

Neurologische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer)

**Bestimmung der mRNA-Expression von CXCR4 und SDF-1 in
Carotisplaques nach Thrombendarteriektomie sowie serologischer
Biomarker bei Patienten mit atherosklerotisch stenosierter
Arteria carotis interna**

Arne Michael Müller

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. J. H. Poppert
2. Univ.-Prof. Dr. H.-H. G. U. Eckstein

Die Dissertation wurde am 23.04.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.12.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis	4
2 Einleitung	6
2.1 Definition und Epidemiologie des ischämischen Schlaganfalls.....	6
2.2 Atherosklerose der Arteria carotis interna und deren Bedeutung für den ischämischen Schlaganfall.....	7
2.3 Pathophysiologie der Atherosklerose.....	8
2.4 Atherosklerose und Inflammation.....	14
2.4.1 Endotheldysfunktion.....	14
2.4.2 Lokale Inflammation.....	15
2.4.3 Systemische Marker der lokalen Inflammation.....	17
2.5 RNA-Extraktion aus FFPE- und FF-Präparaten.....	19
2.6 Fragestellungen.....	20
3 Patienten, Material und Methoden	21
3.1 Einschlusskriterien.....	21
3.2 Patientenfragebögen.....	21
3.3 Labortechnische Untersuchungen.....	22
3.3.1 Bestimmung der mRNA-Expression von CXCR4 und SDF-1 im operativ gewonnenen Plaquematerial mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	22
3.3.2 Bestimmung serologischer Biomarker im peripheren venösen Blut.....	27
3.3.2.1 CRP, Fibrinogen.....	27
3.3.2.2 Zytokine.....	27
3.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der histologischen Präparate.....	28
3.4 Statistik.....	28
4 Ergebnisse	30
4.1 Klinische Daten des Patientengutes.....	30
4.2 mRNA-Isolierung.....	33
4.2.1 Vergleich Ct-Werte.....	33
4.2.2 Gelelektrophorese.....	37
4.2.3 Relative Expression von CXCR4 in FF-Präparaten.....	38
4.2.4 Gruppenvergleich „CXCR4 low“ vs. „CXCR4 medium“ vs. „CXCR4 high“.....	41
4.2.5 Relative Expression von SDF-1 in FF-Präparaten.....	47
4.2.6 Gruppenvergleich „SDF-1 low“ vs. „SDF-1 high“.....	50
4.3 CRP, Fibrinogen.....	56
4.4 Zytokine.....	58
4.4.1 Interleukin 6.....	58
4.4.2 Interleukin 8.....	59
5 Diskussion	60
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	60
5.2 RNA-Isolierung aus FF- und FFPE-Präparaten.....	60
5.3 Serologische Biomarker vor und nach Thrombendarteriektomie der A. carotis interna.....	61

5.4 Endotheliale Vorläuferzellen, CXCR4, SDF-1 und deren Bedeutung für den Verlauf des ischämischen Schlaganfalls	62
5.5 Studienbeschränkungen	63
6 Zusammenfassung	64
7 Anhang	65
7.1 Abbildungsverzeichnis	65
7.2 Tabellenverzeichnis	66
7.3 Literaturverzeichnis	66

1 Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme Hemmer
ACI	Arteria carotis interna
AMI	Akuter Myokardinfarkt
BMI	Body-Mass-Index
CBA	Cytometric Bead Array
cDNA	komplementäre-Desoxyribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
Ct-Wert	Cycle threshold
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
EPC	endotheliale Vorläuferzellen
FACS	Durchflusszytometrie
FF	fresh-frozen
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDL	high-density lipoprotein
hs-CRP	hochsensitives CRP
ICAM-1	inter-cellular adhesion molecule-1
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

KHK	koronare Herzerkrankung
LDL	low density lipoprotein
LRNC	lipid-rich necrotic core
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
MMP-1	Matrix-Metalloproteinase-1
NF-κB	nuclear factor-κB
NO	Stickstoffmonoxid
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	perkutane transluminale Coronarangioplastie
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rtPA	rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator
SDF-1	stromal cell derived factor 1
TIA	transitorische ischämische Attacke
TEA	Thrombendarteriektomie
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VHF	Vorhofflimmern

2 Einleitung

2.1 Definition und Epidemiologie des ischämischen Schlaganfalls

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sind in Deutschland und vielen anderen Industrienationen wie den Vereinigten Staaten, Großbritannien, Spanien, Portugal und Irland nach wie vor die häufigsten Todesursachen. Prognosen zufolge werden diese in Zukunft weltweit einen herausragenden Stellenwert haben [1, 2]. Der Schlaganfall als Teil dieser Erkrankungsgruppe steht in einer Aufstellung der häufigsten Todesursachen in Deutschland bei Frauen an vierter, bei Männern an sechster Stelle [3]. Seine jährliche Inzidenz beträgt in Deutschland 1,74/1000 [4]. Es wird unterschieden zwischen dem ischämischen und dem hämorrhagischen Schlaganfall, wobei der ischämische Schlaganfall mit 85 Prozent den Großteil darstellt [5]. Eine gängige Einteilung der Subtypen des ischämischen Schlaganfalls nach deren Ätiologie ist die TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment)-Klassifikation [6]:

1. Zerebrale Makroangiopathie
2. Kardiogene Embolie
3. Zerebrale Mikroangiopathie (lakunärer Infarkt)
4. Andere bekannte Ursache (z.B. Vaskulitis, Dissektion, Koagulopathie)
5. Unklare Ätiologie

25 bis 30 Prozent der Hirninfarkte sind kardioembolischer Genese. 15 bis 20 Prozent werden durch Makroangiopathie bei zugrunde liegenden Stenosen oder Verschlüssen der hirnversorgenden Arterien und 20 bis 25 Prozent durch eine Mikroangiopathie der zerebralen Gefäße verursacht [7, 8]. Bei circa 30 Prozent der Patienten mit ischämischem Schlaganfall kann keine klare Ursache gefunden werden. Diese werden auch als kryptogene Schlaganfälle bezeichnet [9]. Bei einem ischämischen Schlaganfall kommt es durch den Verschluss eines zerebralen Gefäßes zu einer Minderperfusion eines Hirnareals und somit zu einer Unterbrechung der Substratzufuhr. Sinkt die Flussrate unter 15 ml/100g/min wird der Strukturstoffwechsel der Zellen gestört. Nach wenigen Minuten resultiert hieraus eine Zerstörung des abhängigen Hirngewebes [10]. Im Durchschnitt kommt es bei einem unbehandelten Patienten zum Untergang von 1,9 Millionen Neuronen pro Minute [11]. Ziel einer jeden Therapie ist daher die schnellstmögliche Wiederherstellung einer regelrechten

zerebralen Durchblutung. Eine Schlüsselrolle kommt hier der intravenösen oder intraarteriellen Behandlung mit rekombinantem gewebespezifischem Plasminogenaktivator (rtPA) zu [12]. rtPA ist die gentechnologisch produzierte Variante des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (engl. tissue-type plasminogen activator, tPA), welcher physiologisch von den Endothelzellen des Gefäßsystems exprimiert wird. rtPA wie auch tPA wandeln durch ihre Aktivität als Serinprotease Plasminogen zu Plasmin um. Dieses nun freigesetzte Plasmin ist ein potentes Fibrinolytikum, das zur Auflösung von Thromben und somit Beseitigung des Gefäßverschlusses bei einem ischämischen Schlaganfall eingesetzt wird. Eine Sonderform der Ischämie stellt hierbei die transitorische ischämische Attacke (TIA) dar. Kommt es zur Rückbildung der klinischen Ausfallssymptomatik innerhalb von 24 Stunden liegt eine TIA vor [13].

2.2 Atherosklerose der Arteria carotis interna und deren Bedeutung für den ischämischen Schlaganfall

Das Gehirn wird über vier große Arterien mit Blut versorgt. Diese sind die jeweils paarig angelegten Arteriae carotides internae und die Arteriae vertebrales. Den Hauptbeitrag zur arteriellen Versorgung des Gehirns tragen die Arteria carotis interna dextra et sinistra. Wie eingangs erwähnt ist eine Makroangiopathie der hirnversorgenden Arterien ursächlich für einen großen Teil der Hirninfarkte. Weiter wird unterschieden zwischen Endstrom-/Grenzzoneninfarkten bei hämodynamisch wirksamer Stenose bzw. Verschluss der Arteria carotis interna oder der Arteria carotis communis und hieraus resultierendem Perfusionsdefizit und den weitaus häufigeren arterio-arteriell embolisch bedingten Infarkten mit Einschwemmung von Plaquematerial in die zerebrale Strombahn und konsekutivem Gefäßverschluss [14]. Ausgang dieser Schlaganfälle sind meist atherosklerotische Veränderungen der hirnversorgenden Arterien, meist der Arteria carotis interna [15]. Selten sind Vaskulitiden oder Dissektionen der hirnversorgenden Arterien ursächlich für den Hirninfarkt [16, 17]. In der vorliegenden Studie jedoch werden ausschließlich atherosklerotisch bedingte Gefäßverengungen behandelt. Histologische Studien haben gezeigt, dass charakteristische Veränderungen dieser Stenosen mit klinischen Ereignissen wie Hirninfarkt und TIA korrelieren. In vielen Fällen kommt es zur Ruptur,

Oberflächenulzeration/-erosion oder Disruption von Mikrogefäßen in der atherosklerotischen Plaque [18-20]. Angiographische Studien konnten zeigen, dass in den meisten Fällen die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen diskontinuierlich und nicht wie früher angenommen langsam fortschreitend verläuft [21, 22]. Zwar besteht eine statistische Korrelation zwischen Stenosegrad und dem Risiko für einen ischämischen Schlaganfall, viele der an der Krankheitsentstehung beteiligten Prozesse sind jedoch noch nicht genau verstanden [23, 24].

2.3 Pathophysiologie der Atherosklerose

Nach Stary werden acht Stadien der atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen unterschieden (Läsion Typ I-VIII)[25-28].

Typ I Läsionen sind gekennzeichnet durch eine Zunahme von mit Lipidtröpfchen gefüllten Makrophagen in der Intima. Diese Schaumzellen sind Folge und Marker der pathologischen Ansammlungen von atherogenen Lipoproteinen. Typ I Läsionen stellen ein erstes, asymptomatisches und daher in der Regel unerkanntes Frühstadium der Atherosklerose dar. Häufig kann man sie z.B. bei Erwachsenen mit wenig ausgeprägter Atherosklerose finden oder an Stellen des arteriellen Gefäßsystems, die ansonsten wenig anfällig für die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen sind. Im Gegensatz zu allen anderen Stadien können diese Läsionen auch schon im Kindesalter in großen arteriellen Gefäßen mikroskopisch nachweisbar sein.

Typ II Läsionen beinhalten die „fatty streak lesion“, jedoch sind nicht alle Typ II Läsionen als solche sichtbar. Es kommt zur Ausbildung von Schichten bestehend aus Schaumzellen und glatten Muskelzellen der Intima welche mit Lipidtröpfchen gefüllt sind. Zudem finden sich einige T-Lymphozyten, Mastzellen, grobkörnige Partikel und heterogene extrazelluläre Lipidtröpfchen. Der Großteil der Lipide befindet sich aber intrazellulär.

Typ IIa Läsionen werden auch als zum Fortschreiten neigende Läsionen („progression-prone lesions“) bezeichnet und bilden sich vornehmlich an Orten mit niedriger Schubspannung, somit längerer Interaktionszeit zwischen LDL (engl.: low density lipoprotein) und Arterienwand und folglich verstärkter transendothelialer Diffusion aus. Prädilektionsort für

derartige Läsionen sind im Bereich der Karotisbifurkation die dem Strömungsteiler gegenüber gelegenen Abschnitte. Das histologische Bild wird geprägt durch größere Ansammlungen von Makrophagen, glatten Muskelzellen und tiefer in der Intima liegenden Schaumzellen und Lipidtröpfchen.

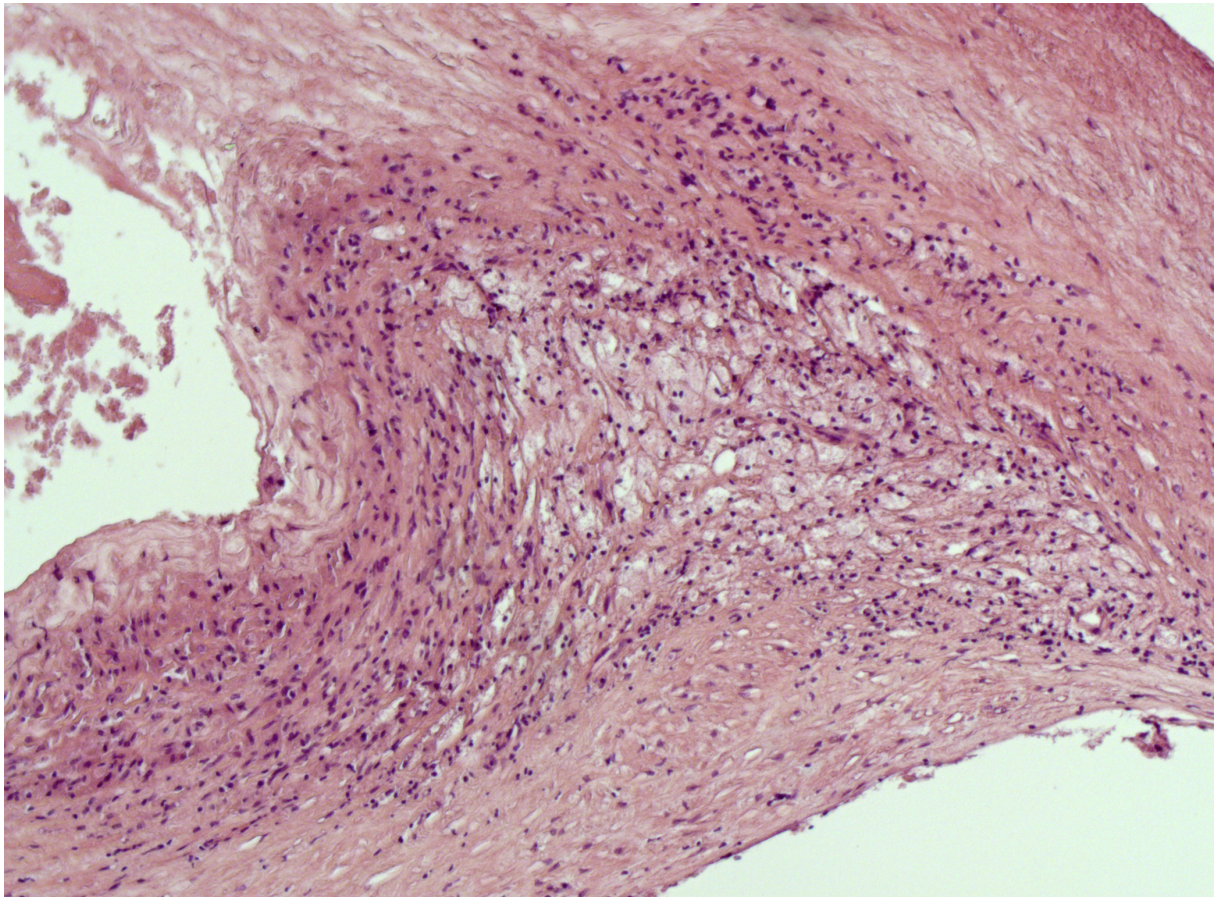


Abbildung 1: Makrophageninfiltration der Plaqueschulter, Typ IIa Läsion (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100x Vergrößerung, Arteria carotis interna, eigene Abbildung)

Typ IIb oder progressionsresistente („progression-resistant lesions“) Läsionen stellen die größere der beiden Subgruppen dar und schreiten langsamer, gar nicht oder nur bei Patienten mit sehr hohen Plasmaspiegeln von atherogenen Lipoproteinen weiter fort.

Typ III („intermediate lesions“) Läsionen bilden die morphologische und chemische Brücke zwischen Typ II und fortgeschrittenen Läsionen. Histologisch imponieren Ansammlungen extrazellulärer Lipide und Partikel unter Schichten aus Makrophagen und Schaumzellen zwischen glatten Muskelzellen. Über die morphologischen Veränderungen der Typ II Läsionen hinaus, finden sich hier mehr Cholesterinkristalle, Fettsäuren und Triglyzeride.

Typ IV Läsionen zeichnen sich durch einen konfluierenden Lipidkern aus, welcher von einer aus präexistenter Intima bestehenden fibrösen Kappe bedeckt wird. Das Läsionsvolumen wird primär durch die Lipidmasse bestimmt. Aufgrund der Fähigkeit der Gefäßwand, sich nach außen zu expandieren, verengt diese Läsion das Lumen jedoch noch nicht zwangsläufig.

Typ V Läsionen bestehen aus schichtartig angeordnetem fibromuskulärem Gewebe und einem oder mehreren lipid-reichen nekrotischen Plaquekernen (engl. lipid-rich necrotic core, LRNC). Diese Plaquekerne entstehen durch Apoptose von lipidbeladenen Schaumzellen [29]. Die Größe der LRNC und die Dicke bzw. der Zustand der fibrösen Kappe sind entscheidend für die Beurteilung der Stabilität der Läsionen [30, 31]. Die einzelnen Schichten setzen sich aus rupturiertem Gewebe, Hämatom oder Thrombus zusammen und wirken der Ausdehnung der Gefäßwand nach außen entgegen. Hieraus resultiert die für eine Typ V Läsion typische Verengung des Lumens. Die luminal gelegene Kappe enthält einen größeren Anteil an Kollagenfasern.

Kommt es an der endothelialen Oberfläche zur Ausbildung von Defekten (Fissuren, Erosionen, Ulzerationen), Thromben, Hämatomen oder Blutungen handelt es sich um Typ VI Läsionen. Besonders häufig treten Rupturen in der Plaqueschulter, also dem Randbereich der fibrösen Kappe einer instabilen Plaque auf, da in diesem Bereich die einwirkenden mechanischen Kräfte und die Aktivität von Matrix degradierenden Enzymen wie z.B. Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) am stärksten ausgeprägt ist [32]. Plaquerupturen mit aufgelagerten Thromben führen zu einer akuten Vergrößerung der Läsion in luminaler Richtung, welche das sonst durch Lipidansammlung entstehende Wachstum übersteigt. Bei nicht fatalen Episoden infiltrieren glatte Muskelzellen die thrombotischen Ablagerungen und bilden fibröses Gewebe. Endothelzellen bilden neue Kanäle durch okklusive Thromben oder besiedeln die luminal Seite des Thrombus.

Ab der fünften Lebensdekade finden sich immer mehr atherosklerotische Läsionen von vorwiegend mineralischer Natur. Sobald mehr als die Hälfte der Querschnittsfläche einer Läsion aus mineralischen Ablagerungen besteht kann diese Typ VII oder kalzifizierte Läsion genannt werden. Darüber hinaus enthalten derartige Läsionen meist eine Fülle von fibrösem Gewebe. Mit zunehmendem Alter vergrößern sich extrazelluläre Kalziumpartikel, fusionieren und bilden Aggregate. Diese Anhäufungen von Mineralien dominieren im Kern der Läsion und ersetzen Schritt für Schritt das extrazelluläre Lipid.

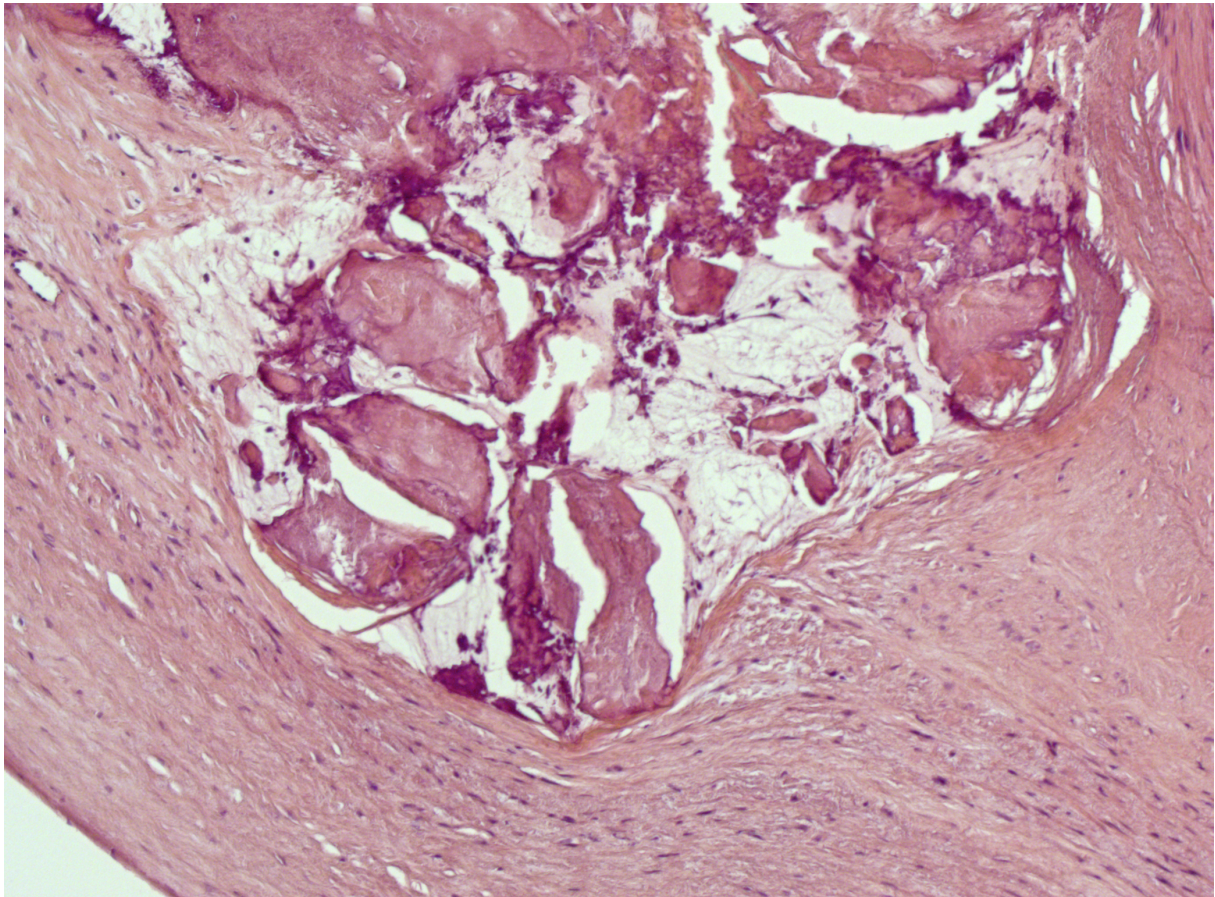


Abbildung 2: Kalzifizierte Läsion mit Makrophageninfiltraten, Typ VII Läsion (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100x Vergrößerung, Arteria carotis interna, eigene Abbildung)

Einige Läsionen bestehen vor allem aus irregulär angeordnetem, fibrösem, teilweise hyalinisiertem Bindegewebe. Es finden sich keine Lipidkerne und nur geringfügige mineralische Ablagerungen. Diese Läsionen werden Typ VIII oder fibrotische Läsionen genannt. Meist resultieren diese aus einem oder mehreren Prozessen wie Reorganisation eines Thrombus oder Resorption und Ersetzung des Lipidkerns mit fibrösem Gewebe.

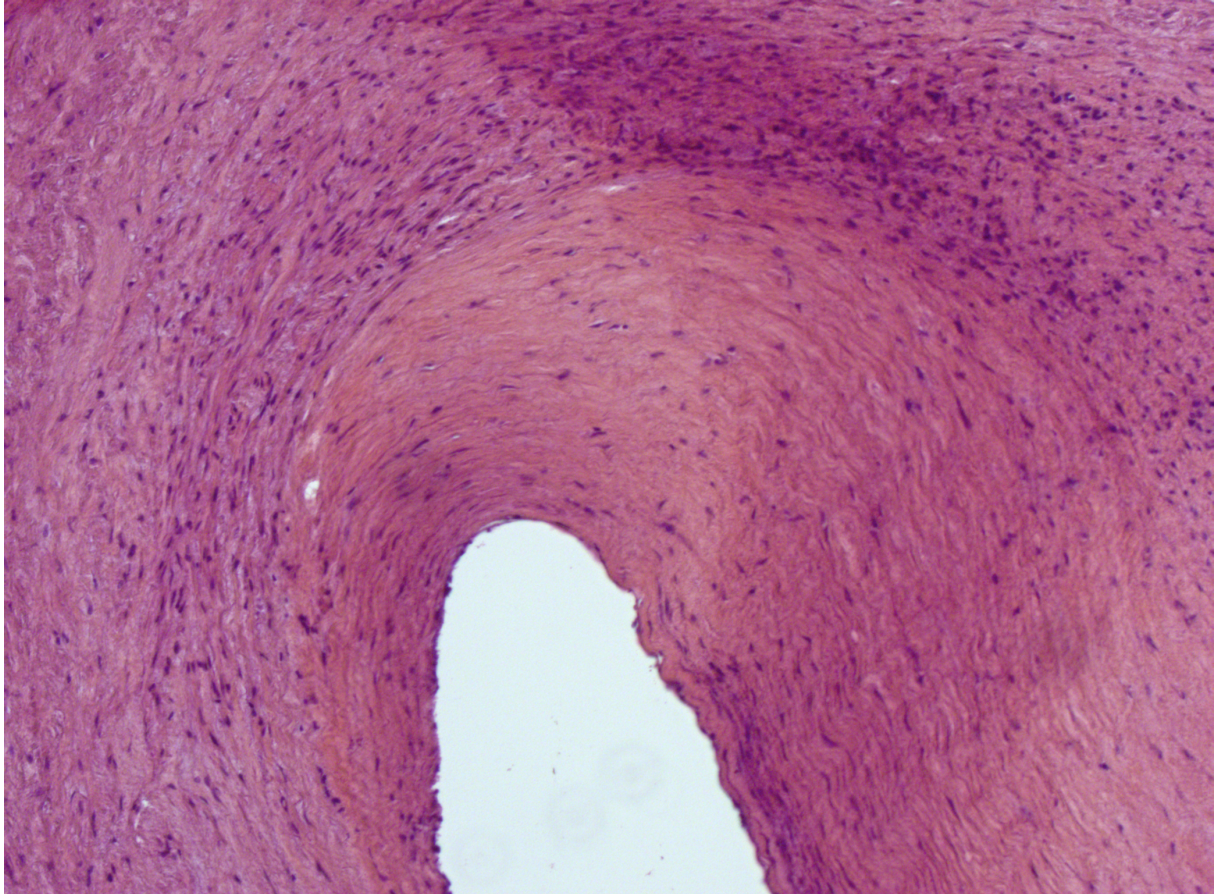


Abbildung 3: typischer, kollagenfaserreicher Aufbau einer Typ VIII Läsion mit deutlicher Stenosierung des Lumens (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100x Vergrößerung, Arteria carotis interna, eigene Abbildung)

Läsionen vom Typ I-III können sich zurückbilden. Typ IV und Typ V Läsionen können sich verkleinern, eine vollständige Regression ist jedoch nicht mehr möglich. Eine Vielzahl von randomisierten Studien haben gezeigt, dass eine Reduktion der ischämischen Episoden in Zusammenhang mit einer Reduktion von low-density lipoprotein (LDL) und einer Zunahme von high-density lipoprotein (HDL) steht [33, 34].

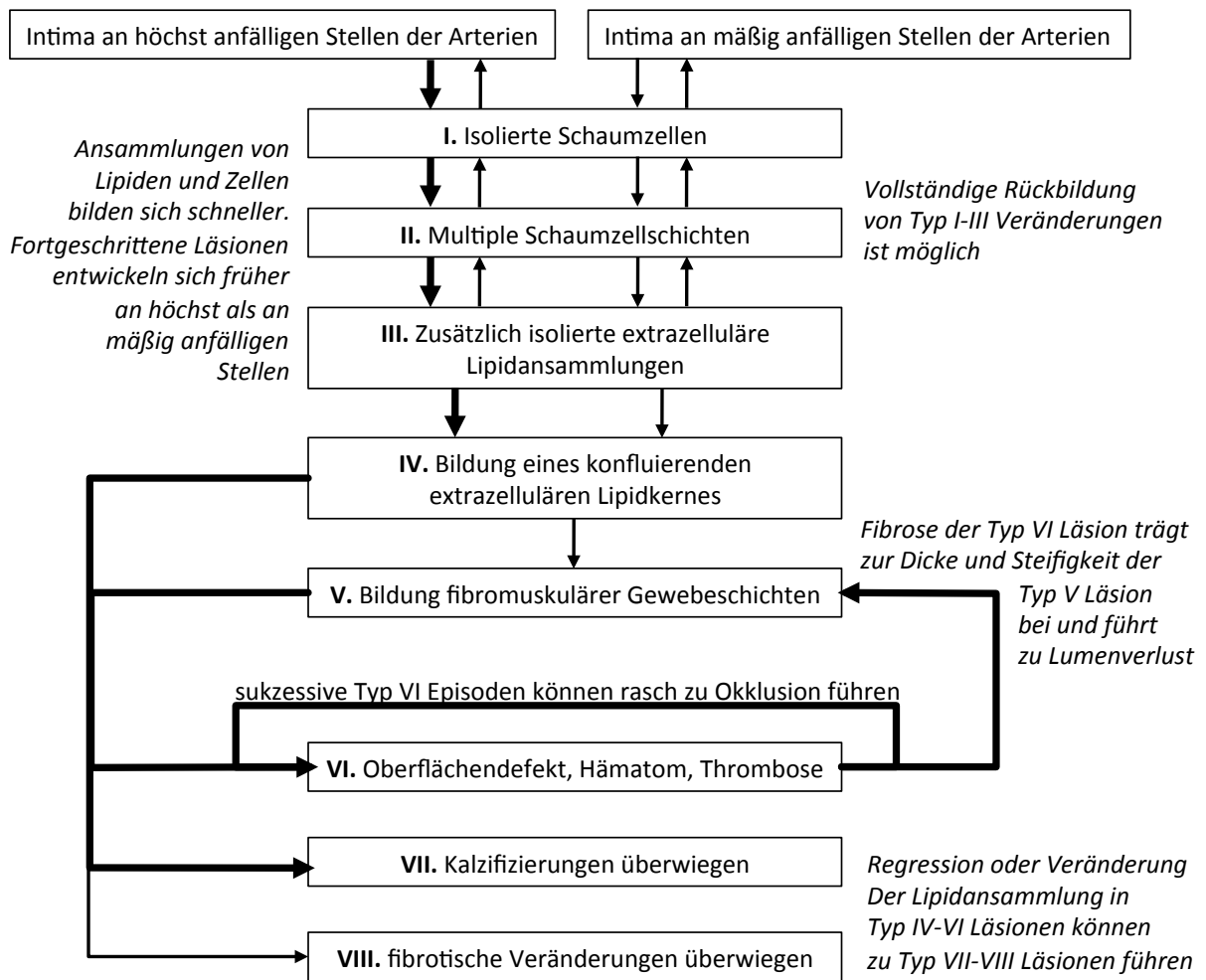


Abbildung 4: Evolution atherosklerotischer Läsionen (Typ I-VIII) [27]

2.4 Atherosklerose und Inflammation

Nach der traditionellen Vorstellung entwickeln sich atherosklerotische Läsionen von einem „fatty streak“ bis zu einem klinisch manifesten, das Gefäßlumen verengenden Atherom zwangsläufig und progressiv nach einer bestimmten Zeit. Ursächlich für die weitere Stenosierung war nach dieser Überzeugung vor allem die von Makrophagen stimulierte Replikation von glatten Muskelzellen und die Anhäufung von Lipiden. Neuere Erkenntnisse haben jedoch gezeigt, dass eine inflammatorische Komponente an allen Stadien der Atherosklerose maßgeblich beteiligt ist. Da die Entzündungsreaktion von besonderer Wichtigkeit für die Pathogenese der Atherosklerose zu sein scheint, spricht man heutzutage auch von einer chronisch-entzündlichen Erkrankung der Gefäßwand [35-39]. Immunzellen wie Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen prägen das Bild atherosklerotischer Läsionen. Diese Leukozyten geben eine Vielzahl von Zytokinen, Matrix-degradierenden Enzymen und thrombogenen Substanzen frei, welche Wegbereiter für die Plaqueerosion und -ruptur sind [40-42].

2.4.1 Endotheldysfunktion

Bei bestehenden kardiovaskulären Risikofaktoren kommt es zunehmend zum Verlust der endothelialen Regulationsfunktionen. Das akute Koronarsyndrom wie auch der ischämische Schlaganfall gehen ursächlich teilweise auf eine reduzierte Kontrolle des Gefäßtonus, Thrombenbildung und eine veränderte Komposition der Gefäßwand zurück. Studien konnten zeigen, dass der Grad der endothelialen Dysfunktion mit dem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse korreliert [43, 44]. Die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren (Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, Hypertonie, Hyperglykämie etc.) aber auch ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) und chronische systemische Infektionen initiieren einen chronisch inflammatorischen Prozess, welcher begleitet wird von einer Abnahme der Vasodilatoren und antithrombotischen Faktoren und einer Zunahme der Vasokonstriktoren und prothrombotischen Faktoren [45-50]. Die Endothelzellen nehmen einen prothrombotischen Phänotyp an, was vermutlich ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse in bestimmten Hochrisikogruppen zur Folge hat [51, 52]. Darüber hinaus exprimiert das Endothel in Anwesenheit von bestimmten inflammatorischen Stimuli

chemotaktisch wirkende Zytokine, Adhäsionsmoleküle und inflammatorische Moleküle [53]. Die endotheliale Dysfunktion scheint die Prozesse der Monozyten und T-Zell Adhäsion, der Schaumzellbildung und der Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen positiv zu verstärken [43]. Von besonderer Bedeutung für die Regulation des Gefäßtonus und der Inhibition der Leukozytenadhäsion ist in diesem Zusammenhang die endotheliale Produktion des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO), welcher sich physiologisch in einem empfindlichen Gleichgewicht mit dem Vasokonstriktor Endothelin-1 befindet [54, 55]. Wobei die Vasokonstriktion, aufgrund des unterschiedlichen Pathomechanismus, bei der Entstehung des Myokardinfarktes durch Koronarsklerose eine wesentlich wichtigere Rolle spielt als bei der Entstehung des Hirninfarktes durch arterio-arterielle Embolie. In Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren jedoch reduzieren reaktive Sauerstoffspezies die Aktivität von NO durch direkte Interaktion mit Endothelzellen und durch oxidative Modifikation der inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) [56]. Gleichzeitig ist bei diesen Patienten die Plasma Endothelin-1 Konzentration erhöht, welche mit der Schwere der Erkrankung korrelieren [57]. Dieses dysfunktionale, geschädigte Endothel ermöglicht Lipiden den Durchtritt in den subendothelialen Raum. Es bilden sich als erster Schritt im atherosklerotischen Prozess die sogenannten „fatty streaks“.

2.4.2 Lokale Inflammation

Sowohl atherogene Ernährung wie auch die familiäre Hypercholesterinämie führen zur fokalen Aktivierung des Endothels von großen und mittelgroßen Arterien. Die im dysfunktionalen Endothel vorherrschende erniedrigte Bioverfügbarkeit von NO führt über proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und tumor necrosis factor- α (TNF- α) zur Aktivierung von nuclear factor- κ B (NF- κ B) in Endothelzellen. Folglich kommt es zur Expression von vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in Endothelzellen und von intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in Makrophagen [58-60]. Lichtmikroskopisch erkennbar imponiert wenig später die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen [61]. Insbesondere Monozyten und T-Lymphozyten binden an VCAM-1. Die Expression von VCAM-1 beschränkt sich dabei selektiv auf die zur Ausbildung von Läsionen neigenden Teile des Gefäßsystems [62]. An den Verbindungsstellen der Endothelzellen treten gebundene Leukozyten durch Diapedese in die Intima ein. Chemotaktisch wirkende Zytokine

(chemoattractant cytokines) wie monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und IL-8 spielen bei diesem Prozess der Leukozytenrekrutierung eine wichtige Rolle [63-65]. Stimulus für die Expression von MCP-1 in Endothelzellen ist auch hier die erniedrigte NO Konzentration [66]. Zudem produzieren Endothelzellen IL-6, welches die inflammatorische Kaskade weiter verstärkt. In der Intima differenzieren die Monozyten, stimuliert durch macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), zu Makrophagen und letztlich Schaumzellen [67, 68]. Makrophagen nehmen die in der Intima abgelagerten Lipide über eine Vielzahl von Rezeptoren, unter anderen die „scavenger receptors“, auf [69, 70]. Diese unkontrollierte Aufnahme von modifiziertem low-density-lipoprotein (LDL) führt zur Ansammlung von Cholesterin in Makrophagen und somit zur Bildung von Schaumzellen, welche ihrerseits proinflammatorische Zytokine, MMP, tissue factor und Wachstumsfaktoren sezernieren. An major histocompatibility complex (MHC) Klasse II gebundene Antigene werden von CD4⁺ T-Lymphozyten erkannt und lösen eine Immunantwort aus [36]. Exprimiert werden MHC Klasse II Moleküle von den umliegenden Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen. Wiederholte Zyklen dieser Entzündungsreaktion führen zur Anhäufung von Makrophagen und Proliferation von glatten Muskelzellen. Hierbei kommt es immer wieder zum Untergang von Zellen und somit zur Bildung des nekrotischen Kerns der Läsion. Einige der glatten Muskelzellen entwickeln sich später weiter zur charakteristischen „fibrösen Kappe“ fortgeschrittener Läsionen. In vulnerablen Plaques treffen T-Lymphozyten auf Antigene wie oxidiertes LDL und „heat shock“ Proteine [71]. Noch ist nicht genau verstanden, warum diese Aktivierung von Th1 T-Zellen in einen chronisch entzündlichen Zustand mündet, jedoch gilt es als gesichert, dass eine selektive Rekrutierung und Aktivierung von Th1 T-Zellen eine starke inflammatorische Kaskade initiiert [39]. Interferon- γ und TNF- α führen zur erhöhten Expression von Chemokinen der Familie der Fraktalkine (CXC3-Motiv) in Endothelzellen und Leukozyten. Die Folge ist eine zusätzliche Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten im Allgemeinen und speziell von Th1-Zellen [72, 73]. Die Freisetzung von Interferon- γ (IFN- γ) aus Th1-Zellen spielt im Verlauf der Atherosklerose eine wichtige Rolle, da diese die Aktivierung von Makrophagen, die Sekretion von prokoagulatorischen Proteinen und MMP, die Inhibition der Proliferation von glatten Muskelzellen und eine Abschwächung der Expression von α -Actin und Kollagen zur Folge hat [60].

In der jüngsten Vergangenheit hat sich gezeigt, dass auch endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) eine Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose spielen [74-76]. EPCs stammen von adulten Stammzellen ab und sind an der Reparatur von Gefäßverletzungen beteiligt [77]. Noch ist allerdings nicht klar, ob der Einfluss von EPCs auf atherosklerotische Läsionen sich vor- oder nachteilig auf deren Stabilität auswirkt, da sie zum einen zur Reendothelialisierung von Läsionen beitragen, aber auf der anderen Seite durch ihren Beitrag an der Neovaskularisation der Plaque den Eintritt von inflammatorischen Zellen verstärken [78-82]. Die durch Neovaskularisation gebildeten Mikrogefäße in der Plaque, korrelieren unabhängig mit der Ruptur der Plaque und sind damit entscheidend für die Einschätzung der Rupturgefahr einer Läsion [83]. Bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren ist die Anzahl von zirkulierenden EPCs erniedrigt. Ursächlich hierfür sind möglicherweise die verminderte Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark und/oder deren verstärkte Rekrutierung an verletzte Stellen der Gefäßwand [84, 85]. Im Falle einer Ischämie z.B. des Myokards jedoch kommt es zu einer verstärkten Mobilisierung von EPCs [86]. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Anzahl von EPCs und die somit verminderte Reparatur von vaskulären Defekten eine Rolle bei der Pathogenese von vaskulären Erkrankungen spielt [87-89]. EPCs exprimieren auf ihrer Oberfläche den CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4), welcher für den Prozess des „homing“ von Bedeutung zu sein scheint [90]. Unter „homing“ versteht man die Rekrutierung der Zellen an ihren Zielort. Bei hypoxischen Gewebsschäden wie einem Myokardinfarkt bilden Endothelzellen und Fibroblasten vermehrt stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), welcher mit CXCR4 interagiert [91, 92]. CXCR4 und SDF-1 erscheinen aufgrund dieser Schlüsselrolle besonders wichtig, um die Funktion von EPCs in atherosklerotischen Läsionen besser zu verstehen.

2.4.3 Systemische Marker der lokalen Inflammation

Neben den oben beschriebenen Prozessen der lokalen Entzündungsreaktion kommt es auch zu einem Anstieg von serologischen, inflammatorischen Biomarkern im peripheren Blut. Ansatz einiger klinischer Studien war es daher, durch Messung dieser Biomarker die Inflammation und damit verbunden das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse zu quantifizieren. Schon in der frühen Phase der vaskulären Entzündungsreaktion produzieren die glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäßwand IL-6 und stimulieren damit die

Expression des CRP (C-reaktives Protein) in der Leber [93]. Das CRP gehört zur Gruppe der akute-Phase-Proteine, deren Synthese als Teil der Immunantwort entweder herunter- oder hochreguliert wird [94]. Ausgeschüttetes CRP führt zur weiteren Rekrutierung von Monozyten und regt diese an IL-1, IL-6 und TNF- α freizusetzen. In diesem Zusammenhang scheint das CRP bei der Aufrechterhaltung des proinflammatorischen Zustandes in der Läsion eine bedeutende Rolle zu spielen [95]. Darüber hinaus konnten Studien zeigen, dass das CRP ein unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse wie das akute Koronarsyndrom, die TIA und den ischämischen Schlaganfall darstellt [96-98]. Die „Centers for Disease Control and Prevention“ und die „American Heart Association“ bestätigten das CRP als einen zusätzlichen Prädiktor vor allem für Patienten mit intermediärem Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis [99]. Auch Fibrinogen gehört zur Gruppe der akute-Phase-Proteine und kann ähnlich wie das CRP die Wahrscheinlichkeit für einen Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall vorhersagen [100-102]. Im direkten Vergleich mit Fibrinogen stellte sich das CRP als ein etwas potenterer Prädiktor für kardiovaskuläre Erkrankungen heraus [103]. Anhäufungen von Makrophagen in Plaques sind mit einem Anstieg des CRP und von Fibrinogen assoziiert. Beide gelten als frühe Indikatoren der Atherosklerose [104, 105]. Interleukin-6 als Stimuli für die hepatische CRP-Produktion und andere Chemokine wie IL-7 und IL-8 gelten ebenso als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse [106, 107]. Zudem haben Studien gezeigt, dass erhöhte Werte von IL-6 und TNF- α in Relation zu einem schlechteren Outcome bei einem ischämischen Schlaganfall stehen [108]. Interleukin-10 hingegen wirkt als protektiver Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose. Die tierexperimentelle Inhibition von IL-10 führt im Mausmodell zu stark ausgeprägten Läsionen und Thrombosierung [35, 109-111]. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Verbindung von Inflammation und Metabolismus, welche die Progression der Atherosklerose beeinflusst. Nicht nur kommt es zur Ablagerung von Lipiden in der Arterienwand, sondern zusätzlich führen Übergewicht und insbesondere das metabolische Syndrom zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α durch das Fettgewebe [112, 113].

2.5 RNA-Extraktion aus FFPE- und FF-Präparaten

Formalin fixierte und in Paraffin gebettete Präparate (engl. formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE-Präparate) stellen mit Abstand das am häufigsten verfügbare Material für histologische Studien dar. Die Vorteile dieser Technik liegen in der weiten Verbreitung und den guten Eigenschaften für histologische Schneiderverfahren. Zu den Nachteilen zählt, dass Formalin mit einer Vielzahl von Makromolekülen in Wechselwirkung steht und somit unter anderem die Isolierung von RNA erschwert [114, 115]. Dies führt dazu, dass in den meisten Fällen Gefrierpräparate (engl. fresh-frozen, FF-Präparate) für die Isolierung von RNA verwendet werden. Ein direkter, quantitativer Vergleich zwischen der RNA-Extraktion und anschließender Polymerase-Kettenreaktion aus FFPE- und FF-Präparaten erfolgte für Gewebe der Ovarien, der Mamma und viele weitere, jedoch nicht für Plaquematerial der Arteria carotis interna [116, 117]. All diesen Studien gemein ist die Schlussfolgerung, dass RNA zuverlässig aus FFPE-Präparaten gewonnen werden kann [118]. Lediglich die Quantität der extrahierten RNA ist deutlich niedriger im Gegensatz zu FF-Präparaten, weshalb angesichts der geringen Menge an gewinnbarem Material aus Carotisplaques nicht klar war, ob eine RNA-Extraktion aus FFPE-Präparaten von Plaquetgewebe der A. carotis interna möglich ist.

2.6 Fragestellungen

Fragestellung 1: Kann RNA zuverlässig und reproduzierbar aus FFPE-Präparaten von Plaquematerial der Arteria carotis interna isoliert werden?

Fragestellung 2: Ist die aus FFPE-Präparaten isolierte RNA bezüglich Qualität und Verwendbarkeit für molekularbiologische Verfahren wie der real-time PCR mit der aus FF-Präparaten isolierten RNA vergleichbar?

Fragestellung 3: Besteht eine Assoziation zwischen der relativen Expression von CXCR4 im Plaquematerial und der CRP- bzw. Fibrinogenkonzentration im Serum bzw. Plasma?

Fragestellung 4: Besteht eine Assoziation zwischen der relativen Expression von SDF-1 im Plaquematerial und der CRP- bzw. Fibrinogenkonzentration im Serum bzw. Plasma?

Fragestellung 5: Besteht eine Assoziation zwischen der relativen Expression von CXCR4 bzw. SDF-1 im Plaquematerial und den klinischen Daten des Patientengutes?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Einschlusskriterien

Für die Studie wurden 13 Patienten mit einer atherosklerotisch bedingten Stenose der Arteria carotis interna eingeschlossen, bei denen eine operative Versorgung mittels Thrombendarteriektomie durchgeführt wurde. Es handelte sich hierbei um Patienten, die sich entweder in der neurologischen Ambulanz des Neuro-Kopf-Zentrums, der Gefäßambulanz der Gefäßchirurgie im Rechts der Isar oder der VCM – Praxis für Gefäßchirurgie im Isar Medizin Zentrum vorstellten. Die gefäßchirurgischen Eingriffe wurden in der Abteilung für Gefäßchirurgie des Klinikums rechts der Isar, München und in der VCM – Praxis für Gefäßchirurgie im Isar Medizin Zentrum unabhängig von dieser Studie geplant und durchgeführt. Alle eingeschlossenen Patienten wurden im Vorfeld standardisiert doppler- und duplexsonographisch untersucht. Relevante Komorbiditäten wurden durch einen standardisierten Fragebogen erfasst. Die Patienten stimmten nach Aufklärung über die Ziele der Studie schriftlich der Teilnahme zu. Alle durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethikkommission genehmigt

3.2 Patientenfragebögen

Alle eingeschlossenen Patienten wurden nach einem standardisierten Fragebogen befragt. Erfasst wurden: Kardio- und zerebrovaskuläre Vorerkrankungen, allgemeine vaskuläre Risikofaktoren / körperliche Aktivität, andere relevante Erkrankungen, die Familienanamnese und die Medikamenteneinnahme. Zudem ergab eine kurze klinische Untersuchung Aufschluss über Körpergröße/-gewicht, Body-Mass-Index (BMI), Blutdruck und Herzfrequenz.

Kardio-/Zerebrovaskuläre Vorerkrankungen
Hirnfarkt, TIA, Carotis TEA/PTA, Myokardinfarkt, PTCA/Stenting, Bypass, Koronare Herzkrankheit, Angina pectoris, Vorhofflimmern, Herzklappendefekte, pAVK, PTA, Bypass Venenthrombosen, Koagulopathien
Allgemeine vaskuläre Risikofaktoren / Körperliche Aktivität
Arterielle Hypertonie (systolisch Blutdruckwerte >140 mmHg oder Einnahme antihypertensiver Medikation), Diabetes mellitus, Raucher
Andere relevante Erkrankungen
Neoplasien, Nephropathien, akute Infekte
Familienanamnese
Hirnfarkt/Myokardinfarkt Eltern/Geschwister
Regelmäßig eingenommene Medikamente

Tabelle 1: Inhalt der Patientenfragebögen

3.3 Labortechnische Untersuchungen

3.3.1 Bestimmung der mRNA-Expression von CXCR4 und SDF-1 im operativ gewonnenen Plaquematerial mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Das operativ gewonnene Plaquematerial wurde zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und während der Überführung in das Labor vorübergehend in Kochsalzlösung gelagert. Zwischen Gewinnung und Fixierung des Plaquematerials vergingen durchschnittlich 60 Minuten. Nach makroskopischer Begutachtung wurde die Plaque mit Hilfe eines Skalpells je nach Größe in zwei oder vier Segmente zerteilt (siehe Abbildung 2). Wobei die Segmente a und c für 12 Stunden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin gebettet wurden (nachfolgend als FFPE-Präparate bezeichnet). Die Segmente b und d hingegen wurden mit Tissue-Tek® O.C.T™ überschichtet und in flüssigem Stickstoff eingefroren (nachfolgend als FF-Präparate bezeichnet). Tissue-Tek® O.C.T™ ist ein aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen bestehendes Einbettmedium, welches eine geeignete Basis für die weitere

Verarbeitung mit dem Kryostat darstellt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die in Paraffin gebetteten Präparate bei Raumtemperatur, die mit Tissue-Tek® O.C.T™ überschichteten Präparate bei -80 °C aufbewahrt.

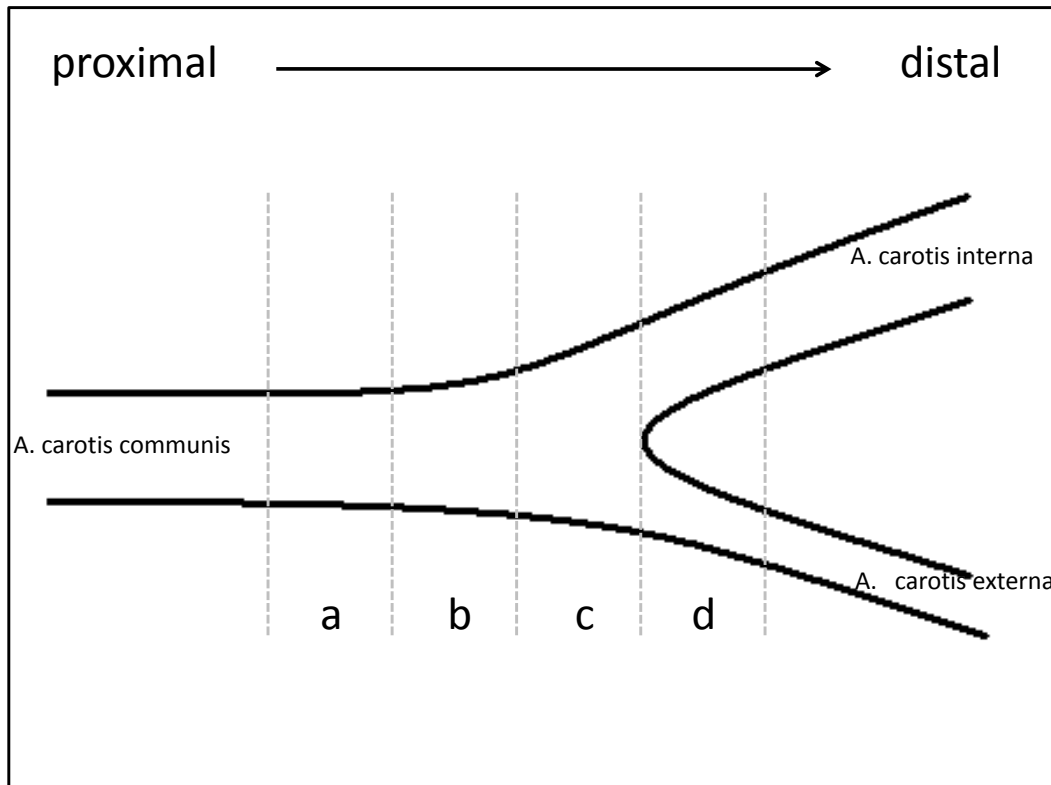


Abbildung 5: Segmentierung des Plaquematerials nach Explantation

Schneiden der Präparate

Von den FFPE-Präparaten wurden bei Raumtemperatur mit dem Mikrotom jeweils zwei 10 µm Schnitte angefertigt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die FF-Präparate wurden mit Hilfe des Kryotoms während des Schneidevorgangs konstant auf -10 °C gekühlt und geschnitten. Auch hier wurden je Segment zwei 10 µm Schnitte hergestellt und zur weiteren Verarbeitung in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

RNA-Extraktion

Für die unter diesem Punkt aufgeführten Arbeitsschritte kam zum einen der Roche High Pure RNA Paraffin Kit (FFPE-Präparate) und der Qiagen RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (FF-Präparate) zum Einsatz. Die Vorgehensweise orientierte sich an den mitgelieferten Handbüchern.

FFPE-Präparate (Roche High Pure RNA Paraffin Kit®)

- Entparaffinierung

Zu den Schnitten wurde Xylol und Ethanol gegeben, der nach Zentrifugation entstandene Überstand verworfen und das entparaffinierte Präparat im Heizblock bei 55 °C getrocknet.

- RNA-Isolierung

Es folgte die Zugabe von Lysepuffer, Natriumdodecylsulfat und Proteinase K. Daran schloss sich eine Inkubation im Heizblock bei 55 °C über Nacht an. Das nun lysierte Probenmaterial wurde im Folgenden mit Ethanol und „binding buffer“ verdünnt. Anschließend erfolgte die Übertragung in ein Filtrerröhrchen, welches in ein Eppendorfgefäß eingesteckt war. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Diese Zentrifugationen unter Anwendung eines „wash buffers“ wiederholten sich drei weitere Male bis nach dem Verwerfen des letzten Durchlaufes ein „elution buffer“ zugegeben wurde, welcher die Nukleinsäuren aus dem Filtrerröhrchen auswusch. Diese sammelten sich nach erneuter Zentrifugation in einem sterilen Sammelröhrchen.

- DNase-Verdau

Nach Zugabe von DNase und „incubation buffer“ wurden die Proben für 45 Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Während der Inkubation erfolgte der Abbau von doppelsträngigen Nukleinsäuren.

- RNA-Aufreinigung

Die unter „RNA-Isolierung“ beschriebenen Schritte wurden wiederholt und die gewonnene RNA somit weiter aufgereinigt.

FF-Präparate (Qiagen RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit®)

- Zerkleinerung und Homogenisierung

Verdünnung der Proben mit RNase freiem Wasser und Bearbeitung mit Heidolph Silent Crusher® Dispergierer für 30 Sekunden.

- RNA-Isolierung
- DNase-Verdau

- RNA-Aufreinigung

cDNA-Synthese (Fermentas RevertAid Strand cDNA Synthesis Kit®)

Bei der cDNA-Synthese wurde ein zur isolierten RNA komplementärer DNA-Strang hergestellt. Hierfür wurde das Enzym Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) benötigt. Auch im Ansatz enthalten waren ein Reaktionspuffer, Magnesiumchlorid, Desoxyribonukleotidtriphosphate, Hexamer-Oligonukleotide und RNase-Inhibitor. Als Primer dienten die Hexamer-Oligonukleotide. Nach Anlagerung der Primer an die mRNA synthetisierte die Reverse Transkriptase den komplementären DNA-Strang an den zuvor isolierten mRNA-Strang. Das Produkt der Reaktion war ein mit dem ursprünglichen mRNA-Strang hybridisierter cDNA-Strang.

Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) (StepOnePlus® Real-Time PCR System)

Die cDNA wurde mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion repliziert und gleichzeitig die synthetisierte DNA quantifiziert. Nur durch die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) aus dem Bakterium *Thermus Aquaticus* können die direkt aufeinander folgenden Zyklen kontinuierlich durchlaufen werden [119]. Hierbei kam das StepOnePlus® Real-Time PCR System zum Einsatz. Auf eine 96-Wellplatte wurden übertragen: Taq-Polymerase, spezifische Primer (GAPDH, Actin B, CXCR4, SDF-1), TaqMan®-Sonden (Hydrolyse-Sonden), cDNA und Nuklease-freies Wasser. Die nachfolgende Reaktion erfolgte in 40 aufeinander folgenden Zyklen. Jeder Zyklus beinhaltete folgende Schritte:

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	15 min
Primerhybridisierung	58 °C	15 min
Elongation	72 °C	15 min

Tabelle 2: Schritte der Polymerase-Kettenreaktion

TaqMan®-Sonden nutzen den Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer. Sie bestehen aus kurzen, einsträngigen DNA Fragmenten, welche an ihrem einen Ende mit einem Quencher,

an ihrem anderen mit einem Reporter markiert sind. Die Fluoreszenz des Reporters wird durch die Nähe des Quenchers unterdrückt. Während des Reaktionsschrittes der Denaturierung im Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion trennte sich die doppelsträngige DNA auf. Sie lag nun einsträngig vor und konnte im nächsten Schritt mit den Primern und TaqMan-Sonden hybridisieren. Die Taq-Polymerase begann anschließend mit der Elongation und synthetisierte einen zum ursprünglichen DNA-Strang komplementären Strang. Neben ihrer 5'-3'-Synthese-Aktivität besitzt diese auch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Stößt die Taq-Polymerase während der Synthese auf die angelagerte TaqMan-Sonde, wird das 5'-Ende der Sonde abgebaut. Nun wird die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr durch den Quencher unterdrückt und kann gemessen werden. In der exponentiellen Phase der PCR nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der Reaktionsprodukte zu und eine korrekte, quantitative Auswertung ist möglich. Eine wichtige Messgröße stellte hierbei der Ct-Wert (Cycle threshold) dar. Dieser Schwellenwert beschreibt den Beginn der exponentiellen Amplifikationsphase der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion. Zu diesem Zeitpunkt stieg die Fluoreszenz der amplifizierten DNA erstmals exponentiell über den Hintergrundwert an. Der Ct-Wert lässt Rückschlüsse auf die Anzahl der DNA-Kopien in der jeweiligen Probe zu. Ein niedriger Ct-Wert deutete somit auf eine höhere DNA-Konzentration, ein hoher Ct-Wert auf eine niedrigere DNA-Konzentration hin. Zur weiteren Quantifizierung der Ergebnisse wurde darüber hinaus die relative Expression von SDF-1 und CXCR4 berechnet. Hierbei wurden die Ct-Werte von SDF-1 und CXCR4 in Relation gesetzt zu den Ct-Werten des Referenzgenes GAPDH.

Gelelektrophorese

Um die Richtigkeit der durch die qRT-PCR gelieferten Ergebnisse zu prüfen, wurde zudem eine Gelelektrophorese der amplifizierten DNA-Fragmente durchgeführt. Hierbei wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente unter Einfluss eines elektrischen Feldes von der negativ geladenen Kathode in Richtung der positiv geladenen Anode. Diese Wanderung fand in einem Agarose-Gel statt, welches wie ein engmaschiges Sieb wirkt und die Fragmente nach ihrer Größe auftrennt. Kurze DNA-Stränge liefen schneller, lange DNA-Stränge liefen langsamer durch das Gel in Richtung Anode. Darüber hinaus war dem Agarose-Gel Ethidiumbromid beigefügt, welches zwischen den Basen der DNA-Stränge interkaliert. Durch diese Interkalation verändert sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid, wodurch

seine Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht (UV-Licht) stark erhöht wird. Stellen im Agarose-Gel an denen sich DNA-Fragmente befanden, leuchteten bei Bestrahlung mit UV-Licht auf. Umso höher die Konzentration, desto stärker war die Intensität der Fluoreszenz. Neben den Proben wurde auch eine Mischung aus synthetisierten DNA-Fragmenten bekannter Länge auf das Gel gegeben. Durch Vergleich der jeweiligen Banden, konnte auf die Länge der DNA-Stränge der untersuchten Proben geschlossen werden. Stellte sich die amplifizierte DNA in diesem Arbeitsschritt als eine Bande im erwarteten Bereich des Agarosegels dar, so konnte ausgeschlossen werden, dass Polymere bestehend aus PCR-Sonden bzw. Primern die Messung während der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion verfälschten.

3.3.2 Bestimmung serologischer Biomarker im peripheren venösen Blut

Unmittelbar vor und 24 Stunden sowie weitere 2 Monate nach dem operativen Eingriff, wurden für die Bestimmung der Zytokine jeweils ein Serumröhrchen und ein Citratröhrchen abgenommen und direkt anschließend bei 3000 Umdrehungen/Minute für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei minus 20 °C eingefroren.

3.3.2.1 CRP, Fibrinogen

Die Laborparameter CRP (mg/dl) und Fibrinogen (mg/dl), deren Bestimmung im Institut für Klinische Chemie des Klinikums Rechts der Isar durchgeführt wurde, sind in die Studie miteinbezogen worden. Hierbei handelt es sich um Routinebefunde. Für die Messung von Fibrinogen wurde Plasma, für die Messung von CRP wurde Serum verwendet.

3.3.2.2 Zytokine

Cytometric Bead Array (CBA)

Für die quantitative Bestimmung der Zytokine IL-6 und IL-8 wurde das „Human Inflammation Kit“ von BD-Bioscience verwendet. Durchgeführt wurde diese Messung aus dem

Patientenserum. Die sogenannten „Beads“ sind Grundlage für die Messung mittels CBA. Diese Mikropartikel sind jeweils mit einem für ein bestimmtes Zytokin spezifischen Antikörper gekoppelt und haben eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität, welche im Durchflusszytometer gemessen wird. Somit kann während derselben Messung zwischen den verschiedenen Zytokinen unterschieden werden. Darüber hinaus erfolgt eine Inkubation der Zytokine mit einem PE-konjugierten Antikörper. Diese ist wichtig für die Bestimmung der Konzentration. Im nächsten Schritt erfolgte die Messung der Proben im Durchflusszytometer (FACS Calibur, Becton Dickson). Die Messung gibt Aufschluss über die Fluoreszenz der Mikropartikel („Beads“) und der PE-konjugierten Antikörper. Durch Anwendung von Standardkurven mit Hilfe der „BD CBA Analysis Software“ kann die Konzentration der einzelnen Zytokine in pg/ml errechnet werden.

3.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der histologischen Präparate

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist das weltweit am weitesten verbreitete Färbeverfahren für histologische Schnittpräparate. Zunächst wurden von den FFPE-Präparaten mithilfe des Mikrotoms 10 µm Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger übertragen. Anschließend wurden die auf den Objektträgern fixierten Schnitte durch Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt. Die nun entparaffinierten Schnitte wurden über 5 Minuten mit Hämatoxylin gefärbt. Nach Spülen der Schnitte mit Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit 1%iger alkoholischer Eosinlösung über 30 Minuten. Schließlich wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und mit einem Deckglas abgedeckt.

3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe von SPSS 20 für Windows. Zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde bei den vorliegenden kontinuierlichen Werten der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Ausführung aller Tests erfolgte zweiseitig. Als signifikant gewertet wurden Signifikanzen mit einem $p < 0,05$. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Boxplots. Die Länge der Box

entspricht hierbei dem Interquartilsabstand. Der Strich in der Box repräsentiert den Median. Die Whisker wurden auf das maximal 1,5-Fache des Interquartilsabstands limitiert. Milde Ausreißer (1,5 - 3-Fache des Interquartilsabstands) wurden als °, starke Ausreißer (>3-Fache des Interquartilsabstands) als * dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Daten des Patientengutes

In die Studie wurden, wie bereits oben erwähnt, 13 Patienten eingeschlossen. Hiervon waren 7 Patienten männlich und 6 Patienten weiblich. Die eingeschlossenen Patienten waren zur Zeit des gefäßchirurgischen Eingriffs zwischen 56 und 85 Jahren alt. Das Durchschnittsalter lag bei 69 Jahren. Bei der Mehrheit der Patienten bestanden eine arterielle Hypertonie, ein Nikotinabusus in der Vorgeschichte und eine durch Statine therapierte Hypercholesterinämie (Tabelle 3).

Patientendaten

n=13

Alter (Jahre), Mittelwert(range) 69;70(65-85)

Kardio-/Zerebrovaskuläre Vorerkrankungen

Hirnfarkt 3(23%)

TIA 4(31%)

Carotis TEA/PTA 1(8%)

KHK 4(31%)

AMI, PTCA/Stenting, Bypass 4(31%)

Angina pectoris 0(0%)

VHF 2(15%)

Herzklappendefekte 1(8%)

pAVK 6(46%)

Bypass, PTA 4(31%)

Stenosegrad der ACI (%)

70-80 3(23%)

80-90 6(46%)

>90 4(31%)

symptomatische ACI-Stenosen 5(38%)

asymptomatische ACI-Stenosen 8(62%)

Allgemeine vaskuläre Risikofaktoren

Hypertonie 11(85%)

Diabetes mellitus 3(23%)

Raucher 8(62%)

Andere relevante Vorerkrankungen

Neoplasien 3(23%)

Nephropathien 2(15%)

akute Infekte 1(8%)

Familienanamnese

Eltern Myokard-/Hirnfarkt	5(38%)
Geschwister Myokard-/Hirnfarkt	4(31%)

Medikamente

Statine	10(77%)
β-Rezeptorenblocker	10(77%)
ACE-Hemmer	5(38%)
Diuretika	4(31%)
Thrombozytenaggregationshemmer	12(92%)
Sartane	3(23%)

Körpermaße

Größe (m), Mittelwert(range)	1,71;1,68(1,57-1,82)
Gewicht (kg), Mittelwert(range)	76;77(58-94)
BMI (kg/m ²), Mittelwert (range)	25,9;26,5(21,0-31,5)

AMI = Akuter Myokardinfarkt, TIA = Transitorische ischämische Attacke, TEA = Thrombendarteriektomie, PTA = Perkutane transluminale Angioplastie, PTCA = Perkutane transluminale Coronarangioplastie, KHK = Koronare Herzerkrankung, VHF = Vorhofflimmern, pAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit, ACI = Arteria carotis interna, ACE-Hemmer = Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer, BMI = Body-mass-Index
Angaben jeweils Mittelwert;Median(range)

Tabelle 3: Daten des Patientenkollektivs

4.2 mRNA-Isolierung

4.2.1 Vergleich Ct-Werte

GAPDH

Der „cycle threshold“ für das Gen, welches für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase kodiert, wurde bei Amplifikation der aus FF-Präparaten isolierten Nukleinsäuren früher erreicht (Median 27,80 vs. 25,14 Range 7,29 vs. 8,06). Der Unterschied war signifikant ($p < 0,001$).

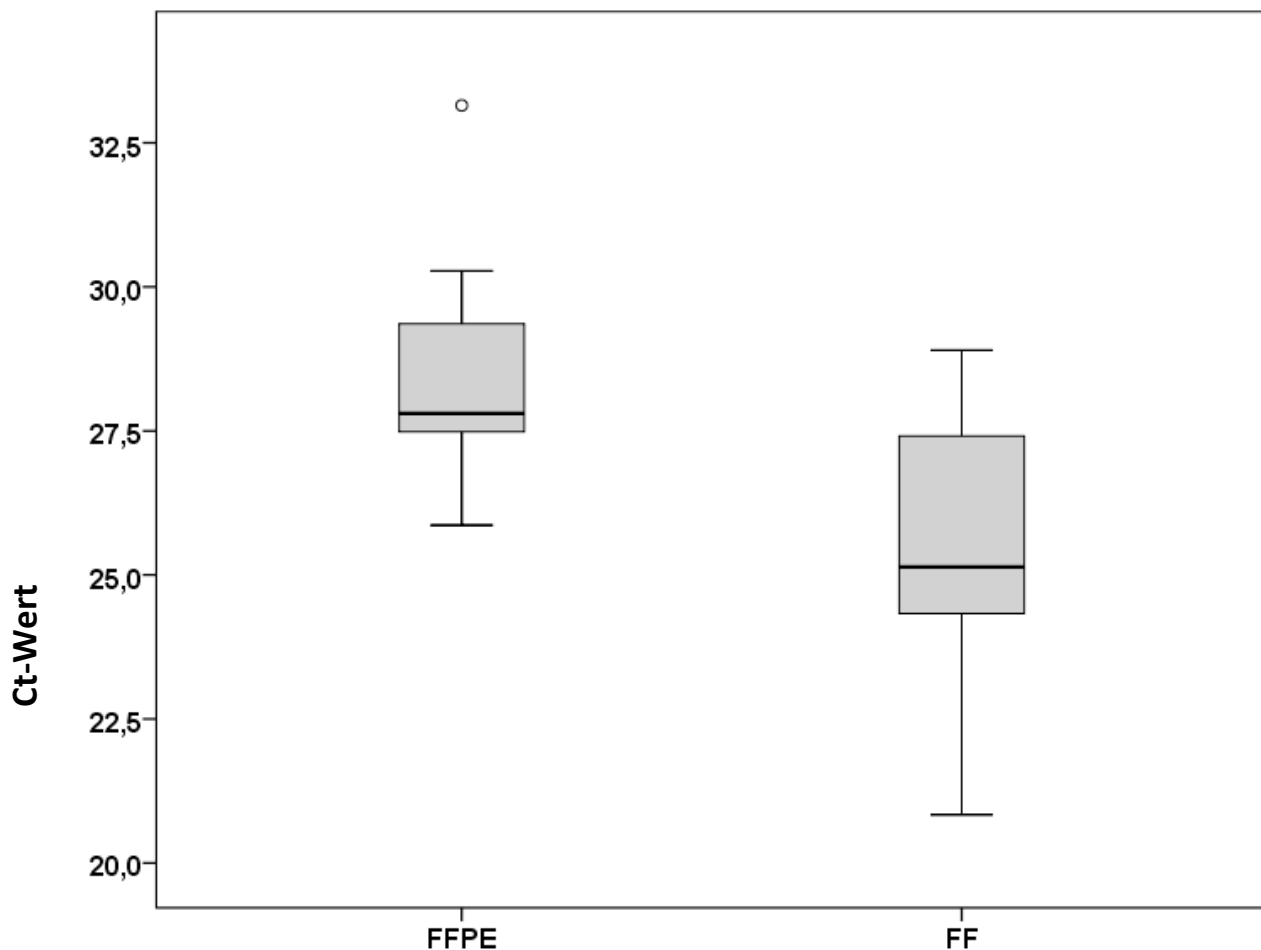


Abbildung 6: cycle-threshold (GAPDH) im Vergleich (FFPE vs. FF)

Actin B

Auch bei Verwendung von Primern bzw. Sonden spezifisch für das Gen von Actin B wurde der Ct-Wert bei Amplifikation des aus FF-Präparaten isolierten Materials signifikant ($p < 0,001$) früher erreicht (Median 29,92 vs. 26,45; Range 5,53 vs. 8,54).

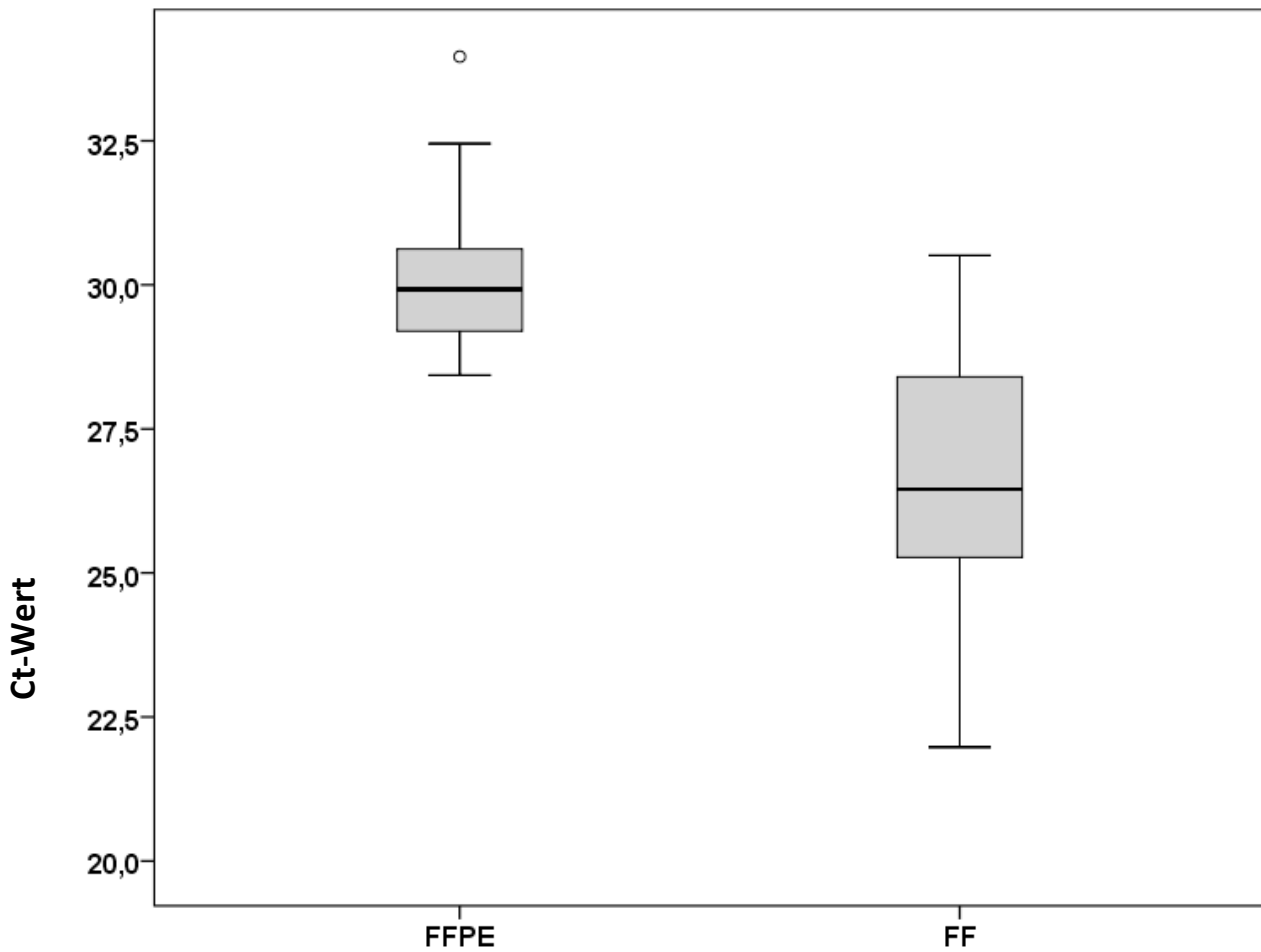


Abbildung 7: cycle-threshold (ActinB) im Vergleich (FFPE vs. FF)

CXCR4

Der Ct-Wert der für den Chemokinrezeptor 4 kodierenden Sequenz wurde auch hier für FF-Präparate (Median 32,16 vs. 30,94; Range 7,21 vs. 11,28) früher erreicht. Eine Signifikanz ergab sich jedoch nicht ($p=0,097$).

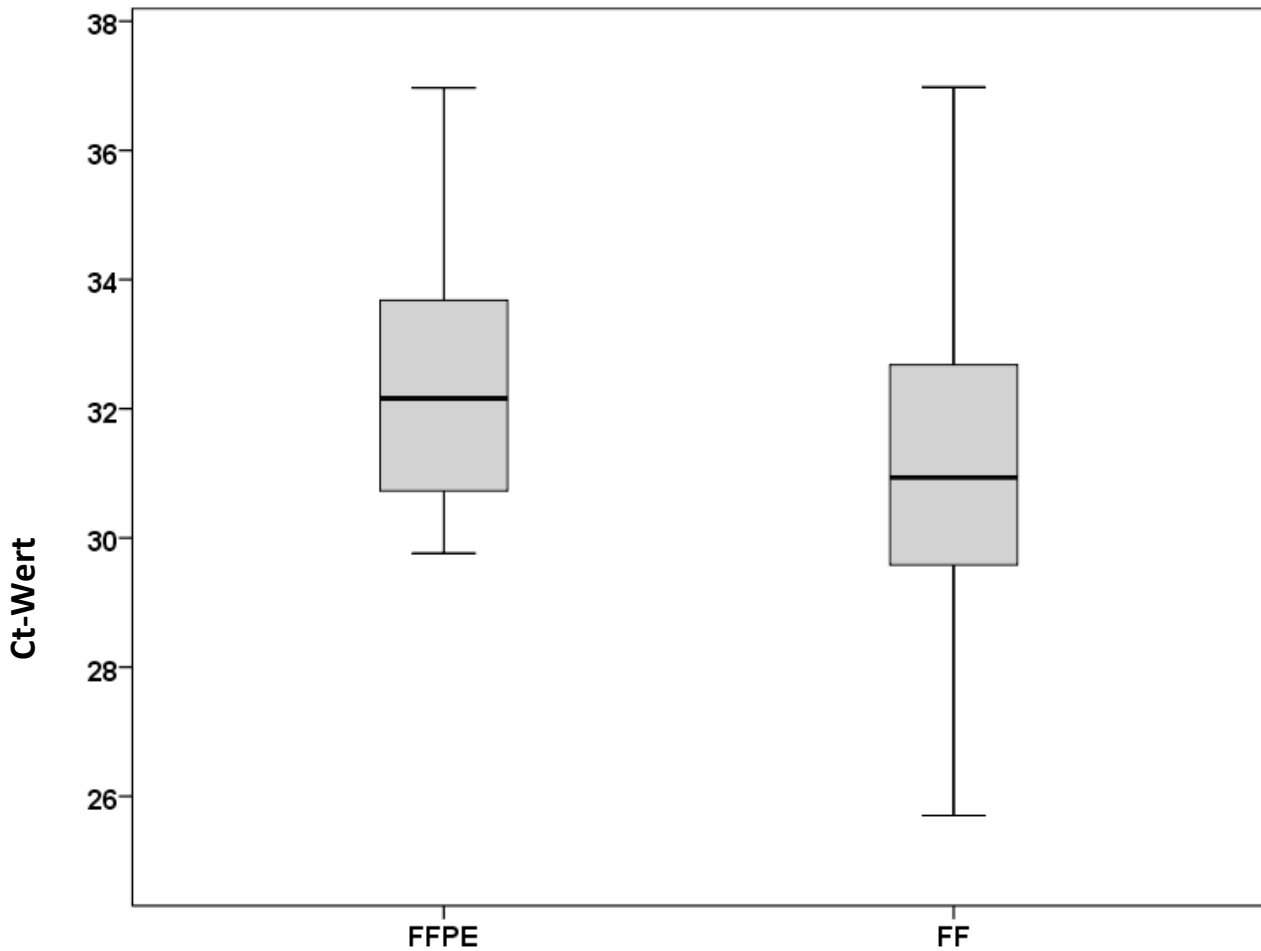


Abbildung 8: cycle-threshold (CXCR4) im Vergleich (FFPE vs. FF)

SDF-1

Signifikant niedriger ($p=0,005$) lag der Ct-Wert für das aus FF-Präparaten (Median 32,92 vs. 31,24, Range 5,71 vs. 9,43) gewonnene Material auch bei Verwendung von für SDF-1 spezifischen Primersequenzen.

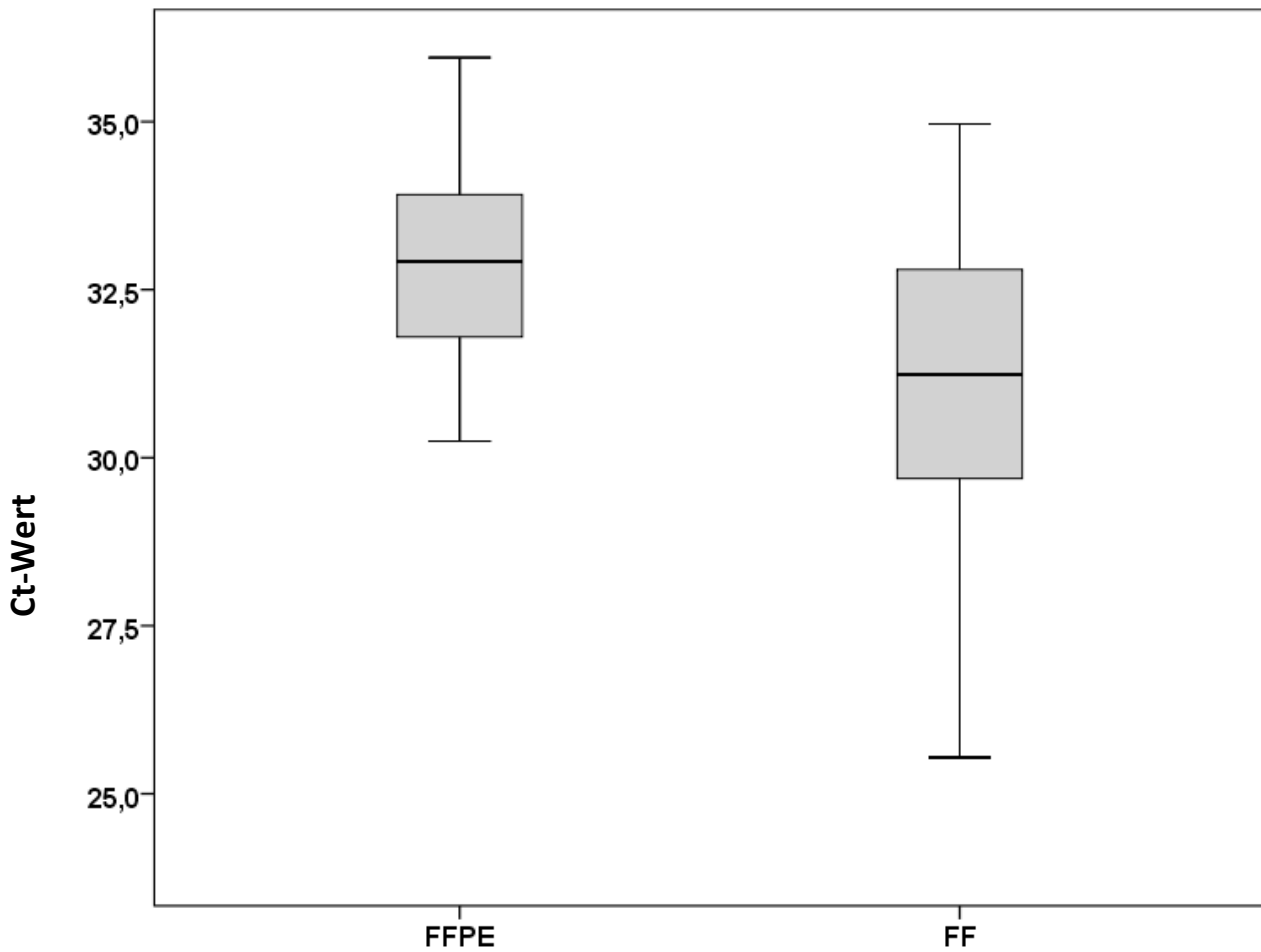


Abbildung 9: cycle-threshold (SDF-1) im Vergleich (FFPE vs. FF)

4.2.2 Gelelektrophorese

Zur Bildung von Polymeren aus PCR-Primern bzw. Sonden und somit weiteren sichtbaren Banden kam es nicht.

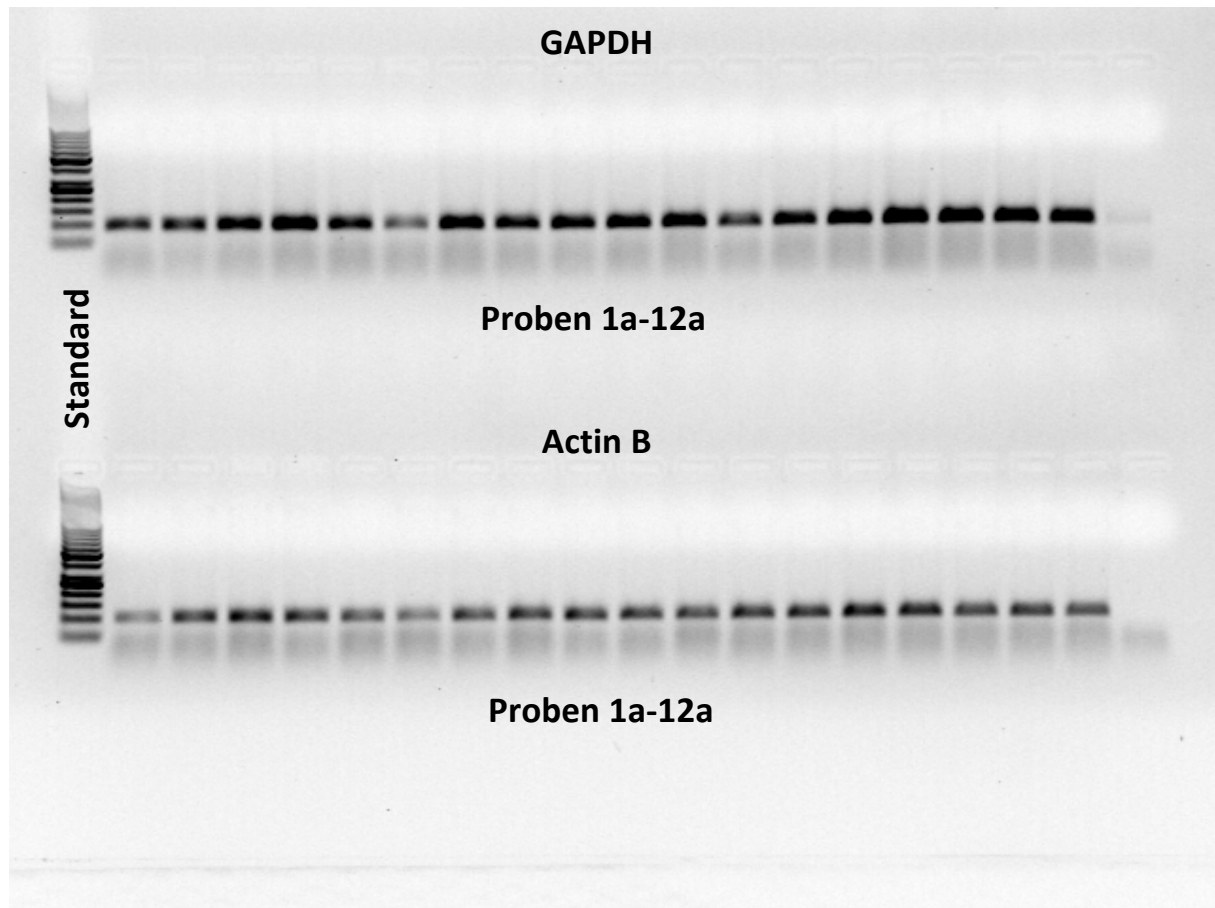


Abbildung 10: Gelelektrophorese der amplifizierten DNA (Proben 1a-12a; FFPE-Präparate)

4.2.3 Relative Expression von CXCR4 in FF-Präparaten

Die relative Expression von CXCR4 lag bei den Patienten zwischen 2,61 und 8,81 (Median 5,08, Range 6,20). Die Patienten wurden in drei Gruppen unterteilt: Eine Gruppe mit einer relativen Expression <4 , im Weiteren „CXCR4 low“ genannt, eine Gruppe mit einer relativen Expression von 4-6, im Weiteren „CXCR4 medium“ genannt und eine Gruppe mit einer relativen Expression >6 , im Weiteren „CXCR4 high“ genannt.

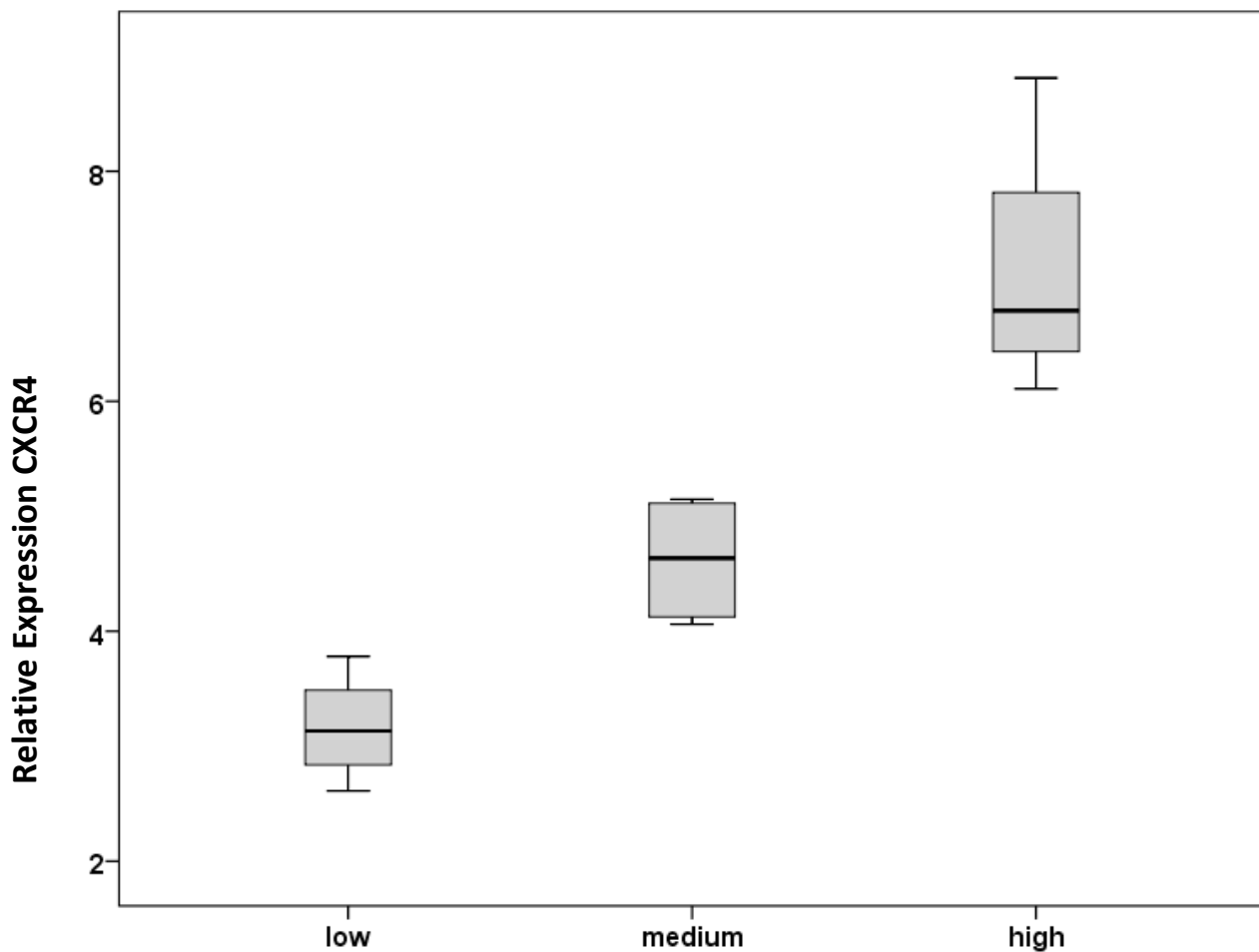


Abbildung 11: Subgruppen CXCR4 low, medium, high (FF-Präparate)

	"CXCR4 low" rel. Expression<4 n=4	"CXCR4 medium" rel. Expression 4-6 n=5	"CXCR4 high" rel. Expression>6 n=4	p
Alter (Jahre), Mittelwert(range)	68;70(61-71)	70;69(59-85)	70;69(56-80)	n.s.
Kardio-/Zerebrovaskuläre Vorerkrankungen				
Hirnfarkt	0(0%)	1(20%)	2(50%)	n.s.
TIA	1(25%)	1(20%)	2(50%)	n.s.
Carotis TEA/PTA	0(0%)	1(20%)	0(0%)	n.s.
KHK	1(25%)	1(20%)	2(50%)	n.s.
AMI, PTCA/stenting, Bypass	1(25%)	1(20%)	2(50%)	n.s.
Angina pectoris	-	-	-	
VHF	1(25%)	0(0%)	1(25%)	n.s.
Herzklappendefekte	1(25%)	0(0%)	0(0%)	n.s.
pAVK	3(75%)	2(40%)	1(25%)	n.s.
Bypass, PTA	3(75%)	0(0%)	1(25%)	p=0,048
Stenosegrad der ACI (%)				
70-80	1(25%)	0(0%)	2(50%)	n.s.
80-90	3(75%)	2(40%)	1(25%)	n.s.
>90	0(0%)	3(60%)	1(25%)	n.s.
symptomatische ACI-Stenosen	1(25%)	1(20%)	3(75%)	n.s.
asymptomatische ACI-Stenosen	3(75%)	4(80%)	1(25%)	n.s.
Allgemeine vaskuläre Risikofaktoren				
Hypertonie	3(75%)	4(80%)	4(100%)	n.s.
Diabetes mellitus	2(50%)	0(0%)	1(25%)	n.s.
Raucher	2(50%)	4(80%)	2(50%)	n.s.
Andere relevante Vorerkrankungen				
Neoplasien	1(25%)	1(20%)	1(25%)	n.s.
Nephropathien	0(0%)	1(20%)	1(25%)	n.s.

akute Infekte	1(25%)	0(0%)	0(0%)	n.s.
Familienanamnese				
Eltern Myokard-/Hirnininfarkt	2(50%)	2(40%)	1(25%)	n.s.
Geschwister Myokard-/Hirnininfarkt	1(25%)	1(20%)	2(50%)	n.s.
Medikamente				
Statine	3(75%)	5(100%)	2(50%)	n.s.
β-Rezeptorenblocker	4(100%)	3(60%)	3(75%)	n.s.
ACE-Hemmer	2(50%)	2(40%)	1(25%)	n.s.
Diuretika	1(25%)	1(20%)	2(50%)	n.s.
Thrombozytenaggregationshemmer	4(100%)	5(100%)	3(75%)	n.s.
Sartane	1(25%)	0(0%)	2(50%)	n.s.
Körpermaße				
Größe (m), Mittelwert(range)	1,71;1,73(1,57-1,79)	1,70;1,68(1,60-1,78)	1,72;1,69(1,66-1,82)	n.s.
Gewicht (kg), Mittelwert(range)	81;85(63-90)	75;76(60-94)	71;68(58-89)	n.s.
BMI (kg/m ²), Mittelwert (range)	28,2;27,8(25,6-31,5)	25,8;26,5(21,3-29,7)	23,8;23,7(21,0-26,9)	n.s.

AMI = Akuter Myokardinfarkt, TIA = Transitorische ischämische Attacke, TEA = Thrombendarteriektomie, PTA = Perkutane transluminale Angioplastie, PTCA = Perkutane transluminale Coronarangioplastie, KHK = Koronare Herzerkrankung, VHF = Vorhofflimmern, pAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit, ACI = Arteria carotis interna, ACE-Hemmer = Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer, BMI = Body-mass-Index
Angaben jeweils Mittelwert;Median(range)

Tabelle 4: Patientenkollektiv „CXCR4 low“, „CXCR4 medium“ und „CXCR4 high“

4.2.4 Gruppenvergleich „CXCR4 low“ vs. „CXCR4 medium“ vs. „CXCR4 high“

CRP präoperativ

Bei der Bestimmung des CRP vor dem operativen Eingriff („prä“) war der Median in der Gruppe „CXCR4 high“ (Median 0,28 mg/dl; Range 0,33 mg/dl) deutlich niedriger als in den Gruppen „CXCR4 low“ (Median 0,44 mg/dl; Range 1,92 mg/dl) und „CXCR4 medium“ (Median 0,52 mg/dl; Range 1,19 mg/dl). Eine Signifikanz ergab sich bei einem $p=0,34$ bzw. $p=0,56$ jedoch nicht.

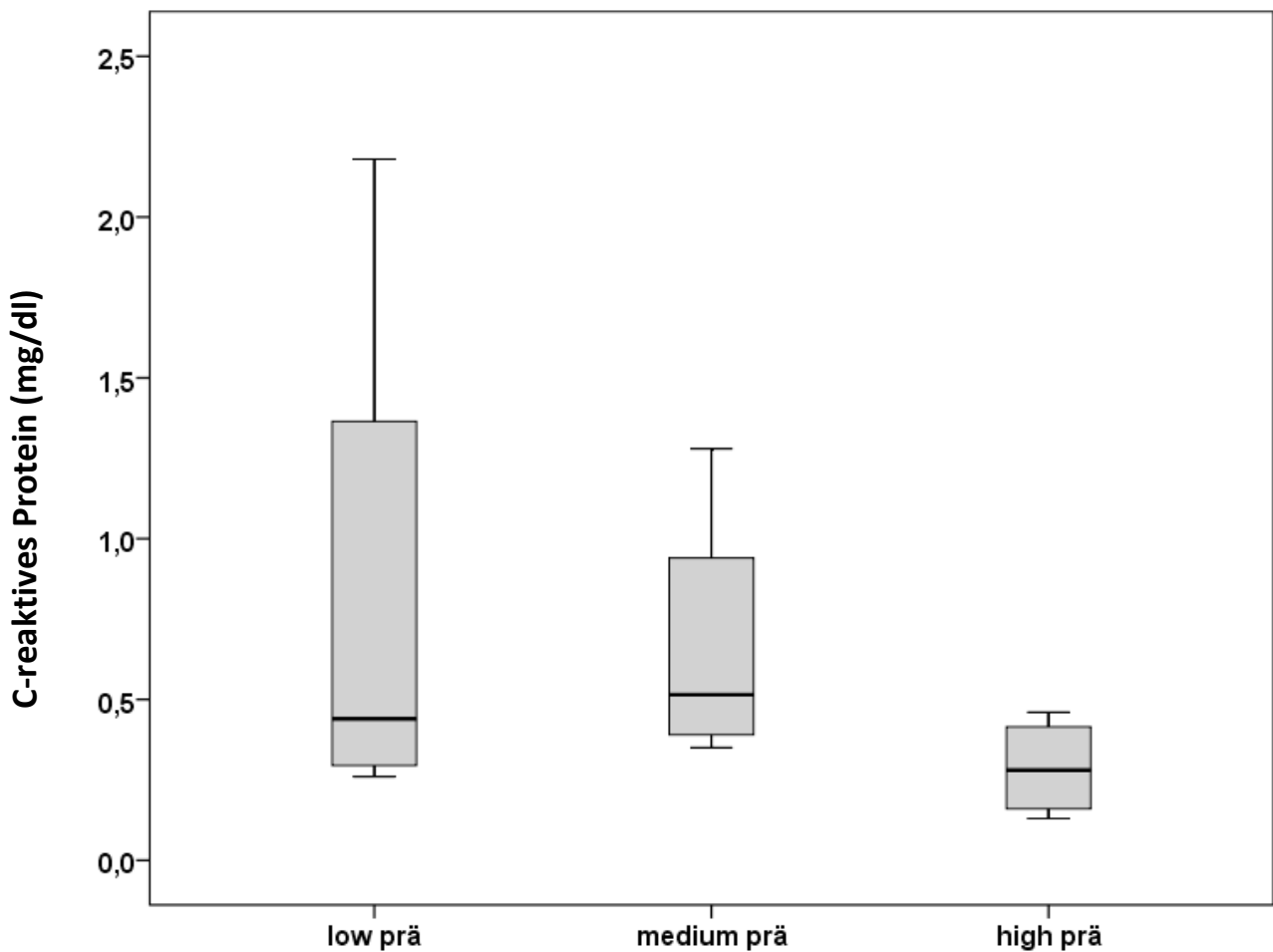


Abbildung 12: Präoperative CRP-Konzentration im Gruppenvergleich (CXCR4; FF-Präparate)

CRP postoperativ

Postoperativ unterschieden sich die Serumkonzentrationen des CRP in den Gruppen „CXCR4 low“ (Median 2,02 mg/dl; Range 1,11 mg/dl) und „CXCR4 medium“ (Median 2,11 mg/dl, Range 1,05 mg/dl) bei $p=0,95$ nicht signifikant. Auch der Vergleich der Gruppe „CXCR4 high“ (Median 2,70 mg/dl; Range 1,51 mg/dl) mit den Gruppen „CXCR4 low“ bzw. „CXCR4 medium“ ergab bei $p=0,69$ bzw. $p=0,41$ keine Signifikanz.

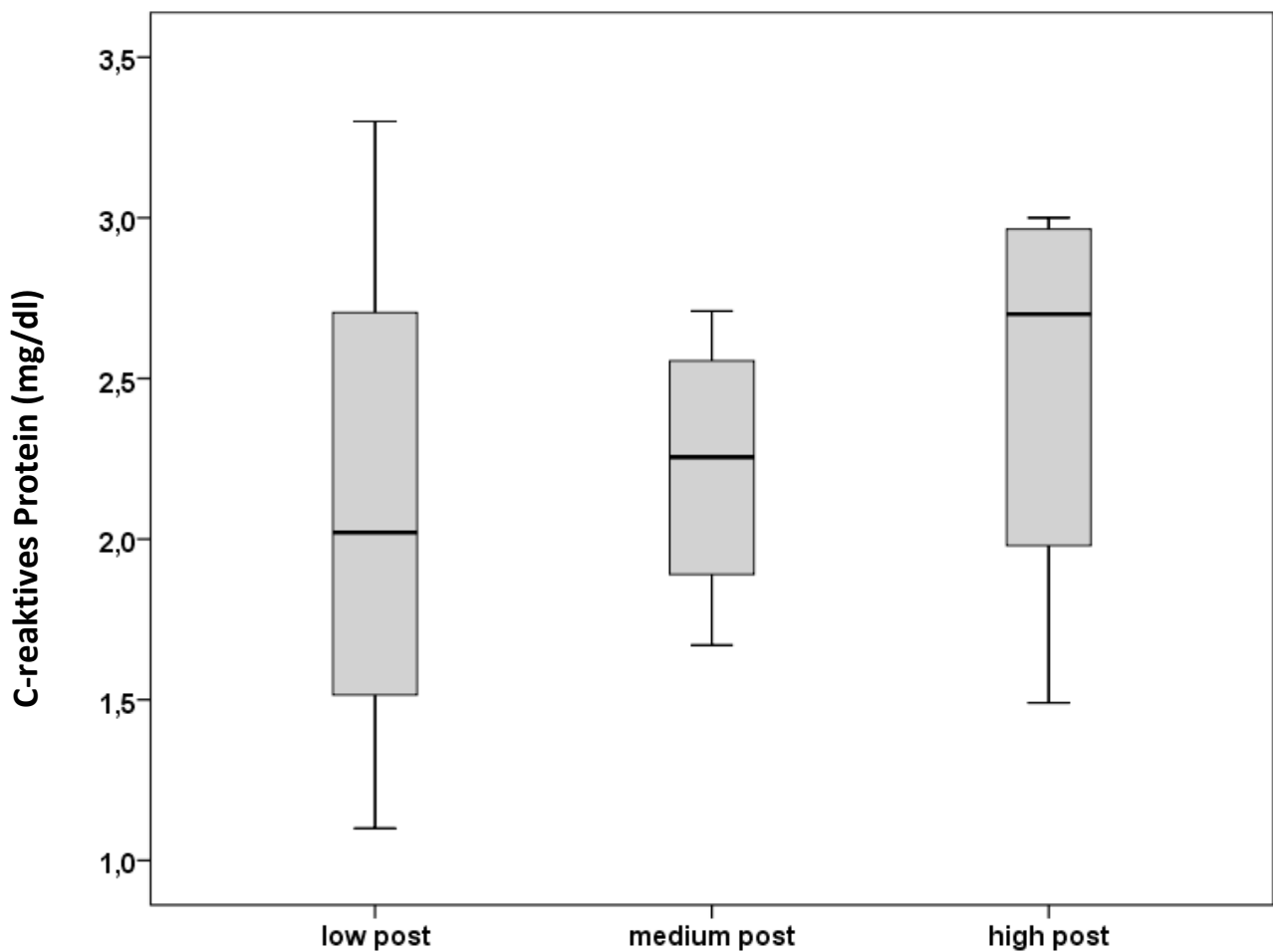


Abbildung 13: Postoperative CRP-Konzentration im Gruppenvergleich (CXCR4; FF-Präparate)

CRP follow-up

Zwei Monate nach dem operativen Eingriff ergab die Messung des CRP in den Gruppen „CXCR4 medium“ (Median 0,28 mg/dl; Range 0,35 mg/dl) und „CXCR4 high“ (Median 0,12 mg/dl; Range 0,14) deutlich niedrigere Werte als in der Gruppe „CXCR4 low“ (Median 1,82 mg/dl; Range 2,06). Diese Erniedrigung ist trotz eines erkennbarem Trends bei $p=0,057$ bzw. $p=0,063$ nicht signifikant. Auch bei Vergleich der Gruppen „CXCR4 medium“ und „CXCR4 high“ war keine Signifikanz nachweisbar ($p=0,32$).

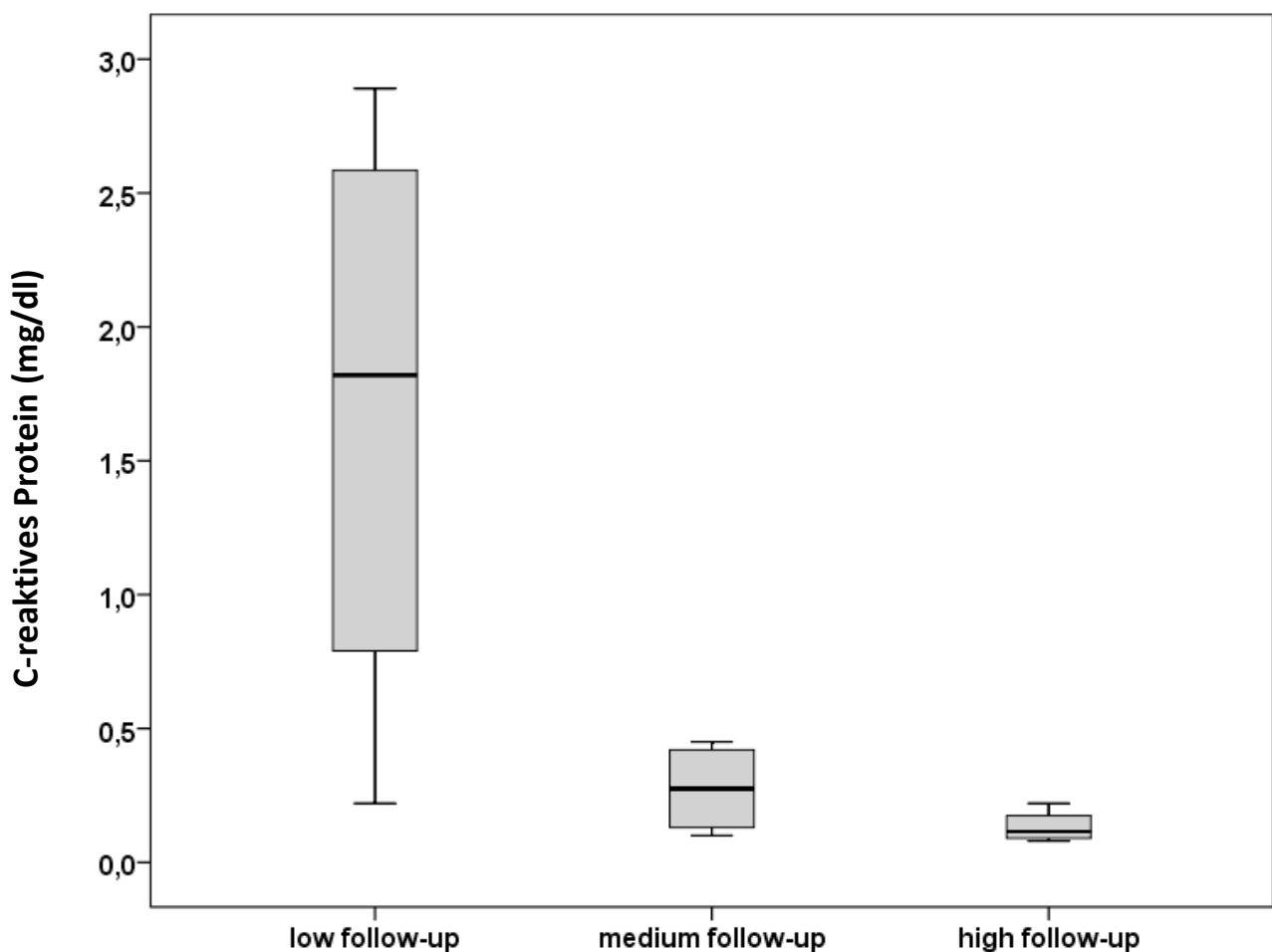


Abbildung 14: CRP-Konzentration bei follow-up im Gruppenvergleich (CXCR4; FF-Präparate)

Fibrinogen präoperativ

Die Fibrinogenkonzentration unterschied sich in den Gruppen „CXCR4 low“ und „CXCR4 medium“ (Median 366 mg/dl vs. 343 mg/dl; Range 200 mg/dl vs. 152 mg/dl) nicht signifikant ($p=0,91$). Die Gruppe „CXCR4 high“ (Median 280 mg/dl; Range 115 mg/dl) unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von den Gruppen „CXCR4 low“ ($p=0,49$) bzw. „CXCR4 medium“ ($p=0,56$).

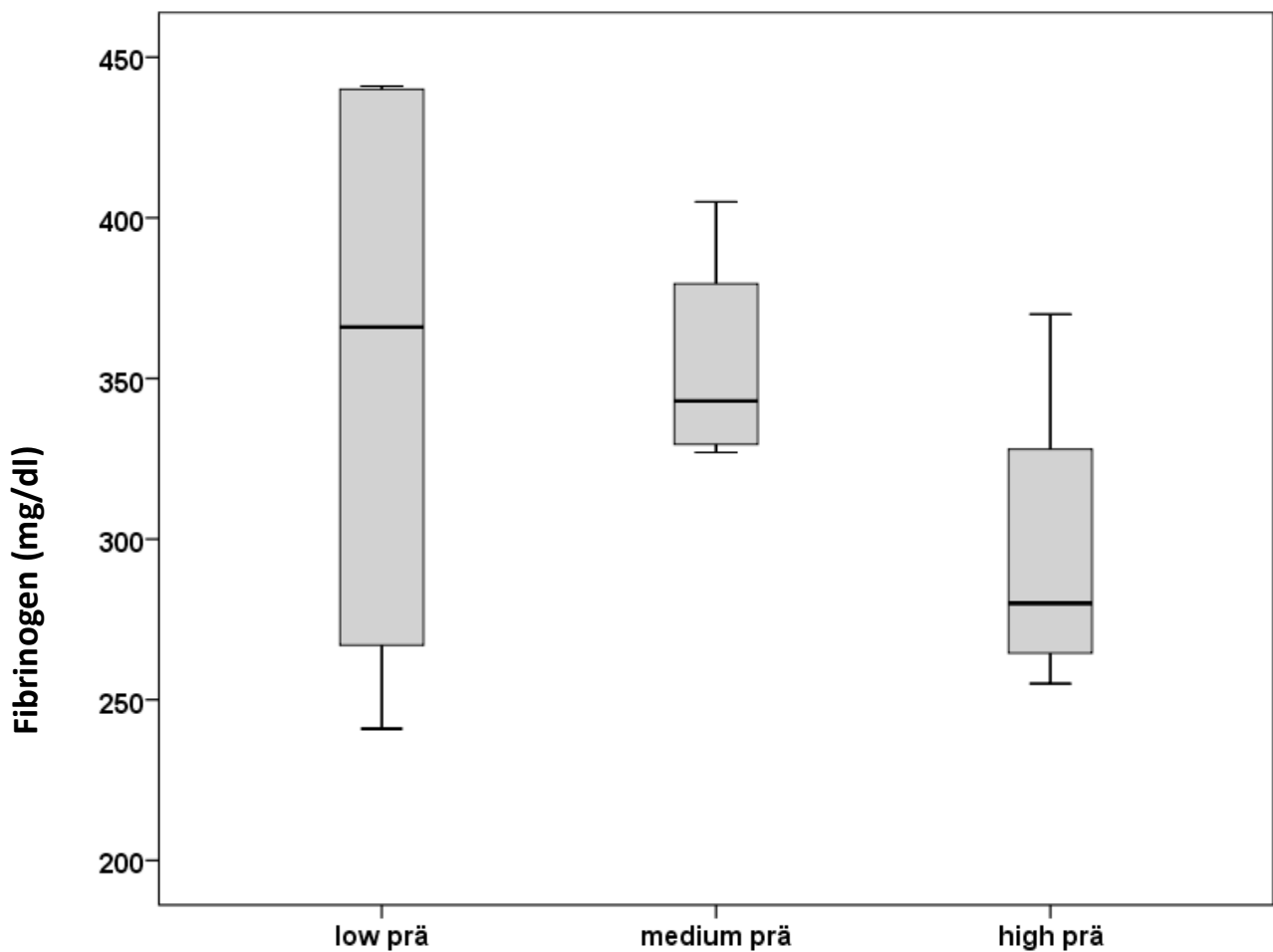


Abbildung 15: Präoperative Fibrinogenkonzentration im Gruppenvergleich (CXCR4; FF-Präparate)

Fibrinogen postoperativ

Die postoperative Erhöhung des Fibrinogen in der Gruppe „CXCR4 medium“ (Median 395 mg/dl; Range 193 mg/dl) im Vergleich zu den Gruppen „CXCR4 low“ (Median 350 mg/dl; Range 141 mg/dl) und „CXCR4 high“ (Median 378 mg/dl; Range 108 mg/dl) erwies sich bei $p=0,73$ bzw. $p=0,96$ als nicht signifikant. Auch bei Vergleich der Gruppen „CXCR4 low“ und „CXCR4 high“ ergab sich keine Signifikanz ($p=0,89$).

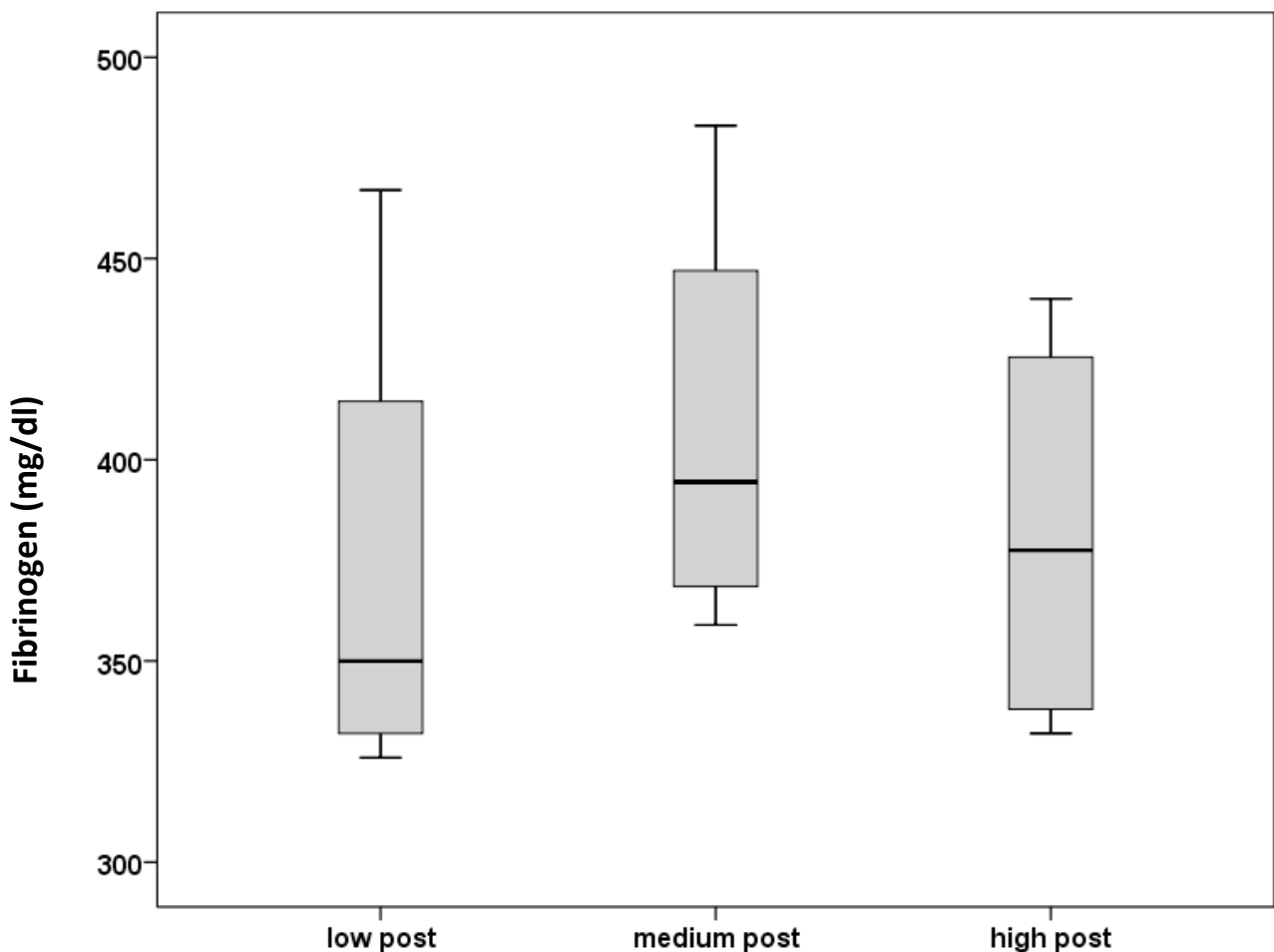


Abbildung 16: Postoperative Fibrinogenkonzentration im Gruppenvergleich (CXCR4; FF-Präparate)

Fibrinogen follow-up

Die Erniedrigung der Fibrinogenkonzentration zwei Monate nach dem operativen Eingriff in der Gruppe „CXCR4 medium“ (Median 276 mg/dl; Range 81 mg/dl) verglichen mit den Gruppen „CXCR4 low“ (Median 354 mg/dl, Range 159 mg/dl) und „CXCR4 high“ (Median 327 mg/dl; Range 193 mg/dl) ergab bei $p=0,063$ keine Signifikanz. Der Vergleich der Gruppen „CXCR4 low“ und „CXCR4 high“ ergab ebenfalls keine Signifikanz ($p=0,89$).

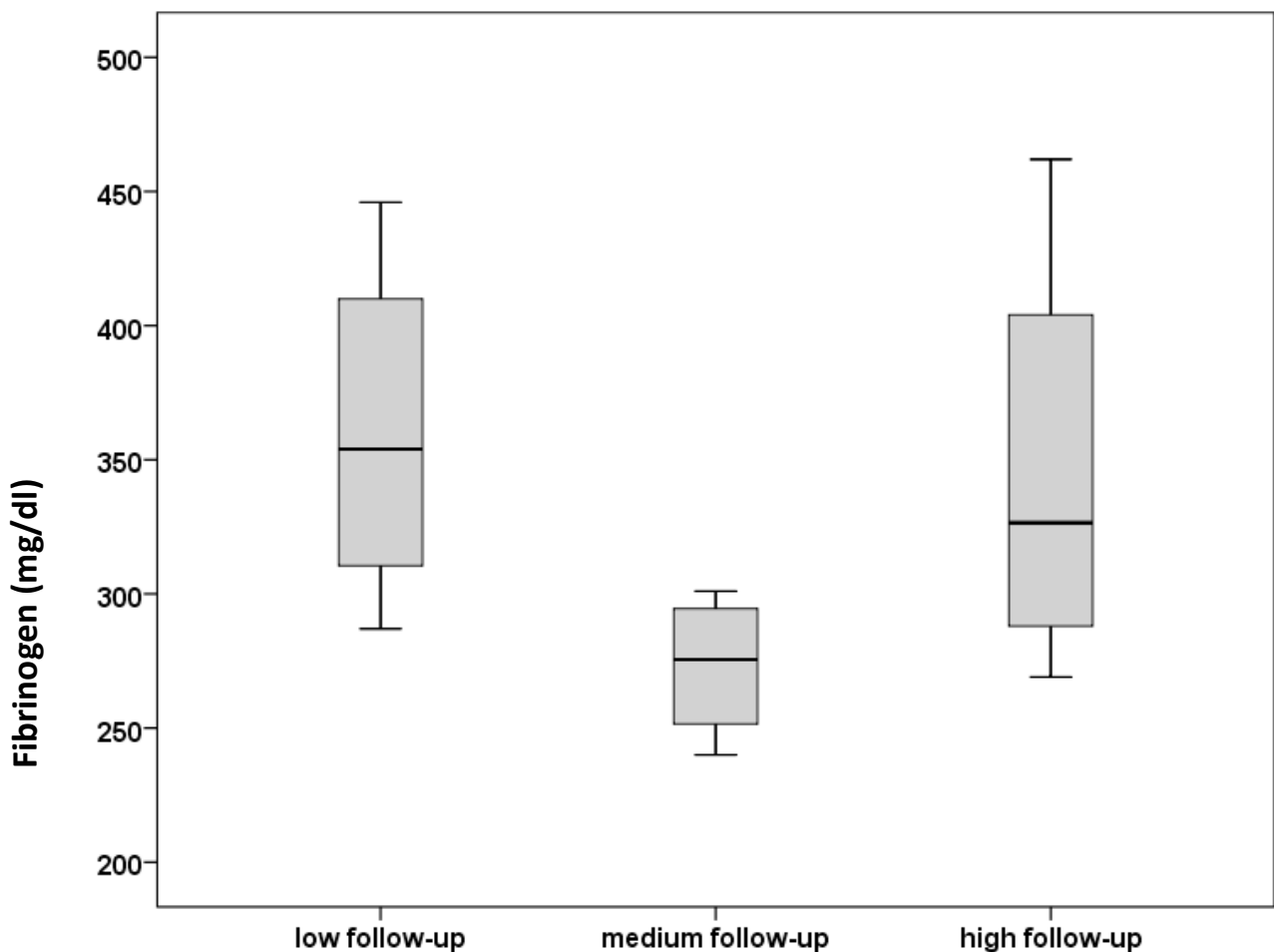


Abbildung 17: Fibrinogenkonzentration bei follow-up im Gruppenvergleich (CXCR4; FF-Präparate)

4.2.5 Relative Expression von SDF-1 in FF-Präparaten

Die relative Expression von SDF-1 lag bei den Patienten zwischen 3,20 und 9,40 (Median 3,81; Range 6,20). Die Patienten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: Eine Gruppe mit einer relativen Expression von SDF-1 <5 , im Weiteren als „SDF-1 low“ bezeichnet und eine Gruppe mit einer relativen Expression von SDF-1 >5 , im Weiteren als „SDF-1 high“ bezeichnet.

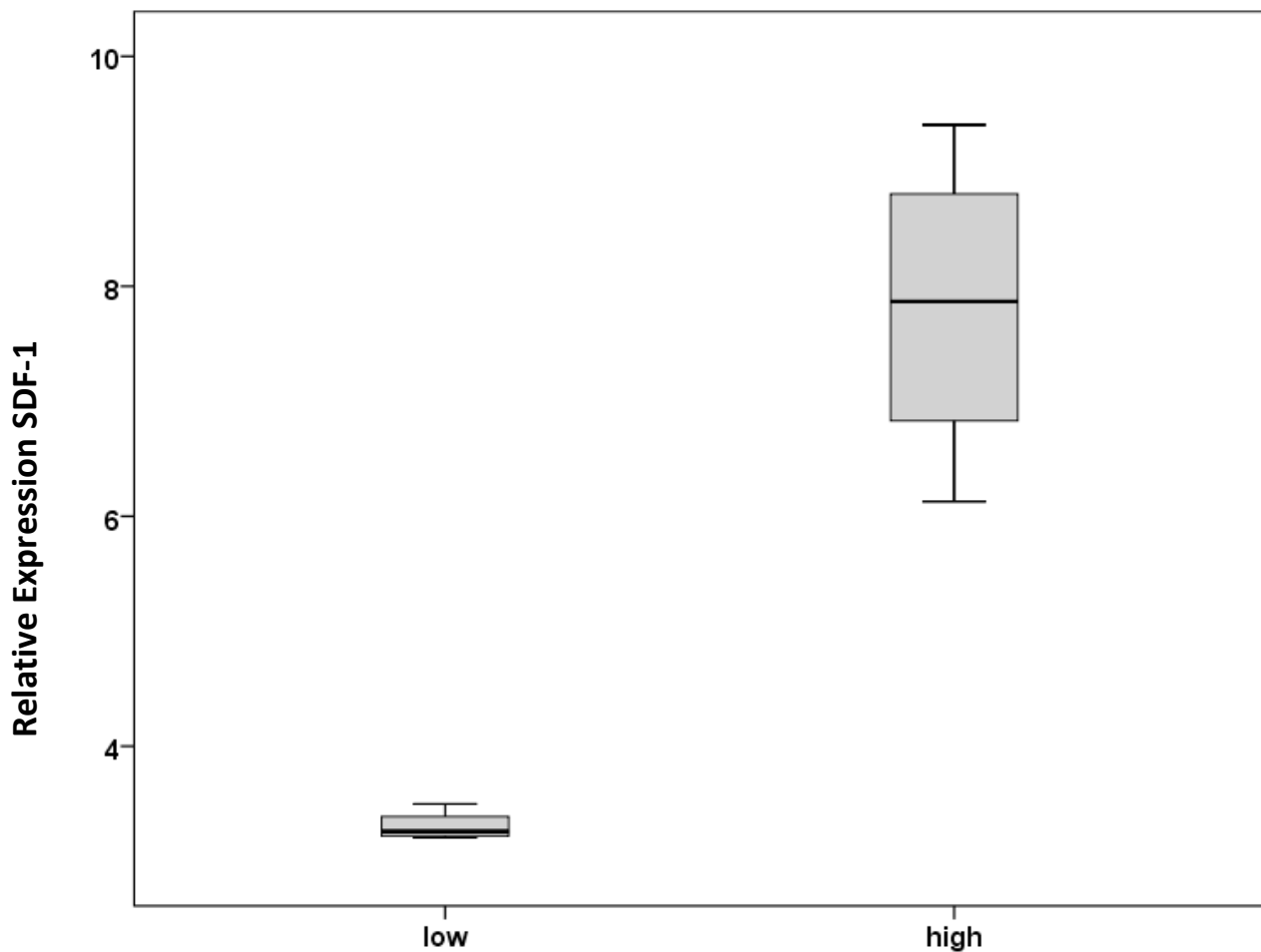


Abbildung 18: Subgruppen SDF-1 low und high (FF-Präparate)

	"SDF-1 low" rel. Expression<5 n=9	"SDF-1 high" rel. Expression>5 n=4	p
Alter (Jahre), Mittelwert(range)	72;71(59-85)	63;63(56-69)	p=0,029
Kardio-/Zerebrovaskuläre Vorerkrankungen			
Hirnfarkt	1(11%)	2(50%)	n.s.
TIA	3(33%)	1(25%)	n.s.
Carotis TEA/PTA	1(11%)	0(0%)	n.s.
KHK	3(33%)	1(25%)	n.s.
AMI, PTCA/stenting, Bypass	3(33%)	1(25%)	n.s.
Angina pectoris	-	-	
VHF	2(22%)	0(0%)	n.s.
Herzklappendefekte	1(11%)	0(0%)	n.s.
pAVK	4(44%)	2(50%)	n.s.
Bypass, PTA	3(33%)	1(25%)	n.s.
Stenosegrad der ACI (%)			
70-80	2(22%)	1(25%)	n.s.
80-90	5(56%)	1(25%)	n.s.
>90	2(22%)	2(50%)	n.s.
symptomatische ACI-Stenosen	3(33%)	2(50%)	n.s.
asymptomatische ACI-Stenosen	6(67%)	2(50%)	n.s.
Allgemeine vaskuläre Risikofaktoren			
Hypertonie	8(89%)	3(75%)	n.s.
Diabetes mellitus	2(22%)	1(25%)	n.s.
Raucher	6(67%)	2(50%)	n.s.
Andere relevante Vorerkrankungen			
Neoplasien	2(22%)	1(25%)	n.s.
Nephropathien	2(22%)	0(0%)	n.s.

akute Infekte	1(11%)	0(0%)	n.s.
Familienanamnese			
Eltern Myokard-/Hirnininfarkt	4(44%)	1(25%)	n.s.
Geschwister Myokard-/Hirnininfarkt	3(33%)	1(25%)	n.s.
Medikamente			
Statine	6(67%)	4(100%)	n.s.
β-Rezeptorenblocker	7(78%)	3(75%)	n.s.
ACE-Hemmer	5(56%)	0(0%)	n.s.
Diuretika	4(44%)	0(0%)	n.s.
Thrombozytenaggregationshemmer	8(89%)	4(100%)	n.s.
Sartane	2(22%)	1(25%)	n.s.
Körpermaße			
Größe (m), Mittelwert(range)	1,69;1,68(1,57-1,82)	1,75;1,78(1,66-1,79)	n.s.
Gewicht (kg), Mittelwert(range)	74;76(58-90)	79;82(59-94)	n.s.
BMI (kg/m ²), Mittelwert (range)	25,8;26,0(21,0-31,5)	26,2;26,9(21,4-29,7)	n.s.

AMI = Akuter Myokardinfarkt, TIA = Transitorische ischämische Attacke, TEA = Thrombendarteriektomie, PTA = Perkutane transluminale Angioplastie, PTCA = Perkutane transluminale Coronarangioplastie, KHK = Koronare Herzerkrankung, VHF = Vorhofflimmern, pAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit, ACI = Arteria carotis interna, ACE-Hemmer = Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer, BMI = Body-mass-Index
Angaben jeweils Mittelwert;Median(range)

Tabelle 5: Patientenkollektiv „SDF-1 low“ und „SDF-1 high“

4.2.6 Gruppenvergleich „SDF-1 low“ vs. „SDF-1 high“

CRP präoperativ

Der Unterschied der präoperativ gemessenen Werte des CRP zwischen den Gruppen „SDF-1 low“ (Median 0,40 mg/dl; Range 2,09 mg/dl) und „SDF-1 high“ (Median 0,46 mg/dl; Range 0,25 mg/dl) erwies sich als nicht signifikant ($p=0,41$).

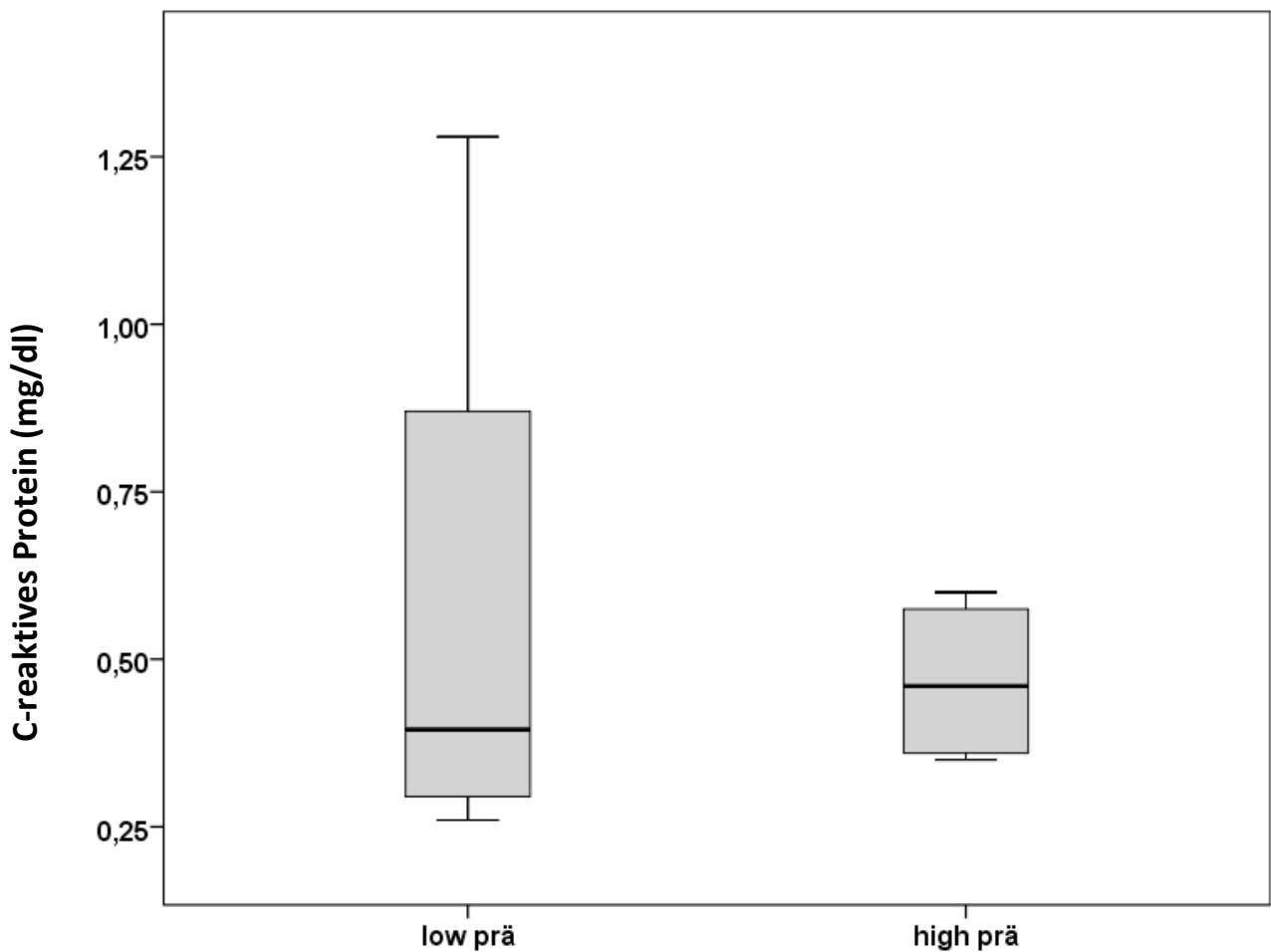


Abbildung 19: Präoperative CRP-Konzentration im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

CRP postoperativ

Auch in der postoperativen Messung des CRP ergab sich kein signifikanter ($p=0,85$) Unterschied zwischen den Gruppen „SDF-1 low“ (Median 1,89 mg/dl; Range 2,20 mg/dl) und „SDF-1 high“ (Median 2,18 mg/dl; Range 0,78 mg/dl).

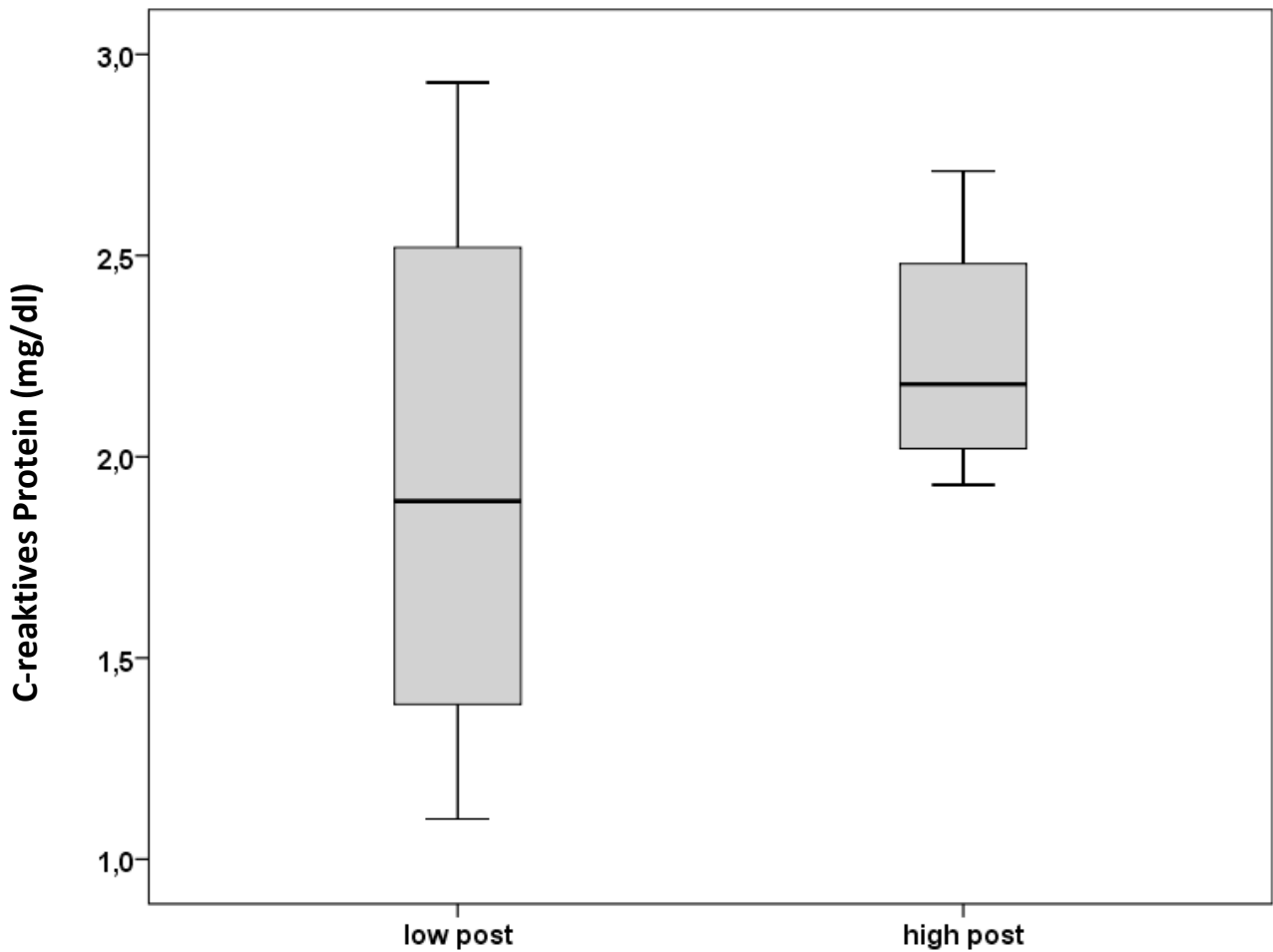


Abbildung 20: Postoperative CRP-Konzentration im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

CRP follow-up

Zwei Monate nach dem operativen Eingriff ergab sich kein signifikanter ($p=0,31$) Unterschied zwischen den Gruppen „SDF-1 low“ (Median 0,22 mg/dl; Range 0,78 mg/dl) und „SDF-1 high“ (Median 0,39 mg/dl; Range 0,29 mg/dl).

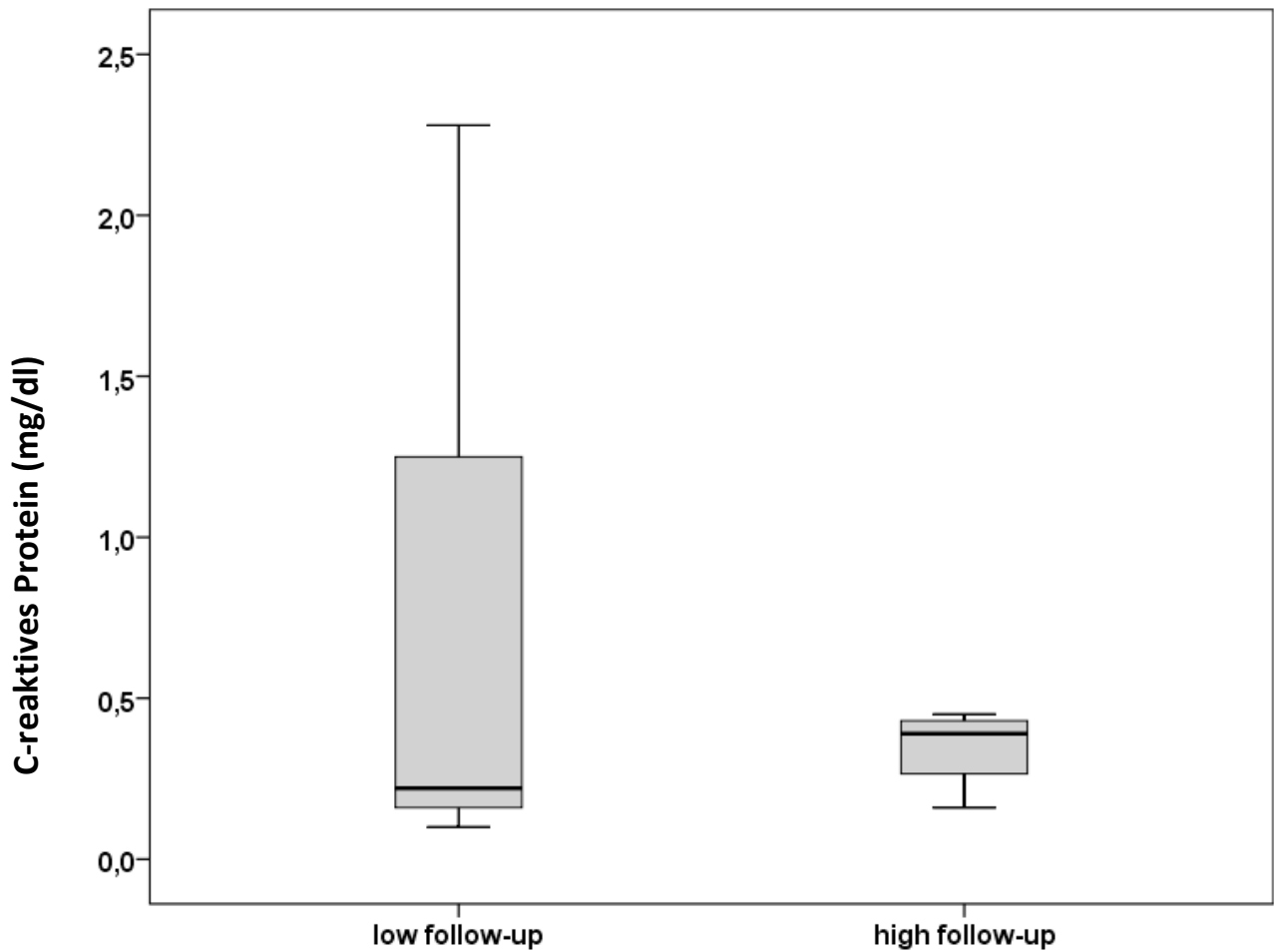


Abbildung 21: CRP-Konzentration bei follow-up im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

Fibrinogen präoperativ

Die Ergebnisse der präoperativen Fibrinogenbestimmung zwischen den Gruppen „SDF-1 low“ (Median 362 mg/dl, Range 200 mg/dl) und „SDF-1 high“ (Median 312 mg/dl; Range 150 mg/dl) unterschieden sich bei $p=1,00$ nicht.

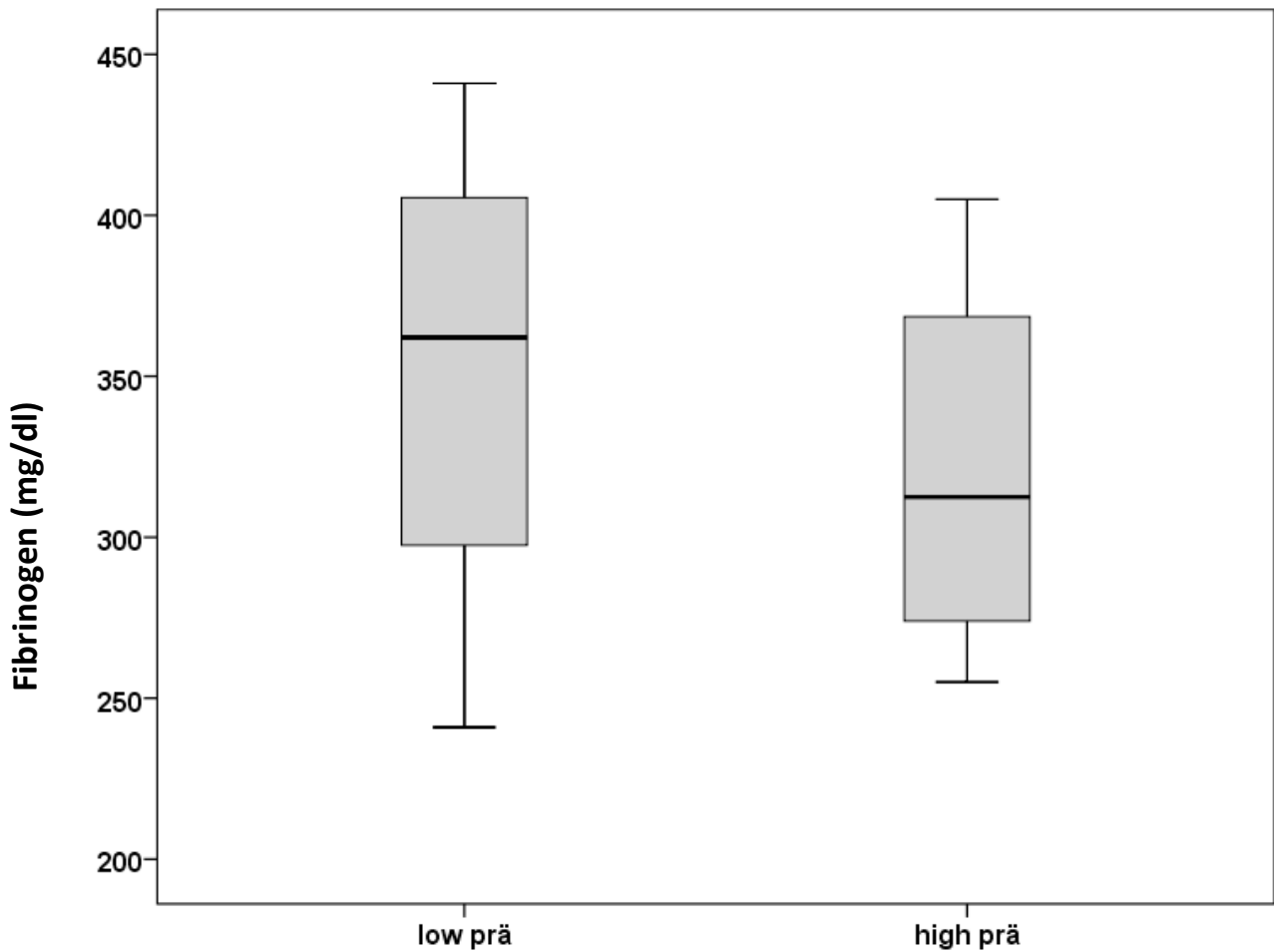


Abbildung 22: Präoperative Fibrinogenkonzentration im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

Fibrinogen postoperativ

Auch unmittelbar nach dem operativen Eingriff zeigte sich keine signifikante ($p=0,43$) Erhöhung oder Erniedrigung des Fibrinogenspiegels im Vergleich der Gruppen „SDF-1 low“ (Median 370 mg/dl; Range 193 mg/dl) und „SDF-1 high“ (Median 349 mg/dl; Range 79 mg/dl).

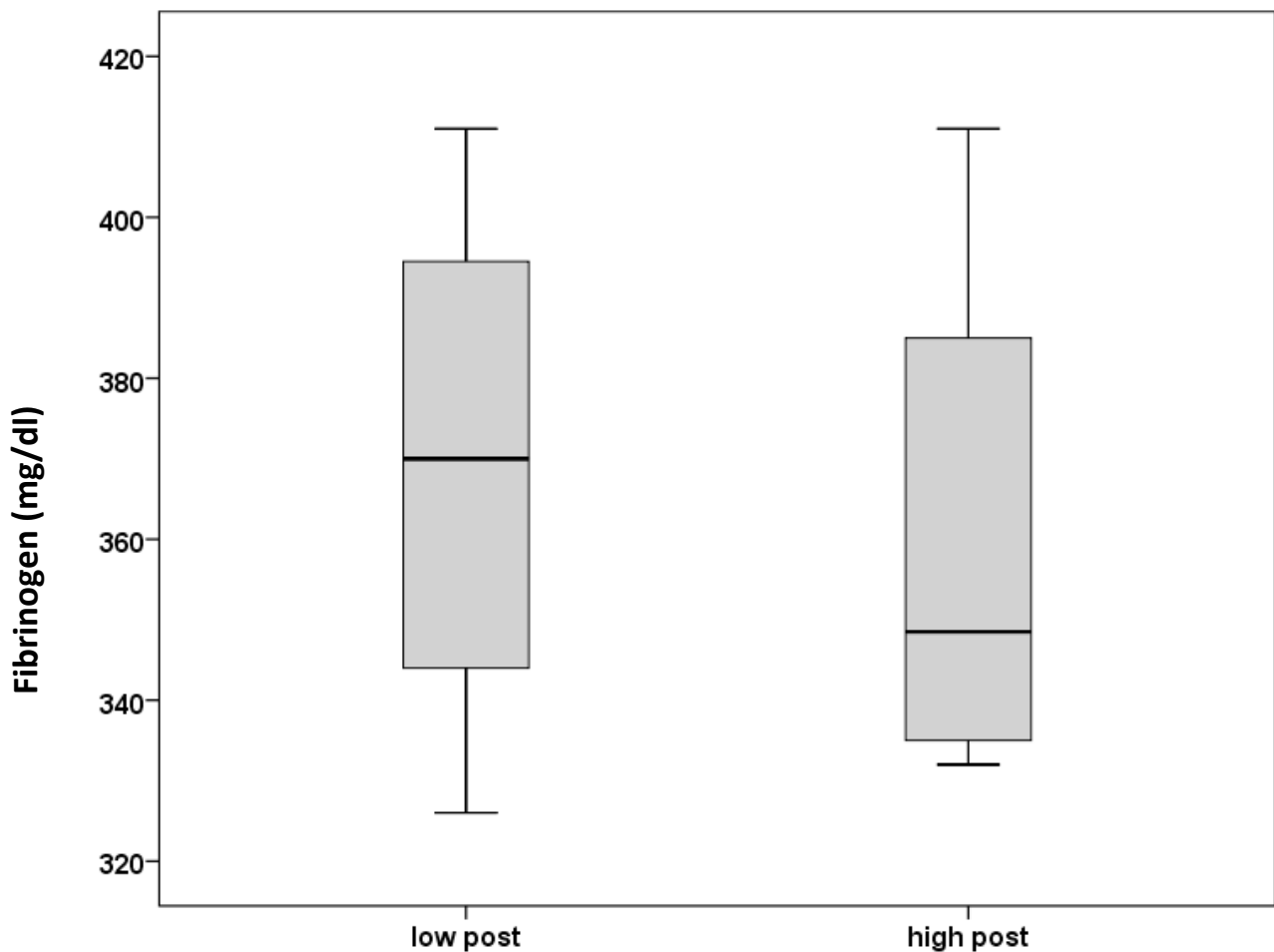


Abbildung 23: Postoperative Fibrinogenkonzentration im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

Fibrinogen follow-up

Die Erhöhung des Fibrinogens zwei Monate nach der Operation in der Gruppe „SDF-1 low“ (Median 367 mg/dl, Range 242 mg/dl) gegenüber der Gruppe „SDF-1 high“ (Median 285 mg/dl; Range 61 mg/dl) erwies sich ebenfalls als nicht signifikant ($p=0,60$).

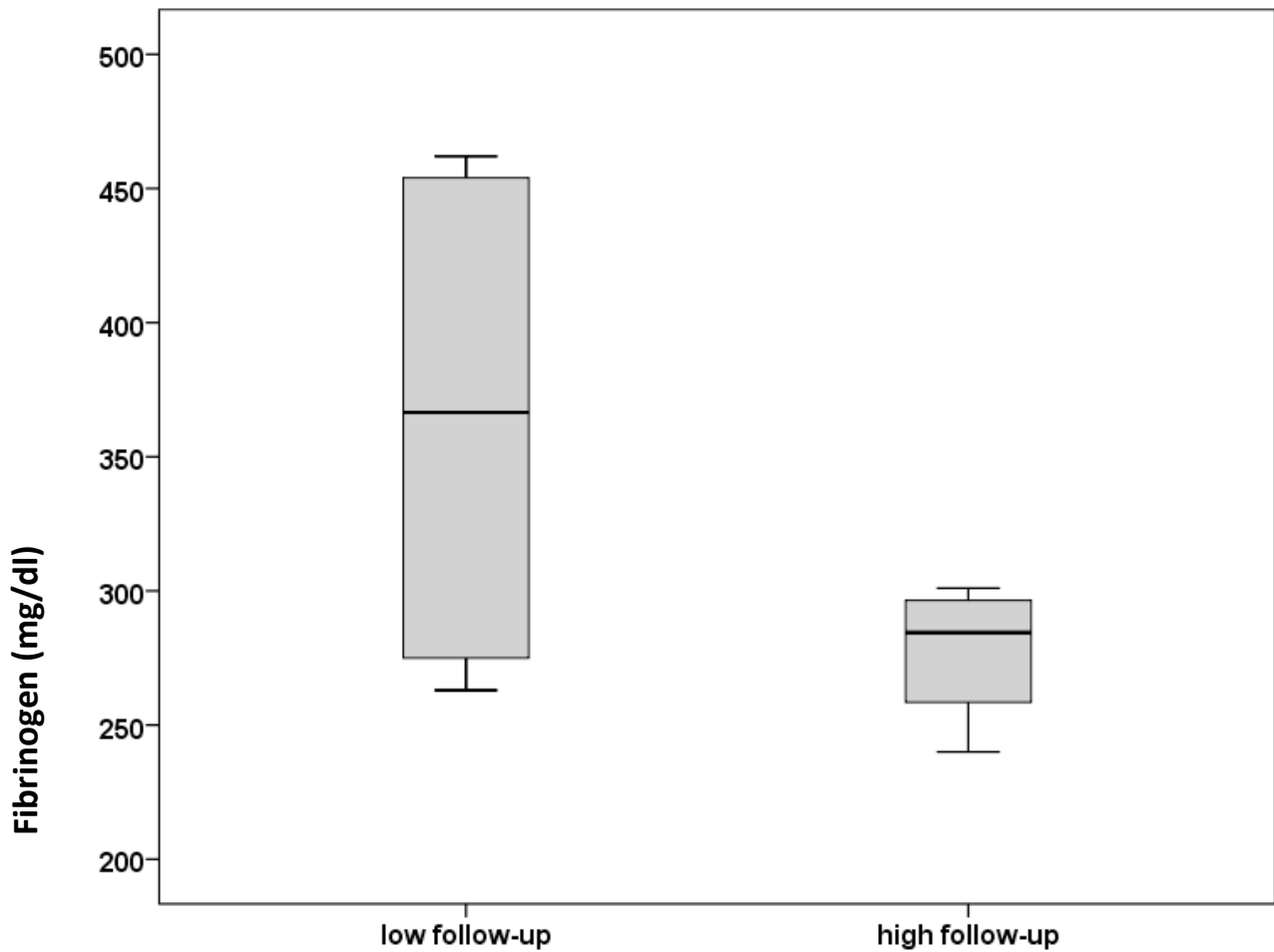


Abbildung 24: Fibrinogenkonzentration bei follow-up im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

4.3 CRP, Fibrinogen

hs-CRP

Die CRP-Werte unmittelbar vor („prä“, Median 0,37 mg/dl; Range 2,05 mg/dl) und nach („post“, Median 2,11 mg/dl; Range 2,20 mg/dl) dem operativen Eingriff unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$). Im weiteren Verlauf fiel das CRP wieder ab („follow up“, Median 0,19 mg/dl; Range 2,20 mg/dl). Dieser Abfall des CRP zwischen der Messung kurz nach der Operation und weitere 2 Monate später erwies sich ebenfalls als signifikant ($p < 0,001$). Die Werte der Messungen „prä“ und „follow-up“ unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,111$).

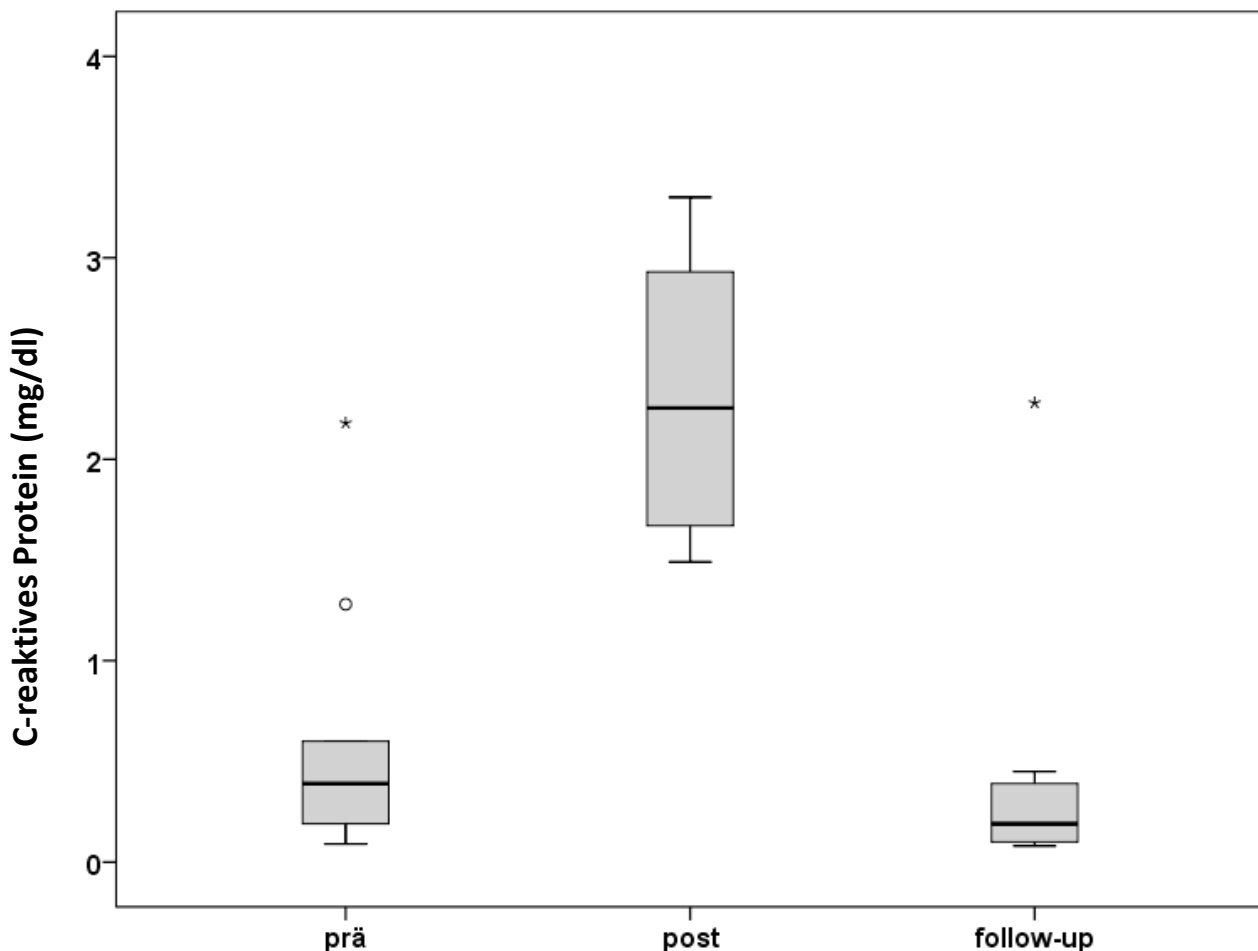


Abbildung 25: hs-CRP präoperativ, postoperativ und bei follow-up im Vergleich

Fibrinogen

Es kam zu einem Anstieg des Fibrinogens unmittelbar nach der Operation („prä“, Median 327 mg/dl, Range 200 mg/dl vs. „post“, Median 363 mg/dl, Range 193 mg/dl). Trotz eines erkennbaren Trends ergab sich keine Signifikanz ($p=0,052$). Die nach 2 Monaten gemessenen Werte („follow-up“, Median 288 mg/dl, Range 242 mg/dl) unterschieden sich signifikant ($p=0,009$) von denen der postoperativen Messung. Die Werte der Messungen „prä“ und „follow-up“ unterschieden sich nicht signifikant ($p=0,522$).

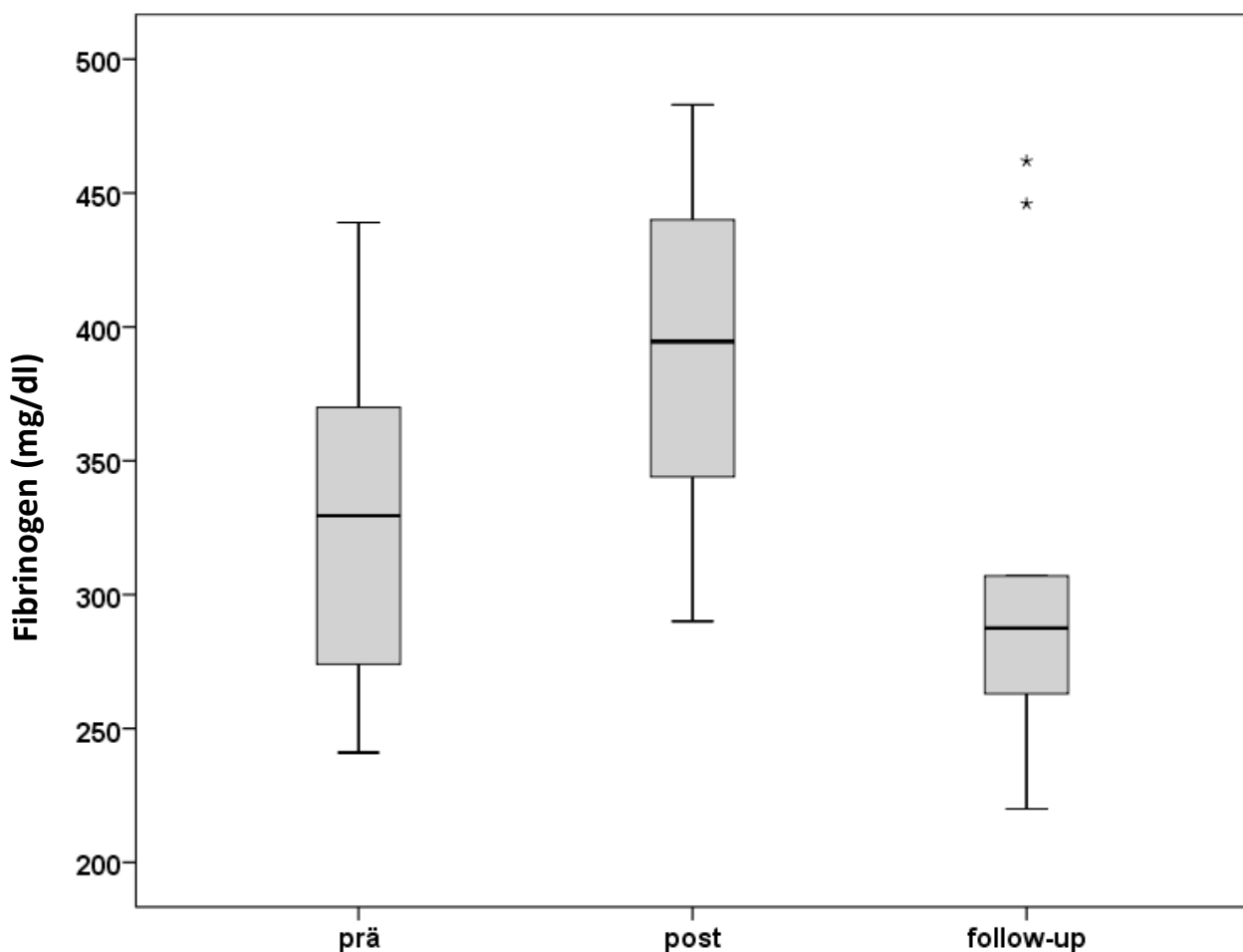


Abbildung 26: Fibrinogen präoperativ, postoperativ und bei follow-up im Vergleich

4.4 Zytokine

4.4.1 Interleukin 6

Der Anstieg von IL-6 zwischen den Messungen „prä“ (Median 2,54 pg/ml; Range 5,06 pg/ml) und „post“ (Median 4,99 pg/ml; Range 16,16 pg/ml) erwies sich als nicht signifikant ($p=0,094$). Die anschließenden Ergebnisse der Messung nach 2 Monaten („follow-up“, Median 0,91 pg/ml; Range 1,94 pg/ml) fielen jedoch signifikant ($p=0,028$) niedriger aus. Der gemessene Abfall der Werte von „prä“ nach „follow-up“ ergab keine Signifikanz ($p=0,143$).

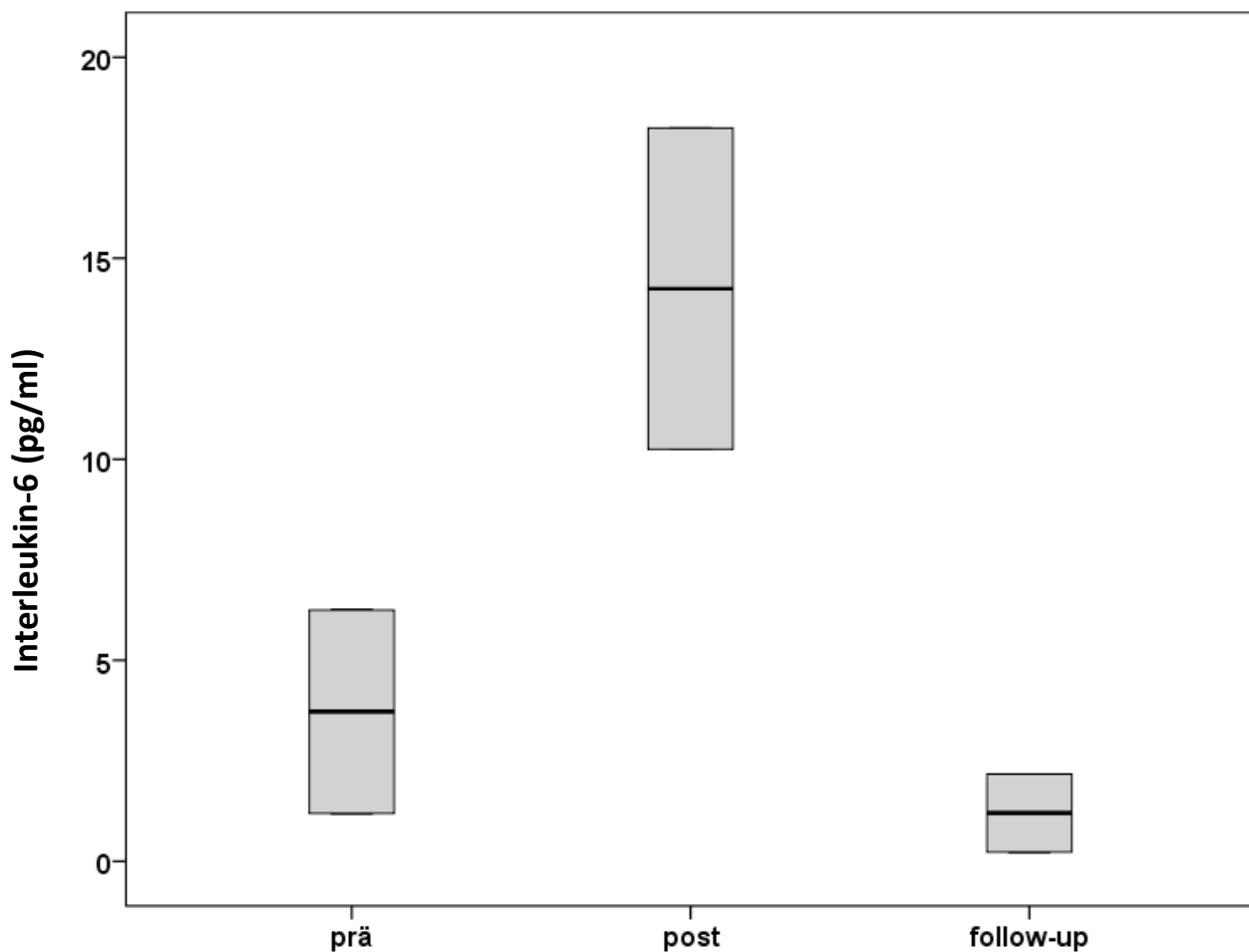


Abbildung 27: IL-6 präoperativ, postoperativ und bei follow-up im Vergleich

4.4.2 Interleukin 8

IL-8 stieg zwischen den Messungen „prä“ (Median 6,49 pg/ml; Range 23,37 pg/ml) und „post“ (Median 5,20 pg/ml; Range 16,17 pg/ml) nicht signifikant ($p=0,652$) an. Auch der anschließende Abfall der Werte von „post“ nach „follow-up“ (Median 5,94 pg/ml; Range 31,13 pg/ml) erwies sich als nicht signifikant ($p=0,552$). Der Vergleich zwischen den Messungen „prä“ und „follow-up“ ergab ebenfalls keine Signifikanz ($p=0,710$).

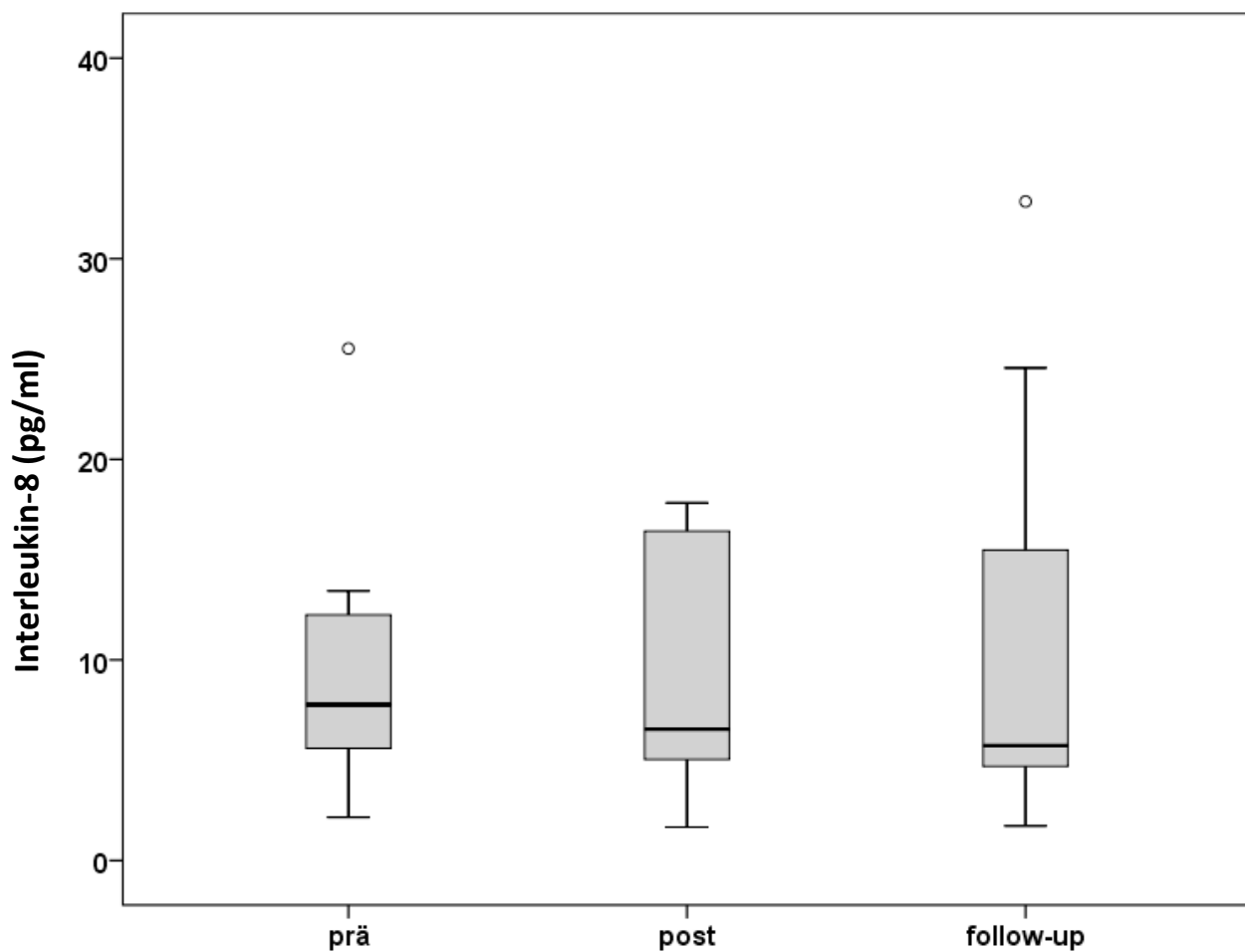


Abbildung 28: IL-8 präoperativ, postoperativ und bei follow-up im Vergleich

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Isolierung von RNA aus Formalin fixierten und in Paraffin gebetteten Präparaten (engl. formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE-Präparate) von Plaquematerial der Arteria carotis interna zuverlässig und reproduzierbar möglich ist. Sowohl die aus Gefrierpräparaten (engl. fresh frozen, FF-Präparate) wie auch die aus FFPE-Präparaten gewonnene RNA war für die Verwendung für die weiterführenden molekularbiologischen Verfahren der cDNA Synthese und anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geeignet. In der durchgeführten real-time PCR zeigten sich bei dem aus FFPE-Präparaten gewonnenen Material niedrigere Ct-Werte im Vergleich zu FF-Präparaten. Für drei von vier verwendeten Primer-Sequenzen erwies sich dieser Unterschied als signifikant, was auf eine niedrigere RNA-Konzentration des aus FFPE-Präparaten isolierten Materials hindeutet. Eine Assoziation zwischen der relativen Expression von CXCR4 bzw. SDF-1 und serologischen Biomarkern wie dem C-reaktiven Protein (CRP), dem Fibrinogen sowie den erhobenen klinischen Daten des Patientengutes bestand nicht.

5.2 RNA-Isolierung aus FF- und FFPE-Präparaten

(FFPE) Präparate stellen weltweit meist das Standardmaterial für Retrospektive Studien dar. Über Jahrzehnte hinweg wurden die bei chirurgischen Eingriffen gewonnenen Gewebeproben in Formalin fixiert und in Paraffin gebettet. Auf diese Art und Weise entstanden in Kliniken und Instituten weltweit umfassende Archive von teilweise seltenen Gewebeproben der jeweiligen chirurgischen Abteilungen. Diese archivierten Gewebe stellen eine wertvolle Quelle für retrospektive Studien dar. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen in dem geringen Aufwand des Anfertigen solcher Präparate, der einfachen Lagerung bei Raumtemperatur und der guten Eignung für histologische Schneide- und Färbeverfahren. Diese Arbeitsschritte sind erprobt und zuverlässig reproduzierbar. Das sofortige Einfrieren von operativ gewonnenen Gewebeproben hingegen wird routinemäßig nur selten durchgeführt. Die Anwendung von molekularbiologischen Verfahren gestaltet sich aufgrund

der Wechselwirkungen von Formalin mit Nukleinsäuren jedoch bei Verwendung von FFPE-Präparaten als schwieriger im Vergleich zu FF-Präparaten. Die erste erfolgreiche RNA-Extraktion aus FFPE-Präparaten wurde 1988 durch Rupp und Locker beschrieben [120]. Seitdem sind viele Protokolle entstanden und wurden immer weiter verbessert. Das grundsätzliche Problem bei diesem Verfahren blieb jedoch bestehen. Durch die streckenweise stattfindende Degradierung von RNA-Sequenzen steht der Extraktion weniger Ausgangsmaterial zur Verfügung [121]. Studien zeigten folglich eine deutlich niedrigere Ausbeute von DNA und RNA u.a. bei Extraktion aus FFPE-Präparaten der Ovarien, Brustdrüsengewebe und lymphatischem Gewebe [117, 122-124]. Doleshal et al. konnten zeigen, dass sogar nach über 10-jähriger Lagerung der Paraffinblöcke intakte RNA aus FFPE-Präparaten isoliert werden kann [125]. Für Gewebe von Plaques der Arteria carotis interna existierten entsprechende Ergebnisse jedoch noch nicht. Die vorliegende Studie konnte bestätigen, dass auch in diesem Fall aus FF-Präparaten eine deutlich größere Menge an Nukleinsäuren im Allgemeinen und RNA im Speziellen extrahiert werden kann. Gleichwohl ist festzustellen, dass auch die geringe Menge der aus FFPE-Präparaten isolierten RNA ausreichend ist, um diese für molekularbiologische Verfahren wie der cDNA-Synthese und der Polymerase-Kettenreaktion zu verwenden. Entscheidend für den Erfolg der Extrahierung scheint hierbei die Länge des amplifizierten RNA Fragments zu sein. Bei Sequenzen mit einer Länge von über 151 Basenpaaren war die Erfolgsrate für eine Amplifikation signifikant niedriger als bei Sequenzen mit einer Länge von unter 151 Basenpaaren [126]. Dies konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Auch hier lag die Ampliconlänge für alle verwendeten Sequenzen unter 151 Basenpaaren.

5.3 Serologische Biomarker vor und nach Thrombendarteriektomie der A. carotis interna

Im Rahmen der chronischen Entzündung der Arterienwand werden im Verlauf der Atherosklerose zahlreiche serologische Biomarker in das zirkulierende Blut freigesetzt. Diese bieten eine Möglichkeit die Schwere der Erkrankung einzuschätzen bzw. können den weiteren Verlauf präzisieren. Zahlreiche Studien konnten CRP als unabhängigen Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse wie das akute Koronarsyndrom, TIA und den ischämischen

Schlaganfall bestätigen [96, 97]. Zudem konnte gezeigt werden, dass mittel- bis hochgradige Stenosen der Arteria carotis interna mit einer Erhöhung des CRP assoziiert sind. Eine Unterscheidung zwischen symptomatischen und asymptomatischen Patienten war jedoch nicht möglich [127]. In der vorliegenden Studie kam es bei allen Patienten postoperativ zu einem signifikanten Anstieg des CRP und des Fibrinogen. Zwei Monate nach dem operativen Eingriff fielen die Werte wieder ab. Tendenziell lagen diese beim follow-up sogar unter den präoperativen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls einen Abfall des CRP und des Fibrinogen im postoperativen Verlauf beobachten konnten [128]. Eine mögliche Ursache für den Abfall 2 Monate nach Thrombarteriektomie könnte die Rolle der Plaque an sich als Entzündungstrigger sein. Weitere Studien konnten zeigen, dass erhöhte Werte des CRP instabile Stenosen identifizieren, das perioperative Risiko für neue, durch Mikroembolien verursachte, zerebrale ischämische Läsionen und die Restenoserate im Verlauf voraussagen können [129-131]. Für IL-6 ergab sich im postoperativen Verlauf ein signifikanter Abfall. Für IL-8 hingegen konnten keine signifikanten Erhöhungen oder Erniedrigungen zwischen den Messungen festgestellt werden. Auch durch den Vergleich der Gruppen „CXCR4 high, medium, low“ bzw. „SDF-1 high, low“ ließen sich keine Assoziationen zwischen der mRNA Expression und dem C-reaktiven Protein (CRP) bzw. dem Fibrinogen nachweisen.

5.4 Endotheliale Vorläuferzellen, CXCR4, SDF-1 und deren Bedeutung für den Verlauf des ischämischen Schlaganfalls

Bis heute ist strittig, ob endotheliale Vorläuferzellen den Verlauf der Atherosklerose positiv oder negativ beeinflussen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Patienten mit instabilen Plaques der Arteria carotis interna die Expression von CXCR4 auf CD 133 positiven Vorläuferzellen größer ist als bei Patienten mit stabilen Läsionen [77]. In der vorliegenden Studie variierte die relative Expression in dem operativ durch Thrombendarteriektomie der Arteria carotis interna gewonnenen Material von CXCR4 bzw. SDF-1 zwischen den Patienten zum Teil deutlich. Es konnte nicht gezeigt werden, dass die relative Expression von SDF-1 bzw. CXCR4 mit einem der anderen erhobenen Parameter assoziiert ist. Entsprechend der Ergebnisse anderer hier zitierter Studien wäre zu erwarten gewesen, dass die relative

Expression von CXCR4 und SDF-1 mit kardiovaskulären Risikofaktoren, dem Stenosegrad oder dem Serumspiegel der bestimmten Biomarker assoziiert ist. Diese Annahme bestätigte sich in unserer an einem kleinen Patientenkollektiv durchgeführten Pilotstudie jedoch nicht. Nach derzeitigem Forschungsstand wird davon ausgegangen, dass EPC deren Oberflächenrezeptoren und von ihnen sezernierte Chemokine nicht nur also Biomarker für den ischämischen Schlaganfall dienen, sondern auch eine mögliche neue therapeutische Option darstellen könnten [132]. So konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass sich die Transplantation von endothelialen Vorläuferzellen positiv auf die Langzeitprognose von zerebrovaskulären Erkrankungen auswirkt [133, 134]. Dem zugrunde liegen die durch Transfusion von EPC induzierte verstärkte Reendothelialisierung von Endothelverletzungen, die Reduktion der Bildung von Neointima und die Hemmung der Thrombozytenaktivierung sowie der Thrombogenese [135, 136]. Diese Ergebnisse deuten auf ein großes Potential für den Einsatz von endothelialen Vorläuferzellen in der Humanmedizin zur Therapie und Prävention des ischämischen Schlaganfalls hin [137].

5.5 Studienbeschränkungen

In der vorliegenden Studie konnte eine Methode zur Isolierung von RNA aus Formalin fixierten und in Paraffin gebetteten Präparaten von Plaquematerial der Arteria carotis interna etabliert und mit der Isolierung aus Gefrierpräparaten verglichen werden. In der anschließend durchgeführten Pilotstudie mit einer kleinen Patientenzahl ließen sich keine signifikanten oder tendenziellen Zusammenhänge zwischen der relativen Expression von CXCR4 bzw. SDF-1 und anderen erhobenen Parametern erkennen. In weiterführenden Studien mit größeren Patientenzahlen sollten diese möglichen Zusammenhänge im Hinblick auf die Konstellation von kardiovaskulären Risikofaktoren, Stenosegrad und serologischen Parametern wie CRP, Fibrinogen oder Zytokine weiter untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Formalin fixierte und in Paraffin gebettete Präparate (engl. formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE-Präparate) stellen mit Abstand das am häufigsten verfügbare Material für retrospektive Studien dar. Die Verwendung dieser Präparate für molekularbiologische Verfahren ist jedoch aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Formalin und der im Gewebe enthaltenen RNA erschwert. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Isolierung von RNA aus Formalin fixierten und in Paraffin gebetteten Präparaten (engl. formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE-Präparate) von Plaquematerial der Arteria carotis interna zuverlässig und reproduzierbar möglich ist. Sowohl die aus Gefrierpräparate (engl. fresh frozen, FF-Präparate) wie auch die aus FFPE-Präparaten gewonnene RNA war für die Verwendung für weiterführende molekularbiologische Verfahren wie der cDNA Synthese und der anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geeignet. Hiermit steht ein Instrument für vielfältige Untersuchungen zur Verfügung. In der durchgeführten real-time PCR zeigten sich bei dem aus FFPE-Präparaten gewonnenen Material niedrigere Ct-Werte im Vergleich zu FF-Präparaten, was auf eine niedrigere RNA-Konzentration des aus FFPE-Präparaten isolierten Materials hindeutet. In einer Pilotstudie sollte die Assoziation zwischen der relativen Expression von CXCR4 bzw. SDF-1 und serologischer Biomarker wie des C-reaktiven Proteins (CRP), des Fibrinogens und auch der erhobenen klinischen Daten des Patientengutes geprüft werden. Signifikante Zusammenhänge waren zwischen den erhobenen Parametern jedoch nicht feststellbar. Mit den in der vorliegenden Arbeit etablierten Methoden sollte diese Assoziation in weiteren Studien mit größer Patientenzahl weiter untersucht werden.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makrophageninfiltration der Plaqueschulter, Typ IIa Läsion
(Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100x Vergrößerung)

Abbildung 2: Kalzifizierte Läsion mit Makrophageninfiltraten, Typ VII Läsion
(Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100x Vergrößerung)

Abbildung 3: Typischer, kollagenfaserreicher Aufbau einer Typ V Läsion mit deutlicher
Stenosierung des Lumens (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100x Vergrößerung)

Abbildung 4: Evolution atherosklerotischer Läsionen (Typ I-VIII)

Abbildung 5: Segmentierung des Plaquematerials nach Explantation

Abbildung 6: cycle-threshold (GAPDH) im Vergleich (FFPE vs. FF)

Abbildung 7: cycle-threshold (ActinB) im Vergleich (FFPE vs. FF)

Abbildung 8: cycle-threshold (CXCR4) im Vergleich (FFPE vs. FF)

Abbildung 9: cycle-threshold (SDF-1) im Vergleich (FFPE vs. FF)

Abbildung 10: Gelelektrophorese der amplifizierten DNA (FFPE-Präparate)

Abbildung 11: Subgruppen CXCR4 low, medium, high (FF-Präparate)

Abbildung 12: Präoperative CRP-Konzentration im Gruppenvergleich (CXCR4; FF-
Präparate)

Abbildung 13: Postoperative CRP-Konzentration im Gruppenvergleich (CXCR4; FF-
Präparate)

Abbildung 14: CRP-Konzentration bei follow-up im Gruppenvergleich (CXCR4; FF-
Präparate)

Abbildung 15: Präoperative Fibrinogenkonzentration im Gruppenvergleich (CXCR4;
FF-Präparate)

Abbildung 16: Postoperative Fibrinogenkonzentration im Gruppenvergleich (CXCR4;
FF-Präparate)

Abbildung 17: Fibrinogenkonzentration bei follow-up im Gruppenvergleich (CXCR4;
FF-Präparate)

Abbildung 18: Subgruppen SDF-1 low und high (FF-Präparate)

Abbildung 19: Präoperative CRP-Konzentration im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-
Präparate)

Abbildung 20: Postoperative CRP-Konzentration im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

Abbildung 21: CRP-Konzentration bei follow-up im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

Abbildung 22: Präoperative Fibrinogenkonzentration im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

Abbildung 23: Postoperative Fibrinogenkonzentration im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

Abbildung 24: Fibrinogenkonzentration bei follow-up im Gruppenvergleich (SDF-1; FF-Präparate)

Abbildung 25: hs-CRP präoperativ, postoperativ und bei follow-up im Vergleich

Abbildung 26: Fibrinogen präoperativ, postoperativ und bei follow-up im Vergleich

Abbildung 27: IL-6 präoperativ, postoperativ und bei follow-up im Vergleich

Abbildung 28: IL-8 präoperativ, postoperativ und bei follow-up im Vergleich

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhalt der Patientenfragebögen

Tabelle 2: Schritte der Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 3: Daten des Patientenkollektivs

Tabelle 4: Patientenkollektiv „CXCR4 low“, „CXCR4 medium“ und „CXCR4 high“

Tabelle 5: Patientenkollektiv „SDF-1 low“ und „SDF-1 high“

7.3 Literaturverzeichnis

1. Murray, C.J.L. and A.D. Lopez, *Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study*. The Lancet, 1997. **349**(9063): p. 1436-1442.
2. Statistics, N.C.f.H., *Health, United States, 2010 With Special Feature on Death and Dying*. 2011: U.S. Dept. of Health and Human Services.
3. Statistisches Bundesamt, Z.B., *Todesursachenstatistik*. 2011.
4. Heinemann, L.A.J., W. Barth, E. Garbe, S.N. Willich, K. Kunze, M.T.G. the, and u.d.F.M. Ostdeutschland, *Epidemiologische Daten zur Schlaganfallerkrankung Daten des WHO-MONICA-Projekts in Deutschland*. Der Nervenarzt, 1998. **69**(12): p. 1091-1099.
5. Weimar, C. and H.-C. Diener, *Diagnose und Therapie der Schlaganfallbehandlung in Deutschland: Ergebnisse der deutschen Schlaganfalldatenbank*. Dtsch Arztebl, 2003. **100**(40): p. 2576-.

6. Adams, H., B. Bendixen, L. Kappelle, J. Biller, B. Love, D. Gordon, and E. Marsh, *Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*. Stroke, 1993. **24**(1): p. 35-41.
7. Grau, A.J., C. Weimar, F. Buggle, A. Heinrich, M. Goertler, S. Neumaier, J. Glahn, T. Brandt, W. Hacke, H.-C. Diener, and o.b.o.t.G.S.D.B. Collaborators, *Risk Factors, Outcome, and Treatment in Subtypes of Ischemic Stroke*. Stroke, 2001. **32**(11): p. 2559-2566.
8. Kolominsky-Rabas, P.L., M. Weber, O. Gefeller, B. Neundoerfer, and P.U. Heuschmann, *Epidemiology of Ischemic Stroke Subtypes According to TOAST Criteria*. Stroke, 2001. **32**(12): p. 2735-2740.
9. Guercini, F., M. Acciarresi, G. Agnelli, and M. Paciaroni, *Cryptogenic stroke: time to determine aetiology*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008. **6**(4): p. 549-554.
10. Alfke, K. and O. Jansen, *Zerebrale Ischämie*. Der Radiologe, 2001. **41**(7): p. 599-609.
11. Saver, J.L., *Time Is Brain—Quantified*. Stroke, 2006. **37**(1): p. 263-266.
12. H. C. Diener, N.P., *Leitlinien für die Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Georg Thieme Verlag, 2008.
13. Easton, J.D., J.L. Saver, G.W. Albers, M.J. Alberts, S. Chaturvedi, E. Feldmann, T.S. Hatsukami, R.T. Higashida, S.C. Johnston, C.S. Kidwell, H.L. Lutsep, E. Miller, and R.L. Sacco, *Definition and Evaluation of Transient Ischemic Attack*. Stroke, 2009. **40**(6): p. 2276-2293.
14. Derdeyn, C.P., *Mechanisms of ischemic stroke secondary to large artery atherosclerotic disease*. Neuroimaging clinics of North America, 2007. **17**(3): p. 303-11, vii-viii.
15. Petty, G.W., R.D. Brown, J.P. Whisnant, J.D. Sicks, W.M. O' Fallon, and D.O. Wiebers, *Ischemic Stroke Subtypes : A Population-Based Study of Incidence and Risk Factors*. Stroke, 1999. **30**(12): p. 2513-2516.
16. Ferro, J.M., *Vasculitis of the central nervous system*. Journal of neurology, 1998. **245**(12): p. 766-76.
17. Schievink, W.I., *Spontaneous dissection of the carotid and vertebral arteries*. The New England journal of medicine, 2001. **344**(12): p. 898-906.
18. Golledge, J., R.M. Greenhalgh, and A.H. Davies, *The Symptomatic Carotid Plaque*. Stroke, 2000. **31**(3): p. 774-781.
19. Davies, M.J., *Stability and Instability: Two Faces of Coronary Atherosclerosis: The Paul Dudley White Lecture 1995*. Circulation, 1996. **94**(8): p. 2013-2020.
20. Virmani, R., A.P. Burke, A. Farb, and F.D. Kolodgie, *Pathology of the unstable plaque*. Prog Cardiovasc Dis, 2002. **44**(5): p. 349-56.
21. Brusckhe, A.V., J.R. Kramer, Jr., E.T. Bal, I.U. Haque, R.C. Detrano, and M. Goormastic, *The dynamics of progression of coronary atherosclerosis studied in 168 medically treated patients who underwent coronary arteriography three times*. Am Heart J, 1989. **117**(2): p. 296-305.
22. Yokoya, K., H. Takatsu, T. Suzuki, H. Hosokawa, S. Ojio, T. Matsubara, T. Tanaka, S. Watanabe, N. Morita, K. Nishigaki, G. Takemura, T. Noda, S. Minatoguchi, and H. Fujiwara, *Process of Progression of Coronary Artery Lesions From Mild or Moderate Stenosis to Moderate or Severe Stenosis : A Study Based on Four Serial Coronary Arteriograms per Year*. Circulation, 1999. **100**(9): p. 903-909.
23. Zhu, J.W.N.a.C.Z., *Stroke risk and critical carotid stenosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1990. **53**(3): p. 235-237.
24. Incalzi, R.A., A. Gemma, F. Landi, and P.U. Carbonin, *Endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis*. The Lancet, 1998. **352**(9122): p. 143.
25. Herbert C. Sary, M., *Atlas of Atherosclerosis Progression and Regression, Second Edition*. Informa Healthcare; Auflage: 0002, 2003.
26. Sary, H., A. Chandler, S. Glagov, J. Guyton, W. Insull, M. Rosenfeld, S. Schaffer, C. Schwartz, W. Wagner, and R. Wissler, *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2462-2478.
27. Sary, H.C., *Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions : An Update*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2000. **20**(5): p. 1177-1178.

28. Stary, H.C., A.B. Chandler, R.E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, M.E. Rosenfeld, C.J. Schwartz, W.D. Wagner, and R.W. Wissler, *A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis : A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Circulation*, 1995. **92**(5): p. 1355-1374.
29. Seimon, T. and I. Tabas, *Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis*. *Journal of lipid research*, 2009. **50 Suppl**: p. S382-7.
30. Cai, J., T.S. Hatsukami, M.S. Ferguson, W.S. Kerwin, T. Saam, B. Chu, N. Takaya, N.L. Polissar, and C. Yuan, *In vivo quantitative measurement of intact fibrous cap and lipid-rich necrotic core size in atherosclerotic carotid plaque: comparison of high-resolution, contrast-enhanced magnetic resonance imaging and histology*. *Circulation*, 2005. **112**(22): p. 3437-44.
31. Yuan, C., L.M. Mitsumori, M.S. Ferguson, N.L. Polissar, D. Echelard, G. Ortiz, R. Small, J.W. Davies, W.S. Kerwin, and T.S. Hatsukami, *In vivo accuracy of multispectral magnetic resonance imaging for identifying lipid-rich necrotic cores and intraplaque hemorrhage in advanced human carotid plaques*. *Circulation*, 2001. **104**(17): p. 2051-6.
32. Lee, R.T. and P. Libby, *The Unstable Atheroma*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997. **17**(10): p. 1859-1867.
33. Blankenhorn, D. and H. Hodis, *George Lyman Duff Memorial Lecture. Arterial imaging and atherosclerosis reversal*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1994. **14**(2): p. 177-192.
34. Brown, G., J.J. Albers, L.D. Fisher, S.M. Schaefer, J.-T. Lin, C. Kaplan, X.-Q. Zhao, B.D. Bisson, V.F. Fitzpatrick, and H.T. Dodge, *Regression of Coronary Artery Disease as a Result of Intensive Lipid-Lowering Therapy in Men with High Levels of Apolipoprotein B*. *New England Journal of Medicine*, 1990. **323**(19): p. 1289-1298.
35. Hansson, G.K., *Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(16): p. 1685-1695.
36. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 868-874.
37. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature*, 1993. **362**(6423): p. 801-809.
38. Ross, R., *Atherosclerosis — An Inflammatory Disease*. *New England Journal of Medicine*, 1999. **340**(2): p. 115-126.
39. Spagnoli, L.G., E. Bonanno, G. Sangiorgi, and A. Mauriello, *Role of Inflammation in Atherosclerosis*. *Journal of Nuclear Medicine*, 2007. **48**(11): p. 1800-1815.
40. Galis, Z.S., G.K. Sukhova, M.W. Lark, and P. Libby, *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1994. **94**(6): p. 2493-2503.
41. Moreno, P.R., V.H. Bernardi, J. Lopez-Cuellar, A.M. Murcia, I.F. Palacios, H.K. Gold, R. Mehran, S.K. Sharma, Y. Nemerson, V. Fuster, and J.T. Fallon, *Macrophages, Smooth Muscle Cells, and Tissue Factor in Unstable Angina: Implications for Cell-Mediated Thrombogenicity in Acute Coronary Syndromes*. *Circulation*, 1996. **94**(12): p. 3090-3097.
42. Wilcox, J.N., K.M. Smith, S.M. Schwartz, and D. Gordon, *Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989. **86**(8): p. 2839-2843.
43. Widlansky, M.E., N. Gokce, J.F. Keaney Jr, and J.A. Vita, *The clinical implications of endothelial dysfunction*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2003. **42**(7): p. 1149-1160.
44. Vita, J.A. and J.F. Keaney, *Endothelial Function*. *Circulation*, 2002. **106**(6): p. 640-642.
45. Celermajer, D.S., K.E. Sorensen, V.M. Gooch, D.J. Spiegelhalter, O.I. Miller, I.D. Sullivan, J.K. Lloyd, and J.E. Deanfield, *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis*. *Lancet*, 1992. **340**(8828): p. 1111-5.
46. Fichtlscherer, S., G. Rosenberger, D.H. Walter, S. Breuer, S. Dimmeler, and A.M. Zeiher, *Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease*. *Circulation*, 2000. **102**(9): p. 1000-6.

47. Prasad, A., J. Zhu, J.P. Halcox, M.A. Waclawiw, S.E. Epstein, and A.A. Quyyumi, *Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction*. *Circulation*, 2002. **106**(2): p. 184-90.
48. Sorensen, K.E., D.S. Celermajer, D. Georgakopoulos, G. Hatcher, D.J. Betteridge, and J.E. Deanfield, *Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(1): p. 50-5.
49. Steinberg, H.O., H. Chaker, R. Leaming, A. Johnson, G. Brechtel, and A.D. Baron, *Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(11): p. 2601-10.
50. Gokce N, K.J.J., Vita JA, *Clinical manifestations of endothelial dysfunction*. In Loscalzo J, Schafer AI (eds). *Thrombosis and Hemorrhage*, Philadelphia, PA, 2002: p. 685-706.
51. Cushman, M., R.N. Lemaitre, L.H. Kuller, B.M. Psaty, E.M. Macy, A.R. Sharrett, and R.P. Tracy, *Fibrinolytic activation markers predict myocardial infarction in the elderly. The Cardiovascular Health Study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(3): p. 493-8.
52. Thogersen, A.M., J.H. Jansson, K. Boman, T.K. Nilsson, L. Weinehall, F. Huhtasaari, and G. Hallmans, *High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor*. *Circulation*, 1998. **98**(21): p. 2241-7.
53. Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, M. Ruperez, V. Esteban, Y. Suzuki, S. Mezzano, J.J. Plaza, and J. Egido, *Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field*. *Hypertension*, 2001. **38**(6): p. 1382-7.
54. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
55. Teplyakov, A.I., *Endothelin-1 involved in systemic cytokine network inflammatory response at atherosclerosis*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004. **44 Suppl 1**: p. S274-5.
56. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
57. Lerman, A., B.S. Edwards, J.W. Hallett, D.M. Heublein, S.M. Sandberg, and J.C. Burnett, Jr., *Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(14): p. 997-1001.
58. Collins, T. and M.I. Cybulsky, *NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?* *The Journal of Clinical Investigation*, 2001. **107**(3): p. 255-264.
59. Khan, B.V., D.G. Harrison, M.T. Olbrych, R.W. Alexander, and R.M. Medford, *Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(17): p. 9114-9119.
60. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(7): p. 508-519.
61. J. C. F. Poole, H.W.F., *Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits*. *Journal of Pathology*, 1958. **75**(2): p. 245-251.
62. Cybulsky, M. and M. Gimbrone, *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. *Science*, 1991. **251**(4995): p. 788-791.
63. Boisvert, W.A., R. Santiago, L.K. Curtiss, and R.A. Terkeltaub, *A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998. **101**(2): p. 353-363.
64. Boring, L., J. Gosling, M. Cleary, and I.F. Charo, *Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. *Nature*, 1998. **394**(6696): p. 894-897.
65. Gu, L., Y. Okada, S.K. Clinton, C. Gerard, G.K. Sukhova, P. Libby, and B.J. Rollins, *Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor Deficient Mice*. *Molecular cell*, 1998. **2**(2): p. 275-281.

66. Zeiher, A.M., B. Fisslthaler, B. Schray-Utz, and R. Busse, *Nitric Oxide Modulates the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Cultured Human Endothelial Cells*. *Circulation Research*, 1995. **76**(6): p. 980-986.
67. Clinton, S.K., R. Underwood, L. Hayes, M.L. Sherman, D.W. Kufe, and P. Libby, *Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis*. *The American journal of pathology*, 1992. **140**(2): p. 301-16.
68. Rosenfeld, M.E., Yl, auml, S. -Herttuaala, B.A. Lipton, V.A. Ord, J.L. Witztum, and D. Steinberg, *Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans*. Vol. 140. 1992. 291-300.
69. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger Receptors in Atherosclerosis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2006. **26**(8): p. 1702-1711.
70. Naito, M., H. Suzuki, T. Mori, A. Matsumoto, T. Kodama, and K. Takahashi, *Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions*. *Am J Pathol*, 1992. **141**(3): p. 591-9.
71. Benagiano, M., M.M. D'Elios, A. Amedei, A. Azzurri, R. van der Zee, A. Ciervo, G. Rombola, S. Romagnani, A. Cassone, and G. Del Prete, *Human 60-kDa heat shock protein is a target autoantigen of T cells derived from atherosclerotic plaques*. *J Immunol*, 2005. **174**(10): p. 6509-17.
72. Fong, A.M., L.A. Robinson, D.A. Steeber, T.F. Tedder, O. Yoshie, T. Imai, and D.D. Patel, *Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow*. *J Exp Med*, 1998. **188**(8): p. 1413-9.
73. Ludwig, A., T. Berkhout, K. Moores, P. Groot, and G. Chapman, *Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity*. *J Immunol*, 2002. **168**(2): p. 604-12.
74. Dimmeler, S. and A.M. Zeiher, *Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis?* *Journal of molecular medicine*, 2004. **82**(10): p. 671-7.
75. Fadini, G.P., C. Agostini, S. Sartore, and A. Avogaro, *Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2007. **194**(1): p. 46-54.
76. Du, F., J. Zhou, R. Gong, X. Huang, M. Pansuria, A. Virtue, X. Li, H. Wang, and X.F. Yang, *Endothelial progenitor cells in atherosclerosis*. *Frontiers in bioscience*, 2012. **17**: p. 2327-49.
77. Sepp, D., L. Esposito, P. Zepper, I. Ott, R. Feurer, S. Sadikovic, B. Hemmer, and H. Poppert, *Surface expression of CXCR4 on circulating CD133progenitor cells is associated with plaque instability in subjects with carotid artery stenosis*. *J Angiogenes Res*, 2009. **1**: p. 10.
78. Sata, M., *Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing, and pulmonary hypertension: lessons from animal models*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(5): p. 1008-14.
79. Walter, D.H., K. Rittig, F.H. Bahlmann, R. Kirchmair, M. Silver, T. Murayama, H. Nishimura, D.W. Losordo, T. Asahara, and J.M. Isner, *Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Circulation*, 2002. **105**(25): p. 3017-24.
80. Celletti, F.L., J.M. Waugh, P.G. Amabile, A. Brendolan, P.R. Hilfiker, and M.D. Dake, *Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression*. *Nat Med*, 2001. **7**(4): p. 425-9.
81. Moulton, K.S., K. Vakili, D. Zurakowski, M. Soliman, C. Butterfield, E. Sylvain, K.M. Lo, S. Gillies, K. Javaherian, and J. Folkman, *Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(8): p. 4736-41.
82. Takahashi, T., C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Wagner, J.M. Isner, and T. Asahara, *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. *Nat Med*, 1999. **5**(4): p. 434-8.
83. Moreno, P.R., K.R. Purushothaman, V. Fuster, D. Echeverri, H. Trusczynska, S.K. Sharma, J.J. Badimon, and W.N. O'Connor, *Plaque neovascularization is increased in ruptured*

- atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability.* *Circulation*, 2004. **110**(14): p. 2032-8.
84. Hill, J.M., G. Zalos, J.P. Halcox, W.H. Schenke, M.A. Waclawiw, A.A. Quyyumi, and T. Finkel, *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.* *N Engl J Med*, 2003. **348**(7): p. 593-600.
 85. Vasa, M., S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler, *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.* *Circ Res*, 2001. **89**(1): p. E1-7.
 86. Shintani, S., T. Murohara, H. Ikeda, T. Ueno, T. Honma, A. Katoh, K. Sasaki, T. Shimada, Y. Oike, and T. Imaizumi, *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction.* *Circulation*, 2001. **103**(23): p. 2776-9.
 87. Goldschmidt-Clermont, P.J., M.A. Creager, D.W. Losordo, G.K. Lam, M. Wassef, and V.J. Dzau, *Atherosclerosis 2005: recent discoveries and novel hypotheses.* *Circulation*, 2005. **112**(21): p. 3348-53.
 88. Karra, R., S. Vemullapalli, C. Dong, E.E. Herderick, X. Song, K. Slosek, J.R. Nevins, M. West, P.J. Goldschmidt-Clermont, and D. Seo, *Molecular evidence for arterial repair in atherosclerosis.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(46): p. 16789-94.
 89. Rauscher, F.M., P.J. Goldschmidt-Clermont, B.H. Davis, T. Wang, D. Gregg, P. Ramaswami, A.M. Pippen, B.H. Annex, C. Dong, and D.A. Taylor, *Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis.* *Circulation*, 2003. **108**(4): p. 457-63.
 90. Stellos, K., H. Langer, K. Daub, T. Schoenberger, A. Gauss, T. Geisler, B. Bigalke, I. Mueller, M. Schumm, I. Schaefer, P. Seizer, B.F. Kraemer, D. Siegel-Axel, A.E. May, S. Lindemann, and M. Gawaz, *Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells.* *Circulation*, 2008. **117**(2): p. 206-15.
 91. Ceradini, D.J., A.R. Kulkarni, M.J. Callaghan, O.M. Tepper, N. Bastidas, M.E. Kleinman, J.M. Capla, R.D. Galiano, J.P. Levine, and G.C. Gurtner, *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1.* *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 858-64.
 92. Wojakowski, W., M. Tendera, A. Michalowska, M. Majka, M. Kucia, K. Maslankiewicz, R. Wyderka, A. Ochala, and M.Z. Ratajczak, *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*, 2004. **110**(20): p. 3213-20.
 93. Hansson, G.K., P. Libby, U. Schonbeck, and Z.Q. Yan, *Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis.* *Circ Res*, 2002. **91**(4): p. 281-91.
 94. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation.* *New England Journal of Medicine*, 1999. **340**(6): p. 448-454.
 95. Verma, S., S. Devaraj, and I. Jialal, *Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis.* *Circulation*, 2006. **113**(17): p. 2135-50; discussion 2150.
 96. Koenig, W. and N. Khuseynova, *Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(1): p. 15-26.
 97. Rost, N.S., P.A. Wolf, C.S. Kase, M. Kelly-Hayes, H. Silbershatz, J.M. Massaro, R.B. D'Agostino, C. Franzblau, and P.W.F. Wilson, *Plasma Concentration of C-Reactive Protein and Risk of Ischemic Stroke and Transient Ischemic Attack.* *Stroke*, 2001. **32**(11): p. 2575-2579.
 98. Schillinger, M., M. Exner, W. Mlekusch, S. Sabeti, J. Amighi, R. Nikowitsch, E. Timmel, B. Kicking, C. Minar, M. Pones, W. Lalouschek, H. Rumpold, G. Maurer, O. Wagner, and E. Minar, *Inflammation and Carotid Artery--Risk for Atherosclerosis Study (ICARAS).* *Circulation*, 2005. **111**(17): p. 2203-9.
 99. Pearson, T.A., G.A. Mensah, R.W. Alexander, J.L. Anderson, R.O. Cannon, 3rd, M. Criqui, Y.Y. Fadl, S.P. Fortmann, Y. Hong, G.L. Myers, N. Rifai, S.C. Smith, Jr., K. Taubert, R.P. Tracy, and F. Vinicor, *Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease*

- Control and Prevention and the American Heart Association*. *Circulation*, 2003. **107**(3): p. 499-511.
100. Kannel, W.B., P.A. Wolf, W.P. Castelli, and R.B. D'Agostino, *Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study*. *JAMA*, 1987. **258**(9): p. 1183-6.
 101. Ma, J., C.H. Hennekens, P.M. Ridker, and M.J. Stampfer, *A prospective study of fibrinogen and risk of myocardial infarction in the Physicians' Health Study*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **33**(5): p. 1347-52.
 102. Wilhelmsen, L., K. Svardsudd, K. Korsan-Bengtson, B. Larsson, L. Welin, and G. Tibblin, *Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 1984. **311**(8): p. 501-5.
 103. Ridker, P.M., M.J. Stampfer, and N. Rifai, *Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease*. *JAMA*, 2001. **285**(19): p. 2481-5.
 104. Levenson, J., P. Giral, M. Razavian, J. Garipey, and A. Simon, *Fibrinogen and silent atherosclerosis in subjects with cardiovascular risk factors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(9): p. 1263-8.
 105. Mora, S., N. Rifai, J.E. Buring, and P.M. Ridker, *Additive value of immunoassay-measured fibrinogen and high-sensitivity C-reactive protein levels for predicting incident cardiovascular events*. *Circulation*, 2006. **114**(5): p. 381-7.
 106. Ridker, P.M., N. Rifai, M.J. Stampfer, and C.H. Hennekens, *Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men*. *Circulation*, 2000. **101**(15): p. 1767-72.
 107. Damas, J.K., T. Waehre, A. Yndestad, K. Otterdal, A. Hognestad, N.O. Solum, L. Gullestad, S.S. Froland, and P. Aukrust, *Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets*. *Circulation*, 2003. **107**(21): p. 2670-6.
 108. Nakase, T., T. Yamazaki, N. Ogura, A. Suzuki, and K. Nagata, *The impact of inflammation on the pathogenesis and prognosis of ischemic stroke*. *J Neurol Sci*, 2008. **271**(1-2): p. 104-9.
 109. Caligiuri, G., M. Rudling, V. Ollivier, M.P. Jacob, J.B. Michel, G.K. Hansson, and A. Nicoletti, *Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice*. *Mol Med*, 2003. **9**(1-2): p. 10-7.
 110. Mallat, Z., S. Besnard, M. Duriez, V. Deleuze, F. Emmanuel, M.F. Bureau, F. Soubrier, B. Esposito, H. Duez, C. Fievet, B. Staels, N. Duverger, D. Scherman, and A. Tedgui, *Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis*. *Circ Res*, 1999. **85**(8): p. e17-24.
 111. Pinderski, L.J., M.P. Fischbein, G. Subbanagounder, M.C. Fishbein, N. Kubo, H. Cheroutre, L.K. Curtiss, J.A. Berliner, and W.A. Boisvert, *Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes*. *Circ Res*, 2002. **90**(10): p. 1064-71.
 112. Arner, P., *The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones*. *Trends Endocrinol Metab*, 2003. **14**(3): p. 137-45.
 113. Yudkin, J.S., I. Juhan-Vague, E. Hawe, S.E. Humphries, G. di Minno, M. Margaglione, E. Tremoli, T. Kooistra, P.E. Morange, P. Lundman, V. Mohamed-Ali, and A. Hamsten, *Low-grade inflammation may play a role in the etiology of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease: the HIFMECH study*. *Metabolism*, 2004. **53**(7): p. 852-7.
 114. Masuda, N., T. Ohnishi, S. Kawamoto, M. Monden, and K. Okubo, *Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(22): p. 4436-43.
 115. Dotti, I., S. Bonin, G. Basili, E. Nardon, A. Balani, S. Siracusano, F. Zanconati, S. Palmisano, N. De Manzini, and G. Stanta, *Effects of formalin, methacarn, and fineFIX fixatives on RNA preservation*. *Diagn Mol Pathol*, 2010. **19**(2): p. 112-22.
 116. Fedorowicz, G., S. Guerrero, T.D. Wu, and Z. Modrusan, *Microarray analysis of RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded and matched fresh-frozen ovarian adenocarcinomas*. *BMC Med Genomics*, 2009. **2**: p. 23.

117. Sanchez-Navarro, I., A. Gamez-Pozo, M. Gonzalez-Baron, A. Pinto-Marin, D. Hardisson, R. Lopez, R. Madero, P. Cejas, M. Mendiola, E. Espinosa, and J.A. Vara, *Comparison of gene expression profiling by reverse transcription quantitative PCR between fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissues*. Biotechniques, 2010. **48**(5): p. 389-97.
118. Specht, K., T. Richter, U. Muller, A. Walch, M. Werner, and H. Hofler, *Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue*. Am J Pathol, 2001. **158**(2): p. 419-29.
119. Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, and H. Erlich, *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-491.
120. Rupp, G.M. and J. Locker, *Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues*. Biotechniques, 1988. **6**(1): p. 56-60.
121. Paska, C., K. Bogi, L. Szilak, A. Tokes, E. Szabo, I. Sziller, J. Rigo, Jr., G. Sobel, I. Szabo, P. Kaposi-Novak, A. Kiss, and Z. Schaff, *Effect of formalin, acetone, and RNAlater fixatives on tissue preservation and different size amplicons by real-time PCR from paraffin-embedded tissue*. Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B, 2004. **13**(4): p. 234-40.
122. Evers, D.L., C.B. Fowler, B.R. Cunningham, J.T. Mason, and T.J. O'Leary, *The effect of formaldehyde fixation on RNA: optimization of formaldehyde adduct removal*. The Journal of molecular diagnostics : JMD, 2011. **13**(3): p. 282-8.
123. Fedorowicz, G., S. Guerrero, T.D. Wu, and Z. Modrusan, *Microarray analysis of RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded and matched fresh-frozen ovarian adenocarcinomas*. BMC medical genomics, 2009. **2**: p. 23.
124. Korbler, T., M. Grskovic, M. Dominis, and M. Antica, *A simple method for RNA isolation from formalin-fixed and paraffin-embedded lymphatic tissues*. Experimental and molecular pathology, 2003. **74**(3): p. 336-40.
125. Doleshal, M., A.A. Magotra, B. Choudhury, B.D. Cannon, E. Labourier, and A.E. Szafranska, *Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues*. The Journal of molecular diagnostics : JMD, 2008. **10**(3): p. 203-11.
126. Ribeiro-Silva, A., H. Zhang, and S.S. Jeffrey, *RNA extraction from ten year old formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples: a comparison of column purification and magnetic bead-based technologies*. BMC molecular biology, 2007. **8**: p. 118.
127. Guven, D.H., D.N. Saritas, D.I. Conkbayir, and P.S. Comoglu, *The value of C-reactive protein in symptomatic versus asymptomatic carotid artery stenosis*. The International journal of neuroscience, 2012.
128. Dosa, E., S. Rugonfalvi-Kiss, Z. Prohaszka, A. Szabo, I. Karadi, L. Selmecci, L. Romics, G. Fust, G. Acsady, and L. Entz, *Marked decrease in the levels of two inflammatory markers, hs-C-reactive protein and fibrinogen in patients with severe carotid atherosclerosis after eversion carotid endarterectomy*. Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.], 2004. **53**(11): p. 631-5.
129. Alvarez Garcia, B., C. Ruiz, P. Chacon, J.A. Sabin, and M. Matas, *High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for unstable carotid plaque*. Journal of vascular surgery, 2003. **38**(5): p. 1018-24.
130. Heider, P., H. Poppert, O. Wolf, T. Liebig, J. Pelisek, T. Schuster, and H.H. Eckstein, *Fibrinogen and high-sensitive C-reactive protein as serologic predictors for perioperative cerebral microembolic lesions after carotid endarterectomy*. Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery, 2007. **46**(3): p. 449-454.
131. Lusic, I., V. Radonic, S. Pavelin, and I. Bilic, *Is C-reactive protein a better predictor of recurrent carotid disease following carotid endarterectomy than established risk factors for atherosclerosis?* VASA. Zeitschrift fur Gefasskrankheiten, 2006. **35**(4): p. 221-5.

132. Rouhl, R.P., R.J. van Oostenbrugge, J. Damoiseaux, J.W. Tervaert, and J. Lodder, *Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts*. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2008. **39**(7): p. 2158-65.
133. Fan, Y., F. Shen, T. Frenzel, W. Zhu, J. Ye, J. Liu, Y. Chen, H. Su, W.L. Young, and G.Y. Yang, *Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice*. Annals of neurology, 2010. **67**(4): p. 488-97.
134. Moubarik, C., B. Guillet, B. Youssef, J.-L. Codaccioni, M.-D. Piercecchi, F. Sabatier, P. Lionel, L. Dou, A. Foucault-Bertaud, L. Velly, F.β. Dignat-George, and P. Pisano, *Transplanted Late Outgrowth Endothelial Progenitor Cells as Cell Therapy Product for Stroke*. Stem Cell Reviews and Reports, 2011. **7**(1): p. 208-220.
135. Werner, N., S. Junk, U. Laufs, A. Link, K. Walenta, M. Bohm, and G. Nickenig, *Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury*. Circulation research, 2003. **93**(2): p. e17-24.
136. Abou-Saleh, H., D. Yacoub, J.F. Theoret, M.A. Gillis, P.E. Neagoe, B. Labarthe, P. Theroux, M.G. Sirois, M. Tabrizian, E. Thorin, and Y. Merhi, *Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation*. Circulation, 2009. **120**(22): p. 2230-9.
137. Zhao, Y.H., B. Yuan, J. Chen, D.H. Feng, B. Zhao, C. Qin, and Y.F. Chen, *Endothelial Progenitor Cells: Therapeutic Perspective for Ischemic Stroke*. CNS neuroscience & therapeutics, 2012.