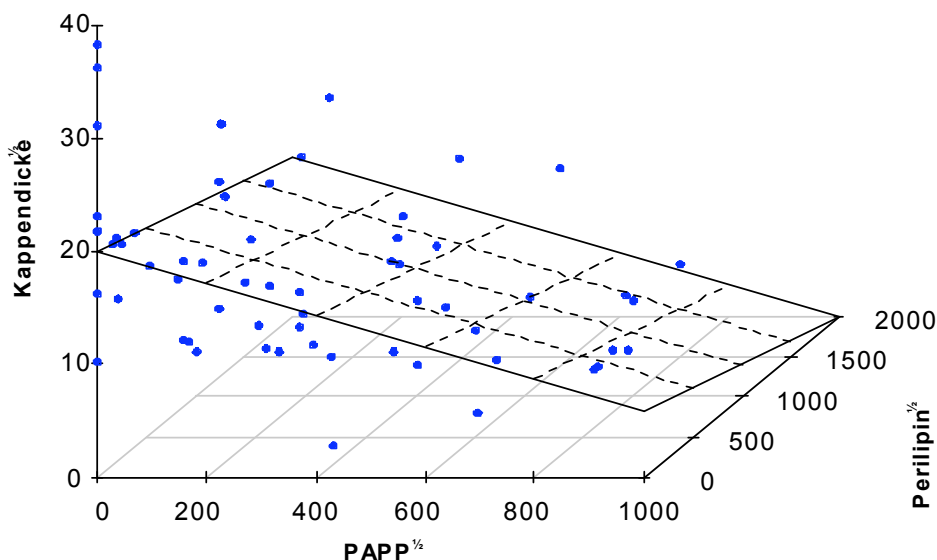


Abbildung 23 zeigt ein "3D Plot multiples lineares Regressionsmodell" in welchem die Abbildungen 20 und 21 zusammengefasst dargestellt werden. Die Abbildung spiegelt nochmals die Abhängigkeit der Kappendicke von der PAPP-A- sowie der Perilipin Expression wider.

Test: Multiples lineares Regressionsmodell; Multiple R-Squared = 0.323; p-wert < 0.001

3.3 Klinische Charakterisierung

Von zentralem Interesse dieser Studie war nicht nur welches Potential PAPP-A und Perilipin als Marker zur Evaluierung der Plaquestabilität haben, sondern auch inwieweit die histologische Zusammensetzung sowie die Stabilität einer Plaque Auswirkungen auf die klinische Neurologie eines Patienten haben. Infolgedessen wurden die einzelnen Plaques in ihrem histologischen Aufbau noch genauer beschrieben und charakteristische Merkmale mit der Neurologie der Patienten in Zusammenhang gesetzt.

3.3.1 Die Auswirkung der Atheromqualität auf die klinische Neurologie

Die Atheromqualität, also aus welcher Substanz ein Atherom besteht (Cholesterin, Calciumpyrophosphat-Kristallen, extrazellulärer Matrix oder gar einem Gemisch aus allen drei Bestandteilen) übt einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität einer Plaque und eventuell dadurch auch auf die neurologische Symptomatik eines Patienten aus. Es wurde in der vorliegenden Studie untersucht, welche Auswirkungen Atherome bestehend aus verschiedenen Substanzen auf die Neurologie haben, und ob man umgekehrt anhand der Symptomatik eines Patienten auch auf das Vorhandensein oder gar die Qualität eines Atheroms schließen kann (Tabelle 11).

Tabelle 11

	asymptomatisch	symptomatisch	Alle Patienten
Kein Cholesterin-Atherom	0%	12,5%	5,9%
Cholesterin-Atherom	100%	87,5%	94,1%

Tabelle 11 zeigt den Zusammenhang zwischen Plaques, die in repräsentativen histologischen Schnittpräparaten (s.h. Kapitel 2.2.2) mindestens ein Cholesterin Atherom enthielten und der klinischen Neurologie der Patienten
exakter Test nach Fisher; $p = 0,471$

Laut der H_0 -Hypothese (beide Variablen Cholesterin und Neurologie sind unabhängig verteilt) dürften die Verteilungen von Cholesterin und Neurologie in den Untergruppen symptomatisch/asymptomatisch nicht signifikant voneinander abweichen. Die beobachteten Verteilungen weichen nicht signifikant ($p=0.471$) von der aus der H_0 -Hypothese erwarteten Verteilung ab, damit kann die H_0 -Hypothese nicht abgelehnt werden. Es

lassen sich aufgrund der Symptomatik eines Patienten somit keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein eines Atheroms bestehend aus Cholesterin (Cholesterin-Atherom) ziehen. Im Gegenteil es waren sogar mehr Patienten mit Cholesterin-Atherom neurologisch asymptomatisch (100%) als symptomatisch (87.5%). Es zeigt sich, dass der deutlich überwiegende Anteil der Patienten mit Carotisstenose Plaques mit Cholesterin-Atheromen enthält (94.1%). Allerdings kann zwischen den neurologischen Untergruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Aufgrund der verschiedenen Atherom Substanzen könnte man davon ausgehen, dass ein Atherom bestehend aus Calciumpyrophosphat-Kristallen dem Plaque womöglich mehr Stabilität verleiht und sich somit eventuell auf die klinische Neurologie des Patienten asymptomatisch auswirkt. Das Ergebnis dieser Überlegung zeigt Tabelle 12.

Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Atheromen bestehend aus Calciumpyrophosphat-Kristallen (kalzifizierte Atherome) und der Auswirkung auf die Neurologie festgestellt werden, welcher sich jedoch nicht als statistisch signifikant erwies ($p=0,576$). Von den Patienten, die asymptomatisch waren, enthielten zwar mehr Plaques ein kalzifiziertes Atherom (88.9%) verglichen mit der symptomatischen Patientengruppe (75%), allerdings erwies sich dieser Unterschied als nicht signifikant. Es lässt sich wiederum feststellen, dass der überwiegende Anteil der Patienten in repräsentativen Schnitten der Carotisplaques kalzifizierte Atherome enthält. Allerdings lassen sich hinsichtlich der neurologischen Untergruppen keine signifikanten Aussagen machen.

Tabelle 12

	asymptomatisch	symptomatisch	Alle Patienten
Kein kalzifiziertes Atherom	11,1%	25,0%	17,6%
Kalzifiziertes Atherom	88,9%	75,0%	82,4%

Tabelle 12 zeigt den Zusammenhang zwischen Plaques, die in repräsentativen histologischen Schnittpräparaten (s.h. Kapitel 2.2.2) mindestens ein kalzifiziertes Atherom enthielten und der klinischen Neurologie der Patienten.
exakter Test nach Fisher: $p=0,576$

Als dritte Atheromqualität wurden Atherome untersucht deren Substanz aus extrazellulärer Matrix (EZM) bestanden. Ob und inwiefern sie sich auf die Neurologie eines

Patienten auswirkt wurde in der folgenden Tabelle 13 untersucht. Auch in dieser Korrelation lassen sich lediglich Trends beschreiben, es konnte kein signifikanter Zusammenhang ($p > 0,99$) festgestellt werden. Unter den symptomatischen Patienten konnte bei 87,5% der Patienten ein Atherom bestehend aus extrazellulärer Matrix nachgewiesen werden, 12,5% der symptomatischen Patienten hatten kein Atherom. Innerhalb der asymptomatische Gruppe gab es deutlich mehr Patienten mit EZM-Atherom (77,8%) als ohne Atherom (22,2%). Daraus ergibt sich, dass die klinische Neurologie nicht auf ein Atherom aus extrazellulärer Matrix innerhalb eines Plaques schließen lässt. Es waren mehr Patienten mit EZM-Atherom symptomatisch als asymptomatisch. Dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant.

Plaques, die sich aus Cholesterin, Calciumpyrophosphat-Kristallen und extrazellulärer Matrix zusammensetzten, wurden ebenfalls untersucht. Da sich hierbei allerdings zum Teil zu kleine Fallzahlen ergaben und in sich in den Korrelationen keine signifikanten Zusammenhänge erkennen ließen wird an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen.

Tabelle 13

	asymptomatisch	symptomatisch	Alle Patienten
Kein EZM-Atherom	22,2%	12,5%	17,6%
EZM-Atherom	77,8%	87,5%	82,4%

Tabelle 13 zeigt den Zusammenhang zwischen Plaques, die in repräsentativen histologischen Schnittpräparaten (s.h. Kapitel 2.2.2) mindestens ein EZM-Atherom enthielten und der klinischen Neurologie der Patienten.
exakter Test nach Fisher; $p > 0,99$

In Tabelle 11-13 wurden Plaques charakterisiert, die in mindestens einem der repräsentativen histologischen Schnitte (s.h. Kapitel 2.2.2) ein Atherom bestehend aus Cholesterin, Calciumpyrophosphat-Kristallen oder extrazellulärer Matrix enthielten. Es ließ sich zeigen, dass der Großteil aller Patienten mit Carotisstenose zwar Plaques mit Atheromen hat, allerdings übt die Qualität der Atherome auf die neurologische Symptomatik der Patienten keinen Einfluss aus.

In einem weiteren Schritt wurde der arteriosklerotische Plaque nicht in seiner Gesamtlänge betrachtet und alle nach Kapitel 2.2.2. festgelegten histologische Schnittpräparate nach Atheromen untersucht, sondern es wurde nur der Schnitt mit kleinstem

Lumen/Intimaverhältnis näher betrachtet. Dieser spezifische Schnitt durch die Plaque stellt die arteriosklerotische Läsion in ihrer stärksten Ausprägung dar. In diesem Schnitt wurde noch einmal die Art der Atherome untersucht, welche Atherome am meisten vorhanden waren und diese Atherome in einen Zusammenhang mit der Neurologie der Patienten gebracht.

Ähnlich der Ergebnisse aus Tabelle 11-13 lässt sich zeigen, dass die Mehrzahl Plaques zwar Atherome enthalten (76.5%), diese jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Neurologie der Patienten ausüben ($p > 0.99$). Dieses Ergebnis zeigt Tabelle 14, in der asymptomatischen Gruppe enthielten 77.8% ein Atherom bestehend aus Cholesterin oder Calciumpyrophosphat oder EZM, in der symptomatischen Gruppe enthielten Plaques zu 75% Atherome, bestehend aus einer dieser Substanzen.

Tabelle 14

	asymptomatisch	symptomatisch	Alle Patienten
Kein Cholesterin-, oder Calciumpyrophosphat-, oder EZM-Atherom	22,2%	25,0%	23,5%
Cholesterin-, oder Calciumpyrophosphat-, oder EZM-Atherom	77,8%	75,0%	76,5%

Tabelle 14 Plaques, die in ihrem histologischen Schnittpäparat mit kleinstem Lumen/Intimaverhältnis mindestens ein Atherom bestehend aus Cholesterin, Calciumpyrophosphat oder extrazelluläre Matrix enthielten, wurden in einen Zusammenhang mit der klinischen Neurologie der Patienten gebracht.

exakter Test nach Fisher; $p > 0,99$

In Tabelle 15-17 wurden Cholesterin- Calciumpyrophosphat- und EZM-Atherome einzeln auf ihr Vorhandensein im Schnitt mit kleinsten Lumen/Intimaverhältnis untersucht. Es zeigt sich keine große Differenz zwischen Läsionen, die in diesem Schnitt kein Cholesterin-Atherom hatten (47.1%) und Läsionen in denen ein Cholesterin-Atherom im Schnitt mit kleinstem Lumen/Intimaverhältnis festgestellt werden konnte (52.9%) (Tabelle 15). Wie bereits mehrfach beschrieben, konnten auch hier keine signifikanten Aussagen bezüglich der Auswirkung von Cholesterin-Atheromen auf die Neurologie gemacht werden. In der asymptomatischen Gruppe enthielten 55.6% ein Cholesterin-Atherom in der symptomatischen Gruppe enthielten 50.0% ein Cholesterin-Atherom ($p > 0,99$). Ähnliche Ergebnisse lassen sich für kalzifizierte Atherome feststellen (Tabelle 16).

Extrazelluläre Atherome konnten kaum im Schnitt mit kleinstem Lumen/Intimaverhältnis detektiert werden (5.9%) (Tabelle 17).

Tabelle 15

	asymptomatisch	symptomatisch	Alle Patienten
Kein Cholesterin-Atherom	44,4%	50,0%	47,1%
Cholesterin-Atherom	55,6%	50,0%	52,9%

Tabelle 15 Plaques, die in ihrem histologischen Schnittpäparat mit kleinstem Lumen/Intimaverhältnis mindestens ein Cholesterin-Atherom enthielten, wurden in einen Zusammenhang mit der klinischen Neurologie der Patienten gebracht.
exakter Test nach Fisher; $p > 0,99$

Tabelle 16

	asymptomatisch	symptomatisch	Alle Patienten
Kein kalzifiziertes Atherom	55,6%	37,5%	47,1%
Kalzifizierteas Atherom	44,4%	62,5%	52,9%

Tabelle 16 Plaques, die in ihrem histologischen Schnittpäparat mit kleinstem Lumen/Intimaverhältnis mindestens ein kalzifiziertes Atherom enthielten, wurden in einen Zusammenhang mit der klinischen Neurologie der Patienten gebracht.
exakter Test nach Fisher; $p = 0,637$

Tabelle 17

	asymptomatisch	symptomatisch	Alle Patienten
Kein EZM-Atherom	88,9%	100,0%	94,1%
EZM-Atherom	11,1%	0%	5,9%

Tabelle 17 Plaques, die in ihrem histologischen Schnittpäparat mit kleinstem Lumen/Intimaverhältnis mindestens ein EZM-Atherom enthielten, wurden in einen Zusammenhang mit der klinischen Neurologie der Patienten gebracht.
exakter Test nach Fisher; $p = 0,63$

3.3.2 Die Fläche der Atherome und deren Auswirkung auf die Neurologie

Da auffallend große Unterschiede bezüglich der Atheromgröße zwischen den einzelnen histologischen Schnitten bestanden, konnten diese nicht ausreichend durch die Beschreibung des alleinigen Vorhandenseins (ja/nein) dokumentiert werden. Infolgedessen wurden die Atherome morphometrisch ausgemessen und die Flächeninhalte der Atherome innerhalb eines Schnittes addiert (Flächenauswertung s.h. Kapitel 2.4) Die Gesamtatheromfläche der einzelnen festgelegten Schnittpräparate (s.h. Kapitel 2.2.2) wurde dann in Bezug auf die Gesamtplaquefläche gesetzt und der histologische Schnitt mit maximalem Prozentanteil in Zusammenhang mit der Neurologie des Patienten gebracht. Somit konnte die Auswirkung der Atheromfläche in instabilen Plaques auf die Neurologie beschrieben werden.

Abbildung 24

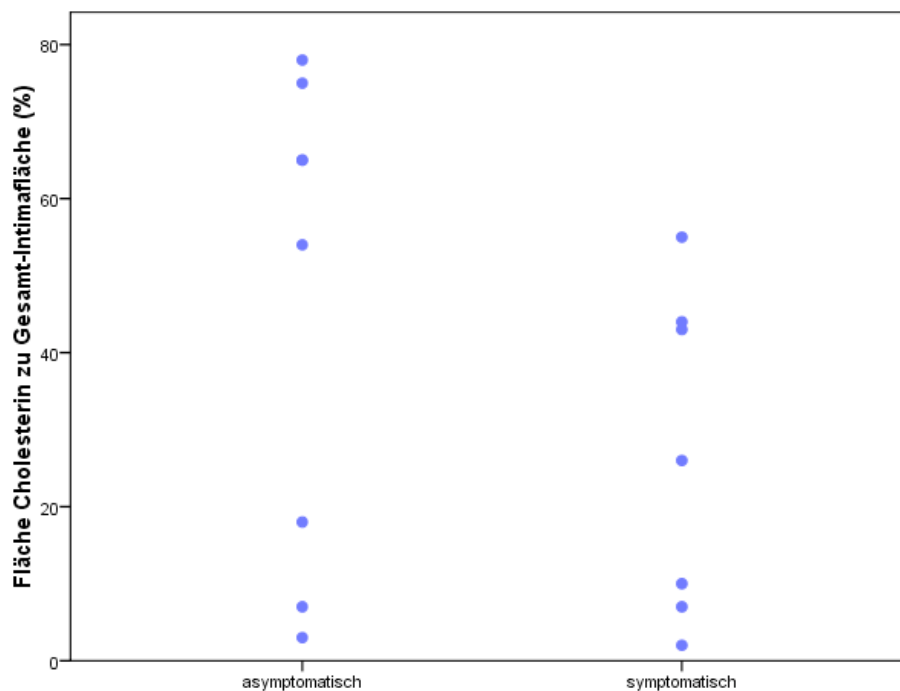


Abbildung 24 stellt jeweils den Schnitt innerhalb der Läsion pro Patient dar (Kapitel 2.2.2), in dem der Anteil der Cholesterinatheromfläche bezogen auf die Gesamtplaquefläche maximal war (Flächenauswertung s.h. Kapitel 2.4). Diese Schnitte wurden in der asymptomatischen und symptomatischen Patientengruppe verglichen.

Mann-Whitney Test; p-wert=0.181

Aus Abbildung 24 geht hervor, dass Patienten, die asymptomatisch waren eine größere Fläche an Cholesterin-Atheromen bezogen auf die Gesamtplaquefläche haben

verglichen mit Patienten, die symptomatisch waren ($\text{Maximum}_{\text{asymptomatisch}} 78.0\%$ versus $\text{Maximum}_{\text{symptomatisch}} 55.0\%$), dies konnte jedoch in keinen signifikanten ($p=0,181$) Zusammenhang gebracht werden. Betrachtet man die Mediane, so liegt der Anteil der Cholesterin-Atheromflächen bezogen auf die Gesamtplaquefläche bei den asymptomatischen Patienten bei 59.5%, bei den symptomatischen Patienten betrug der Anteil 26.0%. Abbildung 12 veranschaulicht dieses Ergebnis. Die Erkenntnis, dass die Fläche der Cholesterin-Atherome keinen entscheidenden Einfluss auf die Neurologie hat, konnte für die kalzifizierten Atherome nicht bestätigt werden.

Abbildung 25

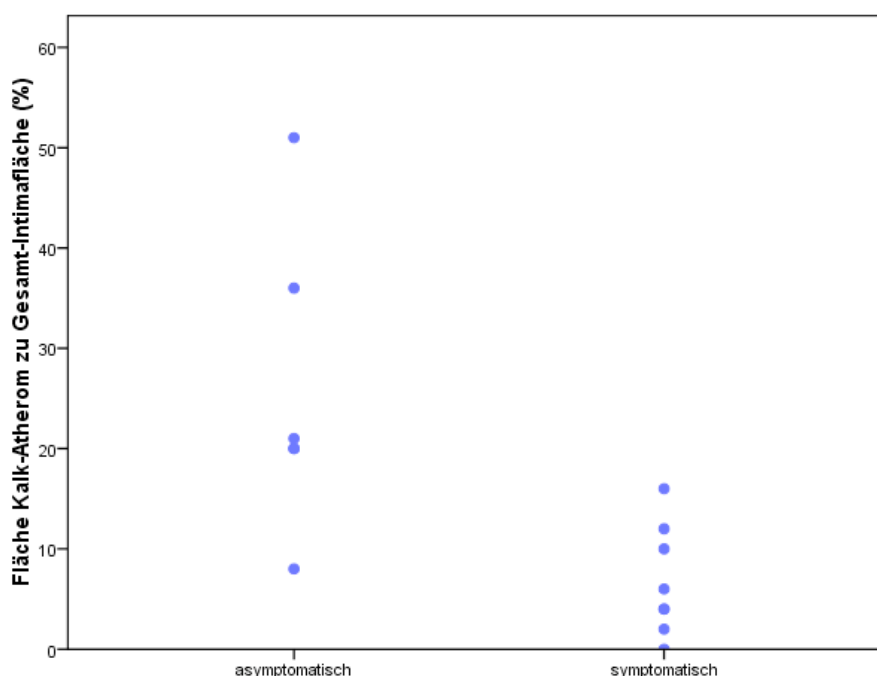


Abbildung 25 stellt jeweils den Schnitt innerhalb der Läsion pro Patient dar (Kapitel 2.2.2), in dem der Anteil kalzifizierter Atheromflächen bezogen auf die Gesamtplaquefläche maximal war (Flächenauswertung s.h. Kapitel 2.4). Diese Schnitte wurden in der asymptomatischen und symptomatischen Patientengruppe verglichen.

Mann-Whitney Test; $p\text{-wert}=0.008$

Die beobachteten Verteilungen weichen signifikant ($p=0.008$) voneinander ab, damit kann die Null-Hypothese (beide Variablen sind unabhängig voneinander verteilt) abgelehnt und die Abhängigkeit statistisch bewiesen werden (Abbildung 25).

In der asymptomatischen Gruppe wurde eine signifikant höhere Fläche kalzifizierter Atherome gemessen als in der symptomatischen Gruppe. Es lässt sich feststellen, dass größere kalzifizierte Atheromflächen innerhalb einer arteriosklerotischen Läsion

on sich nicht unbedingt symptomatisch auf die Klinik der Patienten auswirken. In der asymptomatischen Gruppe lag der Anteil der kalzifizierten Atherome bezogen auf die Intimafläche im Schnitt bei 26.0%, in der symptomatischen Gruppe hingegen bei 6.8%.

Der Anteil der EZM-Atheromfläche an der Gesamtplaquefläche zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Neurologie ($p > 0.99$) (Abbildung 26). Eine etwas größere EZM-Atheromfläche konnte in der asymptomatischen Gruppe gemessen werden. Dass dieser Unterschied jedoch sehr klein ist, zeigt sich, wenn man die Mittelwerte in beiden Gruppen betrachtet. (Mittelwert_{asymptomatisch} 25.9% versus Mittelwert_{symptomatisch} 27.6%)

Abbildung 26

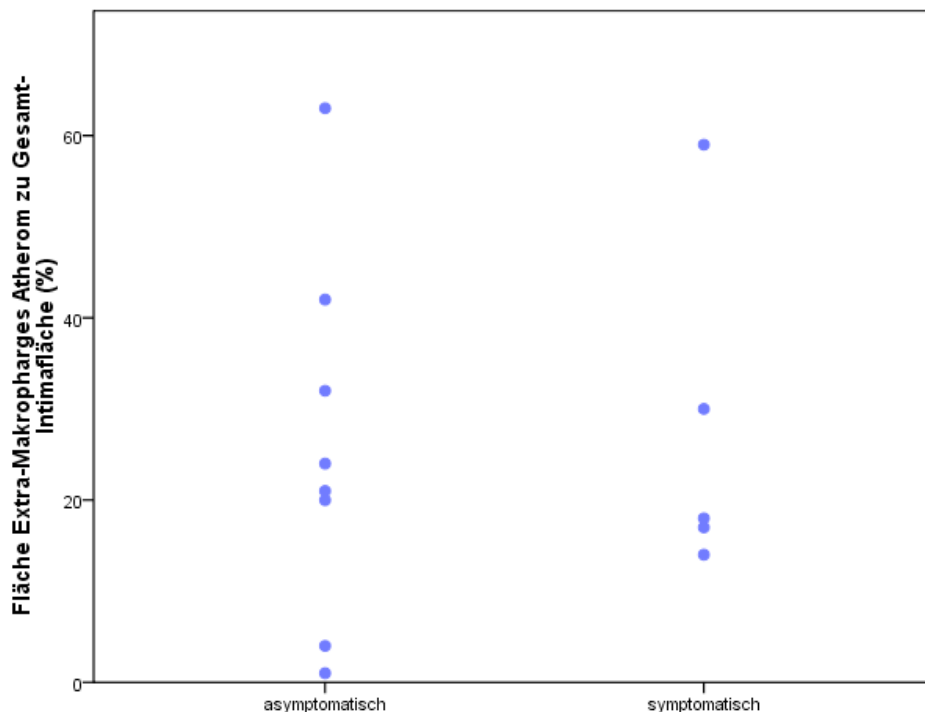


Abbildung 26 stellt jeweils den Schnitt innerhalb der Läsion pro Patient dar (Kapitel 2.2.2), in dem der Anteil der EZM-Atheromflächen bezogen auf die Gesamtplaquefläche maximal war (Flächenauswertung s.h. Kapitel 2.4). Diese Schnitte wurden in der asymptomatischen und symptomatischen Patientengruppe verglichen.

Mann-Whitney Test; p -wert > 0.99

3.3.3 PAPP-A und Perilipin in Korrelation mit der Neurologie

In Kapitel 3.3.4 konnte gezeigt werden, dass sowohl PAPP-A als auch Perilipin mit der Stabilität eines Plaques in signifikantem Zusammenhang stehen. Beide Proteine

lassen sich in Plaques, die nach der AHA-Klassifikation als instabil eingeteilt werden deutlich stärker nachweisen als in stabilen Plaques. Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass mit abnehmender Kappendicke die Expression an PAPP-A und Perilipin im Plaque signifikant ansteigt.

In wieweit PAPP-A und Perilipin als Marker für instabile arteriosklerotische Läsionen mit der klinischen Neurologie der Patienten korrelieren, wurde in einem weiteren Schritt untersucht. In Kapitel 3.2.3 konnte bereits gezeigt werden, dass aktivierte Makrophagen (Schaumzellen) und PAPP-A signifikant korrelieren. Es stellt sich die Frage, ob sich diese signifikant positive Korrelation zwischen Schaumzellen und PAPP-A bei symptomatischen und asymptomatischen Patienten unterscheidet. Das Ergebnis zeigt Abbildung 27. Es zeigt sich ein positiv linearer Zusammenhang zwischen Schaumzellen und PAPP-A in der Gruppe der asymptomatischen Patienten. Dieses Ergebnis lässt sich als Trend beschreiben, der grenzwertig statistisch signifikant ($r=0,370$, $p=0,075$) nachgewiesen werden konnte. Grund für diese schwächere Korrelation stellt die geringe Fallzahl dar.

Abbildung 27

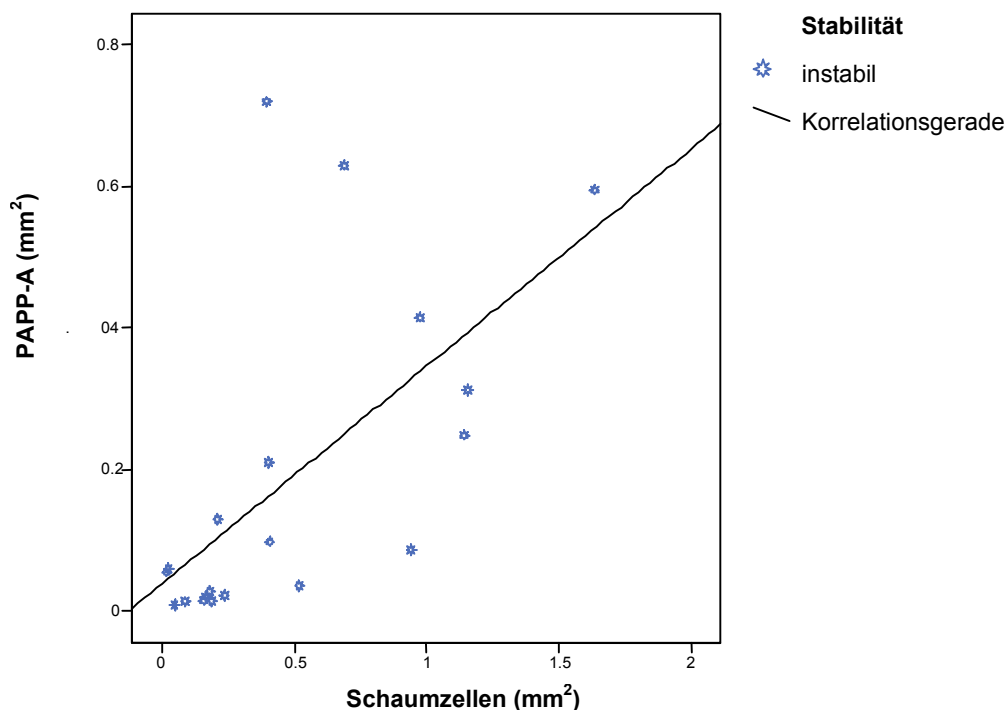


Abbildung 27 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Fläche hoher Schaumzellakkumulation und der Fläche hoher PAPP-A-Akkumulation in Plaques von asymptomatischen Patienten. (Flächenauswertung s.h. Kapitel 2.4)
p-wert=0.075; $r=0.37$ (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

Im Vergleich zur asymptomatischen Gruppe konnte in der symptomatischen Gruppe allerdings ein deutlich stärkerer Zusammenhang zwischen Schaumzellen und PAPP-A verzeichnet werden. Dies ist anhand der Abbildung 28 ersichtlich. Betrachtet man die Kurve, so erscheint die Steigung kleiner verglichen mit Abbildung 27. Die Ursache dafür liegt bei einem der Werte, welcher als Ausreißer die Kurve nach unten drückt. Betrachtet man allerdings den nicht-parametrischen, außreißerunempfindlichen Korrelationskoeffizienten nach Spearman und dessen Signifikanz ($r= 0,615$, $p<0,001$), so muss von einer stärkeren Korrelation der beiden Größen ausgegangen werden. In Abbildung 29 wurden die Daten zur besseren graphischen Darstellung logarithmiert.

Abbildung 28

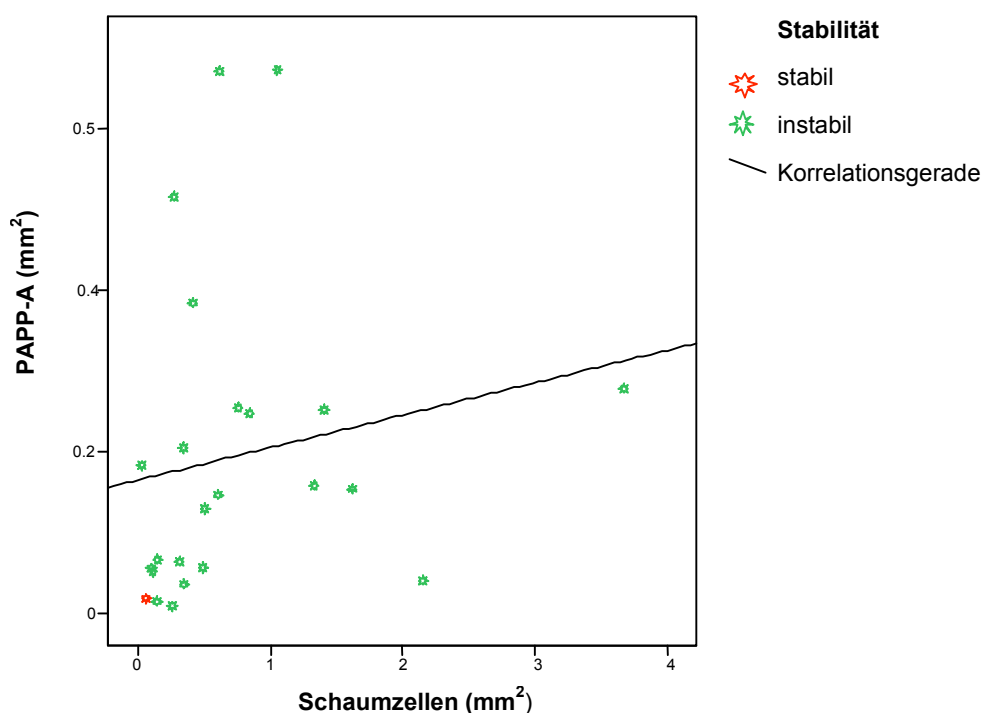


Abbildung 28 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Fläche hoher Schaumzellakkumulation und der Fläche hoher PAPP-A-Akkumulation in Plaques von symptomatischen Patienten. (Flächenauswertung s.h. Kapitel 2.4)
 $p\text{-wert}<0.001$; $r=0.615$ (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

Die log-Transformation (dabei handelt es sich um eine schlichte Logarithmierung der Ausgangswerte), wie sie in Abbildung 29 verwendet wurde, wird angewandt, wenn Daten eine sehr große Streuung "nach oben" besitzen, d.h. also wenn vereinzelt sehr hohe Werte auftreten. Da es sich um eine monotone Transformation handelt, wird die

Rangfolge der Daten durch diese Umrechnung nicht geändert, demzufolge ändern sich auch entsprechend nicht-parametrische Teststatistiken, wie der Spearman-Korrelationskoeffizient, nicht.

Abbildung 29

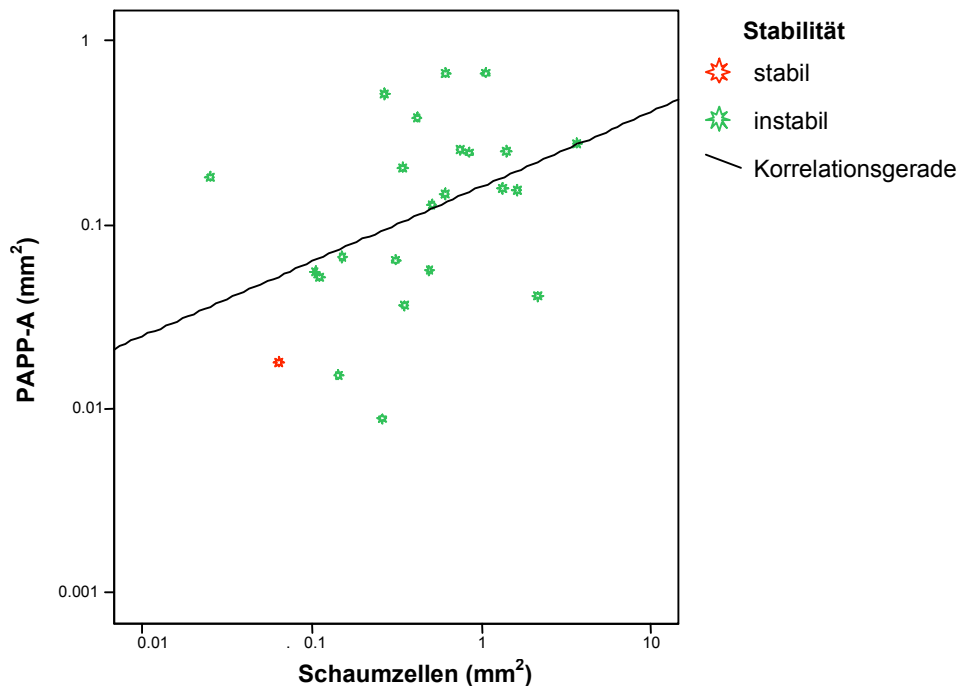


Abbildung 29 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Fläche hoher Schaumzellakkumulation und der Fläche hoher PAPP-A-Akkumulation in Plaques von symptomatischen Patienten. Zur Darstellung wurde im Vergleich zu Abbildung 28 die log-Transformation angewendet. (Flächenauswertung s.h. Kapitel 2.4)
p-wert<0.001; r=0.615 (Korrelationskoeffizient nach Spearman)

Abbildung 30 zeigt, dass in allen instabilen Plaques von asymptomatischen Patienten PAPP-A zu 88.46% exprimiert wurde. In keinem stabilen Schnitt der asymptomatischen Patienten konnte PAPP-A nachgewiesen werden.. Umgekehrt bedeutet dies, dass in 11.54% der instabilen Schnitte und in 100% der stabilen Schnitte kein PAPP-A vorhanden war.

In der symptomatischen Gruppe war PAPP-A innerhalb der instabilen Schnitte zu 62.5% vorhanden, in den stabilen Schnitten konnte PAPP-A in 10% der Fälle nachgewiesen werden. Es ist somit von Bedeutung, dass sowohl bei symptomatischen Patienten, als auch bei asymptomatischen Patienten instabile Läsionen existieren und weiterhin, dass PAPP-A in diesen instabilen Plaques in beiden neurologischen Gruppen

signifikant stärker exprimiert wird verglichen mit stabilen Plaques von symptomatischen und asymptomatischen Patienten.

Abbildung 30

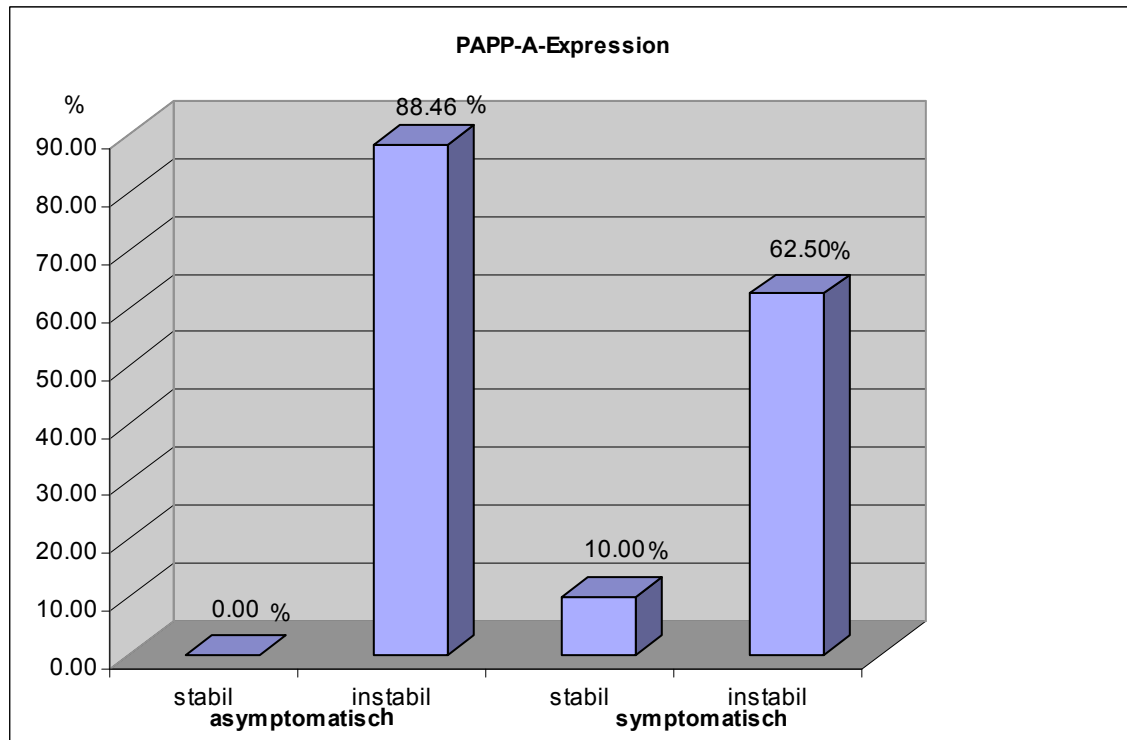


Abbildung 30 zeigt die Verteilung der PAPP-A Expression zwischen allen instabilen und stabilen histologischen Schnitten bei asymptomatischen und symptomatischen Patienten.

Für die Verteilung innerhalb der asymptomatischen Patientengruppe gilt: Chi²-Test; p-wert = 0.015

Für die Verteilung innerhalb der symptomatischen Patientengruppe gilt: Chi²-Test; p-wert = 0.003

Stellt man die gleiche Korrelation für Perilipin auf, so bietet sich ein ähnliches Bild. Dies veranschaulicht Abbildung 31.

Von allen instabilen Plaques innerhalb der asymptomatischen Patientengruppe exprimierten 95.24% Perilipin. Von allen stabilen Plaques der asymptomatischen Patientengruppe exprimierten 33.33% Perilipin. Ein p-wert<0.001 zeigt den signifikanten Zusammenhang dieser Korrelation. Bezüglich der symptomatischen Gruppe konnte in den instabilen Plaques Perilipin in 73.17% nachgewiesen werden, lediglich 17.65% der stabilen Plaques exprimierten Perilipin. Auch dieses Korrelat konnte statistisch signifikant (p<0,001) belegt werden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Perilipin und PAPP-A in instabilen Plaques sowohl bei asymptomatischen und symptomatischen Patienten signifikant häufiger exprimiert werden, wobei dieser Zusammenhang besonders in der asymptomatischen Gruppe ausgeprägt ist, er gilt aber auch für die symptomatische Patientengruppe.

Abbildung 31

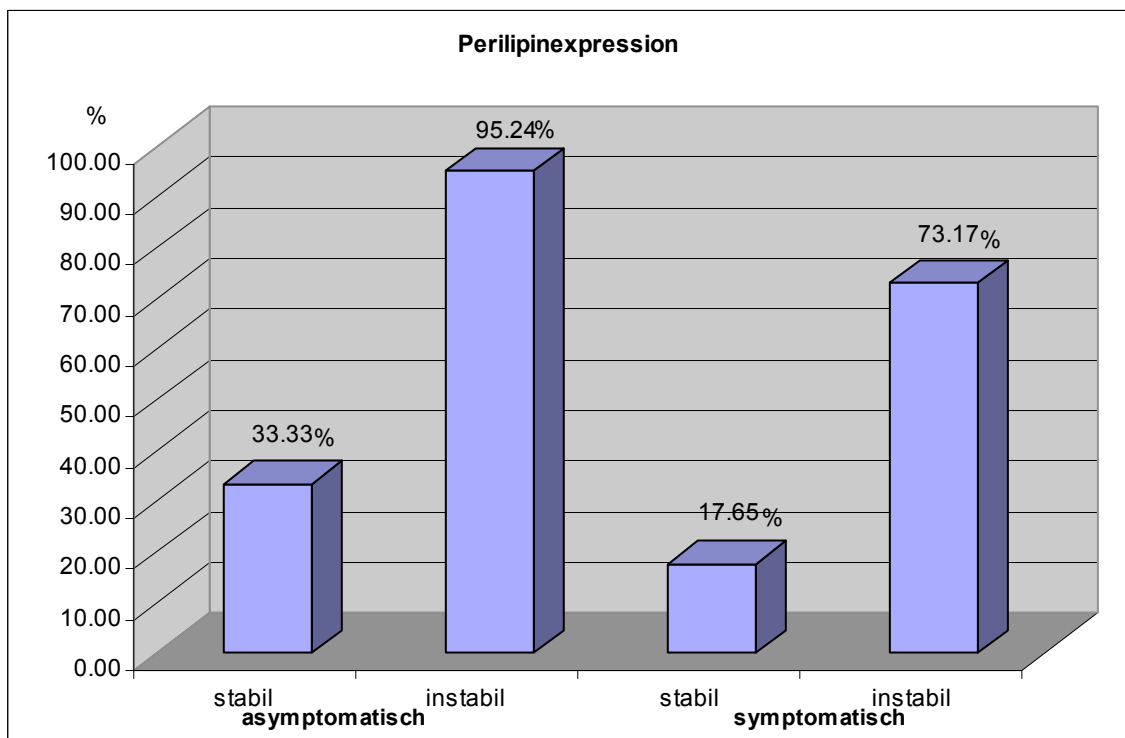


Abbildung 31 zeigt die Verteilung der Perilipin Expression zwischen allen instabilen und stabilen histologischen Schnitten bei asymptomatischen und symptomatischen Patienten.

Für die Verteilung innerhalb der asymptomatischen Patientengruppe gilt: Chi²-Test; p-wert < 0.001

Für die Verteilung innerhalb der symptomatischen Patientengruppe gilt: Chi²-Test; p-wert < 0.001

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Perilipin und PAPP-A in instabilen Plaques sowohl bei asymptomatischen und symptomatischen Patienten signifikant häufiger exprimiert werden, wobei dieser Zusammenhang besonders in der asymptomatischen Gruppe ausgeprägt ist, er gilt aber auch für die symptomatische Patientengruppe.

4 Diskussion

Laut Angaben des statistischen Bundesamtes ist der Schlaganfall die dritthäufigste Todesursache der westlichen Industrienationen nach malignen Erkrankungen und den ischämischen Herzerkrankungen. Dabei ist die Ruptur von Plaques der A. carotis und die daraus resultierende distale Embolie von atheromatösen Ablagerungen der häufigste zugrundeliegende pathogenetische Mechanismus einer zerebralen Ischämie. Eher noch als der Stenosegrad der A. carotis erscheint die morphologische, arteriosklerotische Plaquekomposition von zentraler Bedeutung zur Risikostratifizierung einer Plaqueruptur mit nachfolgendem ischämischem Ereignis. Die wesentlichen histologischen Charakterzüge einer vulnerablen Plaque setzen sich aus neointimalen Einblutungen, Atheromen, einer dünnen fibrösen Kappe und einer erhöhten Zahl an inflammatorischen Zellen, vorzugsweise Monozyten und Makrophagen zusammen. Eine Plaqueruptur mit konsekutiver Embolie aufgrund einer Formation von thrombotischem Material durch frühzeitige Detektion zu vermeiden, ist oberstes Ziel cerebrovaskulärer Wissenschaft.

Obwohl diverse neue Verfahren im technischen Bereich, wie z.B. die optische Kohärenztomografie, die intravaskuläre Sonographie in Kombination mit der Thermographie, die Elastographie und die Photonenspektroskopie entwickelt wurden, um die arteriosklerotische Gewebekomposition zu evaluieren, gestaltet sich die Vorhersage eines cerebrovaskulären Geschehens im klinischen Alltag besonders für asymptomatische Patienten weiterhin schwierig (23). Erschwerend kommt hinzu, dass sich dererlei Verfahren aufgrund hoher Kosten und Invasivität nicht auf ein breites Patientenkollektiv anwenden lassen (23).

Vor diesem Hintergrund steht die Etablierung eines sensitiven, spezifischen und frühen Markers für instabile Plaques, der diese indirekt und nicht invasiv detektiert, und dessen Blutserumkonzentration rechtzeitig vor einem akuten Geschehen ansteigt. In dieser hier vorliegenden Studie wurden zwei potentielle Marker instabiler Plaques untersucht, PAPP-A und Perilipin. PAPP-A ist eine hochmolekulare zinkbindende Metalloproteinase, die auf indirektem Weg die Bioverfügbarkeit von IGF-1 erhöht und dadurch als Mediator der Arteriosklerose fungiert.

Eine Überexpression an Perilipin hat eine Lipidakkumulation in Makrophagen zur Folge, da Perilipin die Hydrolyse von Lipiden blockiert, was in Folge zur abnormalen Retention von Lipiden in der Gefäßwand führt. In der hier vorliegenden Studie wurden diese beiden Proteine mittels Immunhistochemie nach Desobliterationen der A. carotis

auf ihre potentielle Fähigkeit als Marker für instabile Plaques untersucht. Dies ermöglicht eine frühzeitige Detektion derjenigen Plaques, die im Begriff sind, sich instabil zu entwickeln. Damit hätten diese biochemischen Marker Potential, wesentlich zur Verbesserung des Schlaganfall Qualitätsmanagements beizutragen.

Als Hypothese dieser Studie wurde angenommen, dass PAPP-A und Perilipin positiv mit der Instabilität der Carotisplaques korrelieren, ebenso wurde eine Korrelation für beide Marker mit der klinischen Neurologie der Patienten angenommen.

Als weitere Hypothese wurde angenommen, dass bestimmte instabile Plaquekomponenten mit der klinischen Neurologie korrelieren, dass es Unterschiede zwischen PAPP-A und Perilipin bezüglich der Stabilität bzw. der klinischen Neurologie gibt und dass sich weiterhin PAPP-A und Perilipin bezüglich den histologischen Stadien unterscheiden.

4.1 Material und Methoden

4.1.2 Immunhistochemie

Immunhistochemie stellt heute eine Standardmethode in der molekularen Pathologie dar. Neben exakter zweidimensionaler Auflösung ermöglicht die spezifische Färbung von Oberflächenantigenen eine genaue Phänotypisierung des histomorphometrischen Aufbaus physiologischer und pathologischer Gewebetypen. Einen Nachteil der Immunhistochemie stellt die Tatsache dar, dass es sich dabei um eine ex-vivo Momentaufnahme eines pathophysiologischen Zustandes handelt und funktionelle Aussagen über das betreffende Gewebe nur in beschränktem Zustand möglich sind.

4.1.3 Morphometrische Vermessung mittels Sigma Scan

Ziel der Analyse war die übersichtliche Evaluierung der gesamten Plaquekomposition.

Aufgrund der heterogenen Plaquezusammensetzung, stellen herkömmliche Verfahren wie die klassische Gesichtsfeldauszählung keine geeignete Methode dar, eine repräsentative Quantifizierung des gesamten Plaques zu gewährleisten.

SigmaScan Pro Image Analysis Version 5.0.0 ermöglicht, jedes einzelne Flächenmaß der Zellakkumulation zu erfassen, dieses zu vermessen und das Flächenmaß einzelner Areale zu addieren. Diese Methode entspricht einer semiquantitativen Darstellung der

prozentualen Verteilung von Zelltypen. Durch Addition der einzelnen Maße war es möglich spezifische Zellexpressionen in einem Plaque zu erfassen. Kein anderes bekanntes Verfahren erzielt ein vergleichbar genaues Ergebnis.

4.2 Diskussion des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv der hier vorliegenden Studie war in Bezug auf Geschlecht, Alter, Risikofaktoren, Medikation sowie Stenosegrad der A. carotis konform zu vergleichbaren Studien mit ähnlicher Thematik (8,25,100).

Bezüglich dem prozentualen Anteil an Patienten mit Risikofaktoren für Arteriosklerose ist das Patientenkollektiv charakteristisch für Studien ähnlicher Art (6). Ebenso ist der prozentuale Anteil der Patienten, die mit ASS, Beta-Blocker, ACE-Hemmer, Statine oder Nitrate therapiert wurden konform zu vergleichbaren Studien (6).

Der durchschnittliche Stenosegrad betrug 86 ± 7.8 in der asymptomatischen Gruppe und 88 ± 11.3 in der symptomatischen Gruppe und liegt damit etwas über dem durchschnittlichen Stenosegrad anderer Studien. Sangiorgi et al geben für die Gruppe der asymptomatischen Patienten einen Stenosegrad von 80.6 ± 8.0 % und für symptomatische Patienten 80.3 ± 6.2 % (100) Cosin-Sales beschreiben, dass 72.2% aller Patienten eine Carotisstenose von $\square\square\square\square$ aufwiesen (25).

Ein Nachteil dieser Studie stellt das verhältnismäßig kleine Patientenkollektiv dar. Da jedoch aufgrund der eindeutigen klinischen Symptomatik eine klare Einteilung in symptomatische und asymptomatische Stenosen möglich war und ebenso eine standardisierte Einteilung der Läsionen in stabile und instabile Plaques vorgenommen wurde, konnten beide Parameter erfolgreich miteinander korreliert werden. Da für ein Plaque Präparat jeweils 4-6 Schnitte angefertigt wurden, konnten entsprechend 108 einzelne Morphologien in stabil versus instabile Läsion eingeteilt werden und mit dem definierten Parameter symptomatische versus asymptomatische Stenose korreliert werden. Die resultierende Anzahl verglichener Präparate ermöglichte eine valide statistische Auswertung in Bezug auf Gruppengröße und Merkmalsverteilung.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Die Auswirkung von Plaqueatheromen als Faktoren der Plaqueinstabilität auf die neurologische Symptomatik der Patienten

Die Indikation zur CEA wird heutzutage aufgrund des prozentualen Stenosegrades der A. carotis sowie anhand der klinischen Symptomatik eines Patienten gestellt. Beide dienen als wesentliche Parameter um die Erfolgsrate einer CEA abzuschätzen (29,37,49).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die arterio-arterielle Embolie aus rupturierten Läsionen der A. carotis die pathophysiologisch häufigste Ursache für passagere oder irreversible cerebrale ischämische Insulte darstellt (13,36,46,85,92,100,110,113). Aufgrund dieser Tatsache ist die Evaluierung von instabilen Strukturen der Plaquekomposition und deren Auswirkung auf die klinische Neurologie eines Patienten von Bedeutung.

Tatsächlich wurde bereits vielfach der Versuch unternommen, strukturelle, instabile Charakteristika von Plaques der A. carotis in Beziehung zu symptomatischen und asymptomatischen Patienten zu setzen (41,83,105). So beschäftigte sich beispielsweise eine große Zahl von Studien mit der Frage ob Hämorrhagien, Thrombosen, oder Ulcerationen Einfluss auf die klinische Neurologie oder die Stabilität eines Plaques ausüben (20,48,54,63,81,98,104). Allerdings bleibt die Assoziation zwischen Hämorrhagie, Thromben und den daraus entstehenden Symptomen weiterhin kontrovers (27,86) und eignen sich nur ungenügend um anhand der Neurologie auf die Plaquekomposition oder umgekehrt zu folgern.

Atherome sind ein weiteres strukturelles Charakteristikum instabiler Plaques (106). In der hier vorliegenden Studie wurden Atherome, bestehend aus verschiedenen Qualitäten und deren Auswirkung auf die klinische Neurologie untersucht.

Insgesamt wurden sechs verschiedene Atheromtypen und deren Auswirkung auf die Neurologie untersucht. Als Einzelfaktoren wurden Atherome aus Cholesterin, kalzifizierte Atherome und Atherome bestehend aus extrazellulärer Matrix näher betrachtet (s.h. Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). Da sich Atherome auffallend oft aus diesen drei Gewebetypen zusammensetzten, wurden zudem Gewebetypen in Kombination ausgewertet (Kalzifikation/Cholesterin gemischt; extrazellulärer Matrix /Cholesterin gemischt; sowie extrazellulärer Matrix/Kalzifikation und Cholesterin gemischt). So konnte ein realistischeres Bild des tatsächlichen Plaqueaufbaus gezeichnet werden.

Untersucht man diese Atherome allein auf deren Vorhandensein innerhalb arteriosklerotischer Plaques und lässt eventuell vorhandene Größenunterschiede außer Acht, so konnte trotz einer erweiterten Betrachtung verschiedener Atheromqualitäten in dieser Studie für keines der sechs unterschiedlichen Atherome ein signifikanter Unterschied bezüglich asymptomatischer und symptomatischer Plaques festgestellt werden. So hat weder ein Atherom bestehend aus reinem Cholesterin, ein kalzifiziertes Atherom, ein Atherom bestehend aus extrazellulärer Matrix, noch ein Atherom, das sich aus Cholesterin/Kalzifikation oder Cholesterin/extrazelluläre Matrix oder Cholesterin/Kalzifikation/extrazelluläre Matrix Gewebetypen zusammensetzt, eine signifikante Auswirkung auf die Neurologie eines Patienten.

Bezieht man allerdings die unterschiedlichen Größen der Atherome in die Betrachtung mit ein, so ergibt sich ein differenzierteres Bild. Die bereits beschriebenen sechs verschieden klassifizierten Atherome dieser Studie wurden morphometrisch vermessen und die so erhaltene Fläche mit der Neurologie in Zusammenhang gebracht. (s.h. Kapitel 3.3.2). Die Größe der Atherome, bestehend aus Cholesterin oder extrazellulärer Matrix, sowie deren Kombinationen zeigten keinerlei signifikante Korrelation mit der klinischen Symptomatik. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass kalzifizierte Atherome mit zunehmender Größe signifikant häufiger in Plaques gefunden wurden, welche von asymptomatischen Patienten stammten.

Eine kalzifizierte arteriosklerotische Läsion wird nach der AHA Klassifikation als fortgeschrittene Läsion bezeichnet und ist gekennzeichnet durch Plaquekomplikationen wie Einblutung, intramuraler Thrombusbildung, Kalzifikation und Plaquefissuren. Da in der vorliegenden Studie keine Korrelation der kalzifizierten Plaques mit neurologischen Komplikationen gefunden werden konnte, bedeutet dies, dass besonders bei asymptomatischen, und somit klinisch unauffälligen Patienten die Gefahr einer plötzlich eintretenden Plaqueruptur besteht. Dadurch lässt sich folgern, dass Atherome, bestehend aus den beschriebenen Gewebetypen zwar instabile, morphologische Plaquekomponenten darstellen, sie korrelieren jedoch nicht mit der klinischen Neurologie.

Dies bedeutet, dass die Komposition des Plaques alleine nicht die neurologische Symptomatik bedingt, möglicherweise sind die Atherome selbst, ungeachtet ihrer Gewebetypen relativ stabil, und es sind vielmehr aktive Vorgänge auf zellulärer Ebene, in der fibrösen Kappe oder im Bereich des Atheroms, die einen Plaque destabilisieren und letztendlich zur Ruptur führen. Dieses Erkenntnis erlaubt somit nicht, anhand der Neuro-

logie Aussagen über den Atheromgewebetyp zu machen oder noch wichtiger, aufgrund fehlender neurologischer Ereignisse einen instabilen Plaque mit Atherom auszuschließen.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Studie mit der Literatur ähnlicher Untersuchungen so ergeben sich unterschiedliche Resultate. Seeger et al konnten zeigen, dass ein erhöhter Cholesterin- und Lipidgehalt in Carotisplaques enthalten war, die symptomatischen Patienten entnommen worden waren, verglichen mit denjenigen von asymptomatischen Patienten (102). Dies wurde durch die Aussagen von Feeley et al bekräftigt, wonach Plaques, welche symptomatischen Patienten entnommen worden waren weniger fibrotisches Gewebe und Kollagen enthielten und mehr Gewebe enthielten, welches als „softes pinkes“ Material bezeichnet wurde (40). Es wurde vermutet, dass es sich bei diesem Material um eine Mischung aus Cholesterin, Hämorrhagie, Fibrin und ein nicht näher definiertes amorphes Material handelte. Dies wurde jedoch nicht durch histologische Analysen gesichert. Zudem wurde jeweils nur eine kleine Fallzahl untersucht.

Analog der Studie von Seeger et al konzentrierten sich die überwiegende Mehrzahl derartiger Studien lediglich auf einzelne Atheromsubstanzen (z.B. Cholesterin oder Kalzifikation). Plaques setzen sich jedoch selten aus nur einer Atheromqualität zusammen, auffallend häufig bestehen Atherome aus gemischten Substanzen. Dies wird allerdings in den meisten Studien nicht berücksichtigt. Um die Auswirkungen eines möglichst realen Plaqueaufbaus auf die klinische Neurologie zu untersuchen, wurden in dieser hier vorliegenden Studie sechs verschiedene Atherometypen untersucht.

In der hier vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen dem Atheromgewebetyp und der klinischen Neurologie eines Patienten festgestellt werden. Dieses Resultat deckt sich mit einer Reihe weiterer Studien.

Saam et al untersuchten lipidreiche Atherome sowie kalzifizierte Atherome und konnten keine Korrelation mit neurologischen Symptomen feststellen (89). Gestützt werden diese Resultate durch die Beobachtungen von Bassiouny et al (5). Danach bestimmt die morphologische Komplexität der arteriosklerotischen Plaque, welche zur Carotisstenose führt, nicht deren Symptomatik. Die Symptomatik wird nach Bassiouny et al vielmehr durch die Topographie der individuellen Plaque in Relation zur fibrösen Kappe und Lumen beeinflusst. In einer weiteren Studie von Bassiouny et al wurden 62 Carotisplaques untersucht, wobei keine signifikanten Differenzen zwischen asyptomatischen und symptomatischen Patienten bezüglich der morphologischen Plaquekompo-

sition gefunden wurden. Es wurde postuliert, dass der rupturierende Prozess, welcher der Plaqueinstabilität zu Grunde liegt, stark mit der Plaquegröße sowie mit dem Stenosegrad assoziiert werden kann (4). Hatsukami et al konnten in gleich zwei Studien zeigen, dass die allgemeine Plaquekomposition von Patienten mit hochgradigen Carotisstenosen, welche sich einer CEA unterzogen haben, ungeachtet des präoperativen neurologischen Status sehr ähneln (54,55).

In Anbetracht der Tatsache, dass keiner der bisher beschriebenen Instabilitätsfaktoren (Hämorrhagie, thrombotische Ereignisse, Atherome.) in einem zuverlässigen Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik eines Patienten stehen, bedarf es weiterhin eines indirekten Instabilitätsmarker, um embolische Geschehen hinreichend avisieren zu können. Betrachtet man die morphologische Zusammensetzung einer zum Zeitpunkt der CEA entnommenen Plaque, so handelt es sich immer um eine Momentaufnahme und es erscheint diffizil anhand eines bestimmten morphologischen Plaquebestandteils zu diesem Zeitpunkt Aussagen über die Wahrscheinlichkeit eines embolischen Ereignisses zu machen. Es wird ein Verlaufsparmeter benötigt, der indirekt, aktiv inflammatorisches Geschehen erfasst. Ausgehend von dieser Überlegung wurde in einem weiteren Schritt dieser Studie auf die aktiv zellulären Mechanismen innerhalb einer Plaque und deren Korrelation sowohl mit der Stabilität einer Plaque als auch der Neurologie eines Patienten eingegangen.

4.3.2 Makrophagen und Schaumzellen als Zeichen zellulär aktiver inflammatorischer Entzündungsvorgänge innerhalb arteriosklerotischer Plaques der A. carotis und deren Einfluss auf die Plaquestabilität

Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte morphologische Plaquekomponenten, wie z.B. Atherome zwar Merkmale instabiler Plaques sind, es konnte jedoch weiterhin belegt werden, dass die Komposition der Plaques alleine nicht zu neurologischen Symptomen führt. Infolgedessen wurde die Hypothese gestellt, dass die Plaquekomposition nicht die alleinige Ursache für die Plaquerruptur darstellt, sondern vielmehr aktive Vorgänge auf zellulärer Ebene verantwortlich für die Ruptur der fibrösen Kappe gemacht werden können.

Während der Auswertung der über 400 histologischen Schnitte dieser Studie war auffallend, dass die Makrophagenzahl in Plaques deutlich erhöht war, welche ein Atherom enthielten, verglichen zu Plaques in denen kein Atherom vorhanden war. Außerdem waren Makrophagen besonders ausgeprägt in der Plaqueschulter und im Bereich der fibrösen Kappe angesiedelt. Diese Beobachtungen decken sich mit dem AHA Report, in welchem Stary et al fortgeschrittene, arteriosklerotische Läsionen histologisch klassifizierten und eine ähnliche Verteilung der Makrophagen innerhalb des Plaques beschreiben (108). Bassiouny et al Plaques kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass Plaques, in denen sich aktive Entzündungsprozesse abspielen, durch eine beträchtliche Makrophagenakkumulation identifiziert werden können (5).

Aus Analysen von Koronararterien ist bekannt, dass eine hohe Zahl an inflammatorischen Zellen sowie hohe Level an Zytokinen und Proteasen innerhalb arteriosklerotischer Plaques mit Koronarsyndromen assoziiert werden können. Anhand retrospektiver Autopsie Studien von Koronargefäßen untersuchten Kolodgie et al Plaques, welche als Ursache von kardialen Ereignissen betrachtet wurden. Diese vulnerablen Plaques waren ebenfalls durch eine hohe Dichte an Makrophagen gekennzeichnet. (50,64,101). Broz et al bezeichneten Makrophagen in ihrer erst vor kurzem publizierten Studie als zelluläre Schlüsselemente der Pathogenese arteriosklerotischer Plaques (18).

In der hier vorliegenden Studie konnte weiterhin ein signifikanter Zusammenhang zwischen Makrophagen und Schaumzellen festgestellt werden. (s.h. Kapitel 3.2.3) Je mehr Makrophagen in einer Plaque vorhanden waren, umso mehr Schaumzellen befanden sich darin. Dieser Zusammenhang wurde sowohl von Orozco et al, als auch durch Forcheron et al näher untersucht und bestätigt (42,89). Da es sich bei Schaumzellen allerdings um aktivierte Makrophagen handelt und der Übergang fließend ist, kann man lediglich von Feldern in einer Plaque sprechen in der überwiegend Makrophagen die vorherrschenden Zellen waren und Felder in denen überwiegend Schaumzellen gefunden werden konnten. Allerdings konnte zusätzlich beobachtet werden, dass die Makrophagendichte mit der Schaumzellexpression nicht in einem linearen Zusammenhang steht. Trotz steigender Dichte an Makrophagen stagniert die Schaumzellexpression, so dass die Kurve ein Plateau formt s.h. (s.h. Kapitel 3.2.3; Abb. 14).

Darüber hinaus war eine steigende Schaumzelleexpression im Zuge einer vermehrten Kapillarisation auffällig (s.h. Kapitel 3.2.3; Abb.15), welche sich möglicherweise auf eine lokale Inflammationsreaktion zurückführen lässt. Jeziorska et al bestätigten dieses Ergebnis, in ihrer Studie wurden 55 Carotisplaques auf Neovaskularisation untersucht und ebenfalls in fortgeschrittenen Plaquestadien eine vermehrte Neovaskularisation sowie eine verstärkte Akkumulation von Makrophagen verzeichnet (61). Dies deutet darauf hin, dass eine Neovaskularisation im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens ein bedeutendes Merkmal im Verlauf der Plaqueprogression darstellt, da diese potentiell eine zusätzliche oder alternative Quelle für das Einschwemmen von inflammatorischen Zellen aus dem Arterienlumen bietet (61).

Desweiteren konnte festgestellt werden, dass eine exzessive Akkumulation aktivierter Makrophagen (Schaumzellen) signifikant stärker in instabilen Plaques exprimiert war, verglichen zu stabilen Plaques (s.h. Kapitel 3.2.4; Abb.19). Die intensive inflammatorische Aktivität dieser Zellen innerhalb der arteriosklerotischen Plaques kann zur lokalen Proteolyse führen und hat damit letztendlich die Ruptur der fibrösen Kappe zur Folge (53). Infolgedessen lässt sich eine exzessive Akkumulation aktivierter Makrophagen (Schaumzellen) innerhalb arteriosklerotischer Plaques als Risikofaktor für cerebrale Ereignisse klassifizieren. Broz et al bestätigen diese Aussage und beschreiben Makrophagen ebenfalls als signifikanten Risikofaktor einer Plaqueruptur (18). Anhand Studien von Koronararterien konnte in einer weiteren Untersuchung von Buffon et al festgestellt werden, dass in einer beträchtlichen Anzahl an Patienten der rasche Übergang von stabiler zu instabiler koronarer Herzkrankheit mit einer ausgedehnten inflammatorischen Zellinfiltration einhergeht. Weiterhin ließ sich bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom sowohl eine ausgedehnte Inflammation in Serumproben der Koronargefäßen feststellen, als auch eine systemische Aktivierung des Inflammationssystems (19). Dies ließ sich weder durch die allgemeine arteriosklerotische Belastung, noch durch ischämische Geschehen oder Aktivierung des hämostatischen Systems erklären, demnach spielt die chronische Inflammation eine wesentliche Rolle, nicht nur in der Plaqueprogression, sondern auch in deren Stabilität und letztendlich deren Ruptur und stellt nach Buffon et al das Konzept eines einzelnen vulnerablen Plaques als Ursache der instabilen Herzkrankheit in Frage (19).

Allerdings unterscheiden sich die Methoden der beschriebenen Studien von den Methoden der hier vorliegenden Studie, da die Ergebnisse durch Messung verschiedener Entzündungsparameter im Serum festgestellt wurden und nicht, wie in der hier vorliegenden Arbeit durch histologische Evaluierung. Die Ergebnisse dieser hier präsentier-

ten Studie werden bekräftigt durch die Aussagen einer vergleichbaren Studie von Inoue et al. Diese führten immunhistochemische Untersuchungen durch und untersuchten die Expression eines Spätphasemediators HMGB1 (High-mobility group box 1), welcher durch Makrophagen freigesetzt wird. In arteriosklerotischen Plaques der Koronarien und Carotiden war HMGB1 reichlich vorhanden, jedoch nicht in den glatten Muskelzellen der Media normaler Gefäße (59).

Das aktive inflammatorische Geschehen durch Makrophagen und Schaumzellen innerhalb arteriosklerotischer Plaques stellt damit einen Prozess dar, der zur Plaque-destabilisierung und schließlich zur Plaqueruptur führt, dies konnte in der hier vorliegenden Studie eindeutig belegt werden.

4.3.3 PAPP-A als potentieller indirekter Marker für Plaqueinstabilität arteriosklerotischer Plaques in der A. carotis

Es konnte gezeigt werden, dass aktiv inflammatorische Vorgänge wesentlich zur Plaqueinstabilität und Ruptur beitragen. Da allerdings die Plaqueinfiltrate und darunter auch die inflammatorischen Zellen (Makrophagen, Schaumzellen, Monozyten, etc.) mittels nicht invasiver Bildgebung nur sehr ungenau quantifizierbar sind, bedarf es eines Markers, der ein Bestandteil inflammatorischer, endokriner Kaskaden innerhalb arteriosklerotischer Plaques darstellt und darüber hinaus im Serum messbar ist.

Es gilt den lokal inflammatorischen Prozess der arteriosklerotischen Plaques und die daraus resultierenden Komplikationen möglichst frühzeitig durch spezifische Serumpa-rameter nicht invasiv zu beurteilen.

Liuzzo et al berichteten zum ersten Mal, dass systemische Konzentrationen an C-reactive protein (CRP), bei Patienten mit instabiler Angina pectoris erhöht waren und mit einer erhöhten Rate an erneuten kardialen Ereignissen assoziiert werden konnten (102). Systemische Entzündungsindikatoren, wie beispielsweise CRP und Interleukin-6 Titer können heutzutage routinemäßig anhand von Serumproben festgestellt werden. Hansson et al zeigten, dass eine Vielzahl an zirkulierenden inflammatorischen Zytoki-nen und anderen Marker der Akut-Phase-Reaktion (CRP, Interleukin 6, Fibrinogen, In-terleukin 7 Interleukin 8, Pentraxin 3) mit einem höheren Risiko einer Erkrankung der Koronararterien assoziiert sind. Obwohl es unwahrscheinlich ist, dass diese Entzün-dungsparameter selbst die Erkrankung initiieren, so reflektieren sie doch den inflamma-torischen Prozess der Arterien, aber auch anderer Gewebe (50,99). Darin liegt die Pro-

blematik, CRP ist ein unspezifischer Marker für Entzündungsvorgänge und nicht spezifisch für Arteriosklerose. Dies erfordert Biomarker, die Plaque- bzw. Gefäßgewebe repräsentieren und kausal mit den Mechanismen der Plaqueruptur assoziiert werden können.

Darin ergeben sich die Vorteile von PAPP-A, da dieses in einer Form existiert, welche spezifisch aus arteriosklerotischen Plaques stammt und somit durch speziell entwickelte Immuntest mit hoher Spezifität und Sensitivität von weiteren PAPP-A Typen und allgemeinen Inflammationsmarkern im Serum differenziert werden kann (7,93). Es existieren ebenfalls mehrere Isoformen des Perilipin. Allerdings lässt sich anhand der vorhandenen Literatur nicht mit Gewissheit sagen, ob es eine Isoform des Perilipin gibt, die nur in arteriosklerotischen Läsionen exprimiert wird. Hofnagel et al untersuchten die Perilipinexpression in fortgeschrittenen, arteriosklerotischen Plaques von Koronararterien und konnten Perilipin deutlich nachweisen, während Perilipin-B nur schwach exprimiert war (58). Ob Perilipin ein spezifischer Marker für Arteriosklerose ist, muss durch weitere Studien erhärtet werden.

In dieser Studie wurde angenommen, dass PAPP-A durch aktivierte Makrophagen in arteriosklerotischen Plaques exprimiert wird und in seiner Funktion als Protease wesentlich zur Plaqueruptur beiträgt. Da PAPP-A in einen direkten signifikanten Zusammenhang mit aktivierten Entzündungszellen (Makrophagen, Schaumzellen) gebracht werden konnte (s.h. Kapitel 3.2.3; Abb. 17), wird in der hier vorliegenden Arbeit postuliert, dass die Expression von PAPP-A nicht als Reaktion auf ein Entzündungsgeschehen angesehen werden darf sondern vielmehr, dass PAPP-A über IGF-1 eine aktive Funktion im Inflammationsprozess mit konsekutiver Plaquebildung übernimmt. Bereits mehrfach wurde die proarteriosklerotische Wirkung von PAPP-A beschrieben und aufgrund der Erkenntnis über dessen Degradation von IGF-BPs-4 und -5 von einer aktiven Protease ausgegangen (25,26). Diese Hypothese wird allerdings durch einige klinische und experimentelle Studien hinterfragt, welche annehmen, dass IGF-1 eine protektive Funktion gegen ischämische Ereignisse besitzt. Tatsächlich wurde in prospektiven Studien ein vermindertes, zirkulierendes IGF-1 mit koronarer Herzkrankheit, Zunahme der Dicke von Intima und Media, Glukoseintoleranz und Myokardinfarkt sowie Herzversagen und Tod aufgrund kardiovaskulärer Ursachen assoziiert (24,62). Angenommen IGF-1 sei tatsächlich kardioprotektiv, so müssten erhöhte PAPP-A Werte durch ihre Fähigkeit die Bioverfügbarkeit von IGF-1 zu erhöhen ebenfalls kardioprotektiv wirken. Es wurde allerdings beobachtet, dass sowohl erniedrigte IGF-1 Werte als auch erhöhte PAPP-A Level kardioprotektive Wirkung zeigen. Laut Crea et al liegt die einzig mögliche Begründung darin dass PAPP-A keine ursächliche, aktive Funktion

besitzt sondern vielmehr reaktiv auf vaskuläre und myokardiale Verletzung reagiert (26). Dies entspricht nicht der Vorstellung der pathogenetisch aktiven Rolle von PAPP-A, wie sie in der hier vorliegenden Studie vertreten wird. Eine Begründung, welcher alternativen endokrinen Kaskade PAPP-A zu Grunde liegen könnte, bleibt allerdings in der Studie von Crea et al aus. Für eine aktive Funktion des PAPP-A spricht auch die kürzlich veröffentlichte Studie von Resch et al (96). Diese Gruppe untersuchte PAPP-A knock out Mäuse versus wild-type Mäuse nach Ligation der A. carotis um die Hypothese der vaskulären, neointimalen Hyperproliferation nach Verletzung zu eruieren. Wild-type Mäuse zeigten nach Verletzung einen ausgesprochenen Anstieg an PAPP-A in Verbindung mit einer progressiven neointimalen Hyperplasie bis hin zur Totalokklusion des Gefäßes. Bei PAPP-A knock-out Mäusen blieb dieser Effekt aus (96). Infolgedessen liegt es Nahe, dass PAPP-A in seiner Rolle innerhalb Inflammationsreaktionen eine aktive Funktion übernimmt und der Regelkreis Makrophagen, Schaumzellen, IGF-1 wie er in Kapitel 1.5.2 beschrieben wurde, kann belegt werden. Es bedarf allerdings weiterer Studien zur Verifizierung dieser These.

Es konnte in der vorliegenden Studie weiterhin gezeigt werden, dass sowohl Schaumzellen, als auch PAPP-A unabhängig voneinander, signifikant mit den Kriterien der instabilen Plaque assoziiert werden können (s.h. Kapitel 3.2.4) jenen Plaques, die reich an Inflammation und Zellinfiltration sind (106). Die Expression von PAPP-A durch aktivierte Zellen scheint somit stark an lokale Inflammationsprozesse innerhalb der Arterienwand gekoppelt zu sein. Da PAPP-A in stabilen Plaques ohne Atherom deutlich weniger nachgewiesen wurde (s.h. Kapitel 3.2.4), ist PAPP-A möglicherweise in den strukturellen, atheromatösen Veränderungen der Arterienwand involviert und ein Anstieg dieser Proteinase könnte das Stadium innerhalb der Plaqueprogression repräsentieren, in dem eine Plaque instabil wird.

Das Resultat der hier vorliegenden Studie, dass PAPP-A als Marker instabiler Plaques bezeichnet werden kann, konnte durch eine vergleichbare Studie von Bayes-Genis bestätigt werden. PAPP-A wurde durch Bayes-Genis zum ersten Mal im Zusammenhang mit Arteriosklerose beschrieben. Dabei wurden ebenfalls immunhistochemische Plaqueanalysen durchgeführt und von den Autoren hohe Werte an PAPP-A in rupturierten Plaques verglichen zu stabilen Plaques festgestellt. Weiterhin fanden sie erhöhte zirkulierende PAPP-A Serumlevel in Patienten mit akuten Koronarsyndromen (6). Die Resultate von Bayes-Genis et al können nicht beantworten, welche diagnosti-

sche und prognostische Relevanz PAPP-A bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen oder cerebrovaskulären Syndromen hat.

Entsprechend der Studie von Bayes-Genis wurden die meisten der Untersuchungen zu PAPP-A an Koronargefäßen im Zusammenhang mit ACS durchgeführt. Allen Studien ist aber gemein, dass letztlich jegliche Ereignisse, cerebral oder kardial, aus einer Aktivität der arteriosklerotischen Plaques resultieren, dies entspricht der Erkenntnis der hier vorliegenden Studie und erlaubt somit den Vergleich mit kardiovaskulären Untersuchungen.

4.3.4 Die diagnostische Bedeutung von PAPP-A als Marker instabiler arteriosklerotischer Plaques

In dieser Studie wurde PAPP-A mit der klinischen Neurologie korreliert, dabei war besonders auffallend, dass PAPP-A nicht nur signifikant häufiger in instabilen Plaques gefunden wurden, sondern auch signifikant häufiger bei asymptomatischen Patienten (s.h. Kapitel 3.3.3; Abb.28) Danach ist der am meisten gefährdete Patient für ein plötzliches embolisches Geschehen nicht etwa der klinisch symptomatische Patient mit hochgradiger Carotisstenose, sondern der asymptomatische Patient. Die diagnostische Bedeutung von PAPP-A als Marker einer vulnerablen Plaque wäre damit besonders für asymptomatische Patienten relevant. Cosin-Sales et al gingen der Frage nach, ob PAPP-A bei Patienten mit chronisch stabiler Angina pectoris möglicherweise als Marker eines vulnerablen arteriosklerotischen Plaques dienen könnte (25). Sie kamen zu dem Schluss, dass bei asymptomatischen Patienten erhöhte PAPP-A Werte mit arteriosklerotischen Läsionen assoziiert werden konnten, die sich nach der AHA in Typ V oder höher einteilen ließen und damit als instabil gelten (106). Damit unterstreicht die Studie von Cosin-Sales et al die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie, PAPP-A erwies sich ebenfalls geeignet zur Diagnose von instabilen Plaques asymptomatischer Patienten.

Generell gilt, dass PAPP-A bislang hauptsächlich an Koronarien untersucht wurde, über die Bedeutung für den Carotisplaque, welcher in der vorliegenden Studie untersucht wurde, ist bislang wenig bekannt. PAPP-A wurde an der A. carotis durch Beaudeau et al beschrieben. Hier zeigte sich, dass PAPP-A bei asymptomatischen Patienten sowohl mit einer ausgeprägten Inflammationsreaktion als auch mit der Echogenität der Plaquestrukturen assoziiert werden kann. Die Plaquemorphologie wurde durch Sonographie nicht invasiv beurteilt und zeigte, dass hypoechogene, frühe Pla-

questadien geringere PAPP-A Serum Level aufwiesen, während fortgeschrittene Stadien hohe Level an PAPP-A exprimierten (8). Allerdings muss darauf verwiesen werden, dass eine Hypercholesterinämie als voraussetzendes Einschlusskriterium der oben zitierten Studie galt. Somit wurden ausschließlich Patienten evaluiert bei denen erhöhte Werte an Cholesterin bzw. Triglyceride gemessen werden konnten (serum total cholesterol 5.2 mmol/L und/oder Triglyceride 1.7 mmol/L). Daraus ergibt sich die Frage inwieweit sich Interferenzen zwischen PAPP-A und einem erhöhten Wert an Serumlipidwerten ergeben und ob PAPP-A möglicherweise mit dieser Hyperlipidämie assoziiert ist. Diese Korrelation wurde jedoch in der Studie von Beaudoux et al nicht näher untersucht.

Das Risiko eines Schlaganfalls bei asymptomatischen, hochgradigen Carotisstenosen ist im Allgemeinen allerdings gering. Dies konnte durch Longstreth et al gezeigt werden (78). In anderen Studien wurde der natürliche Krankheitsverlauf von Patienten mit asymptomatischen Carotisstenosen untersucht, dabei ging der Mehrheit aller Schlaganfälle, deren Ursache in der A. carotis lag, eine TIA voraus. Die Inzidenz von Schlaganfällen, welche nicht durch eine TIA angekündigt wurden, war relativ niedrig (30). Somit kann argumentiert werden, dass PAPP-A in seiner Relevanz als diagnostischer Marker eines drohenden Schlaganfalls bei asymptomatischen Patienten an Bedeutung verliert. Von einer anderen Perspektive aus betrachtet, beträgt die unangekündigte Schlaganfallrate einer asymptomatischen aber instabilen extrakraniellen Carotisstenose jedoch jährlich ungefähr 1-2% (22,33,71,87), eine Rate die eine hohe Inzidenz bezogen auf die Gesamtbevölkerung repräsentiert (47). Diese Perspektive fordert eine aggressivere Vorgehensweise bezüglich der Evaluation vulnerabler Plaques bei asymptomatischen Patienten. PAPP-A als Screening Marker für instabile Plaques könnte zur Diagnostik beitragen

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sich PAPP-A möglicherweise zur Diagnose einer drohenden Plaqueruptur eignet, inwieweit sich PAPP-A zur Diagnose eines akuten ischämischen Ereignisses eignet, wurde von weiteren Studien untersucht.

PAPP-A wurde mit Markern korreliert, welche akute ischämische Ereignisse am Myokard anzeigen (Ck-MB, Troponin T), dabei konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (63). In einer weiteren Studie fanden Dominguez-Rodriguez et al keine Differenzen bezüglich der PAPP-A Expression von 80 Patienten mit ST-Elevation verglichen zu Kontrollgruppen, in dieser Studie wurden auch keinerlei Korrela-

tionen zwischen PAPP-A und einer myokardialer Nekrose festgestellt. Die Proben wurden allerdings 6.3 ± 2.8 Stunden (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach Beginn der Symptome entnommen, somit proklamierten die Autoren, dass PAPP-A kein früher Marker eines kardialen ischämischen Ereignisses darstellt. Es ist daher anzunehmen, dass sich PAPP-A nicht zur Diagnose eines akuten Ereignisses eignet. Allerdings bedarf es noch weiterer Studien um die genaue Kinetik der PAPP-A Freisetzung in diesem Zusammenhang zu erklären und die korrespondierenden Bluttest zu etablieren. Anzumerken ist, dass es sich bei den oben beschriebenen Studien nicht um histologische Untersuchungen handelt, PAPP-A Werte wurden aus dem Serum ermittelt.

4.3.5 Die prädiktive Bedeutung von PAPP-A als Verlaufspareter zur Aussage von cerebrovaskulären Ereignissen

Die Bedeutung von PAPP-A als Verlaufspareter sowie als prognostischer Marker für cerebrovaskulären Ereignissen zeigte sich, indem PAPP-A mit der Dicke der fibrösen Kappe korreliert wurde (s.h. Kapitel 3.2.4; Abb.22). Erhöhte PAPP-A Werte korrelieren mit einer Abnahme der fibrösen Kappendicke. PAPP-A ist somit nicht nur in Inflammationsvorgängen maßgeblich beteiligt, sondern auch in der Degradation der fibrösen Kappe und letztendlich in der Ruptur der gesamten Plaque. Sangiorgi et al konnten den Zusammenhang zwischen PAPP-A und der Degradation der fibrösen Kappe ebenfalls zeigen und können damit die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen (100). Allerdings handelt es sich bei der Studie von Sangiorgi et al um eine Studie, bei der die Quantifizierung der PAPP-A Expression in fünf Stufen eingeteilt wurde, diese Einteilung ist zudem nicht schlüssig linear und aufgrund von Schätzwerten ungenau. Die morphometrische Vermessung der PAPP-A Expression in der hier vorliegenden Studie erlaubt eine exaktere Darstellung, da für jeden histologischen Schnitt die individuelle PAPP-A Expression bestimmt werden konnte.

Virmani et al beschrieben in ihrer Studie die charakteristische, rupturgefährdete arteriosklerotische Läsion. Diese ist demnach gekennzeichnet durch einen nekrotischen Kern bedeckt von einer fibrösen Kappe $< 65\mu\text{m}$. Es fanden sich wenig glatte Muskelzellen und zahlreiche Makrophagen. Läsionen dieser Art waren hauptsächlich in Patienten vorhanden, welche an einem akuten Myokardinfarkt gestorben waren.

Um Aussagen über den prognostischen Wert von PAPP-A in Patienten mit koronarer Herzkrankheit zu treffen, evaluierten Lund et al die PAPP-A Expression in 200

Patienten mit akuten Myokardinfarkt ohne Troponin T Anstieg. PAPP-A stellte sich als starker, unabhängiger Prädiktor für kardial ischämische Ereignisse bei Patienten mit Verdacht auf Myokardinfarkt ohne Troponin T Anstieg heraus (80). Auch Heeschen et al konnten in einer kürzlich veröffentlichten Studie belegen, dass PAPP-A zusätzliche, wertvolle prognostische Informationen bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom liefert (56).

Gestützt wurde diese Studie erst kürzlich durch die Ergebnisse von Elesber et al. Auch diese Gruppe postulierte dass PAPP-A ein unabhängiger prognostisch wertvoller Marker für ein akutes kardiales Ereignis bei chronisch stabiler Angina sei und Li X et al unterstrichen aktuell diese These noch einmal, indem auch sie PAPP-A eine bedeutende Rolle in der Kaskade von arteriosklerotischer Plaqueinstabilität und ACS zuschreiben (52).

Diese Aussagen unterstützen die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie. Eine erhöhte PAPP-A Expression ist assoziiert mit einer Degradation der fibrösen Kappe, diese Dynamik führt letztlich zur Ruptur der Plaque mit kardialen oder cerebralen Symptomen.

4.3.6 Perilipin als potentieller indirekter Marker für die Plaqueinstabilität arteriosklerotischer Plaques in der A. carotis

Zellen, die Triaglyceride speichern, sind umgeben von spezifischen Proteinen, die diesen Mechanismus kontrollieren, insbesondere Adipophiline und Perilipin. Es existieren drei verschiedene Typen von Perilipin A, B und C, die durch unterschiedliches Splitting einer gemeinsamen Vorläufer mRNA entstehen (79). Perilipin A und B wurde in Adipozyten gefunden wobei eine Prädominanz für Perilipin festgestellt wurde (42). Allerdings wurde lange davon ausgegangen dass die Expression von Perilipin nur auf Adipozyten und Steroidzellen begrenzt ist (77), dies konnte erst kürzlich widerlegt werden, indem Perilipin in arteriosklerotischen Plaques detektiert werden konnte (38). Es kann davon ausgegangen werden, dass Perilipin potentiell in der Entwicklung der Arteriosklerose involviert ist, indem es die Hydrolyse von Lipidakkumulation in Zellen blockiert (115).

Perilipin zeigt in den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie starke Parallelen zu PAPP-A. Es konnte festgestellt werden, dass Perilipin in einem signifikant positiven Zusammenhang sowohl mit der Makrophagenanzahl als auch mit der Schaumzellenex-

pression steht (s.h. Kapitel 3.2.3). So konnte gezeigt werden, dass der Regelkreis zwischen Perilipin, Makrophagen und Schaumzellen auch bei Patienten mit hämodynamisch relevanten Stenosen der A. carotis nachweisbar ist. Allerdings war auffällig, dass die Perilipin Expression in humanen Plaques sehr unregelmässig ausgeprägt war. In histologischen Schnittpräparaten, welche reich an Makrophagen waren, vermuteten wir eine hohe Zahl an Perilipin positiven Zellen, allerdings fand sich relativ häufig das genaue Gegenteil.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Perilipin analog zu PAPP-A ebenfalls signifikant häufiger in instabilen Plaques vorhanden ist und besonders ausgeprägt in Schaumzellen gefunden wurde, die um Atherome angesiedelt waren. In histologischen Schnitten, die kein Atherom enthielten, konnte Perilipin nicht oder nur kaum nachgewiesen werden (s.h. Kapitel 3.2.4). Parallelen zu PAPP-A ergaben sich ebenfalls wenn man Perilipin in Bezug auf die klinische Neurologie näher betrachtet. Perilipin wird sowohl bei symptomatischen als auch asymptomatischen Patienten signifikant häufiger in instabilen Plaques exprimiert, genau wie bei PAPP-A ist allerdings von besonderem Interesse, dass die Perilipin Expression bei asymptomatischen Patienten mit instabilen Plaques noch deutlicher ausgeprägt ist (95% Perilipin bei asymptomatischen Patienten versus 73% Perilipin bei symptomatischen Patienten beide Gruppen enthalten instabile Plaques) (s.h. Kapitel 3.3.3)

Analog zu PAPP-A konnten wir steigende Perilipin Werte mit einer Degradation der fibrösen Kappe assoziieren. Dies konnte in einen negativ linearen Zusammenhang gebracht werden (s.h. Kapitel 3.2.4). Basierend auf diesen Resultaten kann Perilipin ebenfalls als ein Marker klassifiziert werden, welcher indirekt und nicht invasiv vulnerable Plaques detektiert. Ein erhöhter Perilipin Wert kündigt möglicherweise eine drohende Ruptur der fibrösen Kappe an und dient dadurch als frühzeitigen Prädiktor eines drohenden cerebrovaskulären Ereignisses.

Im Vergleich zu PAPP-A ist ein Blick in die Literatur zu Perilipin weit weniger ergiebig, da sich die Erforschung des Perilipin in der Anfangsphase befindet. Wie beschrieben, konnte Perilipin in einen signifikanten Zusammenhang mit der Makrophagendichte und der Schaumzellenexpression gebracht werden. Studien konnten diesen Zusammenhang zwischen Makrophagen, Schaumzellen, Adipozyten und Perilipin bislang belegen und zeigen, dass eine Überexpression an Perilipin zur Lipidakkumulation in Makrophagen und somit zur abnormalen Retention von Lipiden in der Intima der Gefäßwand führt (66). Allerdings war im Zuge der Auswertung der histologischen Schnitte

die unregelmässige Ausprägung des Perilipins auffällig. Obwohl in einigen Schnitten Makrophagen reichlich exprimiert wurden, war Perilipin nur sehr schwach bis überhaupt nicht vorhanden. Besonders frühe Plaquestadien (AHA I-III) zeigten dieses Bild einer hohen Makrophagendichte ohne Perilipinexpression. Dies stellte die ursprüngliche Hypothese in Frage, in der angenommen wurde, dass Perilipin von aktivierten Makrophagen exprimiert wird. Allerdings ließ sich Perilipin in fortgeschrittenen Plaquestadien (AHA IV-VI) im Vergleich zu frühen Plaquestadien proportional deutlich intensiver nachweisen. Trotz mäßiger Makrophagendichte fand hier häufig eine ausgeprägte Perilipinexpression statt.

Diese Beschreibung deckt sich mit den Erkenntnissen einer vergleichbaren Studie (58). In dieser Studie führten Hofnagel et al zur Perilipin Dedektion eine Vielzahl an Experimenten durch, welche allesamt ein uneinheitliches Muster ergaben. Letztendlich entdeckten sie Perilipin in fortgeschrittenen, arteriosklerotischen Läsionen in Koronararterien, konnten Perilipin jedoch ebenfalls in den frühen bis mittleren Stadien weder in Makrophagen noch in glatten Muskelzellen nachweisen (58). Damit können Hofnagel et al die Ergebnisse dieser hier vorliegenden Studie bestätigen. Eine mögliche Begründung dieses Phänomens findet sich durch die genauere Betrachtung der Entstehungskaskade von Perilipin. Adipophilin, welches in den Formenkreis der Perilipine gehört, diesem aber nicht entspricht, konnte in diesen frühen Stadien arteriosklerotischer Plaques detektiert werden. Adipophilin ist beteiligt an der Lipidformation indem es die Fettsäureaufnahme in die Zelle stimuliert (91). Im Zuge der Differenzierung von Adipozyten, wird Adipophilin durch Perilipin ersetzt (58). Folglich ersetzt Perilipin Adipophilin im Zuge der Atherogenese und trägt dann zur Lipidakkumulation in Zellen bei, indem es die Lipidhydrolyse hemmt. Ließe sich diese Theorie nicht nur auf die Differenzierung von Adipozyten sondern auch auf die Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen anwenden (58), so ließe sich erklären, warum trotz hohen Makrophagenzahlen auffallend häufig keinerlei Perilipinexpression detektiert werden konnte. Eine andere Erklärung für die weiter oben dargestellten Beobachtungen einer uneinheitlichen Expression von Perilipin in Abhängigkeit des Plauealters liefert die Studie von Larigauderie et al. Larigauderie et al bestätigen die Aussagen von Hofnagel et al, indem auch in dieser Studie kein Perilipin in frühen Stadien der Zelldifferenzierung von Adipozyten gefunden werden konnte. Perilipin wurde in der Studie von Larigauderie et al ebenfalls in späten Stadien der Differenzierung von Adipozyten detektiert. Darüber hinaus wurde in dieser Studie die Expression von Perilipin im Zuge der Differenzierung von Monozyten in Makrophagen untersucht und festgestellt, dass die Expression an Perilipin im Zuge dieser

Differenzierung signifikant zunimmt (66). Sowohl die Studie von Hofnagel et al als auch die Arbeit von Larigauderie et al bestätigen die Beobachtungen der hier vorliegenden Studie. Es konnte gezeigt werden, dass die Perilipin Expression in frühen arteriosklerotischen Plaques kaum ausgeprägt ist, wohl aber in fortgeschrittenen Läsionen. Obwohl bereits mehrere plausible Erklärungsansätze beschrieben werden konnten, bedarf es weiterer Studien um die genaue Expression von Perilipin im Detail zu evaluieren.

Die genaue Rolle des Perilipin im Arterioskleroseprozess ist nicht exakt geklärt. Wir konnten Perilipin jedoch signifikant häufiger in Plaques nachweisen, die instabil waren. Das bedeutet diese Plaques enthielten Atherome. Dies ist konform mit den Ergebnissen einer ähnlichen Studie von Forcheron et al (42). Sie untersuchten die Perilipin Expression an Desobliterationen der A. carotis, gewonnen durch CEA. In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Expression von Perilipin in Plaques nachgewiesen, die Atherome enthielten und damit instabil waren. Daraus wurde gefolgert, dass die Überexpression von Perilipin und die sich daraus ergebenden Modifikationen innerhalb arteriosklerotischer Plaques eine regulierende Schlüsselrolle im Metabolismus des Cholesterins, besonders in dessen Akkumulation spielt (42). Eine weitere Studie in diesem Zusammenhang wurde erst kürzlich von Xu et al publiziert. Sie zeigt ebenfalls, dass eine Dysregulation des Perilipin in der Pathogenese von Fettleibigkeit, Diabetes und Arteriosklerose involviert ist (114). Faber et al beschrieben ebenfalls die Expression von Perilipin innerhalb instabiler Plaques. Sie untersuchten Plaques, welche von Patienten stammten, die sich einer gefäßchirurgischen Operation unterzogen hatten. Perilipin wurde in dieser Studie ausschließlich in rupturierten Plaques exprimiert, in stabilen Plaques war es nicht vorhanden. Perilipin wurde in Schaumzellen rupturierter Plaques dektiert und besonders Cholesterin-Atherome waren von Perilipin umgeben. In Gefäßen, die frei von Arteriosklerose waren, wurde diese Expression nicht gefunden, lediglich einige wenige positive Perilipin Zellen ließen sich in der Schulterregion stabiler Plaques nachweisen (38). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse unterstreicht die Studie von Faber et al die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit. Perilipin kann damit als ein Marker instabiler arteriosklerotischer Plaques bezeichnet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Perilipin signifikant häufiger in asymptomatischen Patienten exprimiert wurde. Wie in allen bisher beschriebenen Ergebnissen des Perilipins zeigen sich auch hier starke Parallelen zu PAPP-A. Allerdings ist dieses Ergebnis von besonderer Bedeutung, da der Zusammenhang zwischen Perilipin und der klinischen Neurologie noch in bisher keiner anderen Studie beschrieben worden ist.

Dies gilt ebenfalls für Perilipin im Bezug auf die Degradation der fibrösen Kappe. Die Mechanismen über welche Perilipin mit einer Plaqueruptur assoziiert werden kann wurden bislang in keiner Studie näher betrachtet. Die hier vorliegende Studie postuliert daher zum ersten Mal, dass Perilipin über eine Degradation der fibrösen Kappe möglicherweise nicht nur am Prozess der Arteriosklerose beteiligt ist, und in instabilen Plaques exprimiert wird, sondern auch über eine Degradation der fibrösen Kappe aktiv zur Plaqueruptur beiträgt. Dabei ist besonders der asymptomatische Patient gefährdet.

4.3.7 Ausblick

Der Zusammenhang zwischen PAPP-A und Perilipin wurde in bisher noch keiner Studie näher untersucht.

Wir stellten fest, dass Perilipin in 95% der Fälle in Plaques gefunden wurde die PAPP-A enthielten. Der Mechanismus dieses Zusammenhangs wurde nicht untersucht. Allerdings konnten wir feststellen, dass beide Proteine potentielle Marker für die Instabilität einer Plaque darstellen und sich statistisch nicht unabhängig voneinander verhalten. Beide Marker können in einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit aktivierten Entzündungszellen, fortgeschrittenen, instabile Plaquestadien und einer Degradation der fibrösen Kappe gebracht werden. Beide Marker werden sowohl bei asymptomatischen als auch symptomatischen Patienten mit komplexen, instabilen Plaques signifikant häufiger exprimiert, mit dem besonderen Augenmerk, dass die Expression beider Marker bei asymptomatischen Patienten noch ausgeprägter ist. Es ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass wir die histologische Expression von PAPP-A/Perilipin nicht mit dem Level im Blutserum korreliert haben. Hierzu bedarf es weiterer Studien.

Problematisch ist die Tatsache, dass die Folgen arteriosklerotischer Belastung im gesamten Gefäßsystem zu finden sind und PAPP-A und Perilipin keine spezifischen Marker darstellen, welche speziell die Plaquemorphologie der A. carotis widerspiegeln. In Kombination jedoch mit der Dokumentation der Plaquekomposition durch weitere Untersuchungen, wie beispielsweise bildgebender Verfahren, erlauben PAPP-A und Perilipin möglicherweise eine genauere Evaluierung der vulnerablen Plaque oder viel wichtiger des „vulnerablen Patienten“.

Obwohl natürlich ausser Frage steht, dass eine gründliche klinische Untersuchung auch in Zukunft fundamental sein wird, so können PAPP-A und Perilipin als Marker eines vulnerablen arteriosklerotischen Plaques womöglich zur individuellen Risiko-

stratifizierung des Schlaganfalls eines insbesondere asymptomatischen Patienten beitragen. Vor diesem Hintergrund würde eine frühzeitige Ermittlung derjenigen Plaques die im Begriff sind, sich rapide instabil zu entwickeln durch einen biochemischen Marker wesentlich zur Verbesserung des Schlaganfall Qualitätsmanagements beitragen. Weiterhin könnte die Klassifikation arteriosklerotischer Plaques unter dem Gesichtspunkt der klinischen Therapiestratifizierung umstrukturiert werden.

5 Zusammenfassung

5.3 Einleitung

Nach den malignen Erkrankungen und den ischämischen Herzerkrankungen ist der Schlaganfall die dritthäufigste Todesursache der westlichen Industrienationen. Dabei ist die Ruptur von Plaques der A. carotis und die daraus resultierende distale Embolie von atheromatösen Ablagerungen der häufigste zugrundeliegende pathogenetische Mechanismus einer zerebralen Ischämie. Die morphologische, arteriosklerotische Plaquekomposition der A. Carotis erscheint, vielmehr noch als der Stenosegrad, von zentraler Bedeutung zur Risikostratifizierung einer Plaqueruptur mit nachfolgendem ischämischen Ereignis. Es ist oberstes Ziel cerebrovaskulärer Wissenschaft eine Plaqueruptur mit konsekutiver Embolie aufgrund einer Formation von thrombotischem Material durch frühzeitige Detektion zu vermeiden. Allerdings gestaltet es sich im klinischen Alltag besonders bei asymptomatischen Patienten weiterhin schwierig einen vulnerablen Plaque zu detektieren. Vor diesem Hintergrund steht die Etablierung eines sensitiven, spezifischen und frühen Markers für instabile Plaques, der diese indirekt und nicht-invasiv erfasst. In dieser hier vorliegenden Studie wurden zwei potentielle Marker instabiler Plaques untersucht, PAPP-A und Perilipin. Beide Proteine wurden mittels Immunhistochemie nach Desobliterationen der A. carotis auf ihre potentielle Fähigkeit als Marker für instabile Plaques untersucht. Damit hätten diese biochemischen Marker Potential, wesentlich zur Verbesserung des Schlaganfall Qualitätsmanagements beizutragen.

5.4 Material und Methode

Das Patientenkollektiv umfasste neun asymptomatische Patienten und acht symptomatische Patienten. Bei allen Patienten wurde eine Thrombendarteriektomie der A. ca. Desobliterationen 425 histologische Schnittpräparate angefertigt. Aufgrund histologischer Kriterien wurden die Schnitte in stabil/instabil sowie basierend auf der klinischen Neurologie des Patienten in asymptomatisch/symptomatisch eingeteilt. An allen Schnittpräparaten wurden immunhistochemische Färbungen für PAPP-A, Perilipin sowie CD68 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in Form einer semiquantitativen Darstellung der prozentualen Verteilung von Zelltypen. Um Zusammenhänge zwischen klinischen Symptomen eines Patienten und

der histologischen Beschaffenheit der Plaquezusammensetzung beschreiben zu können, wurden PAPP-A und Perilipin sowie jegliche histologische Komponente im Aufbau eines Plaques morphometrisch erfasst und diese Komponenten in einen Zusammenhang mit der Stabilität eines Plaques und der klinischen Neurologie eines Patienten gebracht.

5.5 Ergebnisse

In instabilen Plaques wurde Perilipin A in 84.3% exprimiert, umgekehrt konnte Perilipin A in stabilen Plaques nur zu 19.0% detektiert werden ($p < 0.001$). PAPP-A wurde in 72.7% aller instabilen Plaques exprimiert, während 9.1% der stabilen Plaques PAPP-A enthielten ($p < 0.001$). Die Stabilität eines Plaques wurde in einen Zusammenhang mit der klinischen Neurologie der Patienten gebracht. Dabei zeigte sich, dass in instabilen Plaques von asymptomatischen Patienten Perilipin A in 95.2% vorhanden war ($p < 0,001$), in instabilen Plaques von symptomatischen Patienten war Perilipin in 73.2% exprimiert ($p < 0,001$). PAPP-A konnte in 88.5% aller instabilen Plaques von asymptomatischen Patienten detektiert werden ($p = 0.015$), in 62.5% aller instabilen Plaques von symptomatischen Patienten wurde eine PAPP-A Expression festgestellt ($p = 0.003$). Bezieht man die PAPP-A sowie Perilipin A Expression auf die Dicke der fibrösen Kappe so ergaben sich folgenden Zusammenhänge. Erhöhte PAPP-A Werte sowie erhöhte Perilipin A Werte konnten signifikant mit einer Degradation der fibrösen Kappe assoziiert werden ($p < 0.001$, $r = 0.639$ bzw. $p < 0.001$, $r = 0.429$). Konnte in einem Plaque PAPP-A detektiert werden so war in 95.9% ebenfalls Perilipin A vorhanden ($p < 0.001$).

5.6 Diskussion

Der Zusammenhang zwischen PAPP-A und Perilipin wurde in bisher noch keiner Studie näher untersucht. Beide Proteine stellen potentielle Marker für die Instabilität eines Plaques dar und können in einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit aktivierten Entzündungszellen, fortgeschrittenen, instabile Plaquestadien und einer Degradation der fibrösen Kappe gebracht werden. Beide Marker werden sowohl bei asymptomatischen als auch symptomatischen Patienten mit komplexen, instabilen Plaques signifikant häufiger exprimiert, mit dem besonderen Augenmerk, dass die Expression von PAPP-A und Perilipin bei asymptomatischen Patienten noch ausgeprägter ist. Es

ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass die histologische Expression von PAPP-A/Perilipin nicht mit dem Level im Blutserum korreliert wurde. Hierzu bedarf es weiterer Studien.

Problematisch ist die Tatsache, dass die Folgen arteriosklerotischer Belastung im gesamten Gefäßsystem zu finden sind und PAPP-A und Perilipin keine spezifischen Marker darstellen, welche speziell die Plaquemorphologie der A. carotis widerspiegeln. In Kombination jedoch mit der Dokumentation der Plaquekomposition durch weitere Untersuchungen, wie beispielsweise bildgebender Verfahren, erlauben PAPP-A und Perilipin möglicherweise eine genauere Evaluierung der vulnerablen Plaque oder viel wichtiger des „vulnerablen Patienten“.

Obwohl natürlich ausser Frage steht, dass eine gründliche klinische Untersuchung auch in Zukunft fundamental sein wird, so können PAPP-A und Perilipin als Marker eines vulnerablen arteriosklerotischen Plaques womöglich zur individuellen Risikostratifizierung des Schlaganfalls eines insbesondere asymptomatischen Patienten beitragen. Vor diesem Hintergrund würde eine frühzeitige Ermittlung derjenigen Plaques, die im Begriff sind sich rapide instabil zu entwickeln, durch einen biochemischen Marker wesentlich zur Verbesserung des Schlaganfall Qualitätsmanagements beitragen. Weiterhin könnte die Klassifikation arteriosklerotischer Plaques unter dem Gesichtspunkt der klinischen Therapiestratifizierung umstrukturiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1223–30.
- (2) Ammon HP, Melien MC, Pfaffle T. Potentiation of glucose-induced insulin release by thiourea and thiourea derivatives. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984;327:234-7.
- (3) Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, Rankin RN, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, Spence JD. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 1998;339:1415-25.
- (4) Bassiouny HS, Davis H, Massawa N, Gewertz BL, Glagov S, Zarins CK. Critical carotid stenoses: morphologic and chemical similarity between symptomatic and asymptomatic plaques. *J Vasc Surg* 1989;9:202-12.
- (5) Bassiouny HS, Sakaguchi Y, Mikucki SA, McKinsey JF, Piano G, Gewertz BL, Glagov S. Juxtalumenal location of plaque necrosis and neof ormation in symptomatic carotid stenosis. *J Vasc Surg* 1997;26:585-94.
- (6) Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR Jr, Virmani R, Oxvig C, Schwartz RS. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001;345:1022-9.
- (7) Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 2000;86:125-30.
- (8) Beaudeau JL, Burc L, Imbert-Bismut F, Giral P, Bernard M, Bruckert E, Chapman MJ. Serum plasma pregnancy-associated protein A: a potential marker of echogenic carotid atherosclerotic plaques in asymptomatic hyperlipidemic subjects at high cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:e7-10.
- (9) Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E, Bernard M, Foglietti MJ, Chapman MJ. Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2003;169:139-46.

- (10) Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 1991;325:445-53.
- (11) Biller J, Feinberg WM, Castaldo JE, Whittlemore AD, Harbaugh RE, Dempsey RJ, Caplan LR, Kresowik TF, Matchar DB, Toole JF, Easton JD, Adams HP Jr, Brass LM, Hobson RW 2nd, Brott TG, Sternau L. Guidelines for carotid endarterectomy: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association 1998;29:554-62.
- (12) Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: from laboratory evidence to clinical application. *Ital Heart J* 2001;2:796-800.
- (13) Blaser T, Glanz W, Krueger S, Wallesch CW, Kropf S, Goertler M. Time period required for transcranial Doppler monitoring of embolic signals to predict recurrent risk of embolic transient ischemic attack and stroke from arterial stenosis. *Stroke* 2004;35:2155-9.
- (14) Bogousslavsky J, Despland PA, Regli F. Asymptomatic tight stenosis of the internal carotid artery: long-term prognosis. *Neurology* 1986;36:861-63.
- (15) Boyle JJ. Association of coronary plaque rupture and atherosclerotic inflammation. *J Pathol* 1997;181:93-9.
- (16) Brasen JH, Niendorf A. Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance. *Pathologie* 1997;18:218-27.
- (17) Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression. New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 1993;87:1781-91.
- (18) Broz P, Marsch S, Hunziker P. Targeting of vulnerable plaque macrophages with polymer-based nanostructures. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:190-6.
- (19) Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 2002;347:5-12.
- (20) Carr S, Farb A, Pearce WH, Virmani R, Yao JS. Atherosclerotic plaque rupture in symptomatic carotid artery stenosis. *J Vasc Surg* 1996;23:755-65.
- (21) Carr SC, Farb A, Pearce WH, Virmani R, Yao JS. Activated inflammatory cells are associated with plaque rupture in carotid artery stenosis. *Surgery* 1997; 122:757-63.

- (22) Chambers BR, Norris JW. Outcome in patients with asymptomatic neck bruits. *N Engl J Med* 1986;315:860-5.
- (23) Cola C, Clementi E, Biondi-Zoccai G, Sangiorgi G. From carotid plaque biology to serologic markers of vulnerability to predict the risk of cerebrovascular events. *Acta Chir Belg* 2007;107:129-42.
- (24) Conti E, Carrozza C, Capoluongo E, Volpe M, Crea F, Zuppi C, Andreotti F. Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor. *Circulation* 2004;110:2260-5.
- (25) Cosin-Sales J, Christiansen M, Kaminski P, Oxvig C, Overgaard MT, Cole D, Holt DW. Pregnancy-associated plasma protein A and its endogenous inhibitor, the proform of eosinophil major basic protein (proMBP), are related to complex stenosis morphology in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2004;109:1724-8.
- (26) Crea F, Andreotti F. Pregnancy associated plasma protein-A and coronary atherosclerosis: marker, friend, or foe? *Eur Heart J* 2005;26:2075-76.
- (27) Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996;94:2013-20.
- (28) Delafontaine P, Song YH, Li Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:435-44.
- (29) DGG Stenosen der Arteria Karotis. In: Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie (Hrsg) Leitlinien zu Diagnostik und Therapie in der Gefäßchirurgie. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 1998;15–8.
- (30) Dodick DW, Meissner I, Meyer FB, Cloft HJ. Evaluation and management of asymptomatic carotid artery stenosis. *Mayo Clin Proc* 2004;79:937-44.
- (31) Eckstein HH, Schumacher H, Klemm K, Laubach H, Kraus T, Ringleb P, Dorfler A, Weigand M, Bardenheuer H, Allenberg JR. Emergency carotid endarterectomy. *Cerebrovasc Dis* 1999;9:270-81.
- (32) Eckstein HH, Schumacher H, Laubach H, Ringleb P, Forsting M, Dorfler A, Weigand M, Bardenheuer H, Allenberg JR. Early carotid endarterectomy after non-disabling ischaemic stroke: adequate therapeutical option in selected patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998;15:423-8.
- (33) Eckstein HH, Allenberg JR. Einfluss evidenzbasierter Indikationen zur Karotis-TEA auf die Stadieneinteilung extrakranieller Karotisstenosen -

Notwendigkeit einer aktualisierten Klassifikation. *Gefässchirurgie* 2001;6:91-7.

- (34) Elesber AA, Conover CA, Denktas AE, Lennon RJ, Holmes DR Jr, Overgaard MT, Christiansen M, Oxvig C, Lerman LO, Lerman A. Prognostic value of circulating pregnancy-associated plasma protein levels in patients with chronic stable angina. *Eur Heart J* 2006;27:1678-84.
- (35) Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA* 1995;273:1421-8.
- (36) Erbel R, Heusch G. Coronary microembolization – its role in acute coronary syndromes and interventions. *Herz* 1999;24:558-75.
- (37) European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1991;337:1235-43.
- (38) Faber BC, Cleutjens KB, Niessen RL, Aarts PL, Boon W, Greenberg AS, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Daemen MJ. Identification of genes potentially involved in rupture of human atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2001;89:547-54.
- (39) Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-71.
- (40) Feeley TM, Leen EJ, Colgan MP, Moore DJ, Hourihane DO, Shanik GD. Histologic characteristics of carotid artery plaque. *J Vasc Surg* 1991;13:719-24.
- (41) Fisher M, Paganini-Hill A, Martin A, Cosgrove M, Toole JF, Barnett HJ, Norris J. Carotid plaque pathology: thrombosis, ulceration, and stroke pathogenesis. *Stroke* 2005;36:253-7.
- (42) Forcheron F, Legedz L, Chinetti G, Feugier P, Letexier D, Bricca G, Beylot M. Genes of cholesterol metabolism in human atheroma: overexpression of perilipin and genes promoting cholesterol storage and repression of ABCA1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1711-7.
- (43) Frink RJ. Chronic ulcerated plaques: new insights into the pathogenesis of acute coronary disease. *J Invasive Cardiol* 1994;6:173-85.
- (44) Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 1994;90:2126-46.

- (45) Futterman LG, Lemberg L. Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL-6, PAPP-A. *Am J Crit Care* 2002;11:168-72.
- (46) Goertler M, Blaser T, Krueger S, Hofmann K, Baeumer M, Wallesch CW. Cessation of embolic signals after antithrombotic prevention is related to reduced risk of recurrent arterioembolic transient ischaemic attack and stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:338-42.
- (47) Goldstein LB, Adams R, Becker K, Furberg CD, Gorelick PB, Hademenos G, Hill M, Howard G, Howard VJ, Jacobs B, Levine SR, Mosca L, Sacco RL, Sherman DG, Wolf PA, del Zoppo GJ. Primary prevention of ischemic stroke: A statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Stroke* 2001;32:280-99.
- (48) Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000;31:774-81.
- (49) Halliday A, Mansfield A, Marro J, Peto C, Peto R, Potter J, Thomas D. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 363:1491-1502.
- (50) Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352:1685-95.
- (51) Hansson GK, Jonasson L, Lojstjed B, Stemme S, Kocher O, Gabbiani G. Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1988;72:135-41.
- (52) Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;91:281-91.
- (53) Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:297-329.
- (54) Hatsukami TS, Ferguson MS, Beach KW, Gordon D, Detmer P, Burns D, Alpers C, Strandness DE Jr. Carotid plaque morphology and clinical events. *Stroke* 1997;28:95-100.
- (55) Hatsukami TS, Ross R, Polissar NL, Yuan C. Visualization of fibrous cap thickness and rupture in human atherosclerotic carotid plaque in vivo with high-resolution magnetic resonance imaging. *Circulation* 2000;102:959-64.
- (56) Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Simoons ML, Zeiher AM. Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes: comparison with markers of systemic in-

flammation, platelet activation, and myocardial necrosis. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:229-37.

- (57) Hochberg Z, Hertz P, Maor G, Oiknine J, Aviram M. Growth hormone and insulin-like growth factor-I increase macrophage uptake and degradation of low density lipoprotein. *Endocrinology* 1992; 131:430-5.
- (58) Hofnagel O, Buers I, Schnoor M, Lorkowski S, Robenek H. Expression of perilipin isoforms in cell types involved in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2007;190:14-15.
- (59) Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Maruyama I. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:136-43.
- (60) Inzitari D, Eliasziw M, Gates P, Sharpe BL, Chan RK, Meldrum HE, Barnett HJ. The causes and risk of stroke in patients with asymptomatic internal carotid artery stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 2000;342:1693-1700.
- (61) Jeziorska M, Woolley DE. Neovascularization in early atherosclerotic lesions of human carotid arteries: its potential contribution to plaque development. *Hum Pathol* 1999;30(8):919-25.
- (62) Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res* 2003;13:113-70.
- (63) Khosravi J, Diamandi A, Krishna RG, Bodani U, Mistry J, Khaja N. Pregnancy associated plasma protein-A: ultrasensitive immunoassay and determination in coronary heart disease. *Clin Biochem* 2002;35:531-8.
- (64) Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003;349:2316-25.
- (65) Kolominsky-Rabas PL, Sarti C, Heuschmann PU, Graf C, Siemonsen S, Neundoerfer B, Katalinic A, Lang E, Gassmann KG, von Stockert TR. A prospective community-based study of stroke in Germany – the Erlangen Stroke Project (ESPro): incidence and case fatality at 1, 3, and 12 months. *Stroke* 1998;29:2501-6.
- (66) Larigauderie G, Bouhlef MA, Furman C, Jaye M, Fruchart JC, Rouis M. Perilipin, a potential substitute for adipophilin in triglyceride storage in human macrophages. *Atherosclerosis* 2006;189:142-8.

- (67) Laursen LS, Overgaard MT, Soe R, Boldt HB, Sottrup-Jensen L, Giudice LC, Conover CA, Oxvig C. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS Lett* 2001;504:36-40.
- (68) Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, Yates JR 3rd, Conover CA. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3149-53.
- (69) Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased. *Atherosclerosis* 1991;87:87-90.
- (70) Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:2844-50.
- (71) Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365-72.
- (72) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
- (73) Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-24.
- (74) Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, O'Fallon WM, Maseri A, Goronzy JJ, Weyand CM. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation* 1999;100:2135-9.
- (75) Loftus IM, Naylor AR, Bell PR, Thompson MM. Matrix metalloproteinases and atherosclerotic plaque instability. *Br J Surg* 2002;89:680-94.
- (76) Loftus IM, Thompson MM. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vasc Med* 2002;7:117-33.
- (77) Londos C, Gruia-Gray J, Brasaemle DL, Rondinone CM, Takeda T, Dwyer NK, Barber T, Kimmel AR, Blanchette-Mackie EJ. Perilipin: possible roles in structure and metabolism of intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20(Suppl 3):S97-101.
- (78) Longstreth WT Jr, Shemanski L, Lefkowitz D, O'Leary DH, Polak JF, Wolfson SK Jr. Asymptomatic internal carotid artery stenosis defined by ultrasound and the risk of subsequent stroke in the elderly. The Cardiovascular Health Study. *Stroke* 1998;29:2371-6.

- (79) Lu X, Gruia-Gray J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Londos C, Kimmel AR. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm Genome* 2001;12:741-9.
- (80) Lund J, Qin QP, Ilva T, Pettersson K, Voipio-Pulkki LM, Porela P, Pulkki K. Circulating pregnancy-associated plasma protein a predicts outcome in patients with acute coronary syndrome but no troponin I elevation. *Circulation* 2003;108:1924-6.
- (81) Lusby RJ, Ferrell LD, Ehrenfeld WK, Stoney RJ, Wylie EJ. Carotid plaque hemorrhage. Its role in production of cerebral ischemia. *Arch Surg* 1982; 117:1479-88.
- (82) Mead GE, O'Neill PA, McCollum CN. Is there a role for carotid surgery in acute stroke? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;13:112-21.
- (83) Milei J, Parodi JC, Ferreira M, Barrone A, Grana DR, Maturri L. Atherosclerotic plaque rupture and intraplaque hemorrhage do not correlate with symptoms in carotid artery stenosis. *J Vasc Surg* 2003;38:1241-7.
- (84) Miyoshi H, Souza SC, Zhang HH, Strissel KJ, Christoffolete MA, Kovsan J, Rudich A, Kraemer FB, Bianco AC, Obin MS, Greenberg AS. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2006;281:15837-44.
- (85) Molloy J, Markus HS. Asymptomatic embolization predicts stroke and TIA risk in patients with carotid artery stenosis. *Stroke* 2000;31:1440-3.
- (86) Moody AR, Murphy RE, Morgan PS, Martel AL, Delay GS, Alder S, MacSweeney ST, Tennant WG, Gladman J, Lowe J, Hunt BJ. Characterization of complicated carotid plaque with magnetic resonance direct thrombus imaging in patients with cerebral ischemia. *Circulation* 2003;107:3047-52.
- (87) Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, Fallon JT. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 1996;94:3090-7.
- (88) Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori

- SG, Rekhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003;108:1664-72.
- (89) Orozco LD, Kapturczak MH, Barajas B, Wang X, Weinstein MM, Wong J, Deshane J, Bolisetty S, Shaposhnik Z, Shih DM, Agarwal A, Lusa AJ, Araujo JA. Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circ Res* 2007;100:1703-11.
- (90) Pasterkamp G, Schoneveld AH, van der Wal AC, Hijnen DJ, van Wolven WJ, Plomp S, Teepen HL, Borst C. Inflammation of the atherosclerotic cap and shoulder of the plaque is a common and locally observed feature in unruptured plaques of femoral and coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:54-8.
- (91) Persson J, Degerman E, Nilsson J, Lindholm MW. Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363:1020-6.
- (92) Poppert H, Sadikovic S, Sander K, Wolf O, Sander D. Embolic signals in unselected stroke patients: prevalence and diagnostic benefit. *Stroke* 2006;37:2039-43.
- (93) Qin QP, Kokkala S, Lund J, Tamm N, Voipio-Pulkki LM, Pettersson K. Molecular distinction of circulating pregnancy-associated plasma protein A in myocardial infarction and pregnancy. *Clin Chem* 2005;51:75-83.
- (94) Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998; 351:1379-87.
- (95) Renier G, Clement I, Desfaits AC, Lambert A. Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte and macrophage tumor necrosis factor-alpha production. *Endocrinology* 1996;137:4611-8.
- (96) Resch ZT, Simari RD, Conover CA. Targeted disruption of the pregnancy-associated plasma protein-A gene is associated with diminished smooth muscle cell response to insulin-like growth factor-I and resistance to neointimal hyperplasia after vascular injury. *Endocrinology* 2006;147:5634-40.
- (97) Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
- (98) Saam T, Cai J, Ma L, Cai YQ, Ferguson MS, Polissar NL, Hatsukami TS, Yuan C. Comparison of symptomatic and asymptomatic atherosclerotic

carotid plaque features with in vivo MR imaging. *Radiology* 2006;240:464-72.

- (99) Saam T, Hatsukami TS, Takaya N, Chu B, Underhill H, Kerwin WS, Cai J, Ferguson MS, Yuan C. The vulnerable, or high-risk, atherosclerotic plaque: noninvasive MR imaging for characterization and assessment. *Radiology* 2007;244:64-77.
- (100) Sangiorgi G, Mauriello A, Bonanno E, Oxvig C, Conover CA, Christiansen M, Trimarchi S, Rampoldi V, Homes DR Jr, Schwartz RS, Spagnoli LG. Pregnancy-associated plasma protein-a is markedly expressed by monocyte-macrophage cells in vulnerable and ruptured carotid atherosclerotic plaques: a link between inflammation and cerebrovascular events. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2201-11.
- (101) Schaar JA, Muller JE, Falk E, Virmani R, Fuster V, Serruys PW, Colombo A, Stefanadis C, Ward Casscells S, Moreno PR, Maseri A, van der Steen AF. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece. *Eur Heart J* 2004; 25:1077-82.
- (102) Seeger JM, Barratt E, Lawson GA, Klingman N. The relationship between carotid plaque composition, plaque morphology, and neurologic symptoms. *J Surg Res* 1995;58:330-6.
- (103) Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995;92:1565-9.
- (104) Sitzer M, Muller W, Siebler M, Hort W, Kniemeyer HW, Jancke L, Steinmetz H. Plaque ulceration and lumen thrombus are the main sources of cerebral microemboli in high-grade internal carotid artery stenosis. *Stroke* 1995;26:1231-3.
- (105) Spagnoli LG, Mauriello A, Sangiorgi G, Fratoni S, Bonanno E, Schwartz RS, Piegras DG, Pistolesse R, Ippoliti A, Homes DR Jr. Extracranial thrombotically active carotid plaque as a risk factor for ischemic stroke. *JAMA* 2004;292:1845-52.
- (106) Strydom HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1177-8.
- (107) Strydom HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1992;85:391-405.

- (108) Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 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* 1995;15:1512-31.
- (109) Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89:2462-78.
- (110) Valton L, Larrue V, le Traon AP, Massabuau P, Geraud G. Microembolic signals and risk of early recurrence in patients with stroke or transient ischemic attack. *Stroke* 1998;29:2125-8.
- (111) Van Damme H, Limet R. Analysis of the results of the main randomized trials on carotid endarterectomy for asymptomatic internal carotid stenosis. *Rev Med Liege* 2005;60:811-3.
- (112) Vollmar J. *Rekonstruktive Chirurgie der Arterien* 1996. Thieme, Stuttgart, p 292.
- (113) Wolf O, Heider P, Heinz M, Poppert H, Sander D, Greil O, Weiss W, Hanke M, Eckstein HH. Microembolic signals detected by transcranial Doppler sonography during carotid endarterectomy and correlation with serial diffusion-weighted imaging. *Stroke* 2004;35:e373-5.
- (114) Xu C, He JH, Xu GH. Perilipin associated with lipid droplets regulates lipolysis. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 2006; 37:221-4.
- (115) Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase – new roles for an old enzyme. *Biochem J* 2004;379:11-22.

7 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Dr. Peter Heider für die Inspiration dieses Projekt zu übernehmen, für seine Hilfe bei der Umsetzung und für einen Kühlschrank voll Nervennahrung während der histologischen Auswertung.

Mein Dank gilt Renate Hegenloh für die Anfertigung der zahlreichen histologischen Schnittpräparate, ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Tibor Schuster danke ich für die mehrmalige, professionelle statistische Auswertung dieser Arbeit.

Moritz Wildgruber und Dr. Pelisek danke ich für sehr gute, konstruktive Verbesserungsvorschläge und zahlreiches Korrekturlesen.

Meiner Mutter und Lambrini Patsiouridou danke ich für Ihr wertvolles Korrekturlesen in Orthographie und Grammatik.

Dr Joseph O'Brien Doyle hat mich während der Endphase dieser Arbeit hervorragend durch Rat, Tat und Motivation unterstützt, dafür bedanke ich mich herzlich.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist. Ich bedanke mich, dass sie mir das Studium ermöglicht haben, immer an mich glauben und mich in meinem Werdegang so wundervoll unterstützen.

