

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Neurologische Klinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer)

Charakterisierung zirkulierender Vorläuferzellen und Zytokine bei stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna

Peter Zepper

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

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. J. H. Poppert
2. Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer

Die Dissertation wurde am 29.11.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2011 angenommen.

Mit dem Wissen wächst der Zweifel.

(Johann Wolfgang von Goethe)

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungen	5
1. Einleitung	8
1.1 Atherosklerose	8
1.1.1 Epidemiologie und Problemstellung	8
1.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose	9
1.1.3 Klinische Auswirkungen der Atherosklerose	10
1.2 Plaquestabilität und –instabilität	11
1.2.1 Histologie	11
1.2.2 Bildgebende Verfahren zur Untersuchung der Plaquestabilität	13
1.3 Zirkulierende Vorläuferzellen	16
1.3.1 Ursprung	16
1.3.2 Klassifikation und Marker von Stamm- und Vorläuferzellen	17
1.3.3 Charakterisierung endothelialer Vorläuferzellen	18
1.3.4 Mobilisation zirkulierender Vorläuferzellen	19
1.3.5 Rekrutierung zirkulierender Vorläuferzellen zum Zielorgan durch Interaktion von CXCR4 mit SDF-1	20
1.3.6 Vaskuläre Reparaturmechanismen durch zirkulierende Vorläuferzellen	23
1.4 Messung zirkulierender Vorläuferzellen mittels Durchflusszytometrie	24
1.5 Zytokine in atherosklerotischen Plaques	27
1.5.1 „Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung“	27
1.5.2 Definition und Einteilung der Zytokine	27
1.5.3 Produktion von Zytokinen in atherosklerotischen Plaques	28
1.5.4 Funktion der Zytokine in atherosklerotischen Plaques	30
1.6 Weitere Entzündungsmarker	32
1.6.1 Fibrinogen	32
1.6.2 High-sensitivity C-reaktives Protein	32
1.7 Fragestellung	32
2. Material und Methodik	34
2.1 Studienplanung- und durchführung	34
2.2 Magnetresonanztomographie	35
2.3 Durchflusszytometrie	36
2.3.1 Laborprotokoll der Studie	36
2.3.2 Bestimmung der CD133+ zirkulierenden Vorläuferzellen	38
2.3.3 Bestimmung der VEGFR2+/CD34+ zirkulierenden Vorläuferzellen	40
2.3.4 Bestimmung der absoluten Anzahl der CD133+ und VEGFR2+/CD34+ Vorläuferzellen	43
2.3.5 Bestimmung der Oberflächenexpression von CXCR4	43
2.4 Quantitative Zytokinbestimmung	44
2.5 Weitere Laboruntersuchungen	45
2.6 Statistische Analyse	45
3. Ergebnisse	47
3.1 Klinische Daten	47

3.2	MRT-Plaque-Imaging	48
3.3	Zirkulierende Vorläuferzellen	51
3.3.1	Zirkulierende CD133+ und VEGFR2+/CD34+ Vorläuferzellen	51
3.3.2	CXCR4-Oberflächenexpression auf CD133+ Vorläuferzellen	54
3.4	Zytokine	55
3.5	Weitere Ergebnisse	59
4.	Diskussion	60
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
4.2	MRT-Methode	60
4.2.1	Detektion von Hochrisikopatienten	60
4.2.2	Limitationen der MRT-Methode	61
4.3	Quantitative Messung der Vorläuferzellen	61
4.3.1	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung zirkulierender Vorläuferzellen	61
4.3.2	Messung zirkulierender und endothelialer Vorläuferzellen	63
4.3.3	Methode der Durchflusszytometrie	64
4.4	CXCR4-Oberflächenexpression	65
4.4.1	Ergebnisse der CXCR4-Oberflächenexpression	65
4.4.2	Mögliche Bedeutung der erhöhten CXCR4-Oberflächenexpression für Reendothelialisierung und Neovaskularisation in instabilen Plaques	66
4.5	Zytokine	68
4.5.1	Ergebnisse der Zytokinmessung	68
4.5.2	Zytokine und zirkulierende Vorläuferzellen	70
4.5.3	Fibrinogen und hs-CRP	71
5.	Zusammenfassung	72
6.	Anhang	73
6.1	Literaturverzeichnis	73
6.2	Abbildungsverzeichnis	83
6.3	Tabellenverzeichnis	85
6.4	Standardisierter Fragebogen	86
	Lebenslauf	91
	Danksagung	92

Abkürzungen

ACI	Arteria carotis interna
ACST	Asymptomatic Carotid Surgery Trial
AHA	American Heart Association
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
apoE	Apolipoprotein E
bzw.	beziehungsweise
CAS	Carotid artery stenting
CD	Cluster of differentiation
CEA	Carotid endarterectomy
CMV	Zytomegalie-Virus
CPDA	Citrat Phosphat Dextrose Arginin
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Colony stimulating factor
CT	Computertomographie
CXCL12	C-X-C-motiv-Chemokin-12
CXCR4	C-X-C-motiv-receptor-4
EC	Endothelzellen
ECST	European Carotid Surgery Trial
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPC	Endothelial progenitor cells
EPO	Erythropoetin
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Floureszein-Isothiozyanit
FL	Fluoreszenz
FOV	Field of view
FSC	Forward scatter
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-monocyte-colony stimulating factor
HB-EGF	Heparin-binding epidermal growth factor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

Abkürzungen

HSC	Hematopoetic stem cell
hs-CRP	High-sensitivity C-reaktives Protein
HSV	Herpes-simplex-Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
L-18 BP	Interleukin-18 Bindeprotein
LDL	Low density lipoprotein
LY	Lymphozyten
Mac.	Makrophagen
MCP-1	Monocyte-chemoattractant-protein-1
M-CSF	Monocyte-colony stimulating factor
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MO	Monozyten
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymal stem cell
NEX	Number of excitations
NKTcells	Natürliche Killerzellen
ox-LDL	Oxidiertes LDL
PBS	Phosphatase buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDW	Protonendichtewichtung
PE	Phycoerythrin
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
SDF-1	Stromal cell derived factor-1
SEM	Standard error of the mean
Sig	Signifikanz
SMC	Smooth muscle cells
SSC	Side scatter
TE	Time to echo
TGF	Transforming growth factor

Abkürzungen

TIA	Transitorisch ischämische Attacke
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TR	Time of repetition
Treg	Regulatorische T-Zellen
T1W	T1-gewichtet
T2W	T2-gewichtet
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
vWF	von Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel
3D TOF	3-dimensionale time-of-flight
7-AAD	7-Amino-Actinomycin-D

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Epidemiologie und Problemstellung

Die Atherosklerose ist die Hauptursache von Herzinfarkten und zerebralen Infarkten und somit verantwortlich für die am häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen der westlichen Welt. Der zerebrale Infarkt ist darüber hinaus die häufigste Ursache einer bleibenden Behinderung im Erwachsenenalter. In Deutschland werden jährlich zwischen 200000 und 250000 Menschen wegen eines erstmalig oder wiederholt akut aufgetretenen Schlaganfalls behandelt (Kolominsky-Rabas und Heuschmann, 2002). Der Großteil der Schlaganfälle ist ischämisch bedingt, nur etwa 15% sind durch eine Blutung verursacht. Etwa zwei Drittel der ischämischen Schlaganfälle werden durch eine Embolie ausgelöst, und zwar zu ähnlichen Teilen auf dem Boden einer arterio-arteriell und kardiogen verursachten Embolie.

Der weitaus größte Teil der arterio-arteriell verursachten Schlaganfälle entsteht auf dem Boden einer atherosklerotisch bedingten Stenose großer hirnversorgender Gefäße, in der überwiegenden Zahl der Fälle der Arteria carotis interna (ACI) (Sacco et al., 1989; Kistler und Furie, 2000). Dort wiederum zeigen sich atherosklerotische Plaques bzw. Stenosen meist an Stellen wie Verzweigungen und Krümmungen wie zum Beispiel an der Karotisbifurkation, an denen charakteristische Veränderungen des Blutflusses durch verstärkte Turbulenzen vorliegen (Gotlieb und Langille, 1996). Die durch eine Karotisstenose verursachten Schlaganfälle wären potentiell vermeidbar durch eine prophylaktische operative oder angioplastische Behandlung. Nach Daten der Framinghamstudie beträgt die Prävalenz einer mindestens 50%igen Stenose etwa 5-7% bei Frauen und 7-10% bei Männern über 65 Jahre. In der Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST)-Studie, der bislang größten Interventionsstudie bei asymptomatischer ACI-Stenose, wurden 3120 Patienten mit mindestens 60%iger Stenose für eine Operation oder eine konservative Behandlung randomisiert (Halliday et al., 2004). Das jährliche Risiko eines vermutlich durch die beobachtete Stenose verursachten Schlaganfalls betrug im konservativen Behandlungsarm etwa 0,8% (bei etwa doppelt so hohem Schlaganfallrisiko jeglicher Ursache). Der größte Teil der Patienten würde also vermutlich nie einen durch die Stenose bedingten Schlaganfall erleben. Das perioperative Risiko für Schlaganfall

und Tod im Operationsarm betrug 2,8%. Über eine Gesamtbeobachtungszeit von 5 Jahren zeigte sich ein geringer aber signifikanter Benefit durch die Operation bezüglich der Gesamtschlaganfallrate. Die genannten Zahlen verdeutlichen die Notwendigkeit nichtinvasiv ermittelbarer Diagnoseparameter zur individuellen Risikostratifizierung, um eine risikoeffiziente Behandlung zu ermöglichen.

1.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Nach aktuellem Verständnis der Atherosklerose spielen neben einem pathologischen Lipoproteinstoffwechsel in der Arterienwand und einer Dysfunktion der Endothelzellen Entzündungsprozesse eine Schlüsselrolle (Ross, 1999a; Libby, 2002; Roessner et al., 2008). Atherosklerotische Läsionen sind asymmetrische Verdickungen der innersten Gefäßschicht, der Intima und sind zusammengesetzt aus Zellen, Bindegewebsbestandteilen, Lipiden und Zelltrümmern (Hansson, 2005). Der erste Schritt in der Entstehung dieser Atherome ist die Einlagerung von Lipoproteinen niedriger Dichte (Low density lipoproteins, LDL) in die Gefäßwand. Durch Oxidation der Lipoproteine kommt es zur Freisetzung von Phospholipiden, die ihrerseits Endothelzellen aktivieren. Die aktivierten Endothelzellen setzen nun Entzündungsmediatoren frei und exprimieren bestimmte Adhäsionsmoleküle (v.a. Vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), was zur Folge hat, dass Monozyten und T-Lymphozyten in die Gefäßwand einwandern können (Libby, 2002). Die Monozyten nehmen über den Scavenger-Rezeptor oxidierte LDL-Partikel auf, werden zu intimalen Makrophagen und dann zu Schaumzellen, die wegen ihres Aussehens unter dem Mikroskop ihren Namen bekommen haben. Die Entstehung dieser Zellen und deren Akkumulation in der Intima führt zur ersten sichtbaren Läsion der Atherosklerose, dem „fatty streak“ (Ross, 1999b). Die Schaumzellen produzieren proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α), die auch von T-Zellen produziert werden und die lokale Entzündungsreaktion noch verstärken (siehe auch: 1.5). Außerdem spielt die Schaumzelle eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung von thrombotischen Komplikationen der Atherosklerose: so führt die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) dazu, dass extrazelluläre Matrix degradiert und so die sich im weiteren Verlauf ausbildende fibröse Kappe der Plaque „ausgedünnt“ wird, wodurch die Instabilität der Plaque zunimmt und sich das Risiko einer Ruptur erhöht. Wenn eine solche Ruptur eintritt, kommen zum anderen die Blutzellen mit einem weiteren Produkt der Schaumzelle,

dem stark prokoagulatorisch wirkenden Tissue factor, in Kontakt, wodurch die Bildung von Thrombin und Prothrombin eingeleitet wird und damit der erste Anstoß für die Blutgerinnung gegeben wird. Auf diese Weise können thrombotische Ereignisse induziert werden (Libby, 2002).

Was also als eigentlich protektiver, entzündlicher Prozess zur Aufnahme der oxidierten LDL-Partikel beginnt, entwickelt sich potentiell zu einer schädlichen, gegen die Arterienwand gerichteten Reaktion. Makrophagen bzw. Schaumzellen produzieren Wachstumsfaktoren wie z.B. Platelet-derived growth factor (PDGF), Fibroblast growth factor (FGF), Heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF), Monocyte-colony stimulating factor (M-CSF) und Granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) und es entsteht in der Arterienwand eine an Dicke variable Schicht von glatten Muskelzellen, Bindegewebe, Makrophagen und T-Lymphozyten, über die sich eine fibröse Kappe aus Kollagen, glatten Muskelzellen, elastischen Fasern und Proteoglykanen ausbildet (Ross, 1999b).

1.1.3 Klinische Auswirkungen der Atherosklerose

Klinische Komplikationen wie Myokardinfarkt oder zerebraler Infarkt können in Folge zweier Mechanismen eintreten: einerseits kann es durch eine Plaqueruptur, nicht zuletzt durch die oben beschriebene Ausdünnung der fibrösen Kappe, zum Kontakt zwischen Blut und Plaque-Komponenten und zur lokalen Aggregation der Thrombozyten, zur Bildung von Fibrin und damit zur Entstehung eines Thrombus kommen. Diese Thromben können zu subtotalen oder totalen Verschlüssen entweder am Ort der Entstehung, wie häufig bei koronarerteriellen Verschlüssen, oder embolisch an weiter distal gelegenen Gefäßabschnitten, wie meistens bei Karotisverschlüssen, führen. Ein weiterer Mechanismus ist die Erosion der Plaque mit konsekutiver Thrombusentstehung (Falk, 1999). Der Mechanismus der Erosion wird bis heute jedoch nicht völlig verstanden. Morphologisch wurden zahlreiche glatte Muskelzellen und Proteoglykane an der Oberfläche der Plaque nachgewiesen (Fuster et al., 2005).

1.2 Plaquestabilität und –instabilität

1.2.1 Histologie

Zur Beurteilung des Rupturrisikos und damit der Risikostratifizierung einer atherosklerotischen Plaque ist in erster Linie die Plaquezusammensetzung entscheidend. Histologische Studien von Material aus Endarteriektomieproben führten hierbei zu dem Konzept der „vulnerablen Plaque“: Karotisläsionen mit Zeichen aktiver Entzündung (Infiltration von Monozyten/Makrophagen und/oder T-Zellen), dünner fibröser Kappe, lipidreichem nekrotischen Kern und Hämorrhagien innerhalb der Plaque wurden als vulnerable, instabile Plaques klassifiziert, die mit höherer Wahrscheinlichkeit rupturieren und einen zerebralen Infarkt auslösen können (Naghavi et al., 2003). Kalzifizierte oder bindegewebig durchbaute Plaques sind dagegen weniger anfällig für Rupturen und können als stabile Plaques angesehen werden (Wahlgren et al., 2009).

Im Auftrag der American Heart Association (AHA) haben Stary et al. histologische Kriterien zur Klassifikation atherosklerotischer Plaques unter Berücksichtigung der Zusammensetzung, Konsistenz, Struktur und Prognose erstellt (Stary et al., 1992; Stary et al., 1994; Stary et al., 1995b; Stary, 2000). Wichtig ist dabei, dass mehrere histologische Schnitte der Plaque zur sicheren Klassenzuordnung untersucht werden, weil sich im Längsverlauf der Plaque Unterschiede ergeben können. Die am weitesten fortgeschrittene Region bestimmt letztlich die Gesamteinstufung der Plaque. Unsere Einteilung beruht auf dieser Einteilung der AHA (siehe Tabelle 1.1) unter Berücksichtigung der Aktualisierung Starys von 2000 (Stary, 2000):

Tabelle 1.1: Plaqueklassifikation der American Heart Association (AHA)

Klasse	Eigenschaften
0	keine intimale Verdickung
I	einzelne Makrophagen mit Lipidtröpfchen (Schaumzellen)
II	Schaumzellen, glatte Muskelzellen enthalten Fetttröpfchen, streifige Verfettung („fatty streaks“)
III	Präatherom; streifige Verfettung ohne Anfärben sichtbar, einzelne extrazelluläre Fettverdichtungen, vermehrt glatte Muskelzellen
IV	Atherom; singulärer und klar abgrenzbarer Lipidkern, ummantelt von einer Proteoglykan-haltigen Schicht, die Schaumzellen und glatte Muskelzellen enthält. Es resultiert eine Gefäßwandverdickung, die noch nicht mit einer Lumeneinengung einhergehen muss
V	(ursprünglich auch als Va bezeichnet) Fibroatherom; fibrinhaltige Kappe und evtl. kleinere Verkalkungen, evtl. bindegewebige Unterteilung des Lipidkerns
Vla	meist Klasse IV oder V + Oberflächenruptur
Vlb	meist Klasse IV oder V + Hämorrhagie oder Hämatom
Vlc	meist Klasse IV oder V + Thrombus
Vlabc	Klasse IV oder V + Oberflächenruptur + Hämorrhagie + Thrombus
VII	(ursprünglich auch als Vb bezeichnet) Kalzifizierte Plaque; mit Lipidkern oder Bindegewebe, mit ausgeprägten Verkalkungen
VIII	(ursprünglich auch als Vc bezeichnet) Fibröse Plaque; die Intima ist durch fibröses Bindegewebe ersetzt, kein Lipidkern

Zunächst findet man in der Frühphase der Atherosklerose, die bereits ab der ersten Lebensdekade beginnt, überwiegend Schaumzellen (AHA-Klasse I und II), im Verlauf sind extrazelluläre Lipidablagerungen zu erkennen (AHA-Klasse III). Ist die Läsion bereits weiter fortgeschritten, lagern sich immer mehr Lipide, glatte Muskelzellen und extrazelluläre Matrixbestandteile in die Intima ein, es resultieren Umbau- und Reparaturprozesse der Gefäßwand. In der Mitte der Läsion entsteht der klar abgrenzbare Lipidkern mit Schaumzellen, Monozyten/Makrophagen und T-Zellen (AHA-Klasse IV). Zu diesem Zeitpunkt findet sich meist noch keine Einengung des

Gefäßes, die Läsion kann auf die Intima beschränkt sein und die Volumenzunahme der Intima durch Expansion nach außen kompensiert werden. Was nun folgt, ist eine bindegewebige Durchbauung der Schicht zwischen Gefäßlumen und Lipidkern zur fibrinhaltigen Kappe mit evtl. kleineren Verkalkungen (AHA-Klasse V). Es können jetzt auch die Media durch Rarefizierung der glatten Muskelzellen sowie die Media und Adventitia durch Einwanderung von Monozyten/Makrophagen und Schaumzellen betroffen sein. Im weiteren Verlauf droht eine Plaqueruptur mit Freisetzung atheromatösen Materials, Einblutung und Thrombusauflagerung (Stary et al., 1995a; Naghavi et al., 2003). Treten solche zusätzlichen Komplikationen ein, spricht man nun von der AHA Klasse VI mit den speziellen Untergruppen Oberflächenruptur (AHA Klasse VIa), Einblutung (AHA Klasse VIb), Thrombusauflagerung (AHA VIc) oder aller drei Attribute (AHA Klasse a, b, c). Die Plaque kann sich daraufhin entweder in eine Klasse V-Läsion zurückentwickeln, sie kann sich aber auch durch zunehmenden fibrotischen Umbau und Kalzifizierung in eine stabile Plaque entwickeln. Als stabile Plaques werden kalzifizierte Plaques mit Lipidkern oder Bindegewebe (AHA-Klasse VII) sowie fibröse Plaques mit weitgehend abgebautem Lipidkern (AHA-Klasse VIII) bezeichnet.

Allgemein ist der Progress einer Plaque nicht genau vorhersagbar bzw. folgt nicht genau der Abfolge der Klasseneinteilung. Eine Plaque der Klasse IV kann sich zum Beispiel direkt in eine Klasse VI unter Umgehung der Klasse V entwickeln. Entscheidend für die Plaqueentwicklung und das Ausmaß der Progression ist letztlich die Interaktion der beteiligten Zellen. Die Dysregulation des Entzündungsprozesses mit Verschiebung des Gleichgewichtes aus zellulärer Migration und Proliferation sowie Matrixaufbau und -degradation spielt hierbei eine wichtige Rolle.

1.2.2 Bildgebende Verfahren zur Untersuchung der Plaquestabilität

1.2.2.1 Ultraschall, Angiographie und Computertomographie

Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, mittels Ultraschalluntersuchung unterschiedlich gefährliche Stenostypen voneinander abzugrenzen. Diese blieben jedoch insgesamt unbefriedigend. Mittels Ultraschall lässt sich in entsprechend erreichbaren und ausreichend großen Gefäßen der Stenosegrad zuverlässig

bestimmen und auch die Gefäßwand beurteilen. Die Auflösung ist aber begrenzt und eine Unterscheidung zwischen Tunica intima und Tunica media ist beispielsweise selbst in großen Gefäßen wie der Arteria carotis communis nicht zuverlässig möglich. Auch ist die Methode in ihrer Qualität deutlich untersucherabhängig.

Durch intravasale Ultraschalluntersuchung lässt sich hier eine verbesserte Auflösung erreichen. Es lassen sich fibröse, kalzifizierte und weniger zuverlässig auch lipidhaltige Anteile sowie Thromben unterscheiden. Aufgrund der Invasivität ist das Verfahren jedoch nicht als Screeningmethode von Karotisstenosen geeignet.

Die Angiographie ermöglicht die exakte Bestimmung des Stenosegrades und Beschreibung der Stenoseoberfläche durch Darstellung des Gefäßlumens. Die Beurteilung der eigentlichen Läsion gelingt jedoch nicht. Nach stattgehabtem Herzinfarkt zeigen symptomatisch gewordene Stenosen typische morphologische Merkmale. Es ist jedoch nicht zuverlässig möglich, besonders gefährliche Stenosen zu klassifizieren, bevor sie symptomatisch werden (Little et al., 1988). Die Angiographie der Halsgefäße birgt das Risiko einer zerebralen Ischämie im Rahmen der Untersuchung, persistierende neurologische Defizite wurden in einer großen prospektiven Studie mit knapp 3000 Patienten in circa 0,5 % der Untersuchungen beschrieben (Willinsky et al., 2003). Die Strahlenbelastung und die notwendige Gabe jodhaltiger Kontrastmittel sind weitere Nachteile.

Die Computertomographie (CT) mit der CT-Angiographie ermöglicht eine hochauflösende Darstellung der Gefäße. Intraintimale Verkalkungen lassen sich darstellen. Im Übrigen ist jedoch die Gewebeunterscheidbarkeit (Weichteildarstellung) häufig unzureichend. Die Strahlenbelastung und die notwendige Gabe jodhaltiger Kontrastmittel sind auch hier weitere Nachteile.

1.2.2.2 Plaqueimaging mittels Magnetresonanztomographie

Die **Magnetresonanztomographie** (MRT) ist ein Verfahren zur Erzeugung von Schnittbildern in einer frei wählbaren Raumebene ohne Verwendung von Röntgenstrahlung. Mittels MRT lässt sich nicht nur der Stenosegrad anhand der Lumeneinengung zuverlässig eruieren (van Heeswijk et al., 2002), sondern es ist auch die Darstellung der Plaquezusammensetzung möglich: Bindegewebsstrukturen, Lipidkern, Kalk, Einblutungen oder thrombotisches Material lassen sich idealerweise voneinander abgrenzen (Cai et al., 2002; Chu et al., 2004). Ausschlaggebend hierfür ist das unterschiedliche Signalverhalten von Lipiden, Blut, Kalk usw. in den

unterschiedlich gewichteten Aufnahmen (time of flight, T1, T2, Protonendichtewichtung), was die „Codierung“ unterschiedlicher Plaquebestandteile ermöglicht. Auch Plaques, die noch keine Lumeneinengung verursachen, aber aufgrund entsprechender intrainimaler oder oberflächlicher Veränderungen als gefährlich einzustufen sind, können so detektiert werden.

In diesem Zusammenhang haben einige Studien gezeigt, dass die hochauflösende MRT eine vielversprechende Methode ist, um die genaue Zusammensetzung der Plaque nicht-invasiv zu identifizieren (Hatsukami et al., 2000; Mitsumori et al., 2003). Basierend auf der Plaqueeinteilung der American Heart Association (AHA, siehe Tabelle 1.1) wurde von Cai et al. (Cai et al., 2002) eine modifizierte Klassifikation entwickelt, mit der eine Klassifizierung von Carotisplaques in verschiedene Läsionstypen durch hochauflösende MRT möglich ist (siehe Tabelle 1.2). In dieser Klassifikation wurden Läsionstyp I und II der histologischen AHA-Einteilung zum Typ I-II der modifizierten Einteilung zusammengefasst. Auch die Läsionstypen IV und V gelten darin als gemeinsamer Läsionstyp IV-V. Grund für die Zusammenlegung dieser beiden Gruppen war, dass bedingt durch die Auflösung der MRT der Unterschied zwischen vereinzeltten Schaumzellen und den vermehrten Schaumzellschichten in den „fatty streaks“ (Typ I und II) sowie die unterschiedliche Konfiguration der fibrösen Kappe (Typ IV und V) MR-tomographisch nicht sicher dargestellt werden konnten.

Tabelle 1.2: Histologische und modifizierte Plaqueklassifikationen; in der modifizierten Klassifikation sind jeweils Klasse I und II sowie Klasse IV und V der AHA-Klassifikation zusammengefasst.

Klasse	histologische Klassifikation	modifizierte MRT-Klassifikation
I	Schaumzellen	nahezu normale Wanddicke
II	„fatty streaks“	
III	Präatherom	kleine Plaque
IV	Atherom	Plaque mit lipidreichem / nekrotischem Kern und fibröser Kappe
V	Fibroatherom	
VI	Oberflächendefekt und Einblutung	Oberflächendefekt und Einblutung
VII	kalzifizierte Plaque	kalzifizierte Plaque
VIII	fibrotische Plaque	fibrotische Plaque

Gemäß dieser modifizierten Klassifikation konnten Esposito et al. anhand kernspintomographischer Untersuchungen an 50 Patienten zeigen, dass symptomatische Stenosen der Arteria carotis interna überwiegend durch die als instabil geltenden Plaques der Klassen IV-V und VI verursacht wurden (Esposito et al., 2007). Bei den asymptomatischen Stenosen fand sich dieser Läsionstyp seltener. Der mittlere Stenosegrad war in beiden Gruppen gleich. Auch histologisch konnte bei den Patienten, die einer Endarteriektomie unterzogen wurden, in 19 von 23 Fällen eine gute Übereinstimmung zwischen dem histologischen und kernspintomographischen Ergebnis gefunden werden. Takaya et al. konnten in einer prospektiven Studie an 154 Patienten mit initial asymptomatischer, 50-79% ACI-Stenose zeigen, dass diejenigen Patienten mit MR-tomographisch nachgewiesener dünner bzw. rupturierter fibröser Kappe oder Hämorrhagien in der Plaque gehäuft in der Folge zerebrovaskuläre Ereignisse erlitten (Takaya et al., 2006). Auch weitere Autoren zeigten, dass zurückliegende bzw. kommende zerebrale ischämische Ereignisse mit dem Nachweis vulnerabler bzw. instabiler Komponenten im MRT positiv korrelierten (Yuan et al., 2002; Lin et al., 2006). In einer weiteren Studie an asymptomatischen Patienten gelang es ebenfalls, Karotis-Plaques nach MRT-Kriterien reproduzierbar zu klassifizieren (Chu et al., 2004). Durch das MRT-Plaqueimaging steht so eine zuverlässige, nicht-invasive Methode zur Unterscheidung von stabilen und instabilen Plaques zur Verfügung.

1.3 Zirkulierende Vorläuferzellen

1.3.1 Ursprung

Stammzellen sind Zellen, die sich in verschiedene Zelltypen oder Gewebearten ausdifferenzieren können. Die Vermehrung und Differenzierung embryonaler Stammzellen sind Voraussetzung für die Entstehung von Gewebe und Organen. Während der Embryonalentwicklung geht die Pluripotenz der Stammzellen verloren. Adulte Stammzellen sind Stammzellen, die auch nach der Geburt vorhanden sind, aber ein deutlich eingeschränkteres Differenzierungspotential als embryonale Stammzellen besitzen. Vorläuferzellen stammen von adulten Stammzellen ab und stellen eine noch weiter differenzierte Zellgruppe dar.

1997 wurden erstmals zirkulierende Vorläuferzellen beschrieben, die in der Lage waren, neue Gefäße zu bilden (Asahara et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass sie Vaskulogenese und Angiogenese beeinflussen und die Erneuerung des Endothels verletzter Blutgefäße stimulieren können. So könnte die Mobilisation von Vorläuferzellen einen physiologischen Reparaturmechanismus darstellen (Hristov et al., 2003).

1.3.2 Klassifikation und Marker von Stamm- und Vorläuferzellen

Adulte Stammzellen können in vielen Organen des Körpers nachgewiesen werden, unter anderem in der Haut, im Blut, im Gehirn und im Knochenmark. Im Knochenmark beträgt deren Anteil an allen Zellen 0,1% (Tsai et al., 2009). Allgemein werden adulte Stammzellen in hämatopoetische und nicht-hämatopoetische bzw. mesenchymale Stammzellen eingeteilt.

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSC) können sich in alle Zellen des hämatopoetischen Systems differenzieren. Deren Oberflächenmarker CD34 wird zur Identifizierung der HSCs verwendet und dient zur Unterscheidung gegenüber mesenchymalen Stammzellen. CD34 ist ein membranständiges Protein, das sowohl auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen als auch auf Endothelzellen vorkommt (Fina et al., 1990; Brown et al., 1991). Es gibt auch Hinweise darauf, dass sich HSCs in nicht-hämatopoetische Zellen wie Muskelzellen und Endothelzellen differenzieren können (Camargo et al., 2003; Yeh et al., 2003). 1997 gelang es Asahara et al. erstmals menschliche Vorläuferzellen zu isolieren, die den HSC-Oberflächenmarker CD34 exprimierten und in der Lage waren, sich unter experimentellen Bedingungen in Endothelzellen zu differenzieren sowie in vitro neue Gefäßstrukturen zu bilden (Asahara et al., 1997). Da CD34 auch auf differenzierten Endothelzellen exprimiert wird, sind andere Marker notwendig, um eine genaue Abgrenzung von Vorläuferzellen zu erreichen. CD133 ist ein transmembranales Glykoprotein, das auf Stammzellen und Vorläuferzellen exprimiert wird, jedoch nicht auf differenzierten Endothelzellen (Handgretinger et al., 2003). Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich CD133+ Zellen in Endothelzellen differenzieren können und im Verlauf den CD133-Oberflächenmarker verlieren (Gehling et al., 2000). Es scheint also, dass der Verlust dieses Markers die Transformation von zirkulierenden Vorläuferzellen in differenzierte Endothelzellen widerspiegelt. Durch den CD133-

Marker können zirkulierende Vorläuferzellen von differenzierten Endothelzellen unterschieden werden.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind in der Lage, Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Fibrozyten und Adipozyten hervorzubringen. Spezifische Marker mesenchymaler Stammzellen fehlen. Die Unterscheidung zu hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen gelingt insbesondere durch das Fehlen der Oberflächenmarker CD45 und CD34, wobei CD45 den sogenannten Panleukozytenmarker darstellt (Neuss et al., 2004).

1.3.3 Charakterisierung endothelialer Vorläuferzellen

Vascular endothelial growth factor Rezeptor-2 (VEGFR2) ist ein Marker, der auf Endothelzellen exprimiert wird (Karkkainen und Petrova, 2000). Vorläuferzellen, die sowohl den endothelialen Marker VEGFR2 als auch die Stammzell- bzw. Vorläuferzellmarker CD34 oder CD133 exprimieren, werden allgemein als endotheliale Vorläuferzellen (Endothelial progenitor cells, EPCs) bezeichnet (Urbich und Dimmeler, 2004). EPCs sind nach bisherigem Verständnis zu Endothelzellen heranreifende Zellen, die funktionelle und strukturelle Charakteristika sowohl von Stammzellen als auch von endothelialen Zellen besitzen.

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt bleibt es unklar, inwiefern endotheliale Vorläuferzellen von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu unterscheiden sind. Es gibt Autoren, die den Hämangioblasten als gemeinsamen Vorläufer von EPCs und HSCs vermuten (Tsai et al., 2009). In einer anderen Publikation wird davon ausgegangen, dass EPCs aus HSCs hervorgehen und deswegen eine strikte Trennung nicht möglich ist (Urbich und Dimmeler, 2004). In einer Übersichtsarbeit (Kassmeyer et al., 2009) ist die wahrscheinlich vorliegende Vielgestaltigkeit der Herkunft endothelialer Vorläuferzellen auch in graphischer Form anschaulich zusammengefasst (siehe Abbildung 1.1).

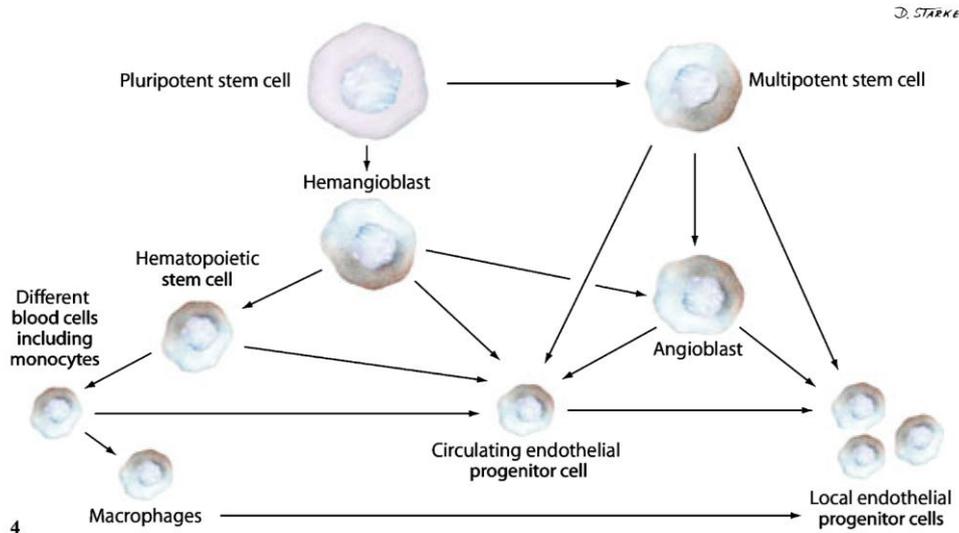


Abbildung 1.1: Verschiedene Quellen endothelialer Vorläuferzellen und deren potentielle Hierarchie der Differenzierung (Kassmeyer et al., 2009)

1.3.4 Mobilisation zirkulierender Vorläuferzellen

Es gibt verschiedene Faktoren, die die Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen beeinflussen. Bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren (siehe Tabelle 1.3) wie Diabetes, Hypercholesterinämie oder Rauchen findet man eine verminderte Anzahl von Vorläuferzellen, was entweder durch eine verminderte Mobilisation aus dem Knochenmark, erhöhten Verbrauch im Bereich verletzter Gefäßstellen oder einer kürzeren Lebenszeit der Vorläuferzellen erklärt werden könnte (Vasa et al., 2001b). Hill et al. beobachteten in diesem Zusammenhang eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Anzahl von Vorläuferzellen und dem Framingham Risk Factor Score (Hill et al., 2003). Im Gegensatz dazu ist die Mobilisation von Vorläuferzellen sowohl nach ischämischen Ereignissen wie einem Myokardinfarkt oder einer Extremitätenischämie als auch nach Gefäßtraumata erhöht (Takahashi et al., 1999; Shintani et al., 2001). Auch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine), die als plaquestabilisierend gelten, beeinflussen die Anzahl von Vorläuferzellen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit positiv (Vasa et al., 2001a). Ähnlich zu den Statinen fördern die antidiabetisch und antiinflammatorisch wirkenden Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ -Agonisten die Differenzierung und Mobilisation von Vorläuferzellen und verbessern die Reendothelialisierung nach einer Gefäßintervention (Wang et al., 2004). Ebenso werden mehr Vorläuferzellen bei körperlicher Aktivität mobilisiert (Laufs et al., 2004). Des Weiteren wurde in vivo die

Freisetzung endothelialer Vorläuferzellen durch Wachstumsfaktoren wie Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (Takahashi et al., 1999), VEGF (Kalka et al., 2000a) oder Erythropoetin (EPO) (Bahlmann et al., 2004) und dem Chemokin stromal cell derived factor (SDF)-1 (Yamaguchi et al., 2003) stimuliert. Im Mausmodell konnten darüber hinaus erhöhte EPC-Spiegel nach Östrogen-Applikation beobachtet werden (Strehlow et al., 2003).

Erfolgt die Mobilisierung aus dem Knochenmark, geschieht dies über einen MMP-9-regulierten Mechanismus, in dem die Verbindung zwischen Stromazellen und Stammzellen des Knochenmarks gelockert wird und so Stammzellen in die Gefäßzone einwandern (Heissig et al., 2002; Hristov et al., 2003).

Table 1.3: Faktoren und therapeutische Präparate bzw. Applikationsformen, die die Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen verändern

Faktoren	Vorläuferzellen im peripheren Blut
Kardiovaskuläre Risikofaktoren (allgemein)	Vermindert
Diabetes	Vermindert
Hypercholesterolämie	Vermindert
Rauchen	Vermindert
Extremitätenischämie	Erhöht
Akuter Myokardinfarkt	Erhöht
Gefäßtrauma	Erhöht
Statine	Erhöht
PPAR- γ -Agonisten	Erhöht
Körperliche Aktivität	Erhöht
VEGF	Erhöht
G-CSF	Erhöht
EPO	Erhöht
SDF-1	Erhöht
Östrogene	Erhöht

1.3.5 Rekrutierung zirkulierender Vorläuferzellen zum Zielorgan durch Interaktion von CXCR4 mit SDF-1

Nicht nur die Mobilisierung der Vorläuferzellen in den Blutstrom, sondern auch das Gelangen der Vorläuferzellen zu ihrem Ziel mit Adhäsion und Einfügen in die monozytäre endotheliale Schicht, das sogenannte „Homing“, muss bei der Untersuchung der Funktion von Vorläuferzellen beachtet werden. In diesem Zusammenhang wurde der C-X-C-motiv-receptor-4 ((CXCR4) beschrieben, der auf Vorläuferzellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle für das Homing von

Vorläuferzellen spielen soll (Stellos et al., 2008). CXCR4, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, stellt den bis dato in der Literatur einzigen bekannten und untersuchten Rezeptor für das aus der CXC-Subfamilie stammende Chemokin SDF-1 und interessanterweise auch einen Korezeptor für die HIV-Typ-1-Infektion dar (Bleul et al., 1996). SDF-1 wird von Endothelzellen und Fibroblasten unter anderem in atherosklerotischen Plaques exprimiert, eine erhöhte Expression findet sich bei Gewebeschäden wie zum Beispiel nach Myokardinfarkt (Ceradini et al., 2004; Wojakowski et al., 2004). Die Hauptfunktion von SDF-1, anders bezeichnet auch als CXCL12, ist die Steuerung der Wanderung von Stammzellen, die den SDF-1-Rezeptor CXCR4 exprimieren. In der embryonalen Entwicklung besteht dies vor allem im Homing von Stammzellen ins Knochenmark und an Orte der embryonalen Vaskulo- und Organogenese. Knockout-Mäuse, denen SDF-1 oder sein Rezeptor CXCR4 fehlen, sind wegen abnormer Zellmigration und sich entwickelnden Organschäden nicht lebensfähig (Nagasawa et al., 1996). Postnatal spielt SDF-1 eine andere Rolle und wird vor allem mit Vaskulogenese, Wundheilung und Reparatur von Organen in Verbindung gebracht. Es gibt hierzu eine interessante Arbeit am Maus-Ischämiemodell von Ceradini et al., in der die SDF-1-Genexpression mit hypoxischen Verhältnissen in ischämischem bzw. verletztem Gewebe in Verbindung gebracht wird. Die Autoren fanden ein ergiebiges Vorkommen von SDF-1 im vaskulären und perivaskulären Bereich ischämischen Gewebes in vivo und konnten Endothelzellen als Produzenten von SDF-1 nachweisen. Eine genauere Untersuchung menschlicher Endothelzellen in vitro deutete an, dass hypoxiespezifische transkriptionelle Faktoren für die primäre Kontrolle der SDF-1-Expression zuständig zu sein scheinen. Weitere Entdeckungen der gleichen Arbeit waren, dass der Rezeptor CXCR4 in hohem Maße auf zirkulierenden Vorläuferzellen exprimiert wird und dass die Anzahl CXCR4+ EPCs, die durch SDF-1 an Stellen ischämischen Gewebes „geführt“ werden, indirekt proportional zum Sauerstoffpartialdruck im Gewebe ist (Ceradini et al., 2004). Die Interaktion von CXCR4 und SDF-1 sei durch folgende Abbildung veranschaulicht (siehe Abbildung 1.2):

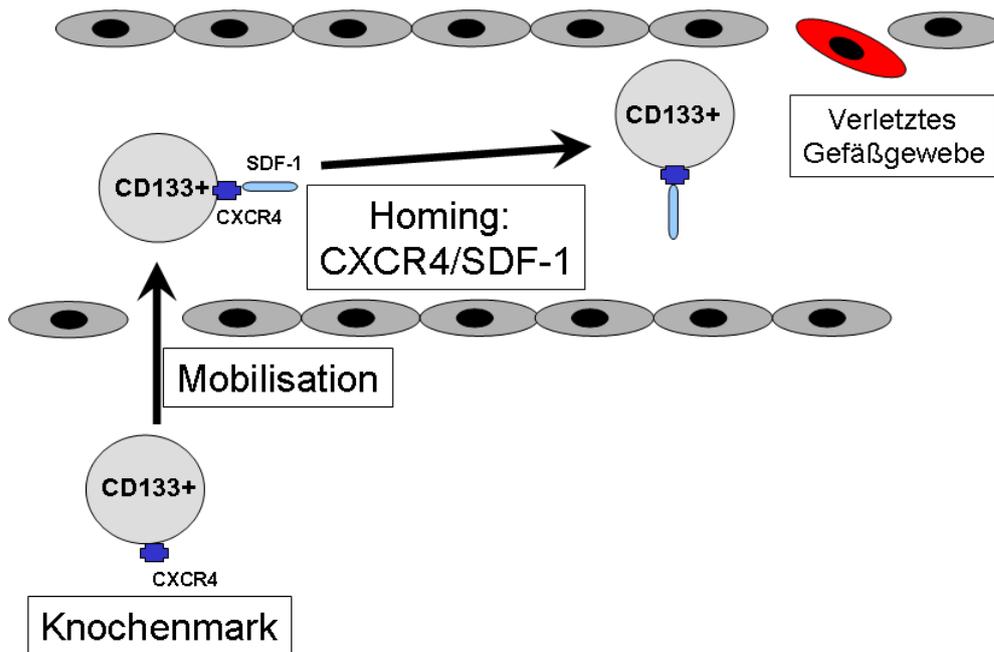


Abbildung 1.2: Interaktion von CXCR4 und SDF-1

Der durch SDF-1 induzierte Homing-Mechanismus wird von zwei weiteren Autoren bestätigt: Yamaguchi et al. haben durch lokale Injektion von SDF-1 in Kombination mit menschlichen endothelialen Vorläuferzellen in ischämisches Muskelgewebe von Nacktmäusen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne SDF-1-Applikation erhöhte Vaskulogenese festgestellt und gezeigt, dass lokal appliziertes SDF-1 durch Verstärkung der Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen zu einer verstärkten Neovaskularisation in ischämischem Gewebe beiträgt (Yamaguchi et al., 2003). Ascari et al. haben hierzu ebenfalls am Tierversuch bestätigt, dass es durch Transplantation von SDF-1-exprimierenden Fibroblasten in ischämisches Gewebe des Myokards acht Wochen nach induziertem Myokardinfarkt zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion kommt. Dies wurde von den Autoren durch die therapeutisch herbeigeführte Überexpression von SDF-1, neben der in ischämischem Gewebe normalen Expression von SDF-1, und der damit verbundenen erhöhten Rekrutierung von Vorläuferzellen erklärt (Askari et al., 2003). Zusätzlich beeinflusst die Interaktion zwischen CXCR4 und SDF-1 die Proliferation und die Mobilisation von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark: hierzu wurde beschrieben, dass aus peripherem Blut isolierte pluripotente CD34+ Zellen den CXCR4-Rezeptor exprimieren und dass SDF-1 die Proliferation zirkulierender, menschlicher CD34+ Zellen erhöht. Dies werde durch stimulierende Effekte von

SDF-1 auf den Zellzyklus und die Ausbreitung von Vorläuferzellen bewirkt (Lataillade et al., 2000). Hattori et al. fanden heraus, dass die Erhöhung der SDF-1-Expression mittels Injektion eines adenoviralen, SDF-1-exprimierenden Vektors in den Blutkreislauf einer Maus zu einer verstärkten Mobilisation von Vorläuferzellen aus Knochenmark in die periphere Zirkulation führt (Hattori et al., 2001). Indem man also die Expression von CXCR4 als Rezeptor von SDF-1 auf zirkulierenden Vorläuferzellen untersucht, ist es möglich, einen funktionellen Parameter von Vorläuferzellen zu analysieren.

1.3.6 Vaskuläre Reparaturmechanismen durch zirkulierende Vorläuferzellen

Das Gefäßendothel, eine monozytäre Schicht aus Endothelzellen, stellt eine dynamische Grenze zwischen zirkulierendem Blut und umgebendem Gewebe dar. Es verhindert im Normalzustand die Anhaftung von Thrombozyten und Leukozyten und produziert eine Reihe verschiedener Faktoren wie Prostaglandin und Stickstoffmonoxid (Cines et al., 1998). Bei Gesunden stellt man einen sehr geringen Basisumsatz von Endothelzellen fest (Dignat-George und Sampol, 2000). Bei Beschädigung des Gefäßendothels kommt es jedoch rasch zur Apoptose von Endothelzellen, zum Verlust der antithrombotischen Eigenschaften der Gefäßwand und zu einem erhöhten Bedarf neuer Endothelzellen. Durch vermehrte Migration reifer Endothelzellen aus der Umgebung kann der Schaden gemildert, aber nicht vollständig behoben werden.

Die Rolle der Neovaskularisation, dem Überbegriff von Angiogenese und Vaskulogenese, wurde von mehreren Forschergruppen untersucht. Unter Angiogenese versteht man das Wachstum neuer Kapillaren durch „Aussprießen“ präexistierender Gefäße mittels Migration und Proliferation reifer Endothelzellen. Vaskulogenese beschreibt eine Gefäßentstehung durch Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen (Urbich et al., 2003). Asahara hat gezeigt, dass es postnatale Vorläuferzellen im menschlichen Blut geben muss, die an der Entstehung neuer Gefäßstrukturen beteiligt sind. Dies wurde unter dem Begriff der „postnatalen Vaskulogenese“ zusammengefasst: eine de-novo Gefäßentstehung durch Inkorporation, Differenzierung, Migration und Proliferation zirkulierender Vorläuferzellen (Asahara et al., 1999). Bis zu diesem Zeitpunkt konnte man sich eine

postnatale Gefäßentstehung nur durch Angiogenese vorstellen, eine Proliferation und Migration präexistierender Endothelzellen (Eguchi et al., 2007).

Vorläuferzellen könnten durch Beeinflussung vaskulärer Reparaturmechanismen in der Entwicklung atherosklerotischer Plaques eine entscheidende Rolle spielen. Durch Beteiligung an Reendothelialisierung nach endotheliale Schaden könnten sie die Integrität der Endothelzellschicht aufrechterhalten und die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen reduzieren (Walter et al., 2002). Durch Beeinflussung der Neovaskularisation in der Gefäßwand und folglich Migration von Entzündungszellen und Zytokinen in die Gefäßwand könnten sie aber auch die Instabilität der Plaque und den atherosklerotischen Prozess verstärken (Takahashi et al., 1999; Celletti et al., 2001; Heeschen et al., 2001; Moulton et al., 2003).

1.4 Messung zirkulierender Vorläuferzellen mittels Durchflusszytometrie

Durch die Eigenschaft zirkulierender Vorläuferzellen, bestimmte Oberflächenmerkmale zu exprimieren, können sie mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Hierbei werden die Vorläuferzellen, um sie von anderen Zellen unterscheiden zu können, mit spezifischen Antikörpern gekoppelt, die gegen bestimmte Oberflächenmerkmale der Zellen gerichtet sind. Jeder Antikörper wird hierbei entweder mit dem Präfix „Cluster of differentiation“ (CD) und einer Zahl oder dem Eigennamen des Antikörpers definiert (siehe Tabelle 2.1). Neben spezifischen zellulären Merkmalen können auch Marker zur Vitalitätskontrolle verwendet werden, wie zum Beispiel 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD). Alle Antikörper wiederum sind mit fluoreszierenden Verbindungen, den Fluorochromen, verbunden, die Lichtenergie eines für sie jeweils charakteristischen Wellenlängenbereichs absorbieren. Durch die absorbierte Energie erfahren die enthaltenen Elektronen einen Sprung in ein höheres Energieniveau, das sie unter Abgabe eines Photons wieder verlassen. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet und kann mit dem Durchflusszytometer gemessen werden. Die emittierte Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle und gibt somit Auskunft sowohl über qualitative als auch quantitative Merkmale der untersuchten Zellpopulation.

Ein Durchflusszytometer misst im Wesentlichen optische Signale unterschiedlicher Qualität, wie Fluoreszenz und Lichtstreuung, die beim Kontakt eines Partikels mit einem Lichtstrahl entstehen (Raffael et al., 1994).

Um dies zu erreichen, werden die Partikel zu einem Analysepunkt geleitet, an dem sie vom fokussierten Lichtstrahl beleuchtet werden. Abhängig vom Zelltyp und der Probenvorbereitung senden die Zellen charakteristische Lichtsignale aus, die mit Detektoren gemessen werden können. Durch Umwandlung dieser optischen Signale und digitaler Verarbeitung können die gesuchten Parameter der gemessenen Zellen am Bildschirm dargestellt und entsprechend ausgewertet werden.

Das Durchflusszytometer ist in folgende Bauteile gegliedert:

- Flüssigkeitssystem
- Optisches System
- Signalverarbeitung bzw. elektronisches System

Das Flüssigkeitssystem besteht aus zwei Leitungen. In der ersten Leitung wird ständig sogenannte Trägerflüssigkeit durch die Messküvette und weiter in einen Abfallbehälter gepumpt. Die zweite Leitung dient dazu, die zu messenden Zellen vom Probenröhrchen in die Messküvette zu befördern, in der sich beide Leitungen vereinen. Ein entscheidendes Prinzip des Durchflusszytometers ist, dass sich der Querschnitt im Zentrum der Messküvette verengt und dadurch sowohl der Strom der Probenflüssigkeit als auch der Strom der Trägerflüssigkeit eine Beschleunigung erfährt. Diese Beschleunigung hat zum einen zur Folge, dass sich Zellaggregate auflösen, zum anderen wird der Abstand der Zellen vergrößert, so dass jede Zelle wie an einer Kette aufgereichte Perlen einzeln durch den Laserstrahl detektiert werden kann. Man spricht vom Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung (siehe Abbildung 1.3).

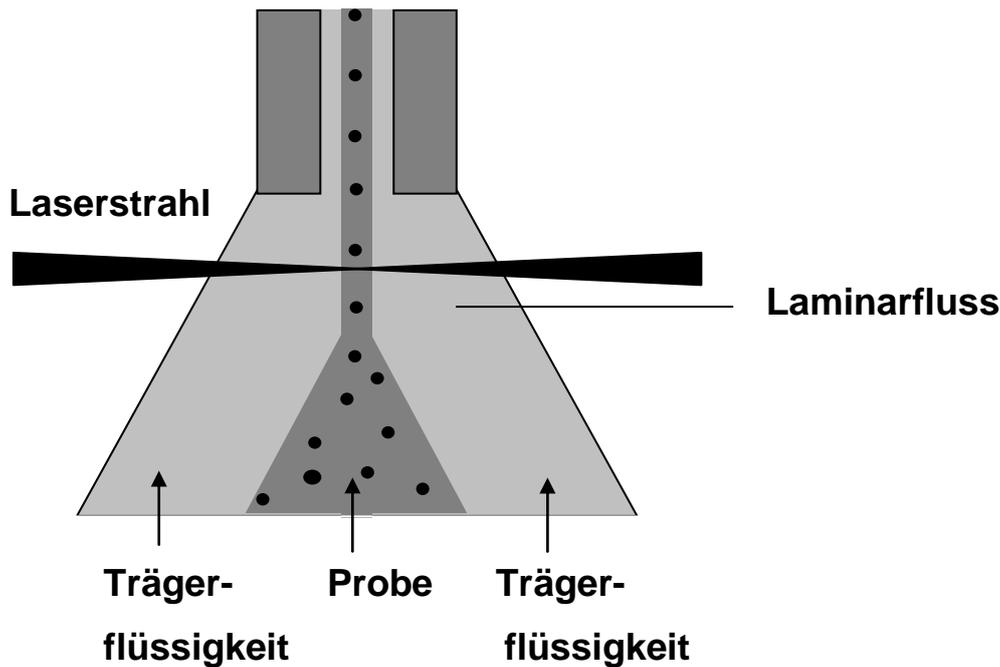


Abbildung 1.3: Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung

Das optische System gliedert sich in einen Anregungs- und Detektionsteil. Zur Anregung dient ein luftgekühlter Argonlaser der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$ und einem Diodenlaser der Wellenlänge $\lambda = 635 \text{ nm}$ zur Fluoreszenzanregung sowie Prismen, um den Laserstrahl zu fokussieren.

Der Detektionsteil besteht aus zwei Baugruppen und zwar aus einem Bereich zur Messung des Vorwärtsstreulichts (axial zum anregenden Laserstrahl) und einem zweiten Bereich (im senkrechten Winkel zum anregenden Laserstrahl), der das sogenannte Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenzeigenschaften misst. Durch diesen Aufbau können folgende Parameter einer Zelle gemessen werden:

- Relative Größe (Forward scatter - FSC)
- Relative Granularität (Side scatter - SSC)
- Spezifische Fluoreszenz der durch einen fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper markierten Zelle. Die Standardfluoreszenzfarben sind Allophycocyanin (APC), Fluoresceinisothiozyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein (PerCP)

Das elektronische System wandelt schließlich die gemessenen optischen Signale in elektrische Spannungsimpulse um, deren Höhe mit der Intensität des Lichtsignals

korreliert. Im Weiteren werden die Daten digitalisiert und an den Computer zur Analyse übermittelt.

1.5 Zytokine in atherosklerotischen Plaques

1.5.1 „Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung“

Russel Ross hat im Jahre 1999 mit dem Slogan „Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung“ als einer der ersten die entzündliche Komponente in der Entstehung der Atherosklerose hervorgehoben (Ross, 1999a). Darüber hinaus gibt es viele Hinweise darauf, dass eine stärkere Entzündung in der Plaque zu einer höheren Instabilität führt. Rupturierte Plaques in den Koronararterien, die zu Herzinfarkt geführt haben, zeigten bei mikroskopischer Untersuchung der koronararteriellen Gefäßwand eine starke Infiltration von Makrophagen vor allem in der fibrösen Kappe der Plaque (Lendon et al., 1991). Makrophagen sind in der Lage, extrazelluläre Matrix durch Phagozytose oder durch Stimulation von Metalloproteinasen zu degradieren, weichen so die fibröse Kappe der Plaque auf und führen zu verstärkter Rupturgefahr (Moreno et al., 1994). Des Weiteren produzieren sie Zytokine, die den Entzündungsprozess aufrechterhalten und verstärken können (Tedgui und Mallat, 2006).

1.5.2 Definition und Einteilung der Zytokine

Stanley Cohen hat 1974 zum ersten Mal den Begriff „Zytokin“ eingeführt als Oberbegriff für verschiedene Proteine, die von einer großen Bandbreite von Zellen gebildet werden und der interzellulären Kommunikation dienen (Tedgui und Mallat, 2006). Ihre zahlreichen Funktionen üben sie in drei Bereichen aus: sie steuern die Entwicklung und Homöostase des Immunsystems, sie kontrollieren das hämatopoetische System und sie sind an der unspezifischen Abwehr beteiligt, indem sie Entzündungsprozesse beeinflussen. Allgemein kontrollieren Zytokine Wachstum, Differenzierung und Apoptose der Zellen (Koolman und Röhm, 2003). Sie können in sechs Hauptgruppen unterteilt werden: Interleukine (IL), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF), Chemokine, Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren (z.B. CSF) und transformierende Wachstumsfaktoren (TGF) (Tedgui und Mallat, 2006). Die ersten drei davon sollen hier kurz erläutert werden: Interleukine vermitteln, wie der lateinische Name verrät (inter = zwischen und leukos = weiß), die Kommunikation

zwischen Leukozyten. Tumor-Nekrose-Faktoren sind eine Familie von Glykoproteinen, die von aktivierten Immunzellen nach Kontakt mit einem Antigen ausgeschüttet werden. Sie wirken im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen sowohl als Botenstoff im Netzwerk zwischen Immunzellen als auch als zytotoxisches Agens. Chemokine steuern die gerichtete Wanderung von Immunzellen und sind bei entzündlichen Reaktionen für die Rekrutierung dieser Zellen in das Gewebe hinein verantwortlich.

Zytokine verbindet eine Reihe spezifischer Eigenschaften: 1. Manche von ihnen zeigen pleiotrope Aktivität, d.h. ein Zytokin kann je nach Zelltyp und Kontext verschiedene zelluläre Reaktionen hervorrufen. 2. Zytokine können synergistisch wirken, d.h. die Verbindung zweier Zytokine verstärkt deren Aktivität. 3. Manche Zytokine können sowohl autokrin als auch parakrin wirken, d.h. sie können sowohl die Zellen, von denen sie produziert werden, stimulieren bzw. inhibieren, als auch eine Wirkung auf benachbarte Zellen ausüben. Eine weitere mögliche Wirkung von Zytokinen ist die sogenannte juxtakrine Wirkung, unter der man eine direkte Zell-Zell-Interaktion versteht (Tedgui und Mallat, 2006). Als Peptide oder Proteine sind Zytokine hydrophile Signalstoffe, die durch Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche wirken. Die Bindung eines Zytokins an seinen Rezeptor führt über mehrere Zwischenstufen zur Aktivierung der Transkription spezifischer Gene (Koolman und Röhm, 2003).

1.5.3 Produktion von Zytokinen in atherosklerotischen Plaques

Den ersten Beweis dafür, dass Zytokine in atherosklerotischen Plaques produziert werden, erbrachten Jonasson et al. in den 80er Jahren durch die Beobachtung, dass die meisten Gefäßmuskelzellen in der Plaque MHC-Klasse-II-Antigene exprimieren, was bedeutet, dass Interferon-(IFN)- γ in unmittelbarer Nähe durch aktivierte T-Zellen produziert wird (Jonasson et al., 1985). IFN- γ war bis zu diesem Zeitpunkt das einzig bekannte Zytokin zur Induktion von MHC-Klasse-II-Antigenen in Gefäßmuskelzellen. Später wurden durch immunhistochemische Verfahren, In-Situ-Hybridisierung oder Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren vornehmlich aus Endarteriektomie-Präparaten identifiziert (Tedgui und Mallat, 2006). Die meisten Zellen, die in der atherosklerotischen Plaque vorliegen, sind prinzipiell dazu fähig, Zytokine zu produzieren und sollen in Abbildung 1.4 kurz dargestellt werden.

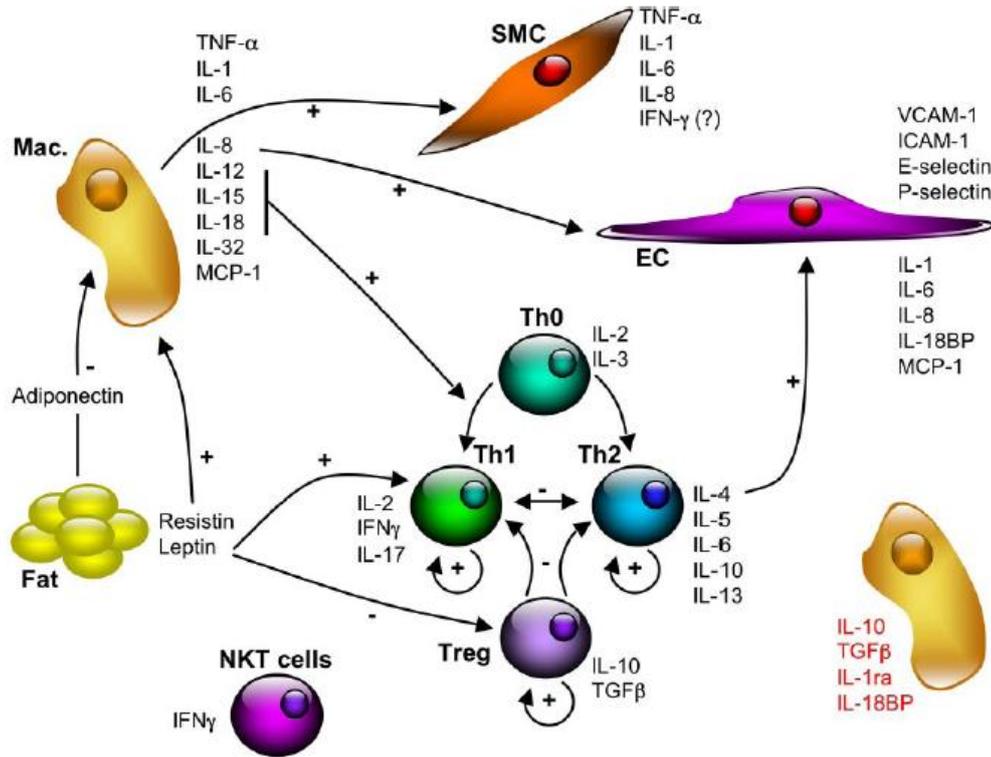


Abbildung 1.4: Zytokine in atherosklerotischen Plaques (Tedgui und Mallat, 2006). Beteiligt sind Makrophagen (Mac.), glatte Muskelzellen (Smooth muscle cells, SMC), Endothelzellen (EC), T-Helferzellen (Th0, Th1, Th2), regulatorische T-Zellen (Treg) und natürliche Killerzellen (NKT cells); rot hinterlegt sind die ebenfalls von Makrophagen gebildeten antiinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10, Transforming-Growth-Factor-β (TGFβ), IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) und IL-18 Bindeprotein (IL-18 BP)

Makrophagen sind die Hauptquelle von Zytokinen in atherosklerotischen Plaques und produzieren unter anderem die proinflammatorischen Zytokine TNFα, IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 und IL-18, und auf der antiinflammatorischen Seite die Zytokine IL-10 und TGF-β (siehe Abbildung 1.4). Im Folgenden soll eine Auswahl verschiedener Zytokine, die für den Entzündungsprozess entscheidend sind, dargestellt werden: TNFα, vor allem in Makrophagen und glatten Muskelzellen produziert (Barath et al., 1990), aktiviert die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen, steigert die Migration von Monozyten und Fibroblasten in den subendothelialen Raum und fördert die Bildung von Kollagen. Somit trägt es maßgeblich zur Modulation der atherosklerotischen Plaque bei (Cavender et al., 1987).

Die Produktion von IL-1 findet hauptsächlich in Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen statt. Es erhöht die Permeabilität von Blutgefäßen, aktiviert T-Zellen und Makrophagen und fördert die Diapedese von Leukozyten in den

subendothelialen Raum (Girn et al., 2007). Außerdem ist es mit einem erhöhten Rupturrisiko atherosklerotischer Plaques assoziiert (Libby et al., 1995).

IL-6 wird unter anderem von Makrophagen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und T-Zellen gebildet und gilt als Paradebeispiel eines proinflammatorischen Zytokins. Es ist in zahlreiche Erkrankungen des zentralen Nervensystems involviert und wurde unter anderem bei Patienten nach Schlaganfall als erhöht nachgewiesen. IL-6 ist ein zentraler Stimulus der Akute-Phase-Reaktion, unter der man eine Allgemeinreaktion des Körpers bei Entzündung mit Produktion verschiedener Proteine wie dem C-reaktiven Protein (CRP) versteht (Gauldie et al., 1992). Insbesondere spielt dieses Zytokin eine Rolle als Entzündungsmediator in der akuten Phase und als neurotropher Mediator in der Postakutphase des Schlaganfalls (Suzuki et al., 2009).

IL-8 gehört eigentlich nicht in die Gruppe der Interleukine, sondern wird zu den Chemokinen gerechnet. Hauptsächlich produziert wird es von Makrophagen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und T-Zellen. IL-8 ist vor allem in an Makrophagen reichen atherosklerotischen Plaques zu finden und aktiviert Monozyten, indem es deren Rekrutierung zu vaskulären Läsionen fördert. Daneben ist es eines der am besten charakterisierten Chemokine, welche chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken (Charo und Taubman, 2004).

IL-10 wird von Makrophagen und T-Zellen produziert und zu den antiinflammatorischen Zytokinen gerechnet. IL-10 gilt als Gegenspieler der proinflammatorischen Zytokine, indem es die Zytokinproduktion, die Antigenpräsentation, die antigenspezifische T-Zell-Proliferation und die Aktivität der Makrophagen inhibiert (Bogdan et al., 1991; Wakkach et al., 2000).

IL-12 wird hauptsächlich von Makrophagen und T-Zellen produziert. Die primäre Funktion von IL-12 besteht in der Induktion und Aufrechterhaltung der Th1-Zell-Antwort auf eine Antigenexposition durch die Förderung der Sekretion von Zytokinen wie IL-2, IFN- γ , IL-17 und einiger Chemokine (Girn et al., 2007).

1.5.4 Funktion der Zytokine in atherosklerotischen Plaques

Zytokine stellen neben ihrer Funktion als Regulatoren von Wachstum und Differenzierung multipotente Mediatoren von Entzündungs- und Immunmechanismen verschiedener entzündlicher Erkrankungen wie der Atherosklerose dar.

Als hauptsächlicher Initialtrigger im Entstehungsmechanismus der Atherosklerose wird oxidiertes LDL (oxLDL) angesehen. Es führt zur Rekrutierung von Makrophagen

und Lymphozyten, die wiederum im aktivierten Zustand eine große Menge verschiedener Zytokine sezernieren. Letztere sind sowohl imstande, ECs und SMCs zu aktivieren, weiterhin führen sie durch Re-Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten dazu, dass sich ein „selbsterhaltender“ inflammatorischer Kreislauf einstellt, der weniger abhängig von oxLDL ist (Tedgui und Mallat, 2006). Ende der 80er Jahre fanden Libby et al. zum ersten Mal heraus, dass SMCs des Menschen sowohl Quelle als auch Ziel von Zytokinen sind, indem sie zeigten, dass IL-1 die IL-1-Produktion durch SMCs und ECs und TNF- α die Produktion von TNF α durch SMCs induzieren (Warner et al., 1987; Warner und Libby, 1989).

Wenn nun der Entzündungsprozess und die Freisetzung von Zytokinen einmal initiiert sind, gibt es zahlreiche weitere sekundäre Trigger in der atherosklerotischen Plaque, die die Produktion von Zytokinen aufrechterhalten und verstärken können. Als Beispiele sollen Hitzeschockproteine, Infektionserreger wie Chlamydia pneumoniae oder Viren wie Herpes-simplex-Virus (HSV) oder Zytomegalie-Virus (CMV), von Zellmembranen abstammende Mikropartikel, MMPs, reaktive Oxidantien, Angiotensin II, „mechanische“ Faktoren wie Scherspannung, Bluthochdruck, Thrombin und andere proinflammatorische Zytokine genannt werden (siehe Übersicht von Tedgui und Mallat, 2006)

Zytokine zeigen eine Vielzahl verschiedener Wirkungen: sie greifen in die Funktion von Endothelzellen ein und beeinflussen so die Entstehung, die Progression und die Komplikation von atherosklerotischen Läsionen. Ein bekanntes Beispiel ist die Regulierung der Expression von Adhäsionsmolekülen (v.a. VCAM-1), wodurch Leukozyten an den Läsionsort gelangen können. Zytokine wie IL-1 und TNF α regulieren die Produktion von Monocyte-chemoattractant-protein (MCP)-1, welches ein starkes Signal für eine direkte Migration von Monozyten in die Tunica intima darstellt. Daneben sind Zytokine auch in der Lage, die Expression von Genen zu steuern, die andere Wachstumsfaktoren und Zytokine selbst kodieren. TNF α kann hierbei IL-1-mRNA in humanen Endothelzellen und glatten Muskelzellen induzieren. Ein weiteres Beispiel zur Funktion der Zytokine ist die Beeinflussung der Produktion von M-CSF in Endothelzellen durch IL-1 und TNF α , wodurch das Wachstum und die Aktivierung mononukleärer Phagozyten gefördert wird (siehe Übersicht von Libby et al., 1995)].

1.6 Weitere Entzündungsmarker

1.6.1 Fibrinogen

Fibrinogen ist das größte Gerinnungsprotein des menschlichen Körpers. Es stellt das Vorläuferprotein von Fibrin dar und bestimmt maßgeblich die Viskosität des Blutes und die Plättchenaggregation (Lowe, 1995). Einige prospektive Studien haben eine positive Assoziation zwischen dem Risiko vaskulärer Ereignisse inklusive Schlaganfall und dem Plasmafibrinogenspiegel gezeigt (Wilhelmsen et al., 1984; Kannel et al., 1987; Ma et al., 1999).

1.6.2 High-sensitivity C-reaktives Protein

High-sensitivity C-reaktives Protein (hsCRP) ist ein Akute-Phase-Protein und wird v.a. in atherosklerotischen Läsionen, der Niere, in Nervenzellen und Alveolarmakrophagen nach Stimulation durch Zytokine gebildet (Ramadori und Christ, 1999; Jialal et al., 2004). Hs-CRP zeichnet sich sowohl durch proinflammatorische als auch durch antiinflammatorische Funktionen aus, die zu einer Progression der Atherosklerose beitragen können (Lagrand et al., 1999). Hierin sind die Aktivierung der Komplementkaskade, die Produktion von Zytokinen und die Induktion entzündlicher Veränderungen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen enthalten. Letztlich ist erwiesen, dass eine hohe Konzentration von hs-CRP im Plasma mit einem vermehrten Auftreten akuter thrombotischer Ereignisse verbunden ist (Pepys und Hirschfield, 2003).

1.7 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war zum einen, die Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen sowie deren CXCR4-Expression mithilfe der Durchflusszytometrie bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna zu untersuchen, um so einen Einblick in das Plaque-Remodeling sowie einen potentiellen Marker zur Risikostratifizierung von Carotisplaques zu gewinnen. Obwohl zirkulierende Vorläuferzellen bei Patienten mit Plaques der Arteria carotis wegen des meist erhöhten kardiovaskulären Risikoprofils wahrscheinlich vermindert sind, vermuteten wir, dass sie eine Rolle im Plaque-Remodeling spielen könnten (Chironi et al., 2007). Die genaue Identifizierung spezifischer Plaquebestandteile ist entscheidend, um

zirkulierende Vorläuferzellen mit der Plaquestabilität zu korrelieren. Da Plaqueimaging mittels MRT gemäß der modifizierten AHA-Klassifikation ein zuverlässiges und nichtinvasives Mittel ist, stabile von instabilen Plaques zu unterscheiden, konnten wir die Stabilität einer Plaque ohne Anfertigung eines histologischen Präparates bestimmen (Cai et al., 2002).

Zum anderen wurde untersucht, ob sich das Interleukinmuster bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques als beeinflussende Größe für Mobilisierung und Differenzierung zirkulierender Vorläuferzellen unterscheidet. Zuletzt war auch die direkte Korrelation mit der Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen Bestandteil dieser Arbeit.

2. Material und Methodik

2.1 Studienplanung- und durchführung

Insgesamt wurden 31 asymptotische Patienten aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München im Zeitraum von April bis Juni 2007 rekrutiert, die in der Doppler- und Duplexsonographie eine extrakranielle Stenose der Arteria carotis interna von über 50% (lokaler Stenosegrad, s.u.) auf mindestens einer Seite aufwiesen.

Ausschlusskriterien aus der Studie waren folgende:

- TIA, Hirninfarkt oder Myokardinfarkt in den letzten sechs Monaten
- Maligne, chronisch entzündliche und infektiöse Erkrankungen sowie kardiale und peripher arterielle Ischämien in den letzten sechs Monaten
- Stenting (CAS) oder Endarteriektomie (CEA) der Arteria carotis in der Vergangenheit
- Andere Ursachen für eine Karotisstenose wie zum Beispiel eine Dissektion, Strahlentherapie in der Halsregion oder eine Vaskulitis

Die Sonographien wurden von geschultem Personal mit dem Gerät „Sonoline Elegra“ (Siemens, Erlangen, Deutschland) in der Neurologischen Klinik durchgeführt. Die Stenosen wurden gemäß den vom Arbeitskreis Gefäßdiagnostik der Deutschen Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin als Standard empfohlenen European Carotid Surgery Trial (ECST)-Kriterien (Widder und Görtler, 2004) nach dem lokalen Stenosierungsgrad klassifiziert. Dieser errechnet sich aus dem Verhältnis zwischen dem minimalen Restdurchmesser und dem lokalen „ursprünglichen“ Lumen (Widder und Görtler, 2004).

Die 31 in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden nach schriftlichem Einverständnis in die Studie zu einem einmaligen Termin in die Neurologische Klinik eingeladen, in der eine nochmalige Beratung zum Inhalt der Studie, ein ausführliches Gespräch über Vorerkrankungen und Vormedikation, die Messung der Vitalparameter (Blutdruck, Puls) sowie Taillen- und Hüftumfang, eine klinisch-neurologische Untersuchung sowie eine Blutentnahme (1 EDTA-, 1 Citrat-, 1 Serum- und 2 CPDA-Monovetten, Sarstedt AG & Co., Numbrecht) durchgeführt wurden. Für jeden Patient wurde außerdem ein standardisierter Fragebogen ausgefüllt (siehe Kapitel 6.4). Die Messung des Blutdrucks erfolgte nicht-invasiv nach zehnmütiger Ruhephase in sitzender Position nach Riva-Rocci. Serum wurde zur späteren

Analyse der Zytokine nach Zentrifugation eingefroren. Im Folgenden wurden spezielle MRT-Aufnahmen angefertigt.

2.2 Magnetresonanztomographie

Alle Patienten dieser Studie wurden mit einem 1,5-Tesla-MRT (Magnetom Symphony Quantum Gradient, Siemens Medical System, Deutschland) mit bilateralen, phasengesteuerten Oberflächenspulen (PACC-SS15; Machnet B.V., Niederlande) untersucht. Im Vorfeld publizierte Protokolle (Cai et al., 2002; Chu et al., 2004) wurden angewandt, um folgende Bilder zu erhalten: 3-dimensionale time-of-flight (3D TOF)-MR-Angiographie, T1-gewichtete (T1W), und T2-gewichtete (T2W) Aufnahmen und Protonendichtewichtung (PDW) von jeweils beiden Karotisarterien. Das MRT war dabei auf die Karotisbifurkation auf der Seite der Stenose zentriert, um einen einwandfreien Vergleich zwischen den kontrastgewichteten Bildern eines jeden Patienten zu gewährleisten. Die Bildsequenzen waren folgende:

- 3D TOF: Bildfeld (field of view; FOV) 200mm/75%; Wiederholungszeit (repetition time; TR) 43ms; Echozeit (time to echo; TE) 7.15ms, Erregungszahl (number of excitations; NEX) 2
- T1W: FOV 160mm/100%; TR 700ms; TE 14ms; NEX 2
- T2W: FOV 160mm/100%; TR 700ms; TE 100ms; NEX 2
- PDW: FOV 160mm/100%; TR 700ms; TE 10ms; NEX 2

Die Schichtdicke betrug 1mm für die 3D TOF und 2mm für die T1W, T2W und PDW-Bilder. Die longitudinale Erfassung jeder Carotisarterie betrug 72mm (72 Schichten) für die 3D TOF und 24mm (12 Schichten) für die T1W, T2W und PDW-Bilder.

Die Patienten wurden während der Untersuchung auf einem Vakuumkopfkissen positioniert, um Bewegungen in der Kopfhalsregion zu minimieren.

Vor der Auswertung der Bilder wurde jeder der vier MRT-Wichtungen eines jeden Patienten eine Qualitätsnote zugeteilt (1 = beste Qualität; 4 = schlechteste Qualität), wobei eine Bildqualität = 4 zum Ausschluss der jeweiligen Wichtung führte. Für jeden Patienten wurden so im Optimalfall insgesamt 108 Bilder ausgewertet (72 Bilder für die 3D TOF und je 12 Bilder für die T1W, T2W und die PDW), die von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet wurden. Zur Bestimmung des Läsionstyps gemäß der modifizierten AHA-Klassifikation wurde zuerst die atherosklerotische Plaque in den 108 Bildern jedes Patienten identifiziert. Im Anschluss daran wurden

drei Schichtbilder jeder Wichtung an der Stelle des minimalen Lumendurchmessers der Plaque zur Auswertung ausgewählt. Der atherosklerotischen Plaque in diesen ausgewählten Bildern wurde im Folgenden ein Typ der modifizierten AHA-Klassifikation zugeordnet.

2.3 Durchflusszytometrie

2.3.1 Laborprotokoll der Studie

Zum Nachweis der zirkulierenden Vorläuferzellen wurden am Tag der MRT-Untersuchung Blutproben entnommen, die innerhalb von zwei Stunden im Labor weiterverarbeitet wurden. Zuerst wurde zur Anreicherung mononukleärer Zellen eine Ficollfällung mit Ficollreagenz (Ficoll-Paque PLUS, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) vorgenommen. Hierzu wurden 20ml Ficollreagenz mit 20ml venösem Vollblut überschichtet und anschließend 20min bei 1900 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch separierten sich die Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten von den Erythrozyten und Granulozyten in einem Überstand, der durch das Ficollreagenz stabil abgetrennt wurde. Dieser Überstand wurde vorsichtig abgenommen und dann zweimal mit Phosphatase Buffered Saline (GIBCO, Paisley, UK) (PBS) gewaschen und jeweils bei 1700 U/min zentrifugiert. Zuletzt wurde nochmals der Überstand abgenommen und verworfen. Das so erhaltene Zentrifugat wurde mit 1000 μ l PBS aufgeschwemmt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend erfolgte mit dem Blutanalysegerät Sysmex (Sysmex KX 21, Gerätenummer A4325) die Bestimmung der Zellzahl in dem Ficoll-Zellen-Gemisch.

Nun wurde die „Antikörper-Färbung“ der Ficoll-zentrifugierten Zellen durchgeführt (siehe Tabelle 2.1): zum Nachweis vitaler CD133+ Vorläuferzellen wurden im ersten Röhrchen 1,25 μ l eines Allophycocyanin (APC)-konjugierten anti-CD45-AK (Klon 2D1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 5 μ l eines Phycoerythrin (PE)-konjugierten anti-CD133-AK (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), 5 μ l eines Fluoreszein-isothiozyanit (FITC)-konjugierten anti-CD34-AK (Klon 8G12, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) sowie, zum Ausschluss nichtvitaler Zellen, 2,5 μ l eines 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD)-Antikörpers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) mit je nach Zellzahl unterschiedlicher Menge an Ficoll-zentrifugierten Zellen aufgefüllt und für 30 Minuten in Dunkelheit auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Probenansatz

mit 200µl FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 1:10 verdünnt mit Aqua destillata, bei Zimmertemperatur in Dunkelheit 10 Minuten lang lysiert. Danach wurde der Probenansatz mit Dulbecco's PBS-Puffer (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) gewaschen und 5 Minuten bei 1700 U/min und 4°C zentrifugiert.

Zum Nachweis vitaler VEGFR2+/CD34+ Vorläuferzellen wurden im zweiten Röhrchen 1,25µl eines APC-konjugierten anti-CD45-AK (Klon 2D1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 5µl eines FITC-konjugierten anti-CD34-AK (Klon 8G12, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 5µl eines PE-konjugierten anti-VEGFR2-AK (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) sowie 2,5µl eines 7-AAD-Antikörpers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ebenfalls mit Ficoll-zentrifugierten Zellen aufgefüllt und nach obenstehender Methode weiterverarbeitet.

Als Kontrolle für die CD133+ und die VEGFR2+/CD34+ Zellen wurden im dritten Röhrchen 1,25µl des APC-konjugierten anti-CD45-AK mit Ficoll-zentrifugierten Zellen aufgefüllt und nach oben beschriebener Methode weiterverarbeitet (sogenanntes „iso“-Röhrchen, erscheint in den Auswertungen immer auf der linken Seite).

Um die Oberflächenexpression von CXCR4 zu messen, wurde eine Färbung des heparinisierten Vollblutes vorgenommen. Eine Ficoll-Zentrifugation wurde zum Schutz von CXCR4 nicht durchgeführt. Zur Färbung wurden im vierten Röhrchen 5µl eines FITC-konjugierten anti-CXCR4-AK (R&D Systems, Minneapolis, USA), 5µl eines PE-konjugierten anti-CD133-AK (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), 1,25µl eines APC-konjugierten anti-CD45-AK (Klon 2D1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) und 2,5µl eines 7-AAD-Antikörpers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ad 50µl mit heparinisiertem, venösem Vollblut aufgefüllt und für 30 Minuten in Dunkelheit auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Probenansatz mit 500µl FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 1:10 verdünnt mit Aqua destillata, bei Zimmertemperatur in Dunkelheit 10 Minuten lysiert. Danach wurde der Probenansatz mit Dulbecco's PBS-Puffer (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) gewaschen und 5 Minuten bei 1700 U/min und 4°C zentrifugiert.

Zur quantitativen Analyse der gemessenen Zellen wurden zwei weitere Probenansätze analog zur Färbung der Ficoll-zentrifugierten Zellen, aber mit Vollblut erstellt: im fünften Röhrchen wurde eine Färbung der CD133+ Zellen vorgenommen und anschließend der Probenansatz in ein TruCOUNT-Röhrchen (BD Biosciences,

San Jose, CA, USA) überführt. Im sechsten Röhrchen wurde ein „iso“-Röhrchen mit anti-CD45-AK erstellt.

Nach Abnahme des nach Zentrifugation überstehenden Puffers aus den sechs Röhrchen erfolgte entweder die unmittelbare durchflusszytometrische Analyse oder eine Fixierung des Probenansatzes mit 150µl 1 %iger Paraformaldehyd-(PFA-) Lösung, wobei die Messung im Durchflusszytometer spätestens am nächsten Tag vorgenommen wurde.

Die Messung wurde schließlich unter Verwendung des oben beschriebenen Durchflusszytometers FACS Calibur durchgeführt. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität von mindestens 100000 Ereignissen gemessen und mit CellQuest-Software (CellQuest Pro Version 4.0, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ausgewertet.

Tabelle 2.1: *Verwendete Antikörper zur „Zellfärbung“*

Verwendete Antikörper	Hersteller	Zielzellen/Funktion
APC-konjugierter anti-CD45-AK (Klon 2D1)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA	Panleukozytenmarker
PE-konjugierter anti-CD133-AK	Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA	Vorläuferzellmarker
FITC-konjugierter anti-CD34-AK (Klon 8G12)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA	Stammzellmarker
PE-konjugierter anti-VEGFR2-AK	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	Endothelmarker
FITC-konjugierter anti-CXCR4-AK	R&D Systems, Minneapolis, USA	SDF-1, Homing
PerCP-konjugierter 7-AAD-Antikörper	BD Biosciences, San Jose, CA, USA	Vitalitätsmarker

2.3.2 Bestimmung der CD133+ zirkulierenden Vorläuferzellen

Zur Bestimmung der CD133+ Vorläuferzellen der Ficoll-zentrifugierten Zellen wurden die gemessenen FACS-Daten nach folgendem Schema mit CellQuest-Software ausgewertet:

Zuerst wurde mittels Gating der Zelldebris und die 7-AAD+, avitalen Zellen aus der weiteren Auswertung abgetrennt (R1 und R8, Abbildung 2.1).

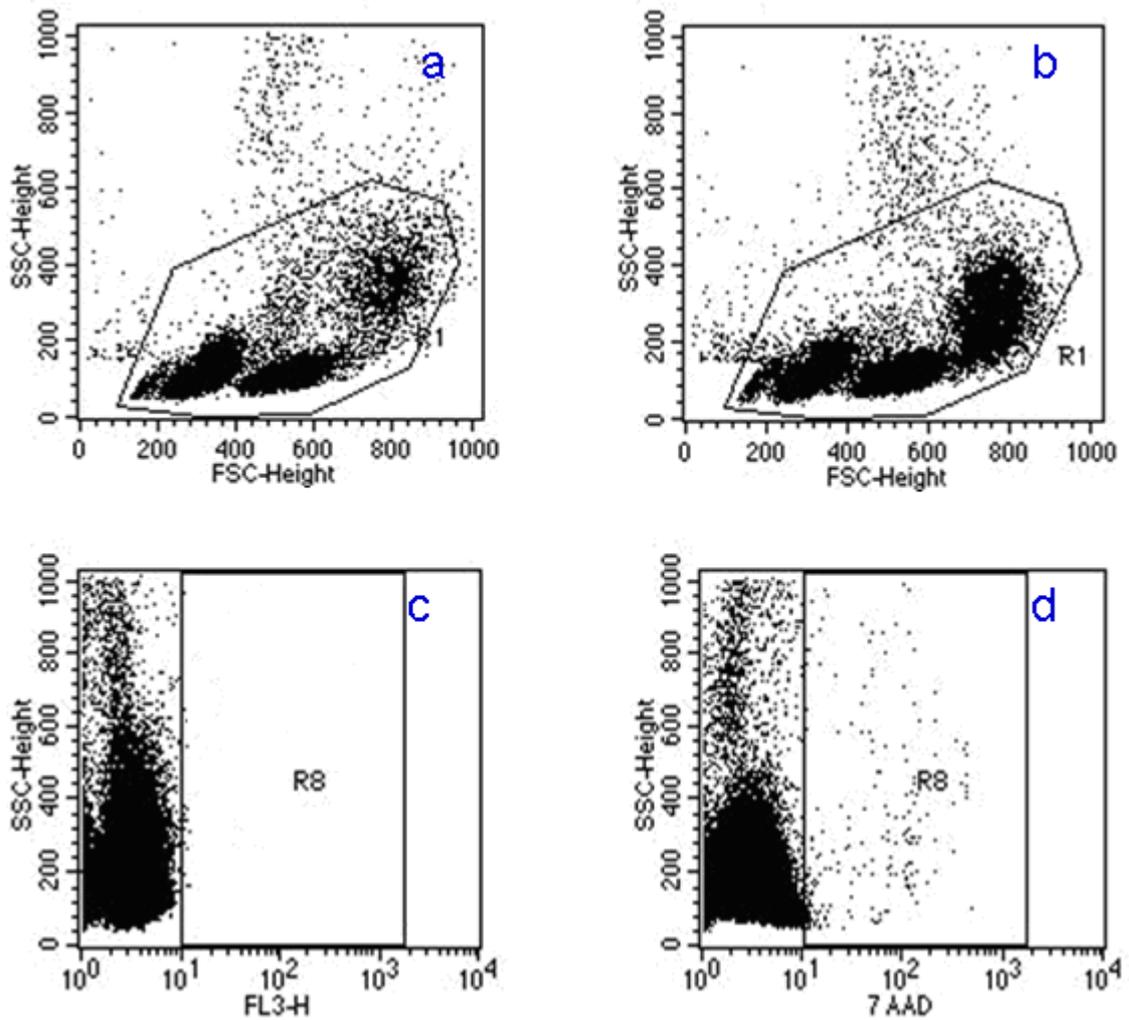


Abbildung 2.1: oben: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung; x-Achse: FSC, y-Achse: SSC; R1: mononukleäre Zellen; links (a, in allen folgenden Punktdiagrammen gleich): Negativkontrolle; rechts (b, in allen folgenden Punktdiagrammen gleich): Mehrfachfärbung, in diesem Fall CD45 APC, CD34 FITC, AC133 PE und 7-AAD; unten: R8: Darstellung der avitalen, 7-AAD-positiven Zellen (c und d); FL3-H: 3. Fluoreszenzkanal

Im nächsten Schritt wurde ein Gate um die CD133+ Zellpopulation der CD45(low)+ Zellen (R4) und der im SSC kleingranulierten Zellen (R16) gesetzt. Das dazugehörige „iso“-Röhrchen, das ausschließlich mit APC-konjugierten anti-CD45-AK inkubiert wurde, wurde als Negativkontrolle gemessen (siehe Abbildung 2.2).

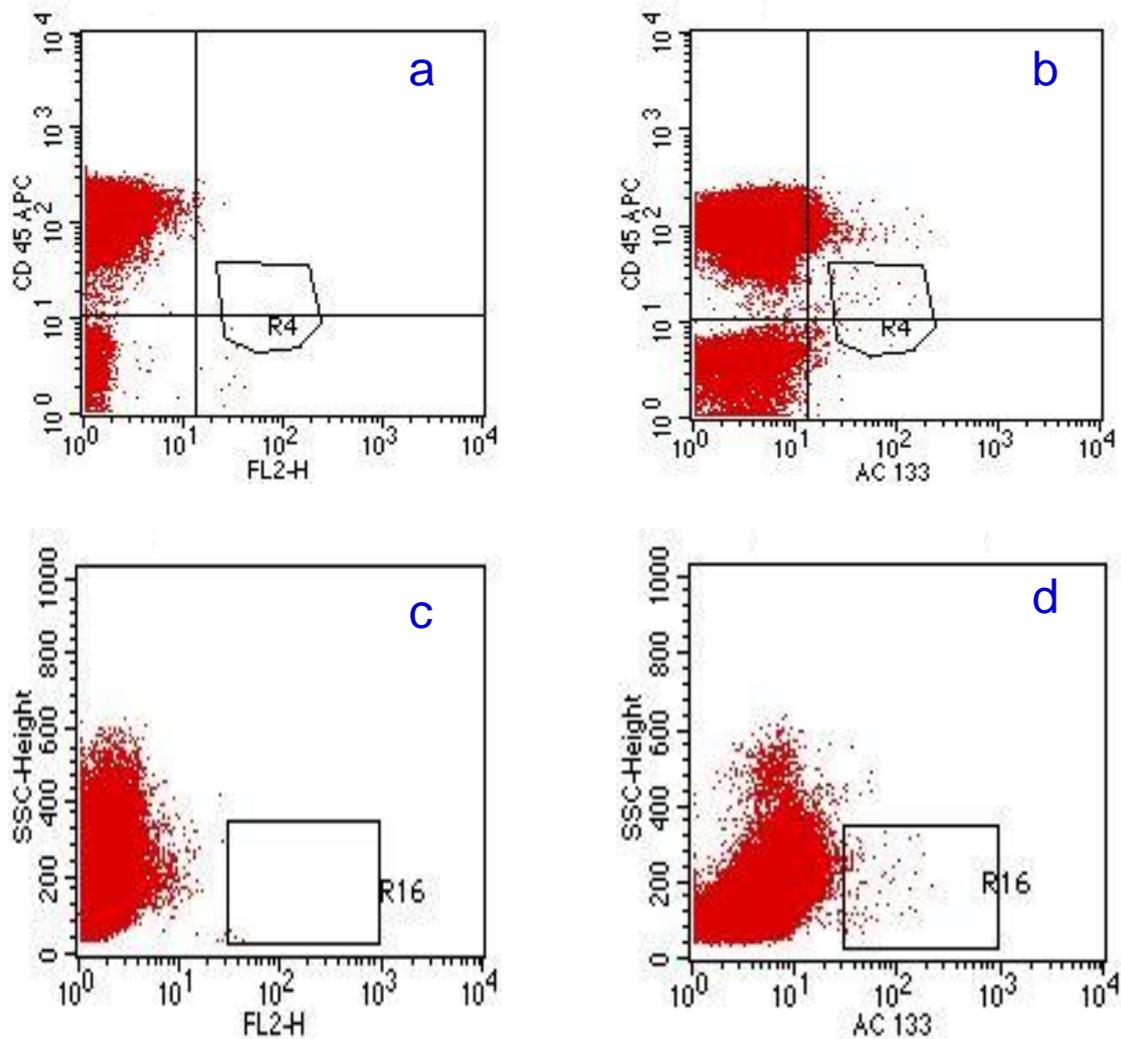


Abbildung 2.2: Punktdiagramm zur Darstellung der AC133 PE positiven Zellen in Bezug auf CD45 APC-(low)-Positivität (R4, a und b) und in Bezug auf SSC (R16, c und d); FL2-H: 2. Fluoreszenzkanal

Nun wurden die CD133+ Zellen (R4 und R16) in ein neues Feld aus SSC und FSC übertragen und in diesem nochmals die kleingranulierten Zellen gegatet. Diese Gates wurden schließlich in ein Feld aus CD133 und CD34 überführt, um Zellen zu erfassen, die auch für CD34 positiv waren. Auf diese Weise konnte die relative Anzahl der gemessenen CD133+ Zellen bestimmt werden.

2.3.3 Bestimmung der VEGFR2+/CD34+ zirkulierenden Vorläuferzellen

Analog zur Bestimmung der CD133+/CD34+ Vorläuferzellen wurden auch hier mittels Gating der Zelldebris und die 7-AAD+, avitalen Zellen aus der weiteren Auswertung abgetrennt.

Anschließend wurde ein Gate um die CD34+ Zellen gesetzt (R10), weil unter diesen Zellen bereits im Vorfeld die doppelpositiven (CD34 und VEGFR2) Zellen mittels „Backgating“ nachgewiesen werden konnten, und letzteres in ein neues Gate mit SSC und FSC überführt. Nach Verifizierung der kleingranulierten Zellen (R11) wurde R11 in ein Gate aus VEGFR2 und CD34 überführt und dort wurden die doppelpositiven Zellen erfasst (R4, siehe Abbildung 2.3).

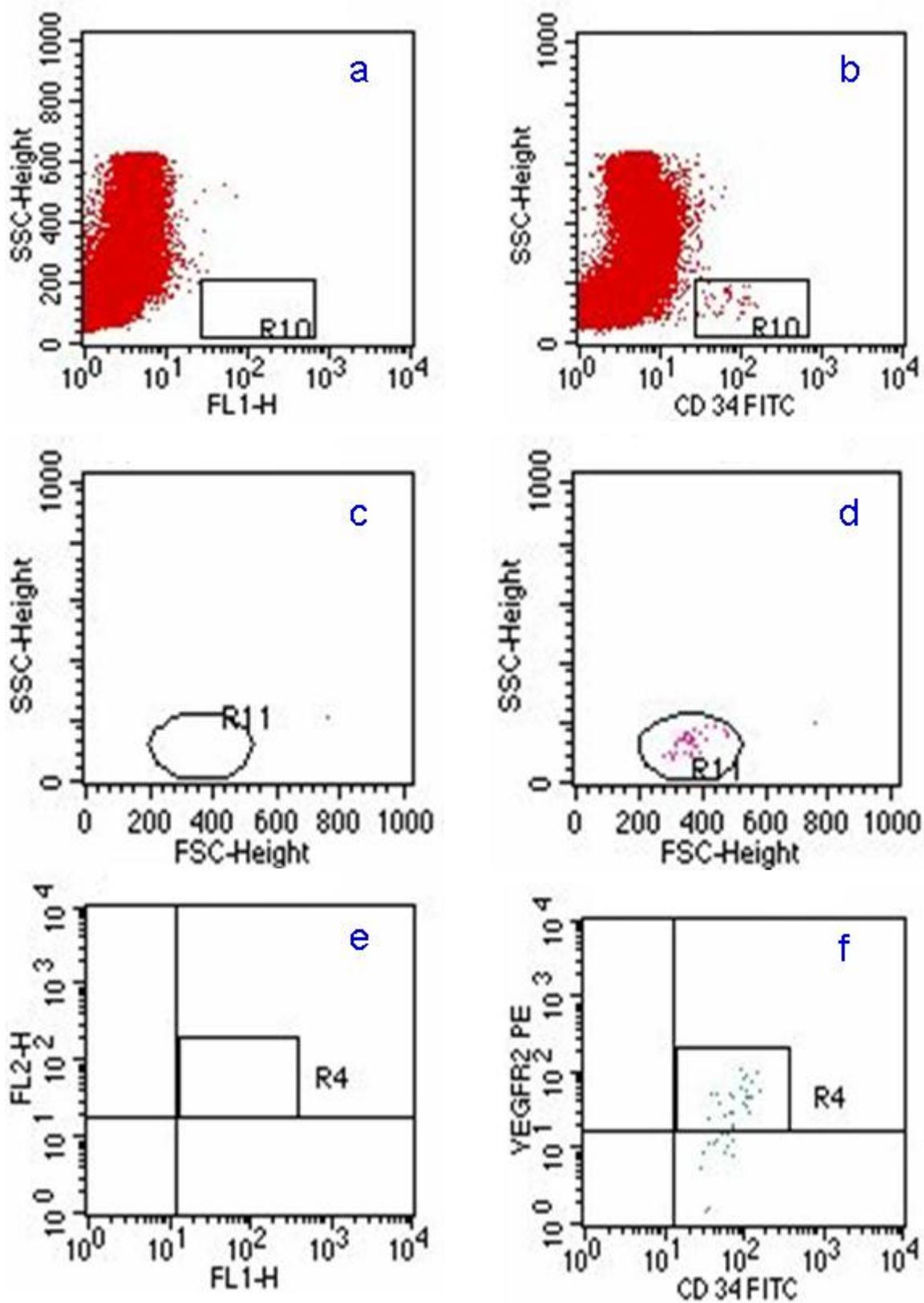


Abbildung 2.3: Punktdiagramm zur Darstellung der VEGFR2 PE-positiven Zellen; CD34 FITC-positiven Zellen (a und b, R10); CD34 FITC-positiven, klein-granulierten Zellen (c und d, R11); doppelpositive (VEGFR2 PE und CD34 FITC) Zellen (e und f, R4); FL1-H: 1. Fluoreszenzkanal

Auf diese Weise konnte die relative Anzahl der gemessenen VEGFR2+/CD34+ Zellen bestimmt werden.

2.3.4 Bestimmung der absoluten Anzahl der CD133+ und VEGFR2+/CD34+ Vorläuferzellen

Die Berechnung wurde mithilfe des „iso“-Vollblutröhrchens und des AC133+ gefärbten Trucount-Röhrchens sowie mit den im Sysmex ermittelten prozentualen Anteilen für Lymphozyten (LY), Monozyten (MO) und neutrophilen Granulozyten im Vollblut durchgeführt:

Zellen/ μ l Blut =

In der Probe gemessene Zellen x „Beads“/TruCOUNT-Röhrchen x (%LY+%MO)/100

gemessene „Beads“ x 36,25

In der Probe gemessene Zellen:	Absolute Zellzahlen gemessen im jeweiligen Röhrchen für CD133+ und VEGFR2+/CD34+
„Beads“/TruCOUNT-Röhrchen:	Anzahl der Beads im vorgefertigten TruCOUNT-Röhrchen
(%LY+%MO)/100	Prozentuale Anteile gemessen im Sysmex
Gemessene „Beads“	Gemessene Beads im AC133+ gefärbten TruCOUNT-Röhrchen
36,25	Verwendete Mikroliter bei der Vollblutfärbung (36,25 μ l Vollblut + 13,75 μ l Antikörper = 50 μ l)

2.3.5 Bestimmung der Oberflächenexpression von CXCR4

Analog zu den vorherigen Auswertungen wurden auch hier zunächst mittels Gating der Zelldebris und die 7-AAD+, avitalen Zellen aus der weiteren Auswertung abgetrennt.

Im Weiteren wurde ein Gate um die AC133+ Zellen gesetzt (R7) und diese Zellen in ein Histogramm überführt, welches die Fluoreszenzintensität von CXCR4+ auf AC133+ Zellen darstellt (siehe Abbildung 2.4).

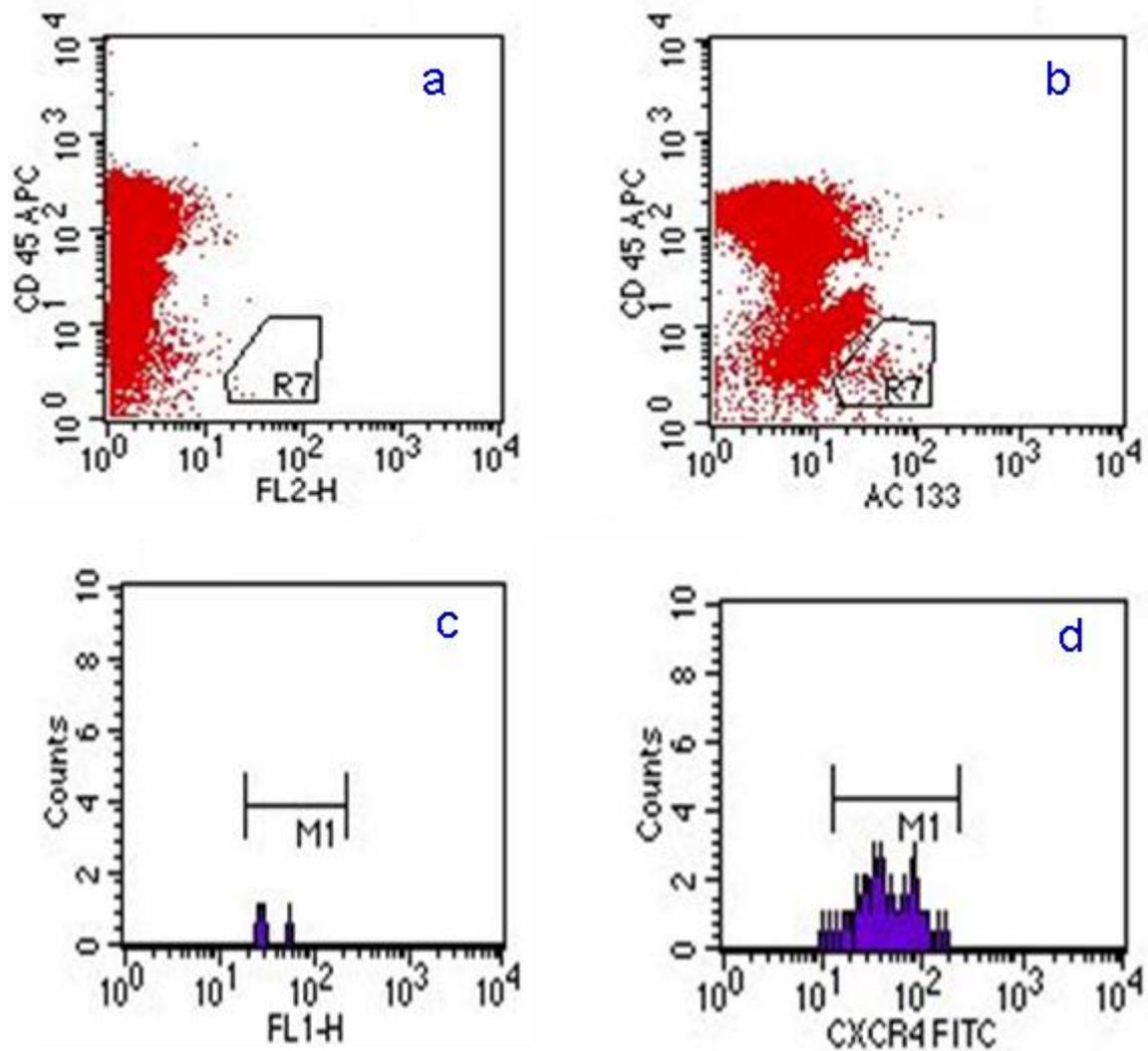


Abbildung 2.4: Punktdiagramm zur Darstellung der AC133 PE-positiven Zellen (a und b, R7), Histogramm zur Darstellung der CXCR4 FITC-Fluoreszenzintensität der AC133 PE-positiven Zellen (c und d, M1)

2.4 Quantitative Zytokinbestimmung

Für die Quantifizierung der Entzündungsfaktoren bzw. Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und TNF α in den Serumproben der Studienpatienten wurde das Cytometric Bead Array „Human Inflammation Kit“ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) verwendet. Unter „Cytometric Bead Array“ versteht man hierbei eine Methode zur Bestimmung von löslichen Substanzen (in diesem Fall Zytokinen) aus Zellüberstand oder Serum. Für jedes Zytokin liegt eine Population von Capture-Beads (Polymerkügelchen) mit unterschiedlicher Intensität in der ersten Fluoreszenz

(FL1) vor. Der Zytokin-Capture-Bead-Komplex bindet wiederum einen spezifischen Sekundär-Antikörper mit gleicher Fluoreszenzintensität in FL2, was den Vorteil mit sich bringt, dass hier die Menge an gebundenen Antikörpern ausschlaggebend ist. Vom Prinzip handelt es sich also um einen "Sandwich-ELISA", wobei die Capture-Antikörper aber nicht an eine Mikrotiterplatte gebunden sind. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte schließlich mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Über eine Eichkurve (4-Parameterfit) konnten so quantitative Ergebnisse erzielt werden, die wie die Vorläuferzellen mit CellQuest Software ausgewertet wurden.

Aus einem von BD Biosciences gelieferten Standard wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt mit einer Konzentration von 20–5000 pg/ml der zu messenden Zytokine. Diese Standardverdünnungen wurden ebenso wie die Patientenproben mit einem Gemisch der Antikörper-Bead-Komplexe inkubiert, danach gewaschen und die gebundenen Komplexe mit dem Sekundär-Antikörper angefärbt. Nach einer Eichung des Gerätes auf die zu erwartende niedrigste und höchste Intensität der Fluoreszenz in FL1 und FL2, wurden die Proben nach einer nochmaligen Waschung gemessen, die Eichkurve erstellt und die Menge der Zytokine in pg/ml mit Hilfe der gemessenen Intensität der Fluoreszenz an Hand dieser Kurve bestimmt.

2.5 Weitere Laboruntersuchungen

Des Weiteren wurden die eingefrorenen Serumproben der Studienpatienten im Zentrallabor der Klinischen Chemie des Klinikums Rechts der Isar nach dem Wiederauftauen auf hs-CRP und Fibrinogen untersucht. Die Messung von hs-CRP erfolgte nephelometrisch am Gerät BN Pro Spec (Siemens Healthcare, Eschborn, DE), die Bestimmung des abgeleiteten Fibrinogens (Derived Fibrinogen) erfolgte turbidimetrisch mittels des Assays Thromborel S am Gerät Behring Coagulation System (BCS) (Siemens Healthcare, Eschborn, DE).

2.6 Statistische Analyse

Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für quantitative Variablen und dem Chi-Quadrat-Test für qualitative Variablen analysiert (SPSS 17.0 für Windows). Zu jedem Test wurde als Signifikanzniveau $\alpha=0.05$ festgelegt. Da es sich bei der Auswertung der Zytokine um einen explorativen

2. Material und Methodik

Versuch zur Generierung einer Hypothese handelte, wurde hier auf die Anwendung multipler Testung verzichtet (Bender et al., 2007).

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

Es wurden insgesamt 31 Patienten mit asymptomatischer Stenose der Arteria carotis interna rekrutiert. Zwischen beiden Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, was Alter, Geschlecht und die meisten kardiovaskulären Risikofaktoren betrifft (siehe Tabelle 3.1). Es fiel auf, dass zum Zeitpunkt der Untersuchung die Patienten beider Gruppen gut mit Statinen eingestellt waren.

Tabelle 3.1: Übersicht der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit Alter, Geschlecht, verschiedenen klinischen Parametern und Medikation

	Patienten mit stabilen Plaques	Patienten mit instabilen Plaques	Signifikanz
	(n=23)	(n=8)	P
Alter in Jahren, Median (Spanne)	73 (61-84)	70 (59-84)	n.s.
Geschlecht, männlich, No. (%)	17 (73,9%)	5 (62,5%)	n.s.
BMI > 25, No. (%)	17 (73,9%)	6 (75%)	n.s.
Bluthochdruck, No. (%)	21 (91,3%)	7 (87,5%)	n.s.
Vorhofflimmern, No. (%)	0	0	
Koronare Herzkrankheit, No. (%)	10 (43,5%)	4 (50%)	n.s.
Hypercholesterinämie, No. (%)	17 (73,9%)	7 (87,5%)	n.s.
Typ-II-Diabetes, no. (%)	6 (26,1%)	2 (25%)	n.s.
Aktuelle oder Ex-Raucher, No. (%)	13 (56,5%)	5 (62,5%)	n.s.
Früherer Myokardinfarkt >6 Monate, No. (%)	6 (26,1%)	1 (12,5%)	n.s.
Früherer Schlaganfall/TIA >6 Monate, No. (%)	7 (30,4%)	6 (75%)	p=0,043
Medikation :			
Statine, No. (%)	19 (82,6%)	7 (87,5%)	n.s.
Thrombozytenaggregationshemmer, No. (%)	23 (100%)	8 (100%)	n.s.

3. Ergebnisse

In der Gruppe mit instabilen Plaques zeigte sich jedoch ein signifikant gehäuftes Vorkommen von länger als sechs Monate zurückliegendem Hirninfarkt oder transitorisch-ischämischer Attacke (TIA) (p-Wert im exakten Fisher-Test: 0,043; siehe Tabelle 3.2)

Tabelle 3.2: Vierfeldertafel von Plaquestabilität und früherer Schlaganfall/TIA > 6 Monate; p-Wert im Exakten Fisher-Test: 0,043)

Früherer Hirninfarkt/TIA > 6 Monate						
				Plaquestabilität		
				Stabil	Instabil	Total
Früherer Hirninfarkt/TIA	Ja	Anzahl	16	2	18	
		% von Total	51,6%	6,5%	58,1%	
	Nein	Anzahl	7	6	13	
		% von Total	22,6%	19,4%	41,9%	
Total		Anzahl	23	8	31	
		% von Total	74,2%	25,8%	100,0%	

3.2 MRT-Plaque-Imaging

Durch MRT-Plaque-Imaging (siehe Tabelle 3.3) wurden gemäß der modifizierten AHA-Klassifikation bei 23 Patienten stabile Plaques (Typ III, VII und VIII, siehe Abbildung 3.1) und bei 8 Patienten instabile Plaques (Typ IV/V und VI, siehe Abbildung 3.2) nachgewiesen. Es zeigte sich, dass bei den in die Studie eingeschlossenen asymptomatischen Patienten vor allem der Läsionstyp IV/V bei den instabilen Plaques (n=7, 87,5% der instabilen Plaques, siehe Abbildung 3.2) und VII bei den stabilen Plaques (n=13, 56,5% der stabilen Plaques, siehe Abbildung 3.1) vorlagen. Es mussten keine Patienten wegen schlechter Bildqualität ausgeschlossen werden.

Tabelle 3.3: Übersicht über die unterschiedlichen Plaquetypen der in die Studie eingeschlossenen Patienten

	Patienten mit stabilen Plaques	Patienten mit instabilen Plaques
	(n=23)	(n=8)
Plaquetyp : (nach modifizierter AHA-Klass.)		
I/II, no.(%)	0	0
III, no.(%)	2 (8,7%)	
IV/V, no.(%)		7 (87,5%)
VI, no.(%)		1 (12,5%)
VII, no.(%)	13 (56,5%)	
VIII, no.(%)	8 (34,8%)	

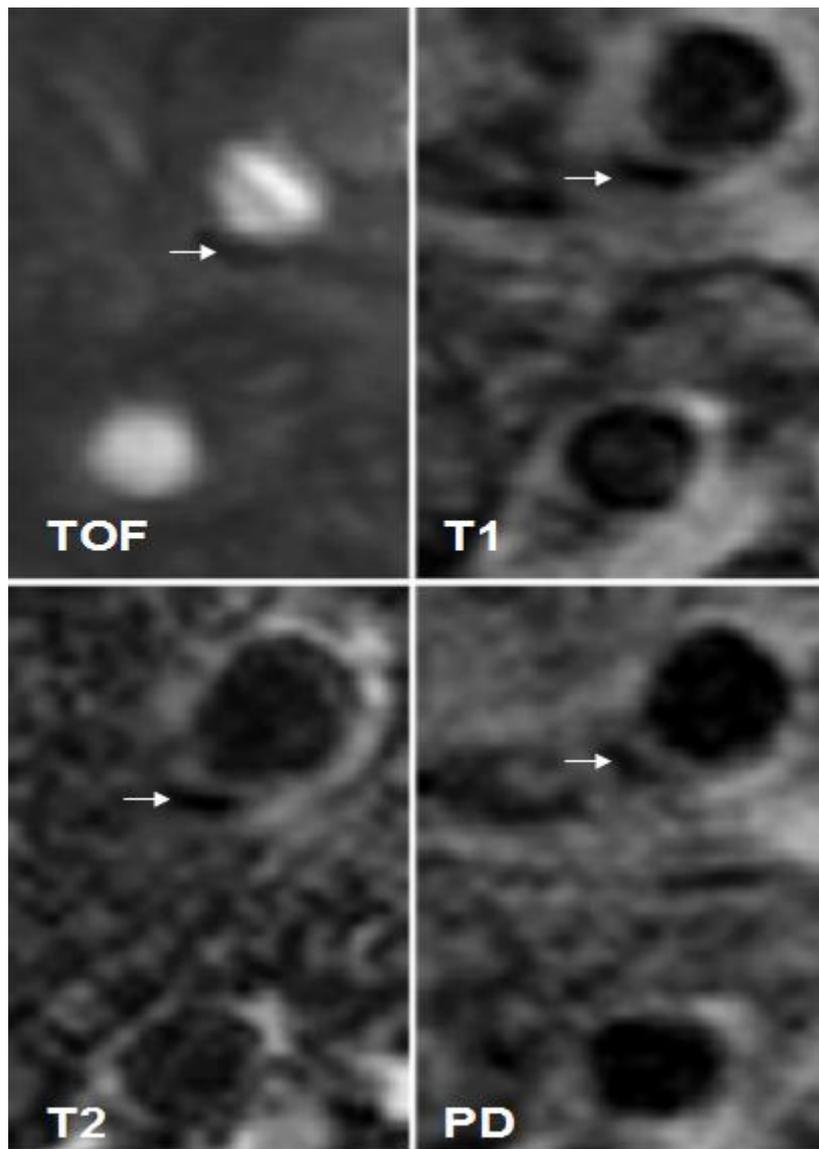


Abbildung 3.1: Beispiel für den stabilen Läsionstyp VII in der linken Arteria carotis interna: Die kalzifizierte Regionen (siehe Pfeile) zeigen sich im MRT hypointens in allen Aufnahmen. Originalvergrößerung x25

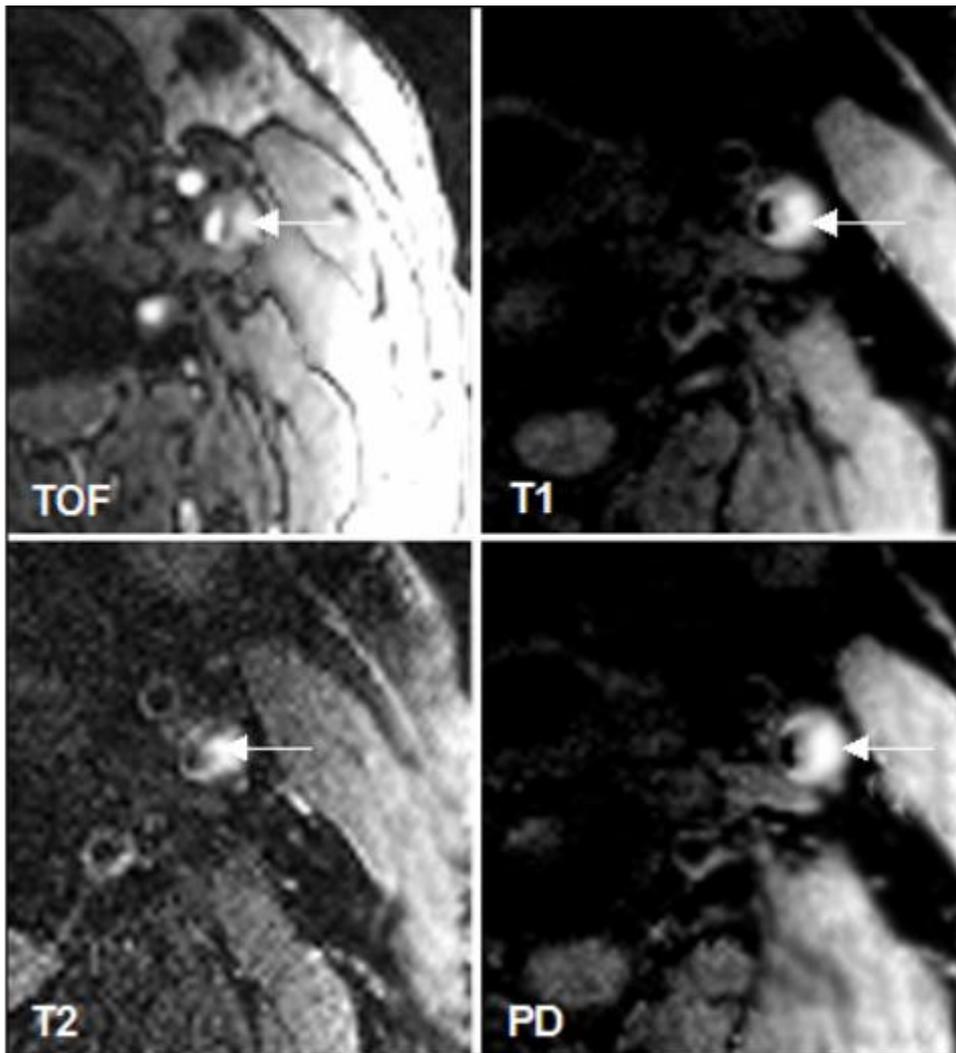


Abbildung 3.2: Beispiel für den instabilen Läsionstyp VI in der linken Arteria carotis interna: die Hämorrhagie innerhalb der Plaque (siehe Pfeile) zeigt sich hyperintens in allen Aufnahmen. Originalvergrößerung x25

3.3 Zirkulierende Vorläuferzellen

3.3.1 Zirkulierende CD133+ und VEGFR2+/CD34+ Vorläuferzellen

Die Anzahl der CD133+ Vorläuferzellen differierten nicht signifikant zwischen Patienten mit instabilen Plaques und solchen mit stabilen Plaques ($0,07 \pm 0,04$ Zellen/ μl vs. $0,07 \pm 0,03$ Zellen/ μl , $p=0,982$). Auch die Analyse der VEGFR2+/CD34+ Zellen zeigte ein ähnliches Ergebnis ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($0,12 \pm 0,04$ Zellen/ μl vs. $0,14 \pm 0,04$ Zellen/ μl , $p=0,219$) (siehe Tabelle 3.4, Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4).

3. Ergebnisse

Tabelle 3.4: Vorläuferzellen und CXCR4-Expression bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna

	Patienten mit stabilen Plaques	Patienten mit instabilen Plaques	Signifikanz
Zellarten:	(n=23)	(n=8)	p-Wert
CD133+ Vorläuferzellen (Zellen/μl)	0,07 (0,02–0,26)	0,07 (0,03–0,14)	0,964
VEGFR2+CD34+ Vorläuferzellen (Zellen/μl)	0,12 (0,06–0,17)	0,15 (0,11–0,23)	0,206
CXCR4-Oberflächenexpression auf CD133+ Vorläuferzellen	62,6 (51,62-75,16)	87,57 (72,83-98,62)	0,009

Gezeigt sind Median (25%-75% Quartil)

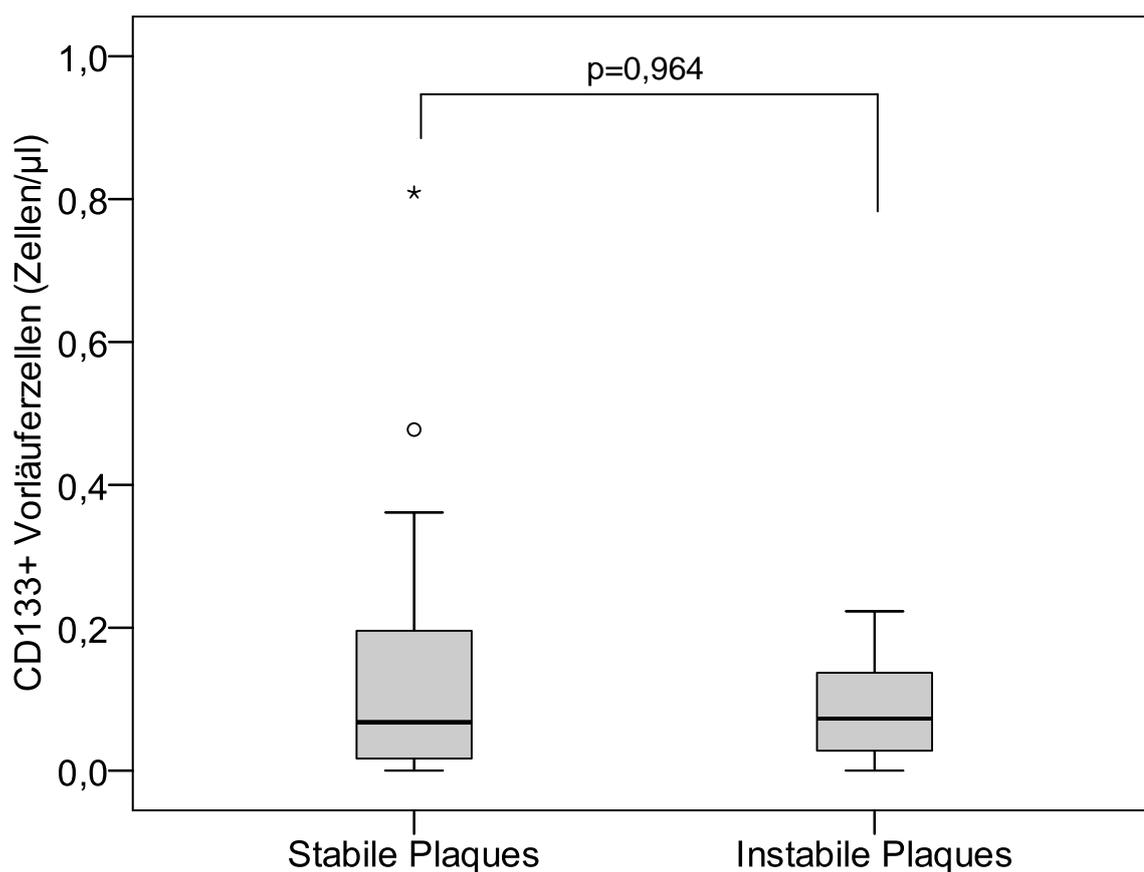


Abbildung 3.3: CD133+ Vorläuferzellen bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna

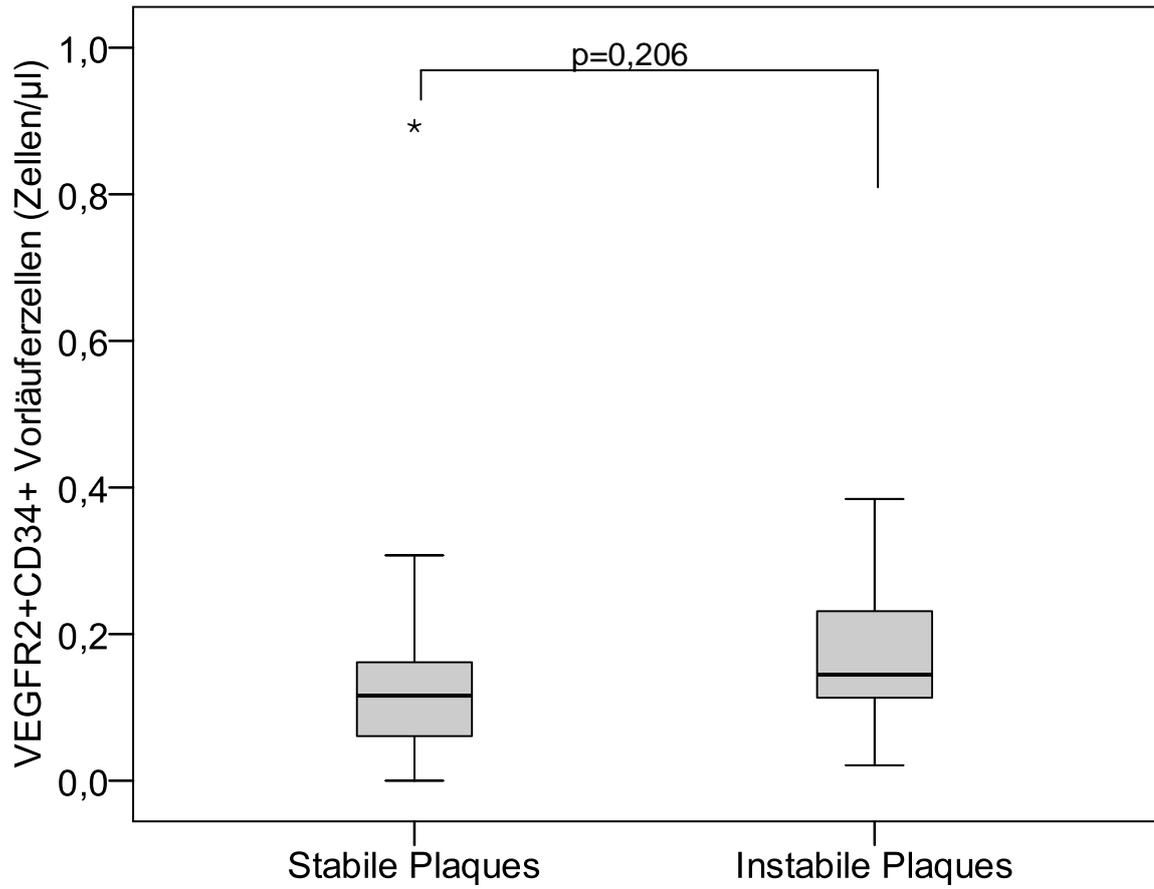


Abbildung 3.4 VEGFR2+CD34+ Vorläuferzellen bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna

3.3.2 CXCR4-Oberflächenexpression auf CD133+ Vorläuferzellen

Die relative Oberflächenexpression von CXCR4 auf CD133+ Vorläuferzellen war jedoch signifikant höher bei Patienten mit instabilen Plaques als bei Patienten mit stabilen Plaques ($87,57 \pm 5,64$ vs. $62,6 \pm 3,76$, $p=0,009$, siehe Abbildung 3.5).

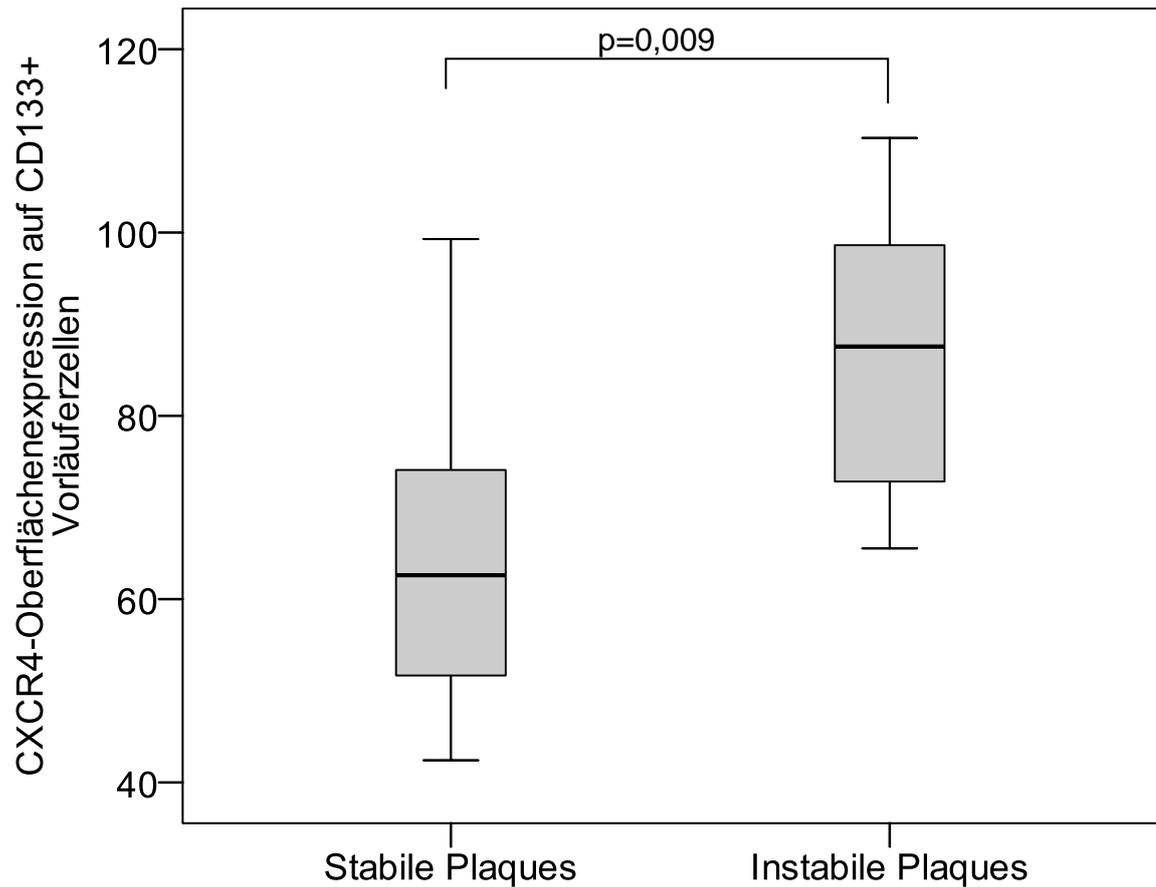


Abbildung 3.5: CXCR4-Expression auf CD133+ Vorläuferzellen bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna

3.4 Zytokine

Zwischen Patienten mit stabilen Plaques und Patienten mit instabilen Plaques ergaben sich hinsichtlich der gemessenen Zytokine keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 3.5: Im Serum gemessene Zytokine bei stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna; p-Werte zum Mann-Whitney-Test

	Plaquesbeschaffenheit						Sig.
	Stabile Plaques			Instabile Plaques			
	Mittelwert	Median	25%-75% Quartil	Mittelwert	Median	25%-75% Quartil	p-Wert
IL 12-p 70	3,91	3,38	3,13-3,69	3,30	3,26	3,22-3,36	p=0,416
TNF-a	3,40	3,37	3,02-3,53	3,42	3,34	3,16-3,69	p=0,857
IL -10	2,96	2,90	2,63-3,12	2,77	2,82	2,58-3,00	p=0,309
IL -6	3,12	2,93	2,72-3,26	2,80	2,80	2,47-3,17	p=0,320
IL-1β	3,72	3,39	3,33-4,03	3,44	3,48	3,17-3,64	p=0,416
IL -8	10,96	7,15	6,17-10,91	7,94	7,13	6,25-9,53	p=0,769

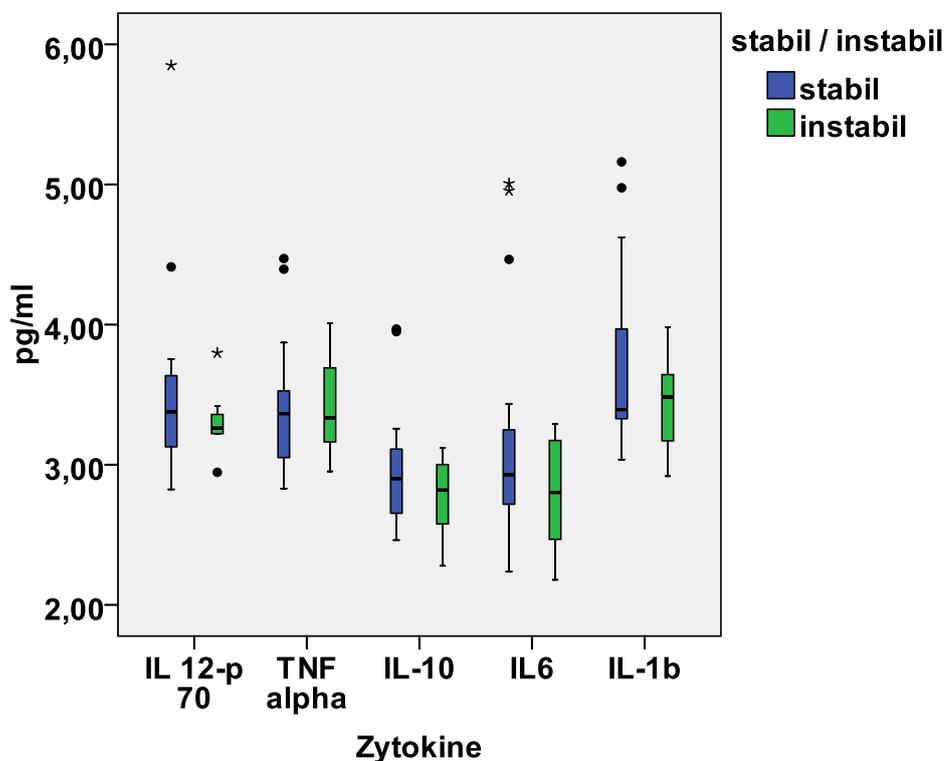


Abbildung 3.6: IL 12-p 70, TNF- α , IL-10, IL-6 und IL-1 β bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna

3. Ergebnisse

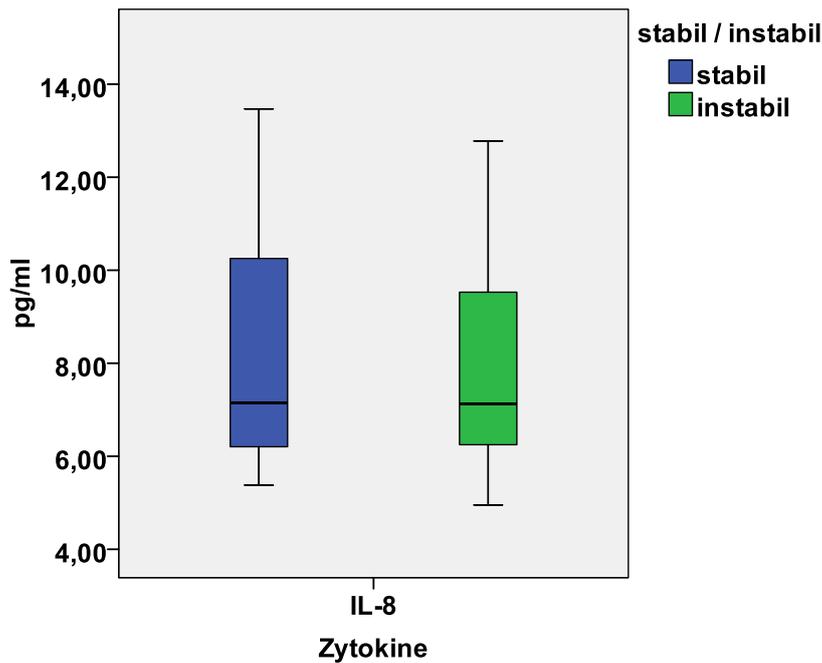


Abbildung 3.7: IL-8 bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna

Jedoch konnten diverse Korrelationen zwischen IL-1 β und IL12-p70 ($R=0,45$, $p=0,011$), IL-1 β und TNF- α ($R=0,47$, $p=0,007$), IL-6 und IL-10 ($R=0,41$, $p=0,022$), IL-1 β und IL-10 ($R=0,39$, $p=0,030$), IL-8 und IL-6 ($R=0,40$, $p=0,027$) und IL-8 und IL-1 β ($R=0,37$, $p=0,044$) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.6). Da es sich hier um einen explorativen Versuch handelte, wurde auf die Anwendung multipler Testung verzichtet. IL-1 β und TNF- α werden im Folgenden graphisch hervorgehoben (siehe Abbildung 3.8).

Tabelle 3.6: Korrelationen nach Spearman zwischen den gemessenen Zytokinen

	IL 12-p 70	TNF- α	IL -10	IL -6	IL-1 β	IL -8
IL 12-p70	1	0,33 ($p=0,073$)	0,28 ($p=0,123$)	0,16 ($p=0,381$)	0,45 ($p=0,011$)	0,22 ($p=0,239$)
TNF- α	0,33 ($p=0,073$)	1	0,28 ($p=0,134$)	0,17 ($p=0,366$)	0,47 ($p=0,007$)	0,108 ($p=0,561$)
IL -10	0,28 ($p=0,123$)	0,28 ($p=0,134$)	1	0,41 ($p=0,022$)	0,39 ($p=0,030$)	0,28 ($p=0,123$)
IL -6	0,16 ($p=0,381$)	0,17 ($p=0,366$)	0,41 ($p=0,022$)	1	0,18 ($p=0,326$)	0,40 ($p=0,027$)
IL-1 β	0,45 ($p=0,011$)	0,47 ($p=0,007$)	0,39 ($p=0,030$)	0,18 ($p=0,326$)	1	0,37 ($p=0,044$)
IL -8	0,22 ($p=0,239$)	0,108 ($p=0,561$)	0,28 ($p=0,123$)	0,40 ($p=0,027$)	0,37 ($p=0,044$)	1

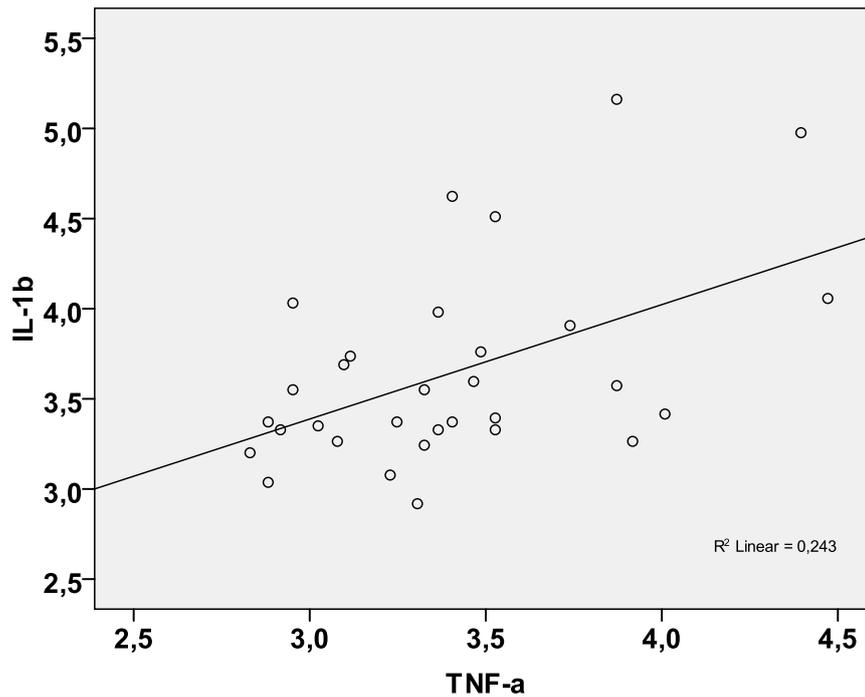


Abbildung 3.8: Korrelation zwischen TNF- α und IL-1 β

Des Weiteren konnten zwischen IL-10, IL-6 und IL-1 β auf der einen Seite und CD133+ Vorläuferzellen auf der anderen Seite negative Korrelationen festgestellt werden (siehe Tabelle 3.7). Graphisch hervorzuheben sei die Korrelation zwischen IL-1 β und CD133+ Vorläuferzellen (siehe Abbildung 3.9).

3. Ergebnisse

Tabelle 3.7: Korrelationen nach Spearman zwischen den gemessenen Zytokinen und den Vorläuferzellen

	CD133+ Vorläuferzellen	VEGFR2+/CD34+ Vorläuferzellen	CXCR4- Oberflächenexpression auf CD133+ Vorläuferzellen
IL-12-p 70	-0,02 (p=0,926)	0,131 (p=0,492)	0,14 (p=0,475)
TNF-α	-0,301 (p=0,10)	-0,09 (p=0,630)	-0,043 (p=0,820)
IL-10	-0,368 (p=0,042)	-0,090 (p=0,630)	0,029 (p=0,875)
IL-6	-0,359 (p=0,047)	-0,160 (p=0,390)	-0,074 (p=0,694)
IL-1β	-0,456 (p=0,010)	-0,114 (p=0,542)	0,125 (p=0,502)
IL-8	-0,075 (p=0,690)	-0,053 (p=0,778)	0,064 (p=0,731)

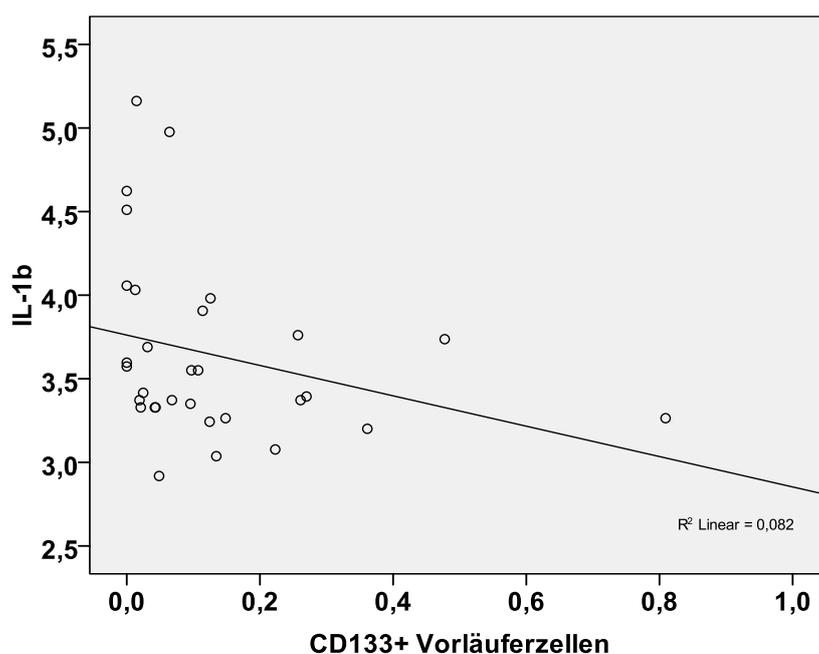


Abbildung 3.9: Korrelation zwischen CD133+ Vorläuferzellen und IL-1 β

3.5 Weitere Ergebnisse

Die Messung von hs-CRP und Fibrinogen ergab nach statistischer Auswertung mittels Mann-Whitney-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen stabilen und instabilen Plaques (hs-CRP: $p=0,619$; Fibrinogen: $p=0,429$).

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna kein Unterschied in der Anzahl CD133+ und CD34+/VEGFR2+ Vorläuferzellen sowie in der Konzentration der Zytokine TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 und den Entzündungsparametern Fibrinogen und hsCRP im Serum besteht. Die Expression von CXCR4 auf CD133+ Zellen war jedoch signifikant höher bei Patienten mit instabilen Plaques im Vergleich zu Patienten mit stabilen Plaques. Außerdem zeigten sich in einer explorativen Analyse diverse Korrelationen zwischen den gemessenen Zytokinen untereinander sowie den Zytokinen mit den Vorläuferzellen.

4.2 MRT-Methode

4.2.1 Detektion von Hochrisikopatienten

Von 31 Patienten mit asymptomatischer Stenose der Arteria carotis interna konnten bei 23 Patienten stabile Plaques und bei 8 Patienten instabile Plaques mittels des Plaque-Imagings diagnostiziert werden, wobei unter den instabilen Plaques der Läsionstyp IV/V vorherrschte. Esposito et al. untersuchten in ihrer Arbeit die Verteilung des Läsionstyps bei symptomatischen und asymptomatischen Patienten mit der gleichen Methode. Bei 71,4 % der symptomatischen Patienten wurde der instabile Läsionstyp gefunden, wohingegen der stabile Läsionstyp in dieser Gruppe nur 26% ausmachte (Esposito et al., 2007). Unter den asymptomatischen Patienten boten 72,3% der Patienten einen stabilen Läsionstyp und 27,7% einen instabilen Läsionstyp. In der vorliegenden Arbeit hatten 8 Patienten der insgesamt 31 untersuchten asymptomatischen Patienten eine instabile Plaque, was zu einem ähnlichen Prozentsatz von 25,8% führt.

Mittels MRT-Plaque-Imaging konnten wie in der Einleitung beschrieben die für eine Ruptur risikobestimmenden morphologischen Charakteristika atherosklerotischer Plaques wie lipidreicher Kern oder Hämorrhagien innerhalb einer Plaque dargestellt werden. Auch war es bei einigen Patienten möglich, neben dem vorherrschenden Läsionstyp Verdickungen der Gefäßwand jener Areale darzustellen, in denen im Anfangsstadium der Plaqueentstehung noch keine Lumeneinengung vorlag. Dies

könnte dahingehend von Interesse sein, als dass Gefäßpatienten mit großen und/oder unregelmäßigen Plaques, die noch keine Beschwerden haben und bei denen mittels angiographischer Methoden noch keine Lumeneinengung festgestellt wird, frühzeitig erkannt werden können.

4.2.2 Limitationen der MRT-Methode

Verglichen mit der Sonographie zählen die hohen Kosten und der Zeitaufwand, der für das Anfertigen und die Analyse der MRT-Bilder verwandt werden muss, sicher zu den Nachteilen dieser Methode. Bei Patienten mit Metallimplantaten oder Klaustrophobie wird man ebenfalls auf eine andere Technik zurückgreifen müssen. Ein weiterer Kritikpunkt ist die manchmal nur unzureichende Qualität der Aufnahmen, die in den meisten Fällen durch Bewegung der Patienten verursacht ist und durch spezielle Vorrichtungen an den Oberflächenspulen verhindert werden muss.

4.3 Quantitative Messung der Vorläuferzellen

4.3.1 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung zirkulierender Vorläuferzellen

Die Mobilisation von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wird ausgelöst durch die Freisetzung mobilisierender Faktoren, dem ein Prozess folgt, in dem die Adhäsion zwischen Vorläuferzellen und Stammzellen durch proteolytische Enzyme aufgelöst wird (Papayannopoulou, 2000). Es konnten verschiedene Mechanismen identifiziert werden, die die Mobilisationskaskade initiieren können, wie z.B. Ischämie, Gefäßtrauma oder körperliche Aktivität. Ein spezielles Ziel dieser Studie war, den Einfluss der regenerativen und entzündlichen Vorgänge in stabilen und instabilen Plaques auf die Freisetzung von Vorläuferzellen zu untersuchen.

Es wurde gezeigt, dass sich die Anzahl sowohl der CD133+ als auch der VEGFR2+/CD34+ Vorläuferzellen zwischen Patienten mit stabilen und solchen mit instabilen Plaques der Arteria carotis interna nicht signifikant unterscheidet. Bis jetzt gibt es nur wenige Studien, die die Korrelation zwischen Vorläuferzellen und atherosklerotischen Läsionen bzw. deren Risikofaktoren untersucht haben: Vasa et al. haben gezeigt, dass atherosklerotische Risikofaktoren negativ mit der Anzahl von Vorläuferzellen korrelieren (Vasa et al., 2001b). Patienten mit Plaques der Aorta, der

Arteria carotis und Arteria femoralis wiesen in einer anderen Arbeit eine verminderte Anzahl von Vorläuferzellen auf. Vor allem bei Karotisplaques lagen darin um 48% weniger Vorläuferzellen im Vergleich zu Patienten ohne Plaques an dieser Stelle vor, wohingegen der Effekt bei Plaques in der Aorta (Reduktion um 18%) oder der Arteria femoralis (Reduktion um 26%) weniger stark ausgeprägt war (Chironi et al., 2007). So kann man annehmen, dass die Anzahl der Vorläuferzellen negativ mit dem Grad der atherosklerotischen Gefäßkrankheit korreliert und die Karotisstenose hierfür einen starken Indikator darstellt. Zusätzlich gibt es zwei Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Vorläuferzellen und dem kardiovaskulären Risiko entdeckt wurde. Werner et al. beobachteten 519 Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit über 12 Monate und konnten bei den Patienten mit mindestens einem kardiovaskulären Ereignis in diesem Zeitraum eine niedrigere Anzahl von Vorläuferzellen als bei Patienten ohne ein solches Ereignis messen (Werner et al., 2005). Andere Autoren wiesen nach, dass eine reduzierte Anzahl von Vorläuferzellen mit einem erhöhten Risiko zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse in einer Follow-up-Periode von 10 Monaten bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit einhergeht (Schmidt-Lucke et al., 2005).

Die unabhängige Assoziation einer niedrigeren Anzahl von Vorläuferzellen mit schlechterer kardiovaskulärer Prognose ließ vermuten, dass Vorläuferzellen einen unabhängigen Marker zur Risikoeinschätzung bzw. Einschätzung der Stabilität auch asymptomatischer Plaques der Arteria carotis interna bedeuten könnten. Bezüglich des Risikoprofils der in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit häufigem Vorkommen von Bluthochdruck, Diabetes und Rauchen und natürlich dem Vorliegen der Karotisstenosen, erwarteten wir in beiden Gruppen insgesamt eine relativ geringe Anzahl von Vorläuferzellen. Es konnte aber kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit der Plaquemorphologie festgestellt werden. So gibt es keinen Hinweis darauf, dass verschiedene Plaquetypen die Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen beeinflussen. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein höherer Verbrauch zirkulierender Vorläuferzellen durch Umbau- und Reparaturvorgänge eine höhere Mobilisation kompensiert. Es könnte also möglich sein, dass sich die Mobilisation von Vorläuferzellen bei Patienten mit instabilen Plaques und solchen mit stabilen Plaques unterscheidet, auch wenn die absolute Anzahl der Vorläuferzellen gleich ist.

4.3.2 Messung zirkulierender und endothelialer Vorläuferzellen

Zum Nachweis zirkulierender Vorläuferzellen benutzen wir zum einen CD133 als Marker, um zirkulierende Vorläuferzellen von zirkulierenden reifen Endothelzellen zu unterscheiden. Der anti-CD133-Antikörper erkennt Vorläuferzellen, die auch CD34 exprimieren, bindet aber nicht an reife Endothelzellen. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass CD133+ Zellen nach Verlust ihres Oberflächenmarkers in Endothelzellen differenzieren können (Gehling et al., 2000). Aus diesem Grund bietet sich CD133 als eine Art Ausgangsmarker an und kennzeichnet Zellen, die imstande sind, sich sowohl zu hämatopoetischen als auch zu endothelialen Vorläuferzellen zu differenzieren. (Tsai et al., 2009). Ein Vorteil, dass HSCs mitenthalten sind, rührt daher, dass EPCs aus HSCs wahrscheinlich hervorgehen können (Urbich und Dimmeler, 2004)

Die Messung endothelialer Vorläuferzellen als speziellere Untergruppe gestaltet sich diffizil, da es bis heute keinen Goldstandard für deren Quantifizierung gibt, weder für die Messung mithilfe der Durchflusszytometrie noch für die zweite Methode, der Messung durch Zellkultur (Rouhl et al., 2008). Eine früher verwendete Methode neben der morphologischen Zelltypisierung bestand darin, EPCs mithilfe des von Willebrand Faktors (vWF) zu identifizieren (Khan et al., 2005). Erst durch die Etablierung der hochsensitiven Durchflusszytometrie und die Entdeckung spezifischer monoklonaler Antikörper konnte eine genauere Untersuchung dieser Zellpopulation durchgeführt werden (Asahara et al., 1997; Peichev et al., 2000). Um EPCs eindeutig von hämatopoetischen Vorläuferzellen abgrenzen zu können, bedarf es eines Endothelzellmarkers wie VEGFR2. Würden nun CD34, VEGFR2 und zusätzlich der Vorläuferzellmarker CD133 als Marker zur Messung von EPCs verwendet, würde sich das Problem ergeben, dass der Anteil von CD34+/CD133+/VEGFR2+, also dreifach positiven Vorläuferzellen, verschwindend gering ist. In der Literatur werden hierfür Werte um 0,002% (Peichev et al., 2000) sowie zwischen 0,01 und 0,0001% (Khan et al., 2005) der zirkulierenden mononukleären Zellen angegeben. Bei 50000 gemessenen Zellen läge nach Peichev et al. also nur eine Zelle vor, die Messung doppelt so vieler Zellen würde eine zu große Streuung mit sich bringen, so dass die Ergebnisse nicht reliabel wären. Auch gibt es widersprüchliche Aussagen über die Differenzierung dieser Zellen. Case et al. haben gezeigt, dass CD34+/CD133+/VEGFR2+ Zellen im Kulturmedium

nicht zu endothelialen Zellen, sondern zu hämatopoetischen Zellen differenzieren (Case et al., 2007). Ein Grund dafür ist sicher die Tatsache, dass CD133 noch die Unreife der Zellen kennzeichnet und somit mehr Differenzierungsmöglichkeiten auch in Richtung hämatopoetischer Zellen gegeben sind. Wir bestimmten deswegen als zweite Gruppe zirkulierende Vorläuferzellen, die nur CD34 und VEGFR2 exprimieren und nannten diese Zellen explizit nicht endotheliale Vorläuferzellen, sondern CD34+/VEGFR2+ zirkulierende Vorläuferzellen. Die gleiche Arbeitsgruppe um Case et al. konnte des weiteren zeigen, dass nur solche CD34+ Zellen zu endothelialen Zellen werden, welche gleichzeitig negativ für den Panleukozytenmarker CD45 sind (Case et al., 2007). Widersprüchliche Aussagen gibt es von anderen Autoren, die EPCs als positiv oder negativ für den Panleukozytenmarker CD45 beschrieben (Peichev et al., 2000; Quirici et al., 2001). Die Ergebnisse unserer Studie waren komplementär zu einer Arbeit von Kondo et al., bei der sowohl zirkulierende Vorläuferzellen als auch endotheliale Vorläuferzellen eine geringe CD45-Positivität aufwiesen (Kondo et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit zur Messung von EPCs bestünde darin, die gewünschten Zellen mit Antikörpern gegen CD31 und CD146, die nicht auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, aber auf endothelialen Vorläuferzellen und Endothelzellen exprimiert werden, anzufärben. Zur Unterscheidung zwischen endothelialen Vorläuferzellen und Endothelzellen könnte ebenfalls die Hinzunahme von CD133 dienen (Khan et al., 2005), was aber die gleiche Problematik mit einer zu geringen Anzahl messbarer Zellen darstellen würde. Zuletzt wird zum Nachweis von EPCs häufig die Methode angewandt, mononukleäre Zellen zu kultivieren. Der EPC-Phänotyp wird dann mittels Aufnahme von azetyliertem LDL und Bindung von Ulex-Lektin definiert. Diesbezüglich konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich hier um keine EPCs handelt, sondern um Zellen, die Monozyten-/Makrophagen-Marker exprimieren (Rehman et al., 2003). Aus diesem Grund wurde auch diese Methode in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

4.3.3 Methode der Durchflusszytometrie

Allgemein ist es so, dass aufgrund fehlender, eindeutiger Marker von EPCs und dem seltenen Vorkommen dieser Zellen in der peripheren Zirkulation deren Quantifizierung eine technische Herausforderung bleibt und einer Standardisierung bedarf. Es muss weiter an der Definition und der zellulären Herkunft von EPCs

geforscht werden. Nach neuesten Erkenntnissen werden nicht nur hämatopoetische Zellen als Quelle endothelialer Vorläuferzellen diskutiert, sondern auch Zellen aus der myeloischen Reihe wie z.B. Makrophagen, nicht-hämatopoetische Zellen aus dem Knochenmark oder bestimmte gewebeständige Zellen (Kassmeyer et al., 2009). Des Weiteren können leichte Veränderungen in der Technik sowohl der Durchflusszytometrie als auch der Zellkultur zum Nachweis verschiedener Zellpopulationen führen. Außerdem sind Ergebnisse, die mit der Durchflusszytometrie gewonnen werden, nicht mit denen aus der Zellkultur vergleichbar. Auch ist kein Normwert für die Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen definiert, so dass nur zwischen Patienten mit verschiedener Exposition bzw. Erkrankung wie z.B. instabilen versus stabilen Plaques unterschieden werden kann. Bezüglich des seltenen Auftretens zirkulierender Vorläuferzellen kann insofern Abhilfe geschaffen werden, als dass eine hohe Anzahl von „Zellevents“ gezählt wird, in dieser Studie 100000, um statistisch aussagekräftige Aussagen treffen zu können.

4.4 CXCR4-Oberflächenexpression

4.4.1 Ergebnisse der CXCR4-Oberflächenexpression

Zur Untersuchung des „Homings“, unter dem man das Gelangen von Vorläuferzellen zu ihrem Bestimmungsort versteht, in diesem Fall beschädigtes (Gefäß-)gewebe, wurde neben der Quantifizierung zirkulierender Vorläuferzellen die Oberflächenexpression von CXCR4 auf CD133+ Vorläuferzellen durchflusszytometrisch gemessen. Unsere Vermutung war, dass auch in instabilen Plaques durch eine gestörte vaskuläre Versorgung ein ischämisches Milieu vorherrscht, in dem es zu einer vermehrten Expression von SDF-1 durch Endothelzellen und folglich zu einer verstärkten Einwanderung von Vorläuferzellen kommen muss. Im Gegensatz zu anderen Studien untersuchten wir nicht die Anzahl CXCR4+ Zellen, sondern die Expression von CXCR4 auf AC133+ Zellen als einen funktionellen Parameter und konnten eine signifikant erhöhte Expression von CXCR4 auf CD133+ Vorläuferzellen bei Patienten mit instabilen Plaques im Vergleich zu stabilen Plaques nachweisen. Unser Ergebnis spricht dafür, dass nicht die Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen, sondern deren Aktivierung mit der Schwere der Atherosklerose assoziiert ist. Da die funktionell aktiven Vorläuferzellen im

geschädigten Gewebe nicht direkt aufgespürt werden können, bietet sich CXCR4 auf zirkulierenden Vorläuferzellen als Hilfsparameter an.

Eine offene Frage bleibt, ob es spezifischere Mechanismen gibt, die eine erhöhte CXCR4-Expression bedingen. Dazu könnte die entzündliche Komponente in der instabilen Plaque beitragen: Die Expression von CXCR4 wird beeinflusst durch IL-4 und TNF- α , was bislang an neuronalen/hämatopoetischen Zelllinien gezeigt wurde (Jinquan et al., 2000; Rostasy et al., 2005). Beide Zytokine werden durch T-Zellen bzw. Makrophagen produziert. Alvarez Garcia et al. haben herausgefunden, dass instabile Plaques eine signifikant höhere Anzahl an Makrophagen und T-Lymphozyten als stabile Plaques vorweisen (Alvarez Garcia et al., 2003). So könnte ein möglicher Mechanismus der Hochregulation von CXCR4 darin bestehen, dass vermehrt Zytokine in instabilen Plaques produziert werden, die folglich zu einer höheren CXCR4-Expression führen.

4.4.2 Mögliche Bedeutung der erhöhten CXCR4-Oberflächenexpression für Reendothelialisierung und Neovaskularisation in instabilen Plaques

Unsere Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Rekrutierung von Vorläuferzellen zu geschädigtem Gewebe bei Patienten mit instabilen Plaques erhöht sein könnte und dass trotz gleicher Anzahl von Vorläuferzellen bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques ein Unterschied in deren Funktionalität bestehen könnte.

Zwei mögliche Mechanismen könnten eine stärkere Rekrutierung von Vorläuferzellen bei Patienten mit instabilen Plaques erklären:

- 1) Instabile Plaques könnten einen endogenen Reparaturmechanismus aktivieren, indem sie Vorläuferzellen, die in den Prozess der Reendothelialisierung von geschädigtem Endothel involviert sind, zu den Plaques rekrutieren (Walter et al., 2002). Wegen verstärkten Vorkommens von Leukozyten in instabilen Plaques und ihrer oben beschriebenen Zytokinproduktion könnte die CXCR4-Expression hochreguliert und dadurch die Rekrutierung von Vorläuferzellen zum Plaque via CXCR4/SDF-1-Interaktion stimuliert werden. Das würde also heißen, dass der entzündliche Prozess in der instabilen Plaque die Rekrutierung von Vorläuferzellen im Sinne diesen endogenen Reparaturmechanismus verstärken könnte.

- 2) Die zweite mögliche Erklärung könnte der potentiell nachteilige Effekt zirkulierender Vorläuferzellen sein, durch Induktion der Neovaskularisation zur Instabilität der Plaque beizutragen bzw. sie zu fördern. Urbich et al. haben gezeigt, dass nur Vorläuferzellen und nicht reife Endothelzellen die Neovaskularisation nach Ischämie verbesserten. Als mögliche Gründe wurde von den Autoren genannt, dass reife Endothelzellen keine Homingrezeptoren wie CXCR4 exprimieren oder weniger Wachstumsfaktoren freisetzen können. Mit einem ähnlichen Versuchsaufbau wurde von Kalka et al. drei Jahre früher ebenfalls der Beweis erbracht, dass die Transplantation ex vivo angereicherter EPCs die Neovaskularisation fördert, in diesem Fall im Rahmen einer Gliedmaßenischämie der Maus (Kalka et al., 2000b). Aber auch bei myokardialer Ischämie wurde der positive Effekt von Vorläuferzellen in Bezug auf die Neovaskularisation demonstriert (Kawamoto et al., 2001). Eine andere Forschergruppe entdeckte schließlich Nabelschnurblut als nützliche Quelle endothelialer Vorläuferzellen zur Transplantation in ischämisches Gewebe und folglich Verbesserung der Neovaskularisation (Murohara et al., 2000). Angiogenese und Vaskulogenese könnten in atherosklerotischen Plaques dazu führen, dass mehr Entzündungszellen und Zytokine in die Läsion einwandern und auf diese Weise die Instabilität der Plaque fördern. Das Ausmaß neu entstandener Gefäße war in einer weiteren Arbeit signifikant größer in rupturierten Plaques als in nicht-rupturierten Plaques der menschlichen Aorta (Moreno et al., 2004). So könnte die Neovaskularisation durch eine erhöhte Rekrutierung von Vorläuferzellen die Plaqueinstabilität verschlechtern und zur Ruptur der Plaque beitragen.

Wahrscheinlich finden in Bezug auf atherosklerotische Plaques beide Mechanismen der Vorläuferzellfunktion, also Reendothelialisierung und Neovaskularisation, nebeneinander zur gleichen Zeit statt und beeinflussen sich gegenseitig.

4.5 Zytokine

4.5.1 Ergebnisse der Zytokinmessung

Wir vermuteten, dass sich in den instabilen Plaques wegen stärkerer Entzündung im Vergleich zu den stabilen Plaques auch systemisch eher die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12 und weniger das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 nachweisen ließen. Kleemann et al. beschreiben die Atherosklerose als Konsequenz der Imbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (Kleemann et al., 2008). In einer neueren Studie wurde anhand von Endarteriektomieproben der Zusammenhang zwischen der Kalzifikation von Plaques in der Arteria carotis und der unterschiedlichen Genexpression pro- und antiinflammatorischer Faktoren in der fibrösen Kappe der Plaque untersucht (Wahlgren et al., 2009). Hierbei zeigte sich neben einer höheren Anzahl von Makrophagen in den nicht-kalzifizierten, als instabil angesehenen Plaques ebenfalls eine höhere mRNA-Expression von MCP-1 und der proinflammatorisch agierenden Zytokine IL-8 und IL-1. Die mRNA-Expression des antiinflammatorisch wirkenden IL-10 war analog dazu in den kalzifizierten, als stabil angesehenen Plaques höher. Dies lässt den Schluss zu, dass instabile Plaques mit einem proinflammatorischen Milieu assoziiert sind, wodurch die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen, der Abbau extrazellulärer Matrix und die Erosion der fibrösen Kappe begünstigt werden. Auf der anderen Seite besitzen stabile Plaques weniger Entzündung und mehr strukturelle Integrität und sind deswegen weniger für Rupturen und konsekutive zerebrovaskuläre Symptome anfällig (Wahlgren et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit ergab sich kein Unterschied zwischen den gemessenen Zytokinen bei stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna. Der Grund für dieses Ergebnis könnte zum einen an der dafür zu geringen Fallzahl von 31 Patienten liegen, zum anderen daran, dass die systemische Messung der Zytokine im Patientenserum nicht die gleichen Ergebnisse liefert wie eine lokale Messung an bioptischem Material.

Es sollen trotzdem kurz einige, wichtige Ergebnisse aus der Literatur in Bezug auf Zytokine und Atherosklerose erwähnt werden, nicht zuletzt um auch die in einer explorativen Analyse ermittelten Korrelationen zwischen den gemessenen Zytokinen dieser Arbeit zu diskutieren:

IL-1 war eines der ersten Zytokine, die mit der Gefäßwandentzündung der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht wurden. Es fördert indirekt über VCAM-1 und MCP-1 (siehe Kapitel 1.5.4) die Rekrutierung von Leukozyten und deren Transmigration in die Gefäßwand und trägt damit zu einem proinflammatorischen Milieu bei, sobald die Entzündung einmal initiiert worden ist (Girn et al., 2007). Am Knockout-Mausmodell konnte eine Abnahme des Schweregrades der Atherosklerose bei apoE-/IL-1 β -defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Kirii et al., 2003). Erhöhte IL-1-Spiegel wurden außerdem gemeinsam mit verstärkter Rupturtendenz atherosklerotischer Plaques beobachtet. Verantwortlich dafür ist die Eigenschaft von IL-1, die Produktion von Metalloproteinasen zu fördern und dadurch zum Abbau der fibrösen Kappe beizutragen (Libby et al., 1995).

IL-1 β zählt mit TNF- α zu den wichtigsten Mediatoren der Immunantwort auf einen entzündlichen Reiz. Die Rolle von TNF- α in der Atherosklerose ist aber im Gegensatz zu IL-1 β nicht vollständig geklärt, vor allem weil die Ergebnisse verschiedener Tiermodelle stark variieren. So gibt es eine Studie, in der die atherogene Rolle von TNF- α in Form signifikant kleinerer atherosklerotischer Plaques in der Aorta von apoE-/TNF- α -defizienten Mäusen im Vergleich zu nur apoE-defizienten Mäusen aufgezeigt wurde (Ohta et al., 2005). In einer anderen Arbeit sollte eigentlich gezeigt werden, dass ein Ausschalten einer der beiden Rezeptoren von TNF- α , p55, am Mausmodell vor Atherosklerose schützen würde. Stattdessen hatten die Mäuse ohne p55 Läsionen an der Aorta, die um das 2,3-fache größer waren als in der Vergleichsgruppe mit p55. Als Grund für dieses Ergebnis nannten die Autoren eine höhere Aktivität der Scavenger-Rezeptoren bei den Mäusen ohne p55 (Schreyer et al., 1996).

IL-1 und TNF- α besitzen trotz verschiedener Struktur und Rezeptoren eine hohe funktionelle Ähnlichkeit und agieren synergistisch (Dinarello, 1997). Dies könnte die positive Korrelation in der vorliegenden Arbeit erklären. Bei hohen Werten von IL-1 liegen auch hohe Werte von TNF- α vor, und umgekehrt.

IL-6 fördert die Produktion von CRP und TNF- α , die mit der Progression der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht werden (Haddy et al., 2003). Des Weiteren stimuliert IL-6 über einen positiven Feedback-Mechanismus seine eigene Produktion durch Intimazellen und Makrophagen, zusammen mit IL-8 und MCP-1. Eine entsprechende positive Korrelation zwischen IL-6 und IL-8 findet sich auch in dieser Arbeit. Des Weiteren verstärkt IL-6 die Rekrutierung von Leukozyten an die

atherosklerotische Plaque und begünstigt die Entwicklung von Schaumzellen aus glatten Muskelzellen, was die Plaquemorphologie negativ beeinflussen kann (Klouché et al., 2000; von der Thüsen et al., 2003).

IL-8 verstärkt alle Interaktionen zwischen Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten und die Migration der letzteren in die Gefäßläsion. Daneben triggert IL-8 auch die Anheftung von Monozyten an das Gefäßendothel und deren Infiltration in die Gefäßwand und trägt somit zur frühen Progression der Atherosklerose bei (Ito und Ikeda, 2003). Gerade durch den inhibitorischen Effekt von IL-8 auf Metalloproteinasen-Inhibitoren (TIMP-1) und dem dadurch folgenden Überwiegen von Metalloproteinasen mit verstärktem Ausdünnen der fibrösen Kappe der Plaque trägt IL-8 zur Destabilisierung der Plaque bei (Moreau et al., 1999).

Auch IL-12 ist in den atherosklerotischen Gefäßprozess involviert. Hauer et al. haben gezeigt, dass eine Blockade von IL-12 durch Impfung LDL-Rezeptor-defizienter Mäuse die Atherogenese reduzieren und die Plaquestabilität verbessern kann (Hauer et al., 2005). In einer weiteren Arbeit wurde nachgewiesen, dass eine tägliche Injektion von IL-12 zur beschleunigten Atherosklerose bei jungen apoE-defizienten Mäusen im Vergleich zu Mäusen, denen nur Puffer injiziert wurde, führt.

IL-10 wird, als einziges der hier gemessenen Zytokine, in der Literatur einheitlich als antiinflammatorisches Zytokin beschrieben. Es findet sich in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques, in denen es mit verminderter Apoptose im zentralen Lipidkern der Plaque und somit mit einem verminderten Rupturrisiko assoziiert ist (Mallat et al., 1999b). Ein ähnlich „protektiver“ Effekt in Bezug auf den atherosklerotischen Gefäßprozess wurde von den gleichen Autoren bei IL-10-defizienten Mäusen nachgewiesen: die Mäuse zeigten nach Fütterung mit atherogener Nahrung eine um das Dreifache erhöhte Anhäufung von Lipiden im Vergleich zum Wildtyp (Mallat et al., 1999a).

4.5.2 Zytokine und zirkulierende Vorläuferzellen

In einer Arbeit von Stein et al. wurde der Zusammenhang zwischen im Plaque-Material nachgewiesenen Zytokinen und dem vor und nach einer Thrombendarteriektomie bei Patienten mit peripherer Verschlusskrankheit im systemischen Blut gemessenen CD133+ Zellen untersucht. (Stein et al., 2008). Hier zeigten sich nach der Intervention ein Abfallen der Anzahl der CD133+ Zellen und ein dazu negativ korreliertes Ansteigen von in der Plaque gemessenem IL-6.

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, ob sich eine solche Korrelation zwischen CD133+ Zellen und Zytokinen auch bei systemischer Messung der Zytokine im Serum nachweisen lässt. In einer explorativen Analyse traf dies für die proinflammatorischen Interleukine IL-1b ($p=0,010$) und IL-6 ($p=0,047$) sowie für das antiinflammatorisch wirkende IL-10 ($p=0,042$) zu. Es kann vermutet werden, dass je mehr diese Interleukine im peripheren Blut zirkulieren, desto weniger CD133+ Zellen gemessen werden. Eine niedrigere Anzahl CD133+ Zellen bei höheren Spiegeln proinflammatorischer und antiinflammatorischer Interleukine könnte folgende Erklärung haben: bei höheren Konzentrationen bestimmter zirkulierender Zytokine liegt wahrscheinlich eine stärkere Entzündung vor, was wiederum zur Folge haben könnte, dass mehr Umbauvorgänge in den betroffenen Gefäßen stattfinden und deswegen durch höheren Verbrauch eine geringere Anzahl von Vorläuferzellen zu finden ist.

4.5.3 Fibrinogen und hs-CRP

Generell gibt es zwei Mechanismen, die unabhängig voneinander oder in Verbindung eine Plaqueruptur triggern. Der erste ist bezogen auf physikalische Kräfte und kommt dort am meisten zu tragen, wo die fibröse Kappe am dünnsten ist (Fuster et al., 2005). Der zweite Mechanismus umfasst einen aktiven Prozess innerhalb der Plaque, der zur Ruptur führt. Hier sind entzündliche Prozesse, Matrixmetalloproteinasen, die die fibröse Kappe auflösen können sowie die Ausschüttung von Zytokinen zu nennen. Zytokine können die Konzentrationen von Akute-Phase-Proteinen wie CRP und Fibrinogen erhöhen. Alvarez Garcia et al. fanden bei Patienten mit instabilen Plaques der Arteria carotis interna erhöhte hs-CRP-Werte, trotzdem ist aber noch unklar, welche Rolle CRP im Entzündungsprozess der Atherosklerose einnimmt (Alvarez Garcia et al., 2003). Bereits 1984 entdeckten Wilhelmsen et al., dass hohe Fibrinogenspiegel mit einem höheren Risiko für Herzinfarkt oder Schlaganfall verbunden sind (Wilhelmsen et al., 1984). In dieser Arbeit wurde ebenfalls auf hsCRP und Fibrinogen im Serum untersucht, wobei sich kein Unterschied zwischen Patienten mit stabilen und instabilen Plaques zeigte.

5. Zusammenfassung

Seit einigen Jahren ist die Existenz regenerativer adulter Stammzellen bekannt, die nach Gewebeschäden im Blut zirkulieren und zur Reparatur funktionsunfähiger Gewebe beitragen. Ein Teil dieser Zellen sind zirkulierende Vorläuferzellen, die zu einer de-novo-Vaskulogenese imstande sind und somit zu einer verbesserten Gewebedurchblutung bei Patienten mit atherosklerotischen Gefäßprozessen wie der Stenose der Arteria carotis interna führen könnten. In dieser Arbeit sollte die Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen und deren Homingrezeptor CXCR4 bei Patienten mit kernspintomographisch nachgewiesenen stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna untersucht werden. Hierzu erfolgte die durchflusszytometrische Analyse von peripher gewonnenem Blut mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen charakteristische Oberflächenantigene mononukleärer zirkulierender Blutzellen. Gleichzeitig wurde in einem ELISA-Verfahren die Serumkonzentration verschiedener Zytokine gemessen, die sowohl im Zusammenhang mit der Entzündungssituation als auch mit der Mobilisation zirkulierender Vorläuferzellen stehen könnten.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl CD133+ sowie CD34+/VEGFR2+ Vorläuferzellen zwischen Patienten mit stabilen und instabilen Plaques nicht unterscheidet. Jedoch fiel bei Patienten mit instabilen Plaques eine signifikant höhere Expression des Oberflächenmarkers CXCR4, der unter anderem für den Homingmechanismus von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark verantwortlich ist, auf CD133+ Zellen auf. Dieses Ergebnis lässt einen Unterschied in der Rekrutierung von Vorläuferzellen zwischen beiden Patientengruppen vermuten und CXCR4 als möglichen serologischen Parameter zur Abschätzung der Plaquestabilität erscheinen. Zirkulierende Vorläuferzellen könnten zum einen eine Rolle im endogenen Reparaturmechanismus in atherosklerotischen Läsionen spielen, zum anderen könnte die durch Vorläuferzellen ausgelöste Neovaskularisation negativ die Plaquestabilität beeinflussen.

Des Weiteren ließ sich neben einigen positiven Korrelationen verschiedener Zytokine wie zum Beispiel IL-1 β und TNF- α eine negative Korrelation zwischen CD133+/CD34+ Vorläuferzellen und IL-1 β nachweisen. Dies unterstreicht zum einen den systemischen Charakter der Entzündungsreaktion bei Atherosklerose, zum anderen könnte dies einen erhöhten Verbrauch von Vorläuferzellen bei in diesem Zusammenhang vermehrt zirkulierenden Zytokinen bedeuten.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Alvarez Garcia, B., Ruiz, C., Chacon, P., Sabin, J. A. und Matas, M. (2003). "High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for unstable carotid plaque." J Vasc Surg **38**(5): 1018-24.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M. und Isner, J. M. (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-8.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. und Isner, J. M. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-7.
- Askari, A. T., Unzek, S., Popovic, Z. B., Goldman, C. K., Forudi, F., Kiedrowski, M., Rovner, A., Ellis, S. G., Thomas, J. D., DiCorleto, P. E., Topol, E. J. und Penn, M. S. (2003). "Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy." Lancet **362**(9385): 697-703.
- Bahlmann, F. H., De Groot, K., Spandau, J. M., Landry, A. L., Hertel, B., Duckert, T., Boehm, S. M., Menne, J., Haller, H. und Fliser, D. (2004). "Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells." Blood **103**(3): 921-6.
- Barath, P., Fishbein, M. C., Cao, J., Berenson, J., Helfant, R. H. und Forrester, J. S. (1990). "Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization." Am J Pathol **137**(3): 503-9.
- Bender, R., Lange, S. und Ziegler, A. (2007). Multiples Testen. Deutsche Medizinische Wochenschrift. **132**: e26-e29.
- Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J. und Springer, T. A. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." Nature **382**(6594): 829-33.
- Bogdan, C., Vodovotz, Y. und Nathan, C. (1991). "Macrophage deactivation by interleukin 10." J Exp Med **174**(6): 1549-55.
- Brown, J., Greaves, M. F. und Molgaard, H. V. (1991). "The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts." Int Immunol **3**(2): 175-84.
- Cai, J. M., Hatsukami, T. S., Ferguson, M. S., Small, R., Polissar, N. L. und Yuan, C. (2002). "Classification of human carotid atherosclerotic lesions with in vivo multicontrast magnetic resonance imaging." Circulation **106**(11): 1368-73.
- Camargo, F. D., Green, R., Capetanaki, Y., Jackson, K. A. und Goodell, M. A. (2003). "Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates." Nat Med **9**(12): 1520-7.
- Case, J., Mead, L. E., Bessler, W. K., Prater, D., White, H. A., Saadatizadeh, M. R., Bhavsar, J. R., Yoder, M. C., Haneline, L. S. und Ingram, D. A. (2007). "Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors." Exp Hematol **35**(7): 1109-18.
- Cavender, D., Saegusa, Y. und Ziff, M. (1987). "Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor." J Immunol **139**(6): 1855-60.

- Celletti, F. L., Waugh, J. M., Amabile, P. G., Brendolan, A., Hilfiker, P. R. und Dake, M. D. (2001). "Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression." Nat Med **7**(4): 425-9.
- Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., Capla, J. M., Galiano, R. D., Levine, J. P. und Gurtner, G. C. (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." Nat Med **10**(8): 858-64.
- Charo, I. F. und Taubman, M. B. (2004). "Chemokines in the pathogenesis of vascular disease." Circ Res **95**(9): 858-66.
- Chironi, G., Walch, L., Pernollet, M. G., Gariepy, J., Levenson, J., Rendu, F. und Simon, A. (2007). "Decreased number of circulating CD34+KDR+ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis." Atherosclerosis **191**(1): 115-20.
- Chu, B., Hatsukami, T. S., Polissar, N. L., Zhao, X. Q., Kraiss, L. W., Parker, D. L., Waterton, J. C., Raichlen, J. S., Hamar, W. und Yuan, C. (2004). "Determination of carotid artery atherosclerotic lesion type and distribution in hypercholesterolemic patients with moderate carotid stenosis using noninvasive magnetic resonance imaging." Stroke **35**(11): 2444-8.
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M. und Stern, D. M. (1998). "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders." Blood **91**(10): 3527-61.
- Dignat-George, F. und Sampol, J. (2000). "Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept." Eur J Haematol **65**(4): 215-20.
- Dinarello, C. A. (1997). "Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings." J Biol Regul Homeost Agents **11**(3): 91-103.
- Eguchi, M., Masuda, H. und Asahara, T. (2007). "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis." Clin Exp Nephrol **11**(1): 18-25.
- Esposito, L., Sievers, M., Sander, D., Heider, P., Wolf, O., Greil, O., Zimmer, C. und Poppert, H. (2007). "Detection of unstable carotid artery stenosis using MRI." J Neurol **254**(12): 1714-22.
- Falk, E. (1999). "Stable versus unstable atherosclerosis: clinical aspects." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S421-5.
- Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A. und Greaves, M. F. (1990). "Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells." Blood **75**(12): 2417-26.
- Fuster, V., Moreno, P. R., Fayad, Z. A., Corti, R. und Badimon, J. J. (2005). "Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts." J Am Coll Cardiol **46**(6): 937-54.
- Gauldie, J., Richards, C. und Baumann, H. (1992). "IL6 and the acute phase reaction." Res Immunol **143**(7): 755-9.
- Gehling, U. M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., Kluge, K., Schafer, B., Hossfeld, D. K. und Fiedler, W. (2000). "In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells." Blood **95**(10): 3106-12.
- Girn, H. R., Orsi, N. M. und Homer-Vanniasinkam, S. (2007). "An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease." Vasc Med **12**(4): 299-309.

- Gotlieb, A. I. und Langille, B. L. (1996). The role of rheology in atherosclerotic coronary artery disease. Atherosclerosis and coronary artery disease. V. Fuster, R. Ross and E. J. Topol. Philadelphia, Lippincott-Raven Verlag. **1**: 595-606.
- Haddy, N., Sass, C., Droesch, S., Zaiou, M., Siest, G., Ponthieux, A., Lambert, D. und Visvikis, S. (2003). "IL-6, TNF-alpha and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population: the STANISLAS cohort." Atherosclerosis **170**(2): 277-83.
- Halliday, A., Mansfield, A., Marro, J., Peto, C., Peto, R., Potter, J. und Thomas, D. (2004). "Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial." Lancet **363**(9420): 1491-502.
- Handgretinger, R., Gordon, P. R., Leimig, T., Chen, X., Buhring, H. J., Niethammer, D. und Kuci, S. (2003). "Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells." Ann N Y Acad Sci **996**: 141-51.
- Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-95.
- Hatsukami, T. S., Ross, R., Polissar, N. L. und Yuan, C. (2000). "Visualization of fibrous cap thickness and rupture in human atherosclerotic carotid plaque in vivo with high-resolution magnetic resonance imaging." Circulation **102**(9): 959-64.
- Hattori, K., Heissig, B., Tashiro, K., Honjo, T., Tateno, M., Shieh, J. H., Hackett, N. R., Quidoriano, M. S., Crystal, R. G., Rafii, S. und Moore, M. A. (2001). "Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells." Blood **97**(11): 3354-60.
- Hauer, A. D., Uyttenhove, C., de Vos, P., Stroobant, V., Renaud, J. C., van Berkel, T. J., van Snick, J. und Kuiper, J. (2005). "Blockade of interleukin-12 function by protein vaccination attenuates atherosclerosis." Circulation **112**(7): 1054-62.
- Heeschen, C., Jang, J. J., Weis, M., Pathak, A., Kaji, S., Hu, R. S., Tsao, P. S., Johnson, F. L. und Cooke, J. P. (2001). "Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis." Nat Med **7**(7): 833-9.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A., Werb, Z. und Rafii, S. (2002). "Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand." Cell **109**(5): 625-37.
- Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A. und Finkel, T. (2003). "Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk." N Engl J Med **348**(7): 593-600.
- Hristov, M., Erl, W. und Weber, P. C. (2003). "Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(7): 1185-9.
- Ito, T. und Ikeda, U. (2003). "Inflammatory cytokines and cardiovascular disease." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **2**(3): 257-65.
- Jialal, I., Devaraj, S. und Venugopal, S. K. (2004). "C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis?" Hypertension **44**(1): 6-11.
- Jinquan, T., Quan, S., Jacobi, H. H., Madsen, H. O., Glue, C., Skov, P. S., Malling, H. J. und Poulsen, L. K. (2000). "CXC chemokine receptor 4 expression and

- stromal cell-derived factor-1alpha-induced chemotaxis in CD4+ T lymphocytes are regulated by interleukin-4 and interleukin-10." Immunology **99**(3): 402-10.
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Gabbiani, G. und Hansson, G. K. (1985). "Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis." J Clin Invest **76**(1): 125-31.
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravelleaux, E., Pieczek, A., Iwaguro, H., Hayashi, S. I., Isner, J. M. und Asahara, T. (2000a). "Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects." Circ Res **86**(12): 1198-202.
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W. M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J. M. und Asahara, T. (2000b). "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3422-7.
- Kannel, W. B., Wolf, P. A., Castelli, W. P. und D'Agostino, R. B. (1987). "Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study." Jama **258**(9): 1183-6.
- Karkkainen, M. J. und Petrova, T. V. (2000). "Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." Oncogene **19**(49): 5598-605.
- Kassmeyer, S., Plendl, J., Custodis, P. und Bahramsoltani, M. (2009). "New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells." Anat Histol Embryol **38**(1): 1-11.
- Kawamoto, A., Gwon, H. C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J. I., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J. M. und Asahara, T. (2001). "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia." Circulation **103**(5): 634-7.
- Khan, S. S., Solomon, M. A. und McCoy, J. P., Jr. (2005). "Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry." Cytometry B Clin Cytom **64**(1): 1-8.
- Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H. und Seishima, M. (2003). "Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(4): 656-60.
- Kistler, J. P. und Furie, K. L. (2000). "Carotid endarterectomy revisited." N Engl J Med **342**(23): 1743-5.
- Kleemann, R., Zadelaar, S. und Kooistra, T. (2008). "Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice." Cardiovasc Res **79**(3): 360-76.
- Klouche, M., Rose-John, S., Schmiedt, W. und Bhakdi, S. (2000). "Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation." Circulation **101**(15): 1799-805.
- Kolominsky-Rabas, P. L. und Heuschmann, P. U. (2002). "[Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke]." Fortschr Neurol Psychiatr **70**(12): 657-62.
- Kondo, T., Hayashi, M., Takeshita, K., Numaguchi, Y., Kobayashi, K., Iino, S., Inden, Y. und Murohara, T. (2004). "Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1442-7.
- Koolman, J. und Röhm, K. (2003). Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart, Thieme Verlag.

- Lagrand, W. K., Visser, C. A., Hermens, W. T., Niessen, H. W., Verheugt, F. W., Wolbink, G. J. und Hack, C. E. (1999). "C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon?" Circulation **100**(1): 96-102.
- Lataillade, J. J., Clay, D., Dupuy, C., Rigal, S., Jasmin, C., Bourin, P. und Le Bousse-Kerdiles, M. C. (2000). "Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival." Blood **95**(3): 756-68.
- Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jurgens, K., Miche, E., Bohm, M. und Nickenig, G. (2004). "Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis." Circulation **109**(2): 220-6.
- Lendon, C. L., Davies, M. J., Born, G. V. und Richardson, P. D. (1991). "Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased." Atherosclerosis **87**(1): 87-90.
- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-74.
- Libby, P., Sukhova, G., Lee, R. T. und Galis, Z. S. (1995). "Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque." J Cardiovasc Pharmacol **25 Suppl 2**: S9-12.
- Lin, K., Zhang, Z. Q., Detrano, R., Lu, B. und Fan, Z. M. (2006). "Carotid vulnerable lesions are related to accelerated recurrence for cerebral infarction magnetic resonance imaging study." Acad Radiol **13**(10): 1180-6.
- Little, W. C., Constantinescu, M., Applegate, R. J., Kutcher, M. A., Burrows, M. T., Kahl, F. R. und Santamore, W. P. (1988). "Can coronary angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild-to-moderate coronary artery disease?" Circulation **78**(5 Pt 1): 1157-66.
- Lowe, G. D. (1995). "Fibrinogen and cardiovascular disease: historical introduction." Eur Heart J **16 Suppl A**: 2-5.
- Ma, J., Hennekens, C. H., Ridker, P. M. und Stampfer, M. J. (1999). "A prospective study of fibrinogen and risk of myocardial infarction in the Physicians' Health Study." J Am Coll Cardiol **33**(5): 1347-52.
- Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M. F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., Staels, B., Duverger, N., Scherman, D. und Tedgui, A. (1999a). "Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis." Circ Res **85**(8): e17-24.
- Mallat, Z., Heymes, C., Ohan, J., Faggin, E., Leseche, G. und Tedgui, A. (1999b). "Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(3): 611-6.
- Mitsumori, L. M., Hatsukami, T. S., Ferguson, M. S., Kerwin, W. S., Cai, J. und Yuan, C. (2003). "In vivo accuracy of multisequence MR imaging for identifying unstable fibrous caps in advanced human carotid plaques." J Magn Reson Imaging **17**(4): 410-20.
- Moreau, M., Brocheriou, I., Petit, L., Ninio, E., Chapman, M. J. und Rouis, M. (1999). "Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque." Circulation **99**(3): 420-6.
- Moreno, P. R., Falk, E., Palacios, I. F., Newell, J. B., Fuster, V. und Fallon, J. T. (1994). "Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture." Circulation **90**(2): 775-8.

- Moreno, P. R., Purushothaman, K. R., Fuster, V., Echeverri, D., Trusczyńska, H., Sharma, S. K., Badimon, J. J. und O'Connor, W. N. (2004). "Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability." *Circulation* **110**(14): 2032-8.
- Moulton, K. S., Vakili, K., Zurakowski, D., Soliman, M., Butterfield, C., Sylvén, E., Lo, K. M., Gillies, S., Javaherian, K. und Folkman, J. (2003). "Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4736-41.
- Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K., Eguchi, H., Onitsuka, I., Matsui, K. und Imaizumi, T. (2000). "Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization." *J Clin Invest* **105**(11): 1527-36.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H. und Kishimoto, T. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." *Nature* **382**(6592): 635-8.
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S. W., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J. J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., Fayad, Z., Stone, P. H., Waxman, S., Raggi, P., Madjid, M., Zarrabi, A., Burke, A., Yuan, C., Fitzgerald, P. J., Siscovick, D. S., de Korte, C. L., Aikawa, M., Juhani Airaksinen, K. E., Assmann, G., Becker, C. R., Chesebro, J. H., Farb, A., Galis, Z. S., Jackson, C., Jang, I. K., Koenig, W., Lodder, R. A., March, K., Demirovic, J., Navab, M., Priori, S. G., Rekhater, M. D., Bahr, R., Grundy, S. M., Mehran, R., Colombo, A., Boerwinkle, E., Ballantyne, C., Insull, W., Jr., Schwartz, R. S., Vogel, R., Serruys, P. W., Hansson, G. K., Faxon, D. P., Kaul, S., Drexler, H., Greenland, P., Muller, J. E., Virmani, R., Ridker, P. M., Zipes, D. P., Shah, P. K. und Willerson, J. T. (2003). "From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I." *Circulation* **108**(14): 1664-72.
- Neuss, S., Becher, E., Woltje, M., Tietze, L. und Jahnen-Dechent, W. (2004). "Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing." *Stem Cells* **22**(3): 405-14.
- Ohta, H., Wada, H., Niwa, T., Kirii, H., Iwamoto, N., Fujii, H., Saito, K., Sekikawa, K. und Seishima, M. (2005). "Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice." *Atherosclerosis* **180**(1): 11-7.
- Papayannopoulou, T. (2000). "Mechanisms of stem-/progenitor-cell mobilization: the anti-VLA-4 paradigm." *Semin Hematol* **37**(1 Suppl 2): 11-8.
- Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A. und Rafii, S. (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." *Blood* **95**(3): 952-8.
- Pepys, M. B. und Hirschfield, G. M. (2003). "C-reactive protein: a critical update." *J Clin Invest* **111**(12): 1805-12.
- Quirici, N., Soligo, D., Caneva, L., Servida, F., Bossolasco, P. und Deliliers, G. L. (2001). "Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells." *Br J Haematol* **115**(1): 186-94.

- Raffael, A., Nebe, C. und Valet, G. (1994). Grundlagen der Durchflußzytometrie. Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. G. Schmitz. Stuttgart, Schattauer Verlag: 3-49.
- Ramadori, G. und Christ, B. (1999). "Cytokines and the hepatic acute-phase response." Semin Liver Dis **19**(2): 141-55.
- Rehman, J., Li, J., Orschell, C. M. und March, K. L. (2003). "Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors." Circulation **107**(8): 1164-9.
- Roessner, A., Pfeifer, U. und Müller-Hermelink, H. K. (2008). Allgemeine Pathologie und Grundlagen der Speziellen Pathologie. München, Urban & Fischer Verlag.
- Ross, R. (1999a). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-26.
- Ross, R. (1999b). "Atherosclerosis is an inflammatory disease." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S419-20.
- Rostasy, K., Gorgun, G., Kleyner, Y., Garcia, A., Kramer, M., Melanson, S. M., Mathys, J. M., Yiannoutsos, C., Skolnik, P. R. und Navia, B. A. (2005). "Tumor necrosis factor alpha leads to increased cell surface expression of CXCR4 in SK-N-MC cells." J Neurovirol **11**(3): 247-55.
- Rouhl, R. P., van Oostenbrugge, R. J., Damoiseaux, J., Cohen Tervaert, J. W. und Lodder, J. (2008). "Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts." Stroke **39**(7): 2158-65.
- Sacco, R. L., Ellenberg, J. H., Mohr, J. P., Tatemichi, T. K., Hier, D. B., Price, T. R. und Wolf, P. A. (1989). "Infarcts of undetermined cause: the NINCDS Stroke Data Bank." Ann Neurol **25**(4): 382-90.
- Schmidt-Lucke, C., Rossig, L., Fichtlscherer, S., Vasa, M., Britten, M., Kamper, U., Dimmeler, S. und Zeiher, A. M. (2005). "Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair." Circulation **111**(22): 2981-7.
- Schreyer, S. A., Peschon, J. J. und LeBoeuf, R. C. (1996). "Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55." J Biol Chem **271**(42): 26174-8.
- Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y. und Imaizumi, T. (2001). "Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction." Circulation **103**(23): 2776-9.
- Sary, H. C. (2000). "Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1177-8.
- Sary, H. C., Blankenhorn, D. H., Chandler, A. B., Glagov, S., Insull, W., Jr., Richardson, M., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. und et al. (1992). "A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **85**(1): 391-405.
- Sary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. und Wissler, R. W. (1995a). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **92**(5): 1355-74.

- Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. und Wissler, R. W. (1995b). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(9): 1512-31.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. und Wissler, R. W. (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **89**(5): 2462-78.
- Stein, A., Montens, H. P., Steppich, B., Busch, G., Brandl, R. und Ott, I. (2008). "Circulating endothelial progenitor cells decrease in patients after endarterectomy." J Vasc Surg **48**(5): 1217-22.
- Stellos, K., Langer, H., Daub, K., Schoenberger, T., Gauss, A., Geisler, T., Bigalke, B., Mueller, I., Schumm, M., Schaefer, I., Seizer, P., Kraemer, B. F., Siegel-Axel, D., May, A. E., Lindemann, S. und Gawaz, M. (2008). "Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells." Circulation **117**(2): 206-15.
- Strehlow, K., Werner, N., Berweiler, J., Link, A., Dirnagl, U., Priller, J., Laufs, K., Ghaeni, L., Milosevic, M., Bohm, M. und Nickenig, G. (2003). "Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation." Circulation **107**(24): 3059-65.
- Suzuki, S., Tanaka, K. und Suzuki, N. (2009). "Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects." J Cereb Blood Flow Metab **29**(3): 464-79.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J. M. und Asahara, T. (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." Nat Med **5**(4): 434-8.
- Takaya, N., Yuan, C., Chu, B., Saam, T., Underhill, H., Cai, J., Tran, N., Polissar, N. L., Isaac, C., Ferguson, M. S., Garden, G. A., Cramer, S. C., Maravilla, K. R., Hashimoto, B. und Hatsukami, T. S. (2006). "Association between carotid plaque characteristics and subsequent ischemic cerebrovascular events: a prospective assessment with MRI--initial results." Stroke **37**(3): 818-23.
- Tedgui, A. und Mallat, Z. (2006). "Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways." Physiol Rev **86**(2): 515-81.
- Tsai, S., Butler, J., Rafii, S., Liu, B. und Kent, K. C. (2009). "The role of progenitor cells in the development of intimal hyperplasia." J Vasc Surg **49**(2): 502-10.
- Urbich, C. und Dimmeler, S. (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." Circ Res **95**(4): 343-53.
- Urbich, C., Heeschen, C., Aicher, A., Dernbach, E., Zeiher, A. M. und Dimmeler, S. (2003). "Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells." Circulation **108**(20): 2511-6.
- van Heeswijk, H. P., Vos, J. A., Louwse, E. S., Van Den Berg, J. C., Overtoom, T. T., Ernst, S. M., Mauser, H. W., Moll, F. L. und Ackerstaff, R. G. (2002). "New brain lesions at MR imaging after carotid angioplasty and stent placement." Radiology **224**(2): 361-5.

- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Adler, K., Aicher, A., Martin, H., Zeiher, A. M. und Dimmeler, S. (2001a). "Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease." Circulation **103**(24): 2885-90.
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A. M. und Dimmeler, S. (2001b). "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease." Circ Res **89**(1): E1-7.
- von der Thusen, J. H., Kuiper, J., van Berkel, T. J. und Biessen, E. A. (2003). "Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential." Pharmacol Rev **55**(1): 133-66.
- Wahlgren, C. M., Zheng, W., Shaalan, W., Tang, J. und Bassiouny, H. S. (2009). "Human Carotid Plaque Calcification and Vulnerability. Relationship between Degree of Plaque Calcification, Fibrous Cap Inflammatory Gene Expression and Symptomatology." Cerebrovasc Dis **27**(2): 193-200.
- Wakkach, A., Cottrez, F. und Groux, H. (2000). "Can interleukin-10 be used as a true immunoregulatory cytokine?" Eur Cytokine Netw **11**(2): 153-60.
- Walter, D. H., Rittig, K., Bahlmann, F. H., Kirchmair, R., Silver, M., Murayama, T., Nishimura, H., Losordo, D. W., Asahara, T. und Isner, J. M. (2002). "Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells." Circulation **105**(25): 3017-24.
- Wang, C. H., Ciliberti, N., Li, S. H., Szmítko, P. E., Weisel, R. D., Fedak, P. W., Al-Omran, M., Cherng, W. J., Li, R. K., Stanford, W. L. und Verma, S. (2004). "Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy." Circulation **109**(11): 1392-400.
- Warner, S. J., Auger, K. R. und Libby, P. (1987). "Human interleukin 1 induces interleukin 1 gene expression in human vascular smooth muscle cells." J Exp Med **165**(5): 1316-31.
- Warner, S. J. und Libby, P. (1989). "Human vascular smooth muscle cells. Target for and source of tumor necrosis factor." J Immunol **142**(1): 100-9.
- Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A., Böhm, M. und Nickenig, G. (2005). "Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes." N Engl J Med **353**(10): 999-1007.
- Widder, B. und Görtler, M. (2004). Doppler- und Duplexsonographie der hirnersorgenden Arterien Berlin, Springer Verlag.
- Wilhelmsen, L., Svardsudd, K., Korsan-Bengtson, K., Larsson, B., Welin, L. und Tibblin, G. (1984). "Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction." N Engl J Med **311**(8): 501-5.
- Willinsky, R. A., Taylor, S. M., TerBrugge, K., Farb, R. I., Tomlinson, G. und Montanera, W. (2003). "Neurologic complications of cerebral angiography: prospective analysis of 2,899 procedures and review of the literature." Radiology **227**(2): 522-8.
- Wojakowski, W., Tendera, M., Michalowska, A., Majka, M., Kucia, M., Maslankiewicz, K., Wyderka, R., Ochala, A. und Ratajczak, M. Z. (2004). "Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction." Circulation **110**(20): 3213-20.

- Yamaguchi, J., Kusano, K. F., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., Bosch-Marce, M., Masuda, H., Losordo, D. W., Isner, J. M. und Asahara, T. (2003). "Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization." Circulation **107**(9): 1322-8.
- Yeh, E. T., Zhang, S., Wu, H. D., Korbling, M., Willerson, J. T. und Estrov, Z. (2003). "Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo." Circulation **108**(17): 2070-3.
- Yuan, C., Zhang, S. X., Polissar, N. L., Echelard, D., Ortiz, G., Davis, J. W., Ellington, E., Ferguson, M. S. und Hatsukami, T. S. (2002). "Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke." Circulation **105**(2): 181-5.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Verschiedene Quellen endothelialer Vorläuferzellen und deren potentielle Hierarchie der Differenzierung (Kassmeyer et al., 2009)	19
Abb. 1.2	Interaktion von CXCR4 und SDF-1	22
Abb. 1.3	Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung	26
Abb. 1.4	Zytokine in atherosklerotischen Plaques (Tedgui und Mallat, 2006). Beteiligt sind Makrophagen (Mac.), glatte Muskelzellen (Smooth muscle cells, SMC), Endothelzellen (EC), T-Helferzellen (Th0, Th1, Th2), regulatorische T-Zellen (Treg) und natürliche Killerzellen (NKT cells); rot hinterlegt sind die ebenfalls von Makrophagen gebildeten antiinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10, TGF- β , IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) und IL-18 Bindeprotein (IL-18 BP)	29
Abb. 2.1	oben: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung; x-Achse: FSC, y-Achse: SSC; R1: mononukleäre Zellen; links (a, in allen folgenden Punktdiagrammen gleich): Negativkontrolle; rechts (b, in allen folgenden Punktdiagrammen gleich): Mehrfachfärbung, in diesem Fall CD45 APC, CD34 FITC, AC133 PE und 7-AAD; unten: R8: Darstellung der avitalen, 7-AAD-positiven Zellen (c und d); FL3-H: 3. Fluoreszenzkanal	39
Abb. 2.2	Punktdiagramm zur Darstellung der AC133 PE positiven Zellen in Bezug auf CD45 APC-(low)-Positivität (R4, a und b) und in Bezug auf SSC (R16, c und d); FL2-H: 2. Fluoreszenzkanal	40
Abb. 2.3	Punktdiagramm zur Darstellung der VEGFR2 PE-positiven Zellen; CD34 FITC-positive Zellen (a und b, R10); CD34 FITC-positive, klein-granulierte Zellen (c und d, R11); doppeltpositive (VEGFR2 PE und CD34 FITC) Zellen (e und f, R4); FL1-H: 1. Fluoreszenzkanal	42

Abb. 2.4	Punktdiagramm zur Darstellung der AC133 PE-positiven Zellen (a und b, R7), Histogramm zur Darstellung der CXCR4 FITC-Fluoreszenzintensität der AC133 PE-positiven Zellen (c und d, M1)	44
Abb. 3.1	Beispiel für den stabilen Läsionstyp VII in der linken Arteria carotis interna: Die kalzifizierten Regionen (siehe Pfeile) zeigen sich im MRT hypointens in allen Aufnahmen. Originalvergrößerung x25	50
Abb. 3.2	Beispiel für den instabilen Läsionstyp VI in der linken Arteria carotis interna: die Hämorrhagie innerhalb der Plaque (siehe Pfeile) zeigt sich hyperintens in allen Aufnahmen. Originalvergrößerung x25	51
Abb. 3.3	CD133+ Vorläuferzellen bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna	52
Abb. 3.4	VEGFR2+CD34+ Vorläuferzellen bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna	53
Abb. 3.5	CXCR4-Expression auf CD133+ Vorläuferzellen bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna	54
Abb. 3.6	IL 12-p 70, TNF- α , IL-10, IL-6 und IL-1 β bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna	55
Abb. 3.7	IL-8 bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna	56
Abb. 3.8	Korrelation zwischen TNF- α und IL-1 β	57
Abb. 3.9	Korrelation zwischen CD133+ Vorläuferzellen und IL-1 β	58

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Plaueklassifikation der American Heart Association (AHA)	12
Tab. 1.2	Histologische und modifizierte Plaueklassifikationen; in der modifizierten Klassifikation sind jeweils Klasse I und II sowie Klasse IV und V der AHA-Klassifikation zusammengefasst	15
Tab. 1.3	Faktoren und therapeutische Präparate bzw. Applikationsformen, die die Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen verändern	20
Tab. 2.1	Verwendete Antikörper zur „Zellfärbung“	38
Tab. 3.1	Übersicht der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit Alter, Geschlecht, verschiedenen klinischen Parametern und Medikation	47
Tab. 3.2	Vierfeldertafel von Plauestabilität und früherer Schlaganfall/TIA > 6 Monate; p-Wert im Exakten Fisher-Test: 0,043)	48
Tab. 3.3	Übersicht über die unterschiedlichen Plaquetypen der in die Studie eingeschlossenen Patienten	49
Tab. 3.4	Vorläuferzellen und CXCR4-Expression bei Patienten mit stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna	52
Tab. 3.5	Im Serum gemessene Zytokine bei stabilen und instabilen Plaques der Arteria carotis interna; p-Werte zum Mann-Whitney-Test	55
Tab. 3.6	Korrelationen nach Spearman zwischen den gemessenen Zytokinen	56
Tab. 3.7	Korrelationen nach Spearman zwischen den gemessenen Zytokinen und den Vorläuferzellen	58

6.4 Standardisierter Fragebogen

Untersuchungsdatum __.__.200__

Name _____ Vorname _____

Geburtsdatum _____ Geschlecht _____

A: Kardio- und Zerebrovaskuläre Vorerkrankungen

1. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die länger als 24 Stunden angehalten haben?

Ja
 Nein

Wenn Schlaganfall, wieviele und wann?

2. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die kürzer als 24 Stunden angehalten haben, oder einen plötzlichen Sehverlust über weniger als 24 Stunden?

Ja
 Nein

Wenn ja, wieviele und wann?

3. Sind Ihre Halsschlagadern operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?

Ja
 Nein

Wenn ja, wann?

4. Hatten Sie jemals einen Herzinfarkt, eine Bypass-Operation oder eine Aufdehnung von Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter?

Ja
 Nein

Wenn Herzinfarkt, wieviele und wann?

5. Ist bei Ihnen eine Koronare Herzkrankheit (KHK / eine Verengung der Herzkranzgefäße) bekannt?

Ja, Jahr der Erstdiagnose : _____
 Nein

6. Ist bei Ihnen Vorhofflimmern bekannt?

- Ja, Jahr der Erstdiagnose : _____
 Nein

7. Ist bei Ihnen eine Erkrankung der Herzklappen bekannt?

- Ja, Jahr der Erstdiagnose : _____
 Nein

8. Ist bei Ihnen eine periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK / Durchblutungsstörung der Beine) bekannt?

- Ja, Jahr der Erstdiagnose : _____
 Nein

9. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern mittels Bypass operiert oder aufgedehnt?

- Ja, Datum der OP: _____
 Nein

10. Kam es bei Ihnen schon einmal zu einer tiefen Beinvenenthrombose?

- Ja, Datum: _____
 Nein

11. Ist bei Ihnen eine Blutgerinnungsstörung bekannt?

- Ja, _____
 Nein

B: Allgemeine Risikofaktoren/Körperliche Aktivität

12. Leiden sie unter Bluthochdruck?

- Ja, Jahr der Erstdiagnose : _____
 Nein

13. Ist bei Ihnen ein Diabetes mellitus bekannt?

- Ja, Jahr der Erstdiagnose: _____
 Nein (*weiter mit Frage 15.*)

14. Wie ist der Diabetes mellitus behandelt?

- Insulin
 Blutzuckersenkende Tabletten (_____)
 Diät

15. Rauchen Sie aktuell oder haben Sie jemals geraucht?
- Ja
 Nein (*weiter* mit Frage 19.)
16. Seit wievielen Jahren rauchen Sie bzw. wieviele Jahre haben Sie insgesamt geraucht?
_____ Jahre
17. Wieviele Päckchen durchschnittlich pro Tag?
_____ Pack Years
18. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht? _____
- a. Blutentnahme Uhrzeit _____
b. Letzte Zigarette vor Blutentnahme _____
c. Gesamtzahl an Zigaretten vor Blutentnahme _____
19. Wenn Sie das letzte Jahr betrachten, wie viele Gläser Alkohol haben Sie durchschnittlich pro Woche, also von Montag bis Sonntag, getrunken? Wir betrachten 0,35 l Bier, 0,120 l (ein „Achtel“) Wein oder 45 ml Spirituosen als ein Glas Alkohol.
Gesamt _____ Gläser
Bier _____ Gläser
Rotwein _____ Gläser
Weißwein _____ Gläser
Spirituosen _____ Gläser
20. An wie vielen Tagen der Woche betätigen Sie sich mindestens 30 Minuten sportlich in einem Ausmaß, dass Sie ins Schwitzen kommen? _____
(falls „0“, *weiter* Frage 22.)
21. Welche Sportarten betreiben Sie hierbei mindestens einmal die Woche?

C: Andere Erkrankungen

22. Ist bei Ihnen eine bösartige Tumorerkrankung oder eine chronische Entzündungserkrankung, etwa eine chronische Darmentzündung oder eine chronische Leberentzündung bekannt?
- Ja: _____
 Nein
23. Leiden Sie unter Migräne?
- Ja, Jahr der Erstdiagnose : _____/Häufigkeit: _____
 Nein

24. Leiden Sie unter einer Erkrankung der Nieren?

- Ja, Jahr der Erstdiagnose : _____
 Art der Erkrankung: _____
 Nein

25. Hatten Sie in den letzten fünf Tagen einen akuten Infekt?

- Ja
 Nein

D: Familienanamnese

26. Hat Ihr Vater oder Ihre Mutter einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor dem 60. Lebensjahr erlitten?

- Ja
 Nein

27. Haben eines oder mehrere Ihrer Geschwister einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor dem 60. Lebensjahr erlitten?

- Ja
 Nein

E: Medikamente

28. Nehmen Sie regelmäßig (seit mindestens 14 Tagen täglich) oder gelegentlich (mindestens einmal in den letzten 14 Tagen) Medikamente ein?

- Ja
 Nein

	Präparat	Dosis
Statine		
Beta-Blocker		
ACE-Hemmer		
Diuretika		
Heparin		
Thrombozytenaggr.hemmer		
Sartane		
Sonstige Medikamente		

F: Untersuchung

29. Waren Sie bei der Blutabnahme nüchtern?

- Ja
- Nein

RR/Puls:

Nach 5 Minuten Ruhe

RR: ____ / ____ (rechts) ____ / ____ (links)

HF: ____

Größe/Gewicht:

Körpergröße (ohne Schuhe, in m) _____

Körpergewicht (leicht bekleidet, in kg) _____

BMI _____

Hüftumfang (in cm) _____

Bauchumfang (in cm) _____

Hip-Waist-Ratio _____

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Peter Zepper
Geburtsdatum und –ort: 20.08.1981 in Trostberg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schul- und Berufsausbildung:

1993 – 2001 König-Karlmann-Gymnasium Altötting
2001 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
10/01 – 09/03 Studium der Humanmedizin, LMU München (Physikum 2003)
10/03 – 07/04 Studium der Humanmedizin, TU München
09/04 – 07/05 Auslandsstudium Humanmedizin, Université Paul Sabatier,
Toulouse, Frankreich
10/05 – 07/07 Studium der Humanmedizin, TU München
08/07 – 12/07 1. PJ-Tertial Neurologie: Klinikum rechts der Isar, München
12/07 – 04/08 2. PJ-Tertial Innere Medizin: Université de Montréal, Kanada
und Deutsches Herzzentrum München
04/08 – 07/08 3. PJ-Tertial Chirurgie: Hôpital de Montreux, Schweiz
12/08 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01/09 Approbation als Arzt
Seit 04/2009 Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie des Klinikums
rechts der Isar der Technischen Universität München

Wissenschaftliche Publikationen

Pelisek, J., Rudelius, M., **Zepper, P.**, Poppert, H., Reeps, C., Schuster, T. und Eckstein, H. H. (2009). "Multiple biological predictors for vulnerable carotid lesions." Cerebrovasc Dis **28**(6): 601-10.

Sepp, D., Esposito, L., **Zepper, P.**, Ott, I., Feurer, R., Sadikovic, S., Hemmer, B. und Poppert, H. (2009). "Surface expression of CXCR4 on circulating CD133 progenitor cells is associated with plaque instability in subjects with carotid artery stenosis." Angiogenes Res **1**: 10.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Holger Poppert für die Überlassung des sehr spannenden Themas und die umfassende Betreuung während der Arbeit sowie bei Herrn Univ.-Prof. Bernhard Hemmer für die Durchführung der Arbeit in der Neurologischen Klinik der Technischen Universität München. Des Weiteren gilt mein Dank meinen Betreuern Frau Prof. Dr. Ilka Ott, Herrn Dr. Dominik Sepp und Frau Dr. Lorena Bauer für die stets hilfsbereite und umfangreiche Begleitung während der praktischen und theoretischen Arbeiten.

Darüberhinaus will ich mich bei Frau Annette Stobbe und Frau Birgit Campbell des experimentellen Labors für Kardiologie des Deutschen Herzzentrums München für deren intensive Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten im Labor sowie Frau Josette Höhn für die Hilfe bei der Erstellung der MR-tomographischen Aufnahmen bedanken.

Ganz besonders will ich aber meinen Eltern Christa und Herbert Zepper danken, die mich nicht nur während meines Medizinstudiums immer mit voller Kraft unterstützt haben und denen ich diese Dissertation widme.