

Chirurgische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J.R. Siewert)  
Abteilung für Gefäßchirurgie  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. P.C. Maurer)

# **Immunhistochemische Analyse des proliferationsassoziierten Antigens Ki-67 in Operationspräparaten der Arteria carotis und der Arteria femoralis**

**Klaus Haug**

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. R. Th. Brandl  
2. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler

Die Dissertation wurde am 24.10.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.05.2001 angenommen.

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1. Einführung**

1.1. Atherogenese und Klassifikation der Arteriosklerose	1
1.2. Risikofaktoren für die Arteriosklerose	3
1.3. Die zelluläre Zusammensetzung der arteriosklerotischen Plaque	4
1.3.1. Endothelzellen	4
1.3.2. Glatte Muskelzellen	5
1.3.3. Makrophagen	6
1.3.4. T- Lymphozyten	6
1.3.5. Mastzellen	7
1.4. Fragestellung	7
1.4.1. Zellproliferation in humanen arteriosklerotischen Läsionen	7
1.4.2. Die Plaquetopographie der Karotidesobliterate	8
1.4.3. Unterschiede im Proliferationsmuster: Vergleich der Arteria carotis mit der Arteria femoralis	8
1.4.4. Korrelation zwischen Risikofaktoren, Zellproliferation und Symptomatik	9
1.4.5. Proliferation in Primärstenosen mit konsekutiver Restenose	9

### **2. Material und Methoden**

2.1. Patientendaten	10
2.1.1. Gruppe 1: 26 Primärstenosen der Arteria carotis	10
2.1.2. Gruppe 2: 10 Primärstenosen der Arteria femoralis	12
2.1.3. Gruppe 3: 5 Primärstenosen der Arteria carotis mit konsekutiver Restenose	12
2.2. Gewinnung und Aufarbeitung des humanen Arteriosklerosematerials	13
2.2.1. Arteria carotis (Gruppe 1 und 3)	13
2.2.2. Arteria femoralis (Gruppe 2)	14
2.3. Histomorphologische Beurteilung	14
2.3.1. Definition der histomorphologischen Charakteristika	15
2.4. Die Plaquetopographie	16
2.5. Immunhistochemie	18
2.5.1. Detektionssysteme	20
2.5.2. Immunhistochemische Einfachfärbungen	22
2.5.3. Immunhistochemische Doppelfärbungen	23
2.6. Statistik	24

### **3. Ergebnisse**

3.1. Die Histomorphologie der Desobliterate	25
3.1.1. <i>Die Histomorphologie der Karotidesobliterate (Gruppe 1 und 3)</i>	25
3.1.2. <i>Die Histomorphologie der Femoralidesobliterate (Gruppe 2)</i>	27
3.2. Zelluläre Proliferation	28
3.2.1. <i>Zellproliferation im Gesamtkollektiv</i>	28
3.2.2. <i>Zellproliferation in den Karotidesobliteraten (Gruppe 1 und 3)</i>	30
3.2.3. <i>Zellproliferation in den Femoralidesobliteraten (Gruppe 2)</i>	31
3.3. Korrelation Ki-67 positiver Zellen mit histomorphologischen Charakteristika	31
3.3.1. <i>Die Desobliterate der Arteria carotis (Gruppe 1)</i>	31
3.3.2. <i>Die Desobliterate der Arteria femoralis (Gruppe 2)</i>	34
3.4. Zuordnung der Ki-67-exprimierenden Zellen zu den immunhistochemischen Zellmarkern in Serienschritten	35
3.4.1. <i>Arteria carotis (Gruppe 1 und 3)</i>	35
3.4.2. <i>Arteria femoralis (Gruppe 2)</i>	37
3.5. Immunhistochemische Doppelfärbungen	37
3.6. Klinische Charakteristika	40
3.6.1. <i>Korrelation der klinischen Charakteristika mit der Symptomatik</i>	40
3.6.2. <i>Korrelation der klinischen Charakteristika mit der Proliferationsaktivität</i>	40

### **4. Diskussion**

4.1. Die immunhistochemische Ki-67/MIB1 Färbung	41
4.2. Patientengruppe 1: Die Karotisläsionen	43
4.2.1. <i>Die pathoanatomische Topographie</i>	43
4.2.2. <i>Die Zellproliferation</i>	44
4.2.3. <i>Proliferierende Zelltypen</i>	46
4.3. Patientengruppe 2: Die Femoralisläsionen	50
4.4. Patientengruppe 3: Die Karotisstensen mit konsekutiver Restenose	51
4.5. Klinische Charakteristika und Proliferationsaktivität	52

<b><u>5. Zusammenfassung</u></b>	53
----------------------------------	----

<b><u>6. Schlußfolgerung</u></b>	55
----------------------------------	----

<b><u>7. Literaturverzeichnis</u></b>	56
---------------------------------------	----

<b><u>8. Anhang</u></b>	
-------------------------	--

8.1. Abkürzungen und feststehende Begriffe	62
--	----

8.2. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	63
---	----

8.3. Danksagung	65
-----------------	----

## 1. Einführung

Die Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen zählen nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen. Für annähernd jeden zweiten Bundesbürger ist eine arteriosklerotische Herz-Kreislaufkrankung die letztendliche Todesursache. Viele Menschen verlieren ihre Autonomie infolge einer Arteriosklerose des zerebrovaskulären Systems oder leiden unter den Folgen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Diese Einschränkung der Lebensqualität durch Folgezustände arteriosklerotischer Gefäßveränderungen wie auch die hohe Inzidenz akut letaler Verläufe machen es notwendig, mehr Licht in die Pathogenese der Arteriosklerose zu bringen. Erst das genaue und umfassende Verständnis der Atherogenese wird es ermöglichen, gezielte Präventionsmaßnahmen sowie kausale Therapiekonzepte zu entwickeln.

### 1.1. Atherogenese und Klassifikation der Arteriosklerose

Vor mehr als 150 Jahren prägte der Pathologe Lobstein in Straßburg den Begriff Arteriosklerose. Seitdem war das Arterioskleroseverständnis einem großen Wandel ausgesetzt. Den Bemühungen um eine einheitliche Nomenklatur und Klassifikation versuchte die WHO schon seit 1958 gerecht zu werden: Sie definierte die Arteriosklerose als „eine variable Kombination von Veränderungen der Intima von Arterien, bestehend aus fokaler Ansammlung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebsvermehrung und Calciumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“.<sup>93</sup> Sie teilte die Arteriosklerose in vier pathomorphologische Kategorien ein.

- **Fatty streak:** Erste sichtbare, oberflächliche, gelbe Flecken.
- **Fibröse Plaque:** Umschriebene, erhabene, feste und grau-weiße Intimaverdickung.
- **Atherom:** Arteriosklerotisches Plaque mit prädominanter „fettiger“ Erweichung.
- **Komplizierte Läsion:** Läsion mit zusätzlichen Veränderungen wie Thrombusbildung, Hämorrhagie, Ulzeration und Verkalkung.

Im Rahmen der aktuellen Fragestellungen reicht eine solche eher makroskopischen Beschreibungen zuzuordnende Terminologie nicht mehr aus. Nach Untersuchung eines großen rechtsmedizinischen Kollektivs insbesondere junger (unter 30jähriger) Patienten hat STARY<sup>77</sup> ein Modell verschiedener Stadien unter Berücksichtigung histologischer Kriterien entworfen. Gemeinsam mit der American Heart Association wurde 1995 eine neue Klassifikation für arteriosklerotische Läsionstypen ausgearbeitet (siehe Tabelle 1.1), die inzwischen international anerkannt und gebräuchlich ist.

**Tabelle 1.1: Die Klassifikation der arteriosklerotischen Plaquetypen<sup>8,77</sup>**

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

Während der Atherogenese werden diese Läsionstypen in unterschiedlicher Ausprägung durchlaufen. Dabei ist die Speicherung von Cholesterin in atheromatösen Plaques eine pathomorphologisch früh nachweisbare Veränderung. Vor allem das im LDL befindliche Cholesterin bewirkt, insbesondere wenn andere Risikofaktoren noch hinzukommen, eine Funktionsstörung der Endothelzellen. Diese Endotheldysfunktion erlaubt es Lipiden sowie Leukozyten, T-Lymphozyten und Monozyten in den subendothelialen Raum einzuwandern. Hier wandeln sich die Monozyten in Makrophagen um, nehmen über ihre Scavenger-Rezeptoren oxidiertes LDL auf und speichern es in ihrem Zytoplasma. Histomorphologisch imponieren sie nun als sogenannte Schaumzellen. Sie können der Gefäßwand sogar makroskopisch erkennbar eine gelbliche Verfärbung verleihen, weshalb dieses frühe Stadium der Arteriosklerose „Fatty Streaks“ genannt wird.

Ob diese Gefäßwandalterationen, die schon im Kindes- und frühen Erwachsenenalter beobachtet werden und sich häufig auch wieder zurückbilden, tatsächlich als pathologisch zu werten sind oder eher eine physiologische Adaptation auf verschiedene Belastungsreize darstellen, ist noch nicht geklärt. Fatty streaks können überall im arteriellen Gefäßbaum vorkommen, doch findet man sie bevorzugt an Gefäßaufzweigungen, starken Gefäßkrümmungen, also überall dort, wo Veränderungen im Blutfluß, Scherströmungen, Rückströmungen und Wirbelbildungen die Gefäßwand ununterbrochen belasten.<sup>24,67,68</sup>

Sind Schaumzellen mit oxidiertem LDL überladen, gehen sie zugrunde und es entwickelt sich im weiteren Verlauf ein Präatherom, Atherom und schließlich ein Fibroatherom. In seiner klassischen Ausprägung imponiert es als tiefintimales, lipidreiches, azelluläres Zentrum und einer darüberliegenden, kollagenfaserreichen Kappe (fibrous cap).<sup>27</sup> Die fibroatheromatöse Plaque ist von einem Endothelmonolayer noch lückenlos überzogen. Bedingt durch die

Schichtdickenzunahme der Intima ragt die Plaque in das Arterienlumen hinein und führt somit bereits zu einer Arterieneinengung. Poststenotisch nimmt die intimale Schichtdicke abrupt wieder ab. Diese Region wird als Plaqueschulter bezeichnet. Ab einer bestimmten intimalen Schichtdicke reicht die physiologische, transendotheliale Blutversorgung aus dem Arterienlumen mittels Diffusion nicht mehr aus. Es bilden sich kleine Kapillargefäße in der Intima, die sogenannten Neovaskularisationen.

Das klinisch manifeste Stadium der arteriosklerotischen Läsion ist die komplizierte Läsion. Häufig kommt es erst jetzt zu Ischämiesymptomen. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch Plaquekomplikationen wie Einblutung, intramuraler Thrombusbildung, Verkalkung oder Plaqueruptur.

## 1.2. Risikofaktoren für die Arteriosklerose

In den westlichen Industrienationen gilt als wichtigster Risikofaktor die Hypercholesterinämie, vor allem in der Form des Low Density Lipoproteins (LDL). So ist das LDL- Cholesterin die einzige Noxe, die für sich alleine zur Arteriosklerose, besonders zur frühzeitigen Koronarsklerose führen kann.<sup>71</sup>

Neben dem LDL- Cholesterin zählen zu den drei klassischen Risikofaktoren erster Ordnung die arterielle Hypertonie und das Zigarettenrauchen.

Beim Zigarettenrauchen schädigen neben der Vasokonstriktion toxische Substanzen die Endothelzellen. Darüberhinaus steigert Zigarettenrauchen schnell und nachhaltig die Fibrinogenkonzentration im Blut. Fibrinogen und seine Spaltprodukte wirken atherogen, sowohl über die Steigerung der Blutviskosität als auch über die vermehrte Adhäsion von Erythrozyten und Thrombozyten ans Endothel.

Die Hypertonie erhöht den mechanischen „Stress“ auf das Endothel. Ihr wird vor allem ein arterioskleroseauslösendes Prinzip an Gefäßverzweigungen und anderen Gefäßabschnitten mit Strömungsunregelmässigkeiten zugeschrieben.<sup>24</sup>

In ähnlichem Zusammenhang wird eine neurophysiologische Überstimulation diskutiert. Experimentell kann im Tierversuch durch Stimulation des Hypothalamus eine Vasokonstriktion mit Beeinflussung der Strömungsverhältnisse und einer Steigerung der Zellreplikation sowie einer Hypertrophie der Tunica media nachgewiesen werden.<sup>28</sup>

In der Framinghamstudie konnte nur der Diabetes mellitus eindeutig als zusätzlicher Arteriosklerose- Risikofaktor ausgemacht werden.

Desweiteren gelten als prädisponierende Arteriosklerosefaktoren Übergewicht, männliches Geschlecht, Hyperhomocysteinämie und arteriosklerotische Folgeerkrankungen in der Familienanamnese.

Interessanterweise belegen Daten aus einer prospektiven Kohortenstudie (Göttinger Risiko-, Inzidenz- und Prävalenzstudie - GRIPS)<sup>16</sup> mit über 5000 Männern und 5 Jahren Beobachtungszeit, daß sich die Bedeutung der Risikofaktoren je nach klinischer Manifestation der Arteriosklerose unterscheidet (Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2: Rangfolge der Risikofaktoren für die 3 häufigsten klinischen Manifestationen der Arteriosklerose**

	<b>Myokardinfarkt</b>	<b>Apoplex</b>	<b>pAVK</b>
1.	LDL- Cholesterin	Bluthochdruck	Bluthochdruck
2.	fam. Belastung	Fibrinogen	Rauchen
3.	Fibrinogen	Plasmaglukose	Plasmaglukose
4.	Lp(a)	Rauchen	LDL- Cholesterin
5.	HDL-Chol. (invers)	Lipoprotein a	Lipoprotein a

### 1.3. Die zelluläre Zusammensetzung der arteriosklerotischen Plaque

Bei der Bildung einer arteriosklerotischen Plaque sind Zellpopulationen mit aktiven zellulären Leistungen beteiligt. Zellkomponenten entstammen direkt aus dem Blutstrom (Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten). Andere Zellpopulationen sind in der Arterienwand ansässig (Endothelzellen und glatte Muskelzellen unterschiedlichen Phänotyps).

Diese Zellkomponenten beherrschen das histomorphologische Bild einer atheromatösen Plaque und entscheiden schlussendlich zusammen mit den protektiven Leistungen der Endothelzellen über „Dignität“ und Geschwindigkeit der Progredienz einer arteriosklerotischen Läsion. Die Zellen beeinflussen sich gegenseitig über ihre eigenen Zellgrenzen hinweg auf parakrinem Weg,<sup>67</sup> beispielsweise hinsichtlich der Modifikation des proliferativen Verhaltens.

Eine zentrale Frage der Arterioskleroseforschung unserer Tage ist, welchen zellulären Mechanismen eine wegweisende pathogenetische Funktion bei der Atherogenese zukommt und welche Zellpopulation dabei die entscheidende Rolle spielt.

Die physiologischen Aufgaben der jeweiligen Zellpopulation sowie ihre parakrinen Wechselwirkungen untereinander sollen in der folgenden Übersicht dargestellt werden.

#### **1.3.1. Endothelzellen**

Fünf physiologische Funktionen der Endothelzellen können, wenn sie pathophysiologisch entgleisen, zur Arterioskleroseentstehung beitragen:

- Erhaltung einer nicht atherogenen Oberfläche
- Selektiv-permeable Barriere für den Nährstoffaustausch zwischen Blutstrom und Arterienwand



- Aufrechterhaltung eines physiologischen Gefäßtonus
- Bildung und Sekretion von verschiedenen Wachstumsfaktoren
- Synthese von Bindegewebsmatrix.

So zählt zu den frühen Veränderungen in der Pathophysiologie der Arteriosklerose die Adhäsion von Monozyten und Leukozyten an das Endothel. Hierfür sind von den Endothelzellen selbst neusynthetisierte Oberflächenglykoproteine und chemotaktische Stoffe wie z. B. „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) verantwortlich. Mittels dieser parakrinen Hormone binden die Endothelzellen Monozyten und T-Lymphozyten sowie Thrombozyten.

Intimale Lipoproteinanreicherung ist ein weiteres Zeichen einer Endotheldysfunktion, bei der die selektive Permeabilität gestört ist. Es kommt zu einer vermehrten Transzytose von LDL, das in den Endothelzellen zu oxLDL oxidiert werden kann.<sup>29</sup> Dieses Oxidationsprodukt fördert in den Endothelzellen selbst die Expression von Adhäsionsmolekülen, chemotaktischen Stoffen und Wachstumsfaktoren.<sup>68</sup>

Die Aufrechterhaltung eines normalen Gefäßtonus durch die Freisetzung von Vasodilatoren (NO, PGI<sub>2</sub>) bzw Vasokonstriktoren (Endothelin, Angiotensin II) ist ein Schutzmechanismus der Endothelzellen auf Veränderungen im Blutfluß. OxLDL führt zu einem gesteigerten Katabolismus von NO. Dadurch wird die NO-induzierte Hemmung der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen aufgehoben.

Auf einen entsprechenden pathologischen Stimulus kann die Endothelzelle mit der Produktion von zahlreichen Wachstumsfaktoren wie z. B. „platelet-derived growth factor“ (PDGF) reagieren. Damit könnte die Endothelzelle die Replikation benachbarter glatter Muskelzellen und Makrophagen parakrin stimulieren.<sup>67</sup>

Bei fortgeschrittenen arteriosklerotischen Veränderungen spielt die Thrombozytenaggregation und Thrombusformation eine wichtige Rolle in Bezug auf die Entstehung arteriosklerotischer Folgeerkrankungen.<sup>77</sup> Durch eine Endothelschädigung wie z.B: die Plaqueruptur kommt es zur Präsentation thrombogener Gefäßwandanteile. Konsekutiv bildet sich ein intramuraler Thrombus aus, der das Gefäßlumen weiter einengen oder Quelle embolischer Ereignisse in der weiter distal liegenden Gefäßstrombahn sein kann.<sup>67</sup>

### **1.3.2. Glatte Muskelzellen**

Die Tunica media aller Gefäßwände besteht ausschließlich aus glatten Muskelzellen. Sie sorgen für einen dem physiologischen Bedarf angepaßten Gefäßtonus. Bei Erwachsenen sind vereinzelte glatte Muskelzellen in der Intima noch ein normales, physiologisches Phänomen. Die „response to injury“ Hypothese<sup>68</sup> besagt, daß glatte Muskelzellen, unter dem Einfluß von mitogenen Faktoren aus Endothelzellen, von der Media in die Intima migrieren und intramurale Makrophagen und benachbarte glatte Muskelzellen aktivieren. In der Intima könnten sie, wie im Tierversuch gezeigt,<sup>15</sup> durch Proliferation und Matrixsynthese für die Massenzunahme der Plaque verantwortlich sein. Allerdings konnten diese Tiermodelle bisher nur unbefriedigend auf die bei der humanen Arteriosklerose beobachteten Verhältnisse angewendet werden. Die Proliferation glatter Muskelzellen wird bei humanen Läsionen kontrovers diskutiert.<sup>50, 58</sup>

Untersuchungen zur Rolle der glatten Muskelzellen bei der Atherogenese werden durch die muskelzelltypische Fähigkeit erschwert, den Phänotyp zu verändern.<sup>12</sup> Unter physiologischen Bedingungen kommen in der Gefäßwand, vor allem in der Media, überwiegend kontraktile glatte Muskelzellen vor. Ihr Zytoplasma enthält Myofillamente in großer Konzentration. Sie können zu sogenannten „synthetic-type“ Gefäßmuskelzellen (Myofibroblasten) modifiziert werden, die überwiegend auf die Synthese von Bindegewebsmatrix eingestellt sind. Weitere modifizierte Phänotypen,<sup>1</sup> bis hin zu Phagozytose betreibenden Populationen<sup>12</sup> sind in arteriosklerotischen Läsionen nachgewiesen worden. Gordon<sup>26</sup> und Rekhter<sup>62</sup> bezeichneten diese heterogenen Muskelzellabkömmlinge als „unspezifische mesenchymale Zellen“.

Die Gefäßmuskelzellen produzieren ebenfalls einige Wachstumsfaktoren (z. B. PDGF, TGF $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ; IGF-1: insuline-like growth factor) und Zytokine (z. B. IL-1), mit denen sie ihre Nachbarzellen parakrin und sich selbst autokrin zu Wachstum und Proliferation anregen können.<sup>67, 68</sup>

### **1.3.3. Makrophagen**

Bei der Arteriosklerose spielen inflammatorische Zellen wie Monozyten und die daraus hervorgehenden Makrophagen eine große Rolle. Ihre Hauptbedeutung liegt in der Abräumfunktion von Lipiden.<sup>22</sup> Daneben sind sie für die Oxidation von LDL verantwortlich.<sup>29</sup> Ihre hohe Potenz, parakrine Mediatoren (z. B. PDGF; TGF $\beta$ ; bFGF: basic fibroblast growth factor) zu produzieren, könnte ihnen eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle proliferativer Ereignisse verleihen. Für diese Aufgabe besitzen sie auch Wachstumsinhibitoren wie Interleukin-1 und  $\gamma$ -Interferon.<sup>67,68</sup> Darüberhinaus stellen die Makrophagen die größte Quelle chemotaktischer Substanzen in der arteriosklerotischen Läsion dar (z. B. MCP-1: „monocyte chemotactic protein-1“).

Tierversuche<sup>66</sup> und Untersuchungen von humanem arteriosklerotischen Gewebe<sup>26,50,59,89</sup> haben gezeigt, daß Makrophagen eine für arteriosklerotisches Gewebe hohe Proliferationspotenz haben. Andererseits nehmen sie an einem regen Zellumsatz durch Apoptose und Nekrose teil,<sup>6,30</sup> so daß ihre Bedeutung für die Plaueprogression schwierig zu bewerten ist.

In letzter Zeit fanden sich Hinweise dafür, daß das Vorkommen von Makrophagen in arteriosklerotischen Gefäßwänden die Gefahr einer Plaqueruptur erhöht.<sup>48</sup> Dies wird auf die makrophagen-spezifische Bildung von Metalloproteinasen<sup>31,49</sup> zurückgeführt, die das kollagene Bindegewebe der „fibrous cap“ enzymatisch abbauen und eine Plaueulzeration mit konsekutiver intramuraler Thrombusbildung begünstigen können.

### **1.3.4. T- Lymphozyten**

Die Präsenz von T-Lymphozyten in arteriosklerotischen Plaques ist seit langem bekannt.<sup>61,67,68</sup> Über die Gründe ihrer Rekrutierung herrscht Unklarheit, da bisher kein spezifisches Antigen in der Arterienwand nachweislich mit ihnen assoziiert werden konnte. Eine unselektive Anlockung der Lymphozyten über Interleukin-2 aus Makrophagen ist vorstellbar.

Eine grössere Rolle dürfte ein immunologischer Prozess spielen, da die Mehrzahl der T-Lymphozyten in arteriosklerotischen Läsionen zu einer antigenspezifischen T-Zell-Subpopulation zählen.<sup>79</sup> Gegen oxidiertes LDL konnten bisher Autoantikörper nachgewiesen werden,<sup>40</sup> Die Suche nach spezifischen Antigenen, die mit einer T-Zell-Subpopulation assoziiert sind, blieb bisher erfolglos. Als spezifisches Antigen zur Stimulation der humoralen und zellulären Immunantwort würden in der arteriosklerotischen Intima neben modifizierten Lipoproteinen möglicherweise auch infektiöse Partikel<sup>39</sup> in Frage kommen.

Zusammengefasst ist unsere Kenntnis über die Rekrutierung und Akkumulation von T-Lymphozyten in arteriosklerotischen Gefäßwänden rudimentär. Auch über ihre Bedeutung bei der Atherogenese ist bisher wenig bekannt. Wahrscheinlich tragen die T-Lymphozyten zur Plaqueinstabilität und Plaqueruptur<sup>7</sup> direkt und indirekt über die Aktivierung von Makrophagen mit Hilfe des „granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) bei.<sup>67</sup>

### **1.3.5. Mastzellen**

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Desobliterate immunhistochemisch nicht nur auf die „etablierten“ Zellkomponenten der Arteriosklerose, sondern auch auf das Vorkommen von Mastzellen, weil ihnen in jüngster Zeit eine Rolle bei der Atherogenese zugeschrieben wurde.<sup>34</sup> Bisher ist noch nicht gesichert, ob Mastzellen tatsächlich in arteriosklerotischen Läsionen in nennenswerter Anzahl vorkommen bzw. überhaupt eine pathophysiologische Funktion erfüllen. Ihre reichhaltige Ausstattung mit Mediatorsubstanzen ließ Spekulationen über eine mögliche Rolle bei Destabilisierungsprozessen wie z.B. der Plaqueruptur aufkommen.<sup>35</sup>

## **1.4. Fragestellung**

### **1.4.1. Zellproliferation in humanen arteriosklerotischen Läsionen**

Die Einordnung proliferativer Ereignisse in das komplexe pathophysiologische Geschehen der Atherogenese stützt sich im wesentlichen auf die Ergebnisse tierexperimenteller Arteriosklerosemodelle.<sup>15,37,38,55,63</sup> In diesen tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Proliferation glatter Muskelzellen zu einer neointimalen Hyperplasie führt,<sup>15,55,63</sup> welche schlussendlich eine Arterienstenose bewirkt. Ungeklärt sind dagegen Ausmaß und strukturelle Bedeutung der zellulären Proliferation bei humanen Arterioskleroseformen. Untersuchungen von humanem Plaquegewebe, bei denen allgemein niedrige Zellproliferationsraten festgestellt wurden, stellen die Übertragbarkeit der Tiermodelle auf die humane Atherogenese in Frage.<sup>26,36,44,50,61,83</sup>

Im Gegensatz zu den zahlreichen tierexperimentellen Forschungsansätzen gibt es nur wenige Untersuchungen über die Zellproliferation bei der humanen Arteriosklerose. Es liegen Aussagen zur Zellproliferation im humanen arteriellen Gefäßbaum für die Coronararterien,<sup>50,25,26</sup> die Aorta,<sup>36</sup> die Arterien der unteren Extremität<sup>57</sup> und die Arteria carotis<sup>61</sup> vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, an Läsionen der Arteria carotis und der Arteria femoralis die Zellproliferation zu quantifizieren und die verschiedenen Zelltypen mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen zu identifizieren.

#### **1.4.2. Die Plaquetopographie der Karotidesobliterate**

Bisherige immunhistochemische Untersuchungen von humanem Arteriosklerosegewebe beschränkten sich weitgehend auf die Analyse von Plaquematerial, welches mittels Katheteratherektomie gewonnen wurde.<sup>25,50,58,83</sup> Dieses Arteriosklerosematerial ist fragmentiert und lässt eine Zuordnung zum pathoanatomischen Plaqueaufbau nicht zu. Dagegen boten die durch offene gefäßchirurgische Thrombendarteriektomie gewonnenen Operationspräparate der vorliegenden Arbeit den Vorteil, das Ausmaß der Zellproliferation in den verschiedenen, spezifischen Plaqueregionen voneinander getrennt untersuchen zu können. Die Desobliterate der Arteria carotis wiesen aus den charakteristischen Abschnitten der Stenose eine regelhafte Abfolge unterschiedlicher Ausprägungen der Arteriosklerose auf: normale Intima distal der Stenose, das stenosierendes Plaquezentrum sowie arteriosklerotisch veränderte und verdickte Intima proximal der Stenose. Dadurch konnte die Proliferation der spezifischen Zellpopulationen im Zusammenhang mit der Plaquetopographie studiert werden (weitere Einzelheiten siehe Kapitel 2: Material und Methoden).

#### **1.4.3. Unterschiede im Proliferationsmuster: Vergleich der Arteria carotis mit der Arteria femoralis**

Läsionen der Arteria femoralis gelten aufgrund einer histologischen und ultrastrukturellen Untersuchung<sup>69</sup> als Vc-Läsionen in der Einteilung nach STARY, mit einer lipidarmen Intimafibrose und einem Überwiegen glatter Muskelzellen. Dagegen wird für die Arteria carotis ein weit heterogeneres histomorphologisches Erscheinungsbild beschrieben, mit einem regen Wechsel zwischen zellreichen inflammatorischen Arealen und azellulären Verkalkungen und Debrisablagerungen. Da bereits diese histomorphologischen Unterschiede bekannt sind, darf eine Kongruenz im Proliferationsmuster der verschiedenen Zellpopulationen in den beiden Arterien nicht selbstverständlich vorausgesetzt werden. Darüberhinaus sind bislang nur wenige und methodisch nicht überzeugende Daten über die Zellreplikation in der Arteria femoralis publiziert worden.<sup>50,58</sup> Eine vergleichende Untersuchung kann mögliche Unterschiede in der Pathophysiologie der Arteriosklerose aufzeigen.

#### **1.4.4. Korrelation zwischen Risikofaktoren, Zellproliferation und Symptomatik**

Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, daß zwischen der Plaquehistomorphologie und der klinischen Symptomatik der Arterienstenose keine signifikanten Zusammenhänge zu erkennen sind.<sup>5,33</sup> Über die Zellproliferation und ihre Korrelation zur Symptomatik oder zu den arteriosklerotischen Risikofaktoren gibt es keine publizierten Untersuchungen. Für die Evaluierung antiproliferativer Therapieformen sind eventuelle Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß der Zellproliferation und den klinischen Parametern wie Symptomatik bzw Risikofaktoren zukünftig von grosser Bedeutung.

#### **1.4.5. Proliferation in Primärstenosen mit konsekutiver Restenose**

Bisher liegen keine Untersuchungen zu der Frage vor, ob quantitative Aspekte der Zellproliferation im arteriellen Desobliterat mit der Entwicklung einer Restenose im weiteren klinischen Verlauf vergesellschaftet sind. Daher wurden gezielt Desobliterate in diese Arbeit einbezogen, bei denen im postoperativen Verlauf eine Restenose aufgetreten war. Daraus könnten sich Hinweise ergeben, ob eine zukünftige Evaluation von immunhistochemischen Proliferationsmarkern als Prädiktoren für Stenoserezidive sinnvoll wäre.

Zusammenfassend ergeben sich damit konkret folgende fünf Fragen:

1. Welche proliferierenden Zellkomponenten lassen sich in humanen arteriosklerotischen Plaques nachweisen und wie hoch ist ihr Anteil?
2. In welchen pathoanatomischen Bereichen der arteriosklerotischen Plaque ist die höchste proliferative Aktivität?
3. Gibt es Unterschiede in der Proliferationshöhe und im Zelltyp der proliferierenden Zellen zwischen der Arteria carotis im Vergleich mit der Arteria femoralis?
4. Haben die Risikofaktoren für Arteriosklerose einen Einfluss auf die Proliferation? Korrelieren die Symptome der Patienten mit dem Ausmaß der Proliferation?
5. Gibt es Anhaltspunkte dafür, daß eine hohe Zellproliferation in Primärstenosen ein erhöhtes Restenosерisiko darstellt?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patientendaten**

Die Studie umfasste 40 Patienten mit Stenosen der Arteria carotis bzw. der Arteria femoralis, bei denen zwischen dem 18. 05. 1989 und dem 18. 06. 1996 im Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München eine gefäßchirurgische Endarteriektomie durchgeführt wurde. Die Patienten wurden über die Plaquentnahme zur feingeweblichen Untersuchung aufgeklärt und ihr schriftliches Einverständnis eingeholt. Die Genehmigung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission der Fakultät lag vor.

Bei Patientengruppe 1 und 2 erfolgte ein Patientenscreening hinsichtlich der vier Hauptrisikofaktoren für Arteriosklerose: Arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie (Serumcholesterol >240mg/dl), Zigarettenrauchen (derzeitiger oder ehemaliger Raucher, mehr als 5 Zigaretten pro Tag über Jahre) und Diabetes mellitus. Die vor stationärer Aufnahme regelmäßig eingenommene Medikation wurde erfragt.

Alle Eingriffe wurden in Vollnarkose mit Fentanyl und Halothan durchgeführt. Während der Abklemmzeit der jeweiligen Gefäßabschnitte wurde systemisch Heparin 100 I.E./kg appliziert. Die patientenspezifische präoperative Medikation wurde perioperativ fortgeführt, auch Thrombozytenaggregationshemmer wurden nicht abgesetzt.

Die Patienten wurden je nach Stenose Lokalisation (karotid / femoral) und postoperativem Verlauf (Stenoserezidiv innerhalb von zwei Jahren postoperativ) einer von 3 Gruppen zugeteilt:

- **Gruppe 1:** Primärstenosen der Arteria carotis (n = 25)
- **Gruppe 2:** Primärstenosen der Arteria femoralis (n = 10)
- **Gruppe 3:** Primärstenosen der Arteria carotis, die innerhalb von bis zu 2 Jahren postoperativ eine Restenose entwickelten (n = 5).

#### ***2.1.1. Gruppe 1: 26 Primärstenosen der Arteria carotis***

In dieser Gruppe befanden sich 25 Patienten (eine Patientin hatte bilaterale Stenosen) im durchschnittlichen Alter von  $67 \pm 8$  Jahren, 12 Frauen und 13 Männer mit dopplersonographisch und angiographisch gesicherten hochgradigen Carotisstenosen. Sie wurden aufgrund der Anamnese und des kraniellen CT-Befundes in asymptomatische oder symptomatische eingeteilt. 16 der 25 Patienten zeigten ischämiebedingte zerebrale Symptome (Amaurosis fugax, transiente ischämische Attacke oder Apoplex), 9 der Patienten waren asymptomatisch. (Tabelle 2.1.1.).

**Tabelle 2.1.1: Patientengruppe 1: 26 Primärstenosen der Arteria carotis.**

Name	Alter (Jahre)	Ge- schlecht	Risiko- faktoren	Medikation	Stenose- grad (%)
<b>Asymptomatische Stenosen</b>					
S. J.	71	m	H, L, Z	Ca, Ls, Be	80
K. F.	65	m	H, L, D, Z	ASS	80
B. A.	43	w	L, D, Z	ASS	80
P. J.	71	m	L, Z	ASS	80
E. V.	84	w	H	ASS, Ca, Dg	95
M. E.	59	m	H, Z	ASS, Be, ACE	95
H. R.	80	w	H, L, D	Ca, Dg	80
B. F.	68	w	H, L, D	ASS, Ca	90
A. K.	69	w	L	ASS, ACE	80
<b>Symptomatische Stenosen</b>					
M. G.	52	m	D, Z	ASS, Ca, ACE	60
S. E.	70	w	H, L, D	ASS, ACE	95
K. E.	64	m	H, L, Z	ASS	90
B. X.	54	m	H, L, Z	ASS, Be, Ls	80
H. A.	61	m	L	ASS	80
N. E.	73	w	L	ASS	80
S. P.	70	w	H	ASS	80
S. P.	75	m	L, H	ASS	80
S. I.	61	w	H, L, Z	ASS, ACE	80
M. J.	65	w	H, L, Z	ASS	90
M. J.	65	w	H, L, Z	ASS	80
R. J.	61	m	H, L, D, Z	ASS, Ca, Be	80
P. J.	71	m	H, L, z	ASS	80
G. B.	76	w	L	ASS	80
G. W.	80	m	H, L, Z	ASS	95
Z. E.	78	w	H, L, D	ASS, ACE	95
D. C.	71	w	H, L, Z	ASS, Ls, Ni	80

Risikofaktoren: H: Arterielle Hypertonie;  
L: Hyperlipidämie (Serumcholesterol >240mg/dl);  
Z: Zigarettenraucher (derzeitiger oder ehemaliger Raucher, mehr als 5 Zigaretten pro Tag über Jahre);  
D: Diabetes mellitus;

Medikation: ASS: Acetylsalizylsäure; Ls: Lipidsenker; Be:  $\beta$ -Blocker; Ca: Calciumantagonisten; ACE: ACE-Hemmer;  
Dg: Digitalis; Ni: Nitrate;

### 2.1.2. Gruppe 2: 10 Primärstenosen der Arteria femoralis

Für die Stenosen der Arteria femoralis wurde die klinische Stadieneinteilung nach Fontaine angewandt. In diese Gruppe wurden 10 Patienten (Durchschnittsalter  $64 \pm 9$  Jahre, 7 Männer, 3 Frauen) mit Symptomen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit Grad IIb bis IV nach Fontaine aufgenommen. Bei allen wurde angiographisch ein kompletter Verschluss der Arteria femoralis superficialis bzw. der Arteria iliaca externa diagnostiziert (Tabelle 2.1.2.).

**Tabelle 2.1.2: Patientengruppe 2: 10 Primärstenosen der Arteria femoralis.**

Name	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Klin. Stadium Fontaine	nach Risiko-faktoren	Medikation	Stenose-grad (%)
K. R.	70	m	IIb	H, L, D, Z	Ni	100
G. S.	66	m	IIb	H, L, D, Z	ASS	100
J. M.	57	m	IIb	L, Z	ASS, Ls, Ald	100
N. W.	62	m	IIb	Z	ASS	100
M. L.	49	m	IIb	Z	ASS	100
N. M.	53	m	III	H, L, Z	ASS, Ca	100
K. E.	72	w	IV	H, D	ACE, Ca, Dg, Ald	100
W. R.	75	w	IV	H	Dg, Be	100
J. K.	57	m	IV	D	ACE	100
K. G.	79	w	IV	H, Z	ASS	100

Risikofaktoren: H: Arterielle Hypertonie;  
L: Hyperlipidämie (Serumcholesterol  $>240\text{mg/dl}$ );  
Z: Zigarettenraucher (derzeitiger oder ehemaliger Raucher, mehr als 5 Zigaretten pro Tag über Jahre);  
D: Diabetes mellitus;

Medikation: ASS: Acetylsalicylsäure; Ls: Lipidsenker; Be:  $\beta$ -Blocker; Ca: Calciumantagonisten; ACE: ACE-Hemmer;  
Dg: Digitalis; Ni: Nitrate;

### **2.1.3. Gruppe 3: 5 Primärstenosen der Arteria carotis mit konsekutiver Restenose**

5 Patienten (Durchschnittsalter  $63 \pm 8$  Jahre, 3 Männer, 2 Frauen) präsentierten Restenosen innerhalb von bis zu 2 Jahren postoperativ nach erfolgter Thrombendarteriektomie einer Primärstenose in demselben Gefäßabschnitt. Retrospektiv wurde archiviertes Material der hochgradigen Primärstenosen der Arteria carotis (4 symptomatische, eine asymptomatische) untersucht (Tabelle 2.1.3.).

Obwohl bei der geringen Fallzahl von 5 Patienten eine statistische Auswertung nicht möglich ist, wird diese Gruppe in der vorliegenden Arbeit erörtert. Die 5 Desobliterate erlaubten uns eine explorative Abschätzung, ob „restenoseassoziierte“ Primärstenosen besondere Charakteristika des histologischen Bilds oder des Proliferationsmusters erkennen lassen.



**Tabelle 2.1.3: Patientengruppe 3: 5 Primärstenosen der Arteria carotis, bei denen später Restenosen auftraten.**

Name	Alter (Jahre)	Ge- schlecht	Risiko- faktoren	Medikation	Stenose- grad (%)
Asymptomatische Primärstenose					
C. A.	53	w	-	ASS	80
Symptomatische Primärstenosen					
H. A.	78	w	H, L	ASS, Be, Ls	90
G. D.	63	m	L	ASS	95
P. V.	61	m	L	ASS	90
F. R.	61	m	L, D	ASS, Be, Ls, Ni	90

Risikofaktoren: H: Arterielle Hypertonie;  
L: Hyperlipidämie (Serumcholesterol >240mg/dl);  
Z: Zigarettenraucher (derzeitiger oder ehemaliger Raucher, mehr als 5 Zigaretten pro Tag über Jahre);  
D: Diabetes mellitus;

Medikation: ASS: Acetylsalizylsäure; Ls: Lipidsenker; Be:  $\beta$ -Blocker; Ca: Calciumantagonisten; ACE: ACE-Hemmer; Dg: Digitalis; Ni: Nitrate; Ald: Aldosteronantagonisten.

## 2.2. Gewinnung und Aufarbeitung des humanen Arteriosklerosematerials

Die 41 Desobliterate wurden durch Thrombendarteriektomie gewonnen. Die Desobliterate wurden intraoperativ sofort in 4%igem Formalin (gepuffert bei pH 7,0) für 24 Stunden fixiert.

### **2.2.1. Arteria carotis (Gruppe 1 und 3)**

Bei den Carotidesobliteraten ermöglichte eine besonders vorsichtige Technik der Endarterektomie, daß die Plaquestruktur über die gesamte Plaqueausdehnung erhalten werden konnte. Intraoperativ wurde die Arteria carotis im Bereich der Karotidgabel und der Arteria carotis interna eröffnet. Der Plaque wurde in toto herausgeschält und in Formalin fixiert. Dieses Desobliterate wurde im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie/Klinikum rechts der Isar unter Berücksichtigung der Längsrichtung standardisiert in Paraffin eingebettet. Auf diese Weise konnten 3 $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt werden, die in Bezug zum Verlauf des Lumens der Entnahmeerterie longitudinal ausgerichtet waren. Sie zeigten den arteriosklerotischen Plaque in seiner gesamten Ausdehnung vom proximalen Abtragungsrand und Plaquezentrum über die arteriosklerotische Schulterregion bis zum distalen Abtragungsrand (siehe Abb. 2.4.1 und 2.4.2).

Bei der Patientengruppe 3 wurden die im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie/Klinikum rechts der Isar archivierten Paraffinblöcke der Karotisprimärstenosen auf gleiche Weise wie bei Gruppe 1 weiterbehandelt. Die Schnitte erfolgten idealerweise ebenfalls longitudinal in Bezug zum Verlauf des Lumens der Entnahmeerterie.

### **2.2.2. Arteria femoralis (Gruppe 2)**

Typischerweise sind die arteriosklerotischen Plaques der Arteria femoralis, verglichen mit denjenigen der Arteria carotis, von unregelmässigerem Aufbau und fragilerer Beschaffenheit. So konnten die Plaques in der Regel nicht erhalten werden. Die Desobliterate zerissen beim Ausschälen manchmal in einige Teilstücke. Zur histologischen Auswertung lagen teilweise nur noch Plaquefragmente vor, die eine Zuordnung zur ursprünglichen pathoanatomischen Plaquetopographie erschwerten.

Nach der Paraffineinbettung wurden 3µm dicke Querschnitte durch zentrale Plaqueanteile angefertigt. Wie bei den Desobliteraten der Arteria carotis wurde auch hier versucht, eine Serie von mehreren konsekutiven (direkt aufeinanderfolgenden) Schnitten zu bekommen. Mittels dieser Serienschritte war es möglich, fast identische histologische Präparate mit unterschiedlichen immunhistochemischen Markern zu färben und vergleichend auszuwerten.

## **2.3. Histomorphologische Beurteilung**

Die histomorphologische Beurteilung erfolgte, wie auch die Auswertung der immunhistochemischen Präparate mit einem Zeiss Mikroskop. Je Schnittpräparat wurden 8-12 Gesichtsfelder mit 400 facher Vergrößerung (High-power field - HPF) ohne Kenntnis der klinischen Begleitdaten ausgewertet. Der Terminus „High power field“ wird im Folgenden synonym mit dem Begriff „Gesichtsfeld“ (GF), dem 400fach vergrößerten mikroskopischen Ausschnitt verwendet.

Von den 40 Patienten wurden 41 Arteridesobliterate histologisch untersucht, 31 aus der Arteria carotis (Patientengruppe 1 und 3) und 10 aus der Arteria femoralis (Patientengruppe 2).

Bei den Karotidesobliteraten wurden pro Desobliterat (d.h. Patient) durchschnittlich 12 GF ausgewertet. Dabei wurde darauf geachtet, daß mit den 12 Gesichtsfeldern das histologische Bild des gesamten Präparats repräsentiert war. Die Femoralispräparate waren im Vergleich zu den Karotispräparaten von einer geringeren histomorphologischen Vielfalt. Mit durchschnittlich 8 ausgewerteten Gesichtsfeldern pro Desobliterat war das eher gleichförmige histologische Gesamtbild ausreichend repräsentiert.

Zur histomorphologischen Beurteilung wurden Hämatoxylin/Eosin (HE) und Elastika van Gieson (E.v.G.) Färbungen angefertigt. In der HE Färbung wurde für jedes GF die Gesamtzellzahl quantitativ als Zahl der im Gesichtsfeld vorhandenen Zellkerne bestimmt. Avitale Areale ohne Zellkerne im gesamten Gesichtsfeld sind bei der Untersuchung der Zellproliferation nicht von Bedeutung und wurden nicht berücksichtigt.

Bei allen Desobliteraten wurde zuerst die Arterioskleroseregion mit der größten intimalen Schichtdickenzunahme aufgesucht. Nach dem dort vorherrschenden histologischen Bild wurde es einem Läsionstyp I-VI zugeschrieben. Die Einteilung erfolgte gemäß der Empfehlung des „Comittee on Vascular Lesions of the Council of Atherosclerosis, American Heart Association“<sup>77</sup> (siehe Tabelle 1.1). Darin ist der Läsionstyp VI definiert als Typ IV oder V mit der zusätzlichen Komplikation einer

Plaqueruptur (VIa), einer Plauehämorrhagie (VIb) und/oder einem intramuralen Thrombus (VIc). Da bei den Enderarteriektomie-Desobliteraten eine frische Plaqueruptur nicht von einem intraoperativ zugefügten Artefakt unterschieden werden konnte, wurden nur Plauehämorrhagie und intramuraler Thrombus mit histologischen Anhaltspunkten für sekundäre Reparaturvorgänge als Läsionstyp VI gewertet.

### **2.3.1. Definition der histomorphologischen Charakteristika**

Bei der Auswertung der mikroskopischen Gesichtsfelder wurden 11 histomorphologisch definierte Charakteristika dokumentiert und statistisch ausgewertet:

Laminäre Zellausrichtung: Mehr als 75 % der Fläche des Gesichtsfeldes zeigte länglich ovale Zellkerne, deren Längsachsen parallel zueinander ausgerichtet waren (z. B. typischer Befund bei einem Längsschnitt durch die nicht pathologisch veränderte Media).

Homogene Zellverteilung: Alle Areale des Gesichtsfeldes wiesen eine annähernd identische Zellkerndichte auf.

Lymphozyten: Das Gesichtsfeld wies mehr als 5 Lymphozyten auf, im Sinne eines „lockeren diffusen lymphozytären Infiltrats“.

Lymphozytäres Infiltrat: Dabei handelte es sich um dichte lymphozytäre Infiltrate im Sinne von einer fokalen Anhäufung von mehr als 50 Lymphozyten pro HPF.

Schaumzellen: Im Gesichtsfeld befanden sich mehr als 5 lipidspeichernd Makrophagen, sog. Schaumzellen.

Cholesterinkristalle: Im Gesichtsfeld herrschte das Bild einer sehr zellarmen Nekrose mit zahlreichen „Cholesterinspalten“ vor.

Verkalkung: In mehr als 1/4 des Gesichtsfeldes dominierten feingranuläre oder grobschollige Kalksalzeinlagerungen.

Plauehämorrhagie: Es waren Erythrozyten außerhalb von Vasa vasorum oder Neovaskularisationen ins Gewebe eingelagert. Die Einblutungen durften nicht vergesellschaftet sein mit frischen Gewebeszerreißungen (zum Ausschluß eines Artefakts durch intraoperativ verursachte Einblutungen).

Neovaskularisation: Es mußte wenigstens eine Kapillare pro HPF angeschnitten sein. Mit Hilfe der homologen Gesichtsfelder im immunhistochemischen, Faktor VIII (von Willebrand-Faktor) markierten Präparat konnten die Neovaskularisationen zusätzlich nachgewiesen werden.

Siderophagen: Bei mehr als 2 sideropigmenthaltigen Makrophagen wurde das Gesichtsfeld als Siderophagen-positiv gewertet.

Intramuraler Thrombus: In die Arterienwand integriertes thrombotisches Material, bestehend aus Blutablagerungen in unterschiedlichen Organisationsstadien.

## 2.4. Die Plaquetopographie

Von jedem Schnittpräparat wurde mit 40 facher Vergrößerung eine Übersicht gewonnen, um die Lokalisation jedes ausgewerteten HPF genau angeben zu können. Bei allen 3 Gruppen wurde mit Hilfe des E.v.G.-gefärbten Präparats anhand der Membrana elastica interna alle Gesichtsfelder einer medialen oder intimalen Lokalisation zugeschrieben. Desweiteren wurde innerhalb der Intima noch zwischen lumennaher und medianaher Lokalisation unterschieden. Somit ergaben sich folgende drei für die Tiefenlokalisation des HPF in der Arterienwand relevanten Angaben.

O<sub>i</sub> = oberflächliche (lumennahe) Intima

T<sub>i</sub> = tiefe Intima

M = Media.

Darüberhinaus wurden bei den Karotisstenosen (Gruppe 1 und 3) 4 Plaqueregionen (Abb 2.4.1 und Tabelle 2.4.) unterschieden, die typisch für den Aufbau eines arteriosklerotischen Plaques in der Arteria carotis sind. Hier kann, wie in Abb. 2.4. schematisch gezeigt, eine prästenotisch diffus verdickte Intima (DIT - Diffus intimal thickening) beobachtet werden, auf die weiter distal das Plaquezentrum mit der grössten intimalen Schichtdicke und den histologisch ausgeprägtesten Umbauzeichen folgt. Dies ist der Bereich der maximalen Lumeneinengung der Arterie. Die intimale Schichtdicke nimmt in der Plaqueschulter abrupt ab und geht poststenotisch in eine regelrechte Intima über.

**Tabelle 2.4: Definition der intimalen Plaqueregionen bei den Karotidesobliteraten**

Intimale Regionen	Definition	Läsionstyp *
Regelrechte Intima	Morphologisch regelrechte Intima, allenfalls geringe Zunahme der intimalen Schichtdicke, intakte Lamina elastica interna. Am distalen (poststenotischen) Abtragungsrand des Desobliterats anzutreffen.	0/I
Plaqueschulter	Übergangsbereich zwischen regelrechter Intima und Plaquezentrum mit stetiger Zunahme der intimalen Schichtdicke aufgrund erhöhter Zellzahl und Lipidablagerungen. Anteile des nekrotischen Core sind nicht vereinbar mit der Plaqueschulter.	II/III
Plaquezentrum	Zentralbereich der Stenose mit dem nekrotischen Core und maximaler intimaler Schichtdicke. Häufig zusätzlich Komplikationsstadien wie Einblutung und/oder intramuraler Thrombus.	V/VI
Diffuse intimale Schichtdickenzunahme (DIT = diffuse intimal thickening)	Plane Läsion proximal (prästenotisch) des Plaquezentrums mit konstanter Verdickung der Intima aufgrund kleiner Core-Anteile, eines extrazellulären Lipidpools und/oder einer Zunahme kollagener Matrixbestandteile.	III/IV

\*Die histologische Klassifizierung des Läsionstyps erfolgte nach einer Empfehlung des „Committee on Vascular Lesions of the Council of Atherosclerosis, American Heart Association“<sup>8,77</sup>.

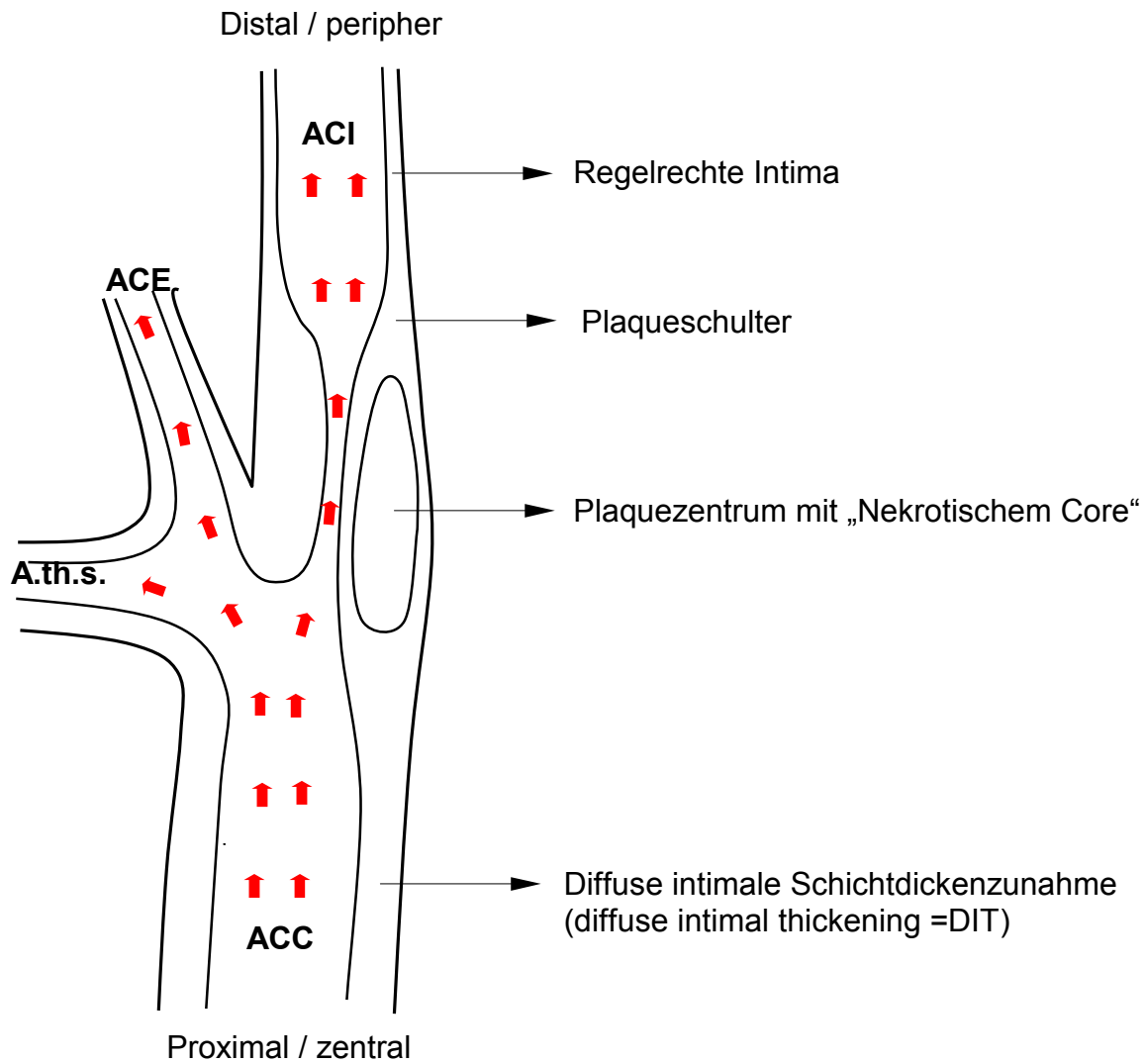


Abb. 2.4.1: Schematische Darstellung der Lokalisation der Plaqueregionen in einer arteriosklerotischen Läsion der Arteria carotis. Gezeigt ist die Aufzweigung der Arteria carotis communis (ACC) in die Arteria carotis interna (ACI) und die Arteria carotis externa (ACE), zusätzlich Abgang der Arteria thyroidea superior (A.th.s.).

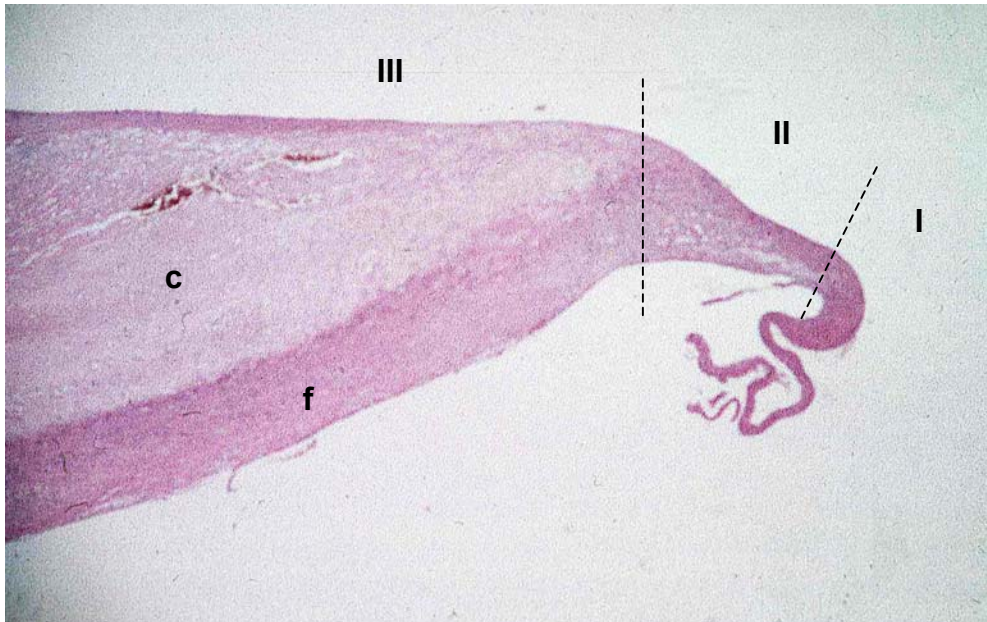


Abb. 2.4.2: Longitudinalschnitt durch eine Karotisläsion mit Plaquezentrum (III), Plaqueschulter (II) und distalem Übergang in regelrechte Intima (I). (f fibrous cap, c Core-Region mit Ablagerung von atheromatösem Material, HE-Färbung, 20fach vergrößert)

## 2.5. Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbetechniken dienen in Serienschritten in Einfach- und Doppelfärbungen zur Zelldifferenzierung und zum Nachweis proliferationsassoziierter Antigene. Mit Hilfe monoklonaler Primär- und Sekundärantikörper wurden glatte Muskelzellen, Mastzellen, Endothelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten dargestellt (Tabelle 2.5).

Die 3µm dicken Schnitte wurden über Nacht im Brutschrank bei 48°C getrocknet und anschließend entparaffiniert. Bevor die Präparate nun mit monoklonalen Antikörpern beschickt werden konnten, mußte eine Vorbehandlung (Andauung) zur Verstärkung der Reaktivität des Primärantikörpers mit dem für ihn spezifischen Epitop erfolgen (Abb 2.5.1). Diese Andauung bestand, je nach Antikörper, aus:

- Kochen in Citratpuffer in der Mikrowelle<sup>73</sup> bei 750 Watt dreimal 5 Minuten
- Kochen im Dampfkochtopf einmal für 6 Minuten
- Andauung mit 0,1%iger Pronase.

Zusätzlich war die Blockade der endogenen Peroxidase mit 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung bei der DAB-Methode obligatorisch.

**Tabelle 2.5: Immunhistochemische Marker**

<b>Antigen</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>
<b>Ki-67</b>	Proliferierende Zellen	Maus	MIB1 lot No. 7000/96
<b>CD68</b>	Makrophagen	Maus	RG-M1 code No. U 7029
<b>CD68</b> (bei den Doppelfärbungen)	Makrophagen	Maus	KP1 code No.M 0814
<b>Von-Willebrand-Faktor</b>	Endothelzellen	Maus	F8/86 code No. M 616
<b>Glattmuskuläres <math>\alpha</math>-Actin</b>	Glatte Muskelzellen	Maus	HHP35 code No. M 0635
<b>Mastzelltryptase</b>	Mastzellen	Maus	AA1 code No.
<b>CD45 RO</b> (Doppelfärbungen)	T-Lymphozyten	Maus	UCHL1 code No. M 0742
<b>CD3</b> (Arteria femoralis)	T-Lymphozyten	Kaninchen	HRP code No. U 026

**Tabelle 2.5.1: Vorbehandlung und Detektionssysteme**

<b>Antigen</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Detektion</b>
<b>Ki-67</b>	Mikrowelle. Blockade der endog. Peroxidase.	ABC-Methode. Entwicklung mit DAB.
<b>CD68 (RG-M1)</b>	Andauung mit Pronase. Blockade der endog. Peroxidase.	EPOS Entwicklung mit DAB.
<b>CD68 (KP1)</b> (bei den Doppelfärbungen)	Andauung mit Pronase.	APAAP. Entwicklung mit Fast Red.
<b>Von-Willebrand-Faktor</b>	Andauung mit Pronase.	APAAP. Entwicklung mit Fast Red.
<b>Glattmuskuläres <math>\alpha</math>-Actin</b>	Andauung mit Pronase.	APAAP. Entwicklung mit Fast Red.
<b>Mastzelltryptase</b>	Andauung mit Pronase.	APAAP. Entwicklung mit Fast Red.
<b>CD45 RO</b> (Doppelfärbungen)	Dampfkochtopf. Blockade der endog. Peroxidase.	B-SA.-Methode. Entwicklung mit Fast Red.
<b>CD3</b> (Arteria femoralis)	Andauung mit Pronase. Blockade der endog. Peroxidase.	EPOS. Entwicklung mit DAB

**2.5.1. Detektionssysteme**

Die einzelnen monoklonalen Antikörper wurden mit einer indirekten Methode detektiert, d.h. nicht der Primärantikörper sondern erst der Zweit- oder Drittantikörper war enzymkonjugiert. Als indirekte Detektionssysteme kamen entweder der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Methode), der APAAP-Komplex oder das EPOS-System zur Anwendung.

Bei der **ABC-Methode** wird ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex an einen biotinylierten Sekundärantikörper unter Ausnützung der hohen Affinität von Avidin zu Biotin gebunden. Die Peroxidase wird dann histochemisch nachgewiesen (Abb. 2.5.1). Auf dem gleichen Prinzip basiert ein Alkalische-Phosphatase-konjugierter Streptavidin-Biotin-Komplex (aus dem Biotin-Streptavidin-Amplifikations (**B-SA**)-Nachweissystem, Bio Genex, San Ramon, CA).

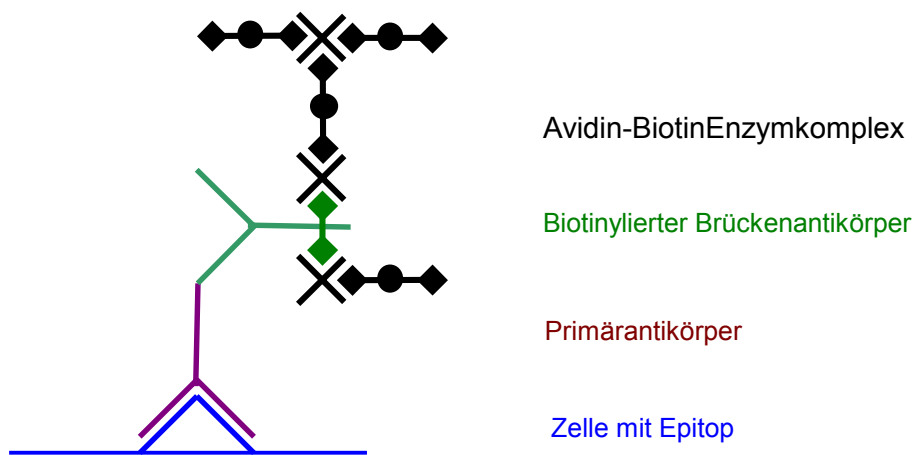


Abb. 2.5.1: Schematische Darstellung der ABC-Methode.

Der **APAAP-Komplex** (Dianova, Hamburg) ist ein löslicher Enzym-Anti-Enzymkomplex. Hierbei bindet ein Komplex aus dem Enzym Alkalische Phosphatase und dem dazugehörigen Antikörper (Antialkalische Phosphatase) mit seinem Fc-Teil an dem Fab-Teil des Brückenantikörpers (Abb 2.5.2). Die Entwicklung der mit dem APAAP-Komplex detektierten Zellen erfolgte mit Fast Red (Naphtol-AS-Mx-Phosphat/Chromogen Fast red TR, Serva, Heidelberg).



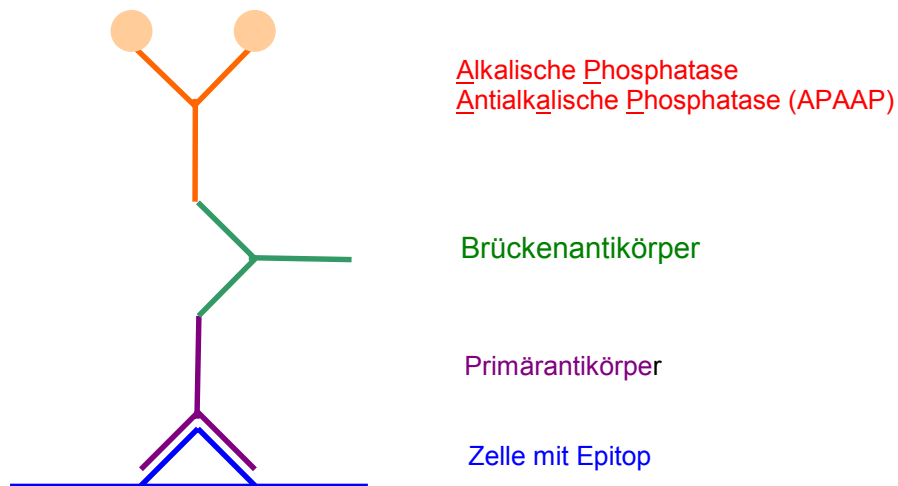


Abb. 2.5.2: Schematische Darstellung der APAAP-Methode

Im **EPOS-System** (Enhanced Polymer One-Step-Staining) ist der Primärantikörper über ein inertes polymeres Dextran mit dem Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) verbunden, das mit 0,1%ige 3'3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (Sigma, Deisenhofen) entwickelt wurde (Abb 2.5.3.).

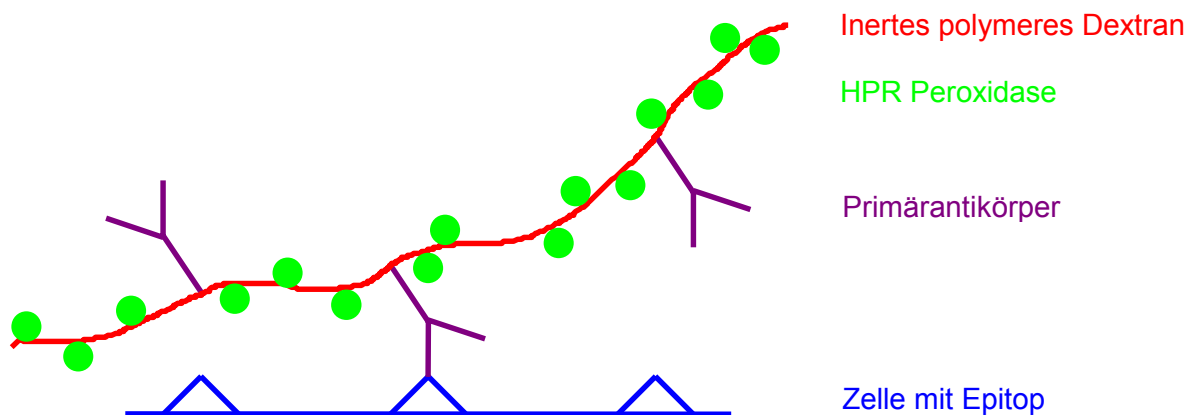


Abb. 2.5.3. Schematische Darstellung des EPOS-Systems

### 2.5.2. Immunhistochemische Einfachfärbungen

Für den Nachweis proliferierender Zellen dienten Antikörper mit Spezifität für Ki-67. Die Expression dieses Antigens ist mit den Phasen des Zellzyklus assoziiert und gilt als spezifisch für die reduplikative DNA-Syntheseaktivität. Ki-67 ist ein Kernantigen mit einem Molekulargewicht von 345 kD, welches als Hilfsenzym der DNA-Polymerase in der späten G1-, S-, G2- und Metaphase exprimiert wird. Es lässt sich auch am formalinfixierten Präparat durch den monoklonalen Antikörper MIB1 nach entsprechender Vorbehandlung nachweisen<sup>21,22</sup>.

Für die Anfertigung der **MIB1** Färbungen wurden die vorbehandelten Schnitte (siehe oben) mit dem Primärantikörper MIB1 (Verdünnung 1:20 in 1% BSA, Dianova, Hamburg) in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Im Rahmen der ABC-Methode inkubierten wir 30 Minuten mit einem biotinylierten Zweitantikörper (anti-Maus IgG, Verdünnung 1:200 in Humanserum) und anschließend weitere 30 Minuten mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex aus dem ABC-Elite Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Als Substrat der Peroxidase diente 0,1%ige 3'3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (Sigma, Deisenhofen). Nach Gegenfärbung mit Hämalaun, aufsteigender Alkoholreihe und Xylol-Behandlung wurde mit Eukitt eingedeckt.

Für die Darstellung glatter Muskelzellen wurde mit dem Primärantikörper gegen  $\alpha$ -**Aktin** (Verdünnung 1:50 in BSA) bei Raumtemperatur für 2 Std. inkubiert, anschließend mit dem Brückenantikörper (Kaninchen anti-Maus IgG, 1:50 in 20 % Humanserum, Dianova, Hamburg) für 30 Minuten. Nun folgte die 30-minütige Inkubation mit dem APAAP-Komplex (1:50 in PBS-Puffer, Dianova). Nach Anfärbung mit Fast Red wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt und in Glyzeringelatine eingedeckt.

Die immunhistochemische Markierung der **Mastzelltryptase** und des **von-Willebrand-Faktors (Faktor VIII)** erfolgte analog der für  $\alpha$ -Aktin angegebenen Methode mit einem monoklonalen Maus-Antikörper (Dako) in der Verdünnung 1:100 bzw. 1:40 in 1% BSA.

Zur immunhistochemischen Färbung der **CD68** exprimierenden Zellen wurden die Schnitte nach der Vorbehandlung mit einem unverdünnten monoklonalen Maus-Antikörper (Dako) aus dem EPOS-System inkubiert und direkt mit DAB entwickelt sowie mit Hämalaun gegengefärbt.

Die Desobliterate der Arteria femoralis wurden zusätzlich mit einem T-Zell-spezifischen **CD3** Antikörper (unverdünnter monoklonaler Kaninchenantikörper aus dem EPOS-System, Dako) analog der CD-68 Markierung beschickt und entwickelt.

Als Positivkontrollen bei den MIB1,  $\alpha$ -Aktin und Faktor VIII Färbungen wurde Dünndarmmukosa (Abb. 2.5.4), bei den CD68 und CD3 Markierungen lymphatisches Gewebe sowie bei der Mastzelltryptase Tonsillengewebe verwendet. Kontrollen mit normalem Maus-Serum und anschließender Applikation des Zweitantikörpers waren jeweils negativ.

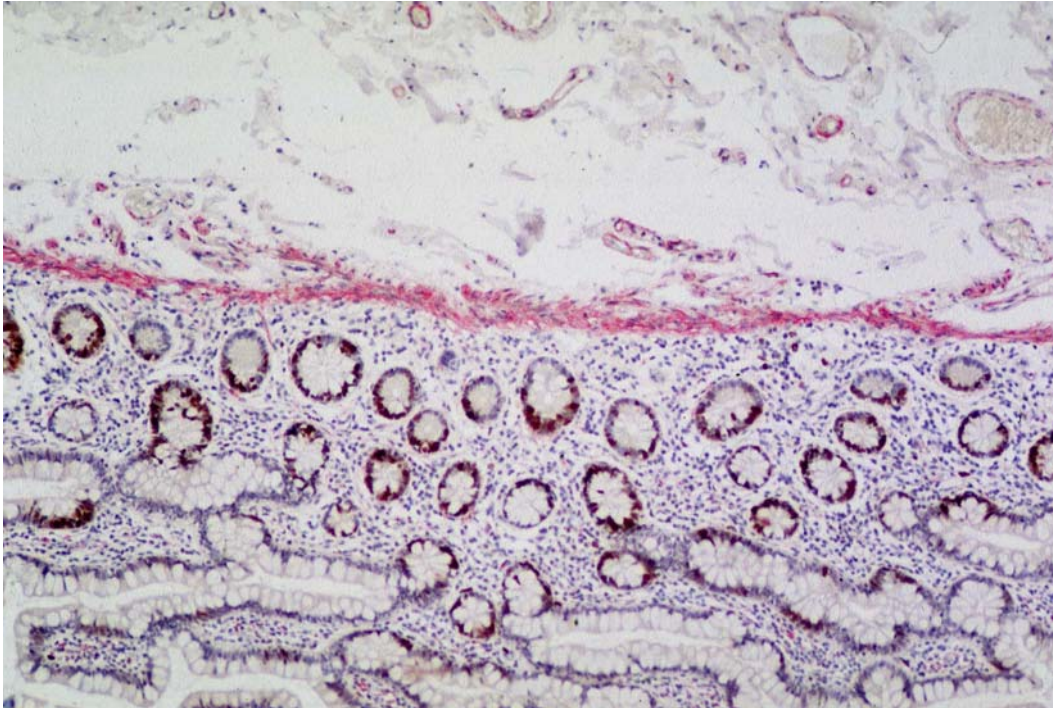


Abb. 2.5.4: Positivkontrolle der immunhistochemischen Doppelmarkierung von Ki-67 (MIB1) und  $\alpha$ -Aktin (200fach vergrößert). Schnitt durch die Darmwand (Jejunum): MIB1 positive Zellen sind mit brauner Kernfarbe in den Krypten erkennbar (DAB). Die Doppelfärbung mit Antikörpern gegen glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin (APAAP) zeigt rot markiert die glatten Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae.

### 2.5.3. Immunhistochemische Doppelfärbungen

Zur Bestimmung des Zelltyps der in Proliferation befindlichen Zellen wurden bei 11 Patienten Doppelfärbungen vorgenommen (bei 10 Patienten aus Gruppe 1 und einem aus Gruppe 3). Jeder immunhistochemische Differenzierungsmarker (CD68, Faktor VIII,  $\alpha$ -Aktin und CD45 RO) wurde in Serienschnitten jeweils mit MIB1 kombiniert. So konnten in den ausgewählten, durch die Serienschnitte hindurch korrespondierenden HPFs, die mindestens 3 MIB1-detektierte Zellen aufweisen mußten, doppeltgefärbte Zellen als proliferierende Makrophagen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder T-Lymphozyten angesprochen werden. Eine Doppelfärbung mit MIB1 und Mastzelltryptase haben wir wegen der geringen Mastzellzahl in den Desobliteraten nicht durchgeführt.

In diesen 11 doppelgefärbten Desobliteraten wurden 83 HPFs (in 4 Schnitten pro Desobliterat) untersucht. Es wurden folgende 7 Kriterien erhoben:

- Gesamtzellzahl
- Gesamtzahl der MIB1 markierten Zellen
- MIB1 und CD68 markierte Zellen
- MIB1 und  $\alpha$ -Aktin markierte Zellen
- MIB1 und Faktor VIII markierte Zellen

- MIB1 und CD45 RO markierte Zellen
- MIB1 markierte Zellen, ohne Reaktion mit den 4 anderen Antikörpern.

Eine immunhistochemische Darstellung von zwei unterschiedlichen Antigenen auf einem Schnitt erforderte die Verwendung unterschiedlicher Substrate bzw. Enzyme. Deshalb wurde MIB1 immer mit der ABC-Methode und die jeweilige Zweitfärbung immer mit der APAAP-Methode durchgeführt. Bei der **CD68** Markierung mußte auch auf eine indirekte Methode mit einem APAAP-kompatiblen Mausantikörper (Klon KP1, Dako) umgestellt werden. Als erster Schritt wurde immer die MIB1 Färbung durchgeführt, danach mehrmals reichlich mit PBS gespült, um Reste der Maus-anti-Mensch Antikörper vollständig zu entfernen. Dadurch konnten falsch positive Markierungen bei der jeweils kombinierten Zweitfärbung vermieden werden.

Die erhobenen Befunde der Einfachfärbungen legten nahe, bei den Doppelfärbungen auch die Anzahl der T-Lymphozyten genau zu belegen. Deshalb färbten wir zusätzlich mit einem **CD45 RO** Antikörper, der sich durch hohe Affinität gegenüber CD4 und CD8 sowie gegen reife aktivierte T- Lymphozyten auszeichnet<sup>77</sup>.

Für diese Färbung wurden die Schnitte nach der oben erwähnten Vorbehandlung mit dem Primärantikörper CD45 RO (Verdünnung 1:10 in 1% BSA, Dako) 2 Std inkubiert. Die nun antikörpermarkierten Zellen wurden mit Hilfe eines biotinylierten Brückenantikörpers (Verdünnung 1:50 in PBS, SuperSensitive Kit, Bio Genex, San Ramon, CA) und eines Alkalische-Phosphatase-konjugiertes Streptavidin-Biotin-Komplexes (aus dem Biotin-Streptavidin-Amplifikations-Nachweissystem, Bio Genex, San Ramon, CA) detektiert sowie mit Fast Red rot angefärbt. Als Positivkontrolle diente lymphatisches Gewebe.

## 2.6. Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

Für die statistische Analyse des Zusammenhangs zwischen Histomorphologie und Ki-67-Positivität wurde ein generalisiertes lineares Modell für korrelierte Daten zugrunde gelegt und mittels eines „Generalized equation estimation“ (GEE) Ansatzes ausgewertet. Damit konnte für die ausgewerteten Gesichtsfelder die Signifikanz für das gemeinsame Auftreten von proliferierenden Zellen und den jeweiligen histomorphologischen Charakteristika berechnet werden. Bei einem p-Wert  $< 0,05$  wurde von einer signifikanten Korrelation ausgegangen.

Diese statistische Analyse wurde erst durch die angefertigten Serienschnitte ermöglicht: Zu den Gesichtsfeldern im HE Präparat, in denen das jeweils vorherrschende histomorphologische Merkmal diagnostiziert wurde, konnte das weitgehend identische Gesichtsfeld im MIB1-Präparat aufgesucht werden. Bei mindestens einer MIB1 positiven Zelle wurde das Gesichtsfeld als „Ki-67 positiv“ gewertet.

Der statistische Zusammenhang zwischen klinischen Charakteristika und Proliferation wurde anhand von Kontingenztafeln beschrieben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Die Histomorphologie der Desobliterate

In den 41 untersuchten Arterien-desobliteraten wurden insgesamt  $n = 453$  mikroskopische Gesichtsfelder histomorphologisch ausgewertet, aufgeteilt in 373 GF in Arteria carotis-Desobliteraten und 80 GF in Arteria femoralis-Desobliteraten. Je Desobliterat wurden zwischen 6 und 16 Gesichtsfelder untersucht.

Die Hauptanteile der Präparate bestanden aus Intima. Zusätzlich konnte bei 14 der 41 Patienten Gefäßwandanteile der Tunica media bestimmt und ausgewertet werden. Jedoch betrug ihr Anteil an allen ausgewerteten Gesichtsfeldern nur 3,3%. Die Grenze zwischen Intima und Media wurde mit Hilfe der im E.v.G.-Präparat gut sichtbaren Lamina elastica interna festgestellt. Dies war bei einigen Schnitten durch eine massive Elasticaaufspaltung erschwert. Doch konnte letztlich in mehr als 95% der Schnitte der Verlauf der ursprünglichen Lamina elastica interna (höchste Dichte der elastischen Fasern) zweifelsfrei bestimmt werden.

Tabelle 3.1. gibt einen Überblick über die durchschnittliche Zellzahl und die Häufigkeit vorgefundener histologischer Strukturen, die weiter oben schon definiert worden sind (siehe Kapitel 2.3.1.).

**Tabelle 3.1: Häufigkeit der histomorphologischen Merkmale in den 3 Patientengruppen.**

Histomorphologie	Gruppe 1 insges. 320 GF		Gruppe 2 insges. 80 GF		Gruppe 3 insges. 53 GF	
<b>Mittlere Zellzahl/GF</b>	160		134		170	
<b>Laminäre Zellausrichtung</b>	33 GF	10,3%	9 GF	11,3%	2 GF	3,8%
<b>Homogene Zellverteilung</b>	162 GF	50,6%	33 GF	41,3%	16 GF	30,2%
<b>Lymphozyten</b>	148 GF	46,3%	48 GF	60,0%	24 GF	45,3%
<b>Lymphozytäres Infiltrat</b>	28 GF	8,8%	9 GF	11,3%	5 GF	9,4%
<b>Schaumzellen</b>	75 GF	23,4%	18 GF	22,5%	11 GF	20,8%
<b>Cholesterinkristalle</b>	27 GF	8,4%	6 GF	7,5%	4 GF	7,55%
<b>Verkalkung</b>	27 GF	8,4%	13 GF	16,3%	6 GF	11,3%
<b>Plauehämorrhagie</b>	42 GF	13,1%	13 GF	16,3%	5 GF	9,4%
<b>Neovaskularisation</b>	73 GF	22,8%	22 GF	27,5%	13 GF	24,5%
<b>Siderophagen</b>	50 GF	15,6%	11 GF	13,8%	3 GF	5,7%
<b>Intramuraler Thrombus</b>	6 GF	1,9%	7 GF	8,8%	1 GF	1,9%

##### 3.1.1. Die Histomorphologie der Karotidesobliterate (Gruppe 1 und 3)

Alle Karotidesobliterate zählten zu Läsionen vom Typ V oder VI nach STARY<sup>77</sup>. Die Zellzahl in den intimalen Gesichtsfeldern der Gruppe 1 variierte stark zwischen 5 und 800 Zellen, durchschnittlich wurden  $160 \pm 126$  Zellkerne pro Gesichtsfeld (=Z/GF)

entsprechend  $815 \pm 643$  Z/mm<sup>3</sup> gezählt. Jedoch zeigte sich zwischen den Regionen kein deutlicher Unterschied (Regelrechte Intima:  $122 \pm 70$  Z/GF; Plaqueschulter:  $131 \pm 71$  Z/GF; Plaquezentrum:  $176 \pm 152$  Z/GF; DIT:  $154 \pm 94$  Z/GF).

Bei den 5 Desobliteraten der Gruppe 3 zeigte sich eine geringfügig erhöhte mittlere Zellzahl von  $170 \pm 110$ .

Zwischen den Karotisläsionen der Gruppen 1 und 3 waren, mit Ausnahme der mittleren Zellzahl, keine histomorphologischen Unterschiede erkennbar, so daß sie im folgenden gemeinsam dargestellt werden können.

**Regelrechte Intima:** Das distale Plaqueende wurde als „regelrechte Intima“ bezeichnet, da es sich um eine unveränderte oder nur geringfügig veränderte Intima handelte, im Sinne einer geringen Zunahme der Intimaschichtdicke, mit evtl. vereinzelt Lymphozyten oder Makrophagen. Die Zellkerne waren etwa gleichmäßig auf die gesamte Region verteilt, so daß wir eine „homogene“ Zellkerndichte vorfanden. Die Fibrozyten waren überwiegend parallel zueinander ausgerichtet, d.h. laminär. Es handelte sich um das histologische Bild einer Intima ohne Anzeichen degenerativer Umbaureaktionen, entsprechend einem Läsionstyp 0 oder I gemäß der Klassifikation nach STARY<sup>8, 77</sup>. Dieses poststenotische (distale) Ende des Desobliterats konnte bei 20 der insgesamt 31 Desobliterate eindeutig aufgefunden und ausgewertet werden.

**Plaqueschulter:** Die zwischen Plaquezentrum und regelrechter Intima liegende Plaqueschulter zeigte eine stetige Abnahme der intimalen Schichtdicke (siehe Abb 2.4.2). Hier bestimmten extrazelluläre Lipidablagerungen und Schaumzellen im wesentlichen das mikroskopische Bild.

**Plaquezentrum:** Das Plaquezentrum war gekennzeichnet durch einen avitalen Kern mit reichlich extrazellulären Lipidablagerungen, oft in Form von Cholesterinkristall-Spalten (Core Region). Zwischen dieser avitalen Core Region und dem Endothel befand sich entweder Intima mit vitalen Zellkernen, wie Makrophagen, glatten Muskelzellen und Lymphozyten, oder eine deutlich dünnere Schicht, die sog. „fibrous cap“. Diese fibrous cap setzte sich aus neugebildetem, faserreichen Bindegewebe zusammen. Die Core Region wurde seitlich umsäumt von Schaumzellen, überwiegend akkumuliert in „Schaumzellnestern“ sowie extrazellulären Lipidablagerungen, welche die Matrixbestandteile auseinanderdrängten und aufgelockert erscheinen ließen. Neovaskularisationen und Lymphozyten bis hin zu dichten lymphozytären Infiltraten gehörten ebenfalls zum Bild des Plaquezentrums. Zwischen dem nekrotischen Core und der Media war häufig ein tiefintimales zellreiches Band sichtbar. Von den vier Plaqueregionen waren im Plaquezentrum die größten Umbauvorgänge und die deutlichste Disorganisation anzutreffen. Bereits innerhalb eines mikroskopischen Gesichtsfeldes zeigte sich meist eine inhomogene Zellkerndichte. Plaquekomplikationen wie Verkalkungen, Plaquehämorrhagien und intramurale Thrombusformationen waren im Plaquezentrum am häufigsten anzutreffen.

**DIT:** Eine diffuse intimale Schichtdickenzunahme (DIT) war charakteristisch für den proximalen, prästenotischen Bereich der Karotidesobliterate. Hier zeigte sich eine konstant verdickte Intima mit extrazellulären Lipiddepositionen und Schaumzellen. Sowohl vereinzelte Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten als auch Neovaskularisationen wiesen auf degenerative Umbauvorgänge hin, die jedoch nicht so ausgedehnt wie im Plaquezentrum in Erscheinung traten.

**Media:** Angrenzende Mediaanteile zeigten überwiegend homogen verteilte, laminär ausgerichtete, spindelförmige glatte Muskelzellen, die immunhistochemisch mit  $\alpha$ -Aktin positiv waren.

### **3.1.2. Die Histomorphologie der Femoralisdesobliterate (Gruppe 2):**

Allgemein zeigten die Femoralisdesobliterate untereinander eine geringere histomorphologische Vielfalt verglichen mit der Arteria carotis. Abb 3.1.2. verdeutlicht das meist vorherrschende Bild einer Intimasklerose mit einer faserreichen verdickten Intima, entsprechend Stadium Vc nach STARY<sup>77</sup>. Die Gesichtsfelder waren zellärmer ( $134 \pm 105$  Z/GF). Das allgemein reaktionsärmere histologische Bild wurde häufiger als bei den Karotidesobliteraten durch fibrindurchtränkte Intimabereiche im Sinne intramuraler Thromben durchbrochen. Diese Thromben waren begleitet von Organisationszonen unterschiedlichen Alters mit einem inflammatorischen Zellbild, welches teilweise eine höhere Zelldichte aufwies als die zahlreichen Umbauzonen in den Karotisläsionen. In diesen Bereichen waren auch die Mehrzahl der lipidassoziierten Reaktionen wie Schaumzellen und Cholesterinkristalle sowie häufig Verkalkungen anzutreffen.

Im Gegensatz dazu standen größere zellarme, kollagenreiche Areale mit einzelnen oder in kleinen Gruppen stehende Lymphozyten.

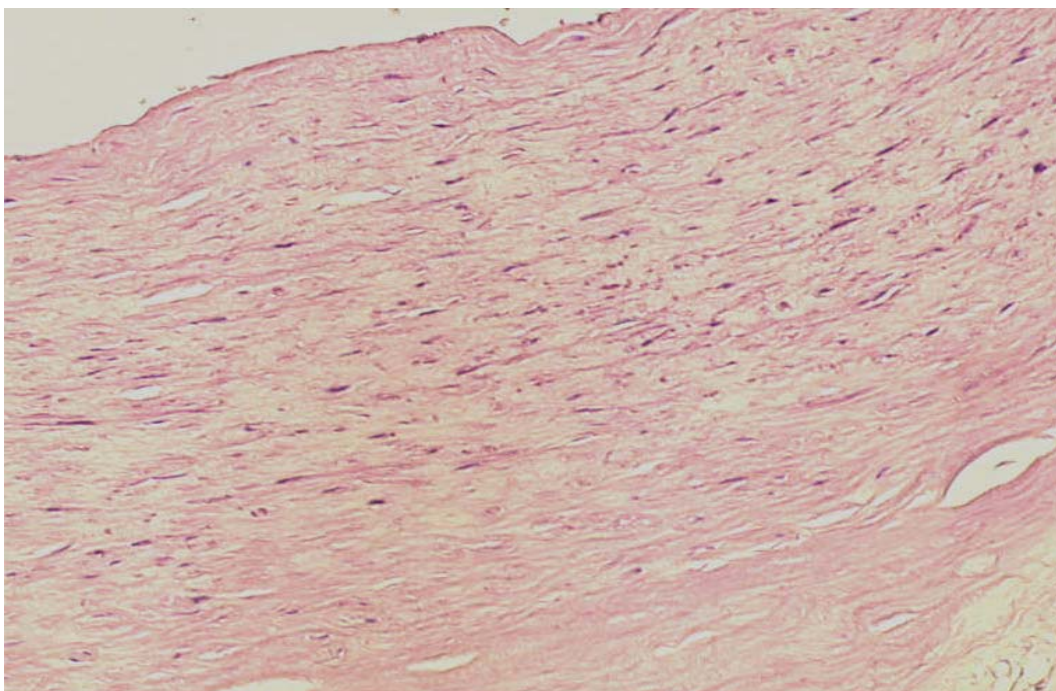


Abb 3.1.2: HE-Färbung der arteriosklerotisch veränderten Arteria femoralis (200fach vergrößert). Die verdickte Intima zeigt eine beginnende Intimasklerose.

## 3.2. Zelluläre Proliferation

### 3.2.1 Zellproliferation im Gesamtkollektiv

Die insgesamt in den 3 Gruppen untersuchten 452 GF zeigten in über der Hälfte der Gesichtsfelder gar keine proliferierenden Zellen. Nur 196 GF (43%) zeigten proliferierende Zellen, im Gesamtdurchschnitt exprimierten nur  $0,78 \pm 1,5\%$  aller ausgewerteten Zellen Ki-67.

Dieser mittlere Proliferationsindex zeigte jedoch deutliche Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen. Aus Abb. 3.2.1. wird ersichtlich, daß die Desobliterate der Arteria femoralis (Gruppe 2) mit einem PI von  $1,41 \pm 2,20\%$  durchschnittlich fast 3 mal mehr Ki-67 positive Zellen beinhalteten als die Karotispräparate der Patientengruppe 1. Innerhalb der Karotidesobliterate wurde deutlich, daß die 5 Patienten der Gruppe 3, die sich später mit Restenosen vorstellten, eine um den Faktor 3,4 höhere Proliferationsrate aufwiesen (PI  $1,66 \pm 1,78\%$ ). Eine statistische Auswertung mit Berechnung der Signifikanz war bei der geringen Fallzahl von nur 5 Patienten nicht sinnvoll.

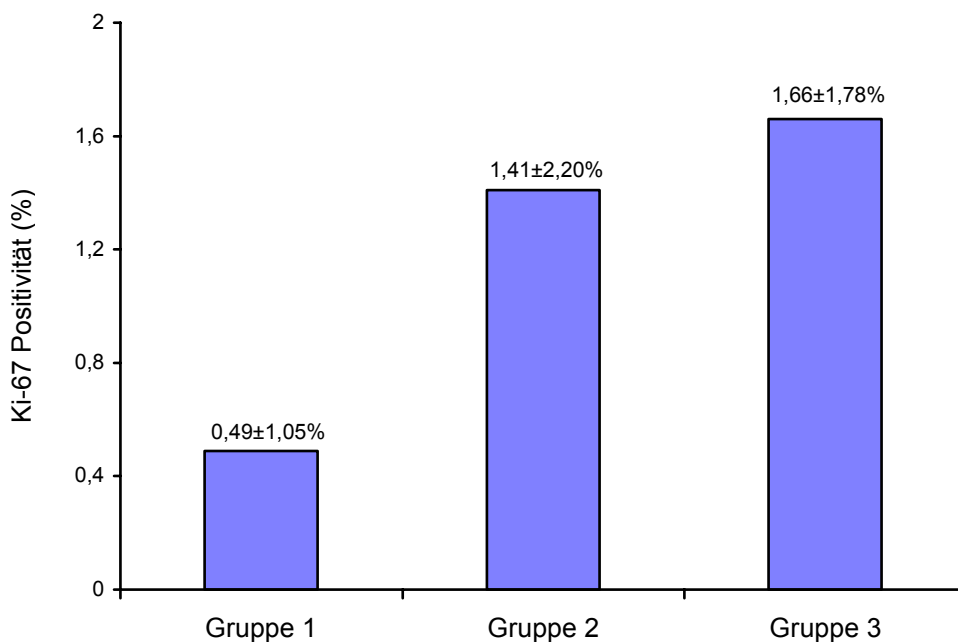


Abb. 3.2.1: Die durchschnittlichen Proliferationsraten in den 3 Patientengruppen: Die Zahlen über den Säulen sind die durchschnittlichen Ki-67-positiven Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl des Gesichtsfeldes.

Proliferierende Zellen fanden sich fast ausschließlich in der Intima (Abb. 3.2.2). In angrenzenden Mediaanteilen waren nur bei 3 Läsionen einzelne MIB1 positive Zellen zu finden, bei einer Läsion von Gruppe 1 und zwei Läsionen der Gruppe 3. Innerhalb der Intima konnte kein signifikanter Verteilungsunterschied zwischen lumennahen (Oi) und medianahen (Ti) Bereichen (siehe Kapitel 2.4) festgestellt werden (Oi:  $1,0 \pm 1,9\%$ ; Ti:  $0,9 \pm 1,6\%$ ). Dies bestätigte sich auch bei der getrennten Analyse der drei Patientengruppen.



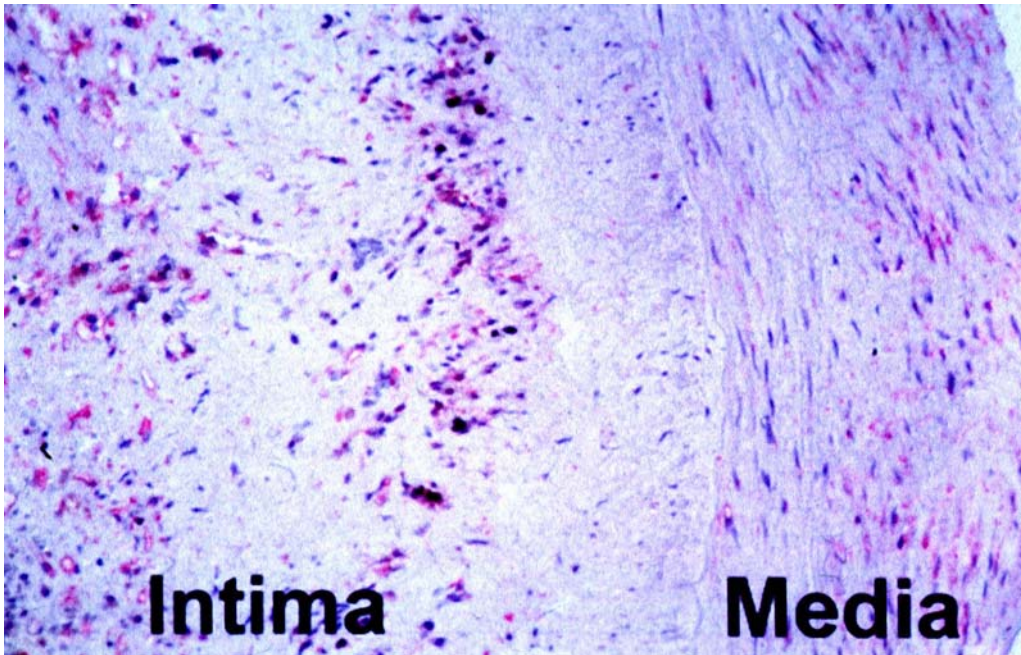


Abb. 3.2.2: Immunhistochemische Färbung für MIB1/Ki-67 einer arteriosklerotisch veränderten Gefäßwand der Arteria carotis (Vergrößerung x200). Proliferierende MIB1-positive Zellen (schwarze Zellkerne) in einem zellreichen Areal in der tiefen Intima nahe des Plaquesentrums. Die angrenzende Media (Lamina elastica nicht sichtbar) zeigt laminär ausgerichtete Zellkerne ohne Ki-67-Positivität.



Abb. 3.2.3: Fokale Ansammlung Ki-67-positiver Zellen (braun-schwarze Zellkerne) in der Umgebung des „Nekrotischen Core“-Areal im Plaqueszentrum (MIB1/DAB-Färbung, Vergrößerung x200). Bei der diffusen Braunfärbung am Bildrand handelt es sich um einen Artefakt.

### 3.2.2. Zellproliferation in den Karotidesobliteraten (Gruppe 1 und 3)

Homogen in der Intima verteilte einzelne Ki-67 positive Zellen waren die Ausnahme. Meist fanden sie sich fokal gehäuft, bevorzugt in Regionen mit hoher Zelldichte (Abb. 3.2.3). Die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens einer Ki-67-positiven Zelle stieg dabei linear mit der Zelldichte des Gesichtsfelds ( $p < 0,001$ ; Abb. 3.2.4).

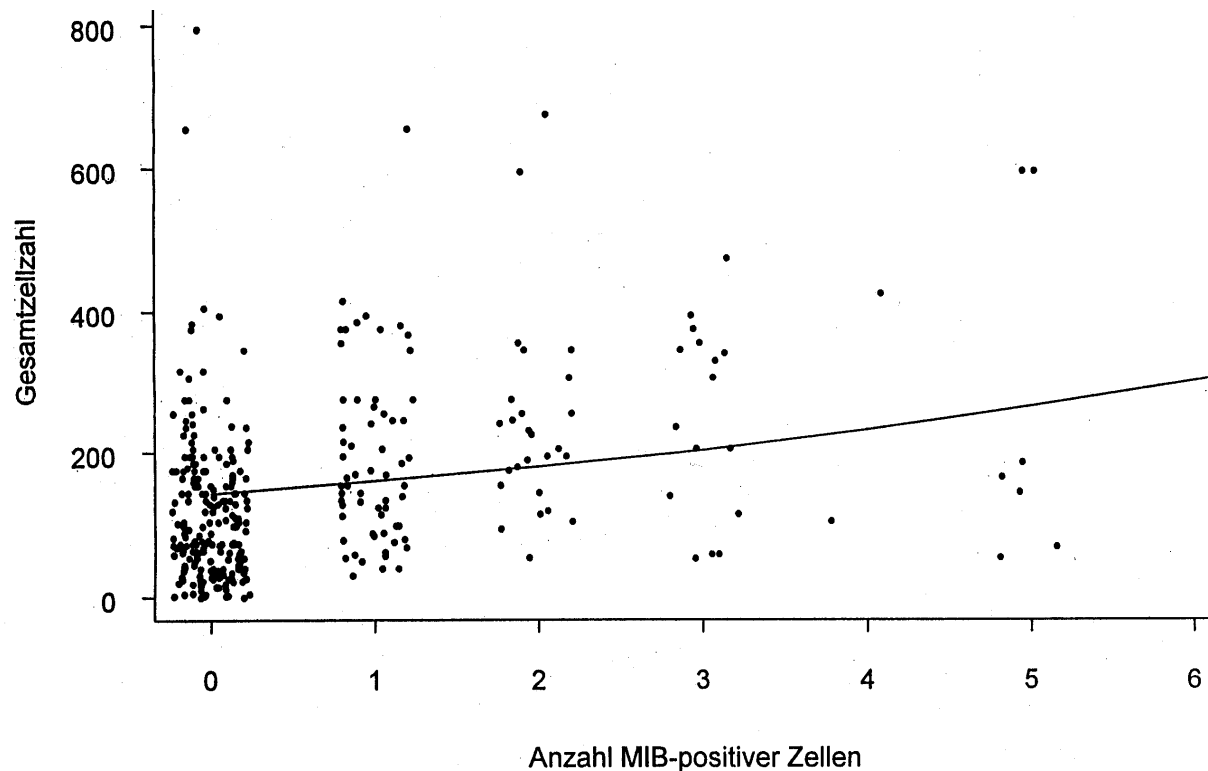


Abb. 3.2.4: Die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen nimmt mit der Gesamtzellzahl des GF zu; Poisson-Regression mit GEE (eq).

Deutliche Verteilungsunterschiede der Ki-67-positiven Zellen zeigten sich zwischen den 4 Arterioskleroseregionen der Karotidesobliterate der Gruppe 1 (Abb. 3.2.5). Vorwiegend konzentrierten sich proliferierende Zellen im Plaquezentrum (PI:  $0,81 \pm 1,37\%$ ) und in der proximal davon gelegenen DIT-Region (PI:  $0,26 \pm 0,46\%$ ). In der Plaqueschulter zeigten sich seltener Zellen mit Ki-67 Expression (PI:  $0,12 \pm 0,41\%$ ). Das distale Plaquende mit regelrechter Intima beinhaltete in keinem Fall proliferierende Zellen.

In den 5 untersuchten Karotis-Primärstenosen, die später Restenosen entwickelten (Patientengruppe 3) lag die Proliferationsrate in den Regionen um etwa 1% höher (Plaqueschulter:  $1,13 \pm 0,81\%$ ; Plaquezentrum:  $1,87 \pm 2,00\%$ ; DIT:  $2,08 \pm 1,50\%$ ). Am deutlichsten war der Unterschied im Bereich der diffusen intimalen Schichtdickenzunahme (DIT). Hier überstiegen, gerade umgekehrt zu Patientengruppe 1, die mittleren Proliferationsindizes die Werte des Plaquezentrums (siehe Abb. 3.2.5.).

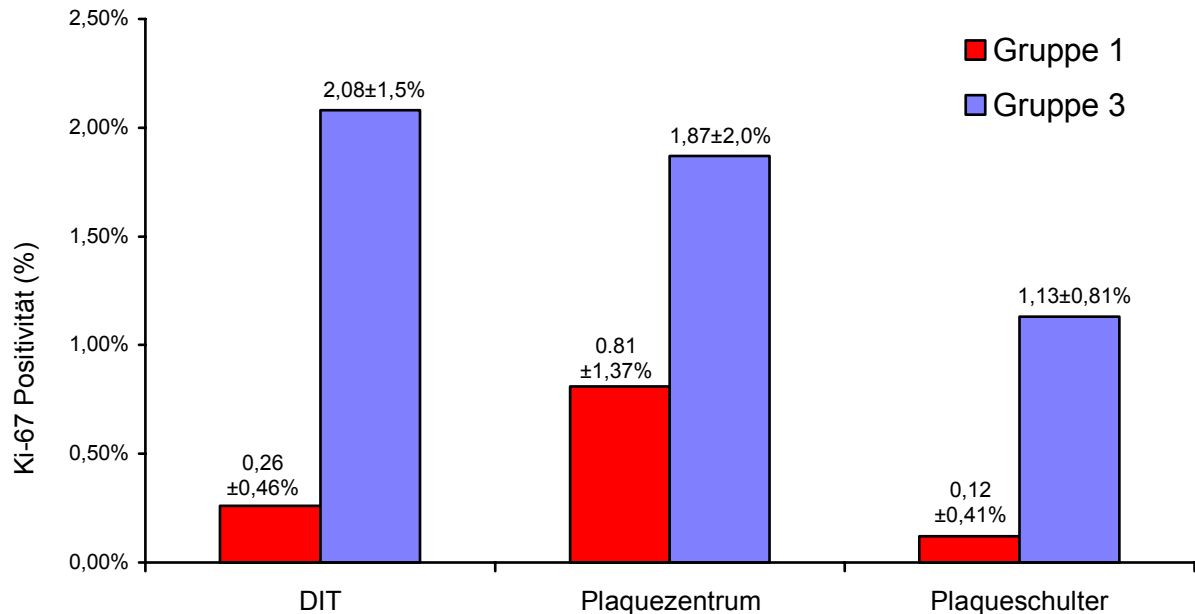


Abb. 3.2.5: Die Proliferationsindizes in den 3 Arterioskleroseregionen der Karotidesobliterate in Gruppe 1 und 3.

Die „regelrechte Intima“-Region beinhaltete keine Ki-67 positiven Zellen (hier deshalb nicht dargestellt). Bei Gruppe 1 zeigte das Plaquezentrum die höchste Proliferationsrate, wohingegen bei Gruppe 3 die „DIT-Region“ höhere durchschnittliche Proliferationsindizes aufwies als das Plaquezentrum.

### 3.2.3. Zellproliferation in den Femoralisdesobliteraten (Gruppe 2)

Trotz niedrigerer durchschnittlicher Zelldichte im Gewebe (134 Zellen/GF versus 160 Zellen/GF bei den Karotidesobliteraten, siehe Tab. 3.1) fand sich ein höherer Proliferationsindex von im Mittel  $1,41 \pm 2,20$ . Auch bei den Femoralisdesobliteraten befanden sich die Mehrzahl der Ki-67-positiven Zellen fokal gehäuft in Regionen hoher Zelldichte. Allerdings kamen auch regelmässig in der Intima in Arealen geringerer Zelldichte diffus verteilte Ki-67-positive Einzelzellen vor.

## 3.3. Korrelation Ki-67-positiver Zellen mit histomorphologischen Charakteristika

### 3.3.1. Die Desobliterate der Arteria carotis (Gruppe 1)

Mit Hilfe der Serienschnitte konnten histomorphologische Charakteristika im HE-Präparat mit den weitgehend identischen Gesichtsfeldern im MIB1-Präparat korreliert werden. Abb. 3.3.1. zeigt diese Korrelation für die 320 ausgewerteten Gesichtsfelder der Karotidesobliterate.

Das histologische Merkmal **Plauehämorrhagie** war in 42 Gesichtsfeldern anzutreffen. Davon wiesen 32 gleichzeitig mindestens eine Ki-67 positive Zelle auf. Dagegen wurde in 277 Gesichtsfeldern keine Plauehämorrhagie gefunden, wovon 191 auch keine proliferierenden Zellen zeigten. Die statistische Analyse dieser Werte

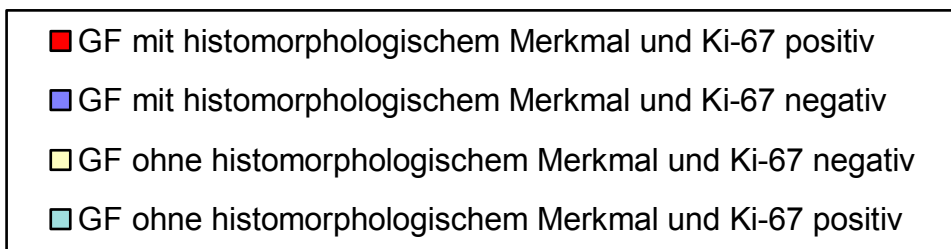
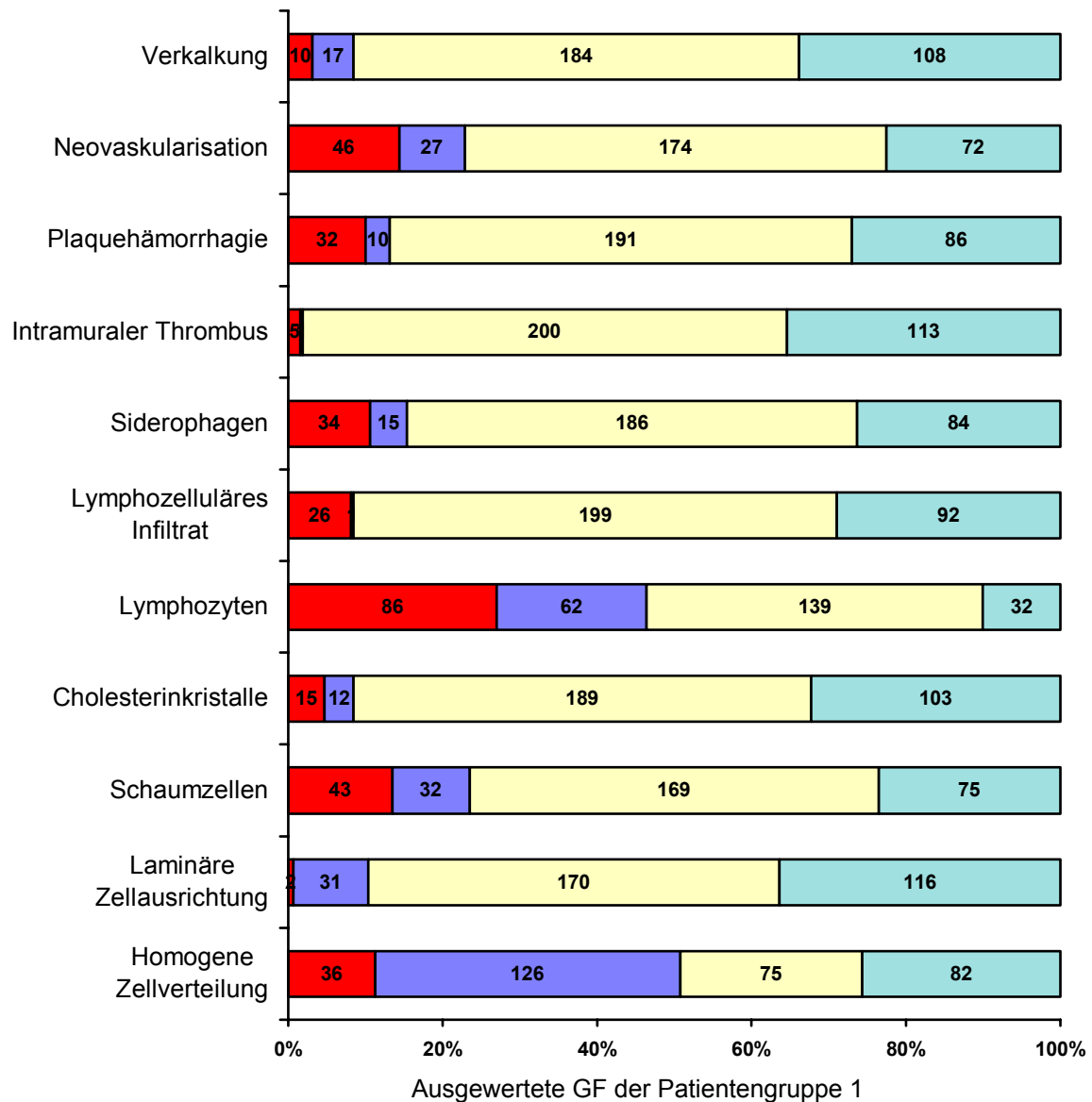


Abb. 3.3.1: Histomorphologische Merkmale und Ki-67 Positivität in den 320 GF der Karotidesobliteratione (Gruppe 1).

Der rote Balkenabschnitt verdeutlicht die Anzahl der Gesichtsfelder, in denen das jeweilige histomorphologische Merkmal und Ki-67 positive Zellen zusammen in einem Gesichtsfeld lokalisiert waren.

erbrachte eine Signifikanz von  $p < 0,001$  für das gemeinsame Auftreten von Ki-67 Positivität und Plauehämorrhagie (siehe auch Abb. 3.3.2).

In gleicher Weise wurde für das gemeinsame Auftreten von Ki-67 Positivität und **Neovaskularisationen** eine Signifikanz von  $p < 0,001$  und für **Siderophagen** eine Signifikanz von  $p < 0,005$  errechnet.

**Schaumzellen, lymphozytäres Infiltrat, Lymphozyten** und **intramuraler Thrombus** zeigten ebenfalls eine signifikante Korrelation mit dem Auftreten von Ki-67 positiven Zellen mit  $p < 0,01$  (siehe Tabelle 3.3.1). Demgegenüber erwiesen sich eine **homogene Zellverteilung** und **laminäre Zellausrichtung** als starke negative Prädiktoren für Ki-67 Positivität ( $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend betrachtet waren bei den Karotidesobliteraten sowohl eine auf Umbauvorgänge hinweisende Morphologie, wie Neovaskularisationen, Gewebseinblutungen, intramurale Thrombusformationen sowie inflammatorische Zellkomponenten und Schaumzellen signifikant kolokalisiert mit Ki-67 exprimierenden Zellen. Dagegen zeigten pathomorphologisch nicht veränderte Zellverbände (homogene Zellverteilung und laminäre Zellausrichtung) eine signifikante Negativität für Ki-67.

Bei den 5 Karotis-Primärstenosen der Patientengruppe 3 wurde diese statistische Auswertung in Anbetracht der geringen Fallzahl nicht durchgeführt.

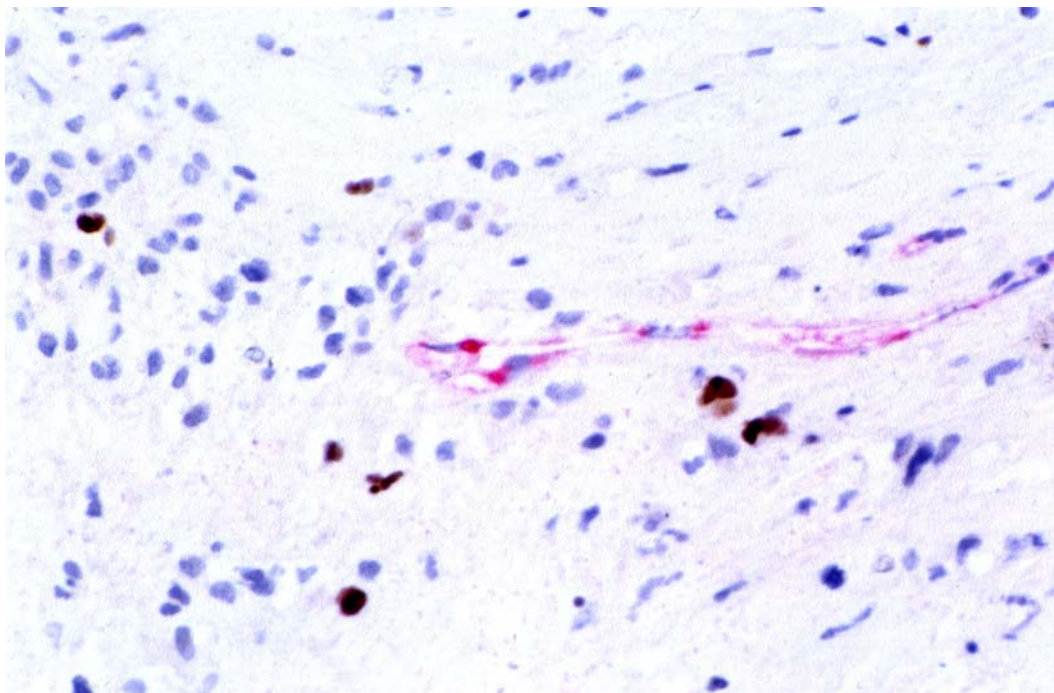


Abb. 3.3.2: Immunhistochemische Doppelfärbung für Ki-67 (MIB1/DAB - braune Zellkerne) und Faktor VIII (Endothelzellen - rot) (Vergrößerung  $\times 400$ ). Der Ausschnitt zeigt das typische Zusammentreffen von proliferierenden Zellen und Neovaskularisationen in zentralen Plauearealen.

**Tabelle 3.3.1: Kolokalisation der histomorphologischen Charakteristika mit Ki-67-Positivität in Desobliteraten der Arteria carotis (Gruppe 1).**

Histomorphologisches Merkmal	Signifikanz für Koexistenz mit Ki-67
Plauehämorrhagie	p<0,001
Siderophagen	p<0,005
Neovaskularisationen	p<0,001
Schaumzellen	p<0,01
Lymphozytäres Infiltrat	p<0,01
Lymphozyten	p<0,01
Intramuraler Thrombus	p<0,01

### 3.3.2. Die Desobliterate der Arteria femoralis (Gruppe 2)

Anders verhielt es sich bei den 10 Desobliteraten aus der Arteria femoralis: Hier korrelierte Ki-67 nur mit lymphozellulären Infiltraten signifikant (p<0,001). Alle anderen histomorphologischen Merkmale zeigten nur eine geringe oder keine Signifikanz mit Ki-67-positiven Zellen (siehe Tabelle 3.3.2)

Auch intramurale Thromben waren nur tendenziell mit Ki-67 korreliert (p=0,11), obgleich das GF mit den weitaus meisten proliferierenden Zellen (40 Ki-67-positive Zellen) sich in einem Thrombusareal befand.

Allerdings kamen auch regelmäßig einzelne proliferierende Zellen in reaktionsärmeren Arealen ohne erkennbare Assoziation mit Umbauvorgängen vor.

**Tabelle 3.3.2: Kolokalisation der histomorphologischen Charakteristika mit Ki-67-Positivität bei Desobliteraten der Arteria femoralis (Gruppe 2).**

Histomorphologisches Merkmal	Signifikanz für die Koexistenz mit Ki-67
Lymphozelluläres Infiltrat	p<0,001
Cholesterinkristalle	p=0,08
Plauehämorrhagie	p=0,09
Intramuraler Thrombus	p=0,11
Neovaskularisation	p=0,12
Schaumzellen	p=0,36
Siderophagen	p=0,47

### 3.4. Zuordnung der Ki-67 exprimierenden Zellen zu den immunhistochemischen Zellmarkern in Serienschnitten

Von allen Desobliteraten der 3 Gruppen wurden Serienschritte mit den in Tabelle 2.5. aufgeführten immunhistochemischen Markern gefärbt und die histologisch korrespondierenden Areale verglichen. Durch die unmittelbar aufeinanderfolgenden Serienschritte zeigten die Präparate fast identische histomorphologische Strukturmerkmale. Somit konnten vergleichbare Gesichtsfelder z.B. in CD68- und MIB1- gefärbten Präparaten aufgesucht werden. Diese Vorgehensweise erlaubte es, die proliferierenden Zellen den immunhistochemisch untersuchten Zellpopulationen zuzuordnen.

### **3.4.1 Arteria carotis (Gruppe 1 und 3)**

In Gesichtsfeldern mit mehreren CD68-exprimierenden Zellen fanden sich regelmässig ( $p < 0,001$ ) auch Ki-67 positive Zellen (Abb. 3.4.1). CD68 wird mit hoher Spezifität von Makrophagen und von ihnen abstammenden<sup>75</sup> Schaumzellen exprimiert. Sie beherrschten das histologische Bild in Bereichen struktureller Reparationszonen wie beispielsweise in der Umgebung des nekrotischen Core oder in Lipiddepositionen, oftmals als Schaumzellen.

Die Expression von  $\alpha$ -Aktin erwies sich als negativer Prädiktor für Ki-67-Positivität ( $p < 0,001$ ). In intimalen Regionen mit überwiegender  $\alpha$ -Actin-Positivität waren proliferierende Zellen nur sehr selten nachzuweisen (Abb 3.4.2). Ebenso ließen sich die Immunhistochemischen Marker des von-Willebrand-Faktors und der Mastzelltryptase der Ki-67-Expression nur äußerst selten zuordnen.

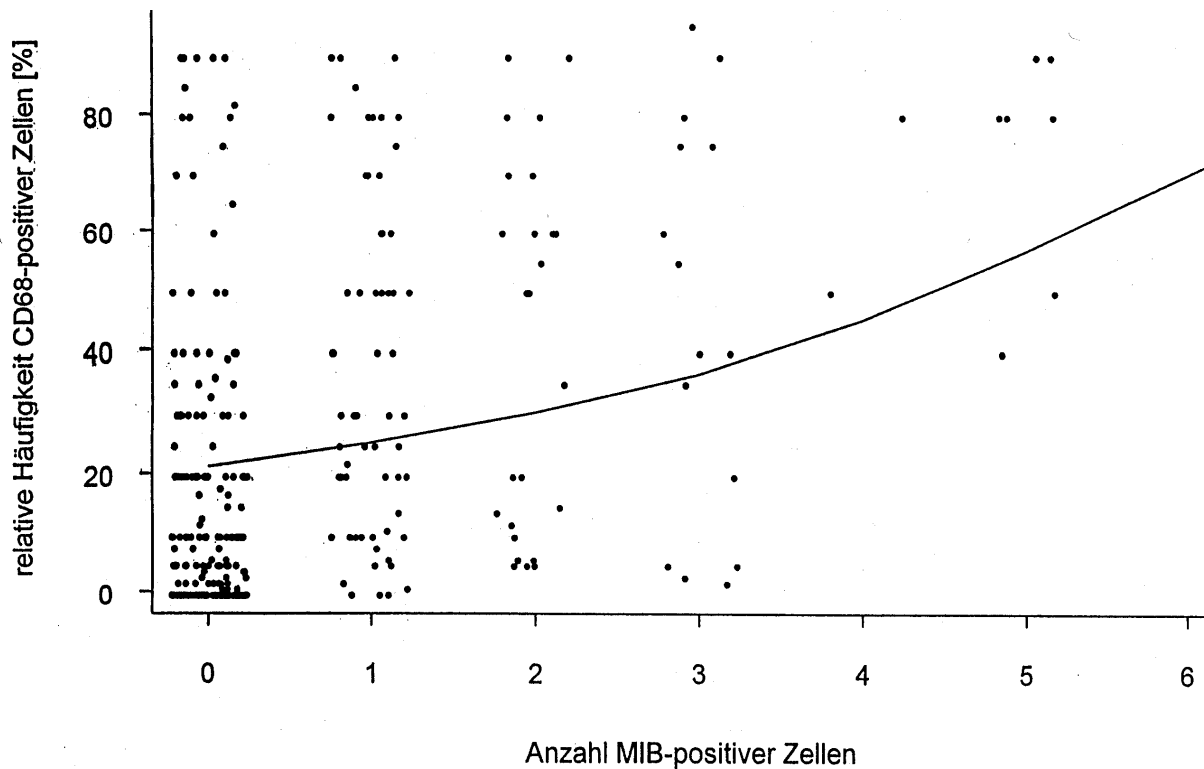


Abb. 3.4.1: Korrespondierende Gesichtsfelder von Serienschnitten zeigten für Patientengruppe 1 die Zuordnung zwischen Ki-67- und CD68-Expression (Poisson-Regression mit GEE). In Arealen mit einer hohen CD68-positiven Zelldichte war auch die Anzahl MIB1-positiver Zellen signifikant ( $p < 0,001$ ) höher als in Regionen mit einem geringen Makrophagenanteil.

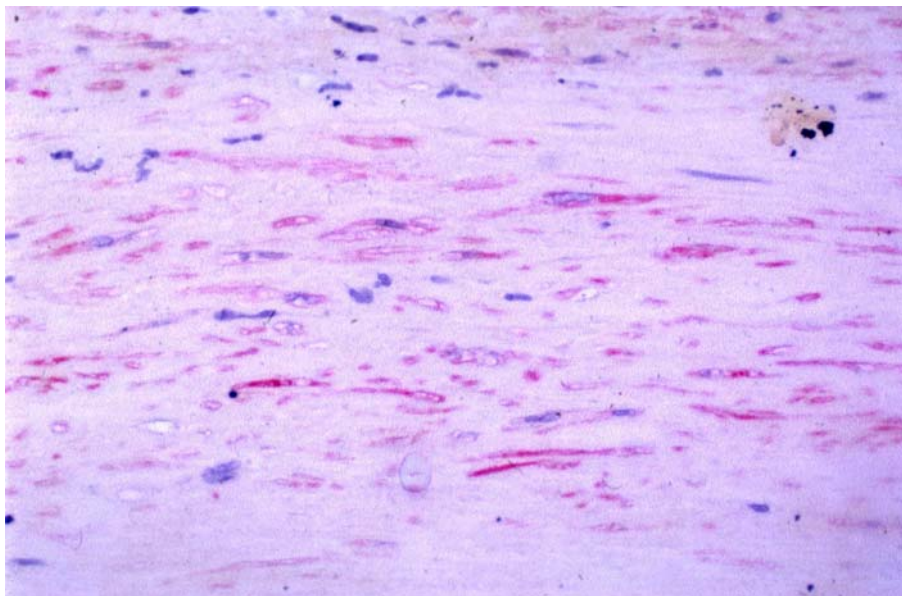


Abb. 3.4.2: Immunhistochemische Färbung eines Karotidesobliterat für glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin (400fach vergrößert). Zur Darstellung kommen lumennahe Mediaanteile in der DIT-Region mit spindelförmigen, longitudinal ausgerichteten Zellen, die sich anhand rot markierter kontraktiler Myofilamente als glatte Muskelzellen identifizieren lassen.



### 3.4.2. Arteria femoralis (Gruppe 2)

In den Femoralisdesobliteraten zeigten am häufigsten CD3 exprimierende T-Lymphozyten in den sich entsprechenden Gesichtsfeldern MIB1-Positivität ( $p < 0.001$ ). Sie beherrschten das histologische Bild in der Nähe von Neovaskularisationen und in lymphozellulären Infiltraten, waren aber auch als Einzelzellen in faserreichen Arealen vorhanden. Für die Korrelation von CD68 mit MIB1 ergab die logistische Regression eine ähnlich hohe Signifikanz von  $p = 0.001$  wie bei den Karotidesobliteraten. Anders verhielt es sich bei den glatten Muskelzellen. Obwohl die Zuordnung korrespondierender  $\alpha$ -Aktin positiver Gesichtsfelder nicht signifikant mit MIB1 korrelierte ( $p = 0.47$ ) war  $\alpha$ -Aktin-Positivität kein negativer Prädiktor für Ki-67-Positivität wie es bei den Karotidesobliteraten der Fall war.

## 3.5. Immunhistochemische Doppelfärbungen

Mit Hilfe der Serienschnitte konnten korrespondierende, weitgehend identische Gesichtsfelder mit unterschiedlichen immunhistochemischen Markern gefärbt werden. So konnte der Zelltyp von MIB1 exprimierenden Zellen abgeschätzt, aber nicht bewiesen werden. Die Dicke der Schnitte von theoretisch  $3\mu\text{m}$  erlaubte es bei einem durchschnittlichen Zellkerndurchmesser von ca  $5\mu\text{m}$  nicht, eine Ki-67 positive Zelle über mehrere Schnitte zu verfolgen. Nur die Anwendung immunhistochemischer Doppelfärbungen in einem Präparat konnte den Zellcharakter der Ki-67 positiven Zellen eindeutig beweisen.

Alle 11 doppelgefärbten Karotidesobliterate wiesen ein ähnliches Verteilungsmuster hinsichtlich der proliferierenden Zellpopulationen auf. Die getrennte Auswertung der 11 Läsionen (Abb. 3.5.1) zeigte, daß kaum Unterschiede zwischen den Desobliteraten in der Zellzusammensetzung der durchschnittlich 6 Ki-67 positiven Zellen pro Gesichtsfeld bestanden. Offensichtlich gab es keine Läsionen, bei denen vornehmlich eine Zellpopulation proliferierte, die bei Läsionen von anderen Patienten keine Ki-67-Positivität zeigten. Diesbezüglich unterschied sich die Läsion aus Gruppe 3 auch nicht von den Läsionen aus Gruppe 1. Diese Ähnlichkeit im Proliferationsmuster erlaubte es, alle doppelgefärbten proliferierenden Zellen zusammengefasst zu analysieren.

Abbildung 3.5.2 verdeutlicht den Anteil der jeweiligen Zellpopulation an den Ki-67 positiven Zellen. In über einem Drittel (37%) der proliferierenden Zellen konnten CD68 exprimierende Makrophagen nachgewiesen werden. Den Zweitgrößten Anteil (10%) am proliferierenden Zellpool hatten die CD45 RO positiven T-Lymphozyten.

Nur in Einzelfällen konnte in Organisationszonen an Kapillargefäßen Endothelzellen (von-Willebrand-Faktor) in den Doppelfärbungen gleichzeitig mit Ki-67 detektiert werden. In sehr geringem Ausmaß zeigten die Ki-67 positiven Zellen eine Reaktivität für  $\alpha$ -Aktin (2,9%). Für 46% der proliferierenden Zellen konnte mit den vier Zweitfärbungen die Zellart nicht geklärt werden.

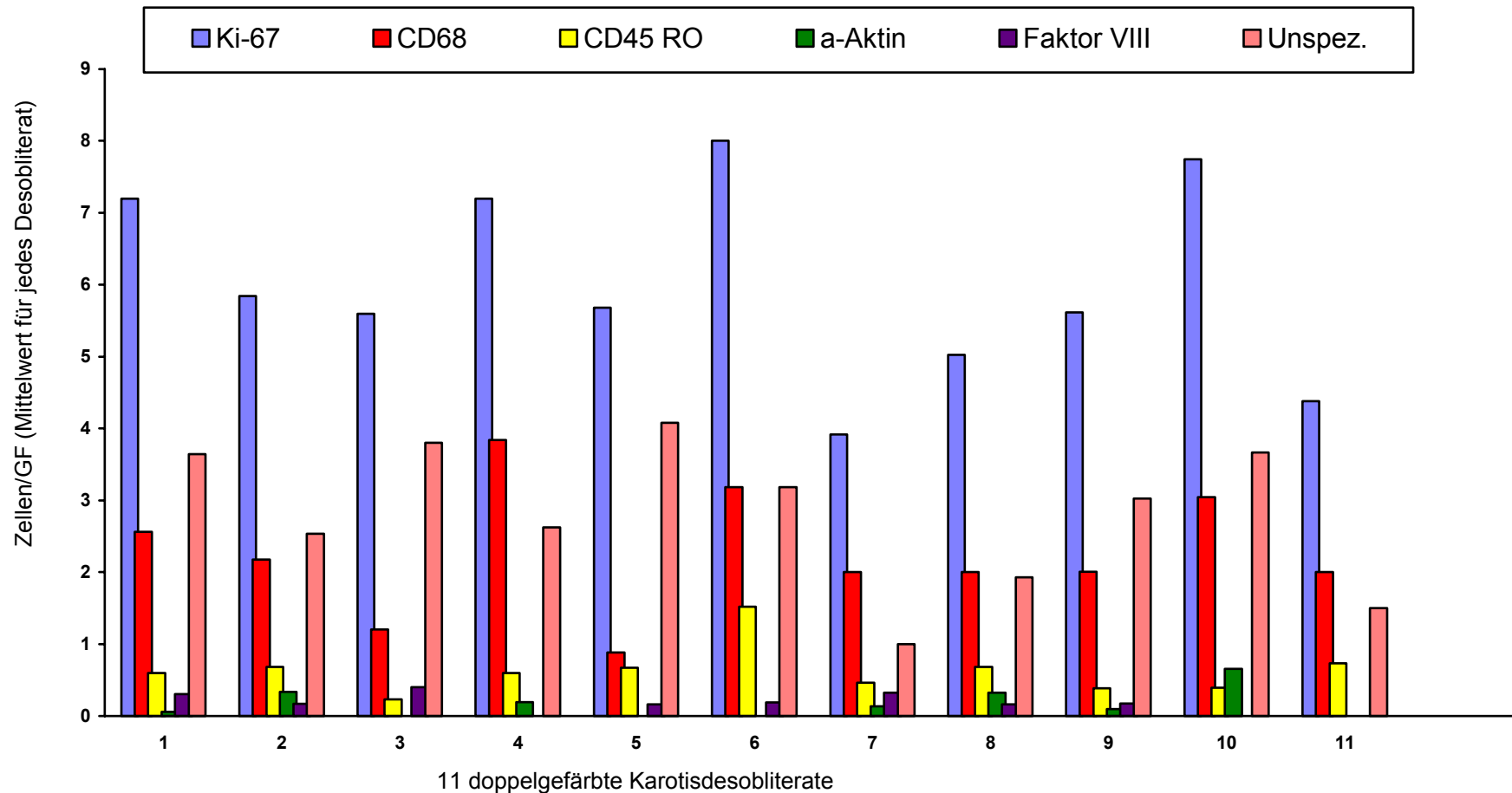


Abb. 3.5.1: Balkendiagramm zur graphischen Darstellung der immunhistochemischen Zelltypisierung der doppelgefärbten Karotidesobliterate. Für jedes Desobliterat wurden mehrere Präparate mit dem Proliferationsmarker Ki-67 und einem der vier Zellmarker gefärbt. Für jedes Desobliterat gemittelt ergaben sich durchschnittlich 6 Ki-67 positiven Zellen pro GF (blauer Balken). Die Desobliterate glichen sich untereinander im Verteilungsmuster der Zelltypisierung der proliferierenden Zellen. Der höchste Anteil der Ki-67 positiven entfiel auf CD68 exprimierende Makrophagen (roter Balken), gefolgt von CD45 RO exprimierenden T-Lymphozyten (gelber Balken). Fast die Hälfte der Zellen zeigten keine Reaktivität mit einer der vier Zweifärbungen (unspezifisch:hellroter Balken).

Bei den Desobliteraten der Arteria femoralis wurden keine immunhistochemischen Doppelfärbungen angefertigt. Um vergleichende Überlegungen zwischen der Arteria carotis und der Arteria femoralis zu den proliferierenden Zelltypen anstellen zu können, klassifizierten wir bei den Femoralstenosen die Ki-67 positiven Zellen anhand ihrer histologischen Morphologie.

Fast 15% der proliferierenden Zellen zeigten ein Aussehen vereinbar mit Fibroblasten bzw. Fibrozyten. Ähnlich den Karotidesobliteraten waren 12% der proliferierenden Zellen als T-Lymphozyten anzusprechen. Etwa 70% imponierten histologisch als Histiozyten/Makrophagen. Die verbleibenden 3 % konnten histomorphologisch keiner Zellart eindeutig zugeordnet werden.

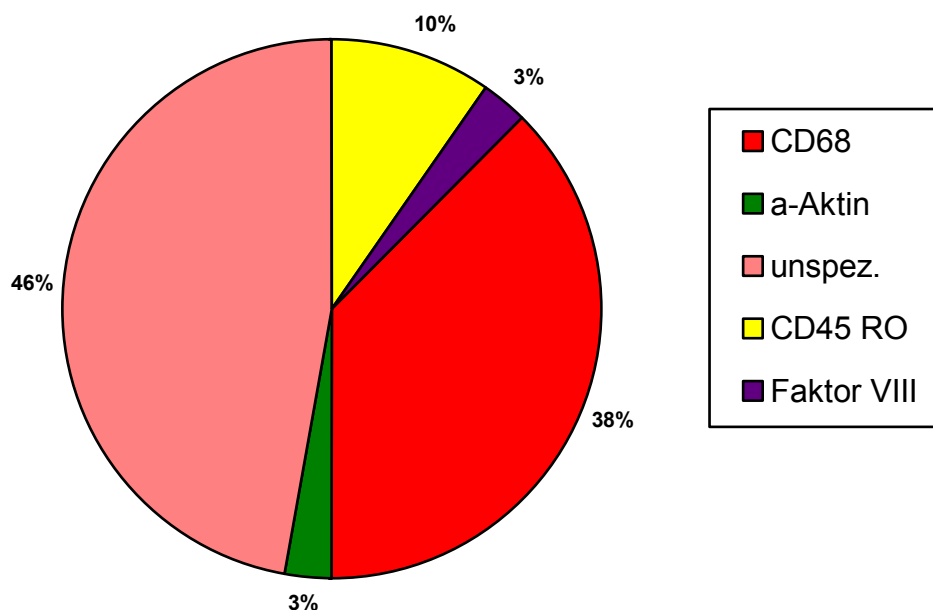


Abb. 3.5.2: Graphische Darstellung des immunhistochemisch ermittelten Zelltyps der proliferierenden Zellen in Desobliteraten der Arteria carotis. Ki-67 positive Zellen zeigten in Doppelfärbungen mit vier immunhistochemischen Markern in über der Hälfte der Fälle eine Reaktivität, am häufigsten mit CD68.

### 3.6. Klinische Charakteristika

Die Ergebnisse der getrennten Auswertung der 3 Patientengruppen bezüglich der Risikofaktoren und der Medikation zeigten kaum Unterschiede. Lediglich zeigte unser Patientenkollektiv in der Rangfolge der Risikofaktoren einen geringen Unterschied zwischen den karotidalen und den femoralen Stenosen (Tabelle 3.6). So litten die Patienten mit Karotisstenosen häufiger (84%) an einer Hyperlipidämie als diejenigen mit Femoralstenosen, die am häufigsten zu den Zigarettenrauchern (70%) zählten.

**Tabelle 3.6: Häufigkeit der Risikofaktoren**

Patienten- gruppe	Patienten- zahl	Hyper- lipidämie	Diabetes	Hypertonus	Nikotin
1	25	22 (84%)	8 (31%)	19 (73%)	16 (61%)
2	10	5 (50%)	4 (40%)	5 (50%)	7 (70%)
3	5	4 (80%)	1 (20%)	1 (20%)	0

### **3.6.1. Korrelation der klinischen Charakteristika mit der Symptomatik**

Die Patienten der Gruppe 1 hatten im Mittel mit 2,4 der 4 untersuchten Risikofaktoren. Das Auftreten von stenoseinduzierten Symptomen war jedoch statistisch unabhängig vom Risikofaktor bzw. dem Risikofaktorenprofil. Gleiches gilt auch für das Patientenalter, das Geschlecht, die Medikation und den Stenosegrad (siehe auch Tabelle 2.1.1): Diese Faktoren zeigten keine statistischen Unterschiede zwischen den asymptomatischen und den symptomatischen Patienten.

Bei der Gruppe 2, den Femoralisstenosen, zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der in Tabelle 2.1.2 aufgeführten klinischen Charakterisierung der Patienten und dem Grad der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit.

Gruppe 3 wurde wegen der geringen Fallzahl diesbezüglich nicht ausgewertet.

### **3.6.2. Korrelation der klinischen Charakteristika mit der Proliferationsaktivität**

Zur Beurteilung der Korrelation zwischen der Proliferationsaktivität und den klinischen Patientendaten mußte ein „patientenspezifischer“ Proliferationsindex semiquantitativ berechnet werden. Hierzu wurden die Proliferationsindizes von allen untersuchten Gesichtsfeldern eines Patienten gemittelt und zu seinem Risikofaktorenprofil, zu seiner Medikation sowie zu seiner Symptomatik in Beziehung gesetzt. Die klinischen Daten korrelierten bei allen 3 Gruppen nicht mit der patientenspezifischen Proliferationsaktivität.

Bei den Patienten der Gruppe 3, die eine Restenose entwickelten, zeigte sich trotz der höheren Proliferationsindizes kein besonderes Risikofaktorenprofil und auch keine signifikante Korrelation mit dem patientenspezifischen Proliferationsindex.

## 4. Diskussion

Die Gefäßwand ist aus Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibrozyten aufgebaut, die mit Hilfe zahlreicher, noch unzulänglich bekannter Interaktionen Störungen der Homöostase mit Struktur- oder Funktionsänderungen beantworten.<sup>23</sup> Eine grosse pathophysiologische Rolle für die Entstehung und Progression arteriosklerotischer Plaques kommt dabei der Zellproliferation zu. Gefäßareale, die mechanischen Scherkräften durch Flußunregelmäßigkeiten, häufig an Gefäßaufzweigungen oder -Biegungen, ausgesetzt sind, stellen die typischen Prädilektionsstellen für die langsamen arteriosklerotischen Umbauvorgänge dar. Zellproliferation kann dabei zur Grössenzunahme einer arteriosklerotischen Plaque beitragen, insbesondere wenn von diesen zusätzlichen Zellen extrazelluläre Matrixbestandteile gebildet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Zellproliferation in der Entstehung und Progression der Arteriosklerose untersucht.

### 4.1. Die immunhistochemische Ki-67/MIB1 Färbung

Erst seit kurzem werden Wege gesucht, durch immunhistochemische Analysen von frischem, arteriellen Gewebematerial Einblicke in das Proliferationsverhalten und die histomorphologische Struktur der In-vivo-Situation bei der humanen Arteriosklerose zu gewinnen. Frühere semiquantitative Ex-vivo-Untersuchungen zur Bestimmung der Proliferationsaktivität mit (<sup>3</sup>H)-Thymidin-Inkorporation<sup>76</sup> und Durchflußzytometrie<sup>54</sup> sind durch die artifiziiellen Bedingungen ihres methodischen Ansatzes in der Aussagefähigkeit begrenzt. Demgegenüber bietet der immunhistochemische Nachweis proliferationsassoziierter Antigene den Vorteil, daß die Zellen im Gewebeverband verbleiben und eine enzymatische Disaggregation nicht erforderlich ist. Ein proliferationsassoziertes Antigen ist das zellzyklusabhängige Protein PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Es ist ein Hilfsenzym für die DNA Polymerase  $\delta^9$ , das hauptsächlich in der S-Phase, aber auch in der G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub> - Phase des Zellzyklus synthetisiert wird.<sup>14</sup>

Bisher wurden für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens in arteriosklerotisch verändertem Gefäßmaterial überwiegend Antikörper gegen PCNA eingesetzt. In unserer Untersuchung verwendeten wir den Proliferationsmarker Ki-67/MIB1, ein kürzlich entwickelter monoklonaler Ki-67 spezifischer Antikörper.<sup>13</sup> Er detektiert das Ki-67-Antigen auch an formalinfixierten Präparaten, die mit der Mikrowellenmethode vorbehandelt wurden.<sup>73</sup> Ki-67 ist ein Kernantigen noch unbekannter Funktion<sup>32</sup> mit einem Molekulargewicht von 345 und 395kDa,<sup>21</sup> dessen Expression streng an die Zellreplikation gebunden ist: Seine Expression beginnt mit der S-Phase, hat einen Gipfel in der G<sub>2</sub> und M-Phase und fällt in der frühen G<sub>1</sub> Phase wieder ab. Die G<sub>0</sub> - Phase zeigt konstant kein Ki-67 Vorkommen.<sup>20</sup> So ist MIB1 ein hochspezifischer Antikörper für die semikonservative DNA-Synthese in replizierenden Zellen.

Auf der Suche nach einem zuverlässigen methodischen Ansatz führten wir zu Beginn unserer Untersuchung vergleichende immunhistochemische Probefärbungen von Serienschnitten zwischen PCNA und MIB1 durch. Diese Serienschnitte ergaben eine weitgehende Übereinstimmung der MIB1- mit den PCNA-Färbungen, doch zeigten sich inkonstante Kontrastverhältnisse und bei einer Reihe von Einzelzellen

nur flauere Farbkontraste in den PCNA-Präparaten. Die Abhängigkeit der PCNA-Reaktivität von den Fixierungsbedingungen des Gewebes<sup>32</sup> und von der Antikörperkonzentration<sup>47</sup> könnten für variierende Farbkontraste mitverantwortlich sein und möglicherweise die Reproduzierbarkeit vorausgegangener Studien erschwert haben.<sup>26,50,58,83</sup> PCNA kann auch bei der DNA-Reparatur<sup>32</sup> oder durch die Einwirkung von Wachstumsfaktoren wie PDGF<sup>55</sup> exprimiert werden. Außerdem bereitet die lange Halbwertszeit von 20 bis 27 Stunden<sup>10,70</sup> zusätzlich Spezifitätsprobleme, da Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase noch eine PCNA-Positivität aufweisen können.

Ein *in vivo* Vergleich der beiden Proliferationsmarker PCNA und Ki-67 mit (<sup>3</sup>H)-Thymidin (Autoradiographie), dem Goldstandard für zellkinetische Untersuchungen, zeigte, daß Ki-67 deutlich besser mit der Zellproliferation korreliert.<sup>70</sup> Andererseits ist im tierexperimentellen Arteriosklerosemodell,<sup>94</sup> aber auch in einzelnen humanen arteriosklerotischen Präparaten<sup>26,61</sup> eine gute Korrelation zwischen Ki-67 und PCNA beschrieben worden. Gerade für humane arteriosklerotische Gefäße mit überwiegend inhomogener Zusammensetzung und einem vielgestaltigen histomorphologischen Bild sowie einer Fülle von Gewebshormonen erscheint daher MIB1 als robuster Antikörper mit guter Reproduzierbarkeit<sup>46</sup> geeigneter.

Beide Methoden haben einen Nachteil, der wegen der derzeit diskutierten infektiösen Genese<sup>39</sup> der Arteriosklerose von Bedeutung sein könnte: MATE et al<sup>45</sup> belegte kürzlich für Ki-67, was für PCNA schon länger bekannt war, daß frisch Zytomegalievirus-infizierte Zellen beide Proliferationsmarker exprimieren, ohne selbst eine Replikation zu durchlaufen. Diese falsch positiven Ergebnisse sind auch bei anderen Virusinfektionen denkbar, jedoch beschränkt sich dieser Effekt auf die frühe Infektionsphase und dürfte bei den untersuchten chronisch arteriosklerotischen Läsionen eher von untergeordneter Bedeutung sein.

Mit dem in unserer Untersuchung verwendeten Antikörper MIB1 ergaben sich durchschnittliche Proliferationsraten für die Arteriosklerose der Arteria carotis (Gruppe 1) von  $0,49 \pm 1,05\%$  und für die der Arteria femoralis (Gruppe 2) von  $1,41 \pm 2,20\%$ . Beim Vergleich mit den Literaturdaten bestätigen sich diese niedrigen Replikationsraten. Allerdings wurde in diesen vorausgegangenen Studien überwiegend Koronararteriengewebe mit dem Proliferationsmarker PCNA untersucht. GORDON et al<sup>26</sup> zeigte an primären Koronarstenosen von explantierten Herzen eine PCNA-Expression in der Intima und Media in sehr geringem Umfang (Intima 0,62%; Media 0,31%). Solche Proliferationsindizes erscheinen äußerst niedrig, verglichen mit den in tierexperimentellen Arteriosklerosemodellen gefundenen verletzungs-induzierten Proliferationsraten von 30-50%.<sup>15</sup> Für humane Koronararterien bestätigte O'BRIEN et al<sup>50</sup> die niedrige Zellreplikationsrate (82% der Primärstenosen zeigten sogar keine PCNA positive Zelle), und er erweiterte diese Beobachtung auch auf Restenosen, deren PCNA-Positivität deutlich unter 1% blieb. Demgegenüber fand PICKERING et al<sup>58</sup> ebenfalls an koronarem Atherektomiematerial deutlich höhere Proliferationsraten, für Primärstenosen 3,6%, für Restenosen 15,2%. Zusätzlich schloß er Atherektomiematerial aus der unteren Extremität in seine Untersuchung mit ein und konstatierte ihnen ähnlich hohe Proliferationsindizes. Alle weiteren bisher publizierten Untersuchungen zeigten Replikationsraten kleiner als 2,5%, sowohl für koronares Atherektomiematerial<sup>83,25</sup> als auch für die Arteria carotis.<sup>61,44</sup>

Selbst wenn man die Untersuchung von PICKERING et al<sup>58</sup> als „Ausreißer“ mit falsch hohen Proliferationsraten aus einer Gesamtbeurteilung ausklammern würde

und nur die publizierten Proliferationsindices von Koronararterien betrachtet, zeigen sich Unterschiede etwa um den Faktor 4: Bei GORDON et al<sup>26</sup> befanden sich 0,6%, bei TAYLOR et al<sup>83</sup> 2,3% aller Zellen in Proliferation. Die Literaturdaten bezüglich der Karotisläsionen zeigen ähnlich widersprüchliche Ergebnisse: MAREK<sup>44</sup> fand in 14 Primärstenosen nur 2 Desobliterate mit PCNA positiven Zellen, während REKHTER<sup>61</sup> in 11/11 Präparaten PCNA positive Zellen mit einem durchschnittlichen Proliferationsindex von 1,6% nachweisen konnte.

Diese beträchtlichen Unterschiede in den Proliferationsindizes bei Desobliteraten sowohl der Koronararterien als auch der Arteria carotis spiegeln nicht die tatsächliche In-vivo-Situation wieder. Die exponentielle Vermehrungskinetik müsste bewirken, daß Präparate von fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen mit einem Replikationsindex von über 1,5% ein viel zellreicheres histomorphologisches Bild als Präparate mit fast überhaupt keiner proliferierenden Zelle aufweisen würden. Solche Unterschiede im histomorphologischen Bild wurden von keinem der Autoren beschrieben und konnte auch in unserer Arbeit nicht festgestellt werden. Desweiteren spricht der klinische Verlauf gegen hohe durchschnittliche Proliferationsraten im arteriosklerotischen Gewebe, da bei einem Zellumsatz dieser Größenordnung nicht mit chronischen Läsionen, sondern überwiegend mit Gefäßverschlüssen durch Gewebsvermehrung zu rechnen wäre.

Der Grund für die Diskrepanz in den Proliferationsraten der publizierten Untersuchungen bleibt unklar. Am wahrscheinlichsten muß die Ursache im methodischen Ansatz gesucht werden. Einerseits könnten die o.g. Störfaktoren bei der PCNA-Methode, vor allem die in arteriosklerotischem Gewebe reichlich vorhandenen Wachstumsfaktoren, für die mangelnde Reproduzierbarkeit der Literaturergebnisse verantwortlich sein. Auf der anderen Seite spielt sicherlich die ungenaue pathoanatomische Zuordenbarkeit der mittels Katheteratherektomie gewonnenen Präparate eine Rolle, was im folgenden noch erörtert werden wird.

## 4.2. Patientengruppe 1: Die Karotisläsionen

### **4.2.1. Die pathoanatomische Topographie**

Die pathoanatomische Zuordnung der Zellen mit proliferativer Aktivität ist eine wesentliche methodische Voraussetzung für die Vergleichbarkeit arteriosklerotischer Replikationsdaten. Hier erscheint die Karotisläsion besonders geeignet, weil sie an einer anatomisch klar definierten Lokalisation eine typische Abfolge von unterschiedlichen Wandbeschaffenheiten aufweist und somit einen interindividuellen Vergleich zuläßt. Das Maximum der Stenose findet sich bei über 90% der Läsionen unmittelbar am Ursprung der Arteria carotis interna und ist auf eine kurze Strecke begrenzt. In diesem Bereich sind histomorphologisch alle Formen der komplizierten Arteriosklerose im Sinne eines Läsionstyp V oder VI anzutreffen.<sup>5,77</sup> Die Bifurkation und die distale Arteria carotis communis weisen demgegenüber im Regelfall eine plane, unkomplizierte Arteriosklerose auf ohne eine hämodynamisch wirksame Stenose. Die pathoanatomische Besonderheit der Karotisstenose liegt darin begründet, daß in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer hochgradigen Läsion morphologisch normale Gefäßwandverhältnisse in der distal anschließenden Arteria

carotis interna zu finden sind. In der vorliegenden Studie konnte durch eine behutsame Enderarteriektomietechnik das intraoperativ entnommene Gewebe in seiner topographischen Struktur erhalten werden. Diese „en bloc-Enderarteriektomie“ ermöglichte die Etablierung eines neuen, humanen Arteriosklerosemodells und bot einen wesentlichen methodischen Vorteil sowohl gegenüber der Katheteratherektomie<sup>50,58,83</sup> als auch der Routine-Enderarteriektomien.<sup>44,61</sup> Solche Verfahren liefern Gewebestückchen unklaren pathoanatomischen Ursprungs, eine Mischung aus verschiedenen Läsionsgraden eines arteriosklerotischen Plaques. Wir beobachteten deutliche Unterschiede in der mittleren Proliferationsaktivität (von 0% bis 0,81%) zwischen den vier Plaqueregionen (regelrechte Intima, Plaqueschulter, Plaquezentrum, DIT). Eine Interpretation von Gewebeproben, die sich definierten Plaqueregionen nicht zuordnen lassen, ist auf dem Hintergrund der vorliegenden Ergebnisse als problematisch zu werten.

Durch die Erhaltung der Plaquetopographie war es uns möglich, die Zellen einer gesamten arteriosklerotischen Läsion im Kontext der weitgehend ursprünglichen „In vivo-Situation“ zu studieren. Der grundsätzliche Nachteil einer Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Desobliteration mag dadurch aufgehoben werden, daß spezifische Plaqueregionen der Arteria carotis in geometrischer Auflösung gleichzeitig morphologische Merkmale früher und fortgeschrittener Entwicklungsstadien aufweisen und damit eine Analyse im Sinne einer zeitlichen Zuordnung erlauben. Somit könnte das Studium einer „statischen Momentaufnahme“ Rückschlüsse auf den dynamischen Prozess der Arterioskleroseentstehung erlauben: Anhand der Lokalisation von spezifischen Zelltypen und extrazellulärer Matrix in Übergangszonen von normaler Intima zur Läsion könnten spekulativ Aussagen getroffen werden zu pathogenetischen Mechanismen bei der Initiierung und Progression arteriosklerotischer Prozesse in der humanen Arteria carotis.

Typischerweise waren die Plaques der Arteria femoralis von fragilerer Beschaffenheit, so daß meist nur Intimafragmente vorlagen, die keine genaue pathoanatomische Lokalisation im Kontext der arteriosklerotischen Läsion zuließen.

#### **4.2.2. Die Zellproliferation**

Aufgrund von tierexperimentellen Ergebnissen von verletzungsinduzierter Arteriosklerose wird der Proliferation glatter Muskelzellen eine Schlüsselstellung bei der Atherogenese zugeschrieben.<sup>15,68</sup> Für die pathophysiologischen Veränderungen humaner Gefäßwände ist die Proliferation glatter Muskelzellen unbestritten bedeutsam bei der neointimalen Hyperplasie,<sup>74</sup> AV-Shuntstenosen<sup>63,82</sup> und der Transplantatarteriosklerose.<sup>88</sup> Gemeinsam ist diesen Veränderungen der charakteristische histomorphologische Befund eines homogenen, myofibrozellulären Proliferats. Dagegen ist die chronische, humane Arteriosklerose ein langsamer Prozess, bei dem das Ausmaß und die Zellzusammensetzung der Proliferation noch kontrovers diskutiert werden.

Unsere Primärstenosen der Arteria carotis zeigten im Mittel bei  $0,49 \pm 1,05\%$  aller Zellen eine MIB1-Reaktivität, was mit dem niedrigen „PCNA-Proliferationsindex“ vorhergehender Studien übereinstimmt.<sup>26,44,50,61,83</sup> Dennoch erscheint ein durchschnittlicher Proliferationsindex von 0,49% ausgesprochen hoch, verglichen mit physiologischen Replikationsraten von 0% bis maximal 0,01% sowohl für normale humane Arterien<sup>26,61,76</sup> als auch für gesunde Kontrollarterien in tierexperimentellen Untersuchungen.<sup>78</sup> Angesichts des zeitlichen Rahmens, innerhalb dessen sich arteriosklerotische Läsionen formieren,<sup>87</sup> könnte die klinische Wertigkeit



zahlenmäßig unbedeutend erscheinender Proliferationsindizes wesentlich an Bedeutung gewinnen.

Während im Tiermodell die Arteria carotis der Ratten nach einem Verletzungsstimulus zuerst mit einer erhöhten Zellreplikation in der Media beginnt,<sup>15</sup> waren bei unseren Läsionen in der humanen Arteria carotis nur bei 3 Patienten (davon 2 Patienten aus Gruppe 3) proliferierende Zellen in der Media anzutreffen. Dies könnte ebenso einen Normalbefund darstellen, da einzelne proliferierende Zellen in der Media auch bei nicht pathologisch veränderten Arterien vorkommen.<sup>26</sup> Bei humanem arteriosklerotischem Koronargewebe zeigte sich nur tendenziell ein Überwiegen der PCNA-Aktivität in der Intima gegenüber der Media.<sup>26</sup> So findet sich bei karotidalem Plauegewebe im Gegensatz zu Koronarstenosen und zum Tiermodell Zellproliferation hauptsächlich in der Intima.<sup>61</sup>

In der Plauegion „regelrechte Intima“, einem Bereich morphologisch intakter bis höchstens dezent verdickter Intima, fehlte jegliche proliferative Aktivität. Das Proliferationsmaximum konzentrierte sich im Plauezentrum (PI  $0,81 \pm 1,37\%$ ), mit signifikant höheren Werten als in der prästenotischen DIT-Region ( $p < 0,003$ ) sowie der Schulterregion ( $p < 0,001$ ). Im Plauezentrum spielt sich in der Arteria carotis auch die große Mehrheit der arterioskleroseassoziierten Ereignisse wie Lipidakkumulation, Hämorrhagie, Neovaskularisation, Verkalkung usw. ab.<sup>86</sup> Mit diesen Merkmalen struktureller Umbauvorgänge bzw degenerativer Folgezustände erwies sich die proliferative Aktivität eng korreliert. Die höchste Konzentration proliferierender Zellen fanden wir in zellreichen Arealen, wo Anhaltspunkte für entzündungsähnliche Resorptions- oder Organisationsmechanismen waren, wie in der Umgebung von Neovaskularisationen, Hämorrhagien, intramuralen Thromben und dichten lymphozytären Infiltraten.

Die zunehmende Häufigkeit proliferierender Zellen in Arealen vom Typ III bis VI (in der Klassifikation nach STARY<sup>77</sup>) und das Fehlen proliferierender Zellen in Arealen vom Typ 0 und I deutet darauf hin, daß die Zellproliferation bei der humanen Atherogenese nicht der initiale pathoanatomische Prozess ist.

Es stellt sich nun die Frage, ob diese direkte Korrelation zwischen Ki-67 Expression und sekundären Reparaturzonen in der Arteria carotis Ausdruck des eigentlichen, konstanten Plauewachstumsmechanismus oder nur eine Momentaufnahme einer akzelerierten arteriosklerotischen Plaue im fortgeschrittenem Stadium ist. Die Tatsache, daß in der poststenotischen regelrechten Intima keine Proliferation, jedoch in der prästenotischen DIT-Region (Läsionstyp III bis IV<sup>77</sup>) plauewachstumsrelevante Proliferationsraten stattfinden, relativiert den Einwand der Momentaufnahme, da die DIT-Region zeitlich gesehen als eine Vorstufe zum Plauezentrum aufgefaßt werden kann. Bei der humanen Arteriosklerose gehört eine stetige Zellproliferation auf niedrigem Niveau vom Auftreten der ersten „fatty streaks“ bis zur fortgeschrittenen Läsion zum pathophysiologischen Bild: KATSUDA et al<sup>36</sup> zeigte für „fatty streaks“ humaner Aorta ein ähnliches Proliferationsgeschehen mit Proliferationsindizes unter 2% wie hier und anderorts für Karotis-<sup>61</sup> und Koronarstenosen<sup>26,50</sup> beschrieben. OREKHOV et al<sup>54</sup> untersuchte „fatty streaks“ und verhältnismäßig frühe aortale Plaues mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Er konnte noch eine geringere Zahl von Zellen definitiv in der S-Phase vorfinden.

Dem entspricht die klinische Beobachtung aus duplexsonographischen Untersuchungen an der Karotidgabel, daß Stenosen über längere Zeit konstant bleiben können oder nur gering an Volumen zunehmen.<sup>64</sup> Dagegen scheinen rasch zunehmende Stenosegrade bei fortgeschrittenen Läsionen der Arteria carotis eher

auf sekundäre Komplikationen wie Plaqueruptur oder intramurale Thrombusformation zurückzuführen zu sein<sup>59</sup> und nicht in direktem Zusammenhang mit einem Volumenzuwachs durch Zellproliferation zu stehen. Dies entspricht dem tatsächlich anzutreffenden Bild eines allgemein langsamen Plaquewachstums, mitbedingt durch stetige, wenn auch niedrige Zellreplikation. In Analogie dazu existieren Tiermodelle mit hypercholesterinämischen Kaninchen und Schweinen, bei welchen zumindest für früharteriosklerotische Läsionen niedrige Proliferationsindizes konstant unter 5% beschrieben wurden.<sup>18,37,38,66,91</sup>

Fatty streaks sind ein regelmäßiger Autopsiebefund auch in nicht industrialisierten Gesellschaften in Entwicklungsländern.<sup>84</sup> Dabei kommt es, trotz Zellproliferation,<sup>36</sup> nicht zu signifikanten Stenosen mit der Folge ischämischer Komplikationen. Diese eigentliche Arteriosklerosekrankheit bleibt der Wohlstandsbevölkerung industrialisierter Regionen vorbehalten. Die schon früh im arteriosklerotischen Geschehen einsetzende Zellproliferation ist somit als vorherrschender pathogenetischer Faktor der frühen Plaqueformierung unwahrscheinlich.

Außerdem muß bedacht werden, daß die Zellreplikation im Gleichgewicht mit einer nicht unerheblichen Zellapoptose steht. HEGYI et al.<sup>30</sup> zeigte einen Apoptoseindex <2% für koronare und aortale Läsionen. Apoptose könnte direkt durch die Anhäufung apoptotischen Materials oder möglicherweise auch indirekt durch Plaqueruptur im Rahmen eines programmierten Zelltods intimalen Gewebes<sup>6</sup> das Plaquewachstum fördern, insbesondere bei gestörter Makrophagenaktivität z:B wegen einer Phagozytosehemmung durch oxidiertes LDL.<sup>43,60</sup> In Einklang mit diesem möglichen Szenario steht die Beobachtung, daß medikamentöse antiproliferative Therapieansätze sich klinisch bislang als unwirksam erwiesen, wohingegen die prophylaktische Einnahme des Antioxidanz  $\alpha$ -Tokopherol (Vitamin E) in der „CHAOS“-Studie eine Inzidenzverminderung von Myokardinfarkten belegte.<sup>81</sup> Möglicherweise verhindert  $\alpha$ -Tokopherol die Entstehung größerer Mengen von oxLDL und erhält somit eine ausreichende Makrophagenaktivität, um extrazelluläres Cholesterin und apoptotisches Material abzuräumen.

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Befunde mit einem insgesamt niedrigen Proliferationsniveau und dem Proliferationsmaximum in komplexen Umbauzonen im Plaquezentrum darauf hin, daß die Zellproliferation kein initiales Ereignis der Atherogenese, sondern eine sekundäre, reparative Reaktion darstellt.

#### 4.2.3. Proliferierende Zelltypen

**Glatte Muskelzellen:** In Tierexperimenten induzierte mechanische<sup>15,56</sup> und chemische<sup>90</sup> Gefäßschäden zeigten eine konsekutive glatte Muskelzellproliferation als hauptsächliche Plaquewachstumskomponente. Bei humanen Primärstenosen wird die glatte Muskelzellproliferation kontrovers diskutiert. In unseren untersuchten Präparaten erwies sich  $\alpha$ -Aktin-Expression als stark negativ korreliert mit Ki-67-Reaktivität. In der Intima zeigten etwa die Hälfte aller Präparate kleine, fokale, laminär ausgerichtete, an einen Fischzug erinnernde  $\alpha$ -Aktin-positive Zellpolster, wie es in viel größerem Ausmaß für eine „Neointimale Hyperplasie“ bei Restenose typisch ist. Diese  $\alpha$ -Aktin-exprimierenden Gebiete waren fast regelhaft frei von proliferierenden Zellen. Bei den doppelgefärbten Präparaten waren nur ca. 3% des proliferierenden Zellpools glatte Muskelzellen.

Die wenigen publizierten Daten von immunhistochemisch doppelgefärbten Desobliteraten zeigten für karotidales Gewebe etwas höhere Werte (9% des proliferierenden Zellpools<sup>61</sup>) und für Koronararterien divergierende Angaben (15%<sup>26</sup> bzw 62%<sup>50</sup>).

Schwierigkeiten mit der Bewertung glatter Muskelzellanteile in arteriellem Gewebe hängen mit ihrer besonderen Fähigkeit zusammen, den Phänotyp zu ändern. So können adulte, kontraktile glatte Muskelzellen auf einen Stimulus hin ihre Myofilamentkonzentration reduzieren und einen metabolisch aktiven, „synthetic-type“ Phänotyp (Myofibroblast) ausbilden<sup>12</sup> mit fibrozytären (Kollagen- und Glykosaminoglykansynthese<sup>42</sup>) und phagozytären (Lipidakkumulation<sup>12</sup>) Fähigkeiten. Inzwischen sind einige intermediäre Phänotypen und embryonale mesenchymale Vorstufen in der Intima arteriosklerotischer Plaques nachgewiesen worden<sup>1,53</sup>, die sich unter anderem in ihrem Gehalt an  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Aktin unterscheiden. Beide Filamente können mit der in unserer Untersuchung verwendeten  $\alpha$ -Aktin/HHF35 Färbung detektiert werden.<sup>85</sup> „Synthetic-type“ Gefäßmuskelzellen verlieren ihre  $\alpha$ -Aktin-Filamente und es gibt Hinweise, daß sie sich mit HHF 35 nicht anfärben lassen.<sup>1,62</sup> Dies läßt den Schluß zu, daß sich in der arteriosklerotisch veränderten Intima Myofibroblasten befinden, die nur elektronenmikroskopisch eindeutig identifiziert werden können. Möglicherweise befinden sich in dem Anteil von 46% des proliferierenden Zellpools, der sich mit unseren Doppelfärbungen nicht genauer typisieren ließ, modifizierte glatte Muskelzellen. Unklar bleibt, wie gross der Anteil mit myozytärem Ursprung ist.

Als mögliche Auslöser der Modifikation zwischen Fibroblasten, Myofibroblasten, fetalen und adulten glatten Muskelzellen werden aufgrund tierexperimenteller Arbeiten Wachstumsfaktoren diskutiert.<sup>52</sup> Kürzlich konnte auch für die chronischer Druckbelastung ausgesetzte Harnblase eine durch „transforming growth factor  $\beta$ 1“ (TGF $\beta$ 1) vermittelte glatte Muskelzellmodifikation gezeigt werden,<sup>65</sup> so daß es sich hierbei offenbar nicht um einen gefäßspezifischen Vorgang handelt.

Es ist zusammenfassend betrachtet sehr wahrscheinlich, daß sich intimal in arteriosklerotischen Plaques synthetisierende glatte Muskelzellen mit proliferativer Potenz befinden. Allerdings kann die auf Tiermodellen basierende Hypothese, die Muskelzellproliferation wäre das initiale Ereignis der Arteriosklerose und würde in der Media beginnen<sup>66</sup> anhand des vorliegenden Untersuchungsmaterials für die humane Atherogenese nicht bestätigt werden.

**Makrophagen:** CD68-positive Makrophagen und Schaumzellen waren der vorherrschende proliferierende Zelltyp sowohl bei den Karotis- als auch bei den Femoralstenosen, mit einem Häufigkeitsmaximum in Plaquearealen mit Umbauvorgängen wie z. B. im Randbereich von atheromatösen Herden. Die Doppelfärbungen zeigten, daß der größte Anteil (38%) des proliferierenden Zellpools CD68-positive Zellen waren. Ihre enorme Menge in der Arterienwand kommt nicht nur durch transendotheliale Migration von Monozyten zustande, wie sie GERRITY et al<sup>22</sup> im Tierversuch belegen konnte, sondern auch durch Zellreplikation vor Ort. Proliferierende Schaumzellen und monozytenähnliche Makrophagen in humanen arteriosklerotischen Läsionen wurden erstmals von VILLASCHI et al<sup>89</sup> mit (<sup>3</sup>H)-Thymidin-Markierungen beobachtet. Seitdem sind immunhistochemisch (PCNA-Methode) sowohl für koronare<sup>26</sup> als auch für karotidale<sup>44,61</sup> Läsionen und für aortale Fatty streaks<sup>36</sup> proliferierende Monozyten/Makrophagen nachgewiesen worden. Darüber hinaus weisen Befunde an tierexperimentellem Arteriosklerosegewebe

darauf hin, daß sich in Zellteilung befindliche Schaumzellen von Makrophagen ableiten.<sup>75</sup> Die Transformation von humanen Monozyten zu Schaumzellen ist kürzlich in Zellkultur gezeigt worden.<sup>72</sup>

Obwohl sich in der vorliegenden Serie eine signifikante Kolo-kalisation von proliferativer Aktivität und Schaumzellarealen fand, hatten in den immunhistochemischen Doppelfärbungen die Ki-67-positiven Makrophagen keine schaumzelltypische Morphologie, da die Proliferation von Makrophagen der Transformation in Schaumzellen vorgeschaltet ist.<sup>72,75</sup>

In azellulären atheromatösen Herden fanden sich häufig diffuse, schwach CD68-positive Areale. Dieser Befund könnte einerseits eine unspezifische Reaktion auf Zelldetritus bei der CD68 Färbung darstellen. Andererseits macht die Lokalisation der diffusen CD68-Positivität eine Reaktion mit untergegangenen Schaumzellresten, die erheblich zum Atheromwachstum beitragen können,<sup>2</sup> wahrscheinlich.

Die Makrophagen proliferieren und transformieren zu Schaumzellen um einer sekundären Abräumfunktion nachzukommen.<sup>22</sup> Dabei hat nicht die Makrophagenproliferation, sondern erst ihre massive Nekrose und Apoptose<sup>30,6</sup> für das Plaqueswachstum die grössere Bedeutung. Was letztendlich den Untergang der Makrophagen auslöst, ist noch nicht geklärt. Ein zytotoxischer Effekt auf Makrophagen ist für hohe Konzentrationen oxidierten LDL nachgewiesen worden.<sup>43,60</sup>

Ogleich der Makrophagenuntergang eine größere Auswirkung auf die Plaquesausmaße haben könnte als die Makrophagenproliferation, spielt die enorme Zunahme wachstumsfaktorenfreisetzender Zellen eine Rolle für die benachbarten Zellpopulationen. Makrophagen könnten durch die Ausschüttung einer Reihe von Wachstumsfaktoren wie z.B. „platelet-derived growth factor“ (PDGF) oder „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und Zytokinen die Proliferation von modifizierten glatten Muskelzellen, unspezifischen mesenchymalen Zellen oder T-Lymphozyten fördern.<sup>68</sup>

Daneben sind Makrophagen in der Lage, in großen Mengen matrixdegradierende Proteasen freizusetzen.<sup>31,72</sup> Eine intensive Expression der Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) konnte für Makrophagen im Randbereich der Core-Region von Karotisläsionen nachgewiesen werden, wobei sich gleichzeitig eine enge Korrelation mit lokalen Plaqueshä-morrhagien ergab.<sup>49</sup> Die Proliferation von Makrophagen als Proteasen-produzierende Zellpopulation könnte daher auch ein höheres Maß an Matrixdegradierung und, in der Konsequenz, Plaquesinstabilität bedeuten. Bei arteriosklerotischen Plaques der Koronararterien ist die Anzahl an Makrophagen in der Läsion proportional zur Progression der klinischen Symptome.<sup>48</sup> Makrophagen- und schaumzellreiche atheromatöse Areale gelten als instabil und rupturgefährdet.<sup>7,17</sup> Im Gegensatz dazu könnte der Replikation glatter Muskelzellen und ihrer Filamentsynthese eher eine biomechanische Plaquestabilisierung zugeschrieben werden.

**T-Lymphozyten:** Das lichtmikroskopische Vorkommen singulärer Lymphozyten und vor allem dichter lymphozytärer Infiltrate waren signifikant assoziiert mit dem Nachweis von Ki-67 positiven Zellen. Die Präsenz von proliferierenden T-Lymphozyten in arteriosklerotischen Plaques ist unbestritten.<sup>61</sup> Fraglich bleibt, ob sie antigenspezifisch auf Plaquesbestandteile geprägt und rekrutiert wurden oder unspezifisch an einem entzündlichen Prozess teilnehmen. Die Tatsache, daß in den

immunhistochemischen Doppelfärbungen ein beachtlicher Anteil (10%) an Ki-67-positiven Zellen gleichzeitig CD45RO exprimierten, spricht für eine antigenspezifische T-Zell Rekrutierung. CD45RO wird nur von einer T-Zell-Subpopulation exprimiert, die vorher durch ihr spezifisches Antigen aktiviert wurde. STEMME et al.<sup>79</sup> zeigte, daß ihr Anteil an allen T-Lymphozyten (CD3-positive Zellen) in karotidalen Plaques signifikant höher ist als im peripheren Blut. So belegen CD45RO-positive Ki-67-exprimierende Zellen eine lokale Proliferation antigenspezifischer T-Zellen. Da CD45RO von 64% der T-Lymphozyten im Plauegewebe exprimiert wird,<sup>79</sup> ist anzunehmen, daß nicht 10% sondern eher 15% der proliferierenden Zellen im Plauegewebe T-Lymphozyten entsprechen.

Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß antigene Determinanten in arteriosklerotischen Plaques eine spezifische Immunreaktion auslösen. Für oxidiertes LDL ist dies bereits gezeigt worden,<sup>40</sup> doch sind viele weitere immunogene Noxen einschließlich Viren oder Bakterien<sup>35,40</sup> denkbar.

BOYLE<sup>7</sup> konnte für Koronararterien zeigen, daß nicht nur Makrophagen, sondern auch T-Lymphozyten signifikant in der rupturgefährdeten Zone eines arteriosklerotischen Plaques anzutreffen sind. Diese häufige Kolokalisation von T-Lymphozyten und Makrophagen erklärt sich durch ihre Fähigkeit, Zytokine und Wachstumsfaktoren wie z. B. „granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) freizusetzen. So könnten sich die destabilisierenden Wirkungen der inflammatorischen Zellpopulationen gegenseitig potenzieren.

**Endothelzellen:** Neovaskularisationen, d.h. reaktiv neugebildete Mikrogefäße in der Intima, wo unter physiologischen Bedingungen keine Vasa vasorum vorkommen,<sup>51</sup> zeigten selten proliferierende Endothelzellen: In immunhistochemischen Doppelfärbungen stellten nur etwa 3% des proliferierenden Zellpools von-Willebrand-Faktor-positive Zellen dar. Dieses Ergebnis ist für Neovaskularisationen im Bildungsprozess eher gering und unterscheidet sich von vorhergehenden Arbeiten. Bei Untersuchungen von Koronararterien<sup>50</sup> und Arteria carotis-Desobliteraten<sup>61</sup> waren 11,5% bzw. 14,5% aller PCNA positiven Zellen Endothelzellen. Beide Untersuchungen verwendeten nicht den Antikörper gegen von-Willebrand-Faktor, sondern Ulex Europaeus agglutinin I, für den REKHTER<sup>61</sup> eine hohe Spezifität für Endothelzellen neugebildeter Mikrogefäße beobachtet hatte. Eine niedrigere Spezifität des von-Willebrand-Faktors für Mikrogefäßzellen wäre denkbar und könnte für die eher geringe Replikationsrate der Endothelzellen in unserer Untersuchung mitverantwortlich sein.

Andererseits muss in Betracht gezogen werden, dass die vorhergehenden Untersuchungen<sup>50,61</sup> mit der PCNA Detektierung wahrscheinlich eine zu hohe Endothelproliferation vorspiegeln. In Endothelzellen wird „platelet-derived growth factor“ (PDGF) synthetisiert.<sup>67</sup> Für diesen Wachstumsfaktor ist eine Exprimierung von PCNA gezeigt worden.<sup>55</sup>

**Mastzellen:** Die Mastzellen, dargestellt mit Antikörper gegen Mastzelltryptase, hatten nur einen kleinen Anteil an der Gesamtzellzahl. Sie kamen entweder als Einzelzellen oder in fokalen Akkumulationen von bis zu 10 Zellen vor. Sie fehlten bei einigen Läsionen völlig. Ihre Lokalisation ließ keine Regelmäßigkeit mit histomorphologischen Charakteristika oder in Bezug auf die Plaquetopographie

erkennen. Sie zeigten keine über das Physiologische hinausgehende Reaktivität für den Proliferationsmarker Ki-67.

JEZIORSKA<sup>34</sup> machte ebenfalls die Beobachtung, dass in arteriosklerotischen karotidalen Endarterektomie-Präparaten fokale Mastzellansammlungen vorkommen können, jedoch zeigten seine Präparate eine sehr grosse Variationsbreite in Anzahl und Lokalisation dieser fokalen Akkumulationen. Er beschreibt eine Häufung dieser Mastzellansammlungen in der Umgebung von Verkalkungen und Thrombusformationen sowie Einblutungen. Auf Grund der grossen Variationsbreite dieser Beobachtungen beschränkt sich JEZIORSKA<sup>34</sup> auf eine deskriptive Analyse ohne Zahlenangaben. In einer anderen Untersuchung<sup>35</sup> wurde auch in arteriosklerotisch veränderten Koronararterien vermehrt Mastzellen beobachtet, vor allem in der Plaqueschulter. Beide Autoren schreiben den reichlich mit Mediatorsubstanzen und Proteasen ausgestatteten Mastzellen eine entscheidende Rolle bei der Atherogenese und bei Destabilisationsprozessen wie beispielsweise der Plaqueruptur zu.<sup>34,35</sup>

Die Inkonstanz im Auftreten einzelner Mastzellakkumulationen sowie die in der vorliegenden Untersuchung gezeigte fehlende Zuordnung zur Plaquetopographie oder zu histomorphologischen Charakteristika macht eine pathophysiologische Schlüsselrolle der Mastzellen bei der Arteriosklerose unwahrscheinlich. Warum es an unterschiedlichen Stellen vereinzelt zu Mastzellakkumulationen kommt, bleibt weiter unklar.

### 4.3. Patientengruppe 2: Die Femoralisläsionen

ROSS äusserte 1984 die Vermutung, dass arteriosklerotische Läsionen, da sie sich an unterschiedlichen Segmenten des arteriellen Gefässbaumes manifestieren, entsprechend ihrer Lokalisation spezielle, typische Merkmale aufweisen müssten.<sup>69</sup> Seitdem sind selten vergleichende Untersuchungen zwischen arteriosklerotisch veränderten peripheren Überleitungsgefässen wie z.B. der Arteria carotis und der Arteria femoralis angestellt worden. Erst kürzlich zeigte jedoch PASTERKAMP et al.<sup>57</sup> an autoptischen Gefässsegmenten, dass die Plaqueausdehnung und der Stenosegrad in der Arteria carotis nicht repräsentativ sind für andere periphere Arterien. Dies weist auf Unterschiede im Plaquewachstum hin, die entweder in einer für das jeweilige Segment des arteriellen Gefässbaumes spezifischen „response to injury“<sup>68</sup> oder in einer spezifischen Empfindlichkeit für Schädigungen begründet sein könnten. Zunächst sind die Möglichkeiten der pathophysiologischen „Antworten auf Schädigungen“ in allen Arterienwänden und selbst Venenwänden<sup>92</sup> gleich. Doch möglicherweise liegen die Unterschiede darin, welcher pathophysiologische Prozess dominiert: Beispielsweise gilt die Arteriosklerose der Arteria femoralis als typische V<sub>C</sub>- oder fibroproliferative Läsion.<sup>69,77</sup> Der pathophysiologische Prozess der Matrixsynthese kommt auch in den Plaques der Arteria carotis vor, erreicht dort jedoch nur geringe Ausmaße.<sup>27,67,68,69</sup> Darüberhinaus ist seit langem bekannt, dass mechanische Faktoren wie Flussverlangsamung oder Scherströmungen einen grossen Einfluss auf die Atherogenese haben.<sup>24</sup> Die Hämodynamik weist lokal grosse Unterschiede auf. Insbesondere ist die Verzweigung der Arteria femoralis superficialis und der Arteria profunda femoris mit den anatomischen Verhältnissen im Bereich der Karotidgabel in Anbetracht der Besonderheit des Carotis-Bulbus nicht

gleichzusetzen. Zudem herrschen differente Abstromwiderstände im femoralen und supraaortalen Bereich.

Die von uns untersuchten 10 Femoralisdesobliterate zeigten, verglichen mit den Karotidesobliteraten, einen im Mittel höheren Proliferationsindex, trotz niedrigerer Zellzahl und einem reaktionsärmeren histologischen Bild mit vorherrschender faserreicher Bindegewebsmatrix. ROSS<sup>69</sup> beschrieb diese fibroproliferative, lipidarme arteriosklerotische Läsion als typisch für die Femoralarterien. Unsere untersuchten Läsionen zeigten, vereinbar mit vorhergehenden Arbeiten,<sup>3,4</sup> ein etwas heterogeneres histomorphologisches Bild. Verkalkungen, Plaquehämorrhagien und Neovaskularisationen gehörten ebenso wie zahlreiche Areale mit intramuralen Thromben zu den häufig anzutreffenden Befunden (siehe Tabelle 3.1). Anders als bei den Karotisläsionen zeigten diese histomorphologischen Charakteristika keine signifikante Korrelation mit dem Proliferationsmarker Ki-67. Nur die Lymphozyten bildeten eine Ausnahme und waren signifikant mit proliferierenden Zellen kolokalisiert. Alle anderen für Umbauprozesse typischen histomorphologischen Merkmale korrelierten nicht mit der durchschnittlich im Vergleich mit den Karotisläsionen höheren Proliferationsrate.

Diese Beobachtung ist am ehesten auf die regelhaft vorkommenden, einzelstehenden, diffus verteilten proliferierenden Zellen in der für die Femoralisläsionen typischen Intimafibrose zurückzuführen. Eine derartige „Hintergrund-Proliferation“ verfälscht die statistische Auswertung und trägt zu einem insgesamt höheren Proliferationsindex bei. Andererseits sind die zahlreichen Gesichtsfelder mit thrombotischem Material in unterschiedlichen Organisationsstadien für eine erhöhte Replikationsrate verantwortlich. Die maximale Ki-67 positive Zellzahl von 40 Zellen pro Gesichtsfeld befand sich im Randbereich eines in Resorption befindlichen Thrombus.

Die bei den Femoralisläsionen allgemein beobachtete Intimafibrose<sup>3,4,69</sup> mit dem ultrastrukturellen Nachweis zahlreicher modifizierter glatter Muskelzellen<sup>3,69</sup> macht eine Proliferation dieses Zelltyps wahrscheinlich. In unseren Präparaten zeigten 70% der Ki-67-positiven Zellen den histomorphologischen Aspekt von Makrophagen (siehe Kapitel 3.4.3.), doch könnten modifizierte glatte Muskelzellen einen makrophagenähnlichen Phänotyp angenommen haben.<sup>12</sup> Analog dazu wäre es denkbar, daß der Fibroblasten- bzw Fibrozytenanteil von ca.15% am proliferierenden Zellpool ebenfalls von glatten Muskelzellen abstammt. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit aufwendiger immunhistochemischer und ultrastruktureller Untersuchungen, um das Ausmaß der glatten Muskelzellproliferation gerade für die Arteriosklerose der Arteria femoralis besser bewerten zu können.

#### 4.4. Patientengruppe 3: Die Karotisstenosen mit konsekutiver Restenose

Für einige Tumore stellt die Zellproliferation einen Prognosefaktor dar.<sup>32</sup> Ob für die Prognose der Arteriosklerose der Replikationsrate eine Bedeutung zukommt, ist bislang nur von TAYLOR et al<sup>83</sup> untersucht worden. Er konnte in einer Verlaufsstudie nach koronaren Katheteratherektomien keine Korrelation des klinischen Ergebnisses nach 6 Monaten mit immunhistochemischen Befunden für PCNA nachweisen. Darüberhinaus gibt es für arteriosklerotische Läsionen bisher keine Untersuchungen, die proliferative Ereignisse mit dem postoperativem Verlauf in Beziehung setzen.

Deshalb versuchten wir, mit dieser kleinen Serie von 5 Patienten mit Primärstenosen der Arteria carotis, die innerhalb von 2 Jahren postoperativ restenosierte, Hinweise zu bekommen, ob die Zellproliferation prognostische Aussagen zuläßt.

Im Vergleich mit den Primärstenosen der Patientengruppe 1 zeigten sich keine Unterschiede in der Korrelation der proliferierenden Zellen und den histomorphologischen Charakteristika. Ein Maximum der Zellreplikation war ebenfalls in degenerativen Umbauzonen zu finden. Allerdings war die Proliferationsrate durchschnittlich um etwa 1% höher, mit einem Differenzmaximum in der DIT-Region. Hier überstieg die Replikation sogar die Werte des Plaquezentrums, d.h. in der prästenotischen, der Entstehung des Plaquezentrums auch zeitlich vorausgehenden DIT-Region bestand eine deutlich höhere Proliferationsrate bei Primärstenosen, die später Rezidive entwickelten. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass diese restenosen-ausbildende Primärstenosen in einem früheren Arteriosklerose-stadium mit Zellproliferation beginnen.

Während in Gruppe 1 nur eine der 26 Läsionen proliferierende Zellen in der Media zeigte, waren in Gruppe 3 bei 2 der 5 Läsionen Ki-67-positive Einzelzellen in den Mediaanteilen des Präparats vorhanden. Ob dies eine zufällige Häufung oder ein Hinweis auf eine von der Media ausgehende Restenosepotenz ist, kann bei der kleinen Fallzahl nicht geklärt werden und wird Gegenstand nachfolgender Untersuchungen sein.

#### 4.5. Klinische Charakteristika und Proliferationsaktivität

Die Proliferationsaktivität der Läsionen korrelierte nicht mit den Risikofaktoren oder einem der untersuchten Symptome. Allerdings waren bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten hinsichtlich der präoperativen Stenoseprogression keine anamnestischen Daten verfügbar. So ist die Frage, ob die Geschwindigkeit des Plaquewachstums mit den patientenspezifischen Proliferationsindizes korreliert, mit der vorliegenden Arbeit nicht beantwortbar. Doch ein Zusammenhang zwischen der patientenspezifischen Proliferationsaktivität und der Symptomatik ließ sich nicht nachweisen.

Allerdings sollte in Betracht gezogen werden, daß bei Karotisstenosen die objektive Erueierung von Symptomen oft unmöglich ist. So können z.B. Amaurosis fugax oder transitorische ischämische Attacken (TIA) vom Patienten unbemerkt während des Schlafs auftreten<sup>5</sup>.

Die Risikofaktoren zeigten ebenfalls keine Korrelation mit den patientenspezifischen Proliferationsindizes. Auf Grundlage unserer Daten erscheint keine Noxe oder Kombination aus Risikofaktoren direkt Zellreplikation in der Arterienwand zu bewirken. Doch bei der Größe unseres Kollektiv und der damit verbundenen Häufigkeit der Ereignisse (z.B. Diabetes mellitus kam in Gruppe 1 nur 8 Mal vor) ist eine definitive Aussage aus statistischen Gründen nicht sinnvoll.



## **5. Zusammenfassung**

Bisher existieren nur wenige Untersuchungen zur Zellproliferation in arteriosklerotisch veränderten, menschlichen Gefäßwänden. Tierexperimentelle Befunde weisen darauf hin, daß die Proliferation glatter Muskelzellen im Rahmen primärer Arteriosklerose und sekundärer neointimaler Umbauprozesse von zentraler pathogenetischer Bedeutung ist. Untersuchungen an humanen arteriosklerotischen Läsionen erbrachten bisher sich deutlich unterscheidende Proliferationsraten (zwischen annähernd 0% und 3,6%) und konnten die Frage nicht klären, welcher Zelltyp die pathophysiologische Schlüsselrolle bei der Replikation spielt.

**Material und Methoden:** In der vorliegenden Studie wurden 41 Desobliterate fortgeschrittener arteriosklerotischer Läsionen, 31 aus der Arteria carotis und 10 aus der Arteria femoralis, histomorphologisch und immunhistochemisch untersucht. Dabei wurden 425 mikroskopische Gesichtsfelder (400fache Vergrößerung) in Serienschnitten mit Färbungen für HE und EvG sowie immunhistochemischen Detektierungen für in Proliferation befindliche Zellen (Ki-67), Makrophagen (CD 68), T-Lymphozyten (CD45 RO bzw. CD3), glatten Muskelzellen ( $\alpha$ -Aktin), Endothelzellen (von-Willebrand-Faktor) und Mastzellen (Mastzelltryptase) ausgewertet. Zusätzlich fertigten wir bei 11 repräsentativen Desobliteraten immunhistochemische Doppelfärbungen an, um den Zelltyp der proliferierenden Zellen zu belegen.

### **Ergebnisse:**

**Arteria carotis (Gruppe 1):** Die 26 Primärstenosen der Arteria carotis zeigten positive Antigenreaktionen mit Ki-67 bei  $0,49 \pm 1,05\%$  aller Zellkerne als Zeichen für in Replikation befindliche Zellen, vorwiegend in makrophagen- und lymphozytenreichen Bezirken hoher Zelldichte sowie in der Nachbarschaft struktureller Reparationszonen im Randbereich von intramuralen Thromben, Plauehämorrhagien sowie Neovaskularisationen ( $p < 0,01$ ). Eine „en bloc-Endarteriektomie“ der Desobliterate ermöglichte die getrennte Auswertung von 4 definierten Regionen: Diffuse intimale Schichtdickenzunahme (DIT), Plauezentrum, Plaueschulter und regerechte Intima. Die höchsten Proliferationsraten fanden sich im Plauezentrum (0,81%) und in der DIT-Region (0,26%). In der Region „regelrechte Intima“, in den anliegenden Mediaanteilen sowie in Regionen mit laminär ausgerichteten  $\alpha$ -Aktin-positiven Myozyten waren keine Anhaltspunkte für proliferative Aktivität erkennbar. Doppelfärbungen bestätigten CD68-positive Makrophagen (38%) und CD45 RO-positive Lymphozyten (10%) als Hauptvertreter proliferierender Zellen. Fast die Hälfte der Ki-67-positiven Zellen zeigte in unseren Doppelfärbungen keine Reaktivität mit den anderen vier immunhistochemischen Markern und repräsentierten unspezifische mesenchymale Zellen, die wahrscheinlich modifizierte, glatte, „synthetic-type“ Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten darstellen.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, daß, im Gegensatz zu tierexperimentellen Untersuchungen, bei der fortgeschrittenen Arteriosklerose der Arteria carotis des Menschen Proliferation im Rahmen sekundärer struktureller Umbauvorgänge mit überwiegend inflammatorischem Zellbild in Erscheinung tritt.

**Arteria femoralis (Gruppe 2):** Die 10 Primärstenosen der Arteria femoralis zeigten im Vergleich zur Arteria carotis durchschnittlich höhere Proliferationsraten ( $1,41 \pm 2,20\%$ ), die einerseits auf das häufigere Auftreten von intramuralen Thromben und andererseits auf einzelstehende, in der für die Pathomorphologie der Arteria femoralis typischen Intimafibrose diffus verteilten Ki-67-positiven Zellen zurückzuführen sind. So existiert hier neben der mit sekundären Abräumprozessen assoziierten Proliferation noch eine „Hintergrund-Proliferation“, die keine  $\alpha$ -Aktin-Reaktivität zeigt und den unspezifischen mesenchymale Zellen der Karotisläsionen entsprechen könnte.

**Karotisstenosen mit konsekutiver Restenose (Gruppe 3):** Die 5 Desobliterate stammten retrospektiv von Patienten mit einer Primärstenose der Arteria carotis, die innerhalb von 2 Jahren postoperativ eine Restenose entwickelten. Sie wurden mit den Karotisstenosen ohne Restenosen im postoperativen Verlauf (Gruppe 1) verglichen. Es ergab sich bezüglich Verteilung der proliferierenden Zellen in der Intima ein ähnliches histomorphologisches Bild. Auffällig war eine insgesamt höhere Proliferationsrate ( $1,66 \pm 1,78\%$ ), vor allem in der prästenotischen DIT-Region, sowie Ki-67-positive Einzelzellen in den anliegenden Mediaanteilen bei zwei der fünf Desobliteraten (hingegen nur eines von 26 Desobliteraten bei Gruppe 1). Ob die Restenose von proliferierenden Zellen in der Media ihren Ausgang nimmt, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die einleitend gestellten fünf Fragen können nun wie folgt beantwortet werden:

1. In arteriosklerotischen Plaques der Arteria carotis proliferierten 0,5% aller Zellen, davon sind 38% Makrophagen, 10% T-Lymphozyten und 46% unspezifische mesenchymale Zellen. Nur knapp 3% der proliferierenden Zellen waren  $\alpha$ -Aktin positive glatte Muskelzellen.
2. Die höchste Proliferationsrate war im Plaquezentrum (0,8%) und in der prästenotischen DIT-Region (0,26%) anzutreffen. In der poststenotischen regelrechten Intima waren keine und in der Schulterregion nur wenige (0,12%) proliferierende Zellen.
3. Im Vergleich mit der Arteria carotis zeigten arteriosklerotische Plaques der Arteria femoralis durchschnittlich eine höhere proliferative Aktivität (PI 1,4%), die überwiegend auf umbauassoziierte T-Lymphozyten und Makrophagen zurückzuführen war.
4. Eine Korrelation der Zellproliferation mit den Risikofaktoren oder der Symptomatik der Patienten war nicht festzustellen.
5. Primärstenosen mit konsekutiver Restenose hatten durchschnittlich eine höhere Proliferationsrate, mit proliferierenden Einzelzellen in der Media bei 2 von 5 Desobliteraten.

## **6. Schlußfolgerung**

Bei der fortgeschrittenen Arteriosklerose humaner Karotis- und Femoralarterien überwiegt die Proliferation entzündungsassoziierter Makrophagen und T-Lymphozyten im Rahmen sekundärer struktureller Umbau- und Abräumvorgänge. An zweiter Stelle steht die Proliferation unspezifischer mesenchymaler Zellen (modifizierten glatte Muskelzellen und Fibroblasten), für die bisher der präzise elektronenmikroskopische Nachweis noch aussteht.

## **7. Literaturverzeichnis**

1. Babaev VR, Bobryshev YV, Stenina OV, Tatarak EM, Gabbiani G (1990) **Heterogeneity of smooth muscle cells in atheromatous plaque of human aorta.** Am J Pathol 136: 1031-1042
2. Ball RY, Stowers EC, Burton JH, Cary NRB, Skepper JN, Mitchinson MJ (1995) **Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma.** Atherosclerosis 114: 45-54
3. Barbano EF, Newman GE, McCann RL, Hackel DB, Stack RS, Palmos LE, Mikat EM (1989) **Correlation of clinical history with quantitative histology of lower extremity atheroma biopsies obtained with the Simpson atherectomy catheter.** Atherosclerosis 78: 183 - 196
4. Barbieri E, Tanganelli P, Taddei G, Attino V, Molinari G, Mirandola G, Cosimi A, Destro G (1991) **il ruolo dell' aterectomia direzionale nello studio della ristenosi postangioplastica.** Cardiologia 36(6): 461-467
5. Bassiouny HS, Davis HD, Massawa N, Gewertz BL, Glagov S, Zarins CK (1989) **Critical carotid stenoses: Morphologic and chemical similarity between symptomatic and asymptomatic plaques.** J Vasc Surg 9: 202-212
6. Björkerud S, Björkerud B (1996) **Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability.** Am J Pathol 149: 367-380
7. Boyle JJ (1997) **Association of coronary plaque rupture and atherosclerotic inflammation.** J Pathol 181:93-99
8. Bräsen JH, Niendorf A (1997) **Atherosklerose: Formale Pathogenese, Klassifikation und funktionelle Bedeutung.** Pathologe 18: 218-227
9. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H (1987) **Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ .** Nature 326: 515-517
10. Bravo R, Macdonald-Bravo H (1987) **Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: Association with DNA replication sites.** J Cell Biol 105: 1549-1554
11. Breslow JL (1996) **Mouse models of atherosclerosis.** Science 272: 685-688
12. Campbell GR, Campbell JH, Manderson JA, Horrigan S, Rennick RE (1988) **Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell.** Arch Pathol Lab Med 112: 977-986
13. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992) **Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in mikrowave-processed formalin-fixed paraffin sections.** J Pathol 168: 357-363
14. Celis JE, Bravo R, Larsen PM, Fey SJ (1984) **Cyclin: A nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells.** Leukemia Res 8: 143-157
15. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM (1983) **Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium.** Lab Invest 49: 327-333

16. Cremer P., Nagel D., Labrot B., Mucbe R., Elster H., Mann D., Seidel D (1991) **Göttinger Risiko-, Inzidenz- und Prävalenzstudie (GRIPS)**. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
17. Falk E (1992) **Why do plaques rupture?** Circulation 86 [suppl: III]: III-30-III-42
18. Florentin RA, Nam SC, Lee KT, Lee KJ, Thomas WA (1969) **Increased mitotic activity in aortas of swine. After three days of cholesterol feeding.** Arch Path 88: 463-469
19. Geer JC, McGill HC, Robertson WB, Strong JP (1968) **Histologic characteristics of coronary artery fatty streaks.** Lab Invest 18: 565-570
20. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** J Immunol 133: 1710-1715
21. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991) **Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67.** Am J Pathol 138: 867-873
22. Gerrity RG (1981) **The role of the monocyte in atherogenesis. II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions.** Am J Pathol 103: 191-200
23. Gibbons GH, Dzau VJ (1994) **The emerging concept of vascular remodeling.** N Engl J Med 330: 1431-1438
24. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN (1988) **Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries.** Arch Pathol Lab Med 112: 1018-1031
25. Gonschior P; Nerlich A, Mack B, Wiest IRM, Höfling B (1994) **Immunhistologische Zellcharakterisierung von Gewebe aus Primär- und Restenosen.** VASA 23: 15-22
26. Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM (1990) **Cell proliferation in human coronary arteries.** Proc.Natl.Acad.Sci 87: 4600-4604
27. Gown AM., Tsukada T., Ross R (1986) **Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions.** Am J Pathol 125, 191-
28. Gutstein WH (1990) **The central nervous system and atherogenesis: role of the arterial smooth muscle cell.** Atherosclerosis 82: 145-155
29. Guyton JR, Klemp KF. (1996) **Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 16: 4-11
30. Hegyi L, Skepper JN, Cary RB, Mitchinson MJ (1996) **Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis.** J Pathol 180: 423-429
31. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries S (1991) **Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization.** Proc Natl Acad Sci 88: 8154-8158
32. Hofstädter F, Knüchel R, Rüschoff J (1995) **Cell proliferation assessment in oncology.** Virchows Arch 427: 323-341
33. Imparato AM, Riles TS, Gorstein F (1979) **The carotid bifurcation plaque: pathologic findings associated with cerebral ischemia.** Stroke 10 No.3: 238-345
34. Jeziorska M, McCollum C, Woolley DE (1997) **Mast cell distribution, activation, and phenotype in atherosclerotic lesions of human carotid arteries.** J Pathol 182: 115-122

35. Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT (1994) **Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture.** *Circulation* 90: 1669-1678
36. Katsuda S, Coltrera MD, Ross R, Gown AM (1993) **Human atherosclerosis. IV. Immunocytochemical analysis of cell activation and proliferation in lesions of young adults.** *Am J Pathol* 142: 1787-1793
37. Kim DN, Schmee J, Ho HT, Thomas WA (1988) **The "turning off" of excessive cell replicative activity in advanced atherosclerotic lesions of swine by a regression diet.** *Atherosclerosis* 71: 131-142
38. Kim DN, Schmee J, Lee KT, Thomas WA (1987) **Atherosclerotic lesions in the coronary arteries of hyperlipidemic swine.** *Atherosclerosis* 64: 231-242
39. Libby P, Egan D, Skarlatos S (1997) **Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis. An assessment of the evidence and need for future research.** *Circulation* 96: 4095-4103
40. Libby P, Hansson G (1991) **Biology of disease. Involvement of the immune system in human atherogenesis: Current knowledge and unanswered questions.** *Lab Invest* 64: 5-14
41. Lüscher TF, Oemar BS, Yang Z, Noll G (1995) **Molekulare Medizin und Gentherapie am Beispiel von Arteriosklerose und Restenose.** *Schweiz Med Wochenschr* 125: 2107-2121
42. MacLeod DC, Strauss BH, de Jong M, Escaned J, Umans VA, van Suylen RJ, Verkerk A, de Feyter PJ, Serruys PW (1994) **Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions.** *J Am Coll Cardiol* 23: 59-65
43. Marchant CE, Law NS, van der Veen C, Hardwick SJ, Carpenter KLH, Mitchinson MJ (1995) **Oxidized low-density lipoprotein is cytotoxic to human monocyte-macrophages: protection with lipophilic antioxidants.** *FEBS Letters* 358: 175-178
44. Marek JM, Koehler C, Aguirre ML, Westerband A, Gentile AT, Mills JL, Hunter GC (1998) **The histologic characteristics of primary and restenotic carotid plaque.** *J Surg Res* 74: 27-33
45. Mate JL, Ariza A, Muños A, Molinero JL, López D, Navas-Palacios J (1998) **Induction of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 expression by cytomegalovirus infection.** *J Pathol* 184: 279-282
46. McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA (1993) **Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1.** *Histopathology* 22: 355-360
47. McCormick D., YU C, Hall PA (1993) **The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens.** *Histopathology* 22: 543-547
48. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT (1994) **Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture.** *Circulation* 90: 775-778
49. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW (1995) **Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis.** *Circulation* 92: 1393-1398

50. O'Brien ER, Alpes CE, Stewart DK, Ferguson M, Tran N, Gordon D, Benditt EP, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM (1993) **Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy.** *Circ Res* 73: 223-231
51. O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM (1994) **Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques.** *Am J Pathol* 145: 883-894
52. Oh SJ, Kurz H, Christ B, Wilting J (1998) **Platelet-derived growth factor-B induces transformation of fibrocytes into spindle-shaped myofibroblasts in vivo.** *Histochem Cell Biol* 109: 349-357
53. Okamoto E, Suzuki T, Aikawa M, Imataka K, Fujii J, Kuro-o M, Nakahara K, Hasegawa A, Yazaki Y, Nagai R (1996) **Diversity of the synthetic-state smooth-muscle cells proliferating in mechanically hemodynamically injured rabbit arteries.** *Lab Invest* 74: 120-128
54. Orekhov AN, Kosykh VA, Repin MD, Smirnov VN (1983) **Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta. I. Flow cytofluorometric determination of cellular deoxyribonucleic acid content.** *Lab Invest* 48: 395-398
55. Ottavio L, Chang CD, Rizzo MG, Travali S, Casadevall C, Baserga R (1990) **Importance of introns in the growth regulation of mRNA levels of the Proliferating Cell Nuclear Antigen gene.** *Mol Cell Biol* 10: 303-309
56. Owens GK, Reidy MA (1985) **Hyperplastic growth response of vascular smooth muscle cells following induction of acute hypertension in rats by aortic coarctation.** *Circ Res* 57: 695-705
57. Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hillen B, Banga JD, Haudenschild CC, Borst C (1998) **Is plaque formation in the common carotid artery representative for plaque formation and luminal stenosis in other atherosclerotic peripheral arteries? A post mortem study.** *Atherosclerosis* 137: 205-210
58. Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, Kearney MA, Isner JM (1993) **Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularisation.** *J Clin Invest* 91: 1469-1480
59. Rautenberg W, Hennerici M (1989) **Long-term follow-up of carotid disease. Clinical and ultrasound aspects.** *Clin Physiol Meas* 10 (Suppl A): 33-36
60. Reid VC, Mitchinson MJ (1993) **Toxicity of oxidised Low Density Lipoprotein towards mouse peritoneal macrophages in vitro.** *Atherosclerosis* 98: 17-24
61. Rekhther MD, Gordon D (1995) **Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques.** *Am J Pathol* 147: 668-677
62. Rekhther MD, Gordon D (1994) **Does platelet-derived growth factor-A chain stimulate proliferation of arterial mesenchymal cells in human atherosclerotic plaques?** *Circ Res* 75: 410-417
63. Rekhther M, Nicholls S, Ferguson M, Gordon D (1993) **Cell proliferation in human arteriovenous fistulas used for hemodialysis.** *Arterioscler Thromb* 13: 609-617
64. Roederer GO, Langlois YE, Jager KA, Primozich JF, Beach KW, Phillip DJ, Strandness DE (1984) **The natural history of carotid arterial disease in asymptomatic patients with cervical bruits.** *Stroke* 15: 605-613
65. Roelofs M, Faggian L, Pampinella F, Paulon T, Franch R, Chiavegato A, Sartore S (1998) **Transforming growth factor  $\beta$ 1 involvement in the conversion of**

- fibroblasts to smooth muscle cells in the rabbit bladder serosa.** *Histochem J* 30: 393-404
66. Rosenfeld ME, Ross R (1990) **Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits.** *Arteriosclerosis* 10: 680-687
67. Ross R (1995) **Cell biology of atherosclerosis.** *Annu. Rev. Physiol.* 57: 791-804
68. Ross R (1993) **The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.** *Nature* 362: 801-809
69. Ross R, Wight TN, Strandness E, Thiele B (1984) **Human atherosclerosis: I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery.** *Am J Pathol* 114: 79-93
70. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, van Noorden S, Price Y, Lane DP, Wright NA (1991) **A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction.** *J Pathol* 165: 173-178
71. Seidel D (1993) **Risikofaktoren der Arteriosklerose. Unterschiedliche Profile - unterschiedliche Mechanismen?** *Z Kardiol* 82, Suppl. 5: 33-37
72. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V (1995) **Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture.** *Circulation* 92: 1565-1569
73. Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991) **Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections.** *J Histochem Cytochem* 39: 741-748
74. Sottirai VS, Yao JST, Batson RC, Sue SL, Jones R, Nakamura YA (1989) **Distal anastomotic intimal hyperplasia: Histopathologic character and biogenesis.** *Ann Vasc Surg* 3: 26-33
75. Spagnoli LG, Orlandi A, Santeusano G (1991) **Foam cells of the rabbit atherosclerotic plaque arrested in metaphase by colchicine show a macrophage phenotype.** *Atherosclerosis* 88: 87-92
76. Spagnoli LG, Villaschi S, Neri L, Palmieri G, Taurino M, Faraglia V, Fiorani P (1981) **Autoradiographic studies of the smooth muscle cells in human arteries.** *Arterial Wall* 7: 107-112
77. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995) **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 atherosclerosis, American Heart Association.** *Circulation* 92: 1355-1374
78. Stary HC, Mc Millan GC, (1970) **Kinetics of cellular proliferation in experimental atherosclerosis.** *Arch Path* 89: 173-183
79. Stemme S, Holm J, Hansson K (1992) **T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45 RO and the integrin VLA-1.** *Arterioscler Thromb* 12: 206-211
80. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund D, Witzum JL, Hansson GK (1995) **T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognise oxidised Low Density Lipoprotein.** *Proc Natl Acad Sci* 92: 3893-3897



81. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ (1996) **Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS).** Lancet 347: 781-786
82. Swedberg SH, Brown BG, Sigley R, Wight TN, Gordon D, Nicholls SC (1989) **Intimal fibromuscular hyperplasia at the venous anastomosis of PTFE grafts in hemodialysis patients.** Circulation 80: 1726-1736
83. Taylor AJ, Farb AA, Angello DA, Burwell LR, Virmani R (1995) **Proliferative activity in coronary atherectomy tissue. Clinical, histopathologic, and immunohistochemical correlates.** Chest 108: 815-820
84. Tejada C, Tsrong JP, Montenegro MR, Restrepo C, Solberg LA (1968) **Distribution of coronary and aortic atherosclerosis by geographic location, race, and sex.** Lab Invest 18: 509-526
85. Tsukada T, Tippens D, Gordon D, Ross R, Gown AM (1987) **HHF35, a muscle-actin-specific monoclonal antibody. I. Immunocytochemical and biochemical characterization.** Am J Pathol 126: 51-60
86. Van Damme H, Vivario M, Boniver J, Limet R (1994) **Histologic characterization of carotid plaques.** Cardiovasc Pathol 3: 9-17
87. Velican C, Velican D (1983) **Progression of coronary atherosclerosis from adolescents to mature adults.** Atherosclerosis 47: 131-144
88. Ventura OH, Mehra MR, Smart FW, Stapleton DD (1995) **Cardiac allograft vasculopathy: Current concepts.** Am Heart J 129: 791-798
89. Villaschi S, Spagnoli LG (1983) **Autoradiographic and ultrastructural studies on the human fibro-atheromatous plaque.** Atherosclerosis 48: 95-100
90. Völker W, Dorszewski A, Unruh V, Robenek H, Breithardt G, Buddecke E (1996) **Copper-induced inflammatory reactions of rat carotid arteries mimic restenosis/arteriosclerosis-like neointima formation.** Atherosclerosis 130: 29-36
91. Walker LN, Reidy MA, Bowyer DE (1986) **Morphology and cell kinetics of fatty streak lesion formation in the hypercholesterolemic rabbit.** Am J Pathol 125: 450-459
92. Westerband A, Mills JL, Marek JM, Heimark RL, Hunter GC, Williams SK (1997) **Immunocytochemical determination of cell type and proliferation rate in human vein graft stenoses.** J Vasc Surg 25: 64-73
93. World Health Organization Technical Report Series (1958) **Classification of atherosclerotic lesions. Report of study group.** WHO Tech Rep Ser 143: 1-20
94. Zeymer U, Fishbein MC, Forrester JS, Cercek B (1992) **Proliferating Cell Nuclear Antigen immunohistochemistry in rat after balloon denudation. Comparison with thymidine and bromodeoxyuridine labeling.** Am J Pathol 141: 685-690

## 8. Anhang

### Abkürzungen

DIT: Diffuse intimal thickening - diffuse intimale Schichtdickenzunahme proximal des Plaquezentrums der Arteria carotis (siehe Tab 2.4.).

E.v.G: Elastica van Gieson Färbung.

GF: Gesichtsfeld(er) - Mikroskopischer Ausschnitt im Präparat bei 400facher Vergrößerung (synonym HPF).

H.E. Hämatoxylin/Eosin Färbung.

HPF: High Power Field - 400fache mikroskopische Vergrößerung (synonym GF).

PI: Proliferationsindex (%) =  $\frac{\text{Gesamtzellzahl im Gewebe des mikroskop. GF}}{\text{Anzahl der proliferierenden Zellen des GF}}$

### Feststehende Begriffe

Homologe Gesichtsfelder: histomorphologisch weitgehend identische Gewebeauschnitte (GF) in mittels Serienschnitten gewonnenen aufeinanderfolgenden Präparaten eines Desobliterats (siehe Kapitel 2.2. bzw. 2.5.3.).

Serienschnitte: Serie vieler direkt aufeinanderfolgender 3µm dicker Schnitte eines Desobliterats. Damit konnten histomorphologisch weitgehend identische Präparate angefertigt werden (siehe Kapitel 2.2.).

„Synthetic-type“ Gefäß-muskelzelle: Metabolisch aktive (Kollagen- und Glykosaminoglykansynthese) glatte Muskelzelle mit einer geringen Konzentration an kontraktile Myofilamenten (syn: Myofibroblast).

Zelldichte des GF: Zelldichte im Gewebe eines mikroskopischen Gesichtsfeldes bei 400facher Vergrößerung.

## Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

<b><u>Tabellen</u></b>	<b><u>Seite</u></b>
1.1. Die Klassifikation der arteriosklerotischen Plaquetypen	2
1.2. Rangfolge der Risikofaktoren für die 3 häufigsten klinischen Manifestationen der Arteriosklerose	4
2.1.1. Patientengruppe 1: 26 Primärstenosen der Arteria carotis	11
2.1.2. Patientengruppe 2: 10 Primärstenosen der Arteria femoralis	12
2.1.3. Patientengruppe 3: 5 Primärstenosen der Arteria carotis, bei denen später Restenosen auftraten.	13
2.4. Definition der intimalen Plaqueregionen bei den Karotidesobliteraten	16
2.5. Immunhistoschemische Marker	19
2.5.1 Vorbehandlung und Detektionssysteme	19
3.1. Häufigkeit der histomorphologischen Merkmale in den 3 Patientengruppen	25
3.3.1. Koexistenz der histomorphologischen Charakteristika mit Ki-67-Positivität in Desobliteraten der Arteria carotis (Gruppe 1)	34
3.3.2. Koexistenz der histomorphologischen Charakteristika mit Ki-67-Positivität bei Desobliteraten der Arteria femoralis (Gruppe 2)	34
3.6. Häufigkeit der Risikofaktoren	40

<b><u>Abbildungen</u></b>	<b><u>Seite</u></b>
2.4.1. Schematische Darstellung der Lokalisation der Plaqueregionen in einer arteriosklerotischen Läsion der Arteria carotis	17
2.4.2. Longitudinalschnitt durch eine Karotisläsion mit Plaquezentrum, Plaqueschulter und distalem Übergang in regelrechte Intima (HE-Färbung, x20)	18
2.5.1. Schematische Darstellung der ABC-Methode	20
2.5.2. Schematische Darstellung der APAAP-Methode	21
2.5.3. Schematische Darstellung des EPOS-Systems	21
2.5.4. Positivkontrolle der immunhistochemischen Doppelmarkierung von Ki-67 (MIB1) und $\alpha$ -Aktin (200fach vergrößert)	23
3.1.2. HE-Färbung der arteriosklerotisch veränderte Arteria femoralis (200fach vergrößert)	27
3.2.1. Die durchschnittlichen Proliferationsraten in den 3 Patientengruppen	28
3.2.2. Immunhistochemische Färbung für MIB1/Ki-67 einer arteriosklerotisch veränderten Gefäßwand der Arteria carotis (Vergrößerung x200)	29
3.2.3. Fokale Ansammlung Ki-67-positiver Zellen in der Umgebung des „Nekrotischen Core“-Areal im Plaquezentrum (MIB1/DAB Färbung, Vergrößerung x200)	29
3.2.4. Die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen nimmt mit der Gesamtzellzahl des GF zu; Poisson- Regression mit GEE (eq)	30
3.2.5. Die Proliferationsindizes in den 3 Arterioskleroseregionen der Karotidesobliterate in Gruppe 1 und 3	31

---

3.3.1. Histomorphologische Merkmale und Ki-67 Positivität in den 420 GF der Karotidesobliterate (Gruppe 1)	32
3.3.2. Immunhistochemische Doppelfärbung für Ki-67 (MIB1/DAB- braune Zellkerne) und Faktor VIII (Endothelzellen - rot) (Vergrößerung $\times 400$ )	33
3.4.1. Korrespondierende Gesichtsfelder von Serienschnitten zeigten für Patientengruppe 1 die Zuordnung zwischen Ki-67- und CD68-Expression (Poisson-Regression mit GEE)	36
3.4.2. Immunhistochemische Färbung eines Karotidesobliterat für glattmuskuläres $\alpha$ -Aktin (400fach vergrößert).	36
3.5.1. Balkendiagramm zur graphischen Darstellung der immunhistochemischen Zelltypisierung der doppelgefärbten Karotidesobliterate.	38
3.5.2. Graphische Darstellung des immunhistochemisch ermittelten Zelltyps der proliferierenden Zellen in Desobliteraten der Arteria carotis	39

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Priv. Doz. Dr. Richard Brandl für die Überlassung des Themas und das vorbildliche und tatkräftige Engagement bei der Betreuung der Arbeit.

Dr. Thomas Richter stand mir bei der histologischen Beurteilung der Präparate hilfsbereit und mit Ausdauer zur Seite. Frau Renate Hegenloh führte mit grossem technischem Geschick die unzähligen immunhistochemischen Färbungen durch. Dafür möchte ich mich bei beiden sehr herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Nathrath für die hilfreichen Korrekturen und Verbesserungsvorschläge.