

**Aus der Neurologischen Klinik der  
Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.J. Freund**

**Vergleichende immunhistochemische Untersuchung zur T-Zell- und  
Makrophageninfiltration symptomatischer und asymptomatischer  
Stenosen der Arteria carotis interna.**

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
vorgelegt von  
René Schumann  
2001**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

Gez. Prof. Dr. Häusinger  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Stoll

Koreferent: PD Dr. Müller

# INHALTSVERZEICHNIS

## A. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

### 1. EINLEITUNG

- 1.1 Extrakranielle Gefäßprozesse als Ursache ischämischer Hirninfarkte
- 1.2 Entzündung und Arteriosklerose
- 1.3 Fragestellung der Arbeit

### 2. MATERIAL UND METHODEN

- 2.1 Operationsmaterial und dazugehörige klinische Angaben
- 2.2 Histologie und Immunzytochemie
  - 2.2.1 Beschichtung der Objektträger (Coating)
  - 2.2.2 Anfertigen der Paraffinschnitte
  - 2.2.3 Lösungen und Puffer für die Immunfärbung
  - 2.2.4 Untersuchte Antigene und verwendete monoklonale Antikörper
  - 2.2.5 Durchführung der Immunfärbung am Schnitt
- 2.3 Quantifizierungstechniken
  - 2.3.1 Einzelauszählung von T-Zellinfiltraten
  - 2.3.2 Computergestützte Planimetrie der Makrophagenantwort
- 2.4 Statistische Auswertung

### **3 ERGEBNISSE**

3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

3.2 Qualitative Beschreibung der Verteilung von Makrophagen, T-Zellen und der HLA-DR-Expression in symptomatischen und asymptomatischen Plaques der Arteria carotis

3.3 Quantitative Auswertung der Plaqueinfiltration: Vergleich zwischen symptomatischen und asymptomatischen Carotisplaques

3.4 Analyse des Zusammenhangs zwischen Mikroembolisation und Plaqueinfiltration

3.5 Plaqueinfiltration und pathoanatomische Merkmale der Carotisplaques

3.6 Verteilung der Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 in Carotisplaques

### **4 DISKUSSION**

4.1. Der Bezug zwischen T-Zell- und Makrophageninfiltration in der Carotiswand und klinischen und histopathologischen Indikatoren der Plaquestabilisierung

4.2 Die Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 als „Vehikel“ der Leukozyteninfiltration in die Gefäßwand

4.3 T-Zell- und Makrophagenmediatoren mit potentiell pathophysiologischer Bedeutung bei der Plaquestabilisierung: Matrixmetalloproteinasen und Tissue-Faktor

4.4 Klinischer Ausblick

### **5 ZUSAMMENFASSUNG**

### **6 LITERATURVERZEICHNIS**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACI	Arteria carotis interna
ICAM-1	“Intercellular adhesion molecule-1”
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LDL	"Low density lipoprotein"
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex, "Major histocompatibility complex"
MMP	Matrix-Metalloproteinase
modLDL	Modifiziertes LDL
oxLDL	Oxidiertes LDL
TCD	Transkranielle Dopplersonographie
TF	"Tissue factor"
TFPI	"Tissue factor pathway inhibitor"
TIA	Transitorisch ischämische Attacke
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VCAM	"Vascular cell adhesion molecule"
VLA	"Very late activation antigen"

# **1. EINLEITUNG**

## **1.1 Extrakranielle Gefäßprozesse als Ursache ischämischer Hirninfarkte**

Die Inzidenz von Schlaganfällen mit bleibenden Defiziten beträgt in Europa 150-300 pro 100000 Personen. Der Schlaganfall steht an dritter Stelle der Mortalitätsstatistik nach Herzerkrankungen und Krebsleiden. Schlaganfälle sind in der überwiegenden Zahl (80-90%) auf zerebrale Ischämien zurückzuführen und zu einem geringeren Teil auf Hirnblutungen.

Häufige Ursache ischämischer Hirninfarkte sind Thromboembolien aus extrakraniellen Gefäßprozessen insbesondere Stenosen der Arteria carotis interna (ACI). Die Prävalenz der Arteria carotis interna-Stenose beträgt in der älteren Bevölkerungsschicht industrialisierter Nationen ca. 25% (Jungquist et al., 1989). Nur ein geringer Teil cerebraler Ischämien ist auf eine unzureichende Hämodynamik mit poststenotischen Flußminderungen zurückzuführen, in der überwiegenden Zahl handelt es sich ursächlich um arterio-arterielle Thromboembolien, die an der arteriosklerotisch veränderten Wand extrakranieller Stenosen der Arteria carotis interna entstehen (Babikian et al., 1997; Golledge et al., 2000). Selbst hochgradige Arteria carotis interna - Stenosen haben ein höchst variables jährliches Hirninfarkttrisiko. Bei klinisch zuvor unauffälligen Patienten – sogenannte asymptomatische Patienten - beträgt das jährliche Schlaganfallrisiko etwa 1-2% (Hennerici et al., 1987; ECST, 1995), ist es dagegen innerhalb der letzten 4 Monate (120 Tage) zur einer retinalen Durchblutungsstörung in Form einer Amaurosis fugax-Attacke bzw. zu hemisphärischen transitorisch ischämischen Attacken (TIAs) gekommen, so steigt das Schlaganfallrisiko auf 13% für etwa 6 Monate (NASCET, 1991; ECST, 1998).

Werden diese 6 Monate bei konservativem Vorgehen schadlos überstanden – üblicherweise besteht in dieser Situation allerdings eine absolute Operationsindikation – so sinkt das Schlaganfallrisiko wieder auf das Niveau von asymptomatischen Gefäßprozessen, ohne dass sich der Stenosegrad verändert hat. Diese epidemiologischen Studien zeigen, dass nicht der Stenosegrad allein, sondern bisher unbekannte weitere Faktoren für die Destabilisierung von Stenosen der ACI verantwortlich sein müssen. Die Identifikation derartiger plaquedestabilisierender Faktoren ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Patienten mit hochgradigen (>70%) ACI-Stenosen, die innerhalb der letzten 4 Monate in Form von retinalen oder hemisphärischen TIAs symptomatisch waren, profitieren von der Thrombendarterektomie (NASCET, 1991; Mayberg et al, 1991; ECST, 1998; Barnett et al., 1998). Der über viele Jahre anhaltende klinische Nutzen der Thrombendarterektomie ist durch zahlreiche Studien belegt, ist aber kritisch von einer niedrigen perioperativen Komplikationsrate abhängig. Als Obergrenze werden 7-8% angegeben (Barnett und Meldrum, 2000). Die Operation gilt bei über 70% symptomatischen ACI-Stenosen international als Goldstandard der Therapie. Bei niedriggradigeren symptomatischen und den asymptomatischen, auch höhergradigen ACI-Stenosen ist das Risiko/Nutzenverhältnis wesentlich ungünstiger (Hobson et al., 1993; ECAS, 1995; Barnett et al., 1998) und das Vorgehen international umstritten (Barnett und Meldrum, 2000). Eine Operation kommt nur bei einer Komplikationsrate von unter 5% in Betracht. Entsprechend sehr guter postoperativer Ergebnisse mit im internationalen Vergleich niedrigen Komplikationsraten werden in der Düsseldorfer Abteilung für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Sandmann) regelmäßig auch Thrombendarterektomien bei Patienten mit asymptomatischen höhergradigen ACI-Stenosen vorgenommen. Damit steht roun-

tinemäßig gewonnenes und für wissenschaftliche Untersuchungen verwendbares Plaquematerial von Patienten sowohl mit symptomatischen als auch mit asymptomatischen Carotisstenosen zur Verfügung, das die Bearbeitung der wissenschaftlichen Fragestellung der vorliegenden Arbeit nach Mechanismen der Plaquedestabilisierung erst ermöglicht.

Neben klinisch faßbaren TIAs erlaubt die Mikroemboliedetektion mittels transkranieller Dopplersonographie (TCD), die in der hiesigen Abteilung durch Prof. Siebler international mitentwickelt wurde, eine Abschätzung des Infarkttrisikos von Carotisplaques. Dabei werden im Langzeitmonitoring durch spezielle Analyse der Frequenzspektren sogenannte Mikroembolien erfaßt, die wahrscheinlich zirkulierenden Thromben entsprechen (Spencer et al, 1990; Siebler et al, 1992). Durch die simultane Ableitung über beiden Arteriae cerebri mediae können mit hoher Treffsicherheit kardiale von umschriebenen lokalen, auf symptomatische ACI-Stenosen zurückzuführende Emboliequellen unterschieden werden. Letztere führen zu vermehrten Mikroembolieraten ausschließlich im nachgeschalteten Stromgebiet, d.h. nur einer A. cerebri media. Mikroemboliesignale treten bei symptomatischen Karotisstenosen weit häufiger auf als bei asymptomatischen (Babikian et al., 1997; Siebler et al., 1994). Mit zunehmender Symptomenlatenz nimmt die Mikroembolierate parallel zum Schlaganfallrisiko wieder ab (Siebler et al., 1993; Forteza et al., 1996). Der besondere prädiktive Charakter der Mikroemboliedetektion wird durch folgende Befunde weiter untermauert: Nach erfolgreicher Thrombendarterektomie bei zuvor symptomatischen Stenosen fällt die Mikroembolierate deutlich ab (Siebler et al., 1993; Van Zuilen et al., 1995). Bleibt die Mikroembolierate postoperativ wider Erwarten hoch, ist damit ein persistierendes deutlich erhöhtes Schlaganfallrisiko verbunden (Levi et al., 1997). Mit dem TCD nachgewiesene Mikroembolien sind somit

ein neuartiger Surrogatmarker drohender thrombembolischer Ereignisse und damit ein wichtiger Indikator der Instabilität von Karotisstenosen.

## **1.2 Entzündung und Arteriosklerose**

Die ersten pathophysiologischen Überlegungen zur Entstehung der Arteriosklerose sind eng mit dem Wirken Rudolph Virchows verbunden. Er hatte die Hypothese formuliert, daß arteriosklerotische Läsionen ihren Ursprung in Verletzungen der Arterienwand hätten (Virchow, 1856). Zur selben Zeit postulierte C. von Rokitansky, daß der Grund für die Intimaverdickung arteriosklerotischer Arterien in einer Ablagerung von Fibrin und anderen Blutbestandteilen in Verbindung mit einem Gefäßwandschaden liege (Von Rokitanski, 1852). Beide Forscher gingen davon aus, daß Lipidansammlungen als primäre oder sekundäre Faktoren zusätzlich zum Verletzungsmechanismus eine bedeutende Rolle spielen. Duguid betrachtete die beobachtete Intimaverdickung bei der Arteriosklerose als Folge einer Anhäufung von Fibrin und Thrombozyten (Duguid, 1946). In den letzten 20 Jahren hat sich das Arteriosklerosekonzept noch einmal grundlegend gewandelt. Es gibt zwischenzeitlich mehr und mehr Anhaltspunkte dafür, daß entzündliche Prozesse eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Arteriosklerose spielen (Ross, 1993 a,b).

In der Wand arteriosklerotisch veränderter Gefäße lassen sich massive Ansammlungen von T-Zellen und Makrophagen, zum Teil auch Mastzellen überwiegend in den lipidreichen Regionen nachweisen (Gown et al, 1986; Jonasson et al, 1986; Van der Wal, 1989; Stemme et al., 1992; Kaartinen et al, 1996). Makrophagen scheinen insbesondere atheromatöse Beete und Lipidkerne

zu besiedeln, wohingegen T-Zellen und glatte Muskelzellen häufig in den fibrösen Regionen arteriosklerotischer Plaques zu finden sind. Die Infiltratzellen exprimieren u.a. Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II-Antigene als Zeichen ihrer Aktivierung (Van der Wal et al., 1989; 1994a). Als Hinweis für eine mögliche autoimmune Komponente als Trigger der Entzündungsreaktion in der Gefäßwand konnten Stämme und Mitarbeiter T-Zellen aus arteriosklerotischen Plaques isolieren, die in vitro spezifisch oxydiertes LDL als Antigen erkannten (Stemme et al., 1995). Die pathogene Rolle dieser Entzündungsreaktion für die Arterioskleroseentwicklung wird weiter durch zahlreiche Befunde an transgenen Tieren untermauert (Lichtman et al., 1996). So entwickeln Apolipoprotein E defiziente Mäuse nicht nur eine beschleunigte Arteriosklerose, sondern weisen in den Gefäßwänden eine massiv erhöhte T-Zell- und Makrophageninfiltration auf (Zhou et al., 1996).

Entzündungsreaktionen leisten nicht nur einen Beitrag zur allgemeinen Arterioskleroseentwicklung sondern wahrscheinlich auch zur klinisch noch bedeutsameren Destabilisierung von arteriosklerotischen Gefäßprozessen. So konnte bei der koronaren Herzkrankheit bereits ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Entzündungsreaktion in den Coronararterien und dem Auftreten einer instabilen Angina pectoris belegt werden (Fuster et al, 1992; Buja & Willerson, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb am Carotissystem der Frage nachgegangen, ob Entzündungsreaktionen in den Plaques möglicherweise an der Konversion einer stabilen, asymptomatischen in eine instabile, symptomatische Carotisstenose mit massiv erhöhtem Schlaganfallrisiko beteiligt sind.

Entzündungszellen müssen auf ihrem Weg aus dem Blutstrom ins Gewebe die Gefäßwände

durchwandern. Dieser Prozess wird durch verschiedene Signalmoleküle aus der Integrinfamilie vermittelt (Springer, 1990). Monozyten und Granulozyten tragen an ihrer Oberfläche konstitutiv CD11a/CD18 (auch als LFA-1 bezeichnet) und CD11b/CD18-Komplexe (auch als MAC-1 bezeichnet), die an die interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) binden. Lymphozyten binden u.a. über den „very late antigen“ (VLA)-4-Komplex an das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (VCAM-1). Über die Liganden/Rezeptorinteraktionen wird nicht nur die Leukozytenmigration gesteuert, diese Interaktionen spielen auch bei der Antigenerkennung als kostimulatorische Signalmoleküle bei Immunprozessen eine wichtige Rolle. Sowohl ICAM-1 als auch VCAM-1 wird normalerweise nur in geringem Ausmaß von „ruhenden“ Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen exprimiert. Proinflammatorische Zytokine, wie sie bei Entzündungsprozessen freigesetzt werden, führen allerdings zu einer dramatischen Induktion von ICAM-1 und VCAM-1. Die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen ist ein wichtiger Schritt in der lokalen Steuerung von Entzündungsprozessen, indem sie den Ort der Infiltration bestimmt. Wir haben deshalb in Ergänzung o.g. Untersuchungen zur T-Zell- und Makrophageninfiltration auch nach einem Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktion und VCAM-1/ICAM-1-Expression in den Carotisplaques gesucht.

### 1.3 Fragestellung

Aus der obigen Darstellung ergibt sich unmittelbar die Frage, welche Prozesse an der Konversion einer asymptomatischen Carotisstenose mit niedrigem Schlaganfallrisiko in eine gefährliche symptomatische Stenose beteiligt sind. Basierend auf Befunden bei der koronaren Herzkrankheit, bei der Entzündungsreaktionen entscheidend an der Dekompensation der Angina pectoris beteiligt sind, haben wir uns gefragt, inwieweit Entzündungsprozesse in Gefäßwand mit der Destabilisierung von Carotisstenosen assoziiert sind. Unter Verwendung von klinisch und Zusatzdiagnostisch (Mikroemboliedetektion) gut charakterisiertem Archivmaterial von 37 thrombendarerektomierten Patienten mit hochgradigen Stenosen der Arteria carotis interna (Sitzer et al., 1995), die entweder zuvor symptomatisch oder asymptomatisch waren, wurde die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen, sowie die Expression von Aktivitätsmarkern wie der MHC-Klasse II-Expression und von Zelladhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1) zunächst immunzytochemisch in den Carotisplaques qualitativ untersucht. In einem zweiten Schritt wurde die T-Zell- und Makrophageninfiltration quantifiziert und mit klinischen und Zusatzdiagnostischen Parametern der Plaquestabilisierung (Mikroemboliedetektion) in Beziehung gesetzt.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Operationsmaterial und dazugehörige klinische Angaben**

Ausgangsmaterial waren in Paraffin eingebettete Thrombendarterektomie-Präparate (Archivmaterial) von Patienten, die aufgrund einer neurologischen bzw. chirurgischen Indikationsstellung wegen einer höhergradigen ( $> 70\%$ ) Stenose der Arteria carotis interna operiert wurden. Insgesamt standen Präparate von 37 Patienten (13 Frauen, 24 Männer) mit höhergradiger Stenose ( $\geq 70\%$ ) der Arteria carotis interna zur Verfügung. Unter Zugrundelegung der NASCET-Kriterien (1991) waren von diesen 21 Patienten zuvor im Sinne von retinalen bzw. hemisphärischen TIAs innerhalb der letzten 120 Tage symptomatisch und 16 asymptomatisch. Zusätzlich standen Daten zur Pathoanatomie der Plaques und die präoperativ ermittelten Mikroembolieraten, die im Rahmen einer vorausgegangenen Untersuchung erhoben worden waren (Sitzer et al., 1995), zum Vergleich mit der in der vorliegenden Studie untersuchten Inflammation im Plaque verfügbar. Der Grad der Stenose wurde durch intraarterielle cerebrale Angiographie entsprechend den NASCET-Kriterien festgelegt (1991). Das Alter der 24 männlichen und 13 weiblichen Patienten lag zwischen 41 und 75, der Mittelwert bei 60 Jahren. Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulantien waren mindestens fünf Tage vor Operation abgesetzt worden. 39 Karotisstenosen waren bereits in einer pathoanatomischen Studie histologisch untersucht worden (Sitzer et al., 1995). Bei 7 der ursprünglich 39 Patienten waren die Präparate aufgrund unzureichender Qualität zur immunhistochemischen Untersuchung ungeeignet. Aus diesem Grund wurden dieser Untersuchung 5 neue Patienten hinzugefügt. Die präoperative Abklärung und die Operationen erfolgten nach Einwilligung der Patienten, die Indikationsstellung zur Operation

erfolgte ausschließlich aus medizinischer Indikation.

Die routinemäßige Entnahme im Rahmen der Operation erfolgte in der Klinik für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation der Heinrich-Heine-Universität (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Sandmann), die Zuschneidung, Fixierung und Paraffineinbettung der Thrombendarterektomiepräparate im Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität (Direktor: Univ.- Prof. Dr. Gabbert in enger Kooperation mit Priv.-Doz. Dr. Müller). Nach longitudinaler Arteriotomie wurden die arteriosklerotischen Plaques en bloc exzidiert (Routinendarterektomie). Die frischen Proben wurden kurz mit Kochsalz gespült, um oberflächlich lokalisiertes Blut zu entfernen. Dem folgte eine sofortige Fixierung in 4% Paraformaldehyd und eine längere Dekalzifizierung. Jedes Thrombendarterektomiepräparat wurde dann in 2mm breite Gewebeblöcke geschnitten und in Paraffin eingebettet. Bei der Quantifizierung der Inflammation wurden alle 2mm Segmente einzeln analysiert und dann pro Patient gemittelt, um ein repräsentatives Ergebnis über den Gesamtplaque zu erhalten. Die Untersuchungen beschränkten sich ausdrücklich nicht auf eine Einzelregion, wie z.B. die Schulter des Plaques. Die Gesamtzahl der verfügbaren Gewebeblöcke betrug 412, pro Patient wurden im Mittel  $11,14 \pm 2,96$  Segmente des Plaques untersucht. Neben einer routinemäßigen pathoanatomischen Untersuchung wurden die Plaques in einer vorrausgehenden Studie hinsichtlich der Kriterien Plaqueulzeration, Thrombosen und Plaqueaufbau (hauptsächlich atheromatös/ fibrös) analysiert (Sitzer et al., 1995). Im Rahmen der Operationsvorbereitung war eine Messung der Mikroembolierate mit Hilfe der transkraniellen Dopplersonographie (Neurologische Klinik der Heinrich-Heine-Universität, TCD-Labor, Dr. M. Sitzer, Prof. M. Siebler) durchgeführt worden. Diese erfolgte an der ipsilateralen Arteria cerebri media über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde und ermöglichte die Aufzeichnung der Embo-

lie-Frequenzen (Emboliezahl/ Stunde auf der Seite der betroffenen Karotisstenose), wie andernorts detailliert beschrieben (Siebler et al, 1993; 1994; 1995). Die TCD-Analog-Output-Signale wurden digital (Samplingfrequenz: 20 kHz) gespeichert. Dabei wurde die "Energie" (E) für ein Mikroemboliesignal (MES) folgendermaßen berechnet:  $E = 20 \times \log (\text{Emboliesignalleistung} / \text{Hintergrundsignalleistung})$  [db]. Die Emboliesignalleistung war der Mittelwert von 4 Fast-Fourier-Transformationlinien (FFT; 128 Punkte, 75% Überlappung), die das Mikroemboliesignal enthalten. Die Hintergrundsignalleistung war der Mittelwert von 2 Sekunden Doppler-Shift-Signal-FFT-Linien ohne MES. Abnormale Dopplersignale wurden nach anerkannten Kriterien als MES identifiziert (Consensus Committee of the Ninth International Cerebral Hemodynamic Symposium, 1995). Der Mittelwert der Energieverteilung aller MES lag bei  $2,93 \pm 1,29$  db. Die Interobserverübereinstimmung innerhalb des Labors und zwischen auswärtigen Zentren war sehr gut (Siebler et al, 1993; Markus et al, 1997). Das Patientenmonitoring wurde 1 bis 21 Tage vor der Thrombendarterektomie durchgeführt (Median 4,5 Tage).

## 2.2 Histologie und Immunzytochemie

### 2.2.1 Beschichtung der Objektträger (Coating)

Damit die Schnitte während der Färbung nicht abschwimmen, wurden die Objektträger mit Gelatine beschichtet.

Reagenzien:	Gelatinepulver	
	(Merck, D-64271 Darmstadt)	0,5g
	$KCr(SO_4)_2 \cdot xH_2O$ ,	
	Chrom Alum (Merck)	0,05g
	Aqua dest.	100 ml
	Ethanol (absolut)	

Durchführung: Die Gelatine wurde bei 60°C in Aqua dest. gelöst und anschließend mit Chrom Alum vermischt. Danach wurden die in Alkohol gesäuberten und dann getrockneten Objektträger kurz in die Lösung eingetaucht und über Nacht in einem Wärmeschrank bei 50°C getrocknet.

### 2.2.2 Anfertigen der Paraffinschnitte

Pro Paraffinblock wurden 20-40 Serienschnitte (10µm Dicke) mit einem Mikrotom (Reichert-Jung, Typ 1140/ Autocult) angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend in ein auf 55°C erhitztes Streckbad (Färbeschale mit Aqua dest. und 1-2 Tropfen Elmer's Glue All) gelegt. Nach Plat-

zierung der Schnitte auf beschichteten Objektträgern und Erwärmung auf einem Heizkörper, wurden sie anschließend über Nacht bei 50-55°C getrocknet und bei Zimmertemperatur bis zur Färbung gelagert.

### 2.2.3 Lösungen und Puffer für die Immunfärbung

Folgende Lösungen und Puffer wurden verwendet:

Phosphatpuffer (PBS = phosphate buffered saline):

Stamm-Lösung A: 35,61g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  auf 1L Aqua dest.

Stamm-Lösung B: 27,60g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  auf 1L Aqua dest.

PBS 0,01M: 40 ml Lösung A, 10 ml Lösung B, 9g NaCl auf 1L Aqua dest.;  
ph auf 7,3-7,4 eingestellt

Trispuffer:

Tris-Stammlösung: 60,8g Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Base) auf 1L Aqua dest. (0,5M)

Tris (0,05M): 100 ml Tris-Stammlösung, 35ml 1 N HCl  
auf 1L Aqua dest. (Einstellung auf PH 7,6 mit HCL)

DAB-Stammlösung: (4mg/ml)  
20mg DAB (Diaminobenzidin) in 5ml Tris-Puffer (0,05M)  
aliquotiert zu je 250 $\mu$ l (Aufbewahrung bei -20°C im Gefrierschrank)

## 2.2.4 Untersuchte Antigene und verwendete Antikörper

Zur Blockierung einer unspezifischen Bindung wurde normales Ziegen- (NGS = normal goat serum)- bzw. in Abhängigkeit des Primärantikörpers normales Pferdeserum (NHS – normal horse serum) verwendet. (Bezugsquelle: VEKTOR Laboratories Inc., Ingold Road, Burlingame, CA 94010 USA)

Folgende primären Antikörper wurden verwendet:

Name	Antigen	Quelle	Herkunft
ACTIN 1A4	alpha-Aktin humaner glatter Muskelzellen	monoklonaler AK aus Maus	DAKO Corp., 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013 USA
KP1 CD68	humane Makrophagen, CD68	monoklonaler AK aus Maus	DAKO
HLA-DR	humanes HLA-DR, CR3/43	monoklonaler AK aus Maus	DAKO
CD3	humane T-Zellen	polyklonal aus Kaninchen	DAKO
VCAM –1(BBA 19)	vascular cell adhesion molecule	polyklonaler AK aus Ziege	R+D Systems
ICAM-1 (BBA 17)	intercellular adhesion molecule	polyklonaler AK aus Ziege	R+D Systems

Folgende biotinylierten Sekundärantikörper der Firma VEKTOR wurden verwendet:

anti-Maus IgG, anti-Kaninchen IgG und anti-Ziegen IgG

Der Inkubation mit den Sekundärantikörpern folgte dann der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex in Form des VECTASTAIN-ABC-Elite-Kits der Firma VEKTOR

Als Substrat für das Enzym Peroxidase wurde Diaminobenzidine (DAB) (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO 63178 USA) verwendet, das auf dem Schnitt zu einem braunen Reaktionsprodukt führt.

### **2.2.5 Durchführung der Immunfärbungen am Schnitt**

#### **Entparaffinierung:**

Zunächst wurden die Schnitte mit 2x5' Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%,90%, 70%, 50%) je 2' inkubiert und schließlich nach Spülen in Aqua dest. in 0.01M PBS überführt.

#### **Mikrowellenbehandlung:**

Zur Demaskierung der Antigene wurde für die Immunfärbungen bei den Antigenen KP1, HLA-DR, CD3, und VCAM zuvor eine Mikrowellenbehandlung der Schnitte durchgeführt, die ACTIN jedoch nicht notwendig war. Dazu wurden die entparaffinierten Schnitte in mit Na-Citrat gefüllte Plastikküvetten gestellt. Danach wurden die Küvetten, welche wiederum in einer Färbeschale bis zur Hälfte in Aqua dest. standen, über 10 Min in der Mikrowelle erhitzt. Wichtig war hierbei den Na-Citrat-Puffer mindestens 6 Min lang sieden zu lassen. Die erhitzte Küvette wurde nun ca. 15 Min lang zur Abkühlung stehengelassen.

### **Blockade unspezifischer Bindungsstellen durch Normalseren:**

Nach 5-minütigem Waschen der Schnitte in PBS (0.01M, pH 7,3-7,4) wurden zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 100µl des 3%-igen Blockierungserums in PBS verdünnt auf jeden einzelnen Schnitt pipettiert und über 30 Min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen. Je nach Sekundärantikörper stammte das Blockierungsserum entweder aus der Ziege (NGS) oder dem Pferd (NHS). Die folgenden Inkubationen fanden, wenn nicht anders erwähnt, unter den gleichen hier beschriebenen Bedingungen statt. NGS wurde bei den Aktin-, HLA-DR- und CD3-Färbungen, NHS bei den VCAM und ICAM-Färbungen verwendet.

### **Inkubation mit dem Primärantikörper:**

Das Blockierungsserum wurde durch Abklopfen des Objektträgers vom Schnitt entfernt und anschließend 100µl des in PBS verdünnten Primärantikörpers hinzugefügt. Die Inkubation fand über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer statt. Dabei wurden folgende Verdünnungen nach initialer Austestung routinemäßig verwendet:

Antikörper gegen:	<b>ACTIN</b>	<b>KP1</b>	<b>HLA-DR</b>	<b>CD3</b>	<b>VCAM</b>	<b>ICAM</b>
Verdünnung:	1:100	1:50	1:100	1:100	1:2000	1:2000

### **Sekundärantikörper und ABC-Elite-Komplex:**

Der biotinylierte 2. Antikörper (1:200 verdünnt in 0.01M PBS) wurde nach 5-minütiger Wäsche der Objektträger in 0.01M PBS aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 30 Min. Mit dem 2.

Antikörper zusammen wurde der VECTASTAIN-ABC-Elite-Komplex (1:100 verdünnt) bestehend aus 10µl Reagenz A (Avidin DH) und 10µl Reagenz B (biotinyliertes Enzym) auf 1ml 0.01 M PBS, angesetzt, gut gemischt und schließlich mindestens 30 Min lang stehengelassen. Danach wurden die Schnitte wieder 5 Min in 0.01M PBS gewaschen, anschließend mit dem ABC-Elite-Komplex versehen und über 30 Min inkubiert.

### **Peroxidasereaktion:**

Die Bindung des Primärantikörpers an das korrespondierende Antigen wurde über das Enzym Peroxidase (VECTASTAIN-ABC-Elite-Komplex) mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht. Die Zusammensetzung der DAB-Lösung war folgende: 250µl DAB-Stammlösung in 4,75ml Tris-HCl-Puffer, wobei unmittelbar vorher 20µl 1%-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 290µl Aqua dest.) zugegeben wurde. Die Präparate wurden nach einem erneuten 5-minütigen Waschvorgang in 0,01M PBS, anschließend für 5 Min in 0.05M Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) gewaschen und dann 10 Min mit der DAB-Lösung inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschschrift in Aqua dest. zum Abspülen der DAB-Lösung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und über Xylol mit Entellan eingedeckelt.

## **2.2 Quantifizierungstechniken**

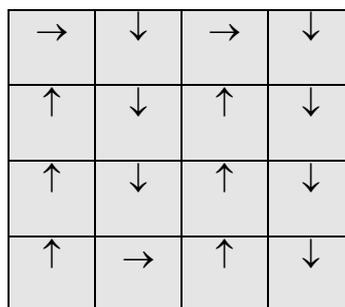
Die T-Zellen wurden aufgrund ihres distinkten Färbeverhaltens einzeln gezählt und in Zellen pro mm<sup>2</sup> Schnittfläche angegeben. Bei den Makrophagen konnte diese Methode nicht angewendet werden, da diese mikroskopisch überwiegend als dichte, fast konfluente Infiltrate in Erscheinung traten, wodurch die Abgrenzung einzelner Zellen unmöglich wurde. Das gleiche gilt auch für

HLA-DR. Deshalb quantifizierten wir die Immunreaktivität für CD-68- und HLA-DR mittels computergestützter Planimetrie und errechneten den Prozentwert der Makrophagen-/ HLA-DR-reichen Flächen bezogen auf die Gesamtschnittfläche.

Zur Qualitätskontrolle wurden die Präparate von einem zweiten unabhängigen Untersucher Herrn Dr. M. Schroeter parallel ausgewertet. Die Übereinstimmung bzgl. dieser Werte zweier unabhängiger "blinder" Untersucher (René Schumann, Dr. Michael Schröter) wurde exemplarisch für n=102 Präparaten bei Makrophagen, n=67 Präparaten bei T-Zellen bestimmt und betrug  $r=0,85$  für die Planimetrie der Makrophagen,  $r=0,93$  für die Zählung der T-Zellen (R.S. versus M.S.), was einer sehr guten Interraterübereinstimmung entspricht.

### 2.3.1 Einzelauszählung von T-Zellinfiltraten

Die CD3-positiven T-Zellen wurden mit einem manuellen Zähler unter einem Mikroskop (Olympus, Typ BH2, Japan) mit Raster bei 20-facher Vergrößerung quantifiziert und als Anzahl pro  $\text{mm}^2$  Schnittfläche angegeben. Die Schnitte wurden dabei meanderförmig (siehe Schema) nach T-Zellen abgesucht.



### **2.3.2 Computergestützte Planimetrie der Makrophagenantwort**

Computergestützte Planimetrie wurde bei HLA-DR- und KP1-gefärbten Präparaten angewendet. Bei dem Computer handelte es sich um einen Apple Macintosh (Appla Company, USA, Systemsoftware D1-7.1). Als Software diente das Programm Image/ MG 1,44 (National Institute of Health, Research Services Branch, USA). Außerdem wurde noch ein Bildverstärker (Hamamatsu, Typ DVS 3000, Japan), eine Kamera (Schwarz-Weiß-CCD-Kamera, Nandi, Typ YG 9220) und ein Leuchttisch (Northern Light, Precision Illuminator Modell 890) benutzt.

Nach der erfolgten Eichung wurden die Einzelschnitte der Plaques mit einer ca. 10-fachen Vergrößerung auf dem Monitor dargestellt. Der Kontrast am Bildverstärker wurde auf submaximal eingestellt. Ebenso wurde beim Programm Image sowohl eine optimale Kontrast-, als auch eine möglichst günstige Farbabstimmung gewählt. Zunächst wurden die Objekträger auf dem Leuchttisch platziert, über eine Kamera in den Computer gespeist und "eingefroren". Die digitalisierten, auf dem Bildschirm sichtbaren Plaques konnten dann mit der Maus zur Flächenberechnung umrahmt werden. Es wurde gleichermassen mit den HLA-DR und KP1-positiven Arealen verfahren. Zur besseren Identifikation der auf dem Monitor abgebildeten Strukturen, wurde der Originalschnitt parallel unter einem Mikroskop (Olympus, BH2) bei 10-facher Vergrößerung betrachtet. Die berechneten Flächen wurden in  $\text{mm}^2$  angegeben und dokumentiert.

## 2.4 Statistische Analyse

Die Übereinstimmung der Quantifizierung von entzündlichen Plaqueinfiltrationen zweier blinder Untersucher wurde mit unabhängiger Analyse der zahlreichen Gewebeschnitte unter Benutzung der linearen Regressionsanalyse (n=67 Gewebeschnitte für T-Zellen und n=102 Gewebeschnitte für Makrophagen) nach Bland und Altman berechnet (Bland & Altman, 1983).

Die Beziehung zwischen entzündlicher Infiltration, klinischen Merkmalen einer Plaquestabilisierung und pathoanatomischen Charakteristika wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Da wir für jede Analyse zwei statistische Tests durchführten, waren Werte von  $p < 0.025 (0.05/2)$  statistisch signifikant ( $\alpha$ -adjustment entsprechend des modifizierten Bonferroni Verfahrens) (Holm, 1979). Die Relation von asymptomatischen zu symptomatischen Patienten innerhalb der zwei Mikroemboliegruppen wurde mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests untersucht. Die gewählte statistische Analyse wurde in einem internationalen Peer-review-System im Rahmen einer Publikation von Teilen der vorliegenden Arbeit als adäquat akzeptiert (Jander, Sitzer, Schumann et al., 1998).

## **ERGEBNISSE**

### **3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs**

Unter Zugrundelegung der NASCET-Kriterien (1991) waren 21 der insgesamt 37 Patienten bezüglich innerhalb von 120 Tagen vor Operation aufgetretener transienter retinaler oder zerebraler Ereignisse oder kleinerer ischämischer Infarkte, die der hochgradigen Stenose der Arteria carotis interna zuzuschreiben waren, der symptomatischen Gruppe zuzuordnen. Entsprechend wurden Patienten, bei denen TIAs länger als 120 Tage zurücklagen als asymptomatisch eingestuft, ebenso wie Patienten, die bislang klinisch unauffällig waren. Zwischen beiden Gruppen gab es in bezug auf Alter, Geschlecht, Grad der Stenose und Größe der durch die Endarterektomie erhaltenen Präparate (totale Schnittfläche) keinerlei signifikanten Unterschiede (Tab.1). Die Gesamtzahl der verfügbaren Gewebeblöcke betrug 412. Pro Patient standen im Schnitt  $11,14 \pm 2,96$  Gewebeblöcke im Abstand von 2mm für die Analyse zur Verfügung. Entsprechend früher publizierter Befunde bestand bei den untersuchten Patienten eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Auftreten vorausgegangener ischämischer Symptome und dem Nachweis zerebraler Mikroembolien in der transkraniellen Dopplersonographie (Sitzer et al., 1995).

**Tabelle 1: Klinische Merkmale der untersuchten symptomatischen und asymptomatischen Patienten mit hochgradiger Arteria carotis interna-Stenose ( $\geq 70\%$ ).**

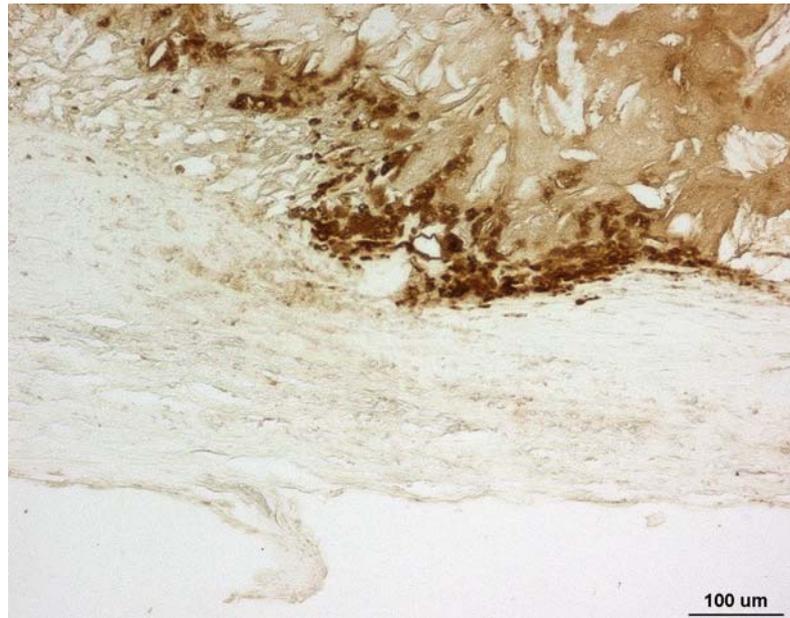
	Alter	Geschlecht	Grad der Stenose	Totale Schnittfläche <sup>2</sup>	Mikroembolierate <sup>3</sup>	
	in Jahren	% Männer	In % [Mw. <sup>1</sup> ]	in mm <sup>2</sup> [Mw. <sup>1</sup> ]	0/h	>0/h
Asymptomatisch (n=16)	63	69	70-95 [84,6]	105-347 [199,1]	12	4
Symptomatisch (n=21)	61	62	70-95 [82,5]	83-393 [206,7]	1	20

1, Mw.= Mittelwert    2, Mann-Whitney-U-Test    3,  $\chi^2$ -Test: p=0,001; df=2

### **3.2 Qualitative Beschreibung der Verteilung von Makrophagen, T-Zellen und der HLA-DR-Expression in symptomatischen und asymptomatischen Plaques der Arteria carotis interna**

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten in allen Präparaten eine deutliche Entzündungsreaktion mit Infiltration von T-Zellen und Makrophagen (Abb. 1, 2). Innerhalb eines Plaques waren die Makrophagen überwiegend im Bereich des atheromatösen Anteils und der darüberliegenden fibrösen Kappe lokalisiert. T-Zellinfiltrate fanden sich überwiegend im Bereich der fibrösen Kappe (Abb. 1, 2). Hinsichtlich der Verteilung von T-Zellen und Makrophagen war kein systematischer Unterschied zwischen zuvor symptomatischen und asymptomatischen Carotisplaques zu erkennen.

**KP1**



**CD3**

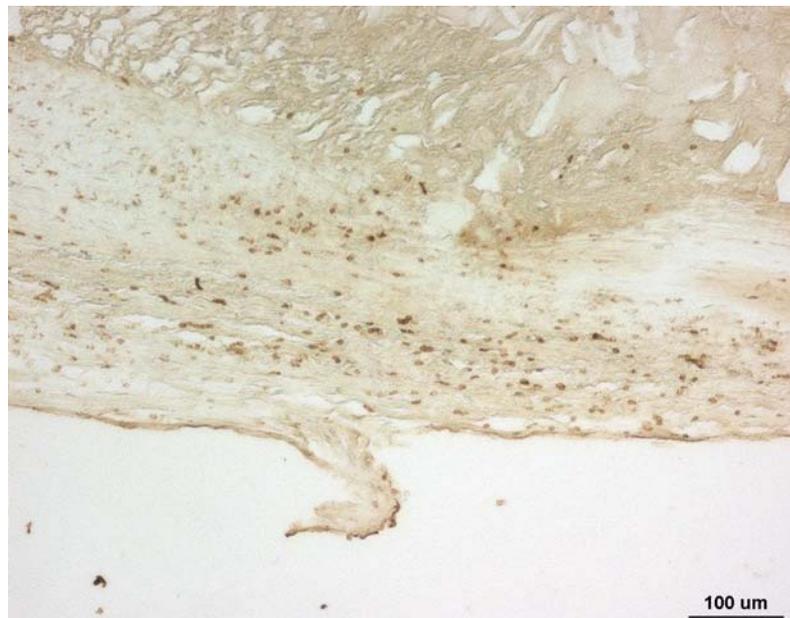
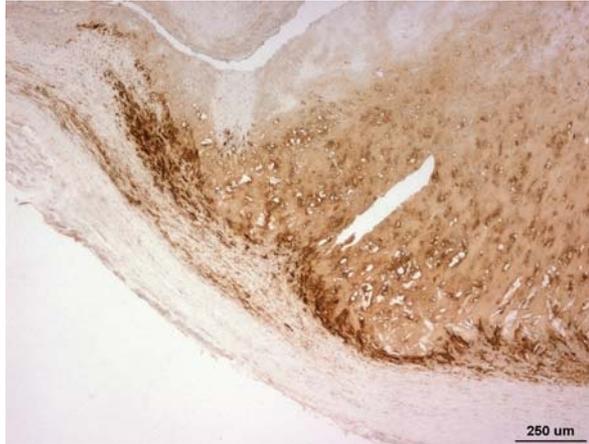
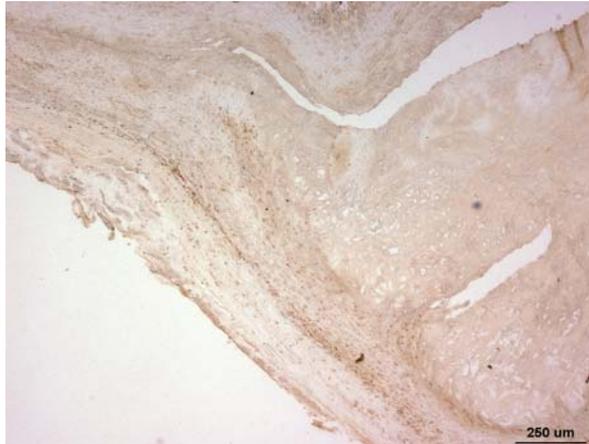


Abb. 1: Typische Verteilung von Makrophagen (KP1) und T-Zellen (CD3) in der fibrösen Deckplatte (unten, lumenwärts gelegen) über dem atheromatösen Kern (oben im Bild) eines Carotisplaques. Beachte, daß die Makrophagen in unmittelbarer Beziehung zum atheromatösen Kern stehen, während die T-Zellen in stärkerem Ausmaß lumenwärts in die fibröse Kappe infiltrieren.

**KP1**



**CD3**



**MHC  
Klasse II**

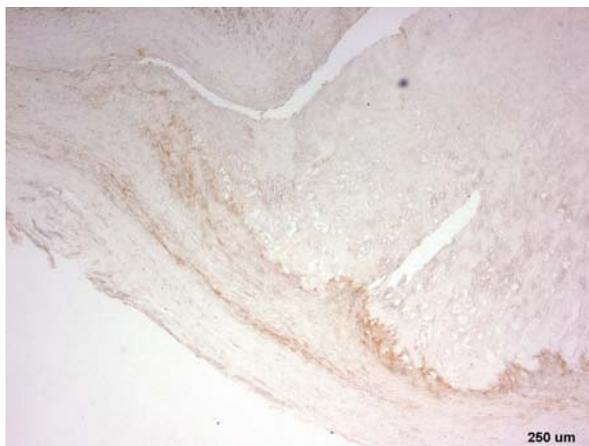
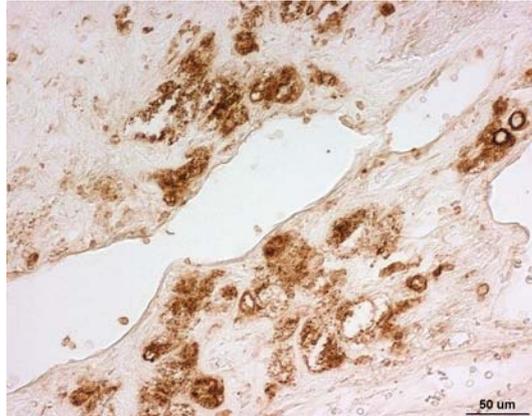
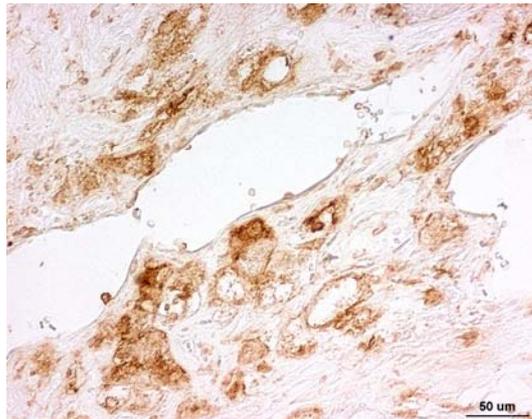


Abb. 2: Serienschritte eines Carotisplaques, gefärbt für Makrophagen (KP1), T-Zellen (CD3) und MHC Klasse II-Antigen. Beachte die überwiegende Expression von MHC Klasse II im Bereich der zellulären Infiltration.

**KP1**



**MHC  
Klasse II**



**CD**

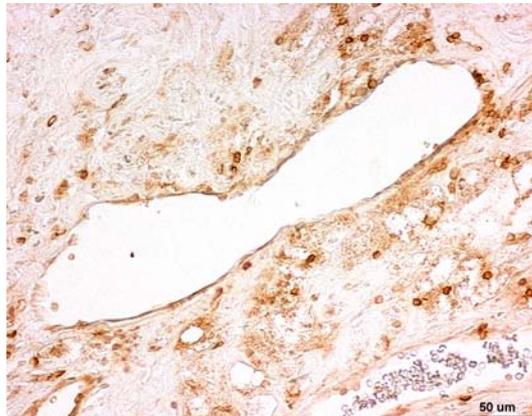


Abb. 3: Serienschritte zeigen eine überwiegende Expression von MHC Klasse II-Antigen auf großen, CD68+ Makrophagen und nur vereinzelt auf kleinen CD3+ T-Zellen.

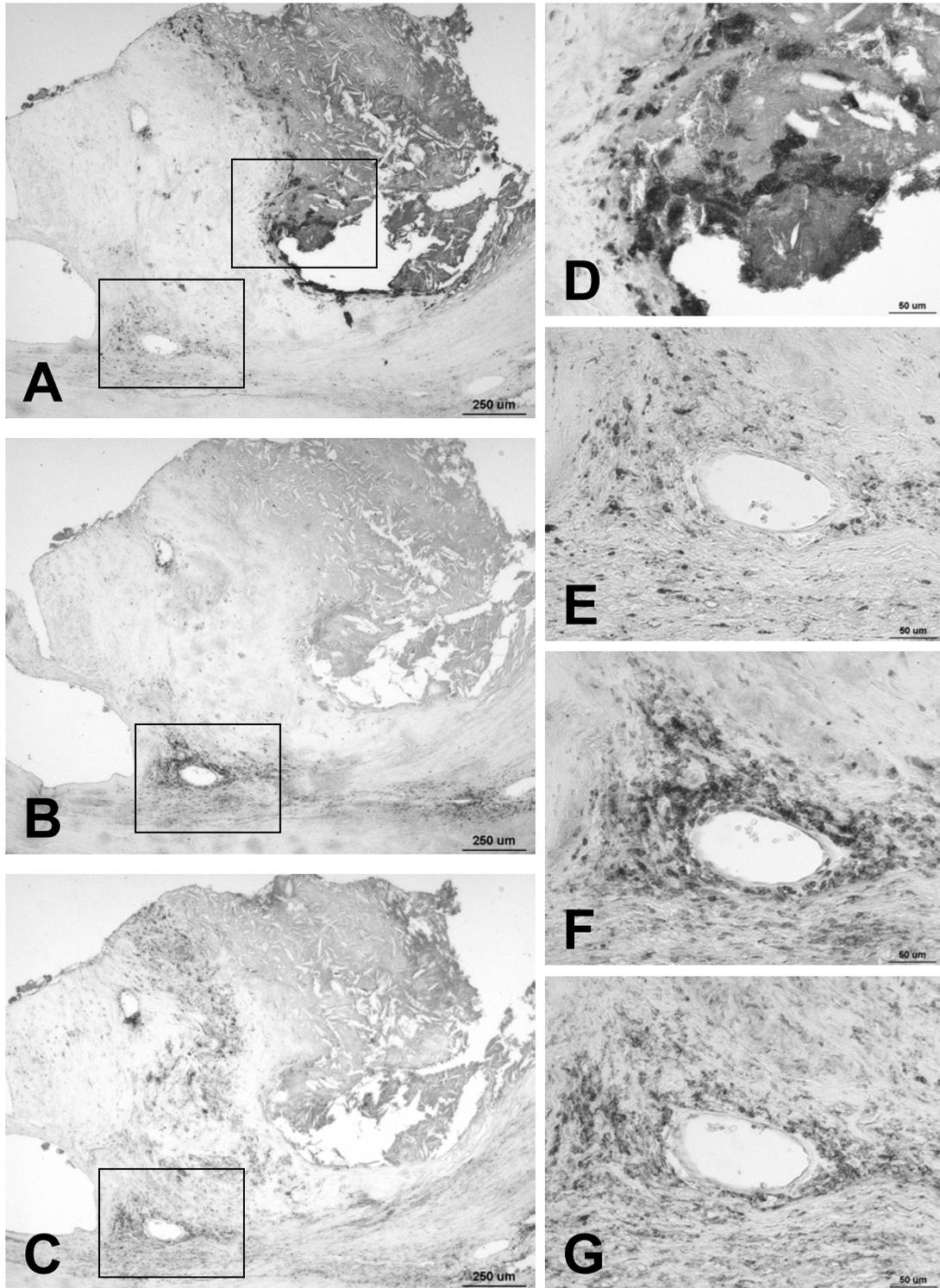


Abb. 4: Fokale Verteilung der Entzündungsreaktion im Plaque. Serienschnittfärbung für Makrophagen (A, D, E), T-Zellen (B,F) und MHC Klasse II-Antigen (C, G). A und D zeigen die

(Fortsetzung Legende Abb. 4)

Infiltration von Makrophagen im Bereich des Atheroms (oben rechts im Bild), die weitgehend ohne T-Zell-Infiltration einhergeht. Dagegen findet sich im eine übereinstimmende Verteilung von Makrophagen (A, E) und T-Zellen (B, F) im perivaskulären Infiltrat im Bereich der fibrösen Platte. MHC Klasse II-Antigene finden sich übereinstimmend mit der Verteilung von Makrophagen in beiden Lokalisationen.

Die Expression von HLA-DR-Molekülen war erwartungsgemäß besonders stark in Regionen mit T-Zell- und Makrophageninfiltration ausgeprägt (Abb. 2-4). Insbesondere Makrophagen exprimierten häufig HLA-DR auf ihrer Oberfläche als Indikator für ihre Aktivierung (Abb. 3). Insgesamt wurde jedoch deutlich, dass die räumliche Verteilung der Infiltration variabel und inhomogen war (Abb. 4).

### 3.3 Quantitative Auswertung der Plaqueinfiltration: Vergleich zwischen symptomatischen und asymptomatischen Plaques der Arteria carotis interna

Wegen der inhomogenen Verteilung der Plaqueinfiltration durch T-Zellen und Makrophagen wurden im Durchschnitt 11 Schnitte pro Plaque jeweils im Abstand von 2mm immunhistochemisch gefärbt und die Zahl der T-Zellen bzw. der planimetrisch bestimmte Flächenanteil der

**Tabelle 2: Korrelation zwischen klinischer Symptomatik (TIAs) und Plaqueinfiltration durch Makrophagen und T-Zellen, sowie HLA-DR-Expression in Carotisplaques**

	Ischämisches Ereignis in den letzten 120 Tagen		
	Asymptomatisch [n=16]	Symptomatisch [n=21]	p <sup>2</sup>
Relativer Makrophagenanteil am Plaqueareal in %	11±4 [6-20]	18±10 [7-44]	<b>0,005<sup>3</sup></b>
Zahl der T-Zellen pro mm <sup>2</sup> Schnittfläche <sup>1</sup>	40,5±31,4 [11-133]	71,2±34,4 [20-158]	<b>0,005<sup>3</sup></b>
Mittlere HLA-Expression (Summe von HLA / Plaquefläche in %) <sup>1</sup>	16,41±9,93	19,56±12,46	0,554

1, Mittelwert ± SD

3, Signifikanz nach  $\alpha$ -adjustment (siehe unter "Methoden")

2, Mann-Whitney U-Test

Makrophageninfiltration und HLA-DR-Expression bestimmt und über den Gesamtplaque gemittelt. Die Ergebnisse des quantitativen Vergleichs der T-Zell- und Makrophageninfiltration zwischen symptomatischen und asymptomatischen Carotisplaques sind in Tabelle 2 dargestellt. Die

Zahl der T-Zellen pro mm<sup>2</sup> der totalen Schnittfläche und der relative Flächenanteil der Makrophagen am Gesamtplaque waren bei symptomatischen Carotisstenosen signifikant größer als bei asymptomatischen Stenosen. Die Unterschiede hinsichtlich der HLA-DR-Expression waren statistisch nicht signifikant.

### **3.4 Analyse des Zusammenhangs zwischen Mikroembolisation und Plaqueinfiltration**

Der Nachweis von Mikroemboliesignalen in der ipsilateralen Arteria cerebri media mit Hilfe der transkraniellen Dopplersonographie ist ein wichtiger paraklinischer Indikator drohender ischämischer Ereignisse bei Carotisstenosen und korreliert im Prädiktionswert mit klinisch fassbaren TIAs. Wir haben deshalb über die unter 3.3 dargestellte Analyse des Zusammenhangs zwischen klinischen TIAs und Plaqueinfiltration eine separate Korrelationsanalyse zwischen dem Auftreten präoperativ gemessener Mikroembolien und der Entzündungsreaktion in den Plaques durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Es zeigte sich wiederum ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Flächenanteil von Makrophagen am Gesamtplaque und dem Nachweis von Mikroembolien, was die Hypothese einer besonderen Bedeutung von Entzündungsreaktionen bei der Destabilisierung von Carotisprozessen weiter stützt. Auch die Zahl der T-Zellen in den Plaques war bei mikroemboliepositiven Carotisstenosen höher, die statistische Auswertung erbrachte aber keine ausreichende Signifikanz. Die Expression von HLA-DR-Molekülen zeigte in Übereinstimmung mit der Analyse unter 3.3 keinerlei Bezug zur Mikroembolierate. Zusammenfassend wird die Korrelation zwischen klinischer Symptomatologie und Ausmaß der Plaqueinfiltration bei Carotisprozessen durch die positive Korrelation zur Mikroembolierate weiter gestützt.

**Tabelle 3: Verhältnis zwischen Mikroemboliezahl und Infiltration von Carotisstenosen durch Makrophagen und T-Zellen**

	Zahl der Mikroembolien		
	0/h [n=13]	>0/h [n=24]	p <sup>2</sup>
Relativer Makrophageanteil am Gesamtplaque in % <sup>1</sup>	11±5 [6-23]	17±10 [7-44]	<b>0,011</b> <sup>3</sup>
Zahl der T-Zellen pro mm <sup>2</sup> Schnittfläche <sup>1</sup>	45,1±27,1 [11-89]	66,9±35,6 [12-158]	0,061
Mittlere HLA Expression (Summe von HLA / Plaquefläche in %) <sup>1</sup>	15,64±8,56	19,58±12,62	0,479

1, Mittelwert ± SD

3, Signifikanz nach  $\alpha$ -adjustment (siehe unter "Methoden")

2, Mann-Whitney U-Test

### 3.5 Plaqueinfiltration und pathoanatomische Merkmale der Karotisplaques

Bei 32 Thrombendarterektomiepräparaten standen aus einer früheren Untersuchung (Sitzer et al., 1995) pathoanatomische Daten für die vergleichende Analyse mit der jetzt durchgeführten Quantifizierung der Inflammation zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Dabei zeigte sich, daß die Makrophagen- und T-Zellinfiltration in überwiegend atheromatösen (lipidreichen) Plaques signifikant stärker ausgeprägt war als bei überwiegend fibrösen Plaques. Dies entspricht der präferentiellen Lokalisation von Makrophagen in diesen Plaquearealen (siehe

3.2). Hinsichtlich der HLA-DR Expression zeigten sich erneut keine signifikanten Unterschiede. Überraschenderweise bestand keine signifikante Korrelation zwischen der Ausdehnung der entzündlichen Infiltration und dem Nachweis von Plaqueulzerationen und intravasalen Thromben, die in einer vorausgehenden Studie mit der Plaquestabilisierung assoziiert war.

**Tabelle 4: Pathoanatomische Merkmale der Thrombendarterektomiepräparate von Carotisstenosen in Relation zur Plaqueinfiltration durch Makrophagen und T-Zellen und der assoziierten HLA-DR-Expression (n=32 untersuchte Plaques)**

	n	Makrophagenreiche Areale <sup>1</sup> in %	P <sup>2</sup>	T-Zellzahl pro mm <sup>2</sup> Schnittfläche <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	mittlere HLA- Expression (Summe von HLA / Plaquefläche in %)	P <sup>2</sup>
Plaqueulzeration:							
-	19	13±6		57,5±32,9		18,72±12,0	
+	13	18±11	0,4	64,3±39,3	0,64	17,50±10,9	0,683
Thrombus:							
-	12	13±7		58,1±31,1		15,58±7,81	
+	20	16±10	0,45	61,5±37,8	0,97	19,45±12,72	0,643
Überwiegender Plaqueaufbau:							
Fibrös	17	9±3		46,4±22,2		17,4±13,81	
Atheromatös	15	19±10	<b>0,0009</b> <sup>3</sup>	71,5±39,0	<b>0,045</b>	18,87±9,18	0,497

1, Mittelwert ± SD    2, Mann-Whitney U-Test    3, Signifikanz nach  $\alpha$ -adjustment

### 3.6 Verteilung der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in Carotisplaques

Die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen ins Gewebe wird durch die endotheliale Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen, insbesondere ICAM-1 und VCAM-1, gesteuert.

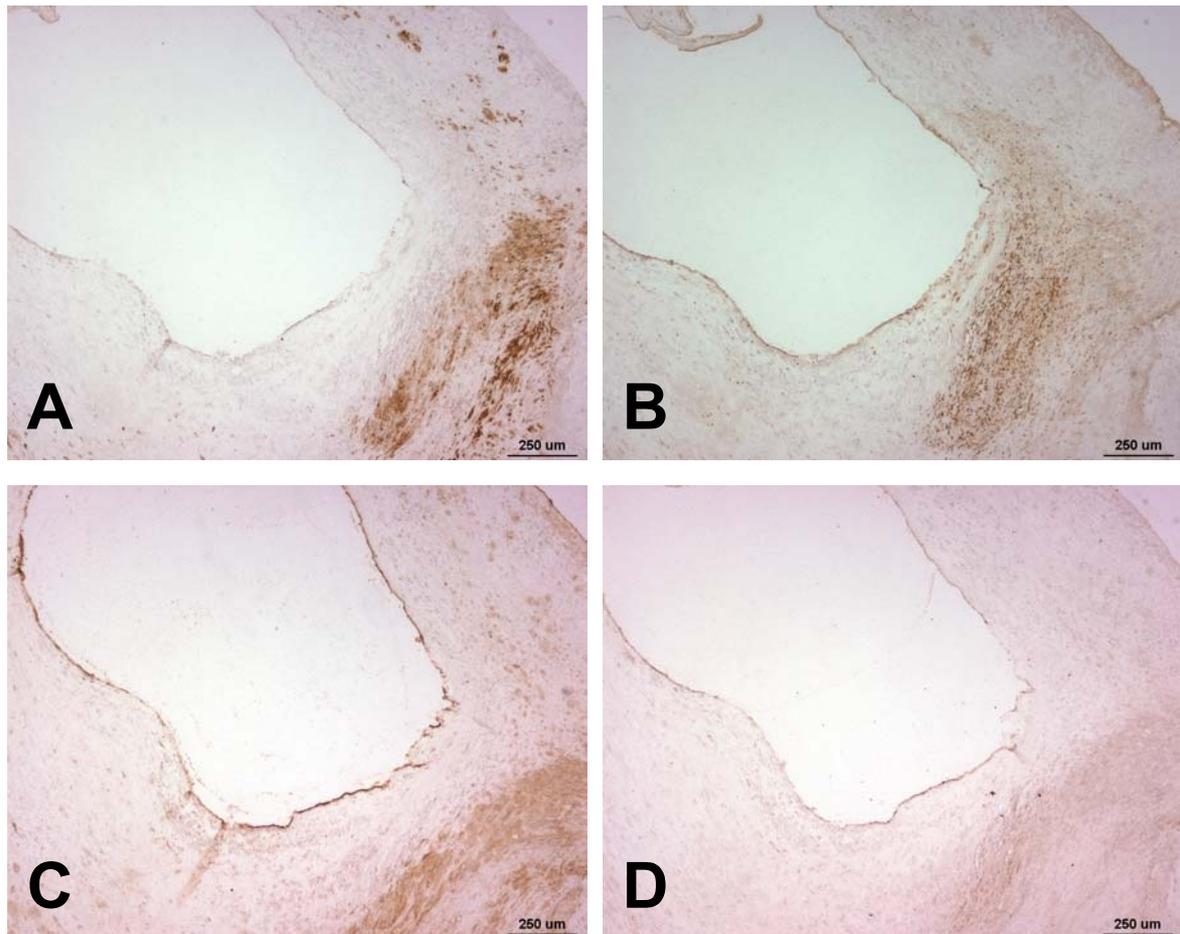


Abb. 5: Expression von ICAM-1 (C) und VCAM-1 (D) an der luminalen Oberfläche eines Carotisplaques und im Bereich der zellulären Infiltration durch Makrophagen (A) und T-Zellen (B).

Diese Moleküle dienen als Rezeptor für die auf T-Zellen und Makrophagen konstitutiv exprimierten Liganden VLA-4 und den CD11b/CD18-Komplex. Im Gegensatz zu den Liganden bedarf die endotheliale Expression von VCAM-1 und ICAM-1 einer vorherigen Induktion im Gewebe selbst. Durch Färbung von Schnitten symptomatischer und asymptomatischer Plaques fanden wir tatsächlich eine Hochregulation von ICAM-1 und VCAM-1. ICAM-1 war einerseits auf der luminalen Oberfläche der Plaques (Abb. 5), andererseits endothelial auf den Vasa vasorum zu finden und häufig von perivaskulären Makrophageninfiltraten umgeben (Abb. 6).

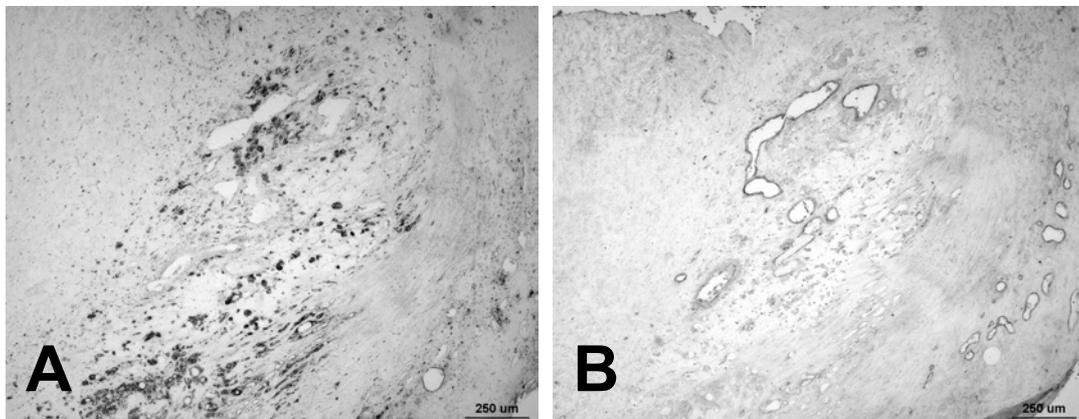


Abb. 6: Perivaskuläre Makrophageninfiltration (A) im Bereich ICAM-1+ Vasa vasorum (B).

Infiltratzellen exprimierten nur vereinzelt ICAM-1. VCAM-1 fand sich endothelial im Bereich kleiner Blutgefäße in der fibrösen Kappe der Plaques und hier häufig in Verbindung mit perivaskulären T-Zellinfiltraten (Abb. 7). Zusätzlich fand sich eine massive Expression von VCAM-1 auf glatten Muskelzellen, die durch Färbung jeweils eines Serienschnitts mit Antikörpern gegen Aktin als solche identifiziert werden konnten (Abb. 8). In der Übersicht waren keine augenfälligen Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen symptomatischen und asymptomati-

schen Stenosen erkennbar. Eine weitere Quantifizierung, wie bei den Infiltraten durchgeführt, war für die Zelladhäsionsmoleküle wegen der diffuseren Verteilung und dem insgesamt schwächeren immunzytochemischen Signal nicht möglich.

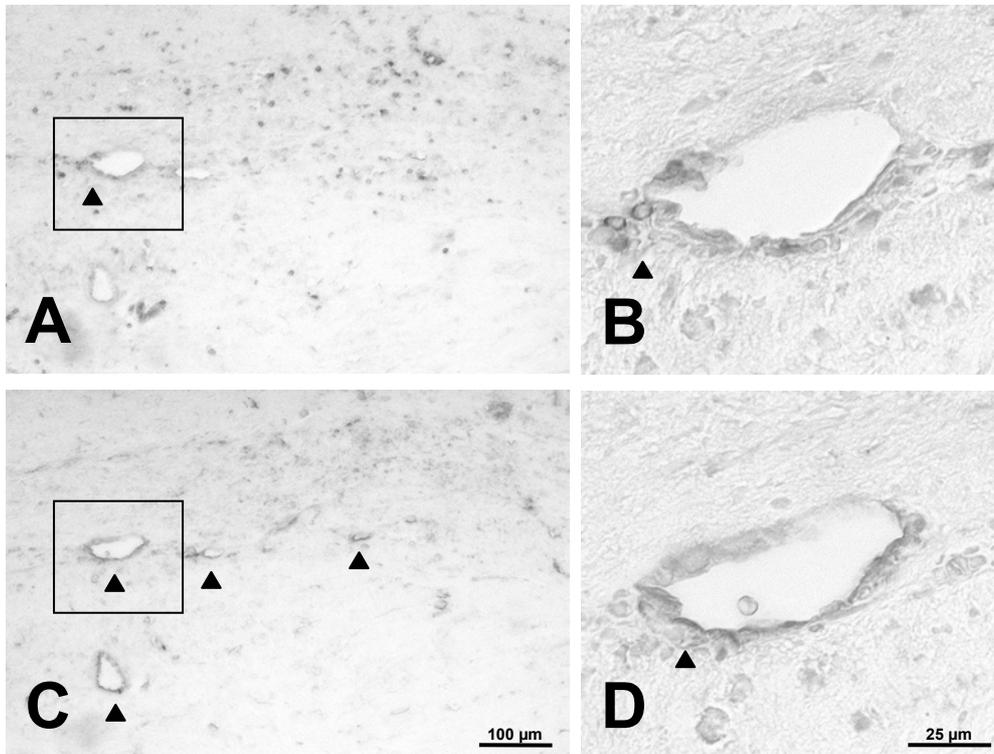


Abb. 7: Expression von VCAM-1 auf kleinen Gefäßen im fibrösen Anteil eines Carotisplaques (Pfeile in C und D). Im Bereich VCAM-1-positiver Gefäße finden sich T-Zellinfiltrate (Pfeil in A und B).

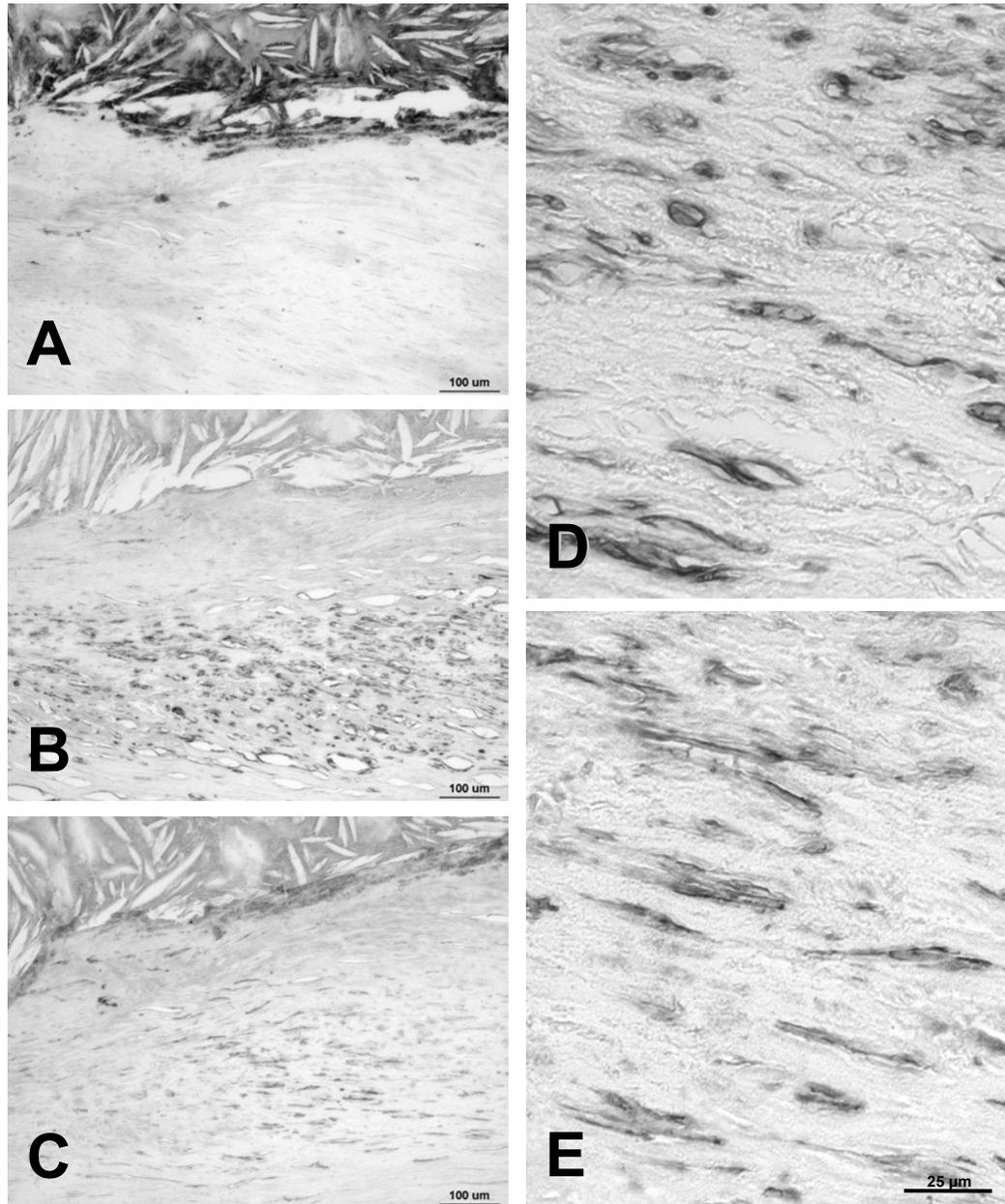


Abb. 8: Expression von VCAM-1 auf glatten Muskelzellen im Bereich der fibrösen Deckplatte (C, E). Die Serienschneitffärbung für Aktin (B, D) zeigt eine weitgehend übereinstimmendes Expressionsmuster beider Antigene. Interessanterweise ist der Bereich der Makrophageninfiltration (A) in unmittelbarer Nachbarschaft zum Atherom weitgehend frei von Aktin (B) und VCAM-1 (C) (oberer Bildrand).

#### 4. DISKUSSION

Ziel der vorgelegten Arbeit war die Untersuchung der Frage, inwieweit das Ausmaß der Infiltration von Plaques der Arteria carotis interna und die Expression immunologischer akzessorischer Moleküle mit klinischen und paraklinischen Parametern der Plaquestabilisierung korreliert. Die Arteria carotis ist für diese Fragestellung besonders geeignet, da über die Erfassung transitorisch ischämischer Attacken und von „kleineren“ Schlaganfällen in den letzten 4 Monaten eine eindeutige prognostische Zuordnung der Patienten in eine Gruppe der weiter vom Schlaganfall bedrohten sogenannten „symptomatischen“ Stenosen und in eine Gruppe mit niedrigem Schlaganfallrisiko, den sogenannten „asymptomatischen“ Stenosen, gelingt. Methodisch wurden Thrombendarrektomiepräparate von 37 Patienten mit hochgradiger Stenose der Arteria carotis interna in 2mm Segmente geteilt und je ein Schnitt aus jedem Segment mit Antikörpern, die entweder Makrophagen oder T-Zellen erkennen, gefärbt und zusätzlich immunhistochemisch die Expression der akzessorischen Immunmoleküle HLA-DR, VCAM-1 und ICAM-1 untersucht. Als Hauptergebnis fand sich bei quantitativer Auswertung eine signifikante Assoziation zwischen dem Ausmaß der Inflammation im Gefäßplaque und rezent abgelaufenen cerebralen Durchblutungsstörungen einerseits und dem präoperativen Nachweis von cerebraler Mikroembolien im transkraniellen Doppler über der ipsilateralen Arteria cerebri media andererseits.

#### **4.1 Der Bezug zwischen T-Zell- und Makrophageninfiltration in der Carotiswand und klinischen und histopathologischen Indikatoren der Plaquestabilisierung**

T-Zellinfiltrate waren sowohl bei zuvor symptomatischen als auch bei asymptomatischen Plaques der Arteria carotis interna nachweisbar. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als Entzündungsreaktionen eine wichtige pathophysiologische Rolle in der allgemeinen Arterioskleroseentstehung spielen (Hansson et al., 1989; Ross, 1993a,b; Neri Serneri et al., 1997). So konnte gezeigt werden, dass arteriosklerotisch veränderte Gefäße in allen Gefäßgebieten von T-Zellen und Makrophagen infiltriert sind. Die Entzündungsreaktion ist im Bereich der lipidreichen Zonen in den arteriosklerotischen Plaques am ausgeprägtesten.

Welche auslösenden Faktoren sind für die Entzündungsreaktion in arteriosklerotischen Gefäßwänden verantwortlich? Diskutiert wurde zum einen die pathologische Ablagerung von verändertem Lipid in der Gefäßwand als Auslöser einer autoimmunen T-Zellantwort, zum anderen Infektionserreger wie Herpesviren (Hajjar et al, 1986) und Chlamydien (Kuo et al, 1993; Wimmer et al, 1996; Jackson et al, 1997; Maass et al, 1997) mit konsekutiver Leukozyteninfiltration im Rahmen der Infektabwehr. Der erste Erklärungsansatz wurde insbesondere von Ross favorisiert (Ross, 1993a,b). Dessen Hypothese besagt, dass die Verletzung des Endothels und der darunter liegenden glatten Muskelzellen unter dem Einfluß der bekannten Gefäßrisikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Nikotinabusus zu einer verstärkten Ablagerung von Lipidkomponenten führt. Diese Lipidkomponenten insbesondere das LDL („low density lipoprotein“) unterliegen im weiteren Verlauf der Plaqueentwicklung einer chemischen Modifikation u.a. durch Oxidierung (oxLDL). Aus normalem physiologischem LDL wird

modifiziertes LDL (modLDL). ModLDL wiederum ist in der Lage die Migration von T-Zellen und Monozyten zu induzieren (McMurray et al, 1993). ModLDL führt darüber hinaus auch Induktion von Autoantikörpern (Rosenfeld et al, 1990; Salonen et al., 1992). Schließlich kommt es unter dem Einfluß von modLDL auf verschiedenen Ebenen zu einer Dysfunktion von Immunzellen und wahrscheinlich zur Induktion von Autoimmunität: So werden aus plaqueinfiltrierenden Monozyten durch Phagozytose von oxLDL Schaumzellen. Diese bilden zusammen mit T-Zellen und glatten Muskelzellen das atheromatöse Beet, aus dem sich durch fibroproliferative Prozesse ein fibröser Plaque entwickeln kann (Rosenfeld et al, 1990). Offensichtlich spielt über die unspezifische Makrophagenaktivierung durch Lipidphagozytose hinaus auch eine zelluläre autoimmune Komponente eine wichtige Rolle. Stemme und Mitarbeiter konnten aus arteriosklerotischen Plaques tatsächlich T-Zellen isolieren, die in vitro spezifisch oxydiertes LDL als Antigen erkannten (Stemme et al., 1995). Von anderen Autoren wird eine Immunantwort gegen infektiöse Erreger in der Gefäßwand als Ursache der Entzündungsreaktion diskutiert. In Carotisplaques konnten mit immunzytochemischen und molekularbiologischen Methoden tatsächlich *Chlamydiae pneumoniae* nachgewiesen werden (Yamashita et al., 1998; Esposito et al., 1999; Mosorin et al., 2000). Aus diesen Plaques isolierte T-Zellen erkannten entsprechend Chlamydienbestandteile als Antigen (Mosorin et al., 2000). Die Bedeutung von Chlamydien und anderen Infektionserregern in der Pathophysiologie der Arteriosklerose ist allerdings insgesamt umstritten und wird von vielen Autoren als Epiphänomen angesehen (Ahlbeck-Glader et al., 1999; Shor & Phillips, 1999). Zusammenfassend stehen unsere qualitativen Befunde einer T-Zell- und Makrophageninfiltration in den Carotisplaques in Einklang mit den in der Literatur berichteten Entzündungsreaktionen in arteriosklerotischen Gefäßplaques anderer Gefäßterritorien.

Unsere Befunde gehen allerdings über diesen allgemeinen Aspekt der Inflammation bei der

Arteriosklerose weit hinaus. Wir konnten zusätzlich durch quantitative Auswertung der Entzündungsreaktion in Thrombendarrektomiepräparaten zeigen, dass der relative Flächenanteil von Makrophagen an der gesamten Plaqueläche mit  $18 \pm 10\%$  bei innerhalb der letzten 4 Monate symptomatischen Carotisstenosen signifikant höher war als bei asymptomatischen mit  $11 \pm 4\%$  ( $p=0,005$ ). Unsere Ergebnisse wurden unabhängig von Bassiouny und Mitarbeitern (1997) bestätigt. Diese Arbeitsgruppe fand im Bereich der fibrösen Kappe eine dreifach höhere Makrophageninfiltration bei symptomatischen im Vergleich zu asymptomatischen Carotisplaques. Um bei der Analyse eine Beeinflussung durch eine Vorauswahl von besonders „interessierenden“ Arealen weitestgehend zu vermeiden, stützte sich unsere Quantifizierung allerdings im Gegensatz zur Arbeit von Bassiouny und Mitarbeitern auf den Gesamtgehalt von Entzündungszellen in den Plaques durch Analyse von Schnitten alle 2 mm durch den Gesamtplaque. Wir untersuchten also nicht die Ausdehnung der Entzündung an rupturierten Stellen oder am Ort der höchsten Stenosierung. Damit wird der gefundene statistische Unterschied zwischen symptomatischen und asymptomatischen Stenosen möglicherweise sogar unterschätzt, da die spezielle Verteilung der Entzündungsreaktion aus methodischen Gründen (Vermeidung eines Selektionsbias) in der Analyse unberücksichtigt blieb. Die gefundene Assoziation zwischen Plaqueinfiltration und rezenter Symptomatologie bestätigte sich auch bei der Zählung von T-Zellen mit  $71,2 \pm 34,4$  (symptomatisch) versus  $40,5 \pm 31,4$  (asymptomatisch) (im statistischen Vergleich  $p=0,005$ ) im Gesamtplaque. Wie nicht anders zu erwarten bei einem multifaktoriellen Geschehen, ergab sich bezüglich der Makrophagen- und T-Zell-Dichte eine gewisse Überlappung zwischen den asymptomatischen und symptomatischen Patienten. So fanden wir einzelne klinisch instabile Patienten mit relativ spärlich infiltrierten Plaques. Auf der anderen Seite konnten auch wenige klinisch stabile Patienten beobachtet werden, deren Pla-

queinfiltrate sehr ausgeprägt waren. In einem Vergleich der Basisdaten der beiden Patientenkollektive zeigten sich allerdings keinerlei Unterschiede in der Altersstruktur, dem Anteil von Männern und Frauen und dem mittleren Stenosegrad (Tabelle 1), so dass ein Selektionsbias, der diese „Ausreiser“ erklären könnte, ausgeschlossen ist.

Die Wertigkeit der Assoziation zwischen dem Ausmaß der Entzündungsreaktion und klinischen Indikatoren der Plaquedestabilisierung konnte durch Vergleich mit den präoperativen Mikroembolieraten weiter untermauert werden. Der Nachweis von Mikroembolien über der ipsilateralen Arteria cerebri media ist hochprädictiv für das zukünftige Auftreten von klinisch fassbaren TIA's und Schlaganfällen (Siebler et al., 1992, 1993, 1994, 1995; Forteza et al., 1996). Bei der Korrelationsanalyse ergab sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Flächenanteil von Makrophagen am Gesamtplaque und dem Präoperativen Nachweis von Mikroembolien. Auch die Zahl der T-Zellen im Plaque war bei Mikroemboliepositiven Patienten höher als bei negativen, die Korrelationsanalyse ergab aber keine ausreichende statistische Signifikanz, was wahrscheinlich auf die relativ niedrige Fallzahl zurückzuführen ist.

Bei 32 Thrombendarterektomiepräparaten standen aus einer früheren Untersuchung pathoanatomische Daten für die vergleichende Analyse mit der jetzt durchgeführten Quantifizierung der Inflammation in den Plaques zur Verfügung (Sitzer et al., 1995). Bereits bei einfacher Betrachtung der Präparate fiel auf, dass die Makrophagen- und T-Zellinfiltration im atheromatösen Bereich der Plaques am stärksten ausgeprägt war. Der fibröse Anteil erschien weniger Entzündungsreaktion zu zeigen. Dieser Unterschied bestätigte sich bei der quantitativen

Auswertung und war statistisch sowohl für Makrophagen ( $p=0.0009$ ) als auch für T-Zellen signifikant ( $p = 0.045$ ). In der Untersuchung von Sitzer und Mitarbeitern (1995) hatte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem histopathologischen Nachweis von Ulzerationen am Plaque, sowie von intravasalen Thromben zum vormaligen Auftreten von TIA's bzw. kleineren abgelaufenen Schlaganfällen nach den NASCET-Kriterien ergeben. Die Bedeutung der Plaqueulzeration als histopathologisches Korrelat der Plaquestabilisierung konnte unabhängig in mehreren Studien von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Avril et al., 1991; Masawa et al., 1994; Carr et al., 1996, 1997; Ballotta et al., 2000). Die von Sitzer et al. (1995) beschriebene Assoziation mit intravasaler Thrombenbildung bestätigte sich dabei nicht. Die hier durchgeführte Korrelationsanalyse zwischen pathoanatomischen Merkmalen der Plaquestabilisierung (Ulzeration, Thrombenbildung) und dem Ausmaß der Entzündungsreaktion im Gesamtplaque zeigte überraschenderweise keine statistisch signifikanten Unterschiede in den einzelnen morphologisch definierten Plaquegruppen. Dies ist möglicherweise auf die Tatsache zurückzuführen, dass wir den Gesamtanteil der Entzündungsreaktion am Plaque und nicht den in einer „Region of interest“ (hier Ort der Ulzeration) zur Korrelationsanalyse herangezogen haben, um einem unkontrollierten Selektionsbias zu entgehen. Darüber hinaus sind die Fallzahlen für derartige Subanalysen wahrscheinlich noch zu klein. Tendenziell war der Makrophagenanteil in den ulzerierten Plaques höher als in den nicht ulzerierten. Letztere Befunde stimmen mit Untersuchungsergebnissen von Carr und Mitarbeitern (1997) überein, die ebenfalls eine lokale Akkumulation von Makrophagen und T-Zellen in rupturierten Bereichen von Carotisplaques beschrieben haben. Diese Untersuchung enthielt jedoch im Gegensatz zu unserer Arbeit keinerlei Angaben und Analyse der Assoziation von Inflammation zu klinischer Stabilität bzw. Instabilität. Auch beim akuten Coronar-

syndrom in der Kardiologie läßt sich mit hoher Verlässlichkeit ein lokaler Entzündungsprozess nachweisen, der unabhängig von der dominierenden Plaquemorphologie ist (Van der Wal et al., 1994b).

Untersuchungen, die sich auf Thrombendarterektomiepräparate stützen, sind naturgemäß nur in der Lage eine punktuelle Analyse zu liefern, wodurch die zeitliche Dynamik des zugrundeliegenden pathogenetischen Prozesses außer Acht gelassen wird. Die Frage, ob die Entzündung einer Plaqueruptur vorangeht, oder vielmehr eine Folge der Ruptur im Sinne eines Heilungsprozesses zur Wiederherstellung der Gefäßintegrität ist, muss bei diesen Untersuchungen unbeantwortet bleiben. Zusammenfassend legen unsere Untersuchungsergebnisse eine wichtige pathophysiologische Rolle von T-Zellen und Makrophagen bei der Plaquestabilisierung extrakranieller Gefäßprozesse nahe, deren potentielle Effektormechanismen unter 4.3 und deren klinische Implikationen unter 4.4 weiter diskutiert werden.

Unsere Befunde stehen im Einklang mit vergleichbaren Untersuchungsergebnissen in der Kardiologie. Anhand von Operationspräparaten bzw. Autopsiematerial von Patienten mit instabiler Angina pectoris konnte ebenfalls eine signifikante Infiltration der Coronararterienwand durch T-Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden (Yeghiazarians et al., 2000). Die Ansammlung von Infiltratzellen in der fibrösen Kappe der arteriosklerotischen Plaques wird auch hier wesentlich für die klinisch entscheidende Plaqueruptur (Davies & Thomas, 1985; Lendon et al., 1991; Fuster et al., 1992, 1996; Moreno et al., 1994, 1996; Van der Wal et al., 1994; Neri Serneri et al., 1997) und die konsekutive Gerinnungsaktivierung mit lokaler Thrombenbildung verantwortlich gemacht (Fernández-Ortiz et al., 1994; Boyle, 1997). Die Interpretierbarkeit der Ergebnisse

hinsichtlich der Rolle von Entzündungsreaktionen bei der Destabilisierung von Coronarprozessen ist allerdings dadurch eingeschränkt, dass Operationsmaterial einer klinisch asymptomatischen Kontrollgruppe mit vergleichbarem Coronarstenosegrad naturgemäß nicht zur Verfügung steht. Insofern weist die Untersuchung des Carotissystems hier einen einzigartigen Vorteil auf, indem es einen direkten Vergleich vormals symptomatischer mit asymptomatischen Carotisprozessen gleichen Stenosegrads erlaubt.

#### **4.2 Die Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 als „Vehikel“ der Leukozyteninfiltration in der Gefäßwand**

Die Infiltration von Leukozyten ins Gewebe wird durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelt (Springer et al., 1990). Während im Blutstrom zirkulierende Leukozyten die Liganden konstitutiv exprimieren, müssen die als Rezeptoren für die Adhäsion und transendotheliale Migration dienenden Zelladhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und ICAM-1 erst durch Zytokinstimulation auf der Endotheloberfläche induziert werden. Wir fanden sowohl bei symptomatischen als auch bei asymptomatischen Carotisplaques eine Expression von ICAM-1 auf der luminalen Oberfläche des Plaqueendothels einerseits und auf den Endothelien der Vasa vasorum andererseits. Während DeGraba und Mitarbeiter (1998) über eine verstärkte endotheliale Expression von ICAM-1 an der Oberfläche symptomatischer im Vergleich zu asymptomatischen Carotisplaques berichteten, war es in unserer Untersuchung nicht möglich, das Ausmaß der ICAM-1 und VCAM-1-Expression verlässlich zu quantifizieren. Dies lag zum einen an der diffusen Verteilung innerhalb der Plaques und zum anderen an dem im Vergleich zur T-Zell- und Makrophagenfärbung schwächeren immunzytochemischen Färbesignal. Qualitativ

fand sich VCAM-1 endothelial im Bereich kleiner Blutgefäße in der fibrösen Kappe der Plaques und hier häufig in Verbindung mit perivaskulären T-Zellinfiltraten. Zusätzlich fand sich eine massive Expression von VCAM-1 auf glatten Muskelzellen. Ein ähnliches Verteilungsmuster von ICAM-1 und VCAM-1 wurde an arteriosklerotisch veränderten Coronararterien beschrieben (Poston et al., 1992; Davies et al., 1993; O'Brien et al, 1993, 1996; Van der Wal et al, 1994; Braun et al., 1995). VCAM-1 vermittelt die Adhärenz von T-Zellen an humane Endothelzellen (Carlos et al., 1990). Im Tierversuchen führte eine atherogene Diät zu einer verstärkten endothelialen Expression von VCAM-1 während der Atherogenese, was wahrscheinlich zu der beobachteten Zellinfiltration in arteriosklerotisch veränderte Gefäßwände beiträgt (Cybulsky & Gimbrone, 1991; Li et al, 1993). Die funktionelle Bedeutung der Expression von VCAM-1 auf glatten Muskelzellen in arteriosklerotischen Plaques ist bislang unklar. VCAM-1 spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Aktivierung glatter Muskelzellen und in der Repairphase nach Gefäßläsionen (Oguchi et al., 2000). Die Blockierung von VCAM-1 im Tierexperiment durch Antikörper führte zu einer drastischen Reduktion der Makrophageninfiltration und Neointimaformation nach periadventitieller Verletzung der Arteria carotis. VCAM-1 kann darüber hinaus als kostimulatorisches Molekül zur Restimulation und Proliferation von T-Zellen beitragen (Burkly et al., 1991). In vitro-Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass humane vaskuläre glatte Muskelzellen im Gegensatz zu Endothelzellen, T-Zellen in der Proliferation eher hemmen (Murray et al., 1995).

#### **4.3 T-Zell- und Makrophagenmediatoren mit potentiell pathophysiologischer Bedeutung bei der Plaquestabilisierung: Matrixmetalloproteinasen und Tissue-Faktor**

Worin könnte das Bindeglied zwischen der Entzündungsreaktion in der Gefäßwand von Carotisstenosen, dem Entstehen einer Plaquelulzeration und der Aktivierung des Gerinnungssystems an der Gefäßwand mit konsekutiver Embolisation ins Hirngewebe bestehen? Von T-Zellen gebildete Zytokine, wie das Interferon- $\gamma$ , können Makrophagen so aktivieren (Hansson et al, 1989; Del Prete et al, 1995), dass diese matrixabbauende Metalloproteinasen (MMP) (Henney et al, 1991; Galis et al, 1994) und den prothrombotisch wirkenden Immunmediator Tissue Faktor (TF) produzieren (Wilcox et al, 1989; Moreno et al, 1996). MMPs bauen Bestandteile der Extrazellulärmatrix ab und können damit potentiell die fibröse Kappe eines Plaques zur Ruptur prädisponieren. Entsprechend konnten Henney und Mitarbeiter (1991) die MMP Stromelysin in glatten Muskelzellen und in Makrophagen/Schaumzellen in arteriosklerotisch veränderten Gefäßplaques nachweisen. In einer anderen Studie wurde die Expression weiterer MMPs, der interstitiellen Kollagenase MMP 1 (Funktion: Abbau von fibrillärem Kollagen) und der Gelatinasen MMP 2 und 9 (Funktion: Abbau von Kollagenen, Elastin) in humanen arteriosklerotischen Plaques und gesunden Arterien untersucht (Galis et al, 1994). Dabei zeigte sich eine funktionelle Aktivität in arteriosklerotischen, jedoch nicht in den gesunden Gewebeproben. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine erhöhte Makrophagendichte und –aktivität durch Sekretion von MMP mit Umbau der fibrösen Deckplatte vermehrt zu Plaquerupturen führen kann (Shah et al, 1995; Nikkari et al., 1995; Halpert et al 1996). Auf das Carotissystem bezogen konnte die Arbeitsgruppe um Loftus in einer rezenten Arbeit die besondere Rolle von MMP 9 belegen (Loftus et al., 2000). Die Konzentration von biologisch aktivem MMP 9 war in der Gefäßwand symptomati-

scher Carotisstenosen gegenüber asymptomatischen drastisch erhöht. Die MMP 9-Aktivität konzentrierte sich im Bereich der entzündlichen Infiltrate und war sowohl extrazellulär als auch intrazellulär in Makrophagen nachweisbar, was die in unserer Arbeit prognostizierte pathophysiologische Bedeutung der Entzündungsreaktion für die Destabilisierung von Carotisstenosen weiter untermauert.

Die Entzündungsreaktion könnte noch an einer zweiten Stelle eine kritische Bedeutung in der Plaquestabilisierung haben. Der Tissue Factor (TF) ist ein membrangebundenes Glykoprotein, der über die Bindung an aktivierten Faktor VII direkt in das Blutgerinnungssystem eingreifen kann und die Thrombenbildung fördert (Toschi et al., 1995; Thiruvikraman et al., 1996; Tremoli et al., 1999). Damit ist TF ein Kandidatenmolekül, das eine Verbindung zwischen der Entzündungsreaktion im Plaque einerseits und der Entstehung von arteriellen Thrombembolien an der Plaqueoberfläche andererseits herstellen könnte (Mach et al., 1997). T-Zellen und Makrophagen sind eine wichtige Quelle von TF (Del Prete et al., 1995; Camerer et al., 1996). In einer durch die hier vorgelegte Untersuchung zur T-Zell- und Makrophageninfiltration bei Carotisprozessen inspirierten weiteren Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe konnte zwischenzeitlich tatsächlich ein statistisch hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der TF-Expression im Plaque und klinischen Zeichen der Destabilisierung von Carotisstenosen gezeigt werden (Wendt, Dissertation an der HHU in Vorbereitung).

#### 4.4 Klinischer Ausblick

Derzeit ist die Thrombendarterektomie der Goldstandard der Therapie bei höhergradigen (>70%) symptomatischen Carotisstenosen. Der über viele Jahre anhaltende klinische Nutzen der Thrombendarterektomie ist durch zahlreiche Studien belegt, aber kritisch von einer niedrigen perioperativen Komplikationsrate abhängig, die unter 8% liegen sollte (Barnett und Meldrum, 2000). Bei den niedriggradigeren symptomatischen und den asymptomatischen Stenosen ist das Risiko/Nutzenverhältnis wesentlich ungünstiger und das Vorgehen operativ versus konservativ umstritten (CASANOVA, 1991; Rothwell und Warlow, 1999; Barnett und Meldrum, 2000). Wegen dieses relativ schmalen therapeutischen Korridors kommt einer Verbesserung der konservativen Therapie eine besondere Bedeutung zu. Aufgrund der hier beschriebenen Korrelation zwischen Inflammation und Plaquestabilisierung und weiteren Hinweisen für plaquestabilisierende Faktoren aus der Literatur (Matrixmetalloproteinasen) (Loftus et al., 2000; Golledge et al., 2000) erscheint es denkbar, pharmakologisch die Progression arteriosklerotischer Prozesse zu verzögern und insbesondere die Konversion einer asymptomatischen in eine symptomatische Stenose zu beeinflussen. Dazu gibt es bereits erste Hinweise mit bewährten Pharmaka, deren präventive Wirkung allerdings bislang nicht vor dem Hintergrund ihres antiinflammatorischen Effekts diskutiert wurde. Acetylsalizylsäure senkt das Risiko weiterer ischämischer Episoden bei Patienten mit TIA's bzw. leichteren Schlaganfällen um etwa ein Viertel (Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994; Easton et al., 1999). Dieser Effekt wurde bislang allein auf die Verminderung der Plättchenaggregation zurückgeführt. ASS wirkt darüber hinaus aber auch antiinflammatorisch durch Blockierung der Synthese proinflammatorischer Zytokine (Hachicha et al., 1999). Statine senken das Schlaganfallrisiko und die Häufigkeit von TIAs bei Patienten mit koronarer

Herzkrankheit um 30% (Blauw et al., 1997; Hess et al., 2000). Dieser Effekt wurde zunächst auf deren cholesterinsenkenden Effekt über die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, dem Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese, zurückgeführt. Die Subgruppenanalyse zeigte aber, dass die protektive Wirkung unabhängig vom Ausgangscholesterinwert war und auch Patienten mit Normwerten profitierten. Möglicherweise beruht der therapeutische Effekt auf den immunmodulatorischen Eigenschaften von Statinen (McPherson et al., 1993; Hess et al., 2000). Die lipophilen Statine, Fluvastatin und Simvastatin hemmen die Expression von Tissue-Faktor in Makrophagen (Colli et al., 1997), reduzieren die Sekretion der Matrixmetalloproteinase-9 (Bellosa et al., 1998) und inhibieren die CD11b-vermittelte Adhäsion von Monozyten an Gefäßendothelien (Weber et al., 1997). Damit ist ein direkter Einfluss der Statine auf die in der vorliegenden Arbeit gezeigten und diskutierten inflammatorischen Prozesse in der Gefäßwand von Carotisarterien naheliegend. Antiinflammatorische Therapiestrategien werden mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Zukunft neben der Operation und der Antikoagulation eine wichtige Rolle in der Sekundärprophylaxe thrombembolischer cerebrovaskulärer Ereignisse spielen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Stenosen der Arteria carotis interna (ACI) sind eine häufige Ursache cerebraler Durchblutungsstörungen hervorgerufen durch lokal induzierte Thrombembolien. Dabei ist das Schlaganfallrisiko einer ACI-Stenose nicht allein vom Stenosegrad, sondern wesentlich von bisher unbekanntem molekularen Faktoren im Plaque selbst abhängig, die passager eine chronische Arteriosklerose in einen gefährlichen instabilen Gefäßprozess mit hohem Schlaganfallrisiko verwandeln. Die pathophysiologische Rolle von Entzündungsprozessen in der allgemeinen Arterioskleroseentwicklung ist allgemein anerkannt, deren funktionelle Rolle bei der Destabilisierung von Gefäßprozessen aber weitgehend unklar. In der vorliegenden Untersuchung konnten wir erstmalig am System der Arteria carotis interna zeigen, dass das Ausmaß der entzündlichen Infiltration im Plaque mit klinischen und paraklinischen Merkmalen der Plaqueinstabilität korreliert.

Hierzu wurden Paraffinschnitte von 37 Thrombendarerektomiepräparaten der ACI mittels der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode mit Antikörpern gegen ein Makrophagenantigen (CD68), T-Zellen (CD3), das HLA-DR-Antigen und gegen die Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 gefärbt. Pro Plaque wurde in 2mm Abständen etwa 11 Schnitte analysiert um einen repräsentativen Querschnitt über den Gesamtplaque zu erhalten und einen Selektionsbias zu vermeiden. Dabei wurde das Färbemuster zwischen zuvor symptomatischen Patienten (n=21) mit dem zuvor asymptomatischer Patienten (n= 16) verglichen. Darüber hinaus erfolgte eine Quantifizierung der Makrophageninfiltration mit Hilfe der computergestützten Planimetrie, T-Zellinfiltrate wurden einzeln ausgezählt. Die Eingruppierung in die Gruppe der symptomatischen bzw. asymptomatischen Carotisstenosen erfolgte klinisch nach den international anerkannten

NASCET-Kriterien. Als zusätzlicher Parameter der Instabilität wurde die Mikroemboliedetektion mittels transkranieller Dopplersonographie herangezogen. Die quantitative Auswertung ergab, dass der prozentuale Anteil makrophagenreicher Areale und die Anzahl der T-Zellen pro Schnittfläche in  $\text{mm}^2$  bei den symptomatischen Patienten signifikant größer war als bei den asymptomatischen (Makrophagen:  $18 \pm 10\%$  gegen  $11 \pm 4\%$ ,  $p=0,005$ ; T-Zellen:  $71,2 \pm 34,4 \text{ mm}^2$  gegen  $40,5 \pm 31,4 \text{ mm}^2$ ,  $p=0,005$ ). Der Nachweis von Mikroembolien als paraklinischem Surrogatmarker der Plaqueinstabilität war ebenfalls mit einem statistisch signifikant erhöhten Makrophagenanteil assoziiert. Makrophagen- ( $19 \pm 10\%$  gegen  $9 \pm 3\%$ ,  $p=0.0009$ ) und T-Zellinfiltration ( $71.5 \pm 39.0 \text{ mm}^2$  gegen  $46,4 \pm 22 \text{ mm}^2$ ,  $p=0.045$ ) waren in atheromatösen Plaques stärker ausgeprägt als in fibrösen. Eine Korrelation zur pathoanatomischen Merkmalen der Plaqueinstabilität wie Plaqueulzeration und Thrombenbildung zeigte sich nicht. In den Plaques fand sich darüber hinaus eine deutliche Expression von HLA-DR-Molekülen und den Zelladhäsionsmolekülen VCAM-1 und ICAM-1.

Zusammenfassend sprechen unsere Befunde für eine pathophysiologische Rolle plaqueinfiltrierender Makrophagen und T-Zellen bei der klinischen Destabilisierung von hochgradigen Stenosen der ACI. Matrixmetalloproteinasen und der Tissue-Faktor sind Makrophagen- und T-Zellprodukte, die als molekulare Mediatoren der Plaquestabilisierung von Carotisstenosen in Betracht kommen. Weitere Untersuchungen der zugrundeliegenden Effektormechanismen führen möglicherweise zu neuen antiinflammatorischen Behandlungsstrategien in der Sekundärprophylaxe cerebraler Durchblutungsstörungen.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Ahlbeck-Glader C, Stegmayr B, Boman J et al. Chlamydia pneumoniae antibodies and high lipoprotein(a) levels do not predict ischemic cerebral infarctions. *Stroke* 1999;30:2013-2018

Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy. I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994;308:83-108

Avril G, Batt M, Guidoin R et al. Carotid endarterectomy plaques: correlations of clinical and anatomic findings. *Ann Vasc Surg* 1991;5:50-54

Babikian VL, Wijman CA, Hyde C et al. Cerebral microembolism and early recurrent cerebral or retinal events. *Stroke* 1997;28:1314-1318

Ballotta E, Da Giau G, Renon L (2000) Carotid plaque gross morphology and clinical presentation: a prospective study of 457 carotid artery specimens. *J Surg Res* 89:78-84

Barnett HJM, Taylor DW, Eliasziw M et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate to severe stenosis. *New Engl J Med* 1998;339:1415-1425

Barnett HJM, Meldrum HE. Carotid endarterectomy: a neurotherapeutic advance. *Arch Neurol* 2000;57:40-45

Bassiouny HS, Sakaguchi Y, Mikucki SA et al. Juxtalumenal location of plaque necrosis and neoformation in symptomatic carotid stenosis. *J Vasc Surg* 1997;26:585-594

Bellosta S, Via D, Canavesi M et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secre-

tion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1671-1678

Blauw GJ, Lagaay M, Smelt AHM et al. Stroke, statins and cholesterol. *Stroke* 1997;28:946-950

Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1983;Feb8:307-310

Boyll JJ. Association of coronary plaque rupture and atherosclerotic inflammation. *Am J Pathol* 1997;181:93-99

Braun M, Pietsch P, Felix SB, Baumann G. Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:2571-2579

Buja LM, Willerson JT. Role of inflammation in coronary plaque disruption. *Circulation* 1994;89:503-505

Burkly LC, Jakubowski A, Newman BM et al. Signaling by vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) through VLA-4 promotes CD3-dependent T cell proliferation. *Eur J Immunol* 1991;21:2871-2875

Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cellbiology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996;81:1-41.

Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL et al. Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 1990;76:965-970

Carr S, Farb A, Pearce WL et al. Atherosclerotic plaque rupture in symptomatic carotid

artery stenosis. *J Vasc Surg* 1996;23:755-765

Carr S, Farb A, Pearce WH et al. Activated inflammatory cells are associated with plaque rupture in carotid artery stenosis. *Surgery* 1997;122:757-764

CASANOVA Study Group. Carotid surgery versus medical therapy in asymptomatic carotid stenosis. *Stroke* 1991;22:1229-1235

Colli S, Eligini S, Lalli M et al. Vastatins inhibit tissue factor expression in cultured human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 ;17 :265-272

Consensus Committee of the Ninth International Cerebral Hemodynamic Symposium. Basic identification criteria of doppler microembolic signals. *Stroke* 1995;26:1123

Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-791

Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring - the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985;53:363-373

Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223-229

DeGraba TJ, Siren AL, Penix L et al. Increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 in symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaques. *Stroke* 1998;29:1405-1410

Del Prete G, De Carli M, Lammel RM et al. Th1 and Th2 T-helper cells exert opposite regulatory effects on procoagulant activity and tissue factor production by human monocytes. *Blood* 1995;86:250-257

Duguid JB. Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J Pathol Bacteriol* 1946;58:207-212

Easton JD, Diener HC, Bornstein NM et al. Antiplatelet therapy: views from the experts. *Neurology* 1999; 53(suppl 4):S32-S37

Esposito G, Blasi F, Allegra L et al. Demonstration of viable *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques of carotid arteries by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Ann Vasc Surg* 1999;13:412-425

European Carotid Surgery Trialists Collaborative Group. Risk of stroke in the distribution of an asymptomatic carotid artery. *Lancet* 1995;345:209-212

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;351:1379-1387

Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA* 1995;273:1421-1428

Fernández-Ortiz A, Badimon JJ et al. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: Implication for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1562-1569

Forteza AM, Babikian VL, Hyde C et al. Effect of time and cerebrovascular symptoms on the prevalence of microembolic signals in patients with cervical carotid stenosis. *Stroke* 1996;27:687-690

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (first of two parts). *N Engl J Med* 1992;326:242-250

Fuster V, Badimon JJ, Chesebro JH, Fallon JT. Plaque rupture, thrombosis, and therapeutic implications. *Haemostasis* 1996;26:269-284

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-2503

Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000;31:774-781

Gown AM, Tsukada T, Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1986;125:191-207

Hachicha M, Pouliot M, Petasis NA et al. Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. *J Exp Med* 1999;189:1923-1930

Hajjar DP, Fabricant DG, Minick CR, Fabricant J. Virus-induced atherosclerosis. Herpesvirus infection alters aortic cholesterol metabolism and accumulation. *Am J Pathol* 1986;122:62-70

Halpert I, Sires UI, Roby JD et al. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9748-9753

Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989;135:169-175

Hennerici M, Hülsbömer HB, Hefter H et al. Natural history of asymptomatic extracranial arterial disease. *Brain* 1987;110:777-791

Henney AM, Wakely PR, Davies MJ et al. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8154-8158

Hess DC, Demchuk AM, Brass LM et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins): a promising approach to stroke prevention. *Neurology* 2000;54:790-796

Hobson RW, Weiss DG, Fields WS et al. Efficacy of carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. *N Engl J Med* 1993;328:221-227

Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 1979;6:65-70

Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC et al. Isolation of chlamydia pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen. *J Infect Dis* 1997;176:292-295

Jander S, Sitzer M, Schumann R et al. Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. *Stroke* 1998;29:1625-1630

Jonasson L, Holm J, Skalli O et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 1986;6:131-138

Jungquist G, Nilsson B, Ostberg H et al. Carotid artery blood flow velocity related to transient ischemic attack and stroke in a population study of 69-year-old men. *Stroke* 1989;20:1327-1330

Kaartinen M, Penttila A, Kovanen PT. Mast cells in rupture-prone areas of human coronary atheromas produce and store TNF- $\alpha$ . *Circulation* 1996;94:2787-2792

Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1501-1504

Lendon CL, Davies MJ, Born GVR, Richardson PD. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased. *Atherosclerosis* 1991;87:87-90

Levi CR, O'Malley HM, Fell G et al. Transcranial Doppler detected cerebral microembolism following carotid endarterectomy. High microembolic signal loads predict postoperative cerebral ischemia. *Brain* 1997;120:621-629

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscl Thromb* 1993;13:197-204

Lichtman AH, Cybulsky M, Lusinskas FW. Immunology of atherosclerosis: the promise of mouse models. *Am J Pathol* 1996;149:351-357

Loftus IM, Naylor AR, Goodall S. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques: a potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 2000;31:40-47

Maass M, Krause E, Engel PM, Kruger S. Endovascular presence of chlamydia pneumoniae in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology* 1997;48:699-706

Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY et al. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40. *Circulation* 1997;96:396-399

Markus HS, Ackerstaff R, Babikian V et al. Intercenter agreement in reading doppler embolic signals. A multicenter international study. *Stroke* 1997;28:1307-1310

Masawa N, Yoshida Y, Yamada T et al. Three-dimensional analysis of human carotid atherosclerotic ulcer associated with recent thrombotic occlusion. *Pathol Int* 1994;44:745-752

Mayberg MR, Wilson SE, Yatsu F et al. Carotid endarterectomy and prevention of cerebral

ischemia in symptomatic carotid stenosis. Veterans Affairs Cooperative Studies Program 309 Trialist Group. JAMA 1991;266:3289-3294

McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. J Clin Invest 1993;92:1004-1008

McPherson R, Tsoukas C, Baines MG. Effect of lovastatin on natural killer cell function and other immunological parameters in man. J Clin Immunol 1993;13:439-444

Moreno PR, Falk E, Palacios IF et al. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. Circulation 1994;90:775-778

Moreno PR, Bernardi VH, López-Cuéllar J et al. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Circulation 1996;94:3090-3097

Mosorin M, Surcel HM, Laurila A et al. Detection of chlamydia pneumoniae-reactive T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:1061-1067

Murray AG, Libby P, Pober JS. Human vascular smooth muscle cells poorly co-stimulate and actively inhibit allogenic CD4+ T cell proliferation in vitro. J Immunol 1995;154:151-161

Neri Serneri GG, Prisco D et al. Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. Circulation 1997;95:1806-1812

Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M et al. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. Circulation 1995;92:1393-1398

North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. N Engl J Med 1991;325:445-453

O'Brien KD, McDonald TO, Chait A et al. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leucocyte content. *Circulation* 1996;93:672-682

O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human atherosclerotic plaques: implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1993;92:945-951

Oguchi S, Dimayuga P, Zhu J et al. Monoclonal antibody against vascular cell adhesion molecule-1 inhibits neointimal formation after periadventitial carotid artery injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1729-1736

Poston RN, Haskard DO, Coucher J et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1992;140:665-673

Rosenfeld ME, Palinski W, Yla-Herttuala S, Carew TE. Macrophages, endothelial cells, and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Toxicol Pathol* 1990;18:560-571

Ross R. Rous-Whipple award lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol* 1993a;143:987-1002

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993b;362:801-809

Rothwell PM, Warlow CP. Prediction of benefit from carotid endarterectomy in individual patients: a risk modelling study. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1999;353:2105-2110

Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992;339:883-887

Shah PK, Falk E, Badimon JJ et al. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995;92:1565-1569

Shor A, Phillips JJ. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *JAMA* 1999;282:2071-2073

Siebler M, Sitzer M, Steinmetz H. Detection of intracranial emboli in patients with symptomatic extracranial carotid artery disease. *Stroke* 1992;23:1652-1654

Siebler M, Sitzer M, Rose G et al. Silent cerebral embolism caused by neurologically symptomatic high-grade carotid stenosis: event rates before and after carotid endarterectomy. *Brain* 1993;116:1005-1015

Siebler M, Kleinschmidt A, Sitzer M et al. Cerebral microembolism in symptomatic and asymptomatic high-grade internal carotid artery stenosis. *Neurology* 1994;44:615-618

Siebler M, Nachtmann A, Sitzer M et al. Cerebral microembolism and the risk of ischemia in asymptomatic high-grade internal carotid artery stenosis. *Stroke* 1995;26:2184-2186

Sitzer M, Müller W, Siebler M et al. Plaque ulceration and lumen thrombus are the main sources of cerebral microemboli in high-grade internal carotid artery stenosis. *Stroke* 1995;26:1231-1233

Spencer MP, Thomas GI, Nicholls SC, Sauvage LR. Detection of middle cerebral artery emboli during carotid endarterectomy using transcranial doppler ultrasonography. *Stroke* 1990;21:415-423

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-434

Stemme S, Holm J, Hansson GK. T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are mem-

ory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscler Thromb* 1992;12:206-211

Stemme S, Faber B, Holm J et al. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3893-3897

Thiruvikraman SV, Guha A, Roboz J et al. In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X. *Lab Invest* 1996;75:451-461

Toschi V, Fallon JT, Gallo R et al. Tissue factor predicts the thrombogenicity of human atherosclerotic plaque components. *Circulation* 1995;92(suppl I):I-112

Tremoli E, Camera M, Toschi V et al. Tissue factor in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999;273-283

Van der Wal AC, Das PK, Benz van de Berg D et al. Atherosclerotic lesions in humans: in situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 1989;61:166-170

Van der Wal AC, Becker AE, Das PK. The expression of adhesion molecules on endothelial cells in atherosclerosis has a topographic relationship with the underlying inflammatory process. *Histopathology* 1994a;24:200-201

Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994b;89:36-44

Van Zuilen, Moll FL, Vermeulen FE et al. Detection of cerebral microemboli by means of transcranial Doppler monitoring before and after carotid endarterectomy. *Stroke* 1995;26:210-213

Virchow R. Phlogose und Thrombose im Gefässsystem. In: Virchow R., ed. Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin. Berlin: Meidinger Sohn & Co.; 1856:458-463

Von Rokitansky C. A manual of pathological anatomy. Day GE, transl. Vol 4. London: The Sydenham Society: 1852

Weber C, Erl W, Weber KS et al. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and Cd11-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1212-1217

Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2839-2843

Wimmer ML, Sandmann-Strupp R, Saikku P, Haberl RL. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke* 1996;27:2207-2210

Yamashita K, Ouchi K, Shirai M et al. Distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the atherosclerotic carotid artery. *Stroke* 1998;29:773-778

Yeghiazarians Y, Braunstein JB, Askari A, Stone PH. Unstable angina pectoris. *New Engl J Med* 2000;342:101-114

Zhou X, Stemme S, Hansson GK. Evidence for a local immune response in atherosclerosis: CD4<sup>+</sup> T cells infiltrate lesions in apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol* 1996;149:359-366

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name René Schumann  
Geburtsdatum 28.6.1971  
Geburtsort Szentes / Ungarn  
Familienstand ledig  
Eltern Erzsébet Schumann (Außenhandelskorrespondentin)  
Dr. Ralf Schumann (Unfall-, und Handchirurg)  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Wohnort 44137 Dortmund, Beurhausstr. 25

## Schul-, Hochschulbildung und ärztliche Tätigkeit

1978-1983 Grundschule in Dessau  
1983-1987 Grundschule in Eger (Ungarn)  
1987-1992 A.-Einstein-Gymnasium Kaarst, *Abitur* 1992  
  
10/1992 *Beginn des Medizinstudiums* an der H.-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf  
9/1994 *Physikum*  
8/1995 *1. Staatsexamen*  
WS 1997 Urlaubssemester zur Fertigstellung des experimentellen Teils der Doktorarbeit  
Frühj. 1998 *2. Staatsexamen*, anschließend *PJ*-Beginn in der Schweiz  
Frühj. 1999 *3. Staatsexamen*  
  
9/99-2/01 *AiP*: Klinik für Plastische Chirurgie, Prof. Olbrisch, FNK, Diakonie Kaiserswerth  
3/01-5/01 *Assistenzarzt*: Klinik für Plastische Chirurgie, Prof. Olbrisch  
5/01-1/02 *Assistenzarzt*: Herz-Thorax-Gefäßchirurgie, Prof. Polonius, Städt. Kliniken Dortmund  
1/02- *Assistenzarzt*: Allgemein- und Unfallchirurgie, PD Dr. Walz, Essen Kliniken-Mitte

## Famulaturen und Praktika in den Semesterferien

1995 1 Monat *Allgemein- und Unfallchirurgie*, Dominikus-Krankenhaus Düsseldorf, Prof. Husemann  
1996/97 3 Monate in der Klinik für *Plastische Chirurgie*, Prof. Olbrisch, Düsseldorf  
1996 Praxis für Allgemeinmedizin (2 Wochen), Fr. Dr. Finken, Neuss  
1997 Gynäkologie und Geburtshilfe (2 Wochen), Lukaskrankenhaus Neuss, Prof. Bokelmann

## Praktisches Jahr

4-8/1998 *Innere Medizin*, Regionalspital Burgdorf (Schweiz), PD Dr. Cottier  
8-11/1998 *Allgemein-, Unfall-, und Gefäßchirurgie*, HHU Düsseldorf, Prof. Röher  
11/98-3/99 *Kiefer- und Plast. Gesichtschirurgie*, HHU Düsseldorf, Prof. Lentrodt

## Zusatzvorlesungen während des Studiums

- *Plastische Chirurgie*; Prof. Olbrisch, Prof. Ingianni; HHU Düsseldorf
- *Medical English* mit Abschlußklausur bei Frau Nieroba, HHU Düsseldorf

- 2. PJ-Tertial: *Chirurgievorlesung für PJ-ler.*
- 3. PJ-Tertial: *Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie.* (Prof. Lentrodt, HHU)

### Dissertation

Vergleichende immunhistochemische Untersuchung zur T-Zell- und Makrophageninfiltration symptomatischer und asymptomatischer Stenosen der Arteria carotis interna.

Eine *immunhistochemische experimentelle Arbeit* an humanen Thrombendarterektomie-Präparaten (9/1995-12/1998); Neurologische Klinik der HHU Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. H.J. Freund; Doktorvater: Prof. Dr. G. Stoll; Betreuer: Dr. S. Jander

*Veröffentlichung:* Inflammation in High-Grade Carotid Stenosis: A Possible Role for Makrophages and T Cells in Plaque Destabilization.; S. Jander, MD; M. Sitzler, MD; R. Schumann; M. Schröter, MD; M. Siebler, MD; H. Steinmetz, MD; G. Stoll, MD (*Stroke*. 1998; 29: 1625-1630.)

### Aktivitäten während des AiP's

- Beginn der assoziierten Mitgliedschaft in der VDPC im November 2000
- *Studentenunterricht* (15x je 45 Min.)
- 5 präsentierte *Vorträge* im Rahmen von VDPC-Fortbildungsveranstaltungen: 2x zum Thema Mammacarcinom, 2x UAL-Fettsaugung, 1x Mißbildungen der Brust
- *Qualitätssicherung* der Mammareduktionsplastiken 1998-1999 für die VDPC

### Fortbildungen und Lehrveranstaltungen

- 1999 • *Internet für Mediziner*, FNK der Diakonie Kaiserswerth.  
 2000 • 3 *Strahlenschutzkurse* für Mediziner (Einführungskurs, Grundkurs, Spezialkurs)  
 • 2 *Mammasonographiekurse* mit DEGUM-Zertifikat (Grundkurs, Aufbaukurs)

### VDPC-Kurse

- 2001 • Prim. und sek. Behandlung von Verbrennungsverletzungen; Prof. Pallua, Aachen (2 Tage)  
 • Mikrochirurgischer Nahtkurs Teil 1; Prof. Pallua, Aachen (2 Tage)  
 • Facialisparesie, Reanimation mit Muskelerersatzplastiken; PD Dr. Exner, Frankfurt (1 Tag)  
 2002 • Bewährtes und Aktuelles in der Handchirurgie; PD Dr. Erbs, Hagen (2 Tage)

Weitere geplante Kurse 2002:

- Rhinoplastik; Dr. Schaff, Dachau (2 Tage)
- Techniken der Lappenhebung; Prof. Ingianni, Wuppertal (2 Tage)
- Mikrochirurgische Mammarekonstruktion; Prof. Pallua, Aachen (2 Tage)
- Arzt im Rettungsdienst, Krefeld (1 Woche)

### Sonstiges

- EDV            Anwendungsorientierte Kenntnisse mit Word, Powerpoint, Excell und WinOnCD;  
                   Internetrecherchen  
 Sprachen     Englisch, Ungarisch

René Schumann