

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Gefäßchirurgie

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

(Univ.-Prof. Dr. H.-H. G. U. Eckstein)

Der Stellenwert der Neovaskularisierung und angiogenetischen Faktoren in hochgradigen Plaquestenosen der A. carotis interna

Georg Well

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. H. Berger

Die Dissertation wurde am 07.04.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.09.2010 angenommen.

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Schlaganfall und Carotisstenose	1
1.2.	Atherosklerose als primäre Ursache der Carotisläsionen	3
1.3.	Faktoren der Plaqueprogression und Rupturgefährdung	8
1.4.	Der Stellenwert der Neovaskularisierung	15
1.5.	Aufgabenstellung	21
2.	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1.	Chemikalien und Lösungen	23
2.2.	Patientenkollektiv	24
2.3.	Probengewinnung	25
2.4.	Histologie	26
2.4.1.	Hämalaun/Eosin-Färbung	26
2.4.2.	Elastika van Gieson Färbung	27
2.5.	Immunhistochemie	27
2.5.1.	APAAP-Methode	28
2.5.2.	LSAB-Methode	28
2.5.3.	Immunhistochemische Aufbereitung der Präparate	31
2.6.	Lichtmikroskopische Auswertung	33
2.7.	Auswertung der Neovaskularisierung	34
2.8.	Methoden zur Präparation von DNA und RNA aus Formalin-fixierten-in-Paraffin-eingebetteten Carotispräparaten	34
2.8.1.	Präparation von Gesamt-DNA	34
2.8.2.	Präparation von RNA	36
2.8.3.	Synthese von cDNA	37

2.9.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
2.9.1.	PCR für DNA	38
2.9.2.	Reverse-Transkriptase (RT)-PCR	42
2.9.3.	Real-time quantitative RT-PCR	42
2.10.	Elektrophorese	44
2.11.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	45
3.	ERGEBNISSE	46
3.1.	Patientencharakterisierung	46
3.2.	Histologische Plaquecharakterisierung	48
3.3.	Immunhistochemische Plaquecharakterisierung	51
3.4.	Charakterisierung der Neogefäße	55
3.5.	Immunhistochemischer Nachweis der Expression angiogenetischer Faktoren in Neogefäßen	56
3.6.	Expression von Matrixmetalloproteinasen in Neogefäßen	62
3.7.	Primeroptimierung für die Expressionsanalyse mittels RT-PCR	64
3.8.	Quantitative Real-Time RT-PCR	67
3.9.	Analyse ausgewählter angiogenetischer Faktoren im Blut	70
3.10.	Korrelationen zwischen Blutwerten und Plaqueparametern	71
4.	DISKUSSION	78
4.1.	Patientencharakterisierung	78
4.2.	Histologische und immunhistochemische Plaquecharakterisierung	80

4.3.	Charakterisierung der Neogefäße	82
4.4.	Lokalisierung und Expression angiogenetischer Faktoren	83
4.5.	Expression von Matrixmetalloproteinasen in Neogefäßen	87
4.6.	Analyse ausgewählter angiogenetischer Faktoren im Blut	88
4.7.	Korrelationen zwischen Blutwerten und Plaqueparametern	89
4.8.	Zukunftsperspektive	91
5.	ZUSAMMENFASSUNG	93
6.	LITERATURVERZEICHNIS	95
8.	DANKSAGUNG	108

Abkürzungen

ACC	Arteria Carotis Communis
ACI	Arteria Carotis Interna
ACST	Asymptomatic Carotid Surgery Trial
ADAM	A Disintegrin and Metalloprotease Domain
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloprotease Domain with Thrombospondin Motifs
AHA	American Heart Association
Ang	Angiopoietin
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
Carotis-TEA	Carotis-Thrombendarteriektomie
CD	Clusters of Differentiation
cDNA	Complementary DNA (zu mRNA)
CEA	Carotisendarteriektomie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelial Cells (Endothelzellen)
ECST	European Carotid Surgery Trial
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eph	Ephrin
EtOH	Ethanol
EvG	Elastika-van-Gieson
Faktor VIII	von Willebrand Faktor VIII
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxilin-Eosin
IgG	Immunoglobulin
HIF-1	Hypoxia-inducible Growth Factor
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukine

Verzeichnis

INF- γ	Interferon-Gamma
LDL	Low Density Lipoproteins
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein
M-CSF	Macrophages Colony Stimulating Factor
MMP	Matrixmetalloproteinasen
NASCET	North American Symptomatic Carotis Endarterectomy Trial
NF- κ B	Nekrose-Faktor-kappa-B
NK	Natural Killer Cells
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTFE	Polytetrafluorethylen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMA	Smooth Muscle Cell Actin
SMC	Smooth Muscle Cells (glatte Muskelzellen)
TIA	Transiente ischämische Attacke (transienter Schlaganfall)
TIMP	Tissue Inhibitor of MMPs
TNF- α	Tumor-Nekrosis-Faktor-alpha
TK	Tissue Kallikrein
tPA	Tissue Plasminogen Aktivator
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
üN	über Nacht
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

1. EINLEITUNG

1.1. Schlaganfall und Carotisstenose

Der Schlaganfall ist in den Industrieländern die dritthäufigste Todesursache nach Herzinfarkt und Tumorneubildungen und die häufigste Ursache für eine dauerhafte Behinderung mit Beeinträchtigung eines selbstständigen Lebens. Neben den sozioökonomischen Problemen eines behindernden Schlaganfalls ist außerdem zu erwarten, dass mit steigendem Durchschnittsalter der Bevölkerung auch die Zahl der Schlaganfallpatienten ansteigen wird (*Trenkler 2008*). Die Sterblichkeitsrate nach Apoplex nach einem Monat liegt bei Männern zwischen 15% und 49% und bei Frauen zwischen 18% und 57% (*European Registers of Stroke Investigators 2009, Wolfe 2000, Thorvaldsen 1995*).

Der Schlaganfall ist die Folge einer plötzlichen Durchblutungsstörung des Gehirns mit dem Risiko einer dauerhaften Schädigung des Gehirngewebes. Mehr als 80% aller Schlaganfälle entstehen auf dem Boden einer zerebralen Ischämie, 10-20% als Folge einer zerebralen Blutung (*Chalela 2009, Ringleb 2007, Eckstein 2004, Grau 2001*). Dabei handelt es sich meist um arterio-arterielle Embolien aus dem Bereich der Stenose und erst in zweiter Linie um hämodynamische, durch den Grad der Stenose bedingte Infarkte. Die Prävalenz höhergradiger (> 50%iger) Stenosen beträgt 7% bei Männern über 65 Jahren und 5% bei Frauen. Besonders hoch ist die Inzidenz bei Patienten, die bereits einen Herzinfarkt erlitten haben oder an einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) leiden. In diesen Fällen ist sogar bei 30% der Patienten mit einer höhergradigen Carotisstenose zu rechnen. In Deutschland leben zurzeit über eine Million Patienten, die an den Folgen eines Schlaganfalls leiden und somit in ihrer Lebensqualität deutlich eingeschränkt sind. Aktuelle Daten der Deutschen Schlaganfalldatenbank belegen, dass bis zu 90% aller ischämischen Schlaganfälle den vorderen Hirnkreislauf und damit den Bereich der Arteria carotis betreffen.

Bei einer Prävalenz hochgradiger Carotisstenosen von über 8% bei Patienten über 65 und über 10% bei 75-Jährigen sind alleine in Deutschland über 500.000 Menschen betroffen. Der Goldstandard, eine wirksame Prophylaxe des Schlaganfalls zu gewährleisten, ist zurzeit die sog. Carotis-Thrombendarteriektomie (Carotis-TEA) (*Rerkasem and Rothwell 2009, Ringleb 2007, Eckstein 2004*). Um das Risiko eines Carotis-bedingten Schlaganfalls zu

verringern, wird häufig ein vorzeitiger chirurgischer Eingriff durchgeführt. Aus diesem Grund kommt der Detektion gefährdeter atherosklerotischer Carotisplaquestenosen entscheidende Bedeutung zu.

Das Risiko eines Schlaganfalls beträgt pro Jahr etwa 1% bei Patienten mit Stenosen unter 70% und 2% bei höhergradigen Stenosen der A. carotis interna (*Ringleb 2007*). Symptomatische Stenosen, die zu transienten ischämischen Attacken (TIA) führen, erhöhen weiterhin deutlich das Schlaganfallrisiko. Es beträgt im ersten und zweiten Monat 10 bis 15% und im zweiten Jahr liegt das Risiko immer noch bei 5%. Das Risiko bleibt auch in den folgenden Jahren nach dem Schlaganfall bei etwa 2% (*Ringleb 2007, Rothwell 2000*). Die prophylaktische Bedeutung und die Vorteile der Carotisendarteriektomie (CEA) sind in der European Carotid Surgery Trial (ECST) und der North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) überzeugend gezeigt worden (*The European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group 1998, The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators 1991*). Trotz eines geringen Risikos von 5–7% stellt die Carotis-TEA derzeit den in Leitlinien empfohlenen Goldstandard bei Patienten mit signifikanten symptomatischen Carotisstenosen von über 50% dar (*Diener 2005, Olsen 2003 (European Stroke Initiative Executive Committee)*). Weniger schlüssige Daten existieren zur operativen Behandlung von Patienten mit asymptomatischen Stenosen. Hier konnte nur ein geringer Vorteil gegenüber der konservativen Therapie für diese Patientengruppe in der ACST-Studie (*Asymptomatic Carotid Surgery Trial*) gezeigt werden (*Naylor 2009, Mohammed 2005*).

Es gibt bislang kein zuverlässiges diagnostisches Verfahren, um hauptsächlich asymptomatische, rupturgefährdete Carotisstenosen, die einen Schlaganfall verursachen können, rechtzeitig zu erkennen. Somit kommt der klinischen Unterscheidung rupturgefährdeter Plaquestenosen eine überragende Bedeutung zu. Gerade bei klinisch asymptomatischen Stenosen ohne auffällige Krankheitssymptome müssen derzeit noch unnötig viele Patienten operativ behandelt werden, um einen Schlaganfall auf Dauer zu verhindern.

1.2. Atherosklerose als primäre Ursache der Carotisläsionen

Kaum eine Krankheit steht derart im Mittelpunkt medizinischer Forschung wie die Atherosklerose, definiert als eine chronisch progrediente Veränderung der Gefäßwand, gekennzeichnet als Verdickung der Intima mit lokalen Ablagerungen von Lipiden, fibrösem Gewebe und Kalzium, Blut und Blutprodukten (*Sary 2000, 1995, 1994; Virmani 2006, 2002, 2000*). Erste atherosklerotische Gefäßveränderungen sind bereits in der Kindheit nachweisbar. Atherosklerotische Läsionen entwickeln sich über Jahrzehnte, werden in vielen Fällen instabil und führen in allen industriell hoch entwickelten Ländern schließlich zu den verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie z.B. Herzinfarkt, Schlaganfall, Thrombose oder Embolie. Gemäß dem Statistischen Bundesamt starben im Jahr 2002 in Deutschland fast 400.000 Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. Das entspricht 46,8 % aller Todesfälle.

Atherosklerose ist eine multifaktorielle Erkrankung zu der verschiedene Risikofaktoren wie z.B. Lebensalter, Geschlecht (männlich), genetische Veranlagung, Lipidstoffwechselstörung, Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen, Adipositas und Bewegungsmangel gehören (*Hof 2009, Roquer 2009, Virmani 2006, Kher 2004, Lusis 2000*). Sie entsteht durch ein komplexes Wechselspiel zwischen unterschiedlichen Blutbestandteilen, veränderten Flussbedingungen in den Gefäßen und Gefäßwandabnormitäten, denen verschiedene pathologische Ursachen zu Grunde liegen:

- (1) Entzündungsvorgänge mit erhöhter Permeabilität der Endothelschicht, Aktivierung von Endothelzellen und Monozyten, Akkumulation inflammatorischer Zellen innerhalb der intimalen Gefäßwand (*Sary 2000, 1995; Davies 1993*);
- (2) Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und überschüssige Produktion extrazellulärer Matrix (*Virmani 2000; Sary 1995, 1994; Ross 1993*);
- (3) Lipidakkumulation (*Bregens 1997, Steinberg 1989*);
- (4) Nekrose verursacht durch zytotoxische Effekte oxidierter Lipide und Lipoproteine (*Steinberg 1989*);
- (5) Arterielle Verkalkung im Sinne eines aktiven Prozesses (*Burke 2001, 2000; Sary 1995, 1994*).

Als primäre Ursache der Entstehung von Atherosklerose wird heutzutage die Schädigung des Endothels vermutet. Faktoren, die eine derartige Dysfunktion begünstigen, sind fortgeschrittenes Alter, Entzündungen, Infektionserkrankungen, Hypertonie, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Leberirrhose, oxidativer Stress, Rauchen und ebenfalls verschiedene Medikamente. Durch die verringerte Funktion der Endothelzellen kommt es zu erhöhter Permeabilität der Gefäßwand für Lipoproteine und andere Blutbestandteile. Jede Zelle braucht für das Überleben und Wachstum sog. Phospholipide und Cholesterin als Bestandteile der Zellmembran. Beides wird hauptsächlich mit Hilfe der sog. Low Density Lipoproteins (LDL) über das Blut zu den Zellen transportiert und beide passieren ungehindert die Endothelschicht. Diese LDL-Vesikel sind jedoch in der Gefäßwand nicht ausreichend gegen verschiedene oxidative Reagenzien geschützt und können somit leicht modifiziert werden (*Stary 1994*). LDL gelangen aufgrund eines erhöhten LDL-Plasmaspiegels oder aufgrund eines Endotheldefektes in den subendothelialen Raum, wo sie akkumulieren und z.B. durch Sauerstoffradikale oxidiert oder anderweitig modifiziert werden können (*Stary 1995, 1994; Palinski 1989*). Oxidierte LDL Partikel wirken chemotaktisch auf Monozyten. Diese Zellen werden rekrutiert und differenzieren in lipidphagozytierende Makrophagen (*Ross 1999, Stary 1994*). Makrophagen nehmen modifizierte LDL über sog. Scavenger-Rezeptoren auf und differenzieren zu sog. Schaumzellen (*Hoff 1991*). Oxidiertes LDL besitzt neben der chemotaktischen Wirkung auf Monozyten auch zytotoxische Wirkung auf glatte Muskelzellen. Die so entstandenen Schaumzellen und aktivierten Makrophagen sezernieren unter anderem weitere freie Radikale, die erneut weitere LDL-Partikel oxidieren (*Libby 2000, Stary 1994*). Aktivierte Makrophagen setzen ebenfalls in den atherosklerotischen Läsionen verschiedene Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Metalloproteinasen (MMPs) und andere proteolytischen Enzyme frei. Die Schaumzellen, die zuviel Lipide und Cholesterin aufgenommen haben (es gibt keine Rückkopplung, um die Aufnahme zu regulieren) sterben ab, entlassen ihren Inhalt in die extrazelluläre Matrix, wo dann zusammen mit weiteren nekrotischen Zellresten das sog. Lipidcore/nekrotisches Core entsteht (*Ross 1999, Stary 1994*). Die Anwesenheit von Makrophagen und anderen inflammatorischen Zellen besitzt jedoch zunächst einen protektiven Hintergrund, denn die Entzündungsreaktion soll die ursächlichen Faktoren der Atherosklerose beseitigen. Auf anderer Seite sezernieren sie jedoch auch verschiedene Entzündungsmediatoren, freie Radikale und weitere Faktoren wie z.B. Metalloproteinasen, die das umliegende Gewebe, die extrazelluläre Matrix wiederum degradieren und schädigen (*Galis 2002, Libby 2002, Dollery 1995*). Als Folge eines Reparatursmechanismus des Organismus wandern glatte Muskelzellen aus der Media in die

Intima ein, verlieren ihren kontraktilen Phänotyp und fangen an zu proliferieren. Sie sind ebenfalls begrenzt zur Lipidaufnahme befähigt (*Stary 1994*). Neben Wachstumsfaktoren und Zytokinen sezernieren sie vor allem Matrixproteine wie z.B. Kollagen und verschiedene Proteoglykane. Das nekrotische Core wirkt jedoch apoptotisch auf die glatten Muskelzellen (*Karaflou 2008*). Das Plaqueswachstum entwickelt sich zunächst in Richtung Adventitia und der mediale Bereich erweitert sich entsprechend. Erst im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose beginnt die Plaque in Richtung Lumen zu wachsen (*Stary 1995, 1994*). In dem anfänglichen Stadium der Atherosklerose tragen die Proliferation glatter Muskelzellen sowie die Bildung neuer Komponenten der extrazellulären Matrix zur Stabilisierung der Plaquearchitektur bei. Diese Vorgänge sind jedoch ebenfalls die Hauptursache des progressiven Charakters der Atherosklerose (*Rekther 1999*). Durch die Produktion verschiedener Matrixkomponenten und Kollagenkomponenten bildet sich später über dem nekrotischen Core eine sog. fibröse Kappe, die das thrombogene Material vom Blut trennt und zur Plaquestabilisierung beiträgt (*Virmani 2006, Burke 2002*).

Es existieren mehrere Möglichkeiten der Einteilung von Plaquestadien. Sie orientieren sich jeweils an der Atherogenese beim Menschen. Die weltweit gültige Einteilung der WHO 2003 besteht aus vier Stadien: Mit dem Stadium 0 wird die normale Arterie bezeichnet; Frühe Läsionen, die so genannten, makroskopisch sichtbaren, fettigen Streifen gehören zum Stadium I, fortgeschrittene Läsionen mit fibrösen Anteilen gehören zum Stadium II und komplizierte Läsionen, die manifeste Folgekrankheiten verursachen, zählt man zum Stadium III. Weltweit anerkannt ist jedoch die Einteilung der American Heart Association (*Stary 1992,1994, 1995,2000 und Virmani 2000, 2002, 2003, 2006*). Die AHA unterteilt die Atherosklerose in 8 verschiedene Typen:

- **Typ 0:** noch keine intimale Verdickung. Diese Stadium entspricht im Grunde einem gesunden Gefäß.
- **Typ I:** inapparente, initiale Läsionen treten auf; die darin befindlichen Makrophagen enthalten oxidierte Lipidtröpfchen, es ist jedoch noch kein extrazelluläres Lipid vorhanden. Es gibt noch keine oder sehr wenige Schaumzellen.
- **Typ II:** die sog. fatty Streaks, die bereits mit Lipiden gefüllte Schaumzellen und glatte Muskelzellen beinhalten. In diesem Stadium erscheinen die ersten extrazellulären Lipidablagerungen. Sie sind jedoch noch relativ selten.

-
- **Typ III:** Präatherom, das bereits makroskopisch gut sichtbare fettige Streifen enthält. Weiterhin sind bereits viele kleine extrazelluläre Lipidablagerungen und Schaumzellen vorhanden.
 - **Typ IV:** Atherom, meist große oder größere Lipidablagerungen, so dass man bereits von einem Lipidcore oder einem nekrotischen Core spricht. Das atherosklerotische Core wird von einer proteoglykanreichen Schicht überzogen, welche viele Schaumzellen und modifizierte glatte Muskelzellen enthalten kann.
 - **Typ V:** wird als Fibroatherom bezeichnet und ist gekennzeichnet durch eine fibröse Kappe über dem Lipidcore/nekrotisches Core.
 - **Typ VI:** ist eine Plaque mit Einblutungen/Hämorrhagien oder Thrombosen.
 - **Typ VII:** wird auch als eine verkalkte Plaque bezeichnet. Sie enthält neben dem Lipidcore und der fibrösen Kappe des Typs V noch großflächige Verkalkungen.
 - **Typ VIII:** ist eine faserige oder fibröse Plaque, die wenig oder kein nekrotisches Core enthält, sondern überwiegend bindegewebige Fasern und Kollagen.

Weil sich die mit Buchstaben modifizierten Zahlen im Klinikalltag schwer einprägen ließen und weil ihre Anordnung einen linearen Verlauf der Progression implizieren könnte, wurde von Virmani und Stary noch ein universelles morphologisches Schema für atherosklerotische Läsionen entwickelt (*Virmani 2000, Stary 2000*). Die Einteilung erfolgte entsprechend auf der Grundlage histologischer Untersuchungen menschlicher Atherosklerose ohne Zahlenangabe:

- Nichtatherosklerotische Läsion mit intimaler Verdickung: glatte Muskelzellen in normaler Anzahl, Lipide und Schaumzellen kommen in der Intima nicht vor.
- Nichtatherosklerotische Läsion mit intimalem Xanthom (*fatty Streaks*): luminal Schaumzellen, aber kein nekrotisches Core und auch keine fibröse Kappe vorhanden.
- Progressive atherosklerotische Läsion mit pathologischer intimaler Verdickung: Myozyten befinden sich in einer proteoglykanreichen Matrix mit extrazellulären Lipidanteilen. Es ist jedoch kein nekrotisches Core und keine fibröse Kappe vorhanden.

-
- Läsion mit luminaler Thrombose: Progressive, atherosklerotische Läsion mit pathologischer, intimaler Verdickung und Erosion.
 - Die progressive atherosklerotische Läsion mit fibröser Kappe und Atherom: Die Läsion enthält ein großes nekrotisches Core mit einer darüber liegenden fibrösen Kappe.
 - Die progressive atherosklerotische Läsion mit fibröser Kappe, Atherom und Erosion: Luminal thrombotische Läsion, zwischen Thrombus und nekrotischem Core besteht kein Kontakt.
 - Die progressive atherosklerotische Läsion mit dünner fibröser Kappe und Atherom; die fibröse Kappe ist dünn, wenig glatte Muskelzellen vorhanden und mit Entzündungszellen infiltriert. Unter der dünnen fibrösen Kappe liegt ein nekrotisches Core.
 - Die progressive atherosklerotische Läsion mit dünner fibröser Kappe und Atherom. Zusätzlich ist eine Plaqueruptur vorhanden: Fibroatherom mit gerissener fibröser Kappe, der Inhalt des nekrotischen Cores steht mit dem entstehenden Thrombus in Kontakt.
 - Die progressive atherosklerotische Läsion mit klumpigen Verkalkungen: Über der fibrokalzifizierten Plaque befinden sich klumpige, eruptive Verkalkungen.
 - Die progressive atherosklerotische Läsion mit Verkalkungen (fibrokalzifizierte Plaque) stellt eine kollagenreiche Plaque mit signifikanter Stenose dar, die reich an verkalkten Arealen und arm an Entzündungszellen ist. Ein nekrotisches Core kommt nicht immer vor.

Es gibt jedoch viele atherosklerotische Läsionen, die sich nicht nach dem oben genannten Schema einordnen lassen. Es sind meistens komplexe oder bereits verheilte Läsionen, die je nach Erfahrung und Beurteilung des Pathologen in verschiedene atherosklerotische Typen eingeordnet werden können. Für die Klinik sind jedoch hauptsächlich die Vulnerabilität und die Rupturgefährdung solcher Plaques von Bedeutung. Partiiell noch die Progression solcher Plaques, die zur Plaqueinstabilität führen kann. Deshalb werden oft klinisch hauptsächlich stabile und instabile atherosklerotische Läsionen unterschieden, die z.B. gemäß Virmani und Burke charakterisiert werden können (*Virmani 2006, Virmani 2002, Burke 2002, Burke 2001*).

Somit werden atherosklerotische Läsionen als stabil gekennzeichnet, die eine dicke fibröse Kappe, durchzogen von glatten Muskelzellen in viel extrazellulärer Matrix, besitzen. Des Weiteren enthalten stabile Plaques ein verhältnismäßig kleineres nekrotisches Core, verglichen mit instabilen Plaques (*Virmani 2006, Virmani 2002, Burke 2002, Libby 2002*). Im Gegensatz dazu zeichnen sich vulnerable, rupturgefährdete atherosklerotische Läsionen durch einen großen lipidreichen und/oder nekrotischen Bereich, eine dünne fibröse Kappe und einen hohen Anteil an inflammatorischen Zellen aus (*Virmani 2002, Libby 2002, Ross 1999*). Weiterhin enthalten diese Plaques auch häufig Einblutungen und Thromben. Das klinische Ereignis kommt schließlich durch eine Ruptur der atherosklerotischen Läsion zustande. Ein rupturierter Plaque besteht meist aus einem Thrombus oder einer frischen Einblutung, einer dünnen fibrösen Kappe über einem nekrotischen Core und vielen inflammatorischen Zellen (*Virmani 2002, Virmani 2006*). Die fibröse Kappe ist oft unvollständig und stellenweise unterbrochen. Weiterhin wurde von Burke und Kollegen für koronare Gefäße eine deutlich instabile resp. rupturgefährdete Läsion bezeichnet, dessen fibröse Kappe $< 65 \mu\text{m}$ war, mit weniger glatter Muskelzellen und durch Makrophagen infiltriert (*Virmani 2006, Burke 1997*). Die Dicke der fibrösen Kappe der rupturierten atherosklerotischen Läsionen lag bei $23 \pm 19 \mu\text{m}$ (*Burke 1997*).

1.3. Faktoren der Plaqueprogression und Rupturgefährdung

Die frühe Phase der Atherogenese ist gekennzeichnet durch eine endotheliale Dysfunktion. Auf diese Weise erhöht sich die Permeabilität des Endothels für Lipoproteine, die Triglyzeride, Phospholipide und Cholesterin enthalten und die zu einer Lipidakkumulation in der Intima führt (*Libby 2000, Ross 1999*). Lipoproteine können in der Intima leicht modifiziert werden, z.B. durch verschiedene Oxidantien und/oder Sauerstoffradikale. Modifizierte und oxidierte Lipoproteine binden an vorhandene Makrophagen und leiten durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine die Immunreaktion ein. In der Folge wird das Gefäßendothel aktiviert und exprimiert vermehrt spezifische Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche wie z.B. ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule), E- und P-Selektin, womit die anfängliche Entzündung weiter stimuliert wird (*Hansson 2002*). Inflammatorische Zellen wie Monozyten/Makrophagen und T-

Lymphozyten spielen im weiteren Verlauf der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Sie produzieren verschiedene Zytokine, wie z.B. Interferon-Gamma (INF- γ), Tumor-Nekrosis-Factor-alpha (TNF- α), und NF- κ B. INF- γ hat eine aktivierende Wirkung auf Makrophagen und steigert deren Produktion von Stickstoffmonoxid und reaktiver Sauerstoffradikale. TNF- α ist ein multifunktionales Zytokin des Immunsystems, welches bei lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist. Es wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet und aktiviert weitere Immunzellen. TNF- α kann Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine anregen. CD40 und CD40L (CD40 Ligand), beide Mitglieder der TNF-Familie, werden bei verschiedenen Zellen in den atherosklerotischen Läsionen exprimiert. Die Interaktion von CD40 und CD40L erhöht die Expression verschiedener Chemokine und Zytokine, wie z.B. Monocyte chemoattractant protein (MCP-1), Wachstumsfaktoren und auch MMPs (*Koenig 2007*). Eine erhöhte Plasmakonzentration von CD40L wurde bereits in einer klinischen Studie (CAPTURE) mit Patienten, die unter Herzerkrankung leiden, nachgewiesen (*Heeschen 2003*). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der verschiedene Gene der Immunantwort, Zellproliferation und Apoptose reguliert und hat eine kritische Stellung in der Entstehung von Entzündungen (*Hansson 2005, Kaperonis 2005, Libby 2000*). Die weiteren Faktoren, die in der Monozyten/Makrophagen Rekrutierung und Aktivierung eine wichtige Rolle spielen sind MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein) und M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor). MCP-1 verursacht chronische vaskuläre Entzündung, induziert Proliferation und Migration von SMCs und ECs, Neovaskularisierung, oxidativer Stress und Thrombosis (*Egashira 2003*). MCP-1 induziert weiterhin auch die Expression von verschiedenen Matrixmetalloproteinasen (MMPs), was eine wichtige Rolle dieses Zytokins in der Plaquestabilisierung vermuten lässt (*Koenig 2007*).

Interleukine (IL) sind die eigentlichen körpereigenen Botenstoffe des Immunsystems und der Entzündungsreaktion. Sie sind Träger der Kommunikation zwischen Leukozyten, aber auch anderen, an der Immunreaktion beteiligten Zellen. Die Entzündungszellen innerhalb der atherosklerotischen Läsionen produzieren dabei verschiedene ILs, wie z.B. Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, -6, -12 und -18 (*Girn 2007*). Vorhandene T-Helferzellen produzieren weiterhin IL-4, -5, -8, und -10, und CD40-Ligand (*Hansson 2006*). In fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose gelangen viele Zytokine auch in die Blutbahn und dadurch in die Leber, wo es zur vermehrten Synthese sog. Akut-Phase-Proteine wie C-reaktives Protein (CRP) und Fibrinogen kommt. Beide Akut-Phase-Proteine wurden bereits als unspezifische Entzündungsparameter von Herzkreislaufkrankungen und auch Atherosklerose herangezogen (*Koenig 2007*).

Die Wirkung der Interleukine ist höchst unterschiedlich. IL-1 β ist z.B. ein hochwirksames Zytokin, das bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen verschiedene immunreaktive Prozesse steuert. IL-1 β triggert unter anderem über NF- κ B die Transduktion von Cyclooxygenase-2 und führt darüber zu einer vermehrten Bildung von Prostaglandinen (*Rivest 2000*). Weiterhin reguliert IL-1 β auch die Freisetzung anderer Zytokine wie z.B. IL-6. IL-2 ist der wichtigste Botenstoff für die Aktivierung von T-Helferzellen und Präsentation fremder Antigene auf der Zelloberfläche. Neben der autokrinen T-Zellaktivierung wirkt IL-2 auch auf B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen mit dem gleichen Effekt. IL-6 bewirkt in der Leber die vermehrte Synthese von Akut-Phase-Proteinen. Es wird vor allem von Monozyten/Makrophagen, aber auch von Endothelzellen ausgeschüttet. Weiterhin stimuliert IL-6 Makrophagen, um MCP-1 zu produzieren (*Rattazzi 2003*). Erhöhte Expression von IL-6 wurde bereits in humanen atherosklerotischen Plaques detektiert (*Koenig 2007, Rus 1996*). IL-8 ist ein Chemokin der CXC Familie und wird unter anderem durch Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten produziert. Die wesentlichen biologischen Wirkungen von IL-8 beinhalten die Förderung der Chemotaxis, die Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivierung mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen (*Wu 2006*). IL-12 besitzt eine zentrale Funktion in der Aktivierung und Fortdauer der T-Helferzellen und der zellulären Abwehr und hat Einfluss auf den Verlauf von intrazellulären Infektionen (*Hansson 2006*). IL-18 wird in vielen Zellen exprimiert, es stimuliert unter anderem die IFN- γ Expression und aktiviert viele Proteinasen (*Koenig 2007*). Eine erhöhte Expression von IL-18 wurde bereits in humanen atherosklerotischen Läsionen beobachtet, besonders in rupturgefährdeten Plaques, assoziiert überwiegend mit Makrophagen (*Mallat 2001*).

Die vorhandenen inflammatorischen Zellen im Plauebereich bestehen vor allem aus Makrophagen und T-Lymphozyten und treten hauptsächlich in besonders rupturgefährdeten Arealen der Läsionen wie z.B. der Plaqueschulterregion, oder an bereits thrombosierte Stellen eines Plaques auf (*Hansson 2006*). Darüber hinaus werden auch die Integrität und Stabilität der bindegewebigen Kappe einer atheromatösen Läsion maßgeblich durch die Anwesenheit dieser Entzündungszellen beeinflusst. Durch die Produktion verschiedener, oben beschriebener Zytokine, wird die Proliferation und Transdifferenzierung von glatten Muskelzellen stimuliert, jedoch gleichzeitig auch die Synthese extrazellulärer Matrixproteine reduziert. Auf diese Weise tragen inflammatorische Zellen und die damit verbundene Immunreaktion zur Destabilisierung atherosklerotischer Plaques bei (*Hansson 2006*). Es ist bekannt, dass die Stabilität der Plauekappe durch die Verabreichung von einigen

Medikamenten wie z. B. Statinen deutlich verbessert werden kann, was auf eine Senkung des LDL-Levels im Plasma und die Reduktion der intimalen Inflammation zurückgeführt wurde (*Libby2002, Libby 2003*).

Der weitere und vermutlich der wichtigste Pathomechanismus, der zur Plaquestabilisierung und -ruptur führt, sind sog. proteolytische Enzyme, welche die extrazelluläre Matrix und somit auch die Komponenten der fibrösen Kappe degradieren (*Dollery 2006, Garcia-Touchard 2005*). Proteinasen spielen eine entscheidende Rolle bei vielen physiologischen Prozessen. Intrazelluläre Proteinasen z.B. regulieren den Proteingehalt der Zelle, aktivieren andere Proteine oder Enzyme, prozessieren Antigene und entsorgen beschädigte Proteine. Extrazelluläre Proteinasen beteiligen sich an der hydrolytischen Spaltung von Nahrungsmitteln im Verdauungstrakt, übernehmen spezifische Aufgaben im Blutgerinnungssystem und sind in der Lage einzelne Komponenten der extrazellulären Matrix bei Bedarf abzubauen. Sie spielen auch eine wichtige Rolle bei der Gefäßneubildung, indem sie vorhandenes Bindegewebe um die Gefäße herum degradieren, um die Migration vaskulärer Zellen und damit auch das Gefäßwachstum zu ermöglichen (*Dollery 2006, Roy 2006*). Ein weiterer Faktor, der zur vermehrten Expression von Proteinasen führt, ist die bereits oben beschriebene Immunreaktion, hauptsächlich in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen (*Hansson 2006, Newby 2006, Hallenbeck 2005*).

Der Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix erfolgt hauptsächlich durch die sog. Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (*Newby 2008, Halvorsen 2008, Newby 2006, Dollery 2006*). Die MMPs gehören zur Klasse der Endopeptidasen, die ein breites Spektrum extrazellulärer Matrixbestandteile an charakteristischen Aminosäuresequenzen, ihren Substraten, hydrolytisch spalten. Sie stellen eine Familie von mehr als 20 Zink-abhängigen Proteinase dar, die entweder von den Zellen in die umliegende extrazelluläre Matrix sezerniert werden oder in der Zellmembran verankert sind (*Newby 2008, Newby 2006*). Die Regulation und Aktivierung dieser Proteinase wird dabei streng kontrolliert. Sie werden meistens als inaktive Zymogene synthetisiert und erst lokal durch andere proteolytischen Enzyme aktiviert. Darüber hinaus gibt es eine Reihe spezifischer Proteinaseinhibitoren (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP-1,-2,-3,-4) mit einem präzise regulierten Gleichgewicht zwischen den Proteinase und deren Inhibitoren (*Visse 2003*).

Die humanen MMPs können aufgrund ihrer Substratspezifität und Struktur in mehrere Gruppen untergeteilt werden:

- Kollagenasen (MMP-1,-8,-13)
- Gelatinasen (MMP-2,-9)
- Stromelysine (MMP-3,-10)
- Matrilysine (MMP-7,-26)
- membran-gebundene MMPs (MT-MMP-1,-2,-3,-4,-5,-6 entspricht ebenfalls der Bezeichnung MMP-14,-15,-16,-17,-24,-25)
- andere (Makrophagenelastase: MMP-12, Stromelysin-3: MMP-11)

Einige der MMPs wurden bereits im Zusammenhang mit Atherosklerose untersucht und zeigten eine erhöhte Expression in atherosklerotischen Plaques (*Newby 2008, Newby 2006, Roy 2006*). Sluijter z.B. assoziierte die Aktivität von MMP-2 überwiegend mit glatten Muskelzellen und stabilen Plaques, die Expression von MMP-8 und -9 mit Makrophagen und Plaqueinstabilität (*Sluijter 2006*). Galis and Libby fanden erhöhte Aktivität von MMP-1,-2,-3,-9 und ihren Inhibitoren TIMP-1,-2 in den Schulterregionen vulnerabler Läsionen, assoziiert mit Makrophagen und Schaumzellen (*Dollery 2006, Gali 1994*). MMP-7 und -12 wurden in der Nähe nekrotischer Regionen zusammen mit Makrophagen lokalisiert (*Halpert 1994*). Erhöhte Expression Membran-gebundener MMP-14 (MT-MMP-1) wurde in atherosklerotischen Läsionen mit MMP-2 und Makrophagen kolokalisiert, MMP-16 (MT-MMP-3) mit glatten Muskelzellen (*Rajavashisth 1999*).

Außer den oben beschriebenen Matrixmetalloproteinasen gibt es noch weitere proteolytische Enzyme, wie z.B. Cathepsine, die ebenfalls in verschiedenen biologischen Prozessen involviert sind, wie z.B. Regulierung des intrazellulären Proteinumsatzes, Aktivierung von Wachstumshormonen und anderer Pro-Peptide (unter anderem aktivieren Cathepsine auch verschiedene MMPs), Matrixdegradierung, Umbau der Gefäßwand und Apoptose (*Zavasnik-Bergant 2006, Turk 2001, Turk 2000*). Diese Enzyme ließen sich bereits bei einigen Tumoren als ungünstige Prognosemarker nachweisen (*Agnantis 2004 und 2003, Duffy 1996*). Im Zusammenhang mit Atherosklerose oder Rupturgefährdung von Bauchortenaneurysmen als mögliche Prädiktoren wurden Cathepsine interessanterweise noch nicht untersucht.

Während viele MMPs im Zusammenhang mit Atherosklerose untersucht und einige mit Rupturgefährdung assoziiert wurden, sind Adamalysine, die ebenfalls zu den

Metalloproteinasen gehören, und ihre Rolle in Atherosklerose weitgehend unbekannt. Zu den Adamalysinen gehören zwei Familien von Metalloproteinasen, die ADAMs (a disintegrin and metalloprotease domain) und ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease domain with thrombospondin motifs) (*Tousseyn 2006, Garcia-Touchard, Blobel 2005, Porter 2005, Herren 2002*).

Die ADAM-Proteinasen besitzen genauso wie die MMPs eine Metalloproteinase- und zusätzlich noch eine Disintegrin-ähnliche-, Cystein-reiche- und Transmembran-Domäne. Es sind 19 Mitglieder dieser Familie bekannt, die bislang in humanem Gewebe identifiziert wurden. Diese Proteinasen beteiligen sich unter anderem maßgeblich an der Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, regulieren Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkung, beeinflussen Zellmigration, Vascular Remodelling, Matrixumbau und Angiogenese (*Tousseyn 2006, Blobel 2005*). Folglich können diese Adamalysine auch eine entscheidende Rolle in der Progression atherosklerotischer Plaques spielen. Die meisten der ADAMs sind extrazelluläre membran-gebundene proteolytische Enzyme, einige können jedoch unter Umständen auch freigesetzt werden (*Duffy 2003*). Bei einer Reihe von ADAMs ist die genaue Funktion und Substratspezifität zurzeit noch unbekannt. Es wurde zwar eine proteolytische Aktivität nachgewiesen, eine funktionelle Aufgabe wurde bislang nur für wenige ADAMs gezeigt, meistens mit deren erhöhten Expression in verschiedenen Tumorarten (*Tousseyn 2006, Carl-McGrath 2005, Wu 1997*). Betreffend atherosklerotische Läsionen gibt es bislang nur einige wenige Veröffentlichungen, die eine mögliche Rolle von ADAM 9, 15 und 17 im Zusammenhang mit Atherosklerose beschreiben (*Canault 2005, Al-Fakhri 2003*).

Noch weniger ist über die andere Gruppe der Adamalysine, die ADAMTS bekannt. Es wurden bislang ebenfalls 19 humane Mitglieder dieser Familie der Proteinasen beschrieben. Im Gegensatz zu ADAMs sind ADAMTS sekretorische Proteine, die zusätzlich noch ein Thrombospondin-Motiv besitzen und dafür bekannt sind, dass sie sich an der embryonalen Entwicklung, Angiogenese und Koagulation beteiligen (*Porter 2005, Wight 2005, Apte 2004*). ADAMTS-Proteinasen sind ebenfalls in der Lage, verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix zu degradieren. ADAMTS 2, 3 und 14 spalten Prokollagen Typ I, II und III, ADAMTS 1, 4, 5, 8, 9 und 15, verdauen das nicht-kollagene Proteoglycan Aggregan und Versican und ADAMTS-13 spaltet den von-Willebrand-Faktor. Darüber hinaus gibt es noch weitere ADAMTS-Proteinasen, wie z.B. ADAMTS 7, 10 und 12, die ebenfalls proteolytisch aktiv sind, deren Substratspezifität und genaue Funktion jedoch bislang nicht

bekannt ist. Im Zusammenhang mit Atherosklerose wurde nur eine einzige ADAMTS, die ADAMTS1 beschrieben (*Tortorella 2009*).

Abgesehen von den verschiedenen Metalloproteinasen (MMPs, ADAMs, ADAMTS) gibt es noch eine Reihe weiterer proteolytischer Enzyme, wie z.B. Serin-, Aspartat- und Cystein-Proteinasen. Die Serin-Proteinasen stellen hier die größte Familie der Proteinasen dar (*Roy 2006*). Ein sehr gutes Beispiel stellt auch das Plasmin-Plasminogen-System (*Fay 2007, Roy 2006, Garcia-Touchard 2005*), das eine wichtige Rolle beim vaskulären Umbau (Remodelling) spielt. Es besteht aus Tissue Plasminogen Aktivator (tPA), Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA), deren Substrat Plasminogen und das Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI). Für die Plaquestabilisierung ist das tPA von Relevanz, weil es in der extrazellulären Matrix von verschiedenen Geweben und auch in der Gefäßwand lokalisiert ist. Aktiviertes Plasmin hat eine breite proteolytische Aktivität und ist in der Lage, verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix zu degradieren: Fibrin, Kollagen, Laminin, Fibronectin und Proteoglykane (*Roy 2006*). Somit kann das Plasmin-Plasminogen-System einen wesentlichen Beitrag zur Plaquestabilisierung beitragen.

Ein weiteres Mitglied der Serin-Proteinasen sind die Tissue Kallikreine (TKs). Es gibt bislang 15 verwandte Kallikreine, die Kininogen zu Kinin spalten und somit ein aktives Kinin produzieren. Kinin hat verschiedene Funktionen in der Regulierung der vaskulären Physiologie (*Roy 2006, Yousef 2002*). Weiterhin sind Kallikreine in der Lage, in verschiedene proteolytische Kaskaden einzugreifen, wie z.B. Aktivierung von uPA oder verschiedener MMPs (*Emami 2007*).

Cathepsine sind ursprünglich intrazelluläre Proteinasen, die erst im sauren pH aktiv werden. Sie befinden sich hauptsächlich in den Lysosomen und ihre Funktion beinhaltet die Degradierung und Prozessierung von Proteinen innerhalb der Lysosomen. Cathepsine können jedoch unter Umständen auch sezerniert werden und können extrazelluläre Matrix degradieren (*Lutgens 2007, Garcia-Touchard 2005, Liu 2004*). Im humanen Gewebe wurden bislang 11 Mitglieder dieser Familie entdeckt (Cathepsin B, C, F, H, L, K, O, S, V, W, X/Z), mit Cystein in ihrem katalytischen Zentrum. Erhöhte Expression einiger Cathepsine, wie z.B. S und K, wurde bereits in atherosklerotischen Läsionen und Aneurysmen beobachtet, meist assoziiert mit Makrophagen und glatten Muskelzellen (*Sukhova 2006, Liu 2004, Sukhova 1998, Chapman 1997*). Cathepsin K ist dabei eine der stärksten bekannten humanen

Kollagenasen und Elastasen (*Chapman 1997*). Dagegen wurde in gesunden Gefäßen eine Cathepsin-Expression nicht detektiert. Cathepsine degradieren verschiedene Oberflächenproteine vaskulärer Zellen und auch die Basalmembran, wodurch diese Zellen zur Proliferation und Migration angeregt werden (*Sukhova 1998*). Weiterhin prozessieren intrazelluläre Cathepsine verschiedene Caspasen, wodurch auch die Apoptose induziert wird (*Liu 2004*). Zusätzlich beteiligen sich Cathepsine auch auf verschiedenen immunreaktiven Prozessen (*Zavasnik-Bergant 2006*). Cathepsin S, L, B und D beteiligen sich ebenfalls maßgeblich an der Regulation der Entzündungsreaktion, in dem sie in der Prozessierung und Präsentation von Antigenen involviert sind. Cathepsin X degradiert extrazelluläre Matrix und Cathepsine C, F und W werden in verschiedenen inflammatorischen Zellen (NK, T-Zellen, Monozyten/Makrophagen) exprimiert.

Zusammenfassend gibt es eine Fülle an verschiedenen Proteinasen, die sich alle mehr oder weniger an der Progression und Degradierung atherosklerotischer Läsionen Richtung vulnerable Plaques beteiligen können. Die Rolle vieler proteolytischer Enzyme im Zusammenhang mit atherosklerotischen Läsionen und deren Rupturgefährdung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Einige der Proteinasen, die eine wichtige Rolle in atherosklerotischen Läsionen spielen, könnten auch als mögliche Prognosemarker der Plaquestabilisierung dienen.

1.4. Der Stellenwert der Neovaskularisierung

Die überwiegende Anzahl atherosklerotischer Läsionen wird von der Ausbildung neuer Gefäße begleitet, die hauptsächlich im späteren Stadium signifikant zur Plaquestabilisierung beitragen können (*Sluimer 2009, Di Stefano 2009, Chen 2006, Moulton 2006*). Die Ursache der Entstehung von Angiogenese in atherosklerotischen Plaques ist unter anderem der Mangel an Sauerstoff (Hypoxie) in den wachsenden Plaques, verursacht durch die Verdickung der Intima und die unzureichende Versorgung der Zellen mit Blut in dem betroffenen Bereich. Hypoxie aktiviert wiederum das Wachstum neuer Gefäße durch die Aktivierung verschiedener angiogenetischer Faktoren, wie z.B. Hypoxia-inducible Growth Factor (HIF-1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Angiopoietine (Ang), Ephrine (Eph) und andere (*Carmeliet 2003, Heilmann 2002*). Zusätzlich zu Angiogenese/Neovaskularisierung,

definiert als Wachstum neuer Gefäße aus einem Gefäßsystem, findet stets auch die sog. Arteriogenese statt, beschrieben als Wachstum und Erweiterung bereits ausgebildeter Gefäße (*Chen 2006, Pelisek 2004, Schaper 2003*). Beide Prozesse ergänzen sich gegenseitig und sind bei der Ausbildung und Stabilisierung neu entstandener Gefäße unabdingbar, um eine ausreichende Blutversorgung aller Organe und Gewebe zu gewährleisten.

Trotz der überwältigenden Evidenz, die die Korrelation zwischen der Anzahl von Neugefäßen innerhalb atherosklerotischen Läsionen und Progression der Atherosklerose unterstützt, gibt es immer noch keinen direkten Beweis der kausalen Zusammenhänge zwischen diesen zwei Vorgängen. Auch wenn bereits einige angiogenetischen Faktoren, wie z.B. VEGF, Angiopoietin oder auch inflammatorische Zytokine bei der Plaqueprogression und Destabilisierung beschrieben wurden (*Moulton 2006, Chen 2006, Calvi 2004*), die Frage, wie Neovaskularisierung die Plaqueprogression und damit auch z.B. die Schlaganfallgefährdung beeinflusst, wurde bislang nicht eindeutig geklärt. Die Untersuchung angiogenetischer Faktoren als mögliche Prädiktoren der Schlaganfallprophylaxe wurde ebenfalls noch nicht systematisch durchgeführt.

Die Zellen innerhalb einer gesunden Gefäßwand werden normalerweise über die Vasa vasorum mit Sauerstoff und allen notwendigen Nährstoffen versorgt. Durch die Verdickung der intimalen Schicht erfahren Zellen in der entstehenden atherosklerotischen Läsion einen Mangel an Sauerstoff und melden es entsprechend der Umgebung. Somit werden Mikrogefäße der Vasa vasorum zum Wachstum und Ausbildung neuer Gefäße angeregt. Das Einsprossen der neuen Gefäße (Neugefäße) aus der Adventitia führt zur Neovaskularisierung der atherosklerotischen Läsion. Im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose reichen die Neugefäße bis unter die luminale Endothelschicht. Die Rolle der Vasa vasorum in Atherosklerose wird derzeit diskutiert (*Langheinrich 2007*).

Beim Gefäßwachstum werden zwei Prozesse definiert: die Angiogenese und Arteriogenese. Als Angiogenese wird der Prozess bezeichnet, bei dem neue Kapillaren entstehen. Der entscheidende Vorgang der Angiogenese ist die Endothelzellproliferation und -migration. Die Angiogenese stellt einen wichtigen Bestandteil sowohl physiologischer als auch pathologischer Vorgänge dar, wie z.B. Wundheilung, Follikulogenese und Ovulation, sowie die Angiogenese bei Tumoren (*Roy 2007, Pelisek 2004, Buschmann 2000*). Der Begriff der Arteriogenese bezeichnet dagegen einen Prozess, bei dem aus bereits bestehenden Kapillaren durch die Erweiterung und Proliferation von Endothelzellen neue Arterien entstehen. Prä-existente Kapillaren oder Kollateralarteriolen bilden dabei den Ausgangspunkt des

Gefäßwachstums. Im Gegensatz zur Angiogenese, an der ausschließlich Endothelzellen beteiligt sind, proliferieren auch glatte Muskelzellen innerhalb der betroffenen Gefäßwand. Der Prozess der Arteriogenese wird durch eine hämodynamisch wirksame Stenose oder durch die Okklusion einer Arterie ausgelöst. Der entstehende Druckgradient zwischen der verschlossenen Arterie und den Kollateralen führt zu einer Erhöhung des Blutflusses und des intraluminalen Druckes in den Umgehungskreisläufen, somit zu einer gesteigerten Wandspannung der dortigen Endothelzellen. Diese Scherkräfte induzieren damit den Prozess der Arteriogenese (*Schaper 2003*). Im Gegensatz zu Angiogenese, die maßgeblich durch die Hypoxie eingeleitet wird, ist Arteriogenese weitgehend von der Hypoxie unabhängig und wird hauptsächlich durch die physikalischen Veränderungen des Blutflusses und die damit verbundenen Veränderungen der Scherkräfte induziert (*Heil 2005, Heil 2004*). Weiterhin haben einwandernde Monozyten und MCP-1 einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung von Kollateralen.

Neogefäße, welche die atherosklerotische Läsion durchdringen, sind jedoch instabil und hoch permeabel (*Sluimer 2009*). Diese Permeabilität der Mikrogefäße wird durch das Ungleichgewicht von Wachstumsfaktoren und durch die unvollständige Integrität der Endothelzellen verursacht. Bei der Angiogenese handelt sich um einen komplexen Prozess, bei dem nicht nur die notwendigen Endothelzellen, sondern auch Perizyten und glatte Muskelzellen durch verschiedene angiogenetische Wachstumsfaktoren, wie z.B. FGF und VEGF aktiviert werden. Nach Ausbildung der ersten Kapillaren werden Perizyten und glatte Muskelzellen durch PDGF rekrutiert. Sie verbinden sich mit den bereits vorhandenen Endothelzellen und bilden die erste mediale Schicht. Dadurch werden die neu entstandenen Gefäße stabilisiert. Im weiteren Verlauf proliferieren beide Zellarten (ECs und SMCs), womit der Prozess der Arteriogenese eintritt und sich die neuen Gefäße erweitern. Die abschließende Wandausbildung wird in beiden Fällen durch FGF, PDGF und Angiopoietin-1 reguliert. Für eine weitere Stabilisierung der Neogefäße kommen noch Ephrine zum Einsatz (*Shibuya 2008*).

In atherosklerotischen Läsionen herrscht jedoch ein Überschuss an Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Zytokinen. Die Entstehung und das Wachstum neuer Gefäße folgt hier nicht der normalen Gefäßentwicklung. Die neuentstandenen Mikrogefäße sind hoch permeabel, und nur in seltenen Fällen werden Perizyten und glatte Muskelzellen rekrutiert (*Sluimer 2009, Ribatti 2008, Moreno 2006*). Durch die hohe Permeabilität der Neogefäße kommt es in deren Umgebung zu vermehrten Akkumulation von Lipoproteinen, die zur

weiteren Progression der Atherosklerose beitragen. Weiterhin akkumulieren sich in der Nähe der Neogefäße inflammatorische Zellen wie Monozyten/Makrophagen und T-Zellen. Das steigert wiederum die bereits vorhandene Immunreaktion. Weiterhin können die instabilen Neogefäße selbst rupturieren, was zur Einblutung innerhalb der Plaque führt. Zusätzlich produzieren aktivierte Endothelzellen verschiedene Proteinasen, genauso wie die akkumulierten inflammatorischen Zellen. Diese Prozesse beschleunigen die Progression der Atherosklerose, tragen zur Plaquestabilisierung bei und erhöhen damit das Rupturrisiko.

Wie bereits oben beschrieben führen die Verdickung der Intima und die Veränderungen innerhalb der atherosklerotischen Läsion zur Hypoxie und folglich zur Synthese von Hypoxie-induzierbarem Faktor-1 (HIF-1). HIF-1 aktiviert wiederum die Expression von VEGF, der zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren gehört (*Shibuya 2008*). Er spielt eine wesentliche regulatorische Rolle in der physiologischen und pathologischen Angiogenese (*Ferrara 2009, Breier 2000*). Neben der Angiogenese beeinflusst VEGF auch die Vaskulogenese (*Isner 1999*). VEGF ist ein heparin-bindendes Mitogen, das spezifisch auf vaskuläre Endothelzellen durch zwei Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 wirkt (*Shibuya 2006*). VEGF und seine Rezeptoren repräsentieren ein parakrines System, welches entscheidend für die Differenzierung von Endothelzellen und die Entwicklung von Gefäßen ist. VEGF begünstigt außer der Angiogenese auch das Überleben von Endothelzellen (*Breier 2000*). Es existieren derzeit fünf VEGF-Isoformen: VEGF-A, -B, -C, -D, -E (*Ferrara 2009, Cross 2003, Carmeliet 2000, Gerwins 2000*). VEGF-A, -B und -E entfalten ihre Wirkung vornehmlich auf Endothelzellen der Arterien, VEGF-C und -D auf Lymphgefäße. VEGF-E wurde im Schlangengift entdeckt und kommt im humanen Gewebe nicht vor. Bei Erwachsenen ist VEGF-A das am häufigsten vorkommende Isomer, das in fast allen vaskulären Geweben gefunden werden kann. Das Gen, das für VEGF-A kodiert, kann durch alternatives Splicing verschiedene Varianten hervorbringen. So wurden bisher in Menschen die Varianten VEGF-A121, VEGF-A138, VEGF-A145, VEGF-A162, VEGF-A165, VEGF-A189 und VEGF-A206 beschrieben. Die Zahlen entsprechen der Anzahl Aminosäuren in der jeweiligen Splicevariante. Interessanterweise unterscheiden sich die einzelnen Isoformen lediglich im Splicing des Exons 6 und/oder 7 (*Bates 2002*). Diese beiden Exons sind hauptsächlich für die Heparinbindung zuständig. Weiterhin ist Exon 7 für die Neuropilin-Bindung verantwortlich. Aus diesem Grund sind kürzere Varianten meist löslich (VEGF-A145), längere Varianten dagegen in extrazellulärer Matrix gebunden (VEGF-A165 und höher). VEGF bindet insgesamt an drei verschiedenen Rezeptoren VEGFR-1, -2, -3.

VEGFR-3 wird ausschließlich auf den lymphatischen Endothelzellen exprimiert, von den beiden anderen scheint VEGFR-2 der wichtigste Rezeptor auf den arteriellen vaskulären Zellen zu sein. Er vermittelt Zellproliferation, Chemotaxis, Zelldifferenzierung und erhöht die Zellüberlebensfähigkeit (*Ferrara 2009*). Kürzlich wurde VEGF als weiterer möglicher Faktor, der zu der Plaqueprogression und -instabilität beitragen kann, entdeckt. (*Holm 2009*).

Der Platelet-derived Growth Factor (PDGF) gehört zur Familie von vier Wachstumsfaktoren, PDGF-A, -B, -C, -D, die als Mitogen auf Zellen wirken (*Raines 2004*). Sie werden bei Verletzungen von Blutplättchen freigesetzt und stimulieren die Heilung innerhalb des Gewebes. PDGF kommt normalerweise als Dimer vor, in dem zwei Peptidketten miteinander verschmelzen (*Andrae 2008*). Alle PDGFs können Homodimere bilden, aber nur PDGF-A und -B bilden auch funktionsfähige Heterodimere. Somit können drei Varianten entstehen, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC und PDGF-DD. Die PDGF-Familie von Proteinen überträgt ihre Wirkung über zwei Rezeptoren, PDGFR-alpha und PDGFR-beta (*Andrae 2008*). PDGF-BB und PDGF-AB können beide Rezeptoren binden, PDGF-AA und -CC lediglich PDGFR-alpha, PDGF-DD ist nur auf PDGFR-beta ausgerichtet. In vaskulären Zellen, Megakaryozyten und Neuronen wird überwiegend PDGF-B exprimiert, PDGF-A meistens in epithelialen Zellen und Muskelgewebe (*Heldin 1999*). Weiterhin wird in den normalen gesunden Gefäßen nur wenig PDGF exprimiert (*Raines 2004*). PDGF-C und -D sind überwiegend in Fibroblasten der Adventitia vorhanden. In atherosklerotischen Läsionen werden vermehrt PDGF-A und -B exprimiert, hauptsächlich in Makrophagen und glatten Muskelzellen. Während der Angiogenese wird PDGF-A und -B ebenfalls von Endothelzellen produziert, um Perizyten und glatte Muskelzellen zu rekrutieren (*Raines 2004*). Somit werden die anfänglichen Mikrokapillaren stabilisiert und es bildet sich während des weiteren Wachstums und der Erweiterung der Gefäße eine neue mediale Schicht. Ein Mangel an PDGF führt somit zu Gefäßinstabilität.

Weitere Faktoren, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Neovaskularisierung und Interaktion zwischen dem Endothel und den umgebenden Zellen spielen, sind Angiopoietine Ang-1 und -2 und deren Rezeptor Tie-2 (Tyrosine Kinase Rezeptor) (*Karamysheva 2008*). Das Tie/Ang Signalsystem ist unerlässlich für die Entwicklung und Erhaltung von Gefäßen. Tierexperimente haben gezeigt, dass, obwohl beide Angiopoietine Ang-1 und -2 hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, sie sich trotzdem in ihrer Wirkung unterscheiden (*Maisonpierre 1997*). Während Ang-1 die Tie-2 Phosphorylierung und damit die Rezeptoraktivierung induziert, wirkt Ang-2 als Antagonist ohne weitere Signaltransduktion.

Tie-2/Ang-1 Signalweg erhöht die Assoziierung von Perizyten und glatten Muskelzellen an das Endothelium, verringert vaskuläre Permeabilität und hat anti-inflammatorische Eigenschaften (*Armulik 2005*). Damit werden die neu ausgebildeten Gefäße stabilisiert. Dagegen blockt das Ang-2 die stabilisierende Wirkung von Ang-1. Somit spielt das Verhältnis von Ang-1/-2 eine wesentliche Rolle bei der Erhaltung von Gefäßen und deren korrekter Funktion. Im Zusammenhang mit Atherosklerose wurde ein signifikantes Ungleichgewicht zwischen den beiden Angiopoietinen beobachtet (*Lovren 2008, Lim 2005*).

Neovaskularisierung und angiogenetische Faktoren sind unentbehrlich für die Entwicklung von Gefäßen, nicht nur während der embryonalen Entwicklung, sondern auch bei verschiedenen anderen (patho-)physiologischen Vorgängen, wie z.B. Wundheilung, Atherosklerose oder Tumorinvasion. Die meisten atherosklerotischen Läsionen sind vaskularisiert und diese instabilen Neogefäße stellen eine potentielle Gefahr der beschleunigten Plaqueprogression und -vulnerabilität dar. Inwieweit spezifische angiogenetische Faktoren hier eine Rolle spielen oder ob sie auch als potentielle Prognosemarker der Plaqueinstabilität dienen können, wurde noch nicht geklärt.

1.5. Aufgabenstellung

Neovaskularisierung und Neogefäße spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Progression von Atherosklerose. Inwiefern jedoch solche Neogefäße und die Expression einzelner angiogenetischer Faktoren direkt zur Rupturgefährdung und Plaquesvulnerabilität bei den höhergradigen Carotisstenosen beitragen ist noch weitgehend ungeklärt.

Die vorliegende Doktorarbeit soll deshalb erörtern, inwieweit Neovaskularisierung und relevante angiogenetische Faktoren, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Wachstum von Gefäßen spielen, zur Vulnerabilität von Carotisläsionen beitragen können.

Auf folgende Fragestellungen soll in dieser Arbeit eingegangen werden:

- 1) Kommen Neogefäße in Carotisplaques häufig vor? Wo sind diese Neogefäße innerhalb der Läsionen lokalisiert? Es werden mit Hilfe der Histologie und Immunhistochemie von ECs die Neogefäße ausgezählt und deren Lage bestimmt.
- 2) Gibt es Unterschiede in der Anzahl der Neogefäße bei stabilen und instabilen Carotisläsionen? In diesem Zusammenhang werden Carotisläsionen der in die Studie eingeschlossenen Patienten histologisch charakterisiert, um die Plaquestabilität, -ruptur, Zellularität und die Anzahl inflammatorischen Zellen zu bestimmen und mit dem Vorkommen der Neogefäße innerhalb der Plaque verglichen.
- 3) Werden angiogenetische Faktoren, wie VEGF, VEGFR-2, PDGF, Ang-1 und -2 in Carotisplaques exprimiert? Zu diesem Zweck werden immunhistochemische und Expressionsanalysen (RT-PCR) durchgeführt.
- 4) Können ausgewählte angiogenetische Faktoren, die aus den Zellen sezerniert werden (VEGF, PDGF, Ang-1, Ang-2) im Blut von Patienten mit höhergradigen Carotisstenosen detektiert werden? Mit Hilfe von ELISA-Assay wird die Konzentration der betroffenen angiogenetischen Faktoren bestimmt.

- 5) Gibt es Unterschiede zwischen den nachweisbaren Konzentrationen von VEGF, PDGF, Ang-1 und Ang-2 bei Patienten mit stabilen bzw. instabilen Carotisläsionen?
- 6) Welche Korrelationen gibt es zwischen den einzelnen angiogenetischen Faktoren in den Carotisläsionen und deren Werten im Blut der betroffenen Patienten?
- 7) Gibt es noch weitere Korrelationen zwischen anderen Faktoren gewonnen aus der Patientenanamnese und Befunden der klinischen Chemie (CRP, Fibrinogen, Alter, Geschlecht, neurologisches Symptom, usw.)?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien und Lösungen

Aceton	Roth
Ammonium hydroxide solution	Sigma
Bouin's solution	Sigma
Bromphenolblau	Roth
Citronensäure-Monohydrat	Merck
EDTA	Sigma
Eosin 1%	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Essigsäure (Eisessig)	Merck
Ethanol, 100% (zur Analyse)	Sigma
Ethanol vergällt, 96%	Institut für Pathologie
Ethanol vergällt, 70%	Institut für Pathologie
Formalin, 4%	Institut für Pathologie
Fuchsin, basisch	Chroma
Fuchsin S, Säurefuchsin	Chroma
Glykogen	Sigma
Isopropanol	Roth
Mayers Hämalaun	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Natriumazetat	Merck
Natriumchlorid (zur Analyse)	Merck
Natronlauge (NaOH), 2N	Merck
Natronlauge, 40%	Merck
PCR-Wasser	Sigma
Pikrinsäure	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Proteinase K	Sigma
Resorcin-Fuchsin	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Salzsäure, 25%	Merck
SDS	Sigma
Trizma base	Sigma

Trichrome Stain	Sigma
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	Merck
Weigert's Eisenhämalaun, Reagenz A	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Weigert's Eisenhämalaun, Reagenz B	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Xylol	Institut für Pathologie
Xylencyanol	Roth
Na-EDTA-Lösung (1 L)	250 g EDTA, 50 mL NaOH (40%), pH 7,4
Citratpuffer	10 mM Sodium Citrate, 0.05% Tween 20 pH 6 oder pH 8
Natriumazetat-Puffer, 3M (1 L)	246 g Natriumazetat, mit NaOH auf pH 4,5
AE-Puffer	100 mmol Tris; 0,5 mmol EDTA

2.2. Patientenkollektiv

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 54 Patienten mit höhergradiger Carotisstenose eingeschlossen, die am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München einer Carotis-Thrombendarteriektomie (Carotis-TEA) unterzogen wurden.

Bei allen Patienten wurde prä-interventionell eine umfangreiche neurologische Untersuchung durchgeführt und die klinische Diagnose gestellt. Der Grad der Stenose wurde mit Hilfe der farbkodierten Duplexsonographie bestimmt. Weiterhin wurde eine ausführliche Patientenanamnese sichergestellt, um die erzielten Ergebnisse mit den klinischen Parametern vergleichen zu können. Die Einteilung der Carotisplaques in stabil und instabil erfolgte nach der histologischen Charakterisierung der Präparate in Zusammenarbeit mit der Pathologie (Dr. Rudelius) nach der modifizierten AHA-Klassifizierung nach Prof. Virmani (*Virmani 2000, 2003, 2006*). Die Studie wurde nach den Richtlinien der World Medical Association Declaration von Helsinki durchgeführt. Alle Patienten haben ihr Einverständnis gegeben, dass ihre Blutproben und Gewebepreparaten wissenschaftlich untersucht werden können.

2.3. Probengewinnung

Bei Patienten mit höhergradiger Carotisstenose, bei denen die Carotis-TEA durchgeführt werden sollte, wurde 1-2 Tage vor dem chirurgischen Eingriff das Blut entnommen. Es wurden in diesem Zusammenhang immer jeweils zwei Röhrchen (9 mL S-Monovette, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Die Blutentnahme führten eine erfahrene Schwester oder ein Assistenzarzt durch. Anschließend wurde das Heparinblut ca. 30 min bei RT inkubiert, um es ausreichend gerinnen zu lassen, und anschließend 10 min bei 1000x g und 4°C abzentrifugiert. Überstand (Serum) wurde in vier 1,5mL-Eppendorfröhrchen überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Die Carotisplaques wurden operativ bei der Carotis-TEA gewonnen. Als chirurgische Technik sind verschiedene Verfahren etabliert, entweder die offene Ausschälung der Carotisplaques und Verschluss der Arteriotomie durch Direktnaht oder Patch (Dacron, PTFE, Vene), oder die Eversionsendarteriektomie, die Kürzungsoperation, die V-Y-Plastik und die interventionell-endovaskulären Techniken. Für alle offenen chirurgischen Verfahren wurde eine Hautinzision am Vorderrand des Muskulus sternocleidomastoideus mit anschließender Präparation der Carotidgabel ohne mechanische Alteration zur Verhütung embolischer Ereignisse durchgeführt. Nach Ausklemmen der Carotidbifurkation erfolgte eine Längsarteriotomie von der ACC bis in die ACI über das craniale Plaqueende hinaus. Die stenosierenden Plaques wurden anschließend ausgeschält. Diese offene Phase kann ohne bzw. mit intraluminalen Shunt, zur Verkürzung der Ausklemmzeit, durchgeführt werden. Bei einem kleinen Gefäßdurchmesser ist eine Patchplastik zur Vermeidung einer nahtbedingten Stenose erforderlich. Als Patchmaterial wird üblicherweise Dacron verwendet.

Das Plaquematerial wurde sofort nach der Entnahme in 4% Formalin überführt und über Nacht bei RT in dieser Lösung belassen. Anschließend (innerhalb 24 Stunden nach dem Eintauchen in Formalin) wurde die derart fixierte Plaque in EDTA-Lösung überführt, um die vorhandene Kalkablagerungen aufzulösen. Andernfalls sind die Plaques schwer weiter zu bearbeiten und lassen sich nicht gut schneiden. Somit sind die so entstandenen Histologien nur bedingt auswertbar und die Plaquepräparate haben zur Folge schlechte Morphologien. In Abhängigkeit von dem Verkalkungsgrad der Probe wurden die Carotisplaques ein bis mehrere Tage in der EDTA-Lösung schonend dekalzifiziert. Anschließend wurden die Plaques in mehrere Segmente von 3-4 mm untergeteilt. Nach Wässerung der einzelnen Segmente

erfolgte schließlich die Einbettung in Paraffin (genaues siehe weiter unten in der Beschreibung der histologischen Vorbereitung der Präparate). Diese Carotispräparate wurden bis zu weiteren histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen bei RT gelagert.

2.4. Histologie

Für die histologische Auswertung der Carotispräparate wurden zuerst Präparatschnitte auf einem Mikrotom angefertigt (2-3 μm), auf einen Glasobjektträger aufgezogen und bei 56°C über Nacht getrocknet.

2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient der Plaquecharakterisierung, Bestimmung der Zellularität und z.B. der Akkumulation inflammatorischen Zellen. Die Färbung erfolgte nach einem histologischen Standardprotokoll, das im Labor der Gefäßchirurgie bereits etabliert wurde. Die trockenen Schnitte wurden 3-mal 5 Minuten im Xylol entparaffiniert und danach in einer absteigender Alkoholreihe (Isopropanol - Ethanol 96% - Ethanol 70%) jeweils 2-mal für 3 Minuten inkubiert und anschließend in destilliertes Wasser überführt. Anschließend folgte eine 10-minütige Inkubation in Mayers Hämalaun. Danach wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen und in Leitungswasser für 50-10 Minuten übertragen (Bläuen). Hiermit erscheinen die Zellkerne blau. Anschließend folgten für 40-60 Sekunden die Inkubation in einem 2%-igem wässrigen Eosin (angesäuert mit Essigsäure), erneutes Spülen in destilliertem Wasser und die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70% - 96% - Isopropanol). Schließlich wurden die Schnittpräparate in Xylol überführt und eingedeckt. Das Zytoplasma der Zellen und partiell auch extrazelluläres Gewebe erscheinen anschließend rosa.

2.4.2. Elastika-van-Gieson-Färbung

Die Elastika-van-Gieson-Färbung dient ebenfalls der Plaquecharakterisierung. Damit kann der Kollagen- und Elastin-Anteil begutachtet werden. Zusätzlich kann, zusammen mit der vorherigen Hämalaun-Eosin-Färbung, die Plaquevulnerabilität und -ruptur bestimmt werden. Methodisch erfolgte die Entparaffinierung, zunächst zweimal für 5 Minuten in Xylol und durch kurzes Eintauchen in absteigender Alkoholreihe (Isopropanol - 96% - 70% Ethanol). Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 15 Minuten in einer Resorcinlösung belassen. Nach Abspülen mit destilliertem Wasser erfolgte erneut ein kurzes Eintauchen in 96%-igem Alkohol. Die Kernfärbung wurde durch ein fünfminütiges Einbringen der Schnitte in eine Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert erreicht. Dann wurden die Präparate 10 Minuten warm gewässert und zur Zytoplasmafärbung für 5 Minuten in Pikrofuchsinlösung überführt. Nach kurzer Befeuchtung mit destilliertem Wasser folgte wiederum das Eintauchen in 96%-igem Alkohol für circa 2 Sekunden. Abschließend wurden die Schnitte wie in der vorherigen Färbung in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert (70% EtOH - 96% EtOH - Isopropanol, jeweils für 3 Minuten), in Xylol überführt und anschließend eingedeckt. Mit Hilfe dieser Färbung werden Zellkerne schwarz, Kollagenfasern rot, Elastinfasern schwarz sowie Muskelfasern, Fibrin und Zytoplasma gelb dargestellt.

2.5. Immunhistochemie

Klassische histologische Färbungen basieren auf chemischen Eigenschaften von Zell- und Gewebsbestandteilen und stellen nur Strukturen mit gleichartigen chemischen und physikalischen – nicht aber notwendigerweise gleichen biologischen – Eigenschaften dar. Die Immunhistochemie dient dagegen der Darstellung von Zell- und Gewebe-spezifischen Antigenen, indem diese mit Hilfe von korrespondierenden Antikörpern visualisiert werden. Mit Hilfe der Immunhistochemie ist es möglich gewebespezifische Strukturen darzustellen und zwar diejenigen Proteine, Polysaccharide und andere Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können. Zu diesem Zweck werden monoklonale oder polyklonale Antikörper angewendet. Monoklonale Antikörper richten sich genau gegen ein Epitop des jeweiligen Antigens. Es handelt sich meist um Antikörper der Klasse IgG. Unter polyklonalen

Antikörpern versteht man natürliche Gemische aus Antikörpern, die während einer Immunreaktion gegen verschiedene Determinanten eines Antigens gebildet werden.

2.5.1. APAAP-Methode

Diese immunhistochemische Methode basiert auf einer indirekten Nachweismethode, der sogenannten APAAP-Methode (**A**lkalische **P**hosphatase **A**nti-**A**lkalische **P**hosphatase). Dabei bindet zunächst ein spezifischer, unkonjugierter Primärantikörper an das im Gewebe liegende Antigen. Abhängig von der Tierspezies, aus der der Primärantikörper gewonnen wird, muss ein entsprechender Brückenantikörper (Sekundärantikörper) eingesetzt werden, damit später der APAAP-Komplex binden kann. Hat also der Primärantikörper seine Herkunft im Kaninchen, so ist fungiert ein Maus-Anti-Kaninchen-Antikörper als Brückenantikörper. Denn der APAAP-Komplex besteht aus monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern gegen alkalische Phosphatase, die spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert sind. Es handelt sich dabei also um einen Enzym-Anti-Enzym-Komplex. Bei der APAAP-Methode sind je zwei Moleküle Enzym an einen Antikörper gebunden. Die Enzym-Immunkomplex-Methoden gehören zu den empfindlichsten immunhistochemischen Techniken. Sie nutzen die natürliche Affinität von Antikörpern gegenüber ihrem Antigen durch den Einsatz stabiler Immunkomplexe anstelle der relativ unsanften chemischen Konjugation. Vor allem durch die größere Anzahl von Enzymmolekülen, die pro Gewebsantigen zur Verfügung stehen, zeigen die Enzym-Immunkomplex-Methoden eine bessere Sensitivität gegenüber anderen Methoden.

2.5.2. LSAB-Methode

Eine andere Färbemethode, die heutzutage am meisten eingesetzt wird, ist die sog. LSAB-Methode: **L**abelled (**S**trept-) **A**vidin-**B**iotin-Methode (LSAB). Das Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin und Avidin für Biotin. Streptavidin und Avidin besitzen jeweils vier Bindungsstellen für Biotin. Im Einzelnen funktioniert die LSAB-Methode folgendermaßen: Der spezifische Antikörper gegen das gesuchte Antigen wird durch einen mit Biotin konjugierten sekundären Antikörper lokalisiert. Danach wird das Streptavidin-Enzym-Konjugat zugegeben, entweder Streptavidin-HRP (Horse-Radish-Peroxidase) oder

Streptavidin-AP (Alkalische Phosphatase), welches das, am sekundären AK kovalent gebundene Biotin, bindet. Die für die Färbung benötigten Enzyme (AP oder HRP) sind also direkt an das Streptavidin gekoppelt. Der spezifische Antikörper, der sekundäre Antikörper und der Streptavidin-Enzym-Komplex werden dann in einem letzten Schritt mit einem geeigneten Substrat (Chromogen) farblich dargestellt.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden folgende Antikörper gegen einzelne Zellen innerhalb der atherosklerotischen Läsionen der Arteria carotis verwendet:

Allgemeine Antikörper:

- Alpha-Aktin (SMA) für die Detektion von glatten Muskelzellen
- CD31 und Faktor VIII für die Detektion von Endothelzellen
- CD68 für die Detektion von Monozyten/Makrophagen und Schaumzellen
- CD3 für die Detektion von Inflammatorischen Zellen

Tabelle 1. Antikörper für die Detektion von Zellen innerhalb atherosklerotischer Plaques

	Antikörper/Antigen	Klon	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
SMA	Anti-Human Muskel Alpha-Aktin	HHF35	Mouse IgG ₁	1:200	Dako
CD68	Anti-Human CD68 (Makrophagen)	KP1	Mouse IgG ₁	1:2000	Dako
CD31	Anti-Human CD31 (Endothelzellen)	JC70A	Mouse IgG ₁	1:50	Dako
VIII	von Willebrand Faktor (Endothelzellen)	F8/86	Mouse IgG ₁	1:500	Dako
CD45	Anti-Human CD45 (Lymphozyten)	2B11	Mouse IgG ₁	1:100	Dako

Spezifische Antikörper:

- angiogenetische Faktoren (VEGR, VEGFR-2, PDGF, Ang-1, Ang-2)
- Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9)

Tabelle 2. Antikörper für die Detektion angiogenetischer Faktoren

	Antikörper/Antigen	Klon	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
VEGF	Anti-Human	SP28	Rabbit IgG	1:200	LabVision
VEGF-R2	Anti-Human	89109	Mouse IgG ₁	1:50	R&D
PDGF	Anti-Human	9257	Rabbit IgG	1:400	LabVision
Ang-1	Anti-Human	AF923	Goat IgG	1:50	R&D
Ang-2	Anti-Human	AF623	Goat IgG	1:25	R&D

Tabelle 3. Antikörper für die Detektion von Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

	Antikörper/Antigen	Klon	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
MMP-1	Anti-Human	RB-9225	Rabbit IgG	1:100	LabVision
MMP-2	Anti-Human	Ge1 VC2	Mouse IgG1	1:50	LabVision
MMP-3	Anti-Human	RB-10488	Rabbit IgG	1:100	LabVision
MMP-7	Anti-Human	4A3	Mouse IgG1	1:100	LabVision
MMP-8	Anti-Human	100608	Mouse IgG2A	1:100	R&D Sys.
MMP-9	Anti-Human	RB-9225	Rabbit IgG	1:100	LabVision

2.5.3. Immunhistochemische Aufarbeitung der Präparate

Wie bereits oben beschrieben, wurden die Präparate zuerst in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die Immunhistochemie wurden anschließend Schnitte mit 2-3 μm vorbereitet und über Nacht bei 56°C getrocknet. Danach folgte eine Deparaffinierung: Die Präparate auf den Objektträgern wurden zuerst 2-mal 10 Minuten in Xylol eingetaucht und danach erfolgte eine absteigende Alkoholreihe, 2-mal 5 Minuten in Isopropanol, danach dann jeweils 2-mal 5 Minuten in 100% - 96% - 70% Ethanol. Anschließend wurden die Präparate in Wasser überführt. Formalin-fixierte Gewebepreparate brauchen meistens eine Vorbehandlung, bevor die Schnitte mit dem ersten Antikörper behandelt werden können. Formalin bildet oft eine sog. Maske (Schicht) über dem Antigen resp. seinem Epitop, das durch den Antikörper erkannt werden soll. Durch die Fixierung von Gewebe und Zellen werden die Proteine miteinander quervernetzt. Einige Epitope verlieren dadurch ihre Eigenschaft, so dass sie von dem zugehörigen Antikörper nicht mehr erkannt werden. Die "Antigenität" des Proteins wird durch den Fixierungsprozess somit zumindest geschädigt oder ganz zerstört. Die Quervernetzungen (Maskierungen) können durch die Antigendemaskierung zum Teil wieder rückgängig gemacht werden. Aus diesem Grund wird die sog. Antigendemaskierung durchgeführt, auch Epitop-Demaskierung oder Antigen-Retrieval bezeichnet, mit der die Immunreaktivität von Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe wiederhergestellt werden. Dabei werden Kombinationen aus z.B. enzymatischen Verdau in sogenannten Retrieval-Lösungen mit Dampfhitze oder Mikrowellenöfen angewendet. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde, mit Ausnahme von Antikörper VIII, die Dampfhitze verwendet, indem alle Schnittpräparate für 7 Minuten in einem Kochtopf inkubiert wurden. Beim Faktor VIII wurde ein enzymatischer Verdau mit Proteinase XXIV (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für 20 Minuten verwendet. Als Lösung für den Kochtopf wurde ein Natriumcitratpuffer eingesetzt (10 mM Natrium Citrate, 0.05% Tween 20). Der pH-Wert liegt entweder bei 6 oder bei 8, abhängig vom verwendeten Antikörper, entsprechend der Empfehlung des Herstellers. Nach der Epitop-Demaskierung erfolgte ein Waschschriff mit Tris-Puffer 2-mal für 5 Minuten und eine Behandlung mit Wasserstoffperoxidase, um die endogene Peroxidase bei der Verwendung von Horse-Radish-Peroxidase für die Substratumwandlung zu deaktivieren. Anschließend wurden die Schnitte erneut 2-mal für 5 Minuten mit Tris-Puffer gewaschen und die Präparate mit dem ersten Antikörper (siehe Tabelle 1, 2 und 3) für eine Stunde bei RT behandelt. Alle Antikörper wurden in einer

speziellen Diluent-Lösung (Dako, Hamburg, Deutschland) verdünnt, wiederum entsprechend den Angaben in den oben erwähnten Tabellen. Danach erfolgte ein erneutes Waschen der Präparate mit Tris-Puffer, um den restlichen, nicht-gebundenen, primären Antikörper vollständig zu entfernen. Der zweite Antikörper und die Farbdetektion wurden entsprechend dem Protokoll der Hersteller verwendet. Es wurden zu diesem Zweck zwei Kits eingesetzt, die im Institut für Pathologie gut etabliert sind und die besten Ergebnisse liefern:

ChemMate Real Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (Dako) für die LSAB-Methode und ChemMate Detection Kit, APAAP, Mouse (Dako) für die APAAP-Methode. Mit Ausnahme von SMA- und VIII-Antikörper, für die die APAAP-Methode verwendet wurde, geschah der Nachweis der Immunreaktion mit dem LSAP-Kit. Nach der Behandlung der Präparate mit dem zweiten Antikörper und dem Chromophor wurde die Färbereaktion nach einer ausreichenden Farbentwicklung gestoppt und mit Hämalaun für 30 Sekunden gegengefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Dies erleichtert die weitere histologische Auswertung. Anschließend erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils 2-mal 5 min in jeder Lösung: 70% – 96% Ethanol – Isopropanol – Xylol. Danach wurden die Präparate mit Eukitt (R&D System, Wiesbaden, Deutschland) eingedeckt. So immun-gefärbt wurden die Präparate dann bei RT bis zur Auswertung aufbewahrt.

2.6. Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Präparate bezüglich Zellularität, entzündliche Reaktion, Neovaskularisierung und Expression verschiedener angiogenetischer Faktoren innerhalb der Carotisläsionen, erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axioplan 2, Carl Zeiss, Institut für Pathologie der TU München). Für Übersichtsaufnahmen wurde die 1,25- oder 2,5-fache Vergrößerung verwendet. Für detailliertere Analysen wurde eine 10-, 20- und 40-fache Vergrößerung eingesetzt. Die Zellen, sowohl histologische als auch immunhistochemische Färbungen, wurden als entweder positiv oder negativ (+ oder -) ausgewertet. Anschließend erfolgte eine semi-quantitative Auswertung der einzelnen Färbungen als Nachweis der möglichen Stärke/Intensität der Expression:

- keine Aktivität/Expression
- + schwache Aktivität/Expression
- ++ mittelgradige Aktivität/Expression
- +++ starke Aktivität/Expression

Ausgewählte Schnitte/Präparate wurden anschließend fotografiert und sind als Beispiele für die einzelnen Färbungen oder Morphologien im Ergebnissteil dargestellt. Für den Nachweis der Expression resp. Aktivität der einzelnen angiogenetischen Faktoren und korrespondierenden Zellen wurde die sog. Folgefärbung durchgeführt, in der zwei konsekutive (aufeinanderfolgende) Schnitte unterschiedlich gefärbt wurden, z.B. ein Schnitt/Präparat mit SMA und der Folgeschnitt mit VEGF.

2.7. Auswertung der Neovaskularisierung

Die Quantitative Bestimmung der Mikrogefäßdichte erfolgte lichtmikroskopisch mit Hilfe der immunhistochemischen Darstellung der endothelialen Antigene CD31 und/oder Faktor VIII. Dabei wurde der gesamte Carotisplaque eines Patienten untersucht und die Neogefäße ausgezählt. Anschließend wurde für den Vergleich zwischen den einzelnen Patienten und zwischen Patienten mit stabilen und instabilen Carotisläsionen die „schlimmste“ Region/Plauebereich ausgewählt, die auch klinisch relevant sein sollte. Die Auszählung erfolgte im gesamten Plaque und entspricht somit der Anzahl an Neogefäßen innerhalb des kompletten „klinisch relevanten“ Plaque. Die Lokalisation der Neovaskularisierungszonen innerhalb der atherosklerotischen Läsionen wurde durch die Beurteilung der gesamten Plaque und der Lage der meisten Neogefäße festgehalten.

2.8. Methoden zur Präparation von DNA und RNA aus Formalin-fixierten-in-Paraffin-eingebetteten Carotispräparaten

2.8.1. Präparation von Gesamt-DNA

DNA wurde aus den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Carotispräparaten mit *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (Qiagen) isoliert. Dieses Kit ist optimiert, um Formalin und Paraffin aus den Geweben restlos zu entfernen und ausreichend reine DNA zu extrahieren, um die PCR durchführen zu können. Es wurden zuerst 10 bis 40 µm Gewebe genommen und die DNA entsprechend dem Firmenprotokoll isoliert. Optimale Ergebnisse wurden mit 2-mal 10 µm Schnittgewebe erzielt und diese Menge an Material wurde dann bei allen Carotispräparaten verwendet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das geschnittene Gewebe wurde in ein 1,5mL-Röhrchen überführt und mit 1 mL Xylen überschichtet und gevortext. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 mL 100% Ethanol überschichtet und gevortext. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit für 2 Minuten. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet bei

37°C für 10 Minuten getrocknet, um alle Ethanolreste zu entfernen. Das Pellet wurde anschließend in 180 µL ATL-Puffer resuspendiert und 20 µL Proteinase K zugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation bei 56°C für 1 Stunde. Mit Hilfe von Proteinase K wurden alle Proteine degradiert und die DNA wurde somit freigesetzt. Anschließend wurden die Proben eine weitere Stunde bei 90°C inkubiert, um die durch Formalin entstandenen Modifikationen der DNA wieder rückgängig zu machen. Die Röhrchen wurden anzentrifugiert, um die Proben unten aufzusammeln, 200 µL Puffer AL zugegeben, gevortext, 200 µL Ethanol (100%) hinzugefügt, erneut gevortext und in ein spezielles QIAamp-MinElute-Röhrchen überführt, das eine spezielle Matrix/Filter enthält, mit dessen Hilfe DNA gebunden werden kann. Diese Röhrchen wurden in sog. Sammelröhrchen gesteckt und bei 6000x g für 1 Minute abzentrifugiert. Die durchgelaufene Flüssigkeit wurde verworfen und das QIAamp-MinElute-Röhrchen erneut in das Sammelröhrchen eingesetzt. Es erfolgten zwei weitere Waschschriffe, bei denen das QIAamp-MinElute-Röhrchen mit Puffer AW1 und AW2 mit jeweils 500 µL gewaschen wurde. Damit wurden die restlichen Bestandteile aus der Matrix herausgewaschen und nur die reine DNA bleibt gebunden. Es erfolgte anschließend eine Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit für 3 Minuten, um die Matrix/Filter innerhalb des Röhrchens, wo sich die DNA befindet, zu trocknen. Danach wird das QIAamp-MinElute-Röhrchen in ein normales 1,5mL-Eppendorfröhrchen eingesetzt und die DNA aus der Matrix mit einem ATE-Puffer eluiert, indem die Salzkonzentration des Puffers verändert wird und dadurch die Bindung der DNA an die Matrix gelöst werden kann. Dies geschah durch eine erneute Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute. Das Eluat enthält eine reine DNA, dessen Konzentration in einem Photometer (Biorad, München, Deutschland) bei 260 nm bestimmt wurde. Anschließend wurde auch die Reinheit der DNA durch das Verhältnis der zwei Wellenlängen 260/280nm gemessen. Die DNA wurde dann entweder weiter für eine PCR eingesetzt oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren und gelagert.

2.8.2. Präparation von RNA

Für die Isolierung der RNA aus den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Carotispräparaten wurde ein modifiziertes Protokoll zusammen mit einem High Pure RNA Paraffin Kit von Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet.

Im ersten Schritt erfolgte, wie bei der DNA, die Entparaffinierung. Auch hier zeigten 2-mal 10 µm Schnitte die besten Ergebnisse hinsichtlich der RNA-Ausbeute und wurden deshalb für alle Carotispräparate angewendet. Diese 2-mal 10µm Schnitte wurden direkt in 1,5mL-Röhrchen übertragen, mit 800 µL Xylol versetzt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Röhrchen einige Male durch Invertieren durchgemischt. Anschließend wurde 400 µL Ethanol (100%) zugegeben, gevortext und bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Alle Protokollschritte, falls nicht anders erwähnt, erfolgten bei RT. Der Überstand wurde verworfen und 1 mL Ethanol (100%, zur Analyse, Merck) zugegeben. Die Proben wurden erneut gevortext und 4 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die entparaffinierten Präparate 10-15 Minuten bei 55°C getrocknet.

Als nächstes erfolgte die RNA-Isolierung, weiterhin bei RT. Zum getrockneten Präparat wurden 100 µL Lysepufer, 16 µL 10% SDS und 40 µL Proteinase K zugegeben und bei 55°C über Nacht bei 350-450 rpm auf einem Heizblock geschüttelt. Falls die Proben noch nicht vollständig verdaut waren (Proteinase K verdaut genauso wie bei der DNA alle Proteine und setzt in diesem Fall die RNA frei), wurden noch weitere 10 µL Proteinase K zugegeben und eine zusätzliche Stunde bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden zu den Proben 325 µL Binding Buffer und 325 µL EtOH (100%) zugegeben, durch Hin- und Herpipettieren gemischt und in ein sog. High-Puffer-Filter-Röhrchen überführt, das zuvor in ein Sammelröhrchen eingesetzt wurde. Dieses Röhrchen enthält wiederum eine spezielle Matrix/Filter, wo die RNA gebunden werden kann. Es folgte die Zentrifugation für 30 Sekunden bei 6000x g, der Durchlauf wurde verworfen, die Proben erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten abzentrifugiert und der restliche Durchlauf erneut entfernt. Danach folgte die Waschung der Matrix mit verschiedenen Puffern (500 µL Waschpuffer I und II) jeweils bei 6000x g für 15 Sekunden. Der Durchlauf wurde jeweils verworfen. Zum Schluss der Waschschritte wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten abzentrifugiert, um die Reste der Waschpuffer zu beseitigen. Anschließend wurde das High-

Puffer-Filter-Röhrchen herausgenommen und in ein steriles 1,5mL-Eppendorfröhrchen eingesetzt. Die RNA wurde aus der Matrix mit 90 μ L Elution Buffer herauseluiert.

In einem weiteren Schritt folgte der DNase-Verdau. Durch das oben beschriebene Verfahren wurde nicht nur die RNA sondern auch die DNA mitisoliert. Um die DNA zu entfernen erfolgte der Verdau mit der DNase. Zu den eluierten Nukleinsäuren wurden 10 μ L DNase-Inkubationspuffer (10x) und 1 μ L DNase I zugegeben, das Röhrchen wurde durch das Hin- und Herpipettieren gemischt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach der DNase-Behandlung der Proben erfolgte eine RNA-Aufreinigung. Zu den Proben wurden nacheinander 20 μ L Lysepuffer, 18 μ L 10% SDS und 40 μ L Proteinase K zugegeben, gevortext und bei 55°C eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Die folgenden Schritte erfolgten wie bereits zuvor beschrieben, über das High-Puffer-Filter-Röhrchen, wo die RNA in der Matrix gebunden, dann gewaschen und anschließend mit 50 μ L Elutionspuffer eluiert wurde.

Weil jedoch durch dieses Verfahren nicht genügend RNA zur Verfügung steht bzw. die RNA-Konzentration viel zu niedrig ist, wurde anschließend als letzter Schritt die RNA durch Fällung aufkonzentriert. Zu der eluierten und aufgereinigten RNA (50 μ L) wurden 250 μ L Ethanol (100%), 10 μ L NaAcetat (3M, pH 4,5) und 1,5 μ L Glykogen zugegeben, die Proben gut gemischt und mindestens 1 Std. bei -20°C inkubiert. Anschließend folgte Zentrifugation für 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und 1 mL 70% Ethanol zugegeben, die Proben erneut durch Vortexen gemischt und für 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde für 5-10 Minuten getrocknet und in 20 μ L reinem RNA-freiem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit einem Photometer bestimmt und bei -70°C eingefroren oder gleich für cDNA-Synthese verwendet.

2.8.3. Synthese von cDNA

Um die Expression auf RNA-Ebene analysieren zu können, wurde aus der RNA die komplementäre cDNA synthetisiert, die dann mittels RT-PCR untersucht wurde. Hierfür wurde 1 μ g RNA mit destilliertem Wasser (mit einem RNase Inhibitor) auf 11 μ l aufgefüllt, 2 μ l dT₁₂₋₁₈ (kurze Oligonukleotide mit 12 bis 18 Thymidinen, die die Poly-As der mRNA binden und somit als Primer die Vorlage für die reverse Transkription bilden) zugegeben und

5 Minuten lang bei 70°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze sofort auf Eis gestellt und jeweils 7 µl einer Lösung [2 µl dNTP (20 mM; Roche), 4 µl Reverse Transkriptase Puffer (5x) und 1 µl (200 U) Reverse Transkriptase (M-MLV, Promega)] zugegeben. Anschließend wurden die Proben 60 Minuten lang bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Die so gewonnene cDNA (20 µL Gesamtvolumen) wurde bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt.

2.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine einfache und schnelle Methode, um DNA oder cDNA zu vervielfältigen. Somit reicht eine sehr geringe Konzentration an Nukleidsäuren, um nicht nur das Vorkommen eines spezifischen Gens, sondern mittels RT-PCR auch die Expression eines bestimmten Gens nachzuweisen. Die Amplifikation einer bestimmten Sequenz erfolgt durch zyklische Wiederholung (Kettenreaktion), indem die Produkte der vorherigen Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus dienen und somit eine exponentielle Vervielfältigung ermöglichen.

2.9.1. PCR für DNA

Die Amplifizierung der DNA mit der PCR-Technik diente nicht nur der Kontrolle, um optimale Primer für die anschließende RT-PCR zu generieren, sondern auch dem Nachweis der Expression der einzelnen angiogenetischen Faktoren.

Für die Primeroptimierung wurden Ansätze von 50 µL mit folgender Zusammensetzung pipettiert: 100 ng DNA, 5 µL 5x Taq-Polymerase Puffer (Puffer Y, peqlab), 5 µL dNTPs (200 µM, peqlab, München, Deutschland), 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µL; peqlab) und jeweils 1 µL Primer forwards (5'-3' Richtung) und reverse (3'-5' Richtung) (Endkonzentration: 10 pmol). Die Mischung wurde mit einem DNase und RNase freiem PCR-Wasser auf 50 µL aufgefüllt. Die Amplifizierung erfolgte in einem PCR-Gerät (Perkin Elmer Gene Amp PCR-System 9.600, Oldendorf, Deutschland) zu folgenden Bedingungen:

5 Minuten bei 95°C; 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 55°C bis 60°C entsprechend dem verwendeten Primerpaar und 30 Sekunden bei 72°C, in 40 Zyklen und zum Schluss 5 Minuten bei 72°C. Nach Ende der Reaktion wurden die Ansätze mit einem DNA-Auftragspuffer (1:6) versetzt und jeweils 20 µl auf das Agarosegel (2%) aufgetragen, die amplifizierten DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid (Sigma) markiert und unter einer UV-Lampe photographiert und analysiert. Die verwendeten Primer und Primerpaare sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3a: Primer für die Optimierung der PCR und RT-PCR

Bezeichnung	Sequenz (22 bp)	Tm
GAPDH-F1	Gagtaagaccctggaccacca	60,0°C
GAPDH-F2	Cactgccaacgtgtcagtggg	60,8°C
GAPDH-F3	Cccatcaccatcttccaggagc	59,7°C
GAPDH-R1	Ggactgagtgtggcagggactc	61,4°C
GAPDH-R2	Tgtagcccaggatgcccttgag	60,8°C
GAPDH-R3	Tccatggtggtgaagacgccag	61,3°C
VEGF-F1	Tcttaccaggtcagacgga	60,1°C
VEGF-F2	Atgaggacaccggtctgacca	61,6°C
VEGF-F3	Agaagcagccatgacagctcc	61,5°C
VEGF-R1	Tttaggtgcacccaggaagg	61,4°C
VEGF-R2	Aggtcctgaatcttccaggca	59,9°C
VEGF-R3	Agcaatgtcctgaagetcccca	60,4°C
VEGFR2-F1	Tacttcaggggacagaggac	60,2°C
VEGFR2-F2	Agtgtggaggacttccaggag	59,9°C
VEGFR2-F3	Ccaccgtgtactccagtgagga	59,9°C
VEGFR2-R1	Tcaggctggagaatctgggctg	60,8°C
VEGFR2-R2	Agctgacacattgcccgttg	60,6°C
VEGFR2-R3	Agaagaggccatcgctgcactc	61,2°C

Tabelle 3b: Primer für die Optimierung der PCR und RT-PCR

Ang1-F1	Agcttggcttggatgtgcaacc	60,6°C
Ang1-F2	Ggagcaagtttgcgagaggca	60,1°C
Ang1-F3	Gaggcacggaaggagtgtgctg	62,3°C
Ang1-R1	Cggcgtgattgctgcacccta	64,1°C
Ang1-R2	Tcagaatggcagcgaggaaagc	59,8°C
Ang1-R3	Ctgctgagtcagctgcgtgta	60,9°C
Ang2-F1	Aaaagctgacacagccctcca	60,8°C
Ang2-F2	Aagcagcatcagccaaccagga	61,1°C
Ang2-F3	Tgcaaagatgaacccgaggctg	59,8°C
Ang2-R1	Ttggttgacagcagcgtctg	59,9°C
Ang2-R2	Atgcatcaaaccaccagcctcc	60,1°C
Ang2-R3	Actgctgtgttctctccaggca	60,0°C
PDGF-F1	Tggacctgaacatgacccgctc	61,0°C
PDGF-F2	Aacatgaccgctcccactctg	61,1°C
PDGF-F3	Gcaagtgtgagacagtggcagc	60,9°C
PDGF-R1	Ccgaatggtcacccgagtttg	60,4°C
PDGF-R2	Gtcttgactcggcgatcatgg	60,4°C
PDGF-R3	Cagcaatggtcaggaaccag	60,5°C
PDGF-F4	Tcaggtgggttagagatggagt	60°C
PDGF-F5	Acagtggcttctttcgttttc	60°C
PDGF-F6	Gttgagtggtgtagatggtga	60°C
PDGF-R4	Gaaaggaaccagaggaagaggt	60°C
PDGF-R5	Actccatcttaaccacactga	60°C

Tabelle 4: Getestete Primerpaare und deren Fragmentlänge. Mit (*) sind die Primerpaare bezeichnet, welche die besten Ergebnisse gezeigt haben. Diese wurden dann für die quantitative Analyse der Expression der einzelnen angiogenetischen Faktoren verwendet.

Primer-forwards	Primer-reverse	Fragmentlänge	Auswahl
GAPDH-F1	GAPDH-R1	90bp	
GAPDH-F2	GAPDH-R2	122bp	*
GAPDH-F3	GAPDH-R3	101bp	
VEGF-F1	VEGF-R3	98bp	
VEGF-F2	VEGF-R2	126bp	*
VEGF-F3	VEGF-R1	80bp	
VEGFR2-F1	VEGFR2-R3	101b	
VEGFR2-F2	VEGFR2-R2	120bp	*
VEGFR2-F3	VEGFR2-R1	91bp	
PDGF-F1	PDGF-R3	90bp	
PDGF-F2	PDGF-R2	110bp	
PDGF-F3	PDGF-R1	101bp	
PDGF-F4	PDGF-R4	126bp	*
PDGF-F5	PDGF-R5	107bp	
PDGF-F6	PDGF-R4	99bp	
Ang1-F1	Ang1-R3	121bp	
Ang1-F2	Ang1-R2	89bp	
Ang1-F3	Ang1-R1	101bp	*
Ang2-F1	Ang2-R3	90bp	*
Ang2-F2	Ang2-R2	110bp	
Ang2-F3	Ang2-R1	64bp	

2.9.2. Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Für diese Polymerasekettenreaktion wurde die RNA, wie oben bereits beschrieben, in cDNA transkribiert. Es wurden 1 µg RNA in einem 20 µl Ansatz in cDNA umgesetzt und für eine PCR-Reaktion jeweils 2 µL der cDNA eingesetzt. Die PCR-Reaktion erfolgte wie bereits unter 2.9.1 PCR für DNA beschrieben. Anschließend wurde, falls die entsprechenden Banden vorhanden waren, eine quantitative RT-PCR (Real-Time PCR) mit Hilfe von SYBRGreen (peqlab) durchgeführt. Die Optimierung erfolgte wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben.

Bei einer RT-PCR ist es im Gegensatz zu PCR (DNA) wichtig, dass die Primer außerhalb der transkribierten Region liegen und innerhalb der sogenannten Exons (transkribierbare DNA-Regionen), die der mRNA und damit der Expression der einzelnen Gene entsprechen. Die verwendeten Primer und Primerpaare sind in den Tabellen 3 und 4 dargestellt.

2.9.3. Real-Time quantitative RT-PCR

Die quantitative PCR ermöglicht die Quantifizierung resp. die genaue Bestimmung der amplifizierten Menge an DNA. Bei dieser Methode erfolgt eine Fluoreszenz-Messung, die während eines jeden PCR-Zyklus erfasst wird. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines PCR-Laufs wird dann anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

Für die PCR-Durchführung wurde das iQ5 real-time PCR-Cycler von Biorad verwendet. Der SYBRGreen-Mix war von der Firma peqlab. Dieser Mix enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen, Taq-Polymerase und dNTPs und ist für die quantitative PCR optimiert. Es wurden jeweils 25 µL Ansätze verwendet. Alle Reaktionen wurden in speziellen 96-PCR-Platten (Sarstedt) durchgeführt, die mit einer Klebefolie abgedeckt und versiegelt wurden (Sarstedt).

Der PCR-Ansatz für eine Reaktion sah wie folgt aus:

- PCR-Wasser	9,5 µL
- SYBRGreen-Mix	12,5 µL
- Primer (forwards + revers)	0,5 µL + 0,5 µL
- DNA oder cDNA	2,0 µL
- Gesamtvolumen	25 µL

Die PCR-Konditionen waren wie folgt:

- 5 min 95°C (Aktivierung der Hot Start DNA-Polymerase)
- 30 sec 95°C
- 30 sec 55°C oder 60°C (abhängig von den verwendeten Primern)
- 1 sec 72°C
- 40 Zyklen

Es gibt mehrere Verfahren, die Fluoreszenz anzuwenden und zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurde wegen der Einfachheit und der Vielfalt an verschiedenen Faktoren die interkalierende Methode mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen verwendet (peqlab). Diese Farbstoffe lagern sich in die DNA ein (interkalieren), wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz bei jedem PCR-Zyklus und der Menge an doppelsträngiger DNA. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

Für die Quantifizierung wurde als Referenz für die Normalisierung das GAPDH-Gen herangezogen, um einen relativen Menge-Vergleich durchführen zu können. Weil jedoch keine absolute Menge an DNA mitgemessen wurde, handelt es sich in dieser Arbeit um eine sog. relative Quantifizierung. Die Auswertung erfolgte im exponentiellen Anstieg der Zyklen. Für den Anfang der exponentiellen Phase wurde der Ct-Wert (engl. Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) bzw. der Cp-Wert (engl. Crossing Point) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die Effizienz wurde dann wie folgt berechnet:

$$\Delta CP = CP (\text{Zielgen}) - CP (\text{Kontrollgen GAPDH})$$

$$\Delta\Delta CP = \Delta CP (\text{Patient mit instabiler Plaque}) - \Delta CP (\text{Patient mit stabiler Plaque})$$

$$\text{Ratio (Unterschied der Expression)} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

Es wurden zuerst die Δ CPs für jeden angiogenetischen Faktor berechnet und alle Patienten einer Stichprobe zusammengefasst (Patienten mit stabilen Carotisläsionen resp. Patienten mit instabilen Carotisläsionen). Anschließend wurde der Unterschied zwischen den Gruppen berechnet.

2.10. Elektrophorese

Mit Hilfe der Elektrophorese können die durch PCR amplifizierte DNA- und cDNA-Fragmente dargestellt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit innerhalb des Gels entspricht dabei der Fragmentlänge und lässt sich anhand von speziellen DNA-Leitern genau bestimmen. Bei der DNA und cDNA kommt meistens bis zu 60 bp Fragmentlänge (und größer) das Trägermaterial Agarose zum Einsatz. Die Elektrophorese dient im Grunde dazu, DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge voneinander zu trennen. Aufgrund der möglichen Degradierung der DNA und auch RNA durch die Formalin-Fixierung, wurden Fragmentlängen von 80 bis 130 bp optimiert. Für solche, relativ kleine Fragmente wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet. Als Puffer für das Gel wurde der TBE-Puffer verwendet (10,8 g Tris (Sigma); 5,5 g Borsäure (Sigma); 4 mL 0,5 M EDTA (Sigma), pH 8,0 pro 1 L H₂O). Nach der Zugabe entsprechender Agarosemenge (z.B. 2 g auf 100 mL TBE-Puffer) wurde die Lösung in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht, bis sich das Agarosegel vollständig löste. Anschließend wurde Ethidiumbromid (EtBr) zugegeben, um die Banden/DNA-Fragmente unter dem UV-Licht sichtbar zu machen (Endkonzentration 0,5 µg/mL). Danach wurde das Gel in eine spezielle Kammer gegossen und an einem Ende der Kammer wurde ein Kamm eingesetzt, der dann die Taschen für die einzelnen PCR-Proben bildet. Nach 20 bis 30 Minuten wurde das Gel fest und die Proben wurden entsprechend aufgetragen und die DNA-Fragmente in einer Elektrophoresekammer bei 80 V für eine Stunde aufgetrennt. Dieses Verfahren wurde für sog. kleine Gele mit 8 Spuren/Taschen bei der Primer-Optimierung verwendet. Nach einer quantitativen RT-PCR mit SYBRGreen wurden die Proben für eine Kontrolle ebenfalls aufs Gel aufgetragen, auf sog. große Gele, wo 2x 20 Spuren/Taschen vorhanden waren. Hier erfolgte die Elektrophorese bei 100 V für 30 min. Anschließend wurden die Gele in einem „Imaging“-Gerät unter UV-Licht gestellt, die optimale Aufnahme eingestellt und die Gele fotografiert. Um die Fragmentlänge zu bestimmen wurde entweder ein 50 bp DNA-Leiter oder ein 100 bp DNA-Leiter der Firma peqlab verwendet.

2.11. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung wurde die Statistiksoftware SPSS 15 verwendet. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn der P-Wert $< 0,05$ war. Für den Vergleich zwischen den Patientengruppen wurde zuerst ein Kolmogorov-Smirnov-Test für eine Stichprobe durchgeführt, um festzustellen, ob es sich um eine Normalverteilung handelt. Normalverteilte stetige Stichproben wurden anschließend mit dem Studentischen T-Test für zwei unabhängige Variablen untereinander verglichen. Nicht-parametrische Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert, nominale Variablen wurden mit dem Fisher's exaktem Test untersucht. Für die kausalen Zusammenhänge zwischen den einzelnen Variablen wurden entweder der Pearson Korrelationskoeffizient (normale Verteilung) verwendet oder der Spearman Rank Korrelationskoeffizient (nicht-parameterische Variablen) angewendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Patientencharakterisierung

Für die vorliegende Studie wurden insgesamt 54 Patienten mit fortgeschrittener Carotisstenose (>70%) ausgewählt, die in der Klinik für Gefäßchirurgie, Prof. Dr. Eckstein, einer Carotis-Thrombendarteriektomie (Carotis-TEA) unterzogen wurden und die folgende Kriterien erfüllt haben: auswertbare histologische Präparate, Vorhandensein von Blutproben und Verfügbarkeit ausreichender Patientendaten, hinsichtlich medikamentöser Behandlung und variabler Begleiterkrankungen. Bei all diesen Patienten wurden die Carotidplaques histologisch aufgearbeitet (siehe weiter unten: Charakterisierung der Präparate) und, entsprechend der Morphologie, als stabil bzw. instabil unterteilt. Die Patientencharakterisierung ist in der Tabelle 5 zusammengefasst. In die Gruppe der instabilen Plaques gehörten auch Patienten mit rupturierten Läsionen. Die Charakterisierung der Präparate erfolgte zusammen mit Priv.-Doz. Dr. Pelisek und der Pathologin Frau Dr. Rudelius. Von den 54 Carotidpatienten waren 37 männlich und 17 weiblich. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug etwa 70 Jahre. Der Anteil an asymptomatischen Patienten lag bei 48%. Aus der Patientengruppe mit instabilen Carotidstenosen (n=30) wiesen 59% der Patienten ein neurologisches Symptom auf. In der Gruppe der Patienten mit stabilen Carotidläsionen (n=24) waren es dagegen nur 26%. Somit korrelierte die Plaqueinstabilität signifikant mit der neurologischen Symptomatik ($p = 0.008$). Das war auch der einzige Unterschied zwischen den einzelnen Patientenkollektiven. Alle anderen Messwerte, Begleiterkrankungen und medikamentöse Behandlung zeigten keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen. Hinsichtlich verschiedener Begleiterkrankungen der in die Studie einbezogenen Individuen zeigte sich, dass die meisten der Patienten an Hypertonie litten ($89,6 \pm 2,7\%$). Weiterhin hatten viele der Carotidpatienten eine Hypercholesterinämie ($79,1 \pm 3,1\%$). Relativ wenig Individuen litten an einer Niereninsuffizienz ($14,7 \pm 1,6\%$) und etwa ein Drittel der untersuchten Patienten hatte einen Diabetes mellitus (Tabelle 5). Etwa die Hälfte der Patienten hat aktiv geraucht, waren entweder immer noch Raucher oder hatten das Rauchen aufgegeben.

Bezüglich der medikamentösen Behandlung nahmen alle untersuchten Patienten entweder ASS (Aspirin) oder Clopidogrel (Plavix) ein und etwa zwei Drittel dieser Individuen wurden mit Statin behandelt.

Tabelle 5: Patientencharakterisierung

	Stabil (24) [%]	Instabil (30) [%]	P-Wert
Alter (Jahre)*	70,4 (± 8,1)	69,7 (± 7,4)	0,912
Geschlecht (Mann/Frau)	68,5 / 31,5	72,1 / 27,9	0,327
Neurolog. Symptom	26,3	59,1	0,008*
<i>Begleiterkrankungen</i>			
Hypertonie	92,3	86,9	0,748
Hyperlipidämie	54,6	66,9	0,311
Hypercholesterinämie	82,2	76,1	0,428
Herzerkrankung	30,5	33,9	0,544
Nikotinabusus	47,2	50,1	0,677
Niereninsuffizienz	13,1	16,2	0,721
Diabetes mellitus	33,4	28,9	0,598
<i>Medikamentöse Behandlung</i>			
Aspirin / Clopidogrel	100	100	1,000
Betablocker	66,2	71,1	0,332
ACE-Inhibitoren	45,6	41,7	0,512
Statine	62,9	74,2	0,345
Nitrate	4,2	6,7	0,289

3.2. Histologische Plauecharakterisierung

Die Einteilung des Patientenkollektivs erfolgte gemäß der histologischen Plauecharakterisierung. Zu diesem Zweck dienten die HE- und EvG-Färbungen. Wie bereits in dem Methodenteil beschrieben, wurden zuerst alle Segmente jedes Patienten lichtmikroskopisch untersucht und das klinisch relevanteste Segment wurde für die Beurteilung der Plauestabilität herangezogen. Die Carotisplauestabilität wurde nach der modifizierten Klassifizierung gemäß Prof. Virmani (*Virmani 2000, 2003, 2006*) beurteilt. Als instabil eingestuft wurden Carotisplaues mit einer dünnen fibrösen Kappe über einem nekrotischen Core (Lipid und Cholesterinablagerungen mit wenig Kollagen) von weniger als 100 μm Dicke.

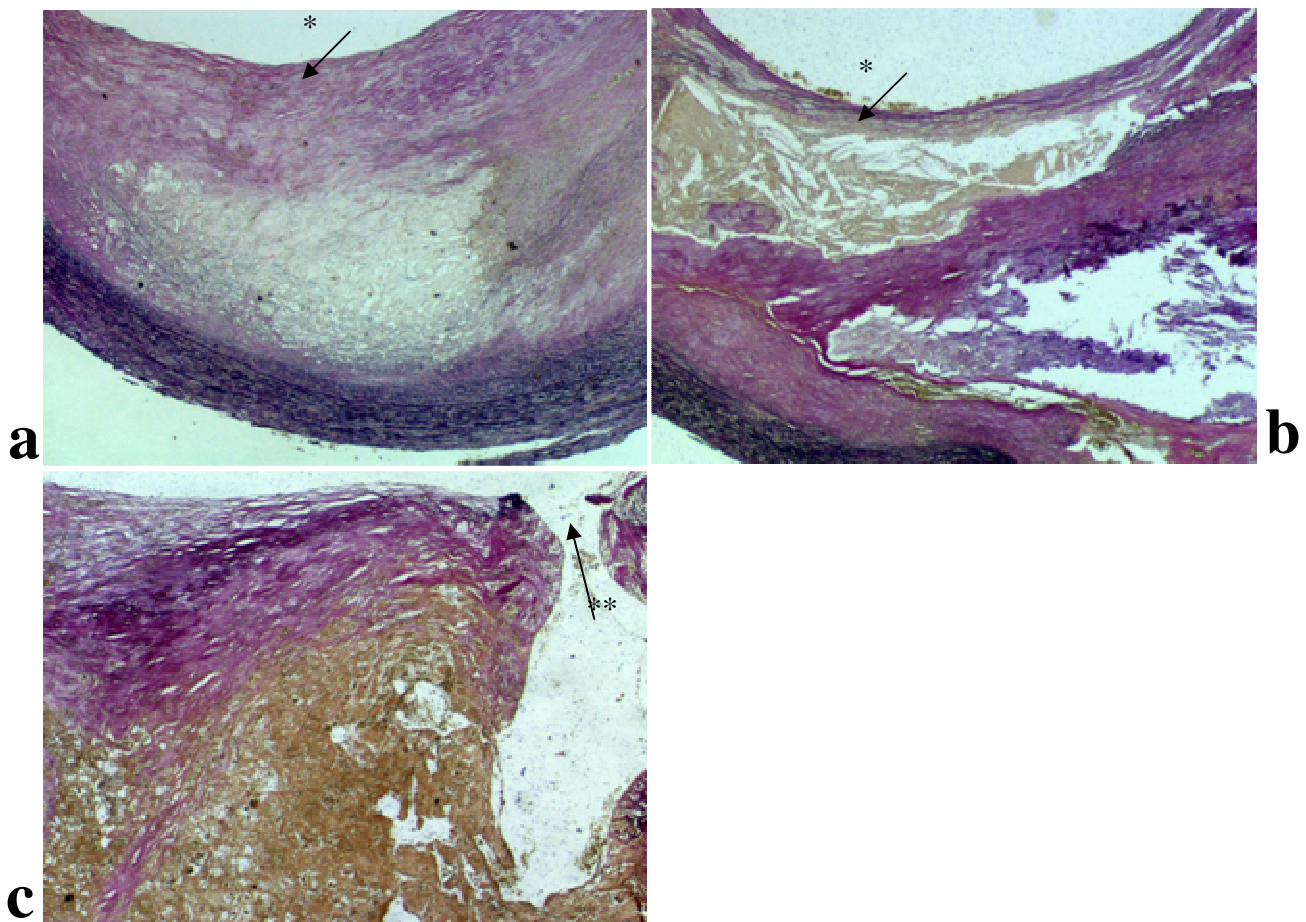


Abbildung 1: Beispiele von stabilen (a), instabilen (b) und (c) rupturierten Carotisplaues. Stabile Plaues hatten eine dicke fibröse Kappe (Pfeil *) über einem nekrotischen Core, oder es gab kein eindeutiges nekrotisches/Lipid Core. Instabile Plaues zeigten eine dünne fibröse Kappe (Pfeil *) über einem relativ großen atheromatösen Bereich. Rupturierte Plaues hatten meistens eine unterbrochene (rupturierte) fibröse Kappe und Einblutung (siehe Pfeil **). EvG-Färbung, Vergrößerung 25-fach.

Plaques, bei denen noch Einblutungen vorhanden waren, wurden ebenfalls als instabil bezeichnet. Einige der Plaques waren auch rupturiert. Das bedeutet, dass diese Plaques eine zerrissene, angerissene oder beschädigte fibröse Kappe hatten, in den meisten Fällen auch Einblutungen. Stabile Plaques hatten eine dicke fibröse Kappe über einem nekrotischen Core, oft mit nur wenigen Zellen (glatte Muskelzellen oder Monozyten/Markophagen). Weiterhin hatten diese Läsionen oft kein eindeutiges nekrotisches/Lipid Core. In den meisten Fällen war noch eine intakte Endothelschicht zu sehen. Instabile Plaques zeigten dagegen eine dünne fibröse Kappe über einem relativ großen atheromatösen Bereich. Diese dünne fibröse Kappe war oft nicht homogen und partiell auch unstrukturiert. Sehr oft war der Bereich der fibrösen Kappe bei den instabilen Plaques reich an Monozyten/Markophagen. Rupturierte Plaques hatten, wie bereits oben beschrieben, eine unterbrochene (rupturierte) fibröse Kappe und eine Einblutung (siehe Pfeil **), die durch die gelbliche Verfärbung der Plaque deutlich zu sehen war.

Tabelle 6. Histologische Charakterisierung von Carotisläsionen

Plaqueeigenschaft	stabil (n=20)	instabil (n=34)	relative Veränderung der Plauekcomposition (stabil vs. instabil)*	P-Wert
Zellularität	+ / ++	+ / ++	-3 %	0,798
Infiltrate	+	+ / ++	+87 %	< 0,001
Kollagen	+ / ++	+	-23 %	= 0,023
Elastin	+ / ++	+	-18%	0,119
Verkalkung	+ / ++	++	+8%	0,412
Neovaskularisierung	++	++ / +++	+43%	0,007
SMA	+	+ / -	-28%	0,087
CD68	+	+	33%	0,233

* Die relativen Werte -, +/-, ... +++ wurden in Zahlen umgewandelt, der Mittelwert berechnet und der Wert der stabilen Plaques wurde als 100% gesetzt. Die Mittelwerte der instabilen Plaques wurden anschließend mit den Werten der stabilen Carotisläsionen verglichen. Der Unterschied ist in Prozent der stabilen Plaques dargestellt, - bedeutet Verringerung um den angegebenen Prozentsatz, + korrespondierende Erhöhung. Anschließend wurden die Werte der beiden Gruppen miteinander statistisch verglichen (Mann-Whitney-U-Test) und in der letzten Spalte als der P-Wert angegeben.

Neben der Einteilung der Plaques in stabil oder instabil, wurden die Präparate morphologisch weiter charakterisiert. Es wurden Zellularität, Verkalkung der Plaques, relatives Gehalt an Kollagen, nicht-kollagene Bereiche (Lipide, Cholesterin) und Neovaskularisierung semi-quantitativ ausgewertet.

Keinem oder einem geringen Vorkommen wurden die Werte 0 (-) und +/- zugeordnet. An Stellen, wo viel von dem untersuchten Charakteristikum vorhanden war, als +++. Um die Zuordnung richtig durchführen zu können, wurden zuerst alle Plaques lichtmikroskopisch untersucht, um eine Übersicht über „viel“ und „rel. wenig“ zu bekommen. Dann wurden die Plaques entsprechend morphologisch charakterisiert. Die Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

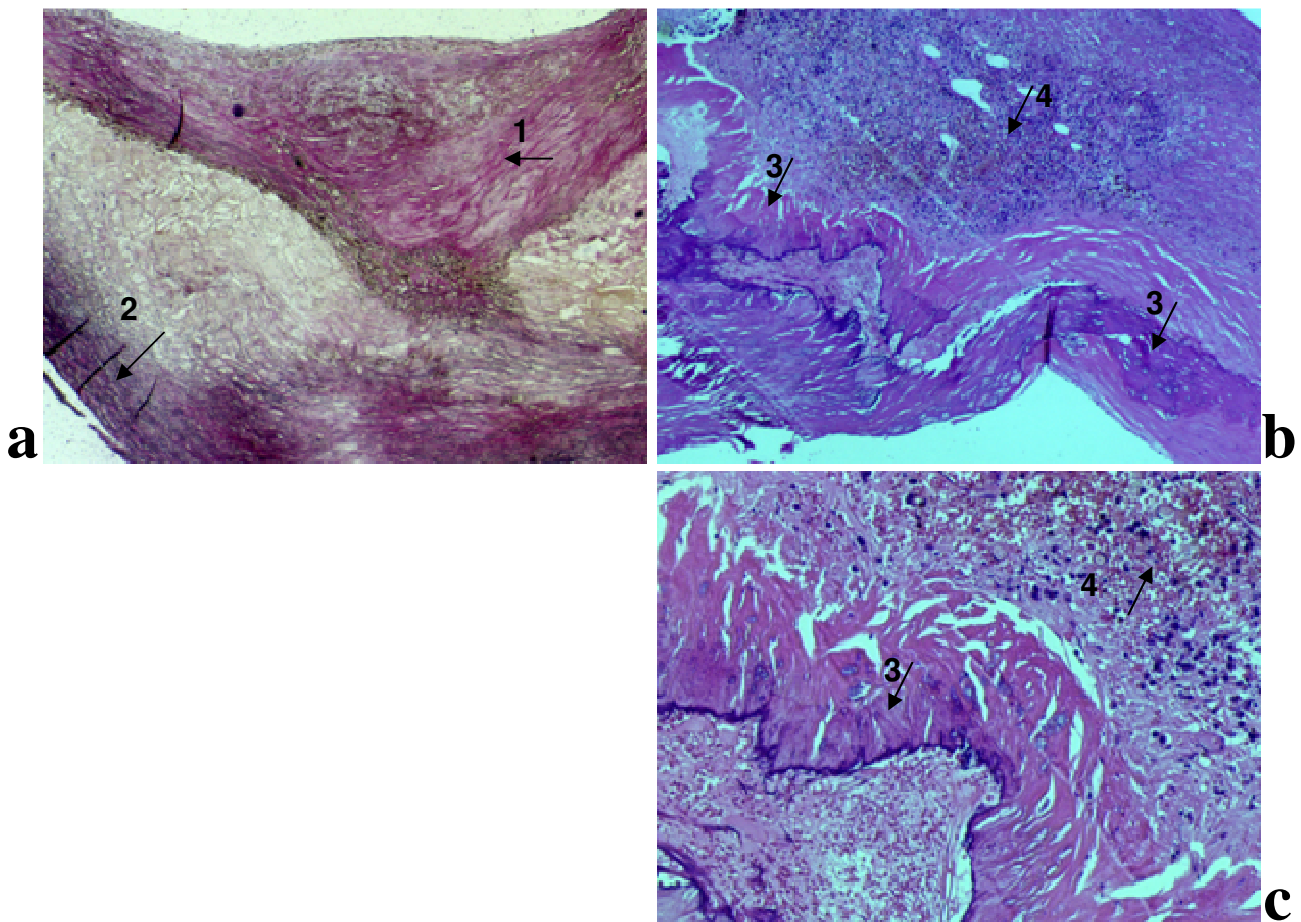


Abbildung 2. Morphologische Charakterisierung von Carotisplaques. (a) EvG-Färbung, 25-fache Vergrößerung, Pfeil 1 zeigt kollagene Fasern, Pfeil 2 elastische Fasern; (b,c) HE-Färbung mit 25-facher (a) und 250-facher Vergrößerung, Pfeil 3 zeigt verkalkte Stellen, Pfeil 4 einen inflammatorischen Bereich mit Entzündungszellen und Einblutungen (Erythrozyten = rot).

Die Zellularität zwischen den beiden Plaqueformen - stabil vs. instabil – war nicht signifikant unterschiedlich. Dagegen zeigten jedoch Infiltrate einen deutlichen Anstieg in den instabilen Plaques. Diese Unterschiede mit $P < 0,001$ waren hoch signifikant. Auch die Anzahl an Makrophagen war in den instabilen Carotisläsionen um etwa 1/3 erhöht, diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Dagegen war die Menge an glatten Muskelzellen in den instabilen Plaques reduziert, genauso wie der Anteil an Kollagen. Die Kollagenreduktion war sogar mit $p = 0,027$ statistisch signifikant. Auch die semi-quantitative Auswertung der Neovaskularisierung zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Hier wurde eine signifikante Erhöhung an Neogefäßen in den instabilen Plaques beobachtet ($p = 0,007$).

Einige Beispiele der morphologischen Charakterisierung der Plaques sind in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt. Kollagen und Elastin wurden anhand der EvG-Färbung ausgewertet.

Kollagene Fasern erscheinen bei dieser Färbung violett, elastische Fasern sind schwarz (Abb. 2a). Die Zellularität wurde anhand der HE-Färbung beurteilt, genauso wie das Vorhandensein von Infiltraten (Abb. 2b, c). Inflammatorische Zellen wurden zusätzlich mit CD45 dargestellt, um diese Zellen besser quantifizieren zu können. Kalkablagerungen zeigten sich entweder als amorphe Bereiche, oft mit einem gewissen „Zaun“ abgegrenzt (Abb. 2b, c), oder im fortgeschrittenen Endstadium als leere Stellen mit zerfransten Rändern innerhalb der Plaques (hier nicht gezeigt). Dies kommt dadurch zustande, dass sich verkalktes Gewebe schwer schneiden lässt, ohne die Morphologie zu schädigen. Aus diesem Grund werden die Plaques, bei denen der Verdacht auf Verkalkung bestand, mit EDTA-Lösung behandelt, um Kalk aufzulösen (siehe auch Beschreibung der Plaqueaufarbeitung im Methodenteil). Diese Stellen erscheinen dann in der morphologischen Untersuchung leer.

3.3. Immunhistochemische Plaquecharakterisierung

In Abbildung 3 bis 5 sind Beispiele der immunhistochemischen Charakterisierung hinsichtlich einzelner Zellarten innerhalb der Carotisplaques dargestellt. Makrophagen und Monozyten (CD68-Färbung) zeigten eine klassische atherosklerotische Verteilung, wie bereits bei anderen Autoren (*Stary 1992, 1994, 1995; Virmani 2000, 2006*) beschrieben. Monozyten fanden sich verteilt unter der Endothelschicht (Abb. 3), etwas tiefer in den atherosklerotischen

Läsionen waren es Makrophagen und Schaumzellen, die dann meist das eigentliche nekrotische Core umrandeten. Das nekrotische Core selbst zeigte oft eine unspezifische hellbraune Färbung (Abb. 3a). Weiterhin wurden Makrophagen/Monozyten vermehrt in der Schulterregion des Atheroms beobachtet.

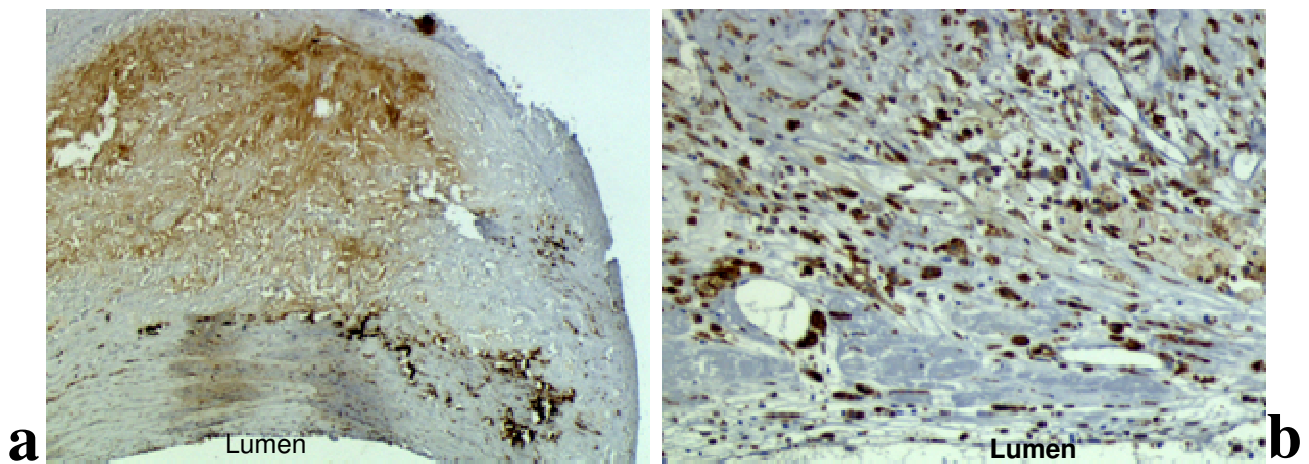


Abbildung 3. CD68-Färbung von Monozyten/Makrophagen: (a) 25-fache Vergrößerung, (b) 250-fache Vergrößerung. Charakteristische Erscheinung von Makrophagen in der Schulterregion des Atheroms ist in (a) deutlich zu sehen. Der Plaque zeigt oft eine unspezifische braune Anfärbung.

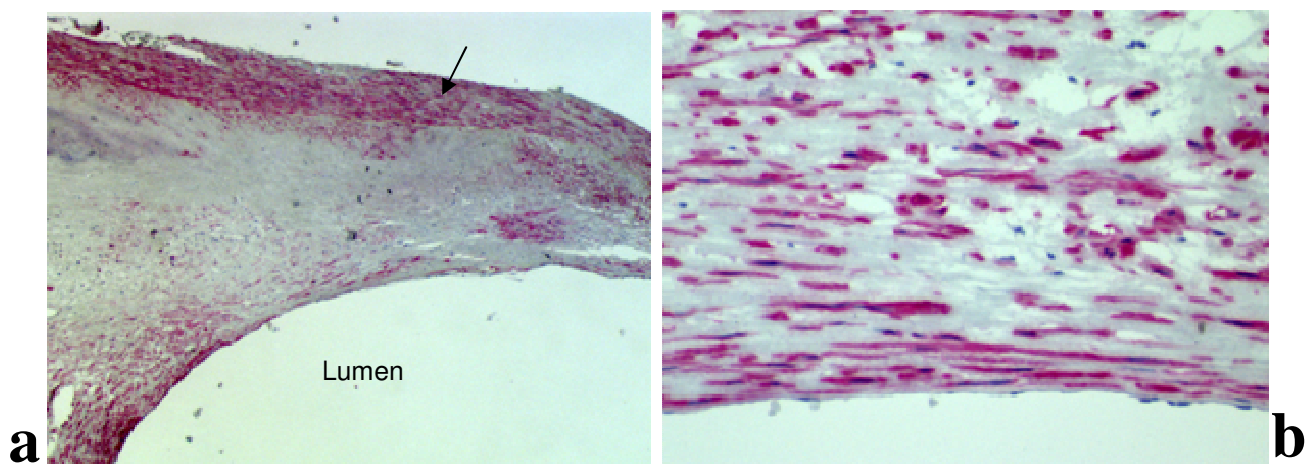


Abbildung 4. SMA-Färbung glatter Muskelzellen in der atherosklerotischen Carotisläsionen. 25-fache (a) und 200-fache (b) Vergrößerung. Ein klassisches Beispiel der Verteilung der glatten Muskelzellen in der Läsion, am Rande als Teil der herauspräparierten Media (Pfeil) und unter der endothelialen Schicht.

Glatte Muskelzellen wurden in den atherosklerotischen Carotispräparaten (Abb. 4) meist am äußeren Rand der Plaques beobachtet. Diese glatten Muskelzellen stammen jedoch aus der Media. Während der Carotis-TEA wird auch ein Teil der Media mit dort vorhandenen glatten Muskelzellen entfernt. Diese glatten Muskelzellen tragen jedoch nicht zur morphologischen Erscheinung der atherosklerotischen Läsion bei. Weiterhin werden glatte Muskelzellen verstreut innerhalb der Läsion beobachtet, öfter jedoch unter der Endothelschicht. Solche Zellen tragen, wenn sie noch aktiv sind, durch die Produktion von Kollagenfasern zur Plaquestabilität bei.

Die Abbildung 5 zeigt die Färbung der Endothelzellen. Es wurden zuerst zwei verschiedene Färbungen durchgeführt, CD31 und Faktor VIII (von Willebrand Faktor), weil bekannt ist, dass sich nicht immer alle endotheliale Zellen anfärben lassen.

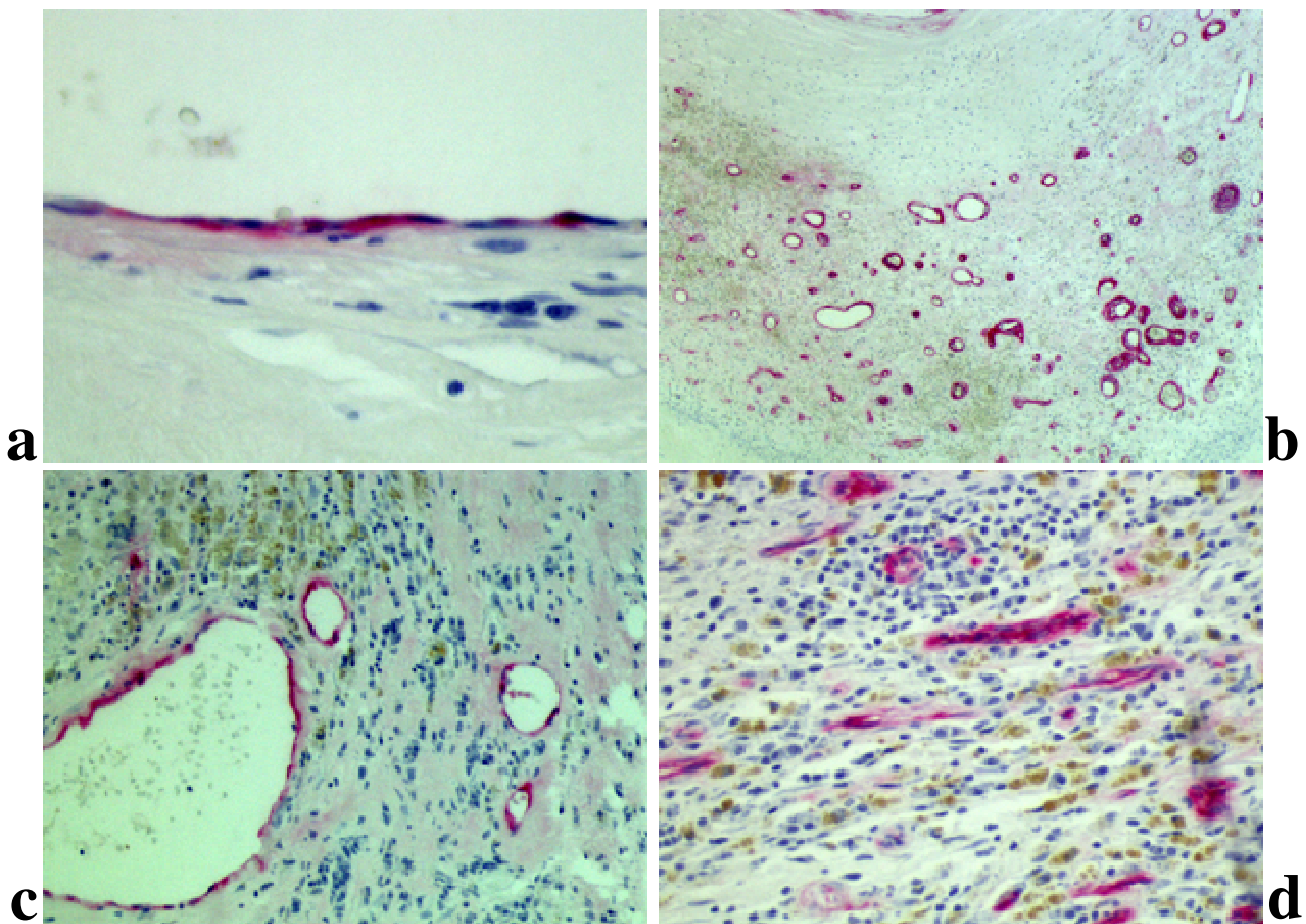


Abbildung 5. Faktor VIII-Färbung von Endothelzellen. (a) Luminaler Endothelzellen, 400-fache Vergrößerung. (b) Übersichtsbild einer Carotisläsion mit Neovesseln innerhalb des Atheroms, 25-fache Vergrößerung. (c) Beispiel von Neogefäßen unterschiedlicher Größe, 100-fache Vergrößerung. (d) Beispiel von Neogefäßen assoziiert mit inflammatorischen Zellen und ebenfalls Einblutung (gelbe Bereiche entstanden durch Eisenablagerung durch Erythrozyten).

Die Ergebnisse der beiden immunhistochemischen Färbungen zeigten vergleichbare Resultate, die Färbung mit Faktor VIII war jedoch stärker. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren immunhistochemischen Nachweise von Endothelzellen die Färbung mit Faktor VIII durchgeführt. Abbildung 5a zeigt die Färbung luminaler Endothelzellen, Abb. 5b, c und d zeigen die Neogefäße innerhalb der atherosklerotischen Carotisplaques. Abbildung 5b demonstriert eine Übersicht der Neogefäße im Plaque, Abb. 5c zeigt ein Beispiel dieser Mikrogefäße in unterschiedlichen Größen. Hier läßt sich deutlich erkennen, dass es sowohl kleine als auch große Neogefäße gibt, beide - kleine wie große - bestehen jedoch nur aus der Endothelschicht, ohne eine stabilisierende Schicht aus glatten Muskelzellen, wie z.B. in der Abbildung 6 dargestellt.

Wie in Abbildung 5d ersichtlich ist, sind die meisten Neogefäße mit inflammatorischen Zellen assoziiert. Weiterhin kommt es oft im Bereich der Neogefäße zur „Einblutung“. Durch die durchlässigen und partiell instabilen Neogefäße diffundieren Infiltrate und auch Erythrozyten in das umliegende Gewebe. Erythrozyten sind durch die Eisenablagerung erkennbar (gelbe Färbung, Abb. 5d).

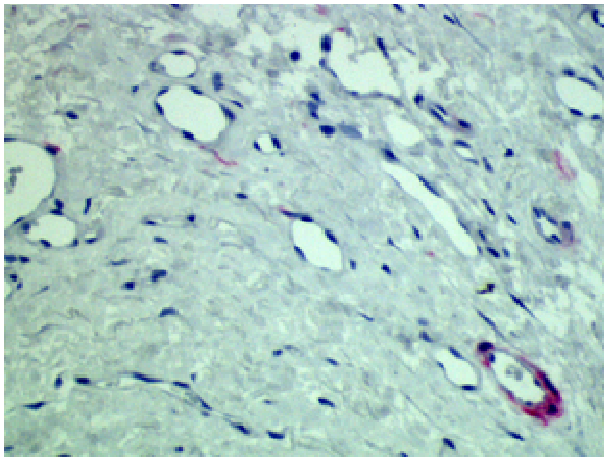


Abbildung 6. Reife und unreife Neogefäße. SMA-Färbung glatter Muskelzellen, 200-fache Vergrößerung. Die meisten der Neogefäße waren unreif und bestanden nur aus der Endothelschicht. Hier zeigte nur ein einziges Mikrogefäß die stabilisierende Schicht aus glatten Muskelzellen.

3.4. Charakterisierung der Neogefäße

Der Nachweis der Neogefäße erfolgte, wie oben bereits beschrieben, innerhalb der Carotisplaques anhand der immunhistochemischen Färbung mit Faktor VIII. Um herauszufinden, ob die meisten der Carotisläsionen überhaupt Neogefäße beinhalten, und wie viele dieser Neogefäße es in den Plaques überhaupt sind, wurden die Plaques von allen Studienpatienten auf das Vorkommen von Neogefäßen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass 93,8% der Carotisplaques Gefäße enthielten. Weiterhin wurde untersucht, ob diese Gefäße reif oder unreif sind. Reif bedeutet, dass diese Gefäße auch eine Schicht aus glatten Muskelzellen enthalten, die normalerweise Gefäße stabilisieren. Dies wurde durch die Faktor VIII- und SMA-Färbung analysiert. Zu diesem Zweck wurden alle Neogefäße ausgezählt und der Anteil an Gefäßen, die glatte Muskelzellen enthielten, bestimmt. In 97,1% der Fälle bestanden die Neogefäße nur aus der Endothelschicht, egal wie groß sie waren, siehe auch Abbildung 5c. Dagegen waren reife Gefäße mit einer schützenden Schicht aus glatten Muskelzellen äußerst selten (2,9%). Das Beispiel eines reifen Gefäßes ist in Abbildung 6 dargestellt.

In einem weiteren Schritt wurden die Gefäße in den klinisch relevanten Segmenten ausgezählt. Zweck dieser Untersuchung war, herauszufinden, ob es hinsichtlich der Anzahl von Neogefäßen innerhalb der Läsion Unterschiede zwischen stabilen und instabilen Carotisplaques gibt. Weil jedoch nur der klinisch relevante Bereich der Plaque zu einem potentiellen Schlaganfall führt, wurden Neogefäße nur in diesem Bereich beachtet. Aufgrund der Heterogenität der Plaques, deren unterschiedlicher Größe und Struktur und auch der unregelmäßigen Verteilung der Mikrogefäße, wurde die Möglichkeit, die Anzahl der Neogefäße per z.B. mm² zu bestimmen, verworfen und anstatt dessen, die gesamte Anzahl dieser Gefäße in der ganzen Läsion ausgezählt. Wie bereits oben erwähnt, waren einige Plaques ganz ohne Neogefäße. Es gab jedoch auch Plaques mit bis zu 372 Neogefäßen pro Carotisplaque. Durchschnittlich konnten insgesamt 126 ± 68 Neogefäße pro Carotisläsion beobachtet werden. Der Vergleich der einzelnen Patientenkollektive (Patienten mit stabilen vs. Patienten mit instabilen Carotisläsionen) zeigte weiterhin signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit einem P-Wert von 0,021.

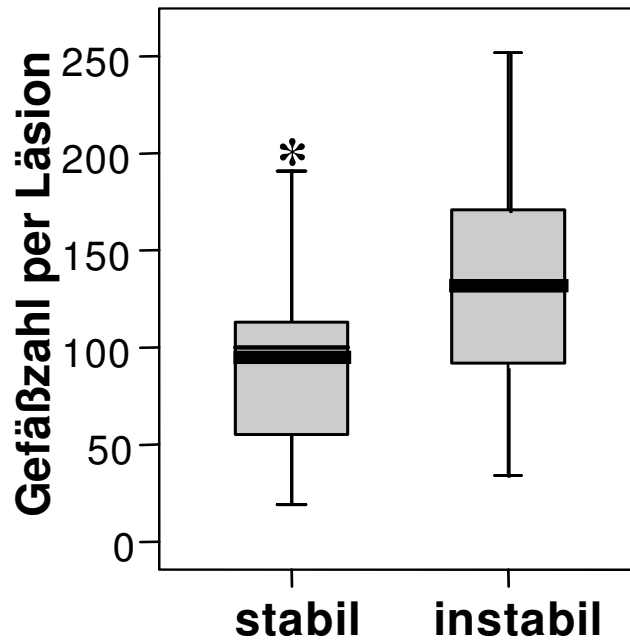


Abbildung 7. Vergleich der Anzahl der Neogefäße innerhalb von Carotisläsionen zwischen Patienten mit stabilen und instabilen Plaques. Die Neogefäße wurden in der gesamten Läsion gezählt. Für die Auszählung wurden nur die klinisch relevanten Plaques genommen. Die Unterschiede waren statistisch signifikant mit $P = 0,021$.

3.5. Immunhistochemischer Nachweis der Expression angiogenetischer Faktoren in Neogefäßen

Die vorherigen Untersuchungen zeigten, dass die meisten der Carotisplaques tatsächlich Neogefäße enthielten und dass die Anzahl der Neogefäße signifikant mit der Plaquestabilität korrelierten. Nun stellte sich eine weitere Frage, ob diese Gefäße noch aktiv sind, und ob sie die relevanten angiogenetischen Faktoren wie VEGF, VEGFR-2 für das Wachstum der Gefäße und PDGF, Ang-1 und -2 für die Reifung und Stabilisierung der Gefäße, exprimierten. Zu diesem Zweck erfolgte als erstes eine immunhistochemische Untersuchung der oben erwähnten angiogenetischen Faktoren.

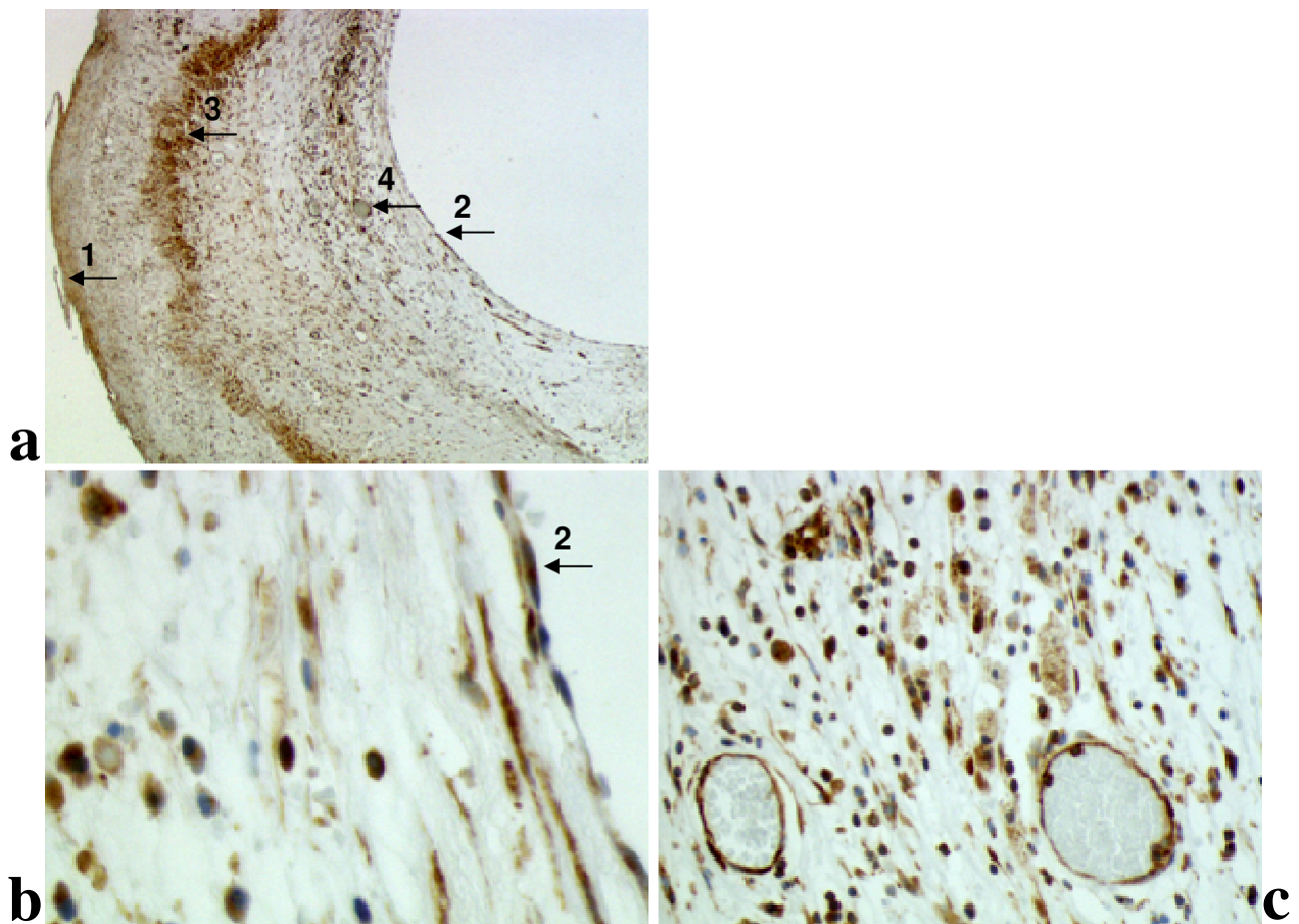


Abbildung 8. Expression von VEGF in Carotisläsionen. (a) ein Übersichtsbild der Expression von VEGF in der Plaque (25-fache Vergrößerung). Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass alle Zellen innerhalb der Plaque VEGF exprimiert haben (1- glatte Muskelzellen, 2- Endothelzellen, 3- Makrophagen, 4- Neogefäße). Für ein besseres Verständnis wurden noch Nahaufnahmen von luminalen Endothelzellen (b) und Neogefäßen (c) durchgeführt (400-fache Vergrößerung).

Abbildung 8 zeigt ein Übersichtsbild der Expression von VEGF. Es ist deutlich zu erkennen, dass die VEGF-Expression relativ stark ist und dass prinzipiell alle Zellen innerhalb der Plaque diesen angiogenetischen Faktor exprimiert haben. Es konnten anhand der Färbung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen detektiert werden. Somit wurde VEGF in den glatten Muskelzellen, Makrophagen, inflammatorischen und sogar endothelialen Zellen des Lumens beobachtet (Abb. 8). Hinsichtlich der Expression von VEGF innerhalb der Neogefäße konnte auch eine deutlich positive immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden (Abb. 8c).

Bezüglich der Expression von VEGFR-2 war die Situation jedoch deutlich unterschiedlich (Abb. 9). Allgemein war die Aktivität von VEGFR-2 niedriger und nicht alle Zellen waren positiv.

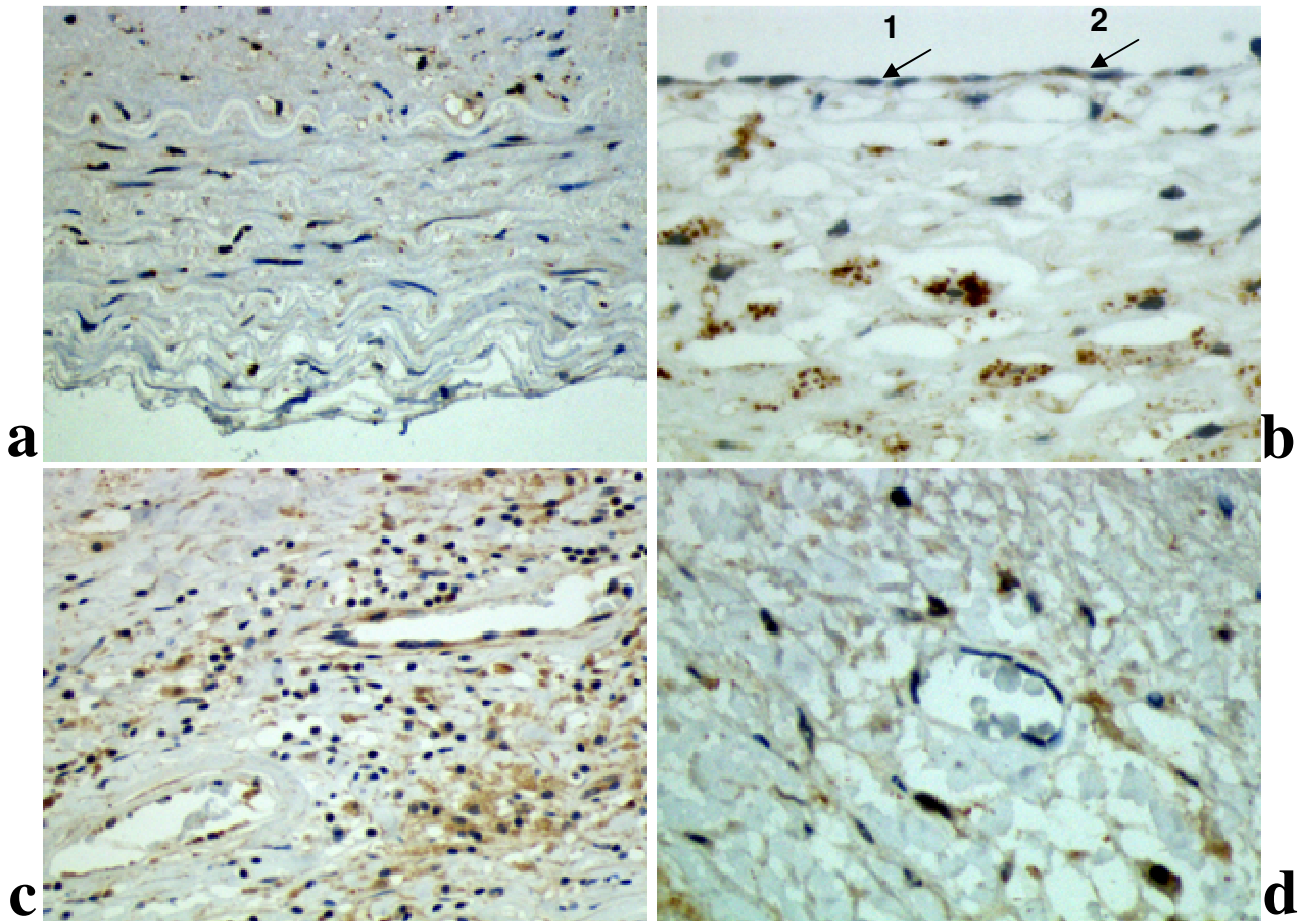


Abbildung 9. Expression von VEGFR-2 in Carotisläsionen. (a) Expression von VEGFR-2 in glatten Muskelzellen (200-fache Vergrößerung). Die meisten dieser Zellen waren negativ (siehe Pfeil). (b) Expression von VEGFR-2 in Endothelzellen (400-fache Vergrößerung). Einige Zellen waren negativ (1) andere wiederum positiv (2). (c) und (d) Expression von VEGFR-2 in Neogefäßen (200-fache und 400-fache Vergrößerung). Beispiel von positiven (c) und negativen (d) Neogefäßen.

Glatte Muskelzellen zeigten keine Expression von VEGFR-2 (Abb. 9a, Pfeil). Bei den luminalen Endothelzellen gab es unterschiedliche Ergebnisse, einige der Zellen waren negativ, andere wiederum positiv (Abb. 9b, Pfeile). Makrophagen und Schaumzellen waren, wie in allen anderen immunhistochemischen Färbungen ebenfalls positiv. Beispiele für Makrophagen und Schaumzellen sind in Abb. 9b dargestellt. Auch Neogefäße zeigten unterschiedliche Expressionsmuster von VEGFR-2 (Abb. 9c und d). Abbildung 9c zeigt positive Neogefäße, Abbildung 9d negative Gefäße.

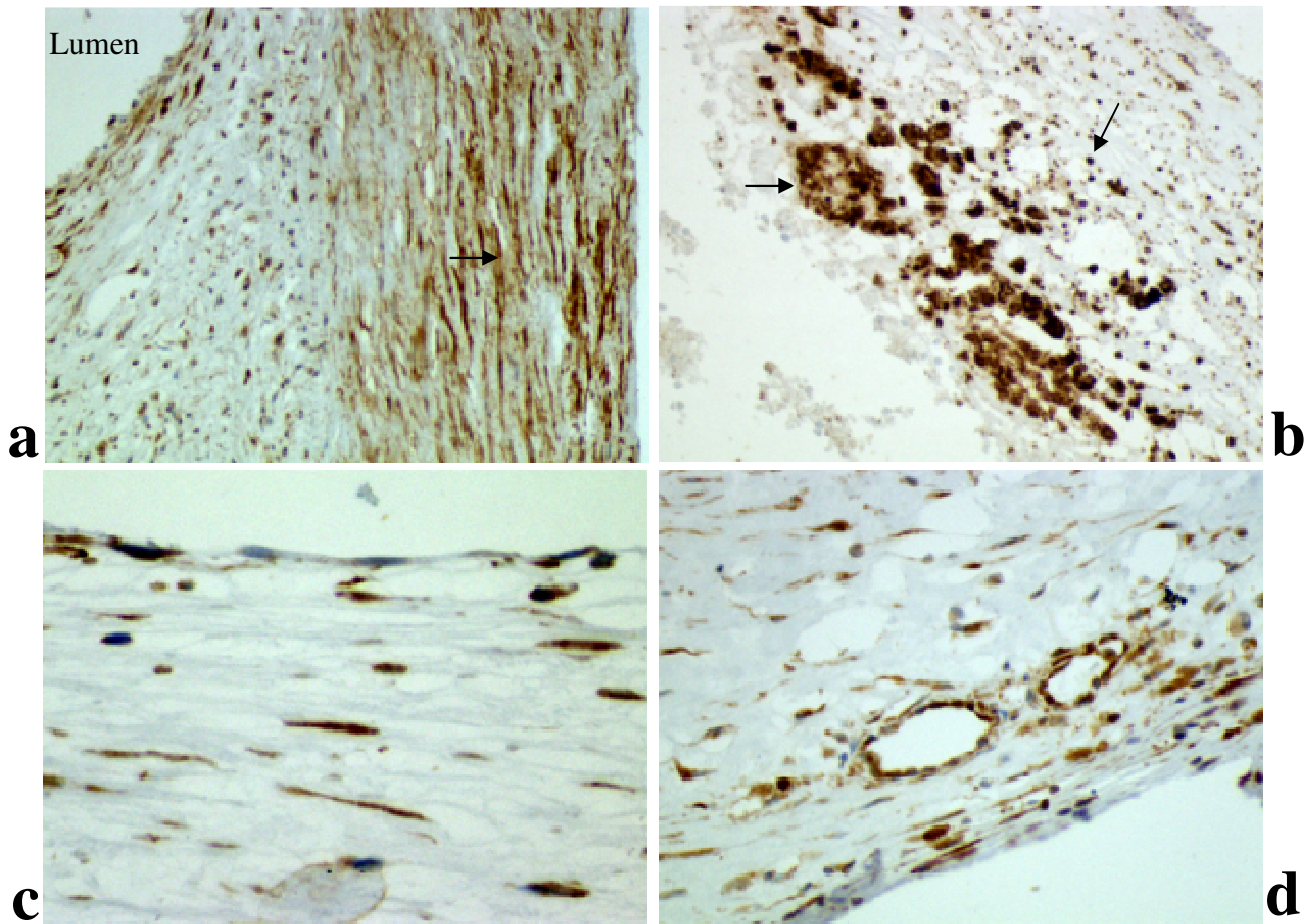


Abbildung 10. Expression von PDGF in Carotisläsionen. (a) Expression von PDGF in glatten Muskelzellen (100-fache Vergrößerung) (siehe Pfeil). (b) Expression von PDGF in Makrophagen und Schaumzellen (100-fache Vergrößerung). (c) Expression von PDGF in Endothelzellen (400-fache Vergrößerung). Hier waren einige Zellen negativ, aber die meisten der Endothelzellen zeigten jedoch positive Färbung. (d) Expression von PDGF in Neogefäßen (200-fache Vergrößerung).

Das Expressionsmuster von PDGF (Abbildung 10) ähnelte der Expression von VEGF. Der einzige Unterschied lag bei den Endothelzellen. Hier waren nicht alle Zellen positiv (Abb. 10c). Die meisten der Endothelzellen waren jedoch positiv. Ansonsten waren alle anderen Zellarten innerhalb der Carotisplaques positiv für diese immunhistochemische Färbung, ebenso wie die Neogefäße (Abb. 10d). Die Expression, beurteilt nach der Intensität der Färbung, war relativ stark und wie bereits oben erwähnt, vergleichbar mit der Expression des angiogenetischen Faktors für VEGF.

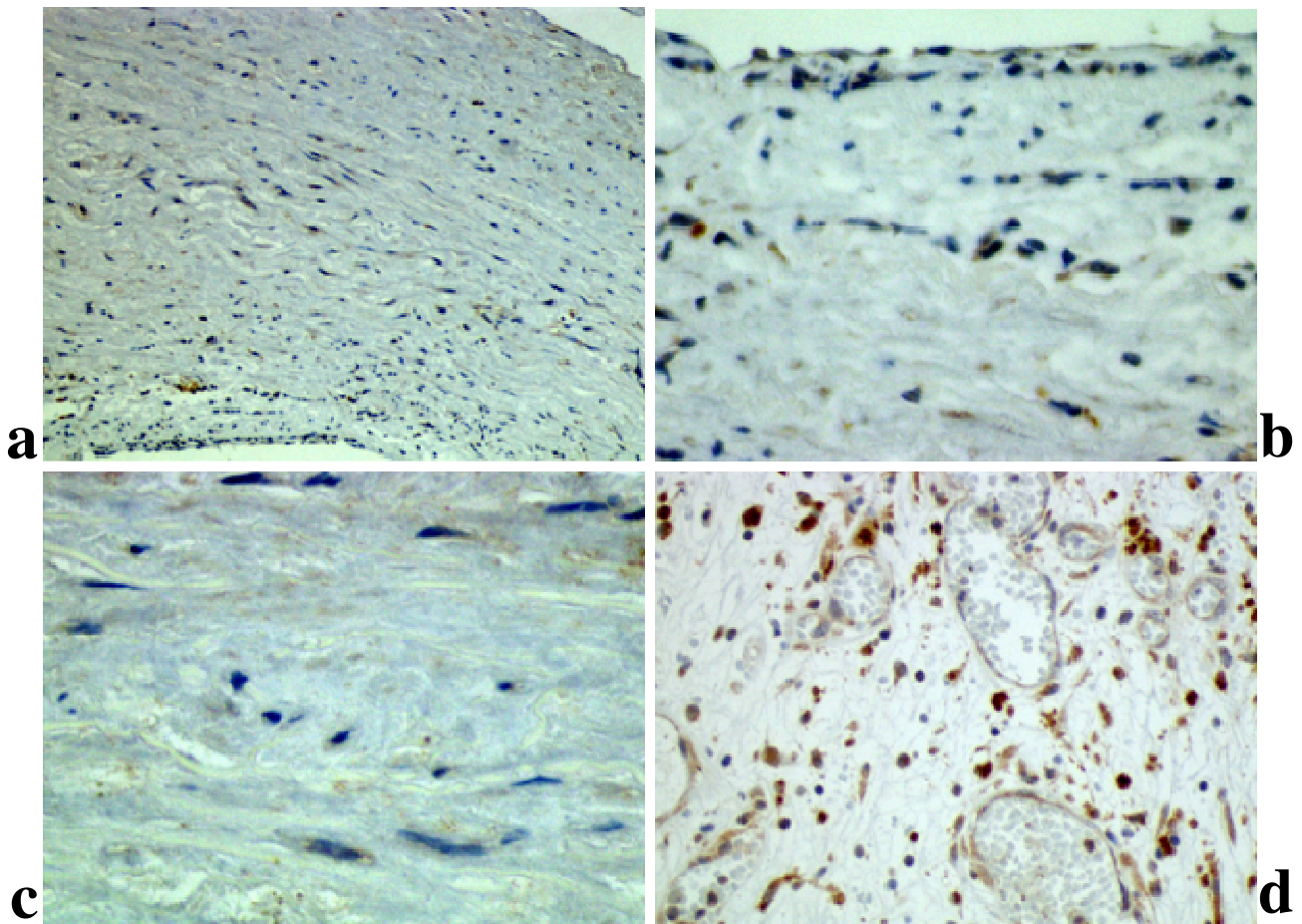


Abbildung 11. Expression von Angiopoietin-1 in Carotisläsionen. (a) ein Übersichtsbild (25-fache Vergrößerung). Mit Ausnahme von Makrophagen waren alle Zellen negativ. (b) Detaillierte Aufnahme von Endothelzellen (400-fache Vergrößerung). Auch hier ist ersichtlich, dass nur Monozyten/Makrophagen positiv sind. (c) eine detaillierte Aufnahme von glatten Muskelzellen (400-fache Vergrößerung). (d) Expression von Ang-1 in Neogefäßen (200-fache Vergrößerung).

Die Expression von Angiopoietin-1 (Ang-1) war deutlich schwächer als die der anderen angiogenetischen Faktoren (Abb. 11). Hier waren glatte Muskelzellen und luminal Endothelzellen negativ. Die einzigen positiven Zellen waren wie erwartet die Makrophagen und Schaumzellen (Abb. 11b und d). Die Neogefäße waren jedoch ebenfalls positiv, auch wenn die Färbung relativ schwach war (Abb. 11d).

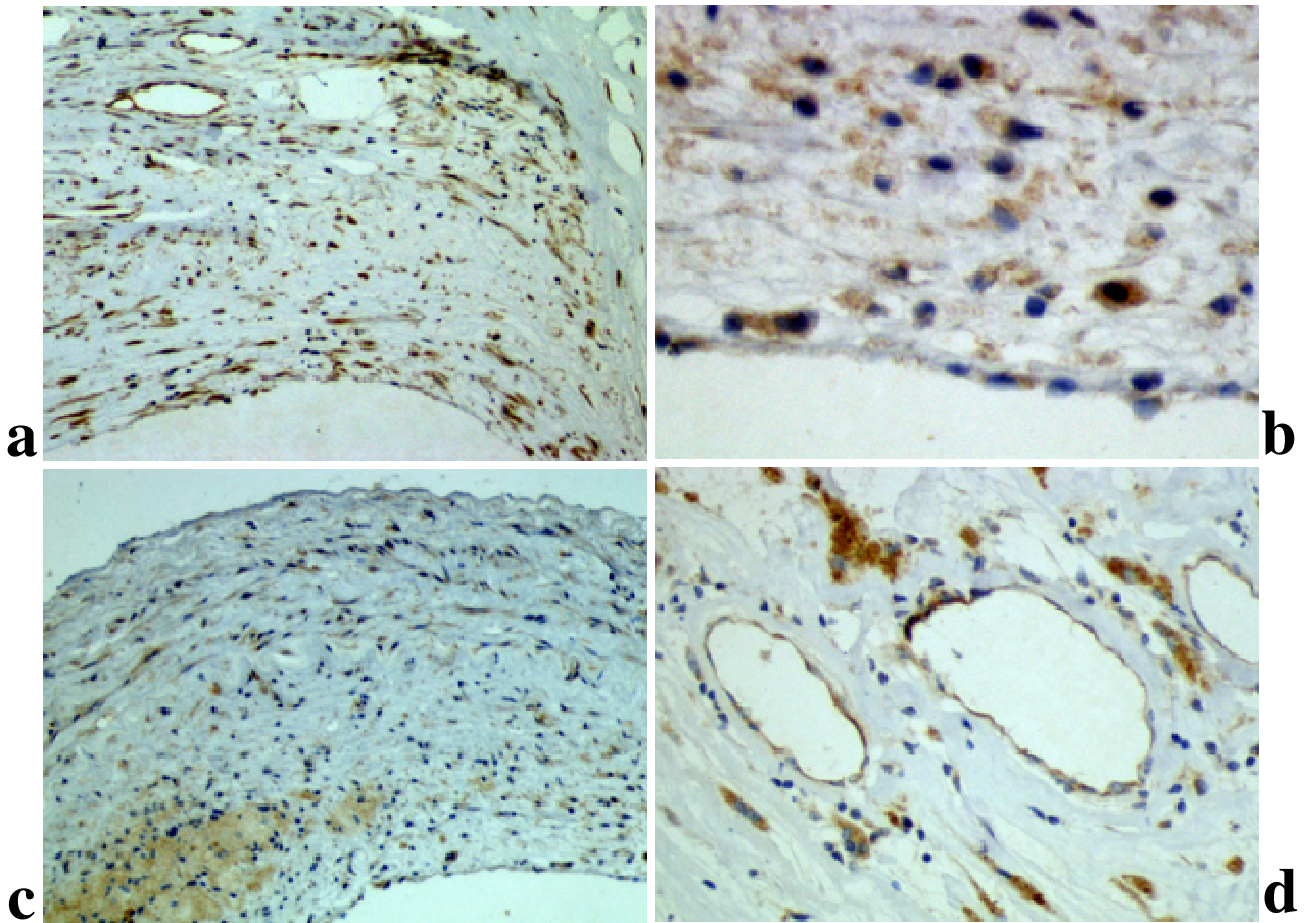


Abbildung 12. Expression von Angiopoietin-2 in Carotisläsionen. (a) ein Übersichtsbild (100-fache Vergrößerung). (b) Detaillierte Aufnahme von Endothelzellen (400-fache Vergrößerung). (c) ein weiteres Übersichtsbild, diesmal schwächer als in (a) (100-fache Vergrößerung). (d) Expression von Ang-2 in Neogefäßen (200-fache Vergrößerung).

Die Expression von Angiopoietin-2 (Ang-2) war stärker als beim Ang-1 (Abbildung 12). Das Übersichtsbild (Abb. 12a) zeigt, dass Makrophagen und glatte Muskelzellen positiv waren, auch wenn die Expression zwischen den einzelnen Präparaten Unterschiede aufwies (Abb. 12a und c). Luminale Endothelzellen waren ebenfalls partiell positiv (Abb. 12b). Neogefäße zeigten, genau wie bei den anderen immunhistochemischen Färbungen mit angiogenetischen Faktoren, ebenfalls eine positive Reaktion (Abb. 12d).

Die Ergebnisse aller immunhistochemischen Untersuchungen, semi-quantitativ ausgewertet, sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7. Semi-quantitative Auswertung der Expression von angiogenetischen Faktoren anhand der immunhistochemischen Färbung.

	<i>Neogefäße (ECs)</i>	<i>luminale ECs</i>	<i>mediale SMCs</i>	<i>Infiltrate</i>	<i>Makro- phagen</i>
<i>VEGF</i>	++	+	+	-	++
<i>VEGFR-2</i>	+/-	-	-	-	+
<i>PDGF</i>	+;++	+	+;++	+/-	++
<i>Ang-1</i>	+/-	+/-	+/-	-	+
<i>Ang-2</i>	+;++	+	+;++	-	+;++

3.6. Expression von Matrixmetalloproteinasen in Neogefäßen

Es ist bekannt, dass Matrixmetalloproteinasen (MMPs) eine wichtige Rolle in der Plaqueprogression und -ruptur spielen. Neogefäße müssen beim Wachstum die umliegende extrazelluläre Matrix degradieren, um überhaupt wachsen zu können. Es stellt sich deshalb die Frage, ob die relevanten MMPs, wie z.B. MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9 in den Mikrogefäßen innerhalb der Carotisplaques exprimiert werden, was theoretisch zur Plaquevulnerabilität beitragen kann. Aus diesem Grund wurden die oben erwähnten MMPs immunhistochemisch in den vorhandenen Neogefäßen (ECs) untersucht. Die Ergebnisse der Expression von MMPs in Neogefäßen sind in Abbildung 13 dargestellt. Mit Ausnahme von MMP-8 wurden alle anderen getesteten MMPs in den Neogefäßen exprimiert. Anhand der Intensität der immunhistochemischen Färbungen wurden jedoch einige Unterschiede beobachtet.

MMP-1, -2, -3 und -9 zeigten eine relativ starke Färbung, was einer erhöhten Expression dieser MMPs zugeordnet werden könnte. Die Expression von MMP-7 war dagegen deutlich schwächer.

Zusammenfassend zeigten Neogefäße eine deutliche Expression verschiedener Matrixmetalloproteinasen. Somit können Neogefäße durch die Ausschüttung von MMPs ebenfalls zur Plaqueprogression und -ruptur signifikant beitragen.

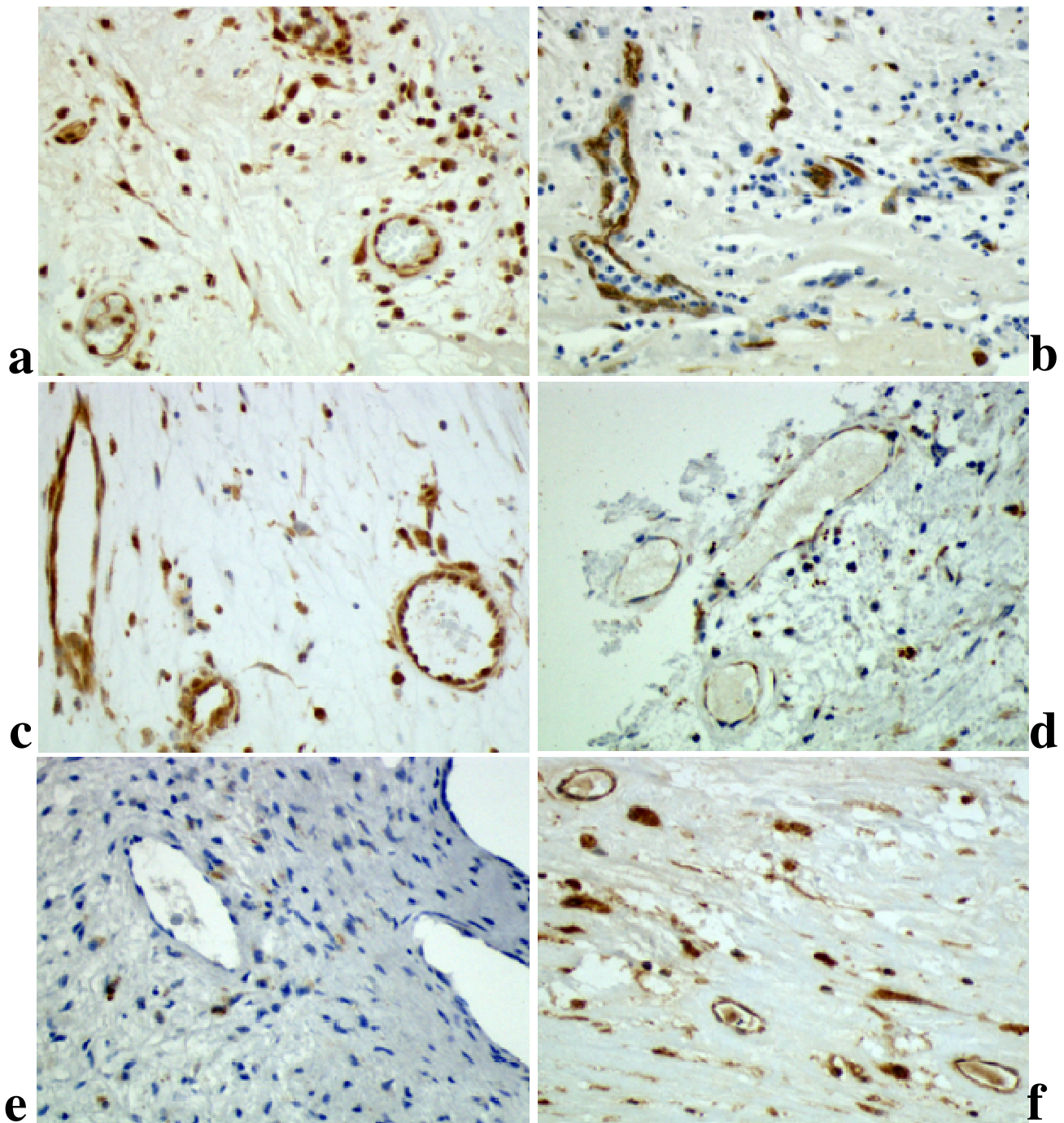


Abbildung 13. Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in Neogefäßen innerhalb von Carotisläsionen (200-fache Vergrößerung). (a) MMP-1, (b) MMP-2, (c) MMP-3, (d) MMP-7, (e) MMP-8, (f) MMP-9. Außer MMP-8 haben Neogefäße alle anderen untersuchten MMPs exprimiert.

3.7. Primeroptimierung für die Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Die immunhistochemische Analyse ist eine wertvolle Methode, um die Zuordnung der Expression spezifischer Faktoren in den einzelnen Zellen in der Carotisläsion zu bestimmen. Weiterhin kann man anhand der Intensität der Färbung mit dieser Methode auch semi-quantitativ die Expression beurteilen. Dies ist jedoch durch die verwendete immunhistochemische Methode und den eingesetzten Antikörper limitiert. Eine tatsächliche Quantifizierung gelingt nur auf der Proteinebene mit dem Western Blot oder auf der mRNA-Ebene mit Hilfe einer RT-PCR. Alle unsere Präparate waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Derart aufbereitetes Gewebe ist für das Western Blot nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die quantitative Bestimmung der Expression von angiogenetischen Faktoren mit Hilfe von PCR durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine modifizierte Methode verwendet, die, um genügend DNA oder cDNA aus 20 µm Schnitten zu isolieren, die RNA-Extraktion aus solchen Präparaten ermöglicht. Trotzdem ist noch einiges zu berücksichtigen. Durch das Formalin kann die DNA oder RNA in die Brüche gehen, so dass es notwendig war, kurze Fragmente von maximal bis zu 150 bp zu amplifizieren. Deshalb wurden für die in dieser Studie ausgewählten angiogenetischen Faktoren spezielle Primer konstruiert, deren Amplifikat zwischen 80 und 130 bp lag. Diese Primer mussten dann entsprechend optimiert werden. Das geschah zuerst mit DNA, die aus diesen Präparaten isoliert wurde. DNA kommt in allen Zellen vor und muss deshalb bei den optimalen PCR-Bedingungen eine einzige Bande mit der erwarteten Länge liefern.

Um optimale Primer zu gewinnen, wurden für alle angiogenetischen Faktoren jeweils drei solche Primerpaare ausgesucht und getestet. Die Primer selbst und die optimalen Primerpaare sind in dem Methodenteil bereits beschrieben. Die Ergebnisse der Primeroptimierung sind in der Abbildung 14 dargestellt. Es wurden jeweils drei Primerpaare getestet und die besten Primer für weitere PCR-Experimente ausgewählt. Es sollte nur eine einzige Bande in der erwarteten Fragmentlänge erscheinen und falls möglich keine Primerdimere. Optimierungsversuche wurden mit DNA durchgeführt, um sicherzustellen, dass eine eindeutige Bande erscheint. Durch den DNase-Verdau während der RNA-Isolierung aus Formalinpräparaten werden jegliche DNA-Reste entfernt, deshalb kann ohne weiteres die Optimierung der Primer mit der DNA durchgeführt werden. Die besten Primer für die einzelnen angiogenetischen Faktoren waren wie folgt:

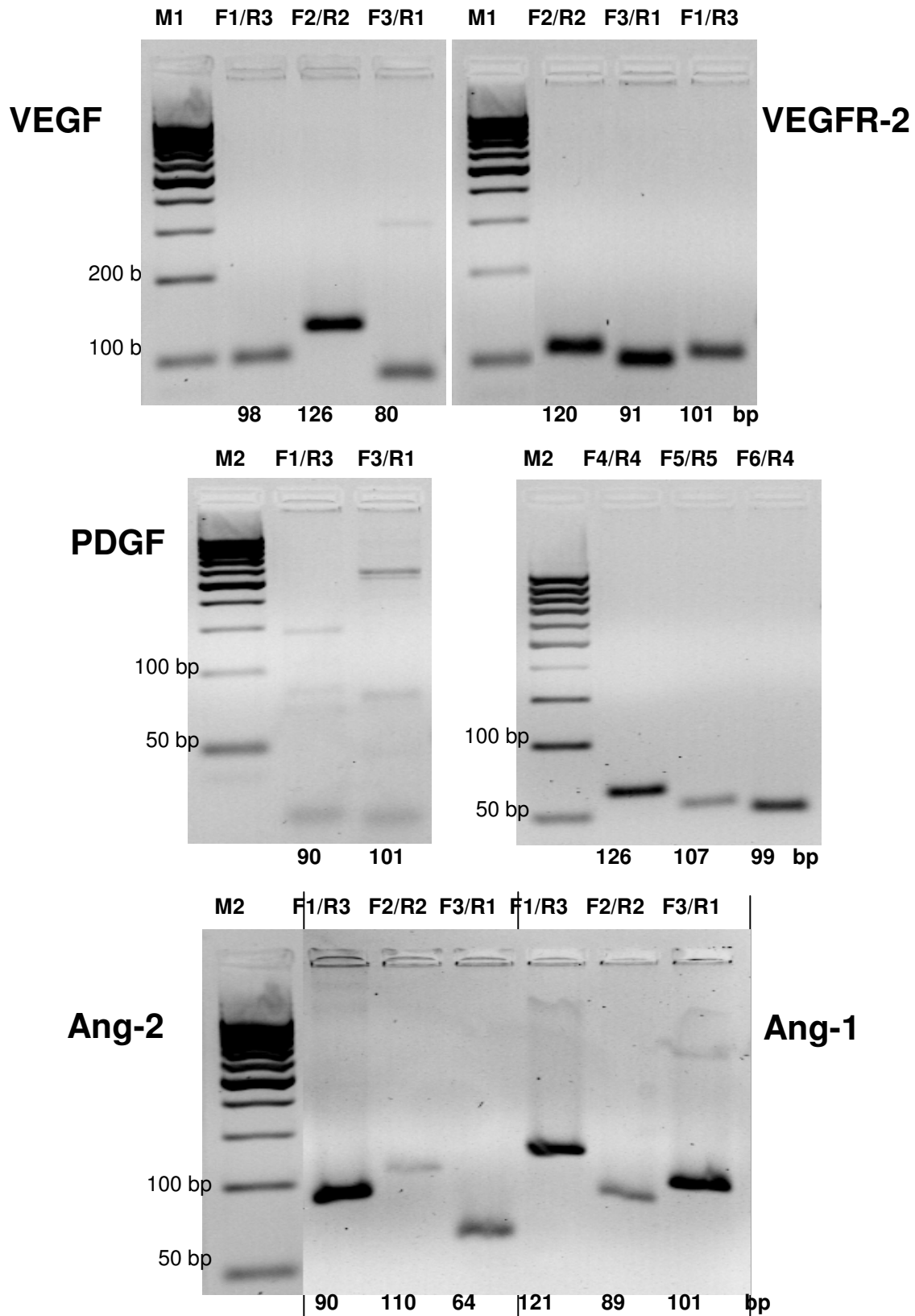


Abbildung 14. Primeroptimierung für quantitative PCR mit DNA. PCR-Konditionen waren wie folgt: 200 ng DNA, 40 Zyklen, 95°C 30 sec / 55°C 30 sec / 72°C 30 sec. F... bedeutet Primer-forward, R... Primer reverse. M1: DNA-Leiter 100 bp (peqlab), M2: DNA-Leiter 50bp (peqlab). Unter jedem Gel ist die zu erwartende Fragmentlänge dargestellt.

VEGF:	VEGF-F2 / VEGF-R2
VEGFR-2:	VEGFR2-F2 / VEGFR2-R2
PDGF:	PDGF-F4 / PDGFR-R4
Ang-1:	Ang1-F1 / Ang1-R3
Ang-2:	Ang2-F3 / Ang2-R1

Die optimalen PCR-Konditionen wurden bei $T_m = 55^\circ\text{C}$ erzielt. Nach der erfolgreichen Primeroptimierung und der Auswahl geeigneter Primerpaare wurden zuerst zwei separate Proben genommen, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und ein RT-PCR durchgeführt (Abb. 15). In beiden Proben/Präparaten konnte ebenfalls die Expression der angiogenetischen Faktoren nachgewiesen werden, auch wenn einige Unterschiede in der Expression der einzelnen angiogenetischen Faktoren zu verzeichnen waren. Dies war jedoch keine quantitative PCR, sondern nur die Überprüfung des geplanten Vorhabens und der Protokolle. Somit konnte nicht nur die DNA, sondern auch die Expression aller untersuchten angiogenetischen Faktoren in den Carotispräparaten erfolgreich nachgewiesen werden, auch wenn diese mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet waren,.

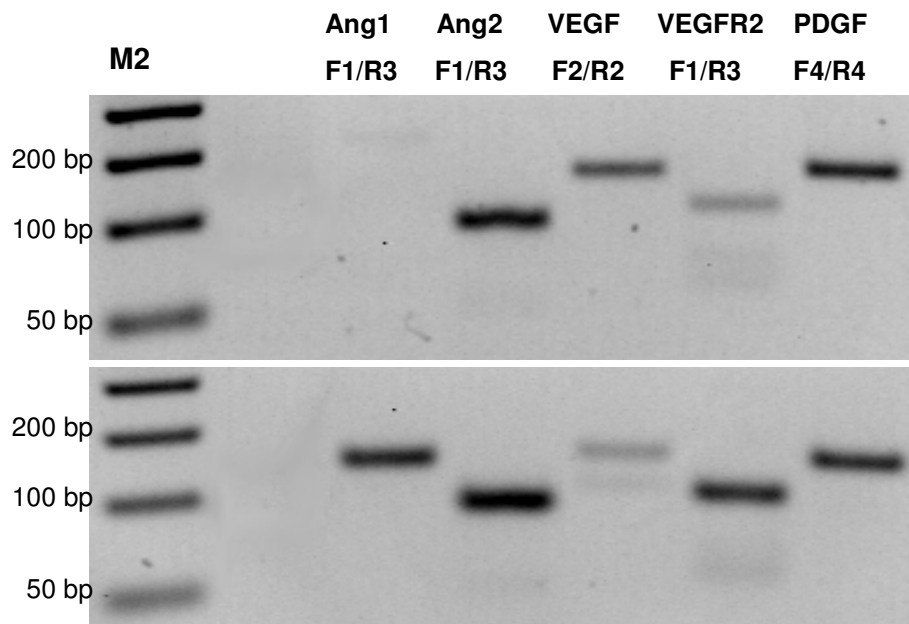


Abbildung 15. RT-PCR mit cDNA aus zwei Carotispräparaten zur Prüfung der Primer und den für die Expressionsanalysen Protokolle. PCR-Konditionen waren wie folgt: $2\mu\text{L}$ cDNA (aus $20\mu\text{L}$ Gesamtvolumen und $1\mu\text{g}$ RNA), 40 Zyklen, 95°C 30 sec / 55°C 30 sec / 72°C 30 sec. F... bedeutet Primer-forward, R... Primer reverse. M2: DNA-Leiter 50bp (peqlab).

3.8. Quantitative Real-Time RT-PCR

Nach der erfolgreichen Optimierung der Primer für die einzelnen angiogenetischen Faktoren erfolgte eine quantitative Expressionsanalyse. Für die Quantifizierung wurde die Methode mit SYBRGreen verwendet. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff dessen Fluoreszenz signifikant ansteigt, wenn es in eine doppelsträngige DNA interkaliert. Somit entspricht die Fluoreszenzintensität der Menge an DNA innerhalb der PCR-Reaktion. Bei allen Reaktionen liefen noch zwei Kontrollen mit, um einzelne Reaktionen miteinander vergleichen und normalisieren zu können. Diese Kontrollen waren 5 und 10 ng DNA. Die beiden Konzentrationen dienten erstens dazu, die zu erwartende Verdopplung der Fluoreszenz zu überprüfen und zweitens wurden die Fluoreszenzintensitäten immer auf den gleichen Wert bei allen PCRs gestellt, um die Ergebnisse der Expression von angiogenetischen Faktoren miteinander vergleichen zu können. Weiterhin wurde noch eine Normalisierung auf die interne Expression von GAPDH durchgeführt.

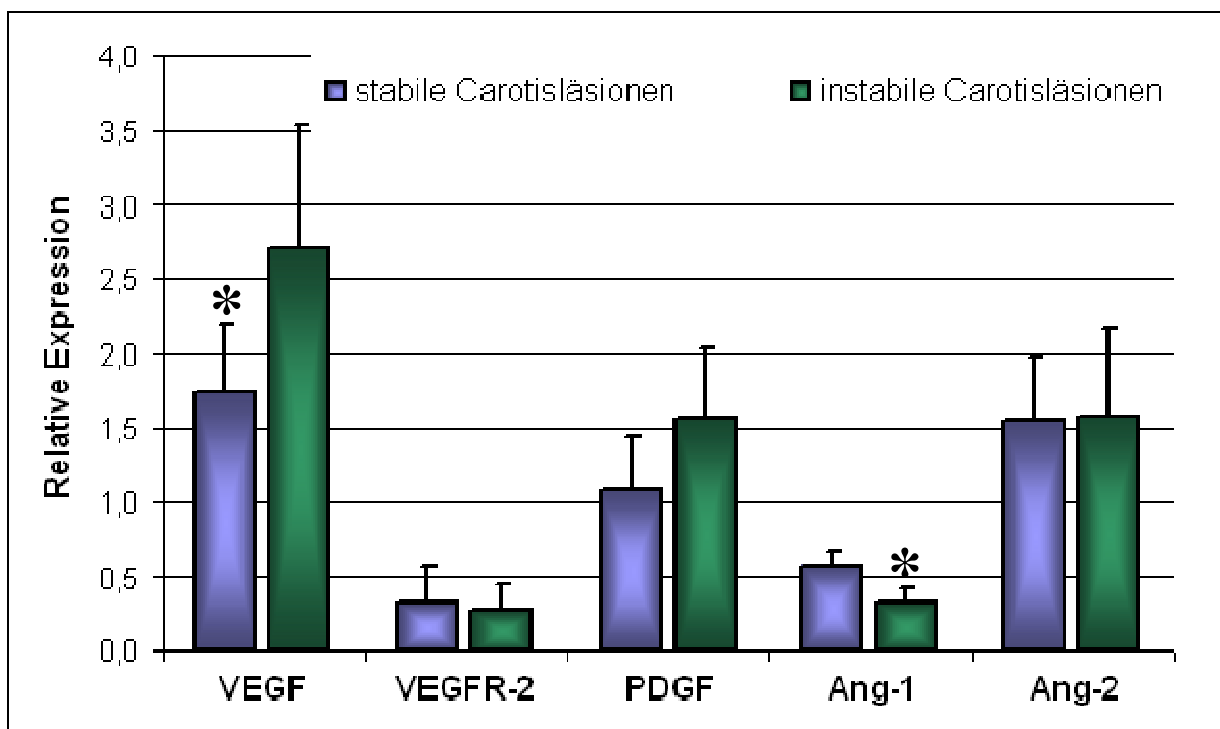


Abbildung 16. Quantitative Real-Time RT-PCR Analyse der Expression angiogenetischer Faktoren. (*) zeigt Faktoren, die sich zwischen den Gruppen von stabilen und instabilen Carotisplaques signifikant unterschieden haben ($P < 0,05$).

Mit diesem Vorgehen wurden alle relevanten Fehlerfaktoren vermieden und die Unterschiede in der Fluoreszenz sollten den Differenzen in der Expression der einzelnen angiogenetischen Faktoren entsprechen. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in der Abbildung 16 dargestellt.

Die höchste Expression wurde beim VEGF beobachtet und das sowohl in stabilen als auch instabilen Carotisplaques. Weiterhin zeigten PDGF und Ang-2 ebenfalls eine relativ hohe Expression innerhalb der Läsionen. VEGFR-2 und Ang-1 waren in ihren Intensitäten dagegen deutlich schwächer. Wenn zum Beispiel die Expression von VEGF und VEGFR-2 verglichen wurde, war sie beim VEGF 10-fach höher als beim VEGFR-2. Die Expression von Ang-2 war ebenfalls etwa 3 bis 5mal höher als beim Ang-1.

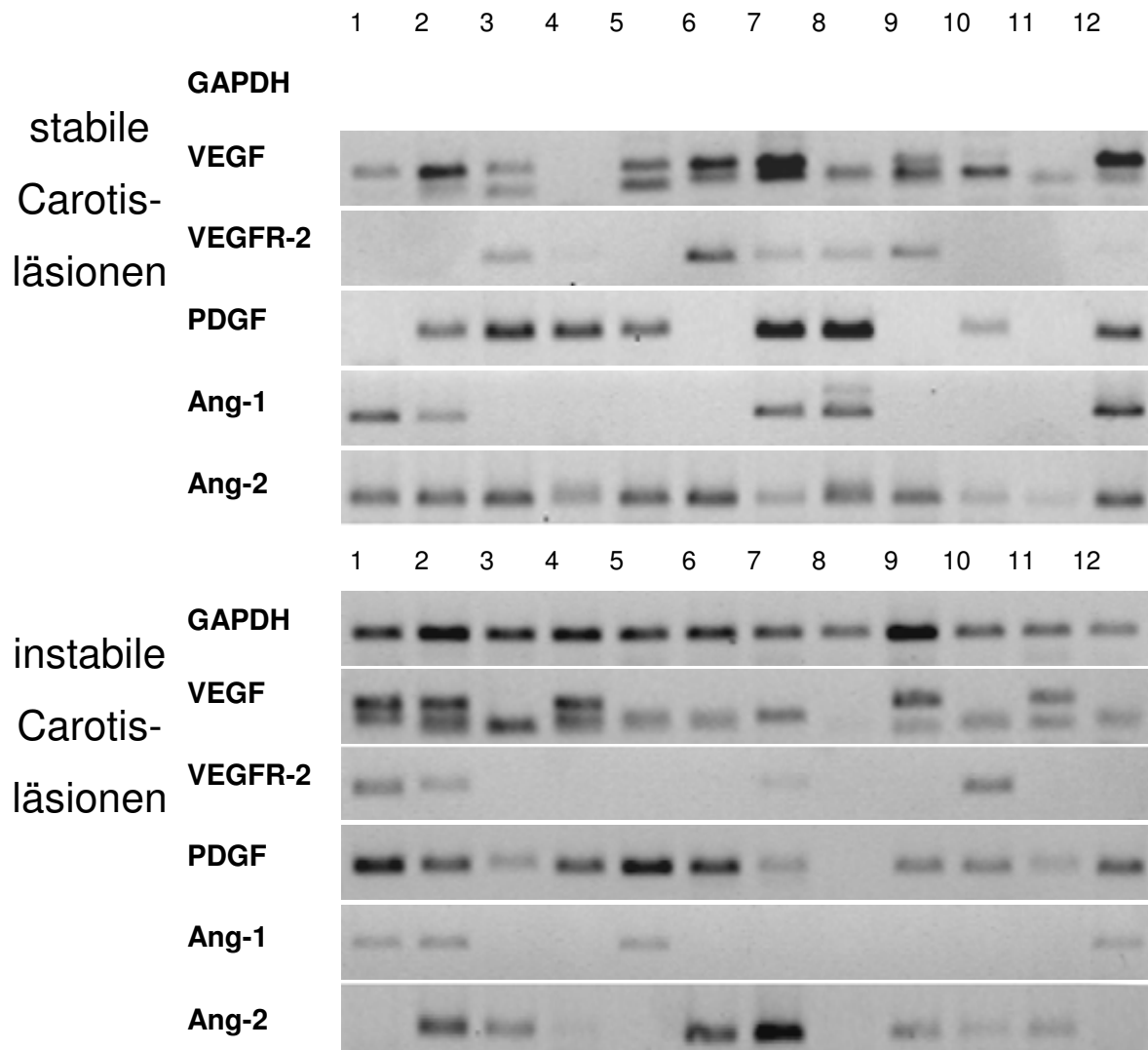


Abbildung 17. Beispiele einzelner Carotisplaquepräparate und deren Expression nach einer quantitativen RT-PCR in stabilen und instabilen Plaques.

Instabile Läsionen zeigten eine signifikant höhere Expression von VEGF (1,6-fach, $p = 0,039$) gegenüber der Gruppe mit stabilen Plaques. Beim Ang-1 war dagegen die Expression in instabilen Plaques signifikant verringert (1,8-fach, $p = 0,037$). Die anderen angiogenetischen Faktoren zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Um die Reaktion zu testen und um sich auch die einzelnen Proben auf dem Gel ansehen zu können, wurden die Proben aus der quantitativen RT-PCR in einem weiteren Schritt auf ein Gel aufgetragen und die Elektrophorese durchgeführt. Einige Beispiele sind in Abbildung 17 zusammengefasst. Aus den Gel-Elektrophorese-Ergebnissen ist ersichtlich, dass zum Beispiel bei den schwach exprimierten angiogenetischen Faktoren VEGFR-2 und Ang-2 diese niedrige Aktivität auch daran lag, dass viele Proben keine Expression gezeigt haben. Diese Ergebnisse korrelierten sehr gut mit der Anzahl der Gefäße innerhalb der Plaques. Einige Faktoren, hauptsächlich VEGF, zeigte partiell zwei Banden, was entweder durch eine Degradierung zustande kam, oder es handelte sich noch um ein Zwischenprodukt.

Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse der quantitativen Expression der untersuchten angiogenetischen Faktoren die Resultate der immunhistochemischen Analysen. Alle angiogenetischen Faktoren ließen sich in den Carotisläsionen nachweisen und das nicht nur immunhistochemisch, sondern auch auf der mRNA-Ebene. Die stärkste Expression der angiogenetischen Faktoren wurde in den Neogefäßen beobachtet. Einige der Faktoren wurden jedoch auch in anderen Zellen, wie luminalen Endothelzellen, glatten Muskelzellen und auch Makrophagen beobachtet. Man kann vermuten, dass angiogenetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Plaqueprogression spielen können. Weiterhin zeigten unsere Ergebnisse eine signifikant höhere Anzahl an Neogefäßen innerhalb der instabilen Carotisläsionen und auch eine signifikant höhere Expression an VEGF. Somit können angiogenetische Faktoren ebenfalls eine maßgebliche Rolle in physiologischen Prozessen spielen, die zur Plaqueinstabilität und -ruptur führen kann.

3.9. Analyse ausgewählter angiogenetischen Faktoren im Blut

Die vorherigen Ergebnisse der Carotisplaqueanalyse zeigten eine deutliche Expression angiogenetischer Faktoren innerhalb der Läsionen und eine erhöhte Expression einiger dieser Faktoren wie zum Beispiel VEGF in den instabilen Carotisplaques. Somit könnten solche Faktoren auch ins Blut übergehen und als potentielle Prognosemarker der Plaquivulnerabilität dienen.

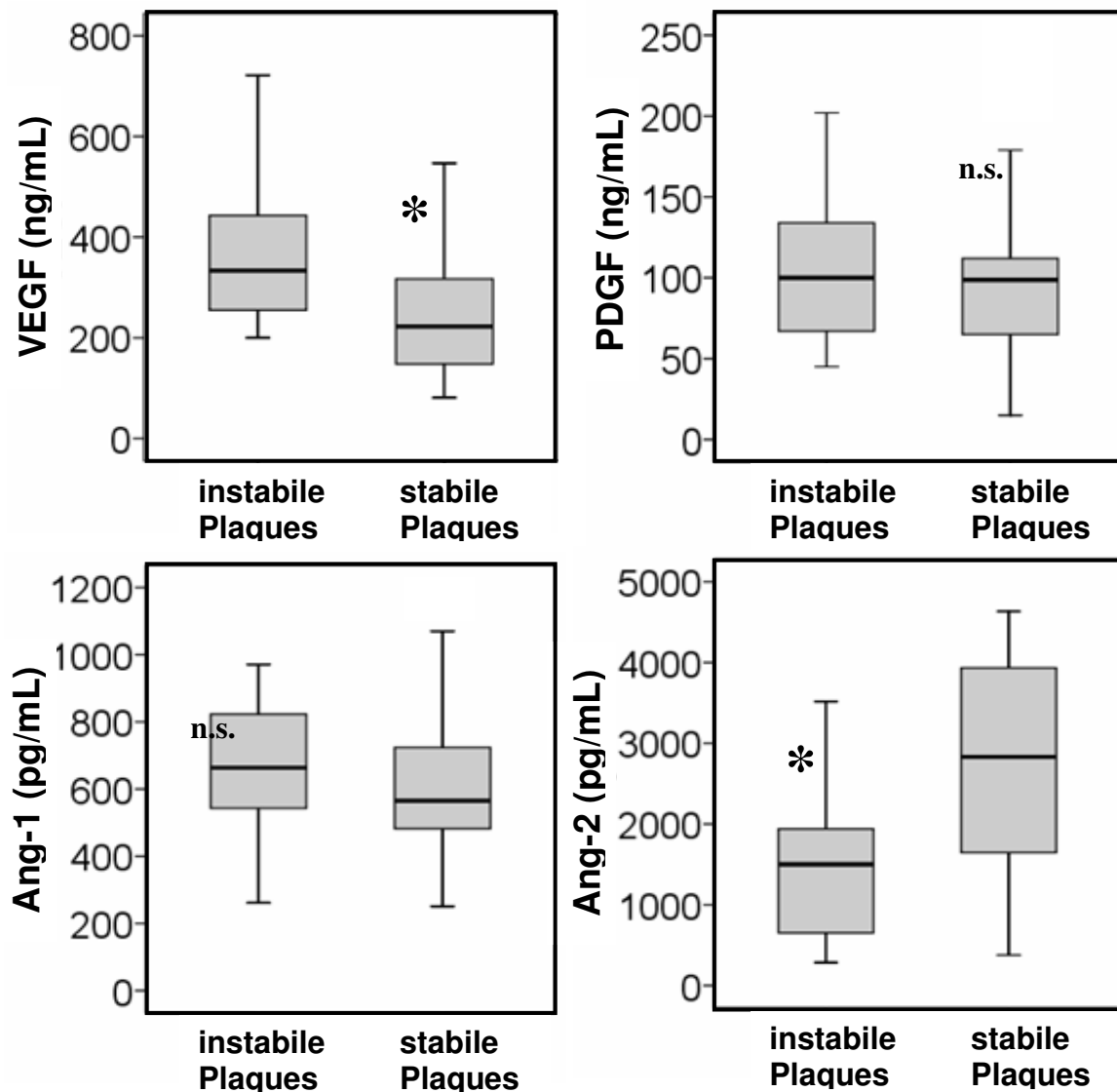


Abbildung 18. Konzentrationen von angiogenetischen Faktoren im Blut (Serum) bei Patienten mit instabilen Plaques und stabilen Plaques. Es wurden optimierte ELISA-Assays für die einzelnen angiogenetischen Faktoren verwendet. (*) bedeutet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$), n.s. heißt nicht signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Aus diesem Grund wurden ausgewählte angiogenetische Faktoren auch im Blut der Studienpatienten untersucht, mit Ausnahme von VEGFR-2. Dieser Faktor wird nur auf der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert, und dessen Expression in den Plaques war außerdem relativ gering. Deshalb war nicht zu erwarten, dass signifikante Konzentrationen dieses Faktors im Blut detektiert werden können. Die anderen angiogenetischen Faktoren werden dagegen sezerniert und können leicht ins Blut übergehen, hauptsächlich dann, wenn die luminale Endothelschicht nicht mehr ordnungsgemäß arbeitet, was dem Zustand bei fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen entspricht und somit auch den fortgeschrittenen Carotisplaques.

Die Ergebnisse der Blutanalyse von VEGF, PDGF, Ang-1 und Ang-2 sind in Abbildung 18 dargestellt. Die Werte von Ang-1 und PDGF zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit stabilen und instabilen Carotisläsionen. Dagegen waren die VEGF-Konzentrationen im Serum von Patienten mit instabilen Plaques signifikant erhöht ($p = 0,002$). Interessanterweise zeigten sich auch signifikante Unterschiede bei den Patienten mit instabilen und stabilen Carotisläsionen beim Ang-2. Hier waren jedoch die Werte im Blut bei den instabilen Patienten signifikant verringert ($p = 0,001$).

3.10. Korrelationen zwischen Blutwerten und Plaqueparametern

Ziel der Doktorarbeit war erstens, die Rolle von angiogenetischen Faktoren in den Carotisläsionen zu ermitteln und zweitens, ob sich solche Veränderungen bei Patienten mit instabilen Plaques auch im Blut dieser Patienten widerspiegeln. Im vorherigen Kapitel wurden auch im Blut der Carotispatienten signifikante Unterschiede bei einigen angiogenetischen Faktoren festgestellt. Um jedoch diese Ergebnisse als Prognose der Plaquevulnerabilität für einzelne Patienten zu verwenden, müssten die Werte im Blut mit den Befunden in den Carotisläsionen korrelieren. Weiterhin kann man mit der Korrelationsanalyse noch weitere Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern ermitteln und auch z.B. noch weitere mögliche Beziehungen zwischen klinischen Parametern. Aus diesem Grund wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS und Unterstützung von Priv.-Doz. Dr. Pelisek verschiedene Korrelationen berechnet. Bei Werten, die eine normale Verteilung aufwiesen (ermitteln durch Kolmogorov-Smirnov-Test für eine Stichprobe) wurde der Pearson Korrelationskoeffizient

berechnet. Bei Variablen, die keine normale Verteilung aufwiesen, wurde der Spearman Rank Korrelationskoeffizient ermittelt.

Als erstes wurden Korrelationen zwischen der Gefäßzahl, den angiogenetischen Faktoren in der Carotisplaque und den Begleiterkrankungen der Patienten, wie Hypertonie, Hyperlipidämie, Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus und Herzerkrankungen untersucht (Tabelle 8).

Tabelle 8. Korrelationen zwischen angiogenetischen Faktoren in den Plaques und Begleiterkrankungen der Patienten mit hochgradigen Carotisstenosen.

		Carotisplaque					
		Neogefäße	VEGF	VEGFR-2	PDGF	Ang-1	Ang-2
Hypertonie	Korr. Koef.	-0,202	0,048	0,097	0,294	0,006	0,218
	P-Wert	0,168	0,746	0,721	0,270	0,982	0,417
Hyperlipidämie	Korr. Koef.	0,091	-0,095	0,100	0,013	-0,091	-0,116
	P-Wert	0,528	0,510	0,714	0,963	0,738	0,669
Niereninsuffizienz	Korr. Koef.	0,071	-0,209	0,397	0,225	-0,030	-0,348
	P-Wert	0,631	0,154	0,128	0,403	0,912	0,187
Diabetes mellitus	Korr. Koef.	-0,218	0,125	-0,183	-0,069	0,139	-0,224
	P-Wert	0,171	0,438	0,530	0,815	0,635	0,442
Herzerkrankung	Korr. Koef.	-0,063	-0,267	0,215	0,390	-0,096	-0,113
	P-Wert	0,684	0,080	0,461	0,168	0,744	0,700

* signifikant relevante Werte; Korr. Koef. = Korrelationskoeffizient

Es wurden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Komorbiditäten und dem Vorkommen von angiogenetischen Faktoren in der Carotisplaque festgestellt.

Weiterhin wurden einige klinische Parameter mit den angiogenetischen Faktoren in den Carotisplaques verglichen (Tabelle 9). Hier korrelierte die Plaquestabilität und auch Plaqueruptur signifikant mit dem Vorkommen an Neogefäßen innerhalb der Plaques ($r = 0,308$ und $r = 0,235$ / $P = 0,004$ und $P = 0,029$). Weiterhin korrelierten auch die neurologischen Symptome signifikant mit den Neogefäßen in der Plaque ($r = 0,373$ / $P < 0,001$) und sogar mit der Expression von VEGF innerhalb der Plaque ($r = 0,373$ / $P < 0,001$). Zusätzlich wurden noch signifikante Zusammenhänge zwischen Alter und Ang-1 beobachtet ($r = 0,482$ / $P < 0,001$). Ob diese Ergebnisse jedoch klinische Relevanz haben oder nur ein Zufallsbefund sind, müsste in weiteren Studien noch überprüft werden.

Tabelle 9. Korrelationen zwischen angiogenetischen Faktoren in den Plaques und einigen klinischen Parametern von Patienten mit hochgradigen Carotisstenosen.

		Carotisplaque					
		Neogefäße	VEGF	VEGFR-2	PDGF	Ang-1	Ang-2
Stabilität	Korr. Koef.	-0,308*	-0,056	-0,030	-0,287	0,267	0,003
	P-Wert	0,004	0,607	0,880	0,139	0,169	0,990
Ruptur	Korr. Koef.	0,235*	0,149	0,161	0,361	0,040	0,133
	P-Wert	0,029	0,169	0,413	0,059	0,841	0,501
Neurol. Symptom	Korr. Koef.	0,373*	0,454*	-0,048	-0,090	0,180	-0,127
	P-Wert	0,000	0,000	0,809	0,648	0,361	0,521
Alter	Korr. Koef.	0,088	-0,150	-0,121	0,286	0,482*	-0,116
	P-Wert	0,416	0,164	0,540	0,140	0,000	0,558
Geschlecht	Korr. Koef.	0,046	-0,122	-0,086	0,165	0,172	0,240
	P-Wert	0,669	0,260	0,663	0,402	0,382	0,219

* signifikant relevante Werte; Korr. Koef. = Korrelationskoeffizient

Es wurden ebenfalls die einzelnen angiogenetischen Faktoren untereinander verglichen, um nach signifikanten Zusammenhängen zu suchen (Tabelle 10). Signifikante Korrelationen wurden, wie erwartet, zwischen dem Vorkommen von Neogefäßen in der Carotisplaque und der Expression von VEGF innerhalb der gleichen Läsion ($r = 0,295 / P = 0,037$) festgestellt. Weiterhin korrelierte auch die Expression von Ang-1 mit der Anzahl an Neogefäßen ($r = 0,458 / P < 0,001$) und interessanterweise waren Neogefäße ebenfalls - jedoch indirekt - proportional der Expression von PDGF ($r = -0,590 / P < 0,001$). Weiterhin wurde auch eine partielle Abhängigkeit zwischen der Expression von Ang-1 und Ang-2 beobachtet und das ebenso indirekt proportional (je höher die Expression des einen angiogenetischen Faktors, desto niedriger die Expression des anderen Faktors). Diese Ergebnisse mit $P = 0,056$ waren jedoch statistisch nicht signifikant (Tabelle 10).

Tabelle 10. Korrelationen zwischen den einzelnen angiogenetischen Faktoren in den Plaques von Patienten mit hochgradigen Carotisstenosen.

		Carotisplaque					
		Neogefäße	VEGF	VEGFR-2	PDGF	ANG1	ANG2
VEGF	Korr. Koef.	0,295*					
	P-Wert	0,037					
VEGFR-2	Korr. Koef.	0,098	0,128				
	P-Wert	0,621	0,517				
PDGF	Korr. Koef.	-0,590*	0,030	-0,019			
	P-Wert	0,000	0,881	0,924			
ANG1	Korr. Koef.	0,458*	0,246	0,103	0,106		
	P-Wert	0,000	0,206	0,600	0,591		
ANG2	Korr. Koef.	-0,149	-0,093	-0,157	-0,182	-0,327	
	P-Wert	0,450	0,636	0,425	0,353	0,056	

* signifikant relevante Werte; Korr. Koef. = Korrelationskoeffizient

Als nächstes wurden noch die Zusammenhänge zwischen der Carotisplaquemorphologie und den angiogenetischen Faktoren untersucht (Tabelle 11). Es wurden signifikante Korrelationen zwischen den Neogefäßen mit der Zellularität ($r = 0,239 / P < 0,026$), als auch mit inflammatorischen Zellen ($r = 0,416 / P < 0,001$), beobachtet. Weiterhin korrelierte interessanterweise die Expression von PDGF indirekt mit dem Gehalt an Kollagen innerhalb der Carotisplaques ($r = -0,438 / P < 0,001$).

Tabelle 11. Korrelationen zwischen den einzelnen angiogenetischen Faktoren in der Carotisplaque-Morphologie.

		Carotisplaque					
		Neogefäße	VEGF	VEGFR-2	PDGF	ANG1	ANG2
Kalkablagerung	Korr.						
	Koef.	0,200	-0,053	-0,074	0,131	0,071	0,033
	P-Wert	0,063	0,623	0,707	0,507	0,718	0,867
Zellularität	Korr.						
	Koef.	0,239*	-0,081	0,075	-0,134	0,268	-0,154
	P-Wert	0,026	0,455	0,704	0,498	0,168	0,433
Kollagen	Korr.						
	Koef.	-0,070	-0,032	0,110	-0,438*	-0,048	0,263
	P-Wert	0,522	0,768	0,578	0,000	0,809	0,176
Infiltrate	Korr.						
	Koef.	0,416*	0,042	0,171	0,121	0,295	0,000
	P-Wert	0,000	0,702	0,385	0,539	0,127	1,000

* signifikant relevante Werte; Korr. Koef. = Korrelationskoeffizient

Als letztes wurde noch die Expression von angiogenetischen Faktoren und das Vorkommen von Neugefäßen in der Carotisplaque mit der Konzentration dieser Faktoren im Blut der korrespondierenden Patienten und dem Vorkommen von einigen inflammatorischen Faktoren im Blut (CRP, Fibrinogen) untersucht (Tabelle 12). Wie erwartet korrelierte die Expression von VEGF innerhalb der Plaue mit der Konzentration von VEGF im Blut der korrespondierenden Patienten. Somit könnte dieser Faktor auch als potentieller Prognosemarker der Carotisplaquevulnerabilität dienen. Weiterhin konnte eine signifikante Korrelation zwischen der VEGF-Aktivität in der Plaue und dem Vorkommen des inflammatorischen Faktors Fibrinogen im Blut nachgewiesen werden. Auch die Expression von PDGF zeigte deutliche Zusammenhänge mit der Konzentration von VEGF im Blut. Die Signifikanz war jedoch grenzwertig. Es gab in diesem Zusammenhang jedoch keine Korrelation zwischen der PDGF-Aktivität in der Carotisplaue und dem Vorkommen von PDGF im Blut der betroffenen Patienten.

Tabelle 12. Korrelationen zwischen den einzelnen angiogenetischen Faktoren in den Carotisplaques und dem Vorkommen solcher Faktoren im Blut.

		Carotisplaue					
		Neugefäße	VEGF	VEGFR-2	PDGF	ANG1	ANG2
VEGF/Serum	Korr. Koef.	-0,103	0,261*	0,305	0,282	-0,002	-0,200
	P-Wert	0,437	0,046	0,192	0,050	0,995	0,398
PDGF/Serum	Korr. Koef.	0,060	0,028	-0,118	-0,229	-0,301	0,289
	P-Wert	0,650	0,831	0,620	0,331	0,197	0,217
Ang-1/Serum	Korr. Koef.	-0,138	0,167	-0,177	0,000	-0,142	0,121
	P-Wert	0,300	0,210	0,468	1,000	0,563	0,622
Ang-2/Serum	Korr. Koef.	-0,021	0,113	-0,195	0,283	-0,283	-0,242
	P-Wert	0,875	0,394	0,409	0,227	0,227	0,304
CRP/Serum	Korr. Koef.	0,064	0,159	-0,711	0,468	-0,252	-0,036
	P-Wert	0,730	0,394	0,073	0,289	0,585	0,939
Fibrinogen/Serum	Korr. Koef.	0,061	0,472*	-0,606	0,051	0,227	-0,318
	P-Wert	0,752	0,010	0,084	0,896	0,557	0,404

* signifikant relevante Werte; Korr. Koef. = Korrelationskoeffizient

Zusammenfassend zeigte die Korrelationsanalyse viele signifikante Abhängigkeiten zwischen der Expression der angiogenetischen Faktoren in der Carotisläsion und weiteren klinischen Parametern. Am deutlichsten waren die Zusammenhänge beim VEGF und dem Vorkommen von Neogefäßen in der Carotisplaque und der inflammatorischen Reaktion zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigen eine potentielle Relevanz zwischen den angiogenetischen Faktoren, deren Expression innerhalb der Plaque und dem Vorkommen im Blut der Patienten mit hochgradigen Carotisstenosen und der Plaquevulnerabilität.

4. DISKUSSION

Die Intention der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung des Stellenwertes der Neovaskularisierung und angiogenetischer Faktoren in der Progression von atherosklerotischen Carotisläsionen und deren potentielle Rolle im Zusammenhang mit der Plaquevulnerabilität. Dass Neovaskularisierung eine Rolle in der Entstehung und Progression der Atherosklerose spielen kann, wurde bereits beschrieben (*Sluimer 2009, Chen 2006, Moulton 2006, Virmani 2005, Fleiner 2004, Jeziorska 1999*). Welche Rolle jedoch die einzelnen angiogenetischen Faktoren hauptsächlich im Zusammenhang mit der Rupturgefährdung speziell bei Patienten mit fortgeschrittenen Carotisläsionen spielen, ist noch weitgehend ungeklärt. Auch die Möglichkeit, angiogenetische Faktoren als mögliche Prognosemarker der Plaqueinstabilität heranzuziehen, wurde bislang nicht untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten einerseits die wichtige Rolle der Neovaskularisierung und angiogenetischer Faktoren in der Progression von Carotisläsionen in Richtung der Vulnerabilität und zum anderen zeigen einige angiogenetische Faktoren ebenfalls das Potential als Prognosemarker der Rupturgefährdung zu dienen.

4.1. Patientencharakterisierung

In die Studie wurden Patienten eingeschlossen, die eine hochgradige Carotisstenose von über 70% hatten. Die Auswahl der Patienten beruhte darauf, dass das Risiko eines Carotisbedingten Schlaganfalls bei einer Carotisstenose >70% bei 2-6% pro Jahr liegt, womit eine Carotis-TEA für diese Individuen vorteilhaft ist (*Sander 2007, Rijbroek 2006, Eckstein 2004*). Die Patienten werden durch ein breit angelegtes Screening oder auch durch Zufall entdeckt. Falls eine hochgradige Carotisstenose vorliegt, werden diese Patienten der Operation zugeführt. Den häufigsten Pathomechanismus einer zerebralen Ischämie stellt dabei die arterio-arterielle Embolie dar. Patienten mit asymptomatischen Stenosen haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die koronare Herzerkrankungen (*Dodick 2004*). Das Risiko liegt zwischen 1,5 bis 5% pro Jahr. Der durchschnittliche Stenosegrad liegt bei 81,5% (Range: 70-95%). Die europäische ECST-Studie und auch die amerikanische NASCET-Studie bestätigten die Vorteile der Carotis-TEA bei 70 bis 99%-igen Stenosen. Hier konnte eine Reduktion des

Risikos für das Auftreten eines ipsilateralen Schlaganfalles nach 5 Jahren von knapp 16% nachgewiesen werden (*Eckstein 2004*). Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei 70 Jahren. Das Alter der Patienten in der vorliegenden Studie entspricht dem Durchschnittsalter, das in den zwei großen Studien ECST und NASCET beschrieben wurde, in denen die meisten Patienten zwischen 65-74 Jahre alt waren. In beiden Gruppen (Patienten mit instabilen und stabilen Carotisplaques) befanden sich etwa zweimal so viele Männer wie Frauen. Insgesamt lag der Anteil an Männern bei 70,3%, der Anteil an Frauen bei 29,3%. Auch diese Verteilung entsprach weitgehend der Verteilung von Männern und Frauen in den großen Studien wie ECST und NASCET. Der Unterschied steigt signifikant mit dem Alter der Patienten. Somit entsprachen die Patienten in dieser Arbeit hinsichtlich Alter, Geschlecht, Stenosegrad sowie Symptomen, der Verteilung in der normalen Bevölkerung. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten über die Expression von angiogenetischen Faktoren und Neovaskularisierung können somit auch auf andere Patienten mit hochgradigen Carotisstenosen übertragen werden.

Der Anteil an symptomatischen Patienten, die binnen 6 Monaten nach einer TIA oder einem non-disabling Schlaganfall einer Carotis-TEA unterzogen wurden, war signifikant höher (Faktor 2,1) bei den Patienten mit instabilen Carotisläsionen. Diese Daten korrespondieren sehr gut mit der Annahme, dass instabile Plaques durch eine Ruptur der Carotisläsion eine Embolie und damit ein neurologisches Symptom verursachen können.

Bezüglich einiger Begleiterkrankungen, die im Zusammenhang mit der Carotisplaqueinstabilität untersucht wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit stabilen und instabilen Läsionen. Es ist jedoch anzumerken, dass 90% der Patienten an Hypertonie litten, 80% an Hypercholesterinämie und über 60% an Hyperlipidämie. Alle diese Faktoren sind die bekannten Risikofaktoren der Atherosklerose und führen zur beschleunigten Plaqueprogression. Weiterhin schädigt erhöhter Blutdruck die endotheliale Schicht und führt damit zur beschleunigten Ablagerung von Lipiden und Rekrutierung und Akkumulation von inflammatorischen Zellen wie z.B. Monozyten und T-Zellen (*Stary 1992, 1994, 1995, Bresens 1997*).

Alle Studienpatienten nahmen Aspirin oder Clopidogrel ein. Beide Medikamente werden niedrig dosiert zur Hemmung der Thrombozytenaggregation eingesetzt und dienen damit der Vorbeugung von Schlaganfällen sowie von (erneuten) Myokardinfarkten bei bekannten arteriosklerotischen Gefäßveränderungen. Alle Patienten gehörten somit bereits zur Risikogruppe, was auch die Begleiterkrankungen bei den meisten Patienten, hauptsächlich Hypertonie, bestätigten. Weiterhin wurde fast die Hälfte der Patienten mit ACE-Inhibitoren

behandelt, die ebenfalls gegen Bluthochdruck eingesetzt werden. Die Prävalenz der arteriellen Hypertonie liegt in hoch entwickelten industriellen Ländern bei bis zu 50% der Gesamtbevölkerung, wobei die Häufigkeit mit dem Alter deutlich ansteigt. An weiteren Medikamenten haben fast 70% der Studienpatienten Statine eingenommen. Statine werden hauptsächlich als Lipidsenker verwendet, die durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase die Cholesterinsynthese blockieren. Damit kann die Aufnahme von in LDL-Vesikeln enthaltenen Lipiden und Cholesterin reduziert und die Progression der Atherosklerose verlangsamt werden (*Goldstein 2007, Zhou 2006, Libby 2003*). Außerdem sind Statine auch in der Lage, anti-inflammatorisch und anti-proliferativ zu wirken, womit sogar theoretisch eine gefährdete atherosklerotische Läsion wieder stabilisiert werden kann (*Montecucco 2009*).

4.2. Histologische und immunhistochemische Plaquecharakterisierung

Die Charakterisierung der Carotisplaques zeigte die klassische Morphologie atherosklerotischer Läsionen. Gemäß der Klassifizierung nach Herbert Stary (*Stary 1992, 1994, 1995*), waren die Carotisplaques aller untersuchten Patienten im Stadium V, VI und/oder VII. Es handelte sich somit bei allen Patienten um fortgeschrittene Carotisläsionen mit potentiell klinischem Impakt. Die typische fortgeschrittene Läsion ist die Typ-V-Läsion, das Fibroatherom, bei welchem in den meisten Fällen ein großer Atheromkern vorhanden ist und zum Lumen hin eine abgrenzende fibröse Kappe auftritt. Das Fibroatherom ist die häufigste Ausgangsläsion für Komplikationen, wie die Typ-VI-Läsion nach Stary, die sog. thrombohämorrhagische Komplikation, welche in der Regel durch einen Einriss der fibrösen Kappe entsteht. Hier werden noch drei Untertypen unterschieden, je nachdem ob mehr die murale oder okklusive, thrombotische Komponente auftritt, oder die hämorrhagische Plaqueeinblutung vorhanden ist. Einige der Plaques hatten auch verkalkte Stellen, was bedeutet, dass diese der Typ-VII-Läsion zuzuordnen waren. Anhand der modifizierten Klassifizierung nach Virmani (*Virmani 2000, 2006*), wurden die Carotisplaques als stabil und instabil charakterisiert. Alle Plaques Typ V und die meisten des Typs VII (verkalkte Läsionen) mit einer fibrösen Kappe von über 100 µm wurden als stabil eingestuft. Alle anderen, hauptsächlich Typ VI, zeigten die charakteristischen Merkmale der Plaqueinstabilität oder -ruptur. Hier ist jedoch zu sagen, dass nach Rücksprache mit Priv.-Doz. Dr. Pelisek und der Pathologin Dr. Rudelius auch einige Plaques des Typ VI als stabil eingeordnet wurden,

wenn die Einblutung nicht frisch war. Es war zwar zur Ruptur der Carotisplaques gekommen, dieses Ereignis war vermutlich zu einem früheren Zeitpunkt klinisch stumm verlaufen. Es ging hier jedoch darum, frische Einblutungen oder Rupturen zu entdecken, die den Patienten in die Klinik brachten. Diese Läsionen waren klinisch relevant und führten z.B. bei symptomatischen Patienten zu einem transienten ischämischen Schlaganfall. Es ist jedoch möglich, dass bei der Auswertung auch einige der Plaques nicht richtig zugeordnet wurden. Auch wenn die Ergebnisse der Plaquecharakterisierung mit Priv.-Doz. Dr. Pelisek und der Pathologin Dr. Rudelius besprochen wurden, bleibt immer noch ein gewisser Fehlerfaktor, hauptsächlich bei Plaques, bei denen die Morphologie nicht eindeutig war. Durch die doch größere Patientenzahl und unter der Annahme, dass die Fehler in beiden Gruppen gemacht werden, kann jedoch, unter bestimmten Bedingungen, die falsche Einteilung vernachlässigt werden.

Im Vergleich der beiden Gruppen, Patienten mit stabilen vs. Patienten mit instabilen Carotisläsionen, zeigten sich ebenfalls einige Unterschiede. Mit Hilfe einer semi-quantitativen Auswertung der Präparate zeigten instabile Plaques einen reduzierten Gehalt an Kollagen und Elastin. Kollagen sorgt für die Stabilität der Gefäße und Elastin für dessen Elastizität. Somit korrelieren diese Ergebnisse sehr wohl mit der Plaqueinstabilität. Es ist bekannt, dass atherosklerotische Läsionen durch die Reduktion des Elastingehalts, durch die Verdickung der Intima, der Gefäßwand und auch die zuerst vermehrte Synthese an Kollagen steifer werden (*Agabiti-Rosei 2007, Safar 2000*). Die erhöhte Produktion an Kollagen durch die in der atherosklerotischen Läsion vorkommenden, glatten Muskelzellen, führt zunächst zur Plaquestabilisierung. Mit der Zeit gehen jedoch diese glatten Muskelzellen zugrunde und damit sinkt auch die Kollagensynthese. Das wurde in dieser Arbeit bestätigt. Weiterhin zeigten die vorliegenden Daten, dass in den instabilen Läsionen die Anzahl an glatten Muskelzellen (SMA-Färbung) ebenfalls reduziert war. Elastin ist sehr stabil mit einer Halbwertszeit von 50 Jahren und wird selten oder nur geringfügig nachsynthetisiert. Dessen Reduktion, z.B. durch verschiedene Matrixmetalloproteinasen führt unwiderruflich zum Verlust von Elastin, womit die Elastizität des Gefäßes nicht mehr gewährleistet werden kann. Interessanterweise zeigten stabile und instabile Läsionen ungefähr den gleichen Gehalt an Makrophagen (Nachgewiesen durch CD68). Somit scheinen Makrophagen selbst nicht die entscheidende Rolle in der Plaqueruptur zu spielen, auch wenn sie durch die Entzündungsreaktion und Produktion von verschiedenen Zytokinen und Matrixmetalloproteinasen zur Plaqueprogression Richtung Instabilität sicherlich beitragen.

Dieser Beitrag scheint jedoch in dieser Studie bei beiden Patientengruppen gleich zu sein. Dagegen zeigten instabile Plaques eine erhöhte Zahl an T- und B-Zell-Infiltraten, partiell auch an Plasmazellen, die sich in den meisten Fällen nah an den Neogefäßen oder um sie herum befanden. Weiterhin hatten instabile Läsionen signifikant mehr Neogefäße als stabile Plaques. Beides, erhöhte Anzahl an Neogefäßen und inflammatorischen Zellen kann somit zur Plaqueinstabilität beitragen (Roy 2006, Rundhaug 2005, Libby 2002, Ross 1999). Diese Ergebnisse (Assoziation zwischen inflammatorischen Zellen und Neogefäßen) lassen den Schluss zu, dass diese Mikrogefäße hoch permeabel sind und auch rupturieren können, was zur Akkumulation von Entzündungszellen führt. Neogefäße tragen dadurch indirekt zur erhöhten Plaqueinflammation und weiter zur Plaqueprogression und eventuell zur Ruptur bei.

4.3. Charakterisierung der Neogefäße

Wie bereits im vorigen Kapitel erwähnt, zeigten instabile Carotisläsionen eine signifikant höhere Anzahl an Neogefäßen, verglichen mit stabilen Plaques. Normale Gefäße rekrutieren nach der Entstehung und Ausbildung der ersten endothelialen Tubes, die meistens aus ein bis zwei Endothelzellen bestehen, sog. Perizyten, Vorläufer von glatten Muskelzellen, welche die Gefäße stabilisieren (Karamysheva 2008, Carmeliet 2000). Dies war jedoch nicht der Fall in den untersuchten Carotispräparaten. Die meisten der Gefäße hatten nur die endotheliale Schicht, auch wenn sie aus mehreren Endothelzellen bestanden (oft über 50, Nachweis durch Faktor VIII Färbung und eine Folgefärbung gegen SMA). Morphologisch konnte man ebenfalls beobachten, dass diese endotheliale Schicht nicht kontinuierlich war, sondern partiell unterbrochen. Diese sog. Fenestration/Permeabilität von Endothelzellen/Endothelschicht führt dazu, dass Blutbestandteile aus dem Blut in das umliegende Gewebe übergehen können (Pries 2006). Unter anderem auch die inflammatorischen Zellen. Weiterhin ist für größere Neogefäße festzustellen, dass die Endothelschicht nicht ausreicht, um diese Gefäße zu stabilisieren. Es besteht die Gefahr, dass die Mikrogefäße platzen können und es dadurch zur interplaqualen Einblutung kommt. Auch dieses Phänomen wurde in den untersuchten Carotispräparaten beobachtet. Die Einblutung war durch die austretenden Erythrozyten sichtbar, die sich durch die Eisenablagerungen dunkel gelb anfärbten. Weiterhin waren in über 97% der Plaques Neogefäße vorhanden. Auch diese Resultate lassen vermuten, dass die Neoangiogenese eine wichtige Rolle in der Plaqueprogression und -ruptur spielt. Die

Neogefäße stammen meist aus der Vasa vasorum, einem Netz aus Gefäßen, die sich in der Adventitia um das Gefäß herum befinden und die glatten Muskelzellen der Media mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen versorgen. Im frühen Stadium der Atherosklerose, durch die Akkumulation der ersten inflammatorischen Zellen, Monozyten und Makrophagen, werden verschiedene Zytokine freigesetzt. Diese Zytokine führen wiederum zur Synthese von Wachstumsfaktoren, die erstens durch Migration ausgehend von den Vasa vasora für die Entstehung neuer Gefäße sorgen, die in die Intima und die atherosklerotische Plaque einwachsen und so für die Neovaskularisierung atherosklerotischer Gefäßabschnitte sorgen (*Langheinrich 2007, Ritman 2007, O'Brien 1994*). Zweitens ermöglichen sie es Monozyten und Lymphozyten durch Expression der Adhäsionsmoleküle am Endothel zu binden, die Endothelbarriere zu passieren und zum Entzündungsort zu migrieren (*Langheinrich 2007*). Aus diesem Grund findet man Neogefäße in frühen Stadien zuerst an der Grenze zwischen Adventitia und Media, dann in den tieferen Schichten der Intima und in fortgeschrittenen Stadien, wie in dieser Studie nachgewiesen, bis unter die luminale Endothelschicht. Diese Beobachtung wurde in vielen der Carotisplaques, die hier untersucht wurden, beobachtet.

4.4. Lokalisierung und Expression angiogenetischer Faktoren

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Neovaskularisierung in den meisten Carotisläsionen und einer erhöhten Angiogenese/Arteriogenese in instabilen Plaques wurden auch die relevanten angiogenetischen Faktoren immunhistochemisch und deren Expression auf der mRNA-Ebene untersucht. Folgende angiogenetische Faktoren wurden in diesem Zusammenhang in den Carotisplaques analysiert und ebenfalls nachgewiesen: VEGF, VEGFR-2, PDGF, Ang-1, Ang-2. VEGF ist nicht nur ein angiogenetischer Wachstumsfaktor, der für die Gefäßentstehung unerlässlich ist (*Holm 2009, Breier 2000, Carmeliet 2000*), sondern auch ein vaskulärer Permeabilitätsfaktor. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten nicht nur eine starke Expression von VEGF innerhalb der atherosklerotischen Läsionen, sondern auch eine signifikant erhöhte Expression in den instabilen Plaques im Vergleich zu stabilen Läsionen. Diese Daten korrelierten signifikant mit der Anzahl an Neogefäßen in den Plaques und auch mit der erhöhten Anzahl an inflammatorischen Zellen innerhalb der Plaques, besonders in den instabilen Carotisläsionen. Weiterhin lässt sich dadurch auch die verstärkte Akkumulation der inflammatorischen Zellen erklären, weil VEGF

nicht nur zum Gefäßwachstum führt, sondern die Permeabilität der Gefäße auch deutlich erhöht. Interessanterweise zeigten alle Zellen innerhalb der Carotisplaques - Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen und auch inflammatorische Zellen - eine VEGF Expression. Es ist bekannt, dass Atherosklerose zum Sauerstoffmangel, der sog. Hypoxie führt (Sluimer 2009). Hypoxie sorgt wiederum für die Aktivierung des Gens für VEGF. Damit lässt sich die Expression von VEGF in allen Zellen innerhalb der Carotisplaque, die alle mehr oder weniger unter Hypoxie leiden, erklären.

Im Gegensatz zu VEGF, war die Expression von VEGFR-2 deutlich (Faktor 10) niedriger. Weiterhin waren, wie erwartet, nur Endothelzellen positiv für dessen Expression (*Ferrara 2009*). Es wurden zwar auch positive Makrophagen und Schaumzellen beobachtet, jedoch lässt sich hier aufgrund dessen, dass Makrophagen und Schaumzellen für alle untersuchten Marker positiv sind, nichts ableiten. Es konnte hier teilweise zu unspezifischen Färbereaktionen kommen. Die Expression von VEGFR-2 war erstens jedoch sehr schwach und zweitens waren nicht alle Endothelzellen positiv. Der Grund für diese schwache Expression könnte zum Beispiel durch die Beschaffenheit der fortgeschrittenen Carotisläsionen erklärt werden. Die Endothelzellen, die negativ für VEGFR-2 waren, waren vermutlich nicht mehr aktiv. Diese Beobachtung wurde dadurch bestätigt, dass die VEGFR-2 negativen Endothelzellen vorzugsweise in den tieferen Schichten der atherosklerotischen Plaque lagen und die aktiven positiven Endothelzellen der Neogefäße meistens unter der luminalen Endothelschicht in den Schulterregionen des Atheroms.

Die Expression von PDGF war, genauso wie die beim VEGF, relativ stark. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit stabilen und instabilen Plaques. Alle Zellen innerhalb der Plaques waren ebenfalls positiv für PDGF. Nur bei den luminalen Endothelzellen wurden einige negative Zellen beobachtet. Der Grund für diese Unterschiede bei den luminalen Endothelzellen ist unklar. Hier lag es entweder an der Färbung, oder daran, dass die Zellen nicht mehr aktiv oder im frühen Stadium der Apoptose, wie bereits im Zusammenhang mit der VEGFR-2 Expression weiter oben angesprochen wurde. Es ist bekannt, dass die Atherosklerose, vor allem im fortgeschrittenen Stadium, die Viabilität von Endothelzellen negativ beeinflussen kann (*Virmani 2006, 2000*). Es kann hier zu einer Erosion, der sog. Abwesenheit von Endothelzellen, kommen (*Virmani 2000*). Dieses Phänomen ist noch nicht ganz geklärt worden. Virmani and Kollegen vermuten eine Art von Vasospasmus, verursacht durch die Verengung des atherosklerotischen Gefäßes aufgrund noch unbekannter Reize. Interessanterweise widerspricht die hohe Expression von PDGF der

Tatsache, dass die meisten der Neogefäße unreif - ohne die stabilisierende Schicht von glatten Muskelzellen – waren. PDGF wird normalerweise von den Endothelzellen freigesetzt und rekrutiert Perizyten, die dann später die stabilisierende und elastische Muskelschicht bilden. PDGF wird jedoch auch bei Verletzungen freigesetzt und stimuliert die Heilung innerhalb des Gewebes (*Raines 2004*). Die Atherosklerose stellt im Grunde eine Art chronischer Verletzung dar. Deshalb ist die erhöhte Expression in verschiedenen Zellen innerhalb der Carotisplaque nicht verwunderlich. Warum jedoch die Expression von PDGF nicht zur Rekrutierung von glatten Muskelzellen zu Endothelzellen der Neogefäße führt, kann mehrere Ursachen haben.

Erstens haben viele glatte Muskelzellen in den atherosklerotischen Läsionen nicht den richtigen Phänotyp, der für die Rekrutierung notwendig ist. Sie befinden sich vielmehr in der proliferativen Phase, um verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix zu synthetisieren.

Zweitens führen der hypoxische Zustand innerhalb der atherosklerotischen Plaques und das Ungleichgewicht von Wachstumsfaktoren zum Tod von glatten Muskelzellen (*Sprague 2009, Rudijanto 2007*). Somit sind nicht genügend glatte Muskelzellen vorhanden, um die gewünschte Schicht um die Endothelzellen der Neogefäße zu bilden. Weiterhin werden überwiegend Perizyten rekrutiert, deren Rolle, Funktion und Vorkommen in atherosklerotischen Läsionen ist jedoch noch weitgehend ungeklärt (*Yamagishi 2005*).

Drittens wurde in dieser Arbeit ein Antikörper gegen PDGF-AB und PDGF-BB verwendet, die als die wichtigsten Faktoren der Perizyten-Rekrutierung gelten (*Karamysheva 2008*). Jedoch könnte auch PDGF-AA eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Perizyten/glatten Muskelzellen spielen. Dieser Wachstumsfaktor wird hier aber nicht erfasst, weil, wie bereits erwähnt, in den meisten Fällen PDGF-BB während der Angiogenese exprimiert wird und dieser Wachstumsfaktor ist hauptsächlich für die Rekrutierung von Perizyten verantwortlich (*Karamysheva 2008*).

Viertens wurden auch keine Rezeptoren des Wachstumsfaktors PDGF untersucht. Ohne entsprechende Rezeptoren kann jedoch keine Bindung und Rekrutierung stattfinden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant festzustellen, ob glatte Muskelzellen die notwendigen PDGF-Rezeptoren, PDGFR-alpha und PDGFR-beta, in atherosklerotischen Läsionen exprimieren und wie stark.

Hinsichtlich der Expression von Ang-1 und -2 bestätigten die vorliegenden Ergebnisse die Rolle der beiden angiogenetischen Faktoren. Während Ang-1 den korrespondierenden Tie-2

Rezeptor aktiviert und damit die Assoziierung von Perizyten und glatten Muskelzellen an das Endothelium erhöht, wirkt Ang-2 als Antagonist ohne weitere Signaltransduktion (*Karamysheva 2008, Arnulik 2005*). Das bedeutet, dass Ang-1 und dessen Expression zur Gefäßstabilisierung beiträgt, Ang-2 dagegen als dessen Antagonist zur Plaquestabilisierung. Die Expressionsanalyse in der vorliegenden Doktorarbeit zeigte eine sehr geringe Expression von Ang-1 und eine hohe Expression von Ang-2. Folglich führen solche Zustände zur Destabilisierung der Neogefäße, was auch den Beobachtungen dieser Arbeit entspricht. Des Weiteren wurden auch signifikante Unterschiede bei der Expression von Ang-1 in stabilen und instabilen Carotisplaques beobachtet. In den instabilen Läsionen war die Expression von Ang-1 signifikant verringert gegenüber der Aktivität von Ang-1 in den stabilen Plaques. Das bewirkt wiederum eine noch stärkere Destabilisierung der Neogefäße. Zusätzlich ist bekannt, dass Ang-1 die vaskuläre Permeabilität verringert und anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt (*Arnulik 2005*). In Abwesenheit von Ang-1 erhöht sich aber die Permeabilität der Neogefäße, was zusammen mit der hohen Expression von VEGF zur weiteren Destabilisierung dieser Mikrogefäße führt und somit auch eine pro-inflammatorische Wirkung zur Folge hat. Die geringe Expression von Ang-1 kann in einem notwendigen Zusammenspiel mit PDGF zur Perizyten-Rekrutierung und Gefäßstabilisierung beitragen. Hier könnte der weitere Grund für die Ineffizienz von PDGF alleine als stabilisierender Faktor der Gefäße liegen, der ohne Ang-1 unzureichend ist.

Zusammenfassend kann über die Expression und Lokalisation von angiogenetischen Faktoren innerhalb atherosklerotischer Carotisplaques folgendes berichtet werden:

Alle relevanten angiogenetischen Faktoren wie VEGF, VEGFR-2, PDGF, Ang-1 und -2 werden in den Läsionen exprimiert. Hohe Expression von VEGF und niedrige Expression von Ang-1 (zusammen mit der erhöhten Expression von Ang-2 als destabilisierender Faktor von Ang-1) führt zum deutlichen Anstieg der Permeabilität von Neogefäßen und zu deren Destabilisierung. Dies führt wiederum zur Akkumulation von inflammatorischen Zellen und einer schnelleren Plaqueprogression. Das Verhältnis der Expression von VEGF/Ang-1 hat sich signifikant zu Ungunsten von instabilen Plaques präsentiert (Faktor 2,8), womit die Instabilität der Neogefäße in den instabilen Läsionen deutlich höher ist. Weiterhin wurden, wie Tabelle 7 zeigt, die untersuchten angiogenetischen Faktoren am stärksten in den Neogefäßen selbst exprimiert. Zusammen mit der erhöhten Anzahl der Neogefäße in den instabilen Carotisplaques legen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung nahe, dass

Neovaskularisierung und angiogenetische Faktoren maßgebend zur Plauevulnerabilität beitragen können.

4.5. Expression von Matrixmetalloproteinasen in Neogefäßen

Der wichtigste Pathomechanismus, der zur Plauedestabilisierung und -ruptur führt, ist die Degradierung extrazellulärer Matrix, hauptsächlich der Abbau kollagener und elastischer Fasern innerhalb der atherosklerotischen Läsionen (*Dollery 2006, Garcia-Touchard 2005*). Aktivierte glatte Muskelzellen versuchen diesem Prozess am Anfang entgegenzuwirken, indem sie vermehrt Kollagen synthetisieren. Im fortgeschrittenen Stadium gehen jedoch viele der Zellen zugrunde. Weiterhin werden durch die chronische Entzündungsreaktion, durch Akkumulierung von inflammatorischen Zellen (unter anderem durch die instabilen und hoch permeablen Neogefäße) vermehrt proteolytische Enzyme freigesetzt, welche die extrazelluläre Matrix degradieren. Dieser „Kampf“ kommt am Ende den Proteinasen zu Gute, hauptsächlich den Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (*Newby 2008*). MMPs spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Gefäßneubildung, indem sie vorhandenes Bindegewebe um die Gefäße herum degradieren, um das Gefäßwachstum zu ermöglichen (*Dollery 2006, Roy 2006*). Die Expression von Proteinasen in den Neogefäßen, die in den fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen häufig vorhanden sind, spielt, wie in der vorliegenden Doktorarbeit nachgewiesen wurde, eine maßgebliche Rolle in der Plauedestabilisierung. Es wurden deshalb einige wichtige MMPs (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9) ausgesucht, um deren Expression, speziell in Neogefäßen innerhalb der Carotisläsionen, zu untersuchen. Mit Ausnahme von MMP-8 wurde die Expression aller untersuchten MMPs in den Neogefäßen nachgewiesen. MMP-1, -2, -3 und -9 zeigten eine starke Expression, MMP-7 war gering schwächer. MMP-1 gehört zu der Gruppe der Kollagenasen und ist in der Lage intaktes Kollagen zu degradieren (*Newby 2008, Dollery 2006*). MMP-2 und -9 sind sogenannte Gelatinasen und verdauen das von MMP-1 bereits partiell zerlegte Kollagen. MMP-3 ist in der Lage, außer Kollagen, auch noch nicht-kollagene Fasern, wie Elastin und Proteoglykane, zu degradieren. Zusätzlich aktiviert es noch weitere MMPs (*Dollery 2006, Visse 2003*). MMP-7 ist eine der wichtigsten Proteinasen für die Degradierung nicht-kollagener Fasern. Zusammenfassend exprimierten die Neogefäße in den Carotisläsionen alle notwendigen MMPs, um die gesamte extrazelluläre Matrix zu degradieren. Neogefäße können somit direkt durch die Expression von MMPs zur Plauedestabilisierung beitragen.

4.6. Analyse ausgewählter angiogenetischer Faktoren im Blut

Trotz wesentlicher Fortschritte in der Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren gibt es immer noch keine zuverlässige Methode, um vulnerable, rupturgefährdete Carotisläsionen frühzeitig zu erkennen. Eine relativ einfache und schnelle Methode sind sog. Biomarker, Faktoren im Blut des betroffenen Patienten, die den Zustand der Plaqueprogression und auch die potentielle Rupturgefahr widerspiegeln würden. In den atherosklerotischen Läsionen sind verschiedene Prozesse, wie z.B. Proteolyse und inflammatorische Reaktion, hoch aktiv (*Newby 2008, Dollery 2006, Libby 2002*). Prof. Eckstein und Dr. Pelisek haben bereits nachgewiesen, dass einige Matrixmetalloproteinasen, wie z.B. MMP-1 und -7, TIMP-1 und auch einige inflammatorische Faktoren wie CRP, Fibrinogen, TNF-alpha und IL-8 einen Hinweis über die Plaqueinstabilität geben können (*Pelisek 2009, Heider 2009*). In der vorliegenden Arbeit wurde bewiesen, dass Neovaskularisierung und angiogenetische Faktoren ebenfalls vermehrt in instabilen Carotisläsionen vorkommen. Es stellt sich deshalb die Frage, ob diese angiogenetischen Faktoren auch als potentielle Prädiktoren der Plaquevulnerabilität dienen könnten. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der angiogenetischen Faktoren im Blut der Studienpatienten mit fortgeschrittener Carotisstenose analysiert. Da VEGFR-2 nur auf der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert wird und eine relativ geringe Expression in den Carotisläsionen nachgewiesen wurde, wurde in dieser Arbeit das Vorkommen von VEGFR-2 im Blut von Carotispatienten nicht untersucht. Alle anderen angiogenetischen Faktoren, VEGF, PDGF, Ang-1 und -2 wurden im Blut der Carotispatienten analysiert. Alle vier Faktoren werden aus den Zellen in das umliegende Gewebe sezerniert und könnten somit durch die meist geschädigte Endothelschicht der fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen ins Blut gelangen.

Die Ergebnisse zeigten signifikant erhöhte Werte von VEGF im Blut von Patienten mit instabilen Carotisläsionen. Somit stimmten die Resultate aus dem Blut und aus dem Plaquegewebe überein. In den Carotisläsionen war die Expression von VEGF signifikant erhöht und es wurde ebenfalls eine erhöhte Konzentration von VEGF im Blut beobachtet. Es sind die ersten Daten, die zeigen, dass VEGF als ein potentieller Biomarker der Plaquevulnerabilität dienen könnte. Selbstverständlich müssen diese Daten noch in einer weiteren prospektiven Studie bestätigt werden.

PDGF betreffend gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Dies war so auch zu erwarten, weil es keine Differenzen in der Expression dieses angiogenetischen Faktors in den Carotisplaques gab. Somit ist PDGF vermutlich nicht geeignet, rupturgefährdete Carotisplaques zu diagnostizieren. Hier bedarf es jedoch noch weiterer Studien, die diese Daten bestätigen können.

Interessante Ergebnisse wurden beim Ang-1 und -2 erzielt. Beim Ang-1 gab es im Gegensatz zu einer signifikanten Verringerung in der Carotisplaque keine signifikanten Unterschiede in dessen Konzentration im Blut. Die Expression von Ang-1 in der Plaue war jedoch sehr gering, bis zu 10-fach niedriger als beim VEGF. Der Grund könnte sein, dass nicht genügend Ang-1 aus der Carotisläsion ins Blut übergehen konnte, um diese Unterschiede zu detektieren. Interessanterweise war jedoch eine deutliche Reduktion von Ang-2 in Patienten mit instabilen Läsionen, verglichen mit Individuen mit stabilen Carotisplaques, zu sehen. Im Gegensatz dazu gab es keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Ang-2 im Plauegewebe. Die Expression war nahezu mit der Expression von VEGF vergleichbar, oder nur leicht verringert. Diese Diskrepanz ist derzeit schwer zu erklären. Es könnte entweder zufällig aufgrund der für diese Studie getroffene Patientenauswahl zustande gekommen sein, oder es liegt ein anderer, uns noch nicht bekannter, Mechanismus vor. Die Experimente mit Ang-2 sollten in einer anderen Studie, retrospektiv oder prospektiv, untersucht werden, um die hier vorliegenden Ergebnisse entweder zu widerlegen, oder zu bestätigen. Falls unsere Ergebnisse bestätigt werden, müsste hier nach möglichen Mechanismen oder Prozessen gesucht werden, die diese Diskrepanz erklären können.

4.7. Korrelationen zwischen Blutwerten und Plaueparametern

Um noch weitere Zusammenhänge zwischen der Expression von angiogenetischen Faktoren, Neovaskularisierung und klinischen Parametern die zur Verfügung standen zu überprüfen, wurde eine ausführliche Korrelationsanalyse der Neogefäße, VEGF, VEGFR-2, PDGF, Ang-1, und -2 durchgeführt.

Hinsichtlich verschiedener Begleiterkrankungen gab es keine relevanten Korrelationen mit angiogenetischen Faktoren. Ausgehend von dieser Datenlage, beeinflussen daher andere Erkrankungen nicht signifikant die Neovaskularisierung innerhalb der Carotisplaques. Der

Vergleich der angiogenetischen Faktoren mit ausgewählten klinischen Symptomen zeigte jedoch einige relevante Ergebnisse:

Erstens korrelierten Neogefäße mit der Carotisplaque-Instabilität, -Ruptur und sogar dem neurologischen Symptom. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass ein Prognosemarker der Neovaskularisierung auch bei der individuellen Diagnostik helfen könnte. Interessanterweise korrelierte die Ang-1 Expression in den Carotisplaques mit dem Alter der Patienten. Ob diesem Ergebnis eine klinische Bedeutung zukommt, bleibt noch abzuwarten. Es ist jedoch bereits bekannt, dass viele atherosklerotische Faktoren und deren Expression und Vorkommen im Blut vom Patientenalter abhängen (*McEwen 2006, Thrailkill 2005*). Solche Unterschiede sind demnach nicht überraschend. Welche klinische Bedeutung jedoch individuell die Veränderung in der Expression solcher Faktoren in Atherosklerose haben, muss noch untersucht werden. Verschiedene Korrelationen von angiogenetischen Faktoren im Blut und deren Expression in den Carotisplaques und Neovaskularisierung (Tabelle 10) bestätigten wiederum, dass einige angiogenetische Faktoren, wie z.B. VEGF tatsächlich als Biomarker der Carotisplaquevulnerabilität dienen könnten. Interessant war auch die Korrelation zwischen Neogefäßen und inflammatorischen Faktoren mit dem Korrelationsfaktor $r = 0.416$ ($p < 0,001$), was die Rolle der Neovaskularisierung und Akkumulation von inflammatorischen Zellen weiter bekräftigt.

Die Korrelationen zwischen den angiogenetischen Faktoren im Blut und im Plauegewebe bestätigten die Rolle von VEGF als potentiellen Biomarker für instabile Plaques. Die zusätzliche Korrelation zwischen dem Vorkommen von VEGF im Blut und Fibrinogen zeigte weiterhin einen klaren Zusammenhang zwischen der Neovaskularisierung und Inflammation. Beide Faktoren und partiell auch CRP, wie Dr. Pelisek (*Pelisek 2009, Heider/Pelisek 2007*) bereits gezeigt hat, könnten somit zusammen noch mit einigen proteolytischen Enzymen, wie MMPs, als multiple Prädiktoren der Plauevulnerabilität dienen.

4.8. Zukunftsperspektive

An den Folgen von Arteriosklerose sterben die meisten Menschen in den westlichen Industrienationen. Im Gegensatz zu anderen Erkrankungen, wie z.B. Krebs, können die atherosklerotischen Vorgänge bislang nicht aufgehalten werden. Atherosklerotische Gefäße können zwar behandelt werden, unter anderem sehr erfolgreich durch die Carotis-TEA, wie in dieser Doktorarbeit beschrieben, es wird dabei jedoch nur das eigentliche klinische Ereignis behandelt, nicht die tatsächliche Ursache der Atherosklerose selbst. Somit können solche erkrankten Gefäße zwar wieder „repariert“ werden, die atherosklerotischen Vorgänge gehen dennoch unaufhaltsam weiter. Es gibt noch kein effizientes therapeutisches Verfahren, um die Atherosklerose aufzuhalten oder deren Progression maßgeblich zu verlangsamen. Nicht nur das, es gibt derzeit noch keine diagnostische Methode, die zuverlässig rupturgefährdete atherosklerotische Läsionen, speziell in den Carotisgefäßen detektieren kann, um rechtzeitig einem Schlaganfall vorzubeugen. Um solche effiziente Verfahren, ob therapeutisch oder diagnostisch, zu entwickeln, müssen die Vorgänge, die zur Entwicklung und Progression der Atherosklerose führen, gut verstanden werden.

In dieser Arbeit wurde im Hinblick auf die Prozesse in atherosklerotischen Läsionen eine neue Annäherung geleistet, indem die Rolle der Neovaskularisierung und angiogenetischen Faktoren in Carotisplaques detailliert untersucht wurde. Es wurde in diesem Zusammenhang nachgewiesen, dass es nicht nur in den Läsionen, sondern auch im Blut der korrespondierenden Patienten, einige angiogenetische Faktoren gibt, die als potentielle Prognosemarker der Rupturgefährdung der Carotisläsionen dienen können. Die Rolle der Biomarker als mögliche Prognosefaktoren fortgeschrittener und vulnerabler atherosklerotischer Läsionen wurde bereits erkannt (*Wang 2006, Ferri 2006, Lind 2003*). Biomarker gewinnen heutzutage mehr und mehr an Bedeutung, denn sie können eine schwerwiegende Diagnose absichern oder die Diagnosestellung erst ermöglichen. Einer Reihe von Erkrankungen, wie zum Beispiel bestimmte Krebserkrankungen, die Alzheimer-Erkrankung oder die rheumatoiden Arthritis, gehen häufig ein frühes, symptomloses Krankheitsstadium voraus (*Sturgeon 2009*). Um jedoch solche Biomarker für die Diagnostik nutzen zu können, muss das Probenmaterial möglichst leicht zugänglich und der Biomarker schnell und einfach nachweisbar sein, z.B. aus dem Blut der Patienten. Durch eine breite

Untersuchung verschiedener Biomarker instabiler Carotisläsionen und durch eine geeignete und validierte Kombination, kann es somit in Zukunft möglich sein, spezielle Biomarker einzusetzen, die in der Lage sind, Plaquevulnerabilität frühzeitig zu diagnostizieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die meisten der atherosklerotischen Läsionen werden von der Ausbildung neuer Gefäße begleitet, die hauptsächlich im späteren Stadium signifikant zu Plaquestabilisierung beitragen können. Die Ursache der Neovaskularisierung ist unter anderem der Mangel an Sauerstoff in den wachsenden Plaques, verursacht durch die Verdickung der Intima und die damit verbundene unzureichende Versorgung der Zellen in dem betroffenen Bereich mit Blut. Der Einfluss der Neogefäße in den Carotisplaques auf die Plaquestabilität, genauso wie die möglichen Korrelationen der Expression angiogenetischer Faktoren in den atherosklerotischen Plaques und deren Vorkommen im Blut von Patienten mit fortgeschrittener extrakranieller Carotisstenosen, ist bislang weitgehend ungeklärt. Aus diesem Grund war das Ziel der Doktorarbeit die Untersuchung kausaler Zusammenhänge zwischen Neovaskularisierung, relevanten angiogenetischen Faktoren in atherosklerotischen Plaques von Patienten mit hochgradigen Carotisstenosen und deren Vergleich mit verschiedenen serologischen Parametern und Patientenanamnese.

Zu diesem Zweck wurden insgesamt 54 Patienten mit hochgradigen Carotisstenosen von über 70% untersucht, die einer Carotis-Thrombendarteriektomie (Carotis-TEA) unterzogen wurden. Die operativ entnommenen Carotisplaques wurden in Formalin fixiert, segmentiert und in Paraffin eingebettet. Histologische Untersuchungen beinhalteten die Plaquemorphologie, die Zellularität, die Plaquestabilität, sowie die Bestimmung der Anzahl der Neogefäße. Immunhistochemisch erfolgte der Nachweis von Makrophagen (CD68), glatten Muskelzellen (SM-Aktin), Endothelzellen (CD31, Faktor VIII) und relevanter angiogenetischer Faktoren (VEGF, VEGFR-2, PDGF, Ang-1, -2). Weiterhin wurden serologisch VEGF, PDGF, Ang-1, -2, und weitere klinische Parameter (CRP, Fibrinogen, Patientenanamnese) analysiert. Anschließend erfolgte eine quantitative Analyse der Expression der angiogenetischen Faktoren mit Hilfe der Real-Time RT-PCR und eine ausführliche statistische und Korrelationsanalyse.

Histologische Untersuchungen der Carotispräparate aller untersuchten Individuen (n = 54) zeigten bei 30 Patienten eine instabile Carotisplaque, 24 Patienten hatten eine stabile Läsion. Instabile Plaques wiesen eine signifikant höhere Anzahl an Neogefäßen, verglichen mit stabilen Plaques (Faktor 1,5 / p = 0.021), auf. Weiterhin wurde eine signifikant verstärkte

Akkumulation von inflammatorischen Zellen in den instabilen Carotisplaques beobachtet. Die instabilen Läsionen zeigten zusätzlich einen geringeren Kollagen- und Elastin-Gehalt und eine reduzierte Zahl an glatten Muskelzellen. Die meisten Neogefäße exprimierten alle untersuchten angiogenetischen Faktoren: VEGF, VEGFR-2, PDGF, Ang-1, und -2. Die Expression von VEGF war in allen Carotisläsionen am stärksten und weiterhin signifikant erhöht in den instabilen Plaques verglichen mit stabilen Carotisläsionen (1,6-fach / $p = 0,039$). Dagegen verringerte sich die Expression von Ang-1 in instabilen Plaques (1,8-fach / $p = 0,037$). Signifikant höhere VEGF-Konzentration wurde auch im Blut von Patienten mit hochgradigen Carotisstenosen und instabilen Plaques beobachtet ($0,32 \pm 0,22$ ng/mL vs. $0,22 \pm 0,16$ ng/mL; $p = 0,002$). Statistische und Korrelationsanalysen zeigten signifikante Korrelationen zwischen der Carotisplaque-Instabilität, der Expression von VEGF in den Plaques, dessen Vorkommen im Blut der korrespondierenden Patienten, der Anzahl an Neogefäßen innerhalb der Plaque und der Akkumulation inflammatorischer Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen dem Grad der Neovaskularisierung, Expression von angiogenetischen Faktoren in den extracraniellen Carotisläsionen und der Plaquestabilität. Instabile atherosklerotische Carotisplaques waren signifikant mit einem serologisch höheren VEGF- und niedrigem Ang-2 Spiegel assoziiert. Somit könnten diese Faktoren auch als potentielle Prognosemarker der Plaqueinstabilität bei dem Auftreten einer zerebralen Ischämie dienen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Agabiti-Rosei E, Muiesan ML. Carotid atherosclerosis, arterial stiffness and stroke events. *Adv Cardiol.* 2007, 44: 173-86.
- Al-Fakhri N, Wilhelm J, Hahn M, Heidt M, Hehrlein FW, Endisch AM, Hupp T, Bobryshev YV, Lord RS, Katz N. Increased expression of disintegrin-metalloproteinases ADAM-15 and ADAM-9 following upregulation of integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 in atherosclerosis. *J Cell Biochem.* 2003, 89(4): 808-23.
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008, 22(10): 1276-312. *Ann NY Acad Sci.* 2006, 1085: 161-9.
- Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004, 36(6): 981-5.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 2005, 97(6): 512-23.
- Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol.* 2002, 39(4-5): 225-37.
- Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005, 6: 32-43.
- Breier G. Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. *Semin Thromb Hemost.* 2000, 26(5): 553-9.
- Bräsen JH, Niendorf A. Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance. *Pathologe.* 1997, 18(3): 218-27.
- Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber D, Virmani R. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation.* 2002, 105(3): 297-303.
- Burke AP, Weber DK, Kolodgie FD, Farb A, Taylor AJ, Virmani R. Pathophysiology of calcium deposition in coronary arteries. *Herz.* 2001, 26(4): 239-44.
- Burke AP, Taylor A, Farb A, Malcom GT, Virmani R. *Z Kardiol.* Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims. 2000, 89 Suppl 2: 49-53.

-
- Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med.* 1997, 336(18): 1276-82.
- Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol.* 2000, 190(3): 338-42.
- Calvi C, Dentelli P, Pagano M, Rosso A, Pegoraro M, Giunti S, Garbarino G, Camussi G, Pegoraro L, Brizzi MF. Angiopoietin 2 induces cell cycle arrest in endothelial cells: a possible mechanism involved in advanced plaque neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24: 511-8.
- Canault M, Peiretti F, Kopp F, Bonardo B, Bonzi MF, Juhan-Vague I, Nalbone G. The TACE/ADAM17 is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. *Atherosclerosis.* 2006, 187(1): 82-91.
- Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Rocken C. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol.* 2005, 26(1): 17-24.
- Carmeliet P, Collen D. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol.* 2000, 190(3): 387-405.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003, 9(6): 653-60.
- Chalela JA. Evaluating the carotid plaque: going beyond stenosis. *Cerebrovasc Dis.* 2009, 27 Suppl 1: 19-24.
- Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.* 1997, 59: 63-88.
- Chen CH, Walterscheid JP. Plaque angiogenesis versus compensatory arteriogenesis in atherosclerosis. *Circ Res.* 2006, 99(8): 787-9.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 2003, 28(9): 488-94.
- Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJH, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993, 171: 223-229.

-
- Di Stefano R, Felice F, Balbarini A. Angiogenesis as risk factor for plaque vulnerability. *Curr Pharm Des.* 2009, 15(10): 1095-106.
- Diener HC, Allenberg JR, Bode C et al. Primär- und Sekundärprävention der zerebralen Ischämie. In: Diener HC (Hrsg) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 2005, Vol 3, Thieme, Stuttgart New York.
- Dodick DW, Meissner I, Meyer FB, Cloft HJ. Evaluation and management of asymptomatic carotid artery stenosis. *Mayo Clin Proc.* 2004, 79(7): 937-44.
- Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res.* 2006, 69(3): 625-35.
- Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res.* 1995, 77(5): 863-8.
- Duffy MJ, Lynn DJ, Lloyd AT, O'Shea CM. The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. *Thromb Haemost.* 2003, 89(4): 622-31.
- Eckstein HH. Surgical therapy of extracranial carotid stenosis. *Chirurg.* 2004; 75(1):93-110.
- Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension.* 2003, 41(3 Pt 2): 834-41.
- Emami N, Diamandis EP. New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family. *Mol Oncol.* 2007, 1(3): 269-87.
- European Registers of Stroke Investigators. Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke.* 2009, 40(5): 1557-63.
- Fay WP, Garg N, Sunkar M. Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007, 27(6): 1231-7.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009, 29(6): 789-91.
- Ferri N, Paoletti R, Corsini A. Biomarkers for atherosclerosis: pathophysiological role and pharmacological modulation. *Curr Opin Lipidol.* 2006, 17(5): 495-501.
- Fleiner M, Kummer M, Mirlacher M, Sauter G, Cathomas G, Krapf R, Biedermann BC. Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic atherosclerosis. *Circulation.* 2004, 110(18): 2843-50.

-
- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002, 90(3): 251-62.
- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of MMPs and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994, 94: 2493-503.
- Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, Schwartz RS. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005, 25(6): 1119-27.
- Gerwins P, Sköldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000, 34(3): 185-94.
- Girn HR, Orsi NM, Homer-Vanniasinkam S. An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease. *Vasc Med.* 2007, 12(4): 299-309.
- Goldstein LB. Statins for stroke prevention. *Curr Atheroscler Rep.* 2007, 9(4): 305-11.
- Grau AJ, Weimar C, Bugge F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener HC. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke.* 2001, 32(11): 2559-66.
- Hallenbeck JM, Hansson GK, Becker KJ. Immunology of ischemic vascular disease: plaque to attack. *Trends Immunol.* 2005, 26(10): 550-6.
- Halpert I, Sires UI, Roby JD, Potter-Perigo S, Wight TN, Shapiro SD, Welgus HG, Parks WC. Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *PNAS* 1996, 93(18): 9748-53.
- Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, Skjelland M, Gullestad L, Øie E, Aukrust P. Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque? *Prog Cardiovasc Dis.* 2008, 51(3): 183-94.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005, 352(16): 1685-95.

-
- Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res.* 2002, 91(4): 281-91.
- Harrison WN, Lancashire RJ, Marshall TP. Variation in recorded blood pressure terminal digit bias in general practice. *J Hum Hypertens.* 2008, 22(3): 163-7.
- Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML; CAPTURE Study Investigators. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2003, 348(12): 1104-11.
- Heider P, Pelisek J, Poppert H, Eckstein HH. Evaluation of Serum Matrix Metalloproteinases as Biomarkers for Detection of Neurological Symptoms in Carotid Artery Disease. *Vasc Endovascular Surg.* 2009 (im Druck).
- Heider P., Wolf O., Poppert H., Liebig T., Pelisek J., Hanke M., Schuster T., Eckstein H.H. Fibrinogen and hsCRP as serological predictors for perioperative cerebral microembolic lesions after carotid endarterectomy. *J Vasc Sur* 2007, 46(3): 449-54.
- Heil M, Schaper W. Cellular mechanisms of arteriogenesis. *EXS.* 2005, (94): 181-91.
- Heil M, Schaper W. Pathophysiology of collateral development. *Coron Artery Dis.* 2004, 15(7): 373-8.
- Heilmann C, Beyersdorf F, Lutter G. Collateral growth: cells arrive at the construction site. *Cardiovasc Surg.* 2002, 10(6): 570-8.
- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999, 79(4): 1283-316.
- Herren B. ADAM-mediated shedding and adhesion: a vascular perspective. *News Physiol Sci.* 2002, 17: 73-6.
- Hof D, von Eckardstein A. Risk factors in atherosclerotic coronary heart disease. *Ther Umsch.* 2009, 66(4): 253-9.
- Hoff HF, O'Neil JA. Oxidation of LDL: role in atherogenesis. *Klin Wochenschr.* 1991, 69(21-23): 1032-8.
- Holm PW, Slart RH, Zeebregts CJ, Hillebrands JL, Tio RA. Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF. *Ann Med.* 2009, 41(4): 257-64.
- Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 1999, 103(9): 1231-6.

-
- 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.
- Jeziorska M, Woolley DE. Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *J Pathol.* 1999, 188(2): 189-96.
- Kaperonis EA, Liapis CD, Kakasis JD, Dimitroulis D, Papavassiliou VG. Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006, 31(4): 386-93.
- Karaflou M, Lambrinouadaki I, Christodoulakos G. Apoptosis in atherosclerosis: a mini-review. *Mini Rev Med Chem.* 2008, 8(9): 912-8.
- Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2008, 73(7): 751-62.
- Kher N, Marsh JD. Pathobiology of atherosclerosis--a brief review. *Semin Thromb Hemost.* 2004, 30(6): 665-72.
- Koenig W, Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007, 27(1): 15-26.
- Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T, Bohle RM. Vasa vasorum and atherosclerosis - Quid novi? *Thromb Haemost.* 2007, 97(6): 873-9.
- Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol.* 2003, 91(4A): 4B-8B.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002, 420(6917): 868-74.
- Libby P, Aikawa M, Schönbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2000, 1529(1-3): 299-309.
- Lim HS, Lip GY, Blann AD. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in diabetes mellitus: relationship to VEGF, glycaemic control, endothelial damage/dysfunction and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2005, 80(1): 113-8.
- Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003, 169: 203-214.
- Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24(8): 1359-66.

-
- Lovren F, Pan Y, Quan A, Teoh H, Wang G, Shukla PC, Levitt KS, Oudit GY, Al-Omran M, Stewart DJ, Slutsky AS, Peterson MD, Backx PH, Penninger JM, Verma S. Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008, 295(4): H1377-84.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000, 407(6801): 233-41.
- Lutgens SP, Cleutjens KB, Daemen MJ, Heeneman S. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J*. 2007, 21(12): 3029-41.
- McEwen JE, Zimniak P, Mehta JL, Shmookler Reis RJ. Molecular pathology of aging and its implications for senescent coronary atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol*. 2005, 20(5): 399-406.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997, 277(5322): 55-60.
- Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Leseche G, Chvatchko Y, Tedgui A. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation*. 2001, 104(14): 1598-603.
- Mohammed N, Anand SS. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomized controlled trial. MRC asymptomatic carotid surgery trial (ACST) collaborative group. *Lancet* 2004; 363: 1491-502. *Vasc Med*. 2005, 10(1): 77-8.
- Montecucco F, Mach F. Update on statin-mediated anti-inflammatory activities in atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2009, 31(1): 127-42.
- Moulton KS. Angiogenesis in atherosclerosis: gathering evidence beyond speculation. *Curr Opin Lipidol*. 2006, 17(5): 548-55.
- Naylor AR, Gaines PA, Rothwell PM. Who benefits most from intervention for asymptomatic carotid stenosis: patients or professionals? *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009, 37(6): 625-32.

-
- Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008, 28(12): 2108-14.
- Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res.* 2006, 69(3): 614-24.
- Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* 2005, 85(1): 1-31.
- O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1994, 145: 883-894.
- Olsen TS, Langhorne P, Diener HC, Hennerici M, Ferro J, Sivenius J, Wahlgren NG, Bath P. European Stroke Initiative Executive Committee; EUSI Writing Committee, European Stroke Initiative Recommendations for Stroke Management-update 2003. *Cerebrovasc Dis.* 2003, 16(4): 311-37.
- Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989, 86(4): 1372-1376.
- Pelisek J, Shimizu M, Nikol S. Differential Developmental Origin of Arteries: Impact on Angiogenesis and Arteriogenesis. *Med Chem Rev.* 2004, 1(3): 317-326.
- Pelisek J, Rudelius M, Zepper P, Poppert H, Reeps C, Schuster T, Eckstein HH. Multiple Biological Predictors for Vulnerable Carotid Lesions. *Cerebrovasc Dis.* 2009 16, 28(6): 601-610.
- Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* 2005, 386: 15-27.
- Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006, (176 Pt 1): 1-40.
- Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004, 15(4): 237-54.

-
- Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, Fishbein MC, Kaul S, Cercek B, Sharifi B, Shah PK. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation*. 1999, 99(24): 3103-9.
- Rattazzi R, Puato M, Faggini E, Bertipaglia B, Zambon A, Pauletto P. C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *J Hypertens*. 2003, 21: 1787-1803.
- Rekhter MD. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res*. 1999, 41(2): 376-84.
- Rerkasem K, Rothwell PM. Temporal trends in the risks of stroke and death due to endarterectomy for symptomatic carotid stenosis: an updated systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009, 37(5): 504-11.
- Ribatti D, Levi-Schaffer F, Kovanen PT. Inflammatory angiogenesis in atherogenesis--a double-edged sword. *Ann Med*. 2008, 40(8): 606-21.
- Rijbroek A, Wisselink W, Vriens EM, Barkhof F, Lammertsma AA, Rauwerda JA. Asymptomatic carotid artery stenosis: past, present and future. How to improve patient selection? *Eur Neurol*. 2006, 56(3): 139-54.
- Ringleb PA, Hacke W. Carotid artery stenosis *Chirurg*. 2007, 78(7): 593-4, 596-9.
- Ritman EJ, Lerman A. The dynamic of vasa vasorum. *Cardiovasc Res* 2007, 75: 649-658.
- Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000, 223(1): 22-38.
- Roquer J, Segura T, Serena J, Castillo J. Endothelial dysfunction, vascular disease and stroke: the ARTICO study. *Cerebrovasc Dis*. 2009, 27 Suppl 1: 25-37.
- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999, 340(2): 115-26.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993, 362: 801-809.
- Rothwell PM, Gibson R, Warlow CP. Interrelation between plaque surface morphology and degree of stenosis on carotid angiograms and the risk of ischemic stroke in patients with

- symptomatic carotid stenosis. On behalf of the European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Stroke* 2000, 31: 615-621.
- Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett.* 2006, 580(12): 2879-87.
- Roy R, Zhang B, Moses MA. Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. *Exp Cell Res.* 2006, 312(5): 608-22.
- Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005, 9(2): 267-85.
- Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones.* 2007, 39(2): 86-93.
- Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 und -8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis.* 1996, 127: 263-271.
- Sander D, Wolf O, Sander K, Poppert H, Heider P, Berger H, Eckstein HH. New developments in diagnostic and therapy of asymptomatic carotid stenosis. *Dtsch Med Wochenschr.* 2007, 132(44): 2336-41.
- Safar ME, Blacher J, Mourad JJ, London GM. Stiffness of carotid artery wall material and blood pressure in humans: application to antihypertensive therapy and stroke prevention. *Stroke.* 2000, 31(3): 782-90.
- Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterios Thromb Vasc Biol.* 2003, 23: 1143-51.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep.* 2008, 41(4): 278-86.
- Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2006, 39(5): 469-78.
- Sluimer JC, Daemen MJ. Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *J Pathol.* 2009, 218(1): 7-29.
- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009, 78(6): 539-52.
- Sтары H. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions. An Update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000, 20: 1177-1178.

-
- 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. *Circulation*. 1995, 92(5): 1355-74.
- 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(5): 2462-78.
- Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, et al. 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(1): 391-405.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989, 320: 915–924.
- Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1998, 102(3): 576-83.
- Sturgeon CM, Lai LC, Duffy MJ. Serum tumour markers: how to order and interpret them. *BMJ*. 2009, 339: b3527.
- Sukhova GK, Shi GP. Do cathepsins play a role in abdominal aortic aneurysm pathogenesis? *Ann NY Acad Sci*. 2006; 1085:161-9.
- The European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998, 351(9113): 1379–1387.
- The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid

- stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 1991, 325: 445–453.
- Thorvaldsen P, Asplund K, Kuulasmaa K, Rajakangas AM, Schroll M. Stroke incidence, case fatality, and mortality in the WHO MONICA project. *World Health Organization Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease. Stroke*. 1995, 26(3): 361-7.
- Thraill KM, Moreau CS, Cockrell G, Simpson P, Goel R, North P, Fowlkes JL, Bunn RC. Physiological matrix metalloproteinase concentrations in serum during childhood and adolescence, using Luminex Multiplex technology. *Clin Chem Lab Med*. 2005, 43(12): 1392-9.
- Tortorella MD, Malfait F, Barve RA, Shieh HS, Malfait AM. A Review of the ADAMTS Family, *Pharmaceutical Targets of the Future. Curr Pharm* 2009, 15(20): 2359-74.
- Tousseyn T, Jorissen E, Reiss K, Hartmann D. (Make) stick and cut loose-disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006, 78(1): 24-46.
- Trenkler J. Der akute ischämische Schlaganfall. *Radiologe* 2008, 48: 457–473.
- Virmani R, Ladich ER, Burke AP, Kolodgie FD. Histopathology of carotid atherosclerotic disease. *Neurosurgery*. 2006, 59(5 Suppl 3): S219-27.
- Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis*. 2002 Mar-Apr, 44(5): 349-56.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005, 25(10): 2054-2061.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000, 20(5): 1262-75.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003, 92(8): 827-39.

-
- Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, Jacques PF, Rifai N, Selhub J, Robins SJ, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasan RS. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med.* 2006 21, 355(25): 2631-9.
- Wight TN. The ADAMTS proteases, extracellular matrix, and vascular disease: waking the sleeping giant(s)! *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005, 25(1): 12-4.
- Wolfe CD, Giroud M, Kolominsky-Rabas P, Dundas R, Lemesle M, Heuschmann P, Rudd A. Variations in stroke incidence and survival in 3 areas of Europe. European Registries of Stroke (EROS) Collaboration. *Stroke.* 2000, 31(9): 2074-9.
- Wu JT, Wu LL. Linking inflammation and atherogenesis: Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. *Clin Chim Acta.* 2006, 366(1-2): 74-80.
- Yamagishi S, Imaizumi T. Pericyte biology and diseases. *Int J Tissue React.* 2005, 27(3): 125-135.
- Yousef GM, Diamandis EP. Expanded human tissue kallikrein family--a novel panel of cancer biomarkers. *Tumour Biol.* 2002, 23(3): 185-92.
- Zhou Z, Rahme E, Pilote L. Are statins created equal? Evidence from randomized trials of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin for cardiovascular disease prevention. *Am Heart J.* 2006, 151(2): 273-81.
- Zavasnik-Bergant T. Cystatin protease inhibitors and immune functions. *Front Biosci.* 2008, 13: 4625-37.

8. Danksagung

Diese Arbeit wurde im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München in der Klinik für Gefäßchirurgie und unter Betreuung von Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jaroslav Pelisek und Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Henning Eckstein angefertigt.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Eckstein und Herrn Priv.-Doz. Dr. Pelisek für die Überlassung des interessanten Themas und auch für deren Bereitschaft bedanken, mir für meine Arbeit jegliche Hilfestellung zukommen zu lassen. Somit konnte ich die Möglichkeiten und Grenzen der wissenschaftlichen und experimentellen Arbeit erfahren.