

Fakultät für Medizin

Klinik und Poliklinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie  
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Untersuchungen zum Zusammenhang von Lebensalter,  
Geschlecht und neurologischen Symptomen mit der  
Plaquemorphologie arteriosklerotischer Läsionen der  
extracraniellen Arteria carotis

Carina Wendorff

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

Vorsitzende(r):

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Jaroslav Pelisek

2. Prof. Dr. Herbert Deppe

Die Dissertation wurde am 15.09.2016 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 12.07.2017 angenommen.

## Vorbemerkung

Bei der folgenden Dissertation wurde die Form der publikationsbasierten Promotion (gemäß TUM Promotionsordnung §6) gewählt, basierend auf zwei akzeptierten Erstautorenveröffentlichungen der Doktorandin. Den als Appendix beigefügten Originalarbeiten kann man jeweils die detaillierten Ausführungen zu Einleitung, Methoden, Resultaten und Diskussion entnehmen. Im folgenden einleitenden Textteil werden die beiden Publikationen zusammenfassend dargestellt, wobei auf die wichtigsten Methoden und Ergebnisse kurz eingegangen wird.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Entwicklung des Dissertationsthemas und Zielsetzung der Arbeit	6
1.2. Anatomie	9
1.3. Arteriosklerose	11
1.3.1. Entstehung	11
1.3.2. Histologischer Aufbau der arteriellen Gefäße	12
1.3.3. Morphologische Klassifizierung arteriosklerotischer Läsionen	16
1.3.4. Klinische Stadien extracranieller Karotisläsionen	16
1.4. Rekonstruktionstechniken	16
1.4.1. Konventionelle Karotis-Thrombendarteriektomie mit/ohne Patchplastik	17
1.4.2. Karotis-Eversionsendarteriektomie	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Patienten	18
2.2. Histologische Untersuchung der arteriosklerotischen Plaques	19
2.3. Definition der Läsionsstabilität	22
2.4. Statistische Analyse	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Publikation I	24
3.1.1. Patienten	24
3.1.2. Plaquestabilität bei sympt. /asympt. Patienten	24
3.1.3. Plaqueklassifizierung bei sympt. /asympt. Patienten	25
3.1.4. Histologische Plaquecharakterisierung bei sympt. /asympt.	26
3.2 Publikation II	26
3.2.1. Patienten	26

3.2.2. Plaquestabilität in Abhängigkeit von Lebensalter und Geschlecht bei asymptomatischen Patienten	27
3.2.3. Histologische Plaquecharakterisierung bei asymptomatischen Patienten	28
<b>4. Diskussion</b>	<b>29</b>
4.1. Kritische Erörterung der angewendeten Methoden	29
4.2. Diskussion der Ergebnisse	30
4.2.1. Publikation I	30
4.2.2. Publikation II	32
<b>5. Zusammenfassung der Publikationen</b>	<b>34</b>
5.1. Publikation I	34
5.2. Publikation II	35
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>37</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>8. Publikationsverzeichnis</b>	<b>46</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>47</b>
<b>10. Appendix</b>	<b>48</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACC	Arteria carotis communis
ACE	Arteria carotis externa
ACI	Arteria carotis interna
BMT	Best medical treatment
CAS	Carotisarterien-Stenting
CEA	Carotis-Thrombendarteriektomie
CI	Confidence Interval
CT	Computertomographie
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded blocks
HDL	High-density lipoprotein
LDL	Low-density lipoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
OR	Odds Ratio
P	Signifikanzwert
RCTs	Randomisierte kontrollierte Studie
TEA	Thrombendarteriektomie

# 1. Einleitung

## 1.1. Entwicklung des Dissertationsthemas und Zielsetzung der Arbeit

Die Gefäßchirurgie ist eine der jüngeren chirurgischen Fachrichtungen. Sie ist geprägt durch eine fortwährende Entwicklung der Operationstechniken. Die anfangs invasiven Operationsverfahren wurden insbesondere in den letzten Jahren durch minimalinvasive, interventionelle Techniken erweitert oder sogar ersetzt (Debus et al. 2012a).

Die Gefäßchirurgie hat sich zu einem Querschnittsfach entwickelt, welches einen Impulsgeber für interdisziplinär orientierte Zentren darstellt (Debus et al. 2012a).

Bereits vor der Nutzung von Heparin wurden offene Ausschälungen der Arterien praktiziert. Die Erfolgsrate war jedoch sehr gering. Mit der klinischen Einführung von Heparin ergaben sich neue chirurgische Möglichkeiten (Heberer et al. 2004). Jean Cid dos Santos führte 1946 die erste erfolgreiche Desobliteration durch (Heberer et al. 2004). Die Gefäßchirurgie beschränkte sich jedoch bis 1952 lediglich auf Extremitäten und aortoiliakale Bereiche (Heberer et al. 2004).

Erst 1951 versuchten Shimizu und Sano die A. carotis interna zu desobliterieren. Am 7. August 1953 wurde die erste erfolgreiche Thrombendarteriektomie der Karotidgabel von DeBakey durchgeführt (Heberer et al. 2004).

Die Meilensteine in der endovaskulären Chirurgie stellen die erste PTA (perkutane transluminale Angioplastie) 1964, vorgenommen durch die Radiologen Dotter und Judkins, die erste Ballondilatation 1974 von Andreas Grüntzig und die endoluminale Ausschaltung von Aortenaneurysmen 1986 von Volodos dar (Debus et al. 2012a).

Mittlerweile werden in Deutschland jährlich etwa 25.000 Karotis-thrombendarteriektomien (CEAs) durchgeführt (Kühnl et al. 2013).

Im Jahr 2013 veröffentlichte das Deutsche Ärzteblatt eine multidisziplinäre, evidenz- und konsensbasierte deutsch-österreichische Leitlinie, die auf der Basis von 182 randomisierten klinischen Studien (RCTs) (1990-2011) und 308 systematischen Reviews erstellt wurde. RCTs konnten belegen, dass durch die CEA hochgradiger symptomatischer oder asymptomatischer Karotisstenosen das 5-Jahres-Schlaganfallrisiko signifikant gesenkt werden konnte (Eckstein et al. 2013).

In den Metaanalysen der 13 vorliegenden RCTs konnte zudem gezeigt werden, dass CAS (Stenting der A. carotis) im Vergleich zur CEA mit einer um 2–2,5 % höheren periprozeduralen Schlaganfall- und Todesfallrate und einer um 0,5–1 % niedrigeren periprozeduralen Rate an Myokardinfarkten assoziiert war (Eckstein et al. 2013). Die CEA ist nach den aktuell gültigen Leitlinien das Standardverfahren bei höhergradigen Karotisstenosen, sofern kein erhöhtes OP-Risiko vorliegt (Eckstein et al. 2013).

Mit den Ergebnissen dreier großer randomisierter kontrollierter Studien (EVA-3S, SPACE, ICSS) konnte dargelegt werden, dass die Schlaganfall- und Todesfallrate nach einem Stenting der A. carotis (CAS) bei symptomatischen Patienten mit steigendem Alter stark erhöht war (<70 Jahre [5.8 %] verglichen mit ≥70 Jahren [12.0 %]) (Bonati et al. 2010). Ein ähnlicher Trend konnte bei asymptomatischen Patienten beobachtet werden, vor allem unter Berücksichtigung des Geschlechts (Halliday et al. 2010).

Circa 15 % aller ischämischen Schlaganfälle liegen in einer arterioarteriellen Embolisation der extrakraniellen arteriosklerotischen Karotisstenose zugrunde (Eckstein et al. 2013). Das Risiko eines erneuten Schlaganfalls nach einer CEA ist bei symptomatischen Patienten immer noch höher als bei asymptomatischen Patienten (Karlsson et al. 2016).

Die Prävalenz extrakranieller Karotisstenosen (Stenosegrad >50 % nach NASCET) liegt in Deutschland bei Patienten >65 Jahren bei ≈6.9 %. Tendenz mit zunehmendem Alter steigend (Eckstein et al. 2013, Pelisek et al. 2012).

In mehreren klinischen Studien wurden bereits Zusammenhänge untersucht, welche Faktoren Auswirkungen auf die Plaquemorphologie der A. carotis

bewirken. Darunter zählt vor allem auch der Diabetes mellitus und das Rauchen (Vigili de Kreutzenberg et al. 2015, Hansen et al. 2016).

Des Weiteren konnte bereits in randomisierte Kontrollstudien gezeigt werden, dass Männer ein erhöhtes Schlaganfall-Todesfallrisiko nach einem Karotis-Stenting, verglichen mit einer Karotisendarterektomie, aufwiesen (9.0 % verglichen mit 5.5 %) (Bonati et al. 2010). Bei Frauen konnte dieser Unterschied nicht festgestellt werden (Bonati et al. 2010). Darüber hinaus scheint das Lebensalter einen maßgeblichen Beitrag am Schlaganfallrisiko nach einem Karotis-Stenting zu leisten (Bonati et al. 2010). Aufgrund dieser Diskrepanzen stellt sich die Frage, ob das Lebensalter, sowie das Geschlecht Auswirkungen auf die Plaquemorphologie in der A. carotis zeigen.

Das Ziel der vorliegenden publikationsbasierten Dissertation lag in der Untersuchung insbesondere des Lebensalters und des Geschlechtes als Einflussfaktoren auf die Plaquezusammensetzung, unter Berücksichtigung der klassischen Risikofaktoren (Nikotinanamnese, Bluthochdruck, chronische Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus, sowie ein erhöhter Cholesterinwert).

Die Arbeit fasst dabei zwei zu diesem Thema veröffentlichte Publikationen zusammen.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Gibt es einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Plaquezusammensetzung bei symptomatischen und asymptomatischen Patienten?
2. Hat das Lebensalter Einfluss auf die Plaquezusammensetzung bei symptomatischen und asymptomatischen Patienten?

## **1.2. Anatomie**

Zu den supraaortalen extrakraniellen Gefäßen gehören der Truncus brachiocephalicus, die A. carotis communis (ACC) mit der anschließenden A. carotis externa (ACE) und der A. carotis interna (ACI), die A. subclavia und die A. vertebralis (Abbildung 1). Verschlüsse, sowie Plaquestenosen treten am häufigsten im Bereich der Karotisbifurkation auf. Die arteriosklerotische Läsion ist, gefolgt von der Dissektion und Aneurysmen, die häufigste Erkrankung (Debus et al. 2012b).



## **1.3. Arteriosklerose**

### **1.3.1. Entstehung**

Die Arteriosklerose ist eine entzündliche Erkrankung, die ihren Ursprung bereits im frühen Erwachsenenalter hat, die klinische Manifestation arteriosklerotisch bedingter Herz-Kreislaufkrankungen erscheint jedoch zumeist deutlich später (van Oostrom et al. 2005). Jahrelange Symptomlosigkeit kann sich durch plötzlich auftretende Herzinsuffizienz, Schlaganfall, Thromboseentwicklung oder Herzinfarkt manifestieren. Mit Arteriosklerose verbundene Gefäßerkrankungen zählen in den westlichen Industrieländern zu den Hauptursachen eines vorzeitigen Todes (Wick et al. 2004). Früher wurde in der Medizin Arteriosklerose und Entzündung getrennt betrachtet. In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, dass es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung der Gefäßwand handelt (Debus et al. 2012c). Eine entzündliche Aktivierung des Endothels steigert dessen Permeabilität und aktiviert die Diapedese von Makrophagen, wobei diese in der Gefäßwand verweilen (Debus et al. 2012c). Bei einer Gewebeentzündung wandern im Gegensatz dazu die Makrophagen in das Interstitium. Zudem unterscheidet sich die Zusammensetzung. Fette und Makrophagen dominieren bei der Arteriosklerose, Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen bei der Entzündung (Debus et al. 2012c). Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine systemisch fortschreitende Erkrankung, wobei die Bildung eines arteriosklerotischen Plaques einem dynamischen Prozess unterliegt (Barnett et al. 1998). Diese arteriosklerotischen Ablagerungen bestehen aus einem atheromatösen Kern, der im fortgeschrittenen Stadium meist durch eine dünne fibröse Kappe vom Lumen getrennt ist (van Oostrom et al. 2005).

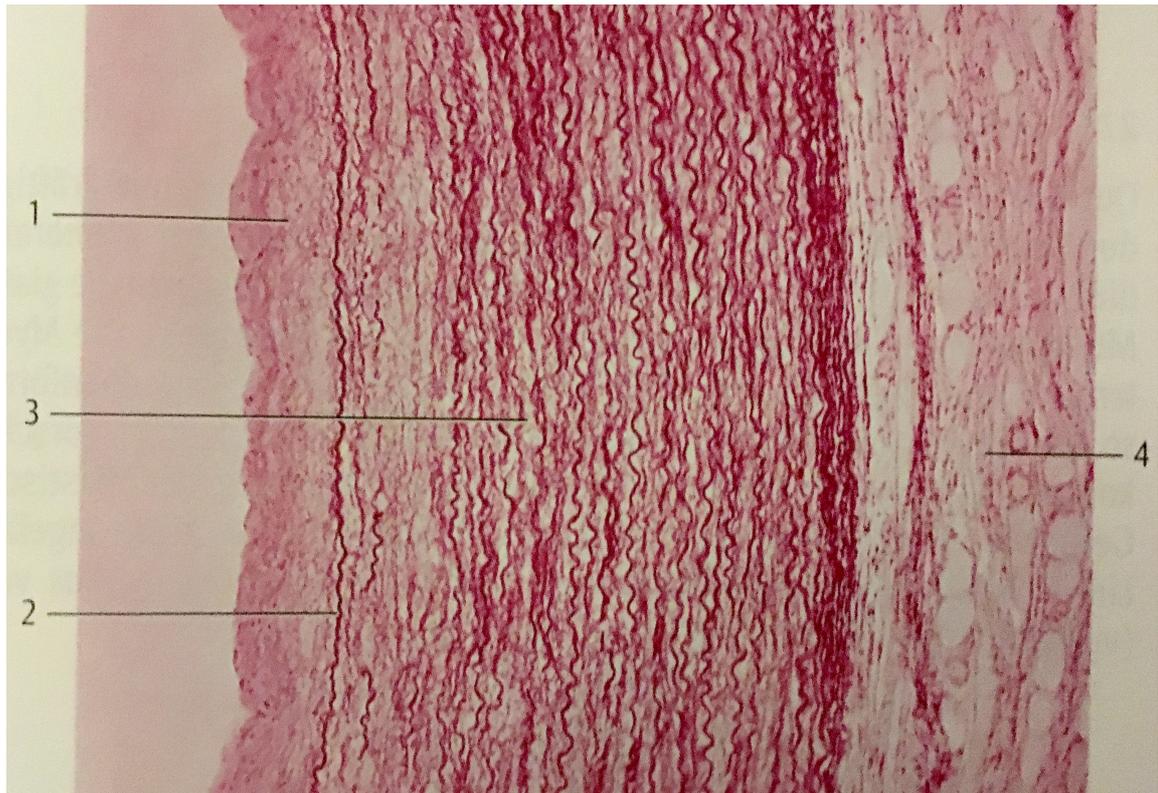
Diese Gebilde sind das Ergebnis eines jahrzehntelangen chronischen Entzündungsprozesses und bestehen aus einem sklerosierten Narbengewebe, welches einen hohen Anteil an Kollagen und elastischen Faserbündeln aufweist (Barnett et al. 1998). Der Gehalt an Zellen ist gering, der Anteil an Kapillaren fehlt vollständig. Diese Beschaffenheit führt zu zentralen Nekrosen welche Fette und Konglomerate aus abgestorbenen Makrophagen,

Myofibroblasten, Endothelzellen und Lymphozyten beinhalten. Tritt ein Kontakt dieser Beete mit dem Blut ein, wird die plasmatische Blutgerinnung aktiviert (Barnett et al. 1998). Die daraus resultierende Thrombenbildung führt zu einer Einengung des Gefäßlumens, was im schlimmsten Fall sogar einen vollständigen Verschluss des Gefäßes bedeuten kann (Libby 2002).

In epidemiologischen Studien wurde bestätigt, dass die Erkrankungswahrscheinlichkeit durch Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Rauchen, Hyperurikämie, Hypertonie und genetische Disposition gefördert wird (van Oostrom et al. 2005). Ein weiterer entscheidender Risikofaktor stellt ein dauerhaft erhöhter Cholesterin- und LDL- Plasmaspiegel (LDL: low-density lipoprotein) in Verbindung mit einem gleichzeitig erniedrigtem HDL- Plasmaspiegel (HDL: high-density lipoprotein) dar (Stampfer et al. 1996).

### **1.3.2. Histologischer Aufbau der arteriellen Gefäße**

Der Wandaufbau arterieller Gefäße besteht grundlegend aus drei Schichten. Die innerste dem Blutstrom zugewandte Schicht (Tunica intima), besteht hauptsächlich aus Endothelzellen. Zu ihren Aufgaben zählt die Barrierefunktion, zudem wird ihr eine wichtige Rolle am Stofftransport zugeschrieben. Die daran angrenzende Membrana elastica interna und mittlere Schicht (Tunica media) beeinflussen entscheidend die Hämodynamik durch Kontraktion bzw. Dilatation. Ihre Hauptbestandteile sind elastische Fasern, sowie spiralförmig angeordnete glatte Muskelzellen. Die äußerste Schicht wird als Tunica adventitia bezeichnet und besteht vornehmlich aus Bindegewebe. Sie ist mit Blutgefäßen und Gefäßnerven durchzogen, was die Versorgung der Arterienwand sicherstellt (Abbildung 2). Bei der Arteriosklerose kommt es zu einer Veränderung der Intima und Media, was sich schließlich als arteriosklerotische Plaques äußert (Benninghoff et al. 2008, Lüllmann-Rauch 2003).



*Abbildung 2: Querschnitt durch eine menschliche Arterie vom elastischen Typ: (1) Tunica intima, (2) Tunica media, (3) Membrana elastica interna, (4) Tunica adventitia  
Quelle: (Kühnel 2002).*

### **1.3.3. Morphologische Klassifizierung arteriosklerotischer Läsionen**

Die Morphologie der Plaques unterliegt einem Wandel, was zu einer Einteilung der histologischen Zusammensetzung arteriosklerotischer Plaques in verschiedene Läsionstypen führte. In dieser Arbeit wurden die weit verbreitete AHA Klassifikation nach Stary (1992, 1994, 1995, 2000) verwendet (Abbildung 3).

#### I Initiale Läsion

- Intimale Ansammlung von Lipoproteinen, vermehrte Makrophagen mit Fetttröpfchen, einzelne Schaumzellen

#### II Fettstreifen (fatty streak)

- Ansammlung von Makrophagen und glatten Muskelzellen, z.T. mit Fetttröpfchen, vereinzelte Lymphozyten

#### III Präatherom

- Fettstreifen, einzelne extrazelluläre Lipidpools

#### IV Atherom

- Befund wie beim Präatherom, Lipidpools bilden sogenannten Atheromkern, strukturelle Intimaschäden

#### V Fibroatherom

- Bindegewebsreiche Läsion über dem Lipidcore (fibröse Kappe), Nekrosen

#### VI Thrombohämorrhagische Läsion

- Typ V mit Fissur, Hämorrhagie oder Thrombus, thrombotisches Material, Einblutung

#### VII Kalzifizierte Läsion

- Typ V mit kalzifizierten Arealen

#### VIII Fibrotische Läsion

- Bindegewebsreiche Läsion ohne Lipidcore und/oder starke Verkalkung

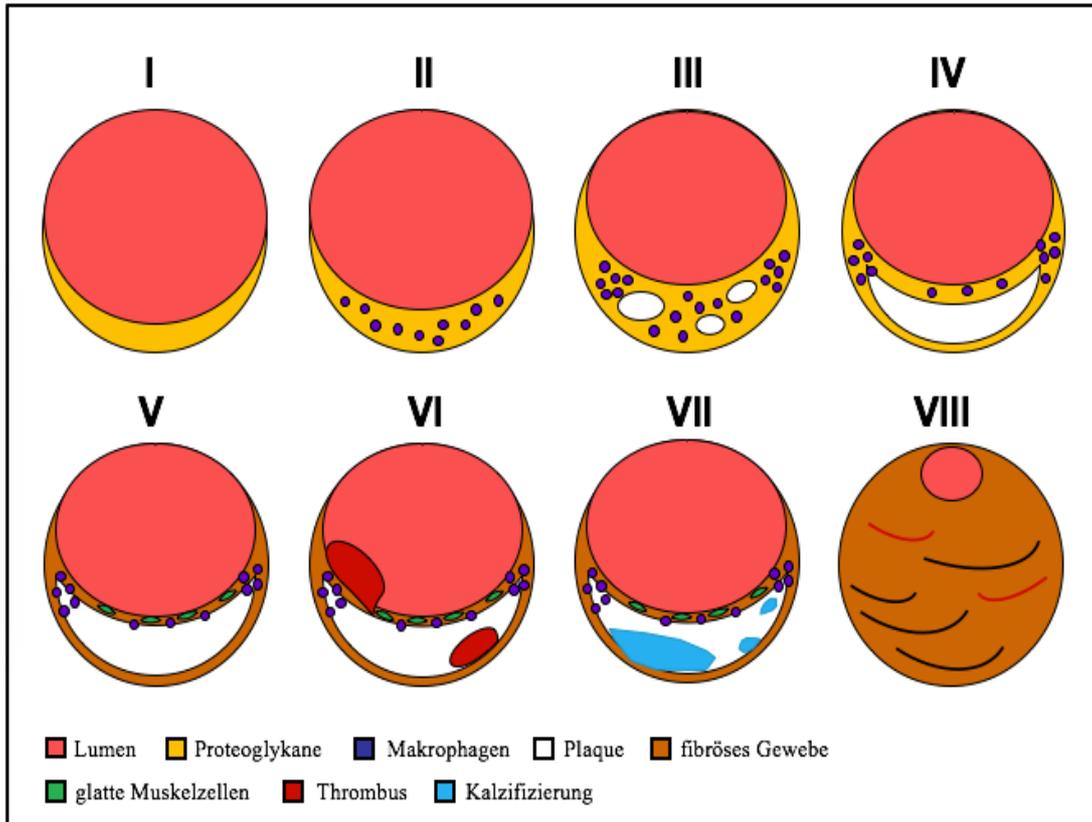


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Stadien der Arterioskleroseentstehung nach AHA

Quelle: (erstellt durch Carina Wendorff)

#### **1.3.4. Klinische Stadien extracranieller Karotisläsionen**

Nicht nur die Lokalisation und Morphologie der Plaques sind wichtige Faktoren, sondern auch der Stenosegrad und die klinische Symptomatik bestimmen die Therapieempfehlung für den Patienten. Eine modifizierte Version der Einteilung von Jörg Vollmar wird im Folgenden beschrieben (Eckstein et al. 2001):

„Patienten mit höhergradiger Karotisstenose und klinisch fehlender Symptomatik oder einer > 6 Monate zurückliegender Symptomatik werden dem Stadium IA oder IB zugeordnet. Das Stadium IA beschreibt Patienten mit unilateraler asymptomatischer Karotisstenose, ein Stadium IB liegt vor bei zusätzlicher hochgradiger kontralateraler Karotisstenose oder -verschluss. Entscheidend ist der klinische Befund, Patienten mit einem klinisch stummen Infarkt in der Bildgebung werden somit ebenfalls dem Stadium I zugeordnet. Im Stadium II werden alle Patienten erfasst mit stattgehabter innerhalb von 24 Stunden reversibler okulärer (Amaurosis fugax) (Stadium IIA), oder zerebraler Ischämie (TIA) (Stadium IIB). Das Stadium III beinhaltet akut neurologisch instabile Patienten mit ursächlicher Karotisläsion. Eine Crescendo- TIA wird selten beobachtet und wird nur dann diagnostiziert, wenn in kurzen Intervallen mit zunehmender Frequenz reversible Ischämien von immer stärker werdender Intensität vorliegen (Stadium IIIA). Im Stadium IIIB werden Patienten mit Karotis assoziiertem progredienten oder akut aufgetretenen Schlaganfall zusammengefasst. Eine Operationsindikation stellt sich nur in ausgewählten Fällen. Das Stadium IV beinhaltet Patienten mit stattgehabtem Karotis-bedingtem Schlaganfall innerhalb der letzten 6 Monate“ (Debus et al. 2012d).

#### **1.4. Operative Rekonstruktionstechniken bei der Karotis-TEA (CEA)**

Die Karotisthrombendarteriekomie (CEA) ist ein weitverbreitetes und akzeptiertes Standardverfahren zur Behandlung von Karotisstenosen (Kühnl et al. 2013). Die Indikation zu einer CEA, wird in Abhängigkeit des Stenosegrades

und aus der klinischen Manifestation der Erkrankung der Karotisarterie gestellt (Verhoeven et al. 2005).

#### **1.4.1. Konventionelle Karotis-Thrombendarteriektomie mit/ohne Patchplastik**

Bei der konventionellen Methode erfolgt eine Längsarteriotomie von der A. carotis communis in die A. carotis interna bis oberhalb der stenosierenden Läsion. Anschließend wird in der äußeren Schicht offen desobliteriert. Im Regelfall wird der Verschluss durch Streifenpatchplastik dem Direktverschluss durch Naht vorgezogen um eine Nahtstenose zu verhindern (Hepp et al. 2007). Für die plastische Rekonstruktion existieren alloplastische (z.B. Dacron, expanded PTFE) oder autologe (Eigenvene, z.B. Vena saphena magna) Materialien (AbuRahma et al. 1998, Bond et al. 2004, Rockmann et al. 2005).

#### **1.4.2. Karotis-Eversionsendarteriektomie**

Bei diesem Verfahren wird die A. carotis interna am Abgang schräg abgesetzt. Nun erfolgt ein Umstülpen der äußeren Wandschichten um den stenosierenden Plaque. Anschließend kann der Plaque als Ganzes von der Gefäßwand getrennt werden. Am Ende erfolgt die Reinsertion der A. carotis interna in die A. carotis communis. Die Vorteile bei dieser Methode sind die mögliche Kürzung einer verlängerten A. carotis interna und der Verzicht auf Patchmaterial, sowie eine verkürzte Ausklemmdauer der A. carotis (Koskas et al. 1995, Ballotta et al. 2000, Katras et al. 2001).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patienten

Im ersten Schritt der Studie erfolgte eine retrospektive Datenerhebung aus der Münchner Biobank. Es wurden Patienten mit hochgradiger Karotisstenose (symptomatisch  $\geq 60$  % Stenose, asymptomatisch  $\geq 70$  % Stenose nach NASCET) erfasst, bei denen im Zeitraum von 2004-2013 arteriosklerotische Plaques operativ entfernt wurden. Es wurden insgesamt 832 Patienten aus der Münchner Biobank der Klinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie (Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) analysiert. Als Einschlusskriterium der Studie galt eine auswertbare Beschaffenheit des Plaques mit verwertbaren histologischen und morphologischen Charakteristika. Zudem wurde die Patientenhistorie, sowie das Vorhandensein klinischer Daten (Medikation, Blutbild) vorausgesetzt. An klinischen Daten wurde erfasst: Neurologische Symptome, Aneurysmen der Bauchschlagader, koronare und periphere Gefäßerkrankungen, zerebrale Ischämie, Risikofaktoren und Standardmedikation (Thrombozytenaggregationshemmer, Antihypertensiva, Statine, Diuretika, Protonenpumpenhemmer). Als Risikofaktoren galten eine Nikotinanamnese, Bluthochdruck, chronische Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus, sowie ein erhöhter Cholesterinwert (Table 1, Publikation I S. 3214). Nach Anwendung der Einschlusskriterien konnten 763 Patienten in die Studie aufgenommen werden (Wendorff et al. 2015).

Die Indikation für einen chirurgischen Eingriff wurde basierend auf den nationalen und internationalen Richtlinien gestellt (Eckstein et al. 2013). Der Dopplerultraschall wurde als Basis Routineuntersuchung angewendet. In den meisten Fällen war jedoch der zusätzliche Einsatz von weiterführenden Untersuchungsmethoden notwendig. Die Computer Tomographie (CT), sowie die Magnetresonanz Angiographie stellten in diesen Fällen das Mittel der Wahl da. Die Studie wurde nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki der WMA durchgeführt und von der Ethikkommission der Technischen Universität

überprüft und genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung lag bei allen Patienten vor (Wendorff et al. 2015).

## **2.2. Histologische Untersuchung der arteriosklerotischen Plaques**

Die arteriosklerotischen Läsionen wurden in Abhängigkeit der Plaquegröße in 3-4 mm große Blöcke segmentiert und in Paraffin (FFPE) eingebettet. Anschließend folgte über Nacht eine Fixierung in einer 4%igen Formalinlösung. Das Kennzeichnen der pathomorphologischen Merkmale der FFPE-Blöcke wurde durch die Färbungen Hämatoxylin-Eosin und Elastica van Gieson erzielt (Abbildung 4). Die Klassifizierung der arteriosklerotischen Plaques erfolgte gemäß der AHA Richtlinien (Stary 2000, Stary et al. 1992, Stary et al. 1995, Stary et al.1994, Virmani et al. 2000) durch zwei unabhängige erfahrene Untersucher (Wendorff et al. 2015).

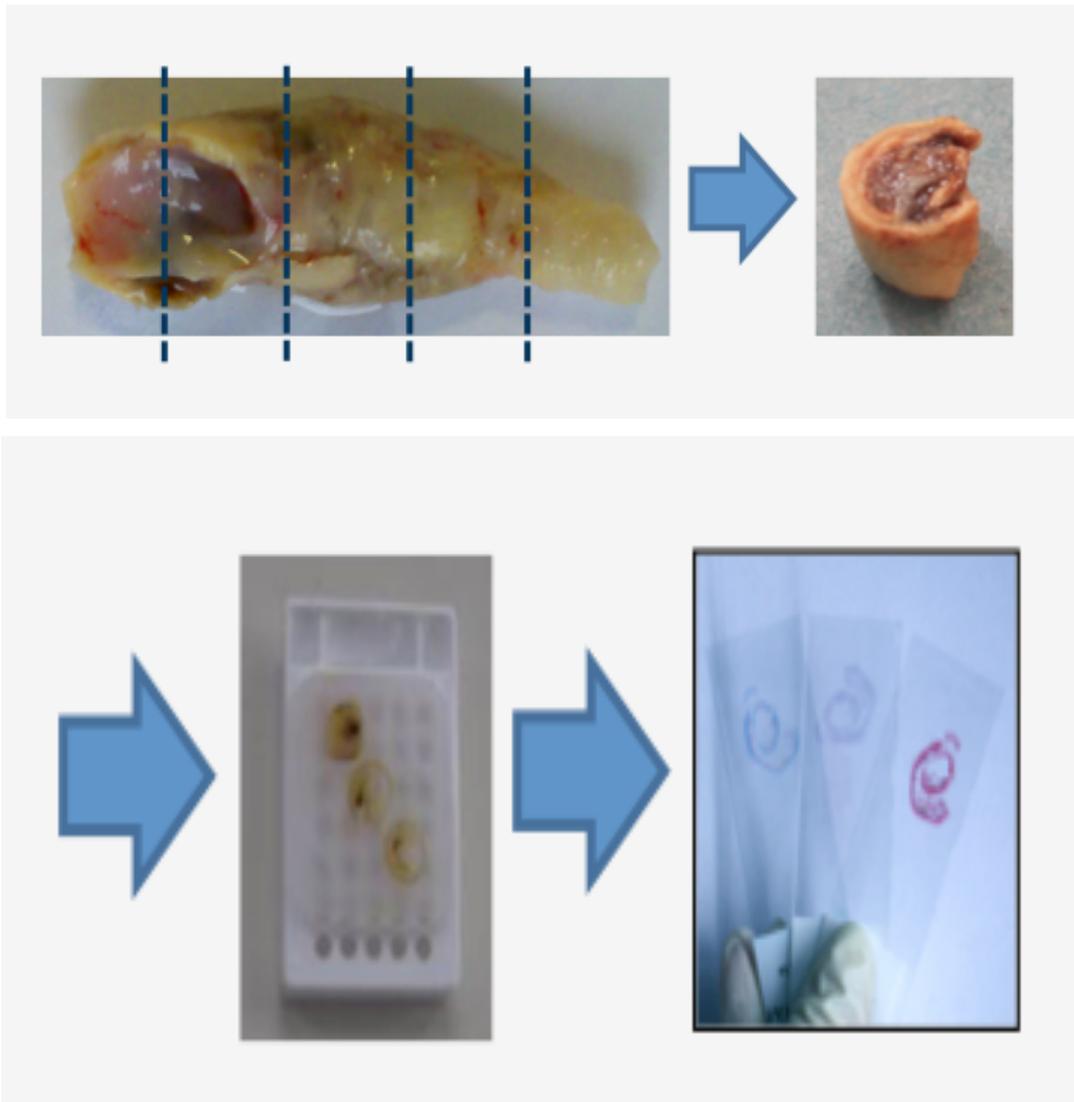


Abbildung 4: Plaquesegmentation.

Quelle: (Erstellt durch PD Dr. Pelisek, TU München, 2014)

Die Ermittlung der histologischen Merkmale der einzelnen Plaques fand ohne Hintergrundwissen über Patientendaten und Studienergebnissen statt. In nicht eindeutigen Fällen wurde ein erfahrener Pathologe zu Rate gezogen. Fälle, wo sich sowohl Typ VI und VII manifestierten, wurden als Plaquetyp VI/VII bezeichnet und als Komplextyp benannt. Ergänzend wurden Merkmale wie Zellularität, der Gehalt an Kollagen und elastischen Fasern, der Grad an Kalzifizierung, Infiltration, Inflammation und Neovaskularisation ermittelt. Die Beobachtungen wurden semiquantitativ mit einer acht Punkt Ordnungsskala (negativ (-) bis stark positiv (+++)) ausgewertet. Die histologische Charakterisierung wurde zuerst für jedes Segment separat vorgenommen und anschließend das klinisch am relevantesten erscheinende Segment für die Analysen nach folgenden Kriterien ausgewählt: (1) Die Vulnerabilität des Plaques (instabil > stabil), (2) der Plaquetyp (Komplexplaque > VI > V > VII), (3) das inflammatorische Infiltrat (stark positiv>abstinent) und (4) der Gehalt an kollagenen Fasern (abstinent > stark positiv), wurden die Merkmale gewichtet (Wendorff et al. 2015).

### 2.3. Definition der Läsionsstabilität

Die Bewertung der Stabilität der arteriosklerotischen Läsionen wurde nach der Beschreibung von Redgrave et al. (Redgrave et al. 2008) durchgeführt. Bei instabilen Läsionen handelte es sich dabei entweder um rupturierte, oder gefährdet rupturierte Plaques mit einer dünnen fibrösen Kappe von weniger als 200 µm über einem vorhandenen nekrotischen Core (Abbildung 5) (Wendorff et al. 2015).

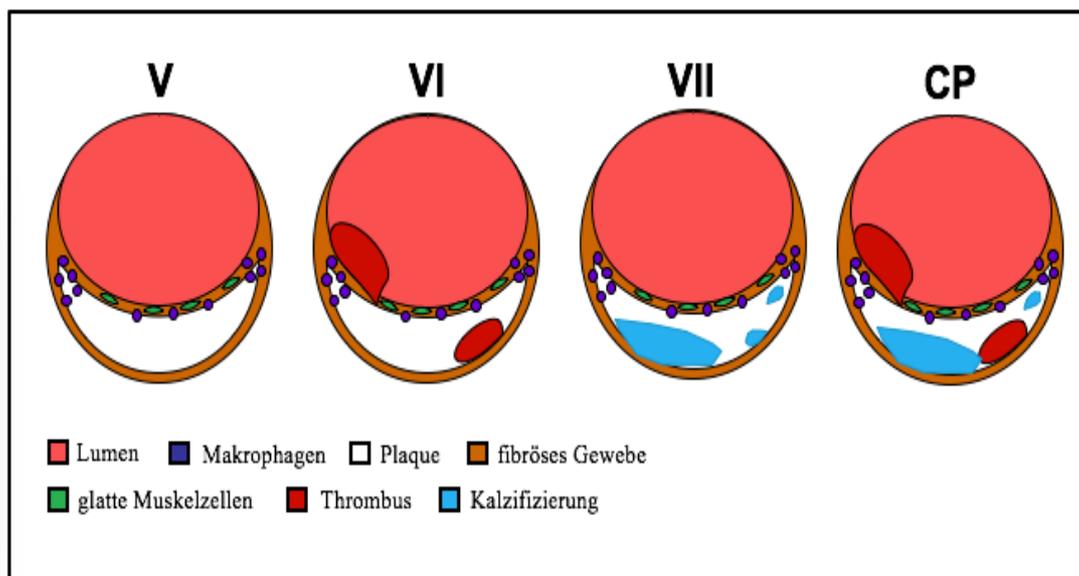


Abbildung 5: Plaqueklassifizierung

Quelle: (erstellt durch Carina Wendorff)

## 2.4. Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde SPSS für Windows 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) und die Statistiksoftware R-Paket (Open- Source, Version 3.1.2) verwendet. Aus den gewonnenen Daten ergaben sich in Abhängigkeit des Fokus der einzelnen Publikationen (Bestandteil der vorliegenden kumulativen Doktorarbeit) zwei unterschiedliche Betrachtungs- und Herangehensweisen:

Im ersten Teil der Auswertung wurden alle 763 Patienten unabhängig von den neurologischen Symptomen herangezogen. Die logistische Regression wurde verwendet, um den Zusammenhang zwischen der Plaquestabilität als abhängige Variabel und den unabhängigen Variablen Alter, neurologische Symptome, Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Rauchen, koronare Herzerkrankungen, periphere arterielle Erkrankungen, gerinnungshemmende Medikamente, ACE Inhibitoren und  $\beta$ -Blocker zu ermitteln. Die ordinale Regression wurde verwendet um den Zusammenhang zwischen den unabhängigen Variablen (wie oben genannt) und den abhängigen Variablen (Zellularität, Kalzifizierung, Kollagengehalt, Elastingehalt, inflammatorische Infiltration und Neovaskularisation) jeweils in einem separaten Modell zu analysieren. Die multinominale Regression wurde angewendet, um den Zusammenhang zwischen den unabhängigen Variablen (auf Risikofaktoren adjustiert) und dem Plaquetyp als abhängige nominale Variable herauszuarbeiten. Kontinuierliche Variablen wurden anhand des Student t-Test verglichen. Nominale Variablen anhand des Fisher exact test (Wendorff et al. 2015).

Im zweiten Teil der Auswertung wurden die 465 asymptomatischen Patienten gesondert betrachtet. Hier wurden statistische Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen anhand des non-parametric Kruskal- Wallis Test analysiert. Post-hoc Analysen von kontinuierlichen Variablen wurden entsprechend mit dem Mann-Whitney U-Test ausgewertet. Die logistische Regression wurde für den Zusammenhang Plaquestabilität und Plaqueruptur angewendet. Für die altersbezogene Analyse wurden folgende Quartilen verwendet: (1) <65, (2) 65-69, (3) 70-74, (4) >74 Jahre. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha=0,05$  definiert (Wendorff et al. 2016).

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Publikation I (Carotid Plaque Morphology Is Significantly Associated With Sex, Age, and History of Neurological Symptoms, Stroke 2015; 46 (11): 3213-9).**

#### **3.1.1. Patienten**

Risikofaktoren, Vorerkrankungen, sowie Patientencharakteristika sind in Table 1 der Publikation I (S.3214) (Wendorff et al. 2015) zusammengefasst. 71 % der Gesamtstudienteilnehmer waren männlich mit einem Durchschnittsalter von  $70.0 \pm 8.7$  Jahren. 86 % der Patienten litten an Bluthochdruck und 67 % an Hyperlipidämie. 85 % waren auf die Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmer (ASS/ Plavix) angewiesen. Statine wurden von 69 % der Patienten eingenommen. Die Hälfte der Patienten hatte eine Nikotinanamnese (Wendorff et al. 2015).

#### **3.1.2. Plaquestabilität bei symptomatischen/asymptomatischen Patienten**

Plaques, die als instabil klassifiziert wurden, kamen signifikant häufiger bei symptomatischen Patienten vor. (Odds Ratio OR=1.60; 95 % Confidence Interval (CI), 1.14-2.25; P=0.007). Weiterhin waren in Bezug auf die Plaquestabilität keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede zu erkennen (Männer verglichen mit Frauen; OR=1.03; 95 % CI, 0.85 - 1.24; P=0.796). Des Weiteren nahm das Alter in diesem Patientengut nur eine untergeordnete Rolle ein (pro 10 Jahres Anstieg; OR=1.03; 95 % CI, 0.85-1.24; P=0.796) (Wendorff et al. 2015).

### **3.1.3. Plaqueklassifizierung bei symptomatischen/asymptomatischen Patienten**

Die relative Plaquetypenverteilung und die Rohdaten werden in Figure 1 Publikation I (S. 3215) (Wendorff et al. 2015) dargestellt. In 24 % der Fälle wurde der Plaque Typ V als instabil eingestuft. Im Gegensatz dazu ergab sich aus den Berechnungen eine Instabilität bei Plaquetyp VI von 65.3 %, Typ VII von 57.5 % und beim komplexen Plaquetyp VI/VII von 65.0 %. Anhand des Fisher exact Tests konnte gezeigt werden, dass die Stabilität nicht unabhängig vom Plaquetyp war ( $P < 0.001$ ) (Wendorff et al. 2015).

Das Model der multinominalen Regression wurde für die beabsichtigte Analyse der Einflussfaktoren auf die Plaquemorphologie angewendet. Die statistischen Ergebnisse zeigten, dass Faktoren wie Lebensalter, Geschlecht und neurologische Symptome, statistisch signifikante Auswirkungen auf die Plaquemorphologie haben ( $P = 0.009$ ,  $P < 0.001$ , und  $P = 0.017$ ). Alle berechneten Daten (OR, CIs und P-Werte) sind in Table 2 und Figure 2 (Publikation I S.3215-6) aufgeführt (Wendorff et al. 2015).

Die Figure 2 in Publikation I (S. 3216) (Wendorff et al. 2015) interpretiert sich folgendermaßen: Verglichen mit Frauen hatten Männer eine höhere Wahrscheinlichkeit für Plaquetyp VI, als für Plaquetyp V (OR=2.76; 95 % CI, 1.68-4.51;  $P < 0.001$ ). Verglichen mit asymptomatischen Patienten trat bei symptomatische Patienten Plaque Typ VII weniger häufig auf als Plaquetyp VI (OR=0.53; 0.34-0.83;  $P = 0.005$ ). Bei älteren Patienten war zu beobachten, dass Plaquetyp VII höher frequentiert ist als Plaquetyp V (OR=1.57; 95 % CI, 1.19-2.06;  $P = 0.001$ ). Aufgrund der verwendeten multivariablen multinominalen Regression konnten alle erzielten Ergebnisse unabhängig voneinander betrachtet werden (Wendorff et al. 2015).

### **3.1.4. Histologische Plaquecharakterisierung bei symptomatischen/asymptomatischen Patienten**

Die ordinale Regressionsanalyse wurde als Analyseform gewählt. Figure 3 (Publikation I S. 3217) (Wendorff et al. 2015) zeigte den Zusammenhang zwischen Alter, Patientenhistorie neurologischer Symptome und den histologischen Charakteristika von Karotisplaques. Verglichen mit Frauen hatten Männer signifikant mehr Zellen innerhalb der arteriosklerotischen Plaques (OR=1.56; 95 % CI, 1.17-2.10; P=0.003) und wiesen zudem mehr entzündliche Infiltrate (OR=1.75; 95 % CI, 1.31-2.34; P>0.010) und stärkere Gefäßneubildung (OR=1.47; 95 % CI, 1.10-1.97; P=0.010) auf. Im Gegensatz dazu neigten Frauen zu einer höheren Kalzifizierungsrate. Jedoch erreichte dieses Ergebnis nicht die postulierte statistische Signifikanz (OR=1.41; 95 % CI, 0.99-2.01; P=0.057). Weiterhin zeigten symptomatische Patienten im Gegensatz zu den asymptomatischen Individuen einen höheren Elastingehalt (OR=1.41; 95 % CI, 0.99-2.01; P=0.057). Mit höherem Alter (pro 10 Jahres Anstieg) war dagegen ein signifikanter Anstieg der Plaquekalzifizierung assoziiert (OR=1.23; 95 % CI, 1.05-1.43; P=0.009) (Wendorff et al. 2015).

## **3.2. Publikation II (Impact of sex and age on carotid plaque instability in asymptomatic patients– Results from the Munich Vascular Biobank – VASA 2016; 1-6)**

### **3.2.1. Patienten**

Patientencharakteristika, Risikofaktoren und Begleiterkrankungen sind in Table 1 der Publikation II (S.3) (Wendorff et al. 2016) zusammengefasst. Das Durchschnittsalter der Männer betrug  $69.4 \pm 8.1$  Jahre, das der Frauen  $69.1 \pm 8.2$  Jahre (P=0.586), 72.5 % waren Männer. Zudem konnte bei Männern ein höherer Anteil an koronaren Herzerkrankungen festgestellt werden (12.8 % vs. 11.0 %, P=0.057), die Einnahme an Statinen war jedoch geringer (67.1 % vs. 76.6 %, P=0.055). Die Mehrzahl der Patienten litt an Bluthochdruck und

Hyperlipidämie (85.8 % und 61.3 %). An Diabetes mellitus waren 26.5 %, an chronischer Niereninsuffizienz 8.6 %, erkrankt. An einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAD) litten 6.7 % und 54.5 % waren Raucher (Wendorff et al. 2016).

### **3.2.2. Plaquestabilität in Abhängigkeit von Lebensalter und Geschlecht bei asymptomatischen Patienten**

Die Auswertung der 465 asymptomatischen Patienten ergab folgende Ergebnisse: In Hinblick auf die Plaquestabilität, zeigte sich bei asymptomatischen Frauen eine geringere Häufigkeit an instabilen Plaques, als bei der Vergleichsgruppe asymptomatischer Männer (Figure 2, Publikation II S.3) (41 % verglichen mit 52 %  $P=0.042$ ) (Wendorff et al. 2016).

Um den Zusammenhang zwischen Lebensalter und Plaquestabilität herauszuarbeiten wurden die Studienteilnehmer in vier altersbezogene Quartile eingeteilt (<65, 65-69, 70-74, >74). Das Geschlecht wurde zudem separat untersucht. Es konnte bei den asymptomatischen Patienten weder bei Frauen ( $P=0.422$ ), noch bei Männern ( $P=0.125$ ) ein signifikanter, altersbedingter Unterschied in der Plaquestabilität beobachtet werden. Während jedoch bei Frauen die Verteilung der instabilen Plaques in allen Quartilen Ähnlichkeit aufwies, konnte bei Männern ein steigender Trend Richtung instabile Plaques mit zunehmendem Alter beobachtet werden. Dieser Trend erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Figure 3, Publikation II S.4) (Wendorff et al. 2016). Um alle Parameter zu berücksichtigen, die die Plaquestabilität beeinflussen können, wurde noch eine adjustierte logistische Regressionsanalyse mit allen als relevant angesehenen möglichen Confoundern durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse der Regression zeigten, dass bei Männern die Wahrscheinlichkeit eines instabilen Plaques signifikant erhöht war ( $OR=1.562$ ,  $P=0.040$ ). Die Häufigkeit an instabilen Plaques stieg im Alter ebenfalls signifikant, wenn man die Resultate der drei weiteren Quartilen mit der Ersten verglich (Figure 3, Publikation II S.4) (Wendorff et al. 2016). Eine signifikant erhöhte Anzahl an instabilen Plaques war in der Gruppe der 65-69-

Jährigen (OR=1.867, P=0.024) und bei Patienten älter als 74-Jährig, zu beobachten. (OR=1.740, P=0.040) (Figure 3, Publikation II S.4) (Wendorff et al. 2016).

### **3.2.3. Histologische Plaquecharakterisierung bei asymptomatischen Patienten**

Die histologische Plaquecharakterisierung bei asymptomatischen Patienten ergab keine statistisch relevanten Ergebnisse. Es waren keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Kollagen (P=0.553), Inflammation (P=0.396), Neovaskularisation (P=0.655), Elastingehalt (P=0.581) und der Kalzifizierungsrate (P=0.146) in den unterschiedlichen Altersquartilen zu beobachten (Wendorff et al. 2016).

## 4. Diskussion

### 4.1. Kritische Erörterung der angewendeten Methoden

In die Studie wurden arteriosklerotischen Plaques aufgenommen, die unselektiert aus den fortlaufend operierten Patienten stammen. Das größte Defizit bestand dabei im Studiendesign. Es handelte sich um eine retrospektive Querschnitt-Studie, womit eine Generalisierung der Resultate ohne prospektive Validierung der erzielten Ergebnisse, ebenso ein tatsächlicher Zeitverlauf nicht ohne Weiteres möglich waren. Somit wurden vielmehr Assoziationen als Kausalbeziehungen ermittelt. Das angewendete Statistikmodell, welches die Odds Ratio bewertete, führt gewöhnlich zu einer Überbewertung der Effekte. Dennoch war der größte Vorteil der multinominalen Regression, dass alle zu untersuchenden Variablen simultan auf die Begleitfaktoren (Risikofaktoren, Medikamente) adjustiert werden konnten (Wendorff et al. 2015, Wendorff et al. 2016).

Bezüglich der durchgeführten chirurgischen Intervention wurde meist die Eversions-Thrombendarterektomie (EEA) eingesetzt, die das Entfernen der Plaques in einem Stück erlaubte. In bestimmten Fällen musste jedoch die konventionelle Patchplastik-TEA angewendet werden. Aus diesem Grund waren einige arteriosklerotische Plaques längs aufgeschnitten und somit der relevanteste Teil oder die dünnste Stelle der fibrösen Kappe zerstört. Diese Problematik ergab sich bei der Betrachtungsweise von Ota et al. nicht (Ota et al. 2013), der sich auf die Auswertung von MRT- Aufnahmen fokussierte. Des Weiteren beinhaltete die Auswahl des relevantesten Segmentes eine gewisse Subjektivität, auch wenn es nach einem standardisierten Muster verlief. Die Bemessung der Zellularität, Kalzifizierung, Inflammation, Neovaskularisation und des Elastin- und Kollagengehalts verlief semiquantitativ. Auch wenn alle Präparate von denselben unabhängigen und erfahrenen Personen ausgewertet und überprüft wurden, würde vermutlich eine zweite Auswertung durch ein anderes Expertenteam zweifellos bestimmte Abweichungen mit sich bringen. Durch die Anwendung einer geeigneten ordinalen Skala wurde jedoch

das Abweichungspotential im Rahmen der Machbarkeit minimiert (Wendorff et al. 2015, Wendorff et al. 2016).

## **4.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1. Publikation I (Wendorff et al. 2015)**

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass zwischen Männern und Frauen morphologische Unterschiede der Karotisplaques vorliegen als auch eine deutliche Veränderung im Alter erkennbar wird. Im ersten Schritt wurden alle 763 (asympt. /sympt.) Patienten herangezogen. Plaquetyp VI und Komplex – Typ (VII/VI), die beide Plaque-Hämorrhagien aufwiesen, sowie Plaques mit einer dünnen fibrösen Kappe, wurden vermehrt mit symptomatischen Patienten in Verbindung gebracht (Wendorff et al. 2015).

Weiterhin wurden Plaques mit einer dünnen fibrösen Kappe ( $<200\mu\text{m}$ ) vermehrt bei Männern beobachtet ( $\text{OR}=1.12$ ), jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ( $P=0.530$ ) (Wendorff et al. 2015). Gegensätzlich zu der 2013 veröffentlichten Studie von Ota et al. (Ota et al. 2013), der einen signifikanten Unterschied diesbezüglich bei Männern beweisen konnte ( $P=0.047$ ). Diese Ergebnisse stehen jedoch nicht im Widerspruch zu einander, sondern liegen wahrscheinlich in den unterschiedlichen Messmethoden begründet. Der Fokus von Ota et al. lag auf der Auswertung von MRT-Abbildungen, während die vorliegende Studie sich auf die histologische Auswertung konzentrierte. Interessanterweise konnte darüber hinaus bei Männern eine vermehrte Ausprägung des Plaquetyps VI und VI/VII, im Vergleich zu Plaquetyp V und VII festgestellt werden (Wendorff et al. 2015). Diese Erkenntnis deckt sich mit einer der größten Vergleichsstudien, bei der die Auswirkung des Geschlechts auf die Plaquezusammensetzung untersucht wurde. Helling et al. zeigte 2007, dass atheromatöse Plaques vermehrt bei Männern zu beobachten waren (Hellings et al. 2007). Zudem stellte er bei Männern im Vergleich zu Frauen, einen höheren Anteil an entzündlichem

Infiltrat fest, was ebenfalls mit den vorliegenden Ergebnissen übereinstimmte (Hellings et al. 2007). Es existieren noch weitere Studien, bei denen die Auswirkung des Geschlechts auf die Plaquezusammensetzung untersucht wurde. Vrijenhoek et al. zeigte zum Beispiel, dass hämorrhagische Plaques bei Männern häufiger vorkamen als bei Frauen (Vrijenhoek et al. 2013).

Zusammenfassend zeigten die vorliegenden Ergebnisse, sowie die Erkenntnisse aus weiteren Studien, dass das männliche Geschlecht mit erhöhter Neovaskularisation, vermehrtem entzündlichen Infiltrat und einer erhöhten Prävalenz an Plaquetyp VI (hämorrhagischer Plaque) assoziiert war (Wendorff et al. 2015).

In mehreren klinischen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass Plaqueeinblutungen entscheidende Bestandteile instabiler Plaques darstellten und diese mit einem erhöhten Schlaganfallrisiko in Verbindung gebracht wurden (van den Bouwhuijsen et al. 2015, Hellings et al. 2010, Park et al. 2015). Darüber hinaus konnten Plaque-Hämorrhagien mittels Magnetresonanztomographie diagnostiziert werden, die als wichtiger Indikator für zerebrovaskuläre Ereignisse dienten (Park et al. 2015, Saam et al. 2013, Wassermann et al. 2010, Altaf et al. 2008). Es ist jedoch ebenfalls zu erwähnen, dass Ergebnisse veröffentlicht wurden, bei denen kein Zusammenhang zwischen hämorrhagischen Plaques und mikroembolischen Signalen (Truijmann et al. 2014), sowie ein erhöhtes Schlaganfallrisiko (Howard et al. 2015) festgestellt werden konnte.

Ein weiterer wichtiger Teilaspekt der Studie stellte das Alter in Bezug auf die Plaquezusammensetzung dar. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Plaquetyp VII (erhöhte Kalzifizierung), sowie Plaquetyp VI/VII vermehrt bei älteren Patienten vorzufinden waren. Plaquetyp V hingegen nahm dabei einen untergeordneten Stellenwert ein (Wendorff et al. 2015). Vergleichbare Ergebnisse konnten in der Studie von van Oostrom et al. mit 383 arteriosklerotischen Plaques von Patienten im Alter von 39-89 ermittelt werden (van Oostrom et al. 2005). Er konnte mit seiner Studie nachweisen, dass mit steigendem Alter der Anteil an fibrösen Plaques abnahm und im Gegenzug der Anteil an atheromatösen Plaques zunahm (van Oostrom et al. 2005). Van Lammeren veröffentlichte 2011 ebenfalls eine Studie, in der gezeigt werden

konnte, dass Plaques von älteren Patienten einen höheren Kalzifizierungsgrad aufwiesen. Darüber hinaus konnte dort jedoch eine Reduzierung an glatten Muskelzellen festgestellt werden (van Lammeren et al. 2011). Verhoeven zeigte zudem 2005, dass fibröse Plaques vermehrt mit stabilen Plaques assoziiert wurden, während atheromatöse Plaques gehäuft mit neurologischen Vorkommnissen in Verbindung gebracht wurden (Verhoeven et al. 2005).

In der vorliegenden Studie gab es ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen älteren Patienten und einem erhöhten Kalzifizierungsgrad ( $P=0.009$ ). Der Kollagengehalt war gleichermaßen erhöht, jedoch konnte dies nicht als signifikant gewertet werden. Interessanterweise konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Plaquestabilität und Alter festgestellt werden (Wendorff et al. 2015), was jedoch mit den Ergebnissen der Oxford Plaquestudie übereinstimmte (Redgrave et al. 2010). Darüber hinaus konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Plaquetyp VI und Komplextyp (VI/VII), bezogen auf die Häufigkeit auftretender neurologischer Symptome festgestellt werden. Dies ließ den Schluss zu, dass Kalzifizierung wahrscheinlich keinen protektiven Effekt aufweist. In der Literatur gab es keine klar definierte Aussage dazu. Davaine et al. zeigte einen Zusammenhang zwischen der Plaquestabilität und dem Grad der Kalzifizierung (Davaine et al. 2014). In anderen Studien wie z. B. Pelisek et al. und Howard et al. ließ sich dieser Zusammenhang nicht erschließen (Pelisek et al. 2011, Howard et al. 2015).

#### **4.2.2. Publikation II (Wendorff et al. 2016)**

Da kaum Studien mit dem Fokus rein auf asymptomatische Patienten existieren, widmete sich der zweite Teil der vorliegenden Doktorarbeit ausschließlich diesen Individuen.

Somit wurde der Einfluss von Lebensalter und Geschlecht auf die Plaquestabilität ausschließlich in asymptomatischen Patienten analysiert. Die einzige Studie, die sich ebenfalls auf diesen Patientenpool beschränkte, war eine Arbeit von van Lammeren et al. 2012 (van Lammeren et al. 2012), die 264

asymptomatische Patienten analysierte. In dieser Studie wurde zwar nicht der direkte Zusammenhang von Alter und Geschlecht untersucht, jedoch wurden asymptomatische Patienten mehr als 6 Monate vor einer CEA betrachtet. Aus den vorliegenden Auswertungen ergab sich, dass asymptomatische Männer von instabilen Plaques mehr betroffen waren als Frauen (Wendorff et al. 2016), was mit den Erkenntnissen von Redgrave et al übereinstimmte (Redgrave et al. 2008). Wie bereits beschrieben, galt dies als erhöhtes Schlaganfallrisikopotential, unabhängig vom Alter. In den in dieser Arbeit verwendeten Altersquartilen zeigte sich bei Frauen kein signifikanter Unterschied bezogen auf die Frequenz instabiler Plaques (Wendorff et al. 2016). Diese Erkenntnis ließ Grund zu der Annahme, dass bei Frauen das erhöhte Schlaganfallrisiko im Alter nicht auf Veränderungen der Plaquemorphologie hin zu instabilen Läsionen zurück zu führen war. Interessanterweise war bei asymptomatischen Männern ein anderer Trend zu beobachten. Mit zunehmendem Alter stieg die Anzahl an instabilen Plaques (Wendorff et al.2016). Auch wenn die Ergebnisse keine statistische Signifikanz zeigten, konnte dieser Trend deutlich beobachtet werden. Am deutlichsten zeigte sich der Unterschied zwischen Männern und Frauen im vierten Altersquartil bei Patienten >74 Jahre (Wendorff et al. 2016). Die Ergebnisse der Studie ließen Grund zu der Annahme, dass besonders ältere Männer ein steigendes ischämisches Schlaganfallrisiko aufwiesen. Begleiterkrankungen, sowie Medikation schienen eine untergeordnete Rolle zu spielen (Wendorff et al. 2016).

## 5. Zusammenfassung der Publikationen

### 5.1. Publikation I (Wendorff et al. 2015)

**Hintergrund:** Das Ziel der vorliegenden Studie war die Ermittlung potentieller Zusammenhänge zwischen der Plaquemorphologie der A. carotis und dem Geschlecht, sowie dem Alter und stattgehabten neurologischen Symptomen.

**Methoden:** In die Studie wurden 763 arteriosklerotische Plaques, die aus Patienten mit hochgradiger Karotisstenose operativ entfernt wurden, aufgenommen. Der Zeitraum der Operationen belief sich auf die Jahre 2004-2013. In meinen Aufgabenbereich fiel das Aufbereiten und Segmentieren, der noch nicht bearbeiteten Plaques. Gefolgt von der histologischen Auswertung, die zur Beurteilung des Plaquetyps, der Plaquestabilität, des Kalzifizierungsgrades, der Inflammation, des Elastin- und Kollagengehaltes und des Ausmaßes an Neovaskularisation, stattgefunden hat (Wendorff et al. 2015).

Aus den gewonnenen Daten erhob ich selbst die Mittelwerte der jeweiligen Segmente und ermittelte die klinisch relevanten Schnitte. Aus den OP-Berichten, Arztbriefen und Laborberichten erstellte ich zu den jeweiligen Patienten die Patientenhistorie. Die gesammelten Daten wertete ich unter Verwendung der logistischen Regression, ordinalen Regression und multinominalen Regression zusammen mit meinem Mentor PD Dr. Pelisek und PD Dr. Kühnl aus. Alle Ergebnisse waren auf die geläufigen Risikofaktoren der Arteriosklerose (Nikotinanamnese, Bluthochdruck, chronische Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus, sowie ein erhöhter Cholesterinwert) entsprechend adjustiert.

**Ergebnisse:** Aus den Auswertungen ergaben sich folgende Erkenntnisse: Männliches Geschlecht ging signifikant mit einer höheren Zellularität (OR=1.56; P=0.003), mehr entzündlichem Infiltrat (OR=1.75; P<0.001), einer höheren Neovaskularisation (OR=1.47; P=0.010) und geringerer Kalzifizierung (OR=0.78; P=0.090) einher. Symptomatische Patienten wiesen einen

geringeren Elastingehalt auf (OR=0.71; P=0.057). Fortgeschrittenes Alter stand im engen Zusammenhang mit einer höheren Kalzifizierungsrate (OR=1.23; P=0.009). Instabile Plaques wurden gehäuft in symptomatischen Patienten beobachtet (OR=1.60; 95 % Konfidenzintervall 1.14-2.25; P=0.007). Anhand eines multinominalen Regressionsmodells konnten wir zeigen, dass Alter, Geschlecht und neurologische Symptome mit bestimmten Plaquetypen in Verbindung standen (P=0.009, P<0.001 und P=0.017) (Wendorff et al. 2015).

**Schlussfolgerung:** Die Plaquemorphologie variierte signifikant zwischen Männern und Frauen und veränderte sich im Alter. Bestimmte Plaquetypen (VI, VI/VII) und instabile Plaques waren mit einer Reihe von neurologischen Symptomen verbunden (Wendorff et al. 2015).

## **5.2. Publikation II (Wendorff et al. 2016)**

**Hintergrund:** Die Vorteile der Thrombendarteriektomie der Karotisarterie (CEA) gegenüber einer optimalen Medikation werden immer noch kontrovers diskutiert. Aus diesem Grund lag die Aufgabe der zweiten Studie darin, die Beziehung zwischen Geschlecht, Alter und instabilen Plaques bei asymptomatischen Patienten nach einer CEA zu untersuchen.

**Methoden:** In die vorliegende Studie wurden 465 arteriosklerotische Plaques von asymptomatischen Patienten, die im Zeitraum von 2004-2013 mittels einer CEA operiert wurden aufgenommen (Wendorff et al. 2016). Das Procedere der Aufbereitung und Auswertung der Plaques wurde genauso wie in der ersten Publikation beschrieben durchgeführt.

Die Datenerhebung habe ich selbst durchgeführt. Die Auswertung der Histologien und die statistischen Analysen erfolgten zusammen mit dem Mentor PD Dr. Pelisek.

**Ergebnisse:** Das Durchschnittsalter der Patienten belief sich auf  $69.3 \pm 8.2$  Jahre. Im Vergleich zu Männern, waren bei Frauen unabhängig vom Alter instabile Plaques geringer frequentiert (41 % verglichen mit 59 %, P=0.042). Es waren zudem keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen

Altersquartilen feststellbar (<65, 65-69, 70-74, >74) (P=0.042). Im Gegensatz dazu war bei Männern mit steigendem Alter tendenziell ein Anstieg an instabilen Plaques zu beobachten (P=0.125). Der größte Unterschied zwischen Männern und Frauen war in dem letzten Altersquartil zu beobachten (<74, P=0.053). Das Auftreten eines instabilen Plaques war bei Männern signifikant höher als bei Frauen (OR=1.562, P=0.040). Weiterhin lag die Wahrscheinlichkeit eines altersassoziierten Anstiegs an instabilen Plaques bei den 65-69-Jährigen (OR=1.867, P=0.024) und den >74-jährigen (OR=1.740, P=0.040) signifikant höher als bei den <65-jährigen (Wendorff et al. 2016).

**Schlussfolgerung:** Es waren bei asymptomatischen Frauen und Männern deutliche Unterschiede in der Plaquestabilität festzustellen. Des Weiteren war vornehmlich bei Männern eine Veränderung der Plaquestabilität im Alter zu erkennen (Wendorff et al. 2016).

## 6. Literaturverzeichnis

AbuRahma, A.F., Robinson, P.A., Saiedy, S., Khan, J.H., Boland, J.P. (1998). Prospective randomized trial of carotid endarterectomy with primary closure and patch angioplasty with saphenous vein, jugular vein and polytetrafluoroethylene: long-term follow-up. *J Vasc Surg*, 27:222-234.

Altaf, N., Daniels, L., Morgan, P.S., Auer, D., MacSweeney, S.T., Moody, A.R., Gladman, J.R. (2008). Detection of intraplaque hemorrhage by magnetic resonance imaging in symptomatic patients with mild to moderate carotid stenosis predicts recurrent neurological events. *J Vasc Surg*, 47:337-342.

Ballotta, E., Renon, L., DaGiau, G., Toniato, A., Baracchini, C., Abbruzzese, E., Saladini, M., Moscardo, P. (2000). A prospective randomized study of bilateral carotid endarterectomy: patching versus eversion. *Ann Surg*, 232:119-125.

Barnett, H., Taylor, D., Eliasziw, M., Fox, A., Ferguson, G., Haynes, R., Rankin, R.N., Clagett, G.P., Hachinski, V.C., Sackett, D.L., Thorpe, K.E., Meldrum, H.E., Spence, J.D. (1998). Benefit of Carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*, 339:1415-1425.

Benninghoff, A., Drenckhahn, D. (2008). Histologischer Aufbau arterieller Gefäße. D. Drenckhahn (Ed.). *Anatomie makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. (S.760). München: Urban & Fischer.

Bonati, L.H., Dobson, J., Algra, A., Branchereau, A., Chatellier, G., Fraedrich, G. (2010). Carotid Stenting Trialists' Collaboration. Short-term outcome after stenting versus endarterectomy for symptomatic carotid stenosis: a preplanned meta-analysis of individual patient data. *Lancet*, 376:1062-1073.

Bond, R., Rerkasem, K., Naylor, A.R., AbuRahma, A.F., Rothwell, P.M. (2004). Systematic review of randomized controlled trials of patch angioplasty versus primary closure and different types of patch materials during carotid endarterectomy. *J Vasc Surg*, 40:1126-1135.

Davaine, J.M., Quillard, T., Brion, R., Laprine, O., Guyomarch, B., Merlini, T., Chatelais, M., Guilbaud, F., Brennan, M.Á., Charrier, C., Heymann, D., Gouëffic, Y., Heymann, M.F. (2014). Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability. *PLOS ONE*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0107642.

Debus, E.S., Gross-Fengels W. (2012a). Vorwort VII. W.Gross-Fengels (Ed.), *Operative und interventionelle Gefäßmedizin. (Vorwort VII)*. Berlin Heidelberg: Springer.

Debus, E.S., Gross-Fengels W. (2012b). Anatomie der Gefäße und operative Zugangswege. W. Gross-Fengels (Ed.), *Operative und interventionelle Gefäßmedizin. (S. 24-52)*. Berlin Heidelberg: Springer.

Debus, E.S., Gross-Fengels W. (2012c). Arteriosklerose. W. Gross-Fengels (Ed.), *Operative und interventionelle Gefäßmedizin. (S. 99-102)*. Berlin Heidelberg: Springer.

Debus, E.S., Gross-Fengels W. (2012d). Erkrankungen der extrakraniellen A. carotis (Ed.), *Operative und interventionelle Gefäßmedizin. (S.383-384)*. Berlin Heidelberg: Springer.

Eckstein, H.-H., Allenberg, J.R. (2001). Einfluss evidenzbasierter Indikationen zur Karotis-TEA auf die Stadieneinteilung extrakranieller Karotisstenosen-Notwendigkeit einer aktualisierten Klassifikation. *Gefasschirurgie*, 6:91-97.

Eckstein, H.-H., Kühnl, A., Dörfler, A., Kopp, I.B., Lawall, H., Ringleb, P.A.A. (2013). Multidisciplinary German-Austrian Guideline Based on Evidence and Consensus. *Dtsch Arztebl Int*, 110:468-476.

Goldstein, L.B., Hasselbad, V., Matchar, D.B., McCroy, D.C. (1995). Comparison and meta-analysis of randomized trials of endarterectomy for symptomatic carotid artery stenosis. *Neurology*, 45:1965-1970.

Halliday, A., Harrison, M., Hayter, E., Kong, X., Manseld, A., Marro, J. (2010). Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. 10-year stroke prevention after successful carotid endarterectomy for asymptomatic stenosis (ACST-1): a multicentre randomised trial. *Lancet*, 376:1074-1084.

Hansen, K., Östling, G., Persson, M., Nilsson, P.M., Melander, O., Engström, G., Hedblad, B., Rosvall, M. (2016). The effect of smoking on carotid intima-media thickness progression rate and rate of lumen diameter reduction. *Eur J Intern Med*, 28:74-79.

Heberer, G., van Dongen, R.J.A.M. (1987,2004). Geschichte der Gefäßmedizin. G. Heberer & R.J.A.M. van Dongen (Eds.), *Gefäßchirurgie*. (S. 8-10). Berlin Heidelberg: Springer.

Hellings, W.E., Pasterkamp, G., Verhoeven, B.A., De Kleijn, D.P., De Vries, J.P., Seldenrijk, K.A., van den Broek, T., Moll, F.L. (2007). Gender-associated differences in plaque phenotype of patients undergoing carotid endarterectomy. *J Vasc Surg*, 45:289-296.

Hellings, W.E., Peeters, W., Moll, F.L., Piers, S.R., van Setten, J., Van der Spek, P.J., de Vries, J.P., Seldenrijk, K.A., De Bruin, P.C., Vink, A., Velema, E., de Kleijn, D.P., Pasterkamp, G. (2010). Composition of carotid atherosclerotic plaque is associated with cardiovascular outcome: a prognostic study. *Circulation*, 121:1941-1950.

Hepp, W., Sigala, F. (2007). Chronische Verschlussprozesse der Arteria carotis. In Hepp, W., Kogel, H. *Gefäßchirurgie* (S. 395). München Jena: Urban&Fischer.

Howard, D.P., van Lammeren, G.W., Rothwell, P.M., Redgrave, J.N., Moll, F.L., de Vries, J.P., de Kleijn, D.P., den Ruijter, H.M., de Borst, G.J., Pasterkamp, G. (2015). Symptomatic carotid atherosclerotic disease: correlations between plaque composition and ipsilateral stroke risk. *Stroke*, 46:182-189.

Karlsson, L., Kängefjärd, E., Hermansson, S., Strömberg, S., Österberg, K., Nordanstig, A., Ryndel, M., Gellerman, K., Fredén-Lindqvist, J., Bergström, G.M. (2016). Risk of Recurrent Stroke in Patients with Symptomatic Mild (20-49% NASCET) Carotid Artery Stenosis. *J Vasc Surg*, 1078-5884:30118-30126.

Katras, T., Baltazar, U., Rush, D.S., Sutterfield, W.C., Harvill, L.M., Stanton, P.E. (2001). Durability of eversion carotid endarterectomy: comparison with primary closure and carotid patch angioplasty. *J Vasc Surg*, 34:453-458.

Koskas, F., Kieffer, E., Bahnini, A., Ruotolo, C., Rancurel, G. (1995). Carotid eversion endarterectomy: short-and long-term results. *Ann Vasc Surg*, 9:9-15.

Kühnl, A., Söllner, H., Flessenkämper, I., Eckstein, H.-H. (2013). Status quo der Gefäßchirurgie in Deutschland. *Gefasschirurgie*, 18:355-364.

Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420:868-874.

Lüllmann-Rauch, R. (2003). Blutgefäße. R. Lüllmann- Rauch (Ed.), *Histologie Verstehen-Lernen-Nachschlagen*. (S. 242-243). Stuttgart: Thieme.

Ota, H., Reeves, M.J., Zhu, D.C., Majid, A., Collar, A., Yuan, C., DeMarco, J.K. (2013). Sex differences of high-risk carotid atherosclerotic plaque with less than 50% stenosis in asymptomatic patients: an in vivo 3T MRI study. *AJNR Am J Neuroradiol*, 34:1049-1155.

Park, J.S., Kwak, H.S., Lee, J.M., Koh, E.J., Chung, G.H., Hwang, S.B. (2015). Association of carotid intraplaque hemorrhage and territorial acute infarction in patients with acute neurological symptoms using carotid magnetization prepared rapid acquisition with gradient-echo. *J Korean Neurosurg Soc*, 57:94-99.

Pelisek, J., Eckstein, H.-H., Zerneck, A. (2012). Pathophysiological mechanisms of carotid plaque vulnerability: impact on ischemic stroke. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 60:431-442.

Pelisek, J., Hahntow, I.N., Eckstein, H.-H., Ockert, S., Reeps, C., Heider, P., Frank, H. (2011). Impact of chronic kidney disease on carotid plaque vulnerability. *J Vasc Surg*, 54:1643-1649.

Redgrave, J.N., Gallagher, P., Lovett, J.K., Rothwell, P.M. (2008). Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: the oxford plaque study. *Stroke*, 39:1722-1729.

Redgrave, J.N., Lovett, J.K., Rothwell, P.M. (2010). Histological features of symptomatic carotid plaques in relation to age and smoking: the oxford plaque study. *Stroke*, 41:2288-2294.

Rockman, C.B., Halm, E.A., Wang, J.J., Chassin, M.R., Tuhim, S., Formisano, P., Riles, T.S. (2005). Primary closure of the carotid artery is associated with poorer outcomes during carotid endarterectomy. *J Vasc Surg*, 42:870-877.

Saam, T., Hetterich, H., Hoffmann, V., Yuan, C., Dichgans, M., Poppert, H., Koeppel, T., Hoffmann, U., Reiser, M.F., Bamberg, F. (2013). Meta-analysis and systematic review of the predictive value of carotid plaque hemorrhage on cerebrovascular events by magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*, 62:1081-1091.

Stampfer, M., Krauss, R., Ma, J., Blanche, P., Holl, L., Sacks, F., Hennekens, C. (1996). A Prospective Study of Triglyceride Level, Low-Density Lipoprotein Particle Diameter, and Risk of Myocardial Infarction. *JAMA*, 276:882-888.

Sary, H.C. (2000). Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20:1177-1178.

Sary, H.C., Blankenhorn, D.H., Chandler, A.B., Glagov, S., Insull, W., Richardson, M., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D. (1992). A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*, 12:120-134.

Sary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. (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 Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92:1355-1374.

Sary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*, 14:840-856.

Truijman, M.T., de Rotte, A.A., Aaslid, R., van Dijk, A.C., Steinbuch, J., Liem, M.I., Schreuder, F.H., van der Steen, A.F., Daemen, M.J., van Oostenbrugge R.J., Wildberger, J.E., Nederkoorn, P.J., Hendrikse, J., van der Lugt, A, Kooi, M.E., Mess, W.H. (2014). Intraplaque hemorrhage, fibrous cap status, and microembolic signals in symptomatic patients with mild to moderate carotid artery stenosis: The Plaque at RISK study. *Stroke*, 45:3423-3426.

van den Bouwhuisen, Q.J., Bos, D., Ikram, M.A., Hofman, A., Krestin, G.P., Franco, O.H., van der Lugt, A., Vernooij, M.W. (2015). Coexistence of calcification, intraplaque hemorrhage and lipid core within the asymptomatic atherosclerotic carotid plaque: The Rotterdam study. *Cerebrovasc Dis*, 39:319-324.

van Lammeren, G.W., den Hartog, A.G., Pasterkamp, G., Vink, A., de Vries, J.P., Moll, F.L., de Borst, G.J. (2012). Asymptomatic carotid artery stenosis: identification of subgroups with different underlying plaque characteristics. *Eur J Vasc Surg*, 43:632-636.

van Lammeren, G.W., Reichmann, B.L., Moll, F.L., Bots, M.L., de Kleijn, D.P., de Vries, J.P., Pasterkamp, G., de Borst, G.J. (2011). Atherosclerotic plaque vulnerability as an explanation for the increased risk of stroke in elderly undergoing carotid artery stenting. *Stroke*, 42:2550-2555.

van Oostrom, O., Velema, E., Schoneveld, A.H., de Vries, J.P., de Bruin, P., Seldenrijk, C. A., de Kleijn, D.P., Busser, E., Moll, F.L., Verheijen, J.H., Virmani, R., Pasterkamp, G. (2005). Age-related changes in plaque composition. A study suffering from carotid artery stenosis. *Cardiovasc Pathol*, 14:126-134.

Verhoeven, B., Hellings, W., Moll, F., de Vries, J.P., de Kleijn, D., de Bruin, P., Busser, E., Schoneveld, A.H., Pasterkamp, G. (2005). Carotid atherosclerotic plaques in patients with transient ischemic attacks and stroke have unstable characteristics compared with plaques in asymptomatic and amaurosis fugax patients. *J Vasc Surg*, 42:1077-1081.

Vigili de Kreutzenberg, S., Fadini, G.P., Guzzinati, S., Mazzucato, M., Volpi, A., Coracina, A., Avogaro, A. (2015). Carotid plaque calcification predicts future cardiovascular events in type 2 diabetes. *Diabetes care*, 38:1937-1944.

Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A., Schwartz, S.M. (2000). Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20:1262-1275.

Vrijenhoek, J.E., Den Ruijter, H.M., De Borst, G.J., de Kleijn D.P., De Vries, J.P., Bots, M.L., Van de Weg, S.M., Vink, A., Moll, F.L., Pasterkamp, G. (2013). Sex is associated with the presence of atherosclerotic plaque hemorrhage and modifies the relation between plaque hemorrhage and cardiovascular outcome. *Stroke*, 44:3318-3323.

Wasserman, B.A. (2010). Advanced contrast-enhanced MRI for looking beyond the lumen to predict stroke: building a risk profile for carotid plaque. *Stroke*, 41:12-16.

Wick, G., Knoflach, M., Xu, Q. (2004). Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*, 22:361-403.

## 7. Abbildungsverzeichnis

1. Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U. (2005). Leitungsbahnen. U. Schumacher (Ed.) Anatomische Darstellung der linksseitigen supraaortalen Gefäße. Prometheus, LernAtlas der Anatomie. (S. 10). Stuttgart NewYork: Thieme.

2. Kühnel, W., (2002). Blutgefäße, Blut und Abwehrsystem. W. Kühnel (Ed.) Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. (S. 201). Stuttgart New York: Thieme.

3. Wendorff, C., (2016). Schematische Darstellung der Stadien der Arterioskleroseentstehung nach AHA. Selbst erstellt.

4. Pelisek, J. (2014). The impact of patient age on carotid atherosclerosis-results from the Munich carotid biobank. Plaque segmentation (Dia 4). Vortrag im Rahmen der Munich Vascular Conference 2014.

5. Wendorff, C., (2016). Plaqueklassifizierung. Selbst erstellt.

## **8. Publikationsverzeichnis**

### **Publikation I**

Wendorff, C., Wendorff, H., Pelisek, J., Tsantilas, P., Zimmermann, A., Zerneck, A., Kuehnl, A., Eckstein, H-H. Carotid Plaque Morphology Is Significantly Associated With Sex, Age, and History of Neurological Symptoms. Stroke 2015; (46) 11: 3213-3219.

### **Publikation II**

Wendorff, C., Wendorff, H., Kuehnl, A., Tsantilas, P., Kallmayer, M., Eckstein, H-H., Pelisek, J. Impact of sex and age on carotid plaque instability in asymptomatic patients– Results from the Munich Vascular Biobank –. VASA 2016; 28:1-6.

## 9. Danksagung

Im folgenden Abschnitt möchte ich mich bei allen Personen ganz herzlich bedanken, die das Zustandekommen der Arbeit ermöglicht haben.

Mein herzlicher Dank geht an Univ.-Prof. Dr. Eckstein für das Anvertrauen dieses spannenden Themas, sowie die umfassende Betreuung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Pelisek für die überragende Unterstützung. Er stand mir mit seiner außerordentlichen Erfahrung während des gesamten Projektes (von der Planung bis zu den Veröffentlichungen) beratend zur Seite. Geduldig und umgehend beantwortete er auftretende Fragen.

Ebenso ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Kühnl für die statistische Betreuung und die wertvollen Anregungen bedanken.

Zuletzt gilt mein tiefster Dank meinem Ehemann und meinen Eltern, die mich bei jedem Vorhaben bedingungs- und grenzenlos unterstützen.

## **10. Appendix**

**Publikation I:**

## Original Contribution

# Carotid Plaque Morphology Is Significantly Associated With Sex, Age, and History of Neurological Symptoms

Carina Wendorff, MD\*; Heiko Wendorff, MD\*; Jaroslav Pelisek, PhD; Pavlos Tsantilas, MD; Alexander Zimmermann, MD; Alma Zerneck, MD; Andreas Kuehnl, MD, MPH\*; Hans-Henning Eckstein, MD, PhD\*

**Background and Purpose**—The purpose of this study was to analyze the association between morphological characteristics of human carotid plaques and patient's sex, age, and history of neurological symptoms.

**Methods**—The study included 763 atherosclerotic plaques from patients treated surgically for carotid stenosis between 2004 and 2013. Histological analyses of carotid plaques were performed to assess the type of plaque (American Heart Association classification), the stability of the plaque, the extent of calcification, inflammation, and neovascularization, as well as the deposition of collagen and elastin. According to the scale of outcome measurement, logistic regression, ordinal regression, and multinomial regression analyses were applied. All results were adjusted for common risk factors of atherosclerosis.

**Results**—Male sex was associated with more cellularity (odds ratio [OR], 1.56;  $P=0.003$ ), more inflammatory infiltrates (OR, 1.75;  $P<0.001$ ), and more neovascularization (OR, 1.47;  $P=0.010$ ), but less calcification (OR, 0.78;  $P=0.090$ ). Symptomatic patients were more likely to have a lower amount of elastin (OR, 0.71;  $P=0.057$ ). Higher age was associated with increased calcification (OR, 1.23;  $P=0.009$ ). Unstable plaques were found more frequently in symptomatic patients (OR, 1.60; 95% confidence interval, 1.14–2.25;  $P=0.007$ ). A multinomial regression model revealed that age, sex, and history of neurological symptoms were significantly associated with specific plaque types ( $P=0.009$ ,  $P<0.001$ , and  $P=0.017$ , respectively).

**Conclusions**—Plaque morphology differed between men and women and varied with age. Certain types of plaques (VI and VI/VII) as well as unstable plaques were significantly associated with a history of neurological symptoms. Thus, individual approaches (eg, in detection of plaque hemorrhage or thin fibrous caps) especially based on sex and age should be considered to identify patients at increased risk of stroke. (*Stroke*. 2015;46:00-00. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.010558.)

**Key Words:** age factors ■ atherosclerosis ■ carotid stenosis ■ sex

The short-term risk of stroke or death of surgically treated patients having a symptomatic carotid stenosis has been shown to be similar in younger and older patients (<70 years [5.7%] versus  $\geq 70$  years [5.9%]).<sup>1</sup> In contrast, a meta-analysis of 3 large randomized controlled trials (EVA-3S, SPACE, ICSS) revealed that the risk of stroke or death after carotid artery stenting increases significantly with age (<70 years [5.8%] versus  $\geq 70$  years [12.0%]).<sup>1</sup> A similar trend (although not significant) has also been found in asymptomatic patients, particularly when sex was taken into account.<sup>2</sup>

These observations might be explained by embolism derived from ruptured plaques or sheared-off arterial calcifications caused by guidewire manipulations during carotid artery stenting procedures.<sup>3,4</sup>

In addition, multivariable analyses of pooled randomized controlled trial data on symptomatic patients showed that men

have had a higher risk of stroke or death when treated with carotid artery stenting compared with carotid endarterectomy (9.0% versus 5.5%, respectively).<sup>1</sup> In contrast, no significant differences were found in women.<sup>1</sup> This discrepancy in the available data raises the question of whether age and sex are associated with differences in plaque morphology or plaque composition.

The pathophysiological development of an atherosclerotic plaque is a long-lasting and dynamic process.<sup>5</sup> The development of atherosclerosis begins already at an early age. However, the incidence of clinically apparent atherosclerosis-related cardiovascular events increases only at an advanced age.<sup>6–10</sup> In Germany, the prevalence of extracranial carotid artery stenosis (>50%) is  $\approx 6.9\%$  in patients aged >65 years but increases further with age.<sup>4,11</sup> Among all ischemic stroke events,  $\approx 15\%$  were caused by arterioarterial embolization from extracranial atherosclerotic carotid artery stenosis.<sup>4</sup> In

Received June 23, 2015; final revision received September 3, 2015; accepted September 8, 2015.

From the Department of Vascular and Endovascular Surgery, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Munich, Germany (C.W., H.W., J.P., P.T., A. Zimmermann, A. Zerneck, A.K., H.-H.E.); DZHK (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung), partner site Munich Heart Alliance, Munich, Germany (J.P., H.-H.E.); and Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany (A. Zerneck).

\*Drs C. Wendorff, H. Wendorff, Kuehnl, and Eckstein contributed equally.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://stroke.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/STROKEAHA.115.010558/-DC1>.

Correspondence to Hans-Henning Eckstein, MD, PhD, Department of Vascular and Endovascular Surgery, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Ismaninger St 22, 81675 Munich, Germany. E-mail [hheckstein@web.de](mailto:hheckstein@web.de)

© 2015 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://stroke.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.010558

Downloaded from <http://stroke.ahajournals.org/> at Technische Universitaet Muenchen on October 8, 2015

contrast, in coronary arteries, acute angina underlies the consequences of rupture or erosion of the plaque surface and subsequent luminal thrombus formation.<sup>12,13</sup> It is also known from coronary artery disease that fibrous plaques are mainly associated with stable syndromes, whereas atheromatous plaques are more often related to unstable syndromes.<sup>14</sup>

So far, only a few morphological studies have reported that increasing age is associated with a decrease in plaque stability.<sup>14-17</sup> In contrast, plaque calcification increases with age.<sup>16</sup> A drawback of most of the previous studies was the small number of patients evaluated and that these studies mainly focused on a single factor associated with aging. To date, there have only been few studies dealing with pathomorphological changes in plaque composition during aging with a larger number of patients.<sup>15,17</sup> For example, van Oostrom et al<sup>17</sup> observed that with increasing age, the morphology of atherosclerotic plaques changes significantly toward that of unstable lesions, without distinguishing between men and women. Only one available study also dealt with sex-specific aspects of plaque morphology.<sup>15</sup>

The purpose of this study was to analyze the differences in morphological characteristics of human carotid plaques with regard to sex, age, and history of neurological symptoms. The study results should improve our knowledge of the underlying pathohistological characteristics and possible morphological predictive factors of differing stroke risks.

## Methods

### Study Population

Between 2004 and 2013, atherosclerotic plaques and corresponding blood samples were collected from 832 patients. All patients were examined by an experienced neurologist within 2 days before and after the operation. The indication for surgical treatment was based on national and international guidelines.<sup>4</sup> The degree of stenosis was routinely assessed with Doppler ultrasound. In most cases, computed tomography or magnetic resonance angiography was also performed for cerebral

imaging or to determine the grade of carotid stenosis. Inclusion criteria for carotid specimens in this study were (1) sufficient quality of plaque tissue for histological and morphological characterization and (2) availability of corresponding patient history and clinical data, including history of neurological symptoms, history of coronary and peripheral artery disease, medication history, and the presence of risk factors of atherosclerosis, such as smoking habits, hypertension, chronic kidney disease, diabetes mellitus, or hyperlipidemia. Finally, specimens from 763 patients were eligible for further analyses. Characteristics of the corresponding patients are given in Table 1.

This study was performed according to the Guidelines of the World Medical Association Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee of the Technische Universität München. Written informed consent was obtained from all patients.

### Histological Analysis of Atherosclerotic Plaques

All specimens were prepared as follows. The plaque was cut into 3 to 5 segments of 3 to 4 mm each depending on the total plaque size. Afterward, all segments were embedded in paraffin (formalin-fixed paraffin embedded) following overnight fixation with formalin (4%) and ethylenediaminetetraacetic acid treatment for decalcification of specimens before embedding in paraffin blocks. Slides (5 µm) were stained using standard protocols for hematoxylin and eosin and Elastica van Gieson staining. Atherosclerotic plaques were classified according to the American Heart Association guidelines<sup>18-22</sup> (Table 1 in the online-only Data Supplement). Classification was determined independently by 2 experienced investigators, blinded for patient characteristics and study outcomes. In ambiguous cases, third party adjudication was provided by an experienced pathologist.

In 153 cases, plaques had similar characteristics of both American Heart Association type VI (mainly lesions with intraplaque hemorrhage) and American Heart Association type VII (predominately calcification) classes. Therefore, these specimens were classified as type VI/VII (named complex plaques; Table 1 in the online-only Data Supplement).

In addition, plaque features, such as cellularity, content of collagenous and elastic fibers, the amount of calcification, inflammatory infiltration, and neovascularization were determined by performing light microscopy using semiquantitative scoring on an 8-point ordinal scale (ranging from absent [-] to strong positive [+++]). The histological examination was performed by 2 experienced investigators as described for classification of plaque types.

**Table 1. Clinical Characteristics of Patients**

Raw Numbers (Proportion)	Total, n=763 (100)	Men, n=540 (71)		Women, n=223 (29)	
		Symptomatic, n=203 (38)	Asymptomatic, n=337 (62)	Symptomatic, n=95 (43)	Asymptomatic, n=128 (57)
Age (mean±SD)	70.0±8.7	69.7±9.3	69.4±8.1	74.4±8.9	69.1±8.2
Clinical presentation and medical history					
Arterial hypertension*	656/763 (86)	175/203 (86)	291/337 (86)	82/95 (86)	108/128 (84)
Diabetes mellitus*	202/762 (27)	58/202 (29)	86/337 (26)	21/95 (22)	37/128 (29)
Hyperlipidemia*	514/763 (67)	129/203 (64)	237/337 (70)	59/95 (62)	89/128 (70)
Smoking†	370/762 (49)	88/202 (44)	197/337 (58)	22/95 (23)	63/128 (49)
History of CHD‡	83/763 (11)	27/203 (13)	43/337 (13)	5/95 (5)	8/128 (6)
History of PAOD‡	40/763 (5)	8/203 (4)	25/337 (7)	1/95 (1)	6/128 (5)
Current medication					
Antiplatelet drugs	651/763 (85)	170/203 (84)	289/337 (86)	79/95 (83)	113/128 (88)
Statins	524/763 (69)	134/203 (66)	226/337 (67)	66/95 (69)	98/128 (77)
β-blockers	275/763 (36)	63/203 (31)	131/337 (39)	36/95 (38)	45/128 (35)
ACE inhibitors	211/763 (28)	58/203 (29)	100/337 (30)	23/95 (24)	30/128 (23)

ACE indicates angiotensin-converting enzyme; CHD, coronary heart disease; and PAOD, peripheral arterial occlusive disease.

\*According to diagnosis guidelines valid in the year of operation.

†Current and former smokers.

‡As specified in medical records or stated by the patient.

Histological classification and characterization was performed separately for each segment. Standardized classification of the whole plaque was based on the most relevant segment, according to the following criteria: (1) plaque vulnerability (unstable>stable), (2) plaque type (complex plaque>VI>V>VII), (3) inflammatory infiltrates (strong positive>absent), and (4) content of collagenous fibers (absent>strong positive). These features were weighted in the order 1, 2, 3, and 4. This procedure was developed and validated by experienced pathologists.

**Definition of Lesion Stability (Vulnerability)**

Lesion stability was assessed as described by Redgrave et al.<sup>23</sup> Unstable lesions were either ruptured or rupture-prone plaques with thin-cap fibroatheroma of thickness <200 μm over a large necrotic core. Stable lesions were plaques with thick-cap fibroatheroma of ≥200 μm or without a lipid/necrotic core.

**Statistical Analysis**

For statistical analyses, SPSS for Windows version 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) and the statistical software package R (Open-Source, Version 3.1.2) were used.

Logistic regression was used to analyze the association between the stability of the plaque (stable versus unstable) as the dependent variable and the independent variables, such as age, sex, neurological symptoms, arterial hypertension, diabetes mellitus, hyperlipidemia, smoking, history of coronary heart disease, history of peripheral artery disease, antiplatelet drug use, statin use, angiotensin-converting enzyme inhibitor use, and β-blocker use (Table II in the online-only Data Supplement). Ordinal regression analysis was used to analyze the association between independent variables (Table II in the online-only Data Supplement) and plaque cellularity, calcification, collagen content, elastin content, inflammatory infiltration, and neovascularization (all were measured by using 8-point semiquantitative/ordinal scales). Using this method, semiquantitative (ordinal) outcome measures need not to be dichotomized. Proportional odds assumption for ordinal regression was tested using the test of parallel lines.

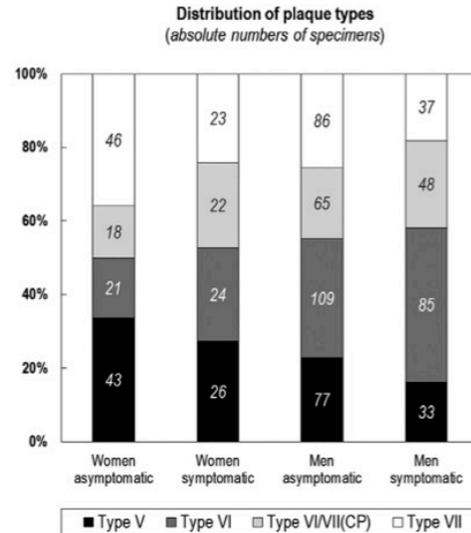
Multinomial regression was applied to assess the association between the independent variables (adjusted for risk factors/confounders listed in Table II in the online-only Data Supplement) and the type of plaque as the dependent nominal outcome.

Continuous variables were compared using the Student *t* test. Nominal variables were compared using Fisher exact test. All statistical tests were performed 2-sided using an α-level of 0.05.

**Results**

**Stability of the Plaque**

Plaques classified as unstable were found more frequently in symptomatic patients (odds ratio [OR], 1.60; 95% confidence



**Figure 1.** Absolute numbers of specimens and relative distribution of plaque types by sex and neurological symptoms (normalized to 100%). CP indicates complex plaque.

interval [CI], 1.14–2.25; *P*=0.007). No significant differences were found on sex (men versus women; OR, 1.12; 95% CI, 0.78–1.61; *P*=0.530) or age (per 10-year increase; OR, 1.03; 95% CI, 0.85–1.24; *P*=0.796).

**Classification of the Plaque**

The relative distribution of plaque types and the raw numbers are shown in Figure 1. Type V plaques were classified as unstable in 24.1% of samples. In contrast, type VI plaques were unstable in 65.3%, type VII in 57.5%, and type VI/VII in 65.0%. Fisher exact test showed that plaque stability was not independent of the distribution of the plaque type (*P*<0.001).

Fitting analysis for multinomial regression model revealed that the full model (variables listed in Table II in the online-only Data Supplement) fit significantly better than the null (intercept only) model ( $\chi^2$ , 148.5; *df*=42; *P*<0.001). Likelihood ratio tests showed that the overall effects of age, sex, and history of neurological symptoms were statistically significant

**Table 2. Results of Multinomial Regression Analyses**

Plaque Type	Factor	vs Type V	vs Type VI	vs Type VII
VI	Age	1.28 (0.99–1.65); <i>P</i> =0.064		
	Symptoms	1.41 (0.89–2.23); <i>P</i> =0.145		
	Sex	2.76 (1.68–4.51); <i>P</i> <0.001		
VII	Age	1.57 (1.19–2.06); <i>P</i> =0.001	1.23 (0.96–1.57); <i>P</i> =0.106	
	Symptoms	0.75 (0.46–1.23); <i>P</i> =0.249	0.53 (0.34–0.83); <i>P</i> =0.005	
	Sex	1.15 (0.72–1.86); <i>P</i> =0.552	0.42 (0.26–0.67); <i>P</i> <0.001	
VI/VII (CP)	Age	1.42 (1.07–1.89); <i>P</i> =0.015	1.12 (0.87–1.43); <i>P</i> =0.391	0.91 (0.69–1.20); <i>P</i> =0.503
	Symptoms	1.42 (0.86–2.34); <i>P</i> =0.175	1.01 (0.65–1.56); <i>P</i> =0.978	1.90 (1.17–3.08); <i>P</i> =0.010
	Sex	1.94 (1.15–3.30); <i>P</i> =0.013	0.71 (0.42–1.18); <i>P</i> =0.184	1.68 (1.02–2.80); <i>P</i> =0.043

The given values are odds ratio (95% confidence interval) for having a plaque type listed in the first column versus having a plaque type listed in header row, when comparing men with women (sex), symptomatic with asymptomatic patients (symptoms), and older with younger patients (age per 10-year increase). CP indicates complex plaque.

( $P=0.009$ ,  $P<0.001$ , and  $P=0.017$ , respectively). All parameter estimates (OR, CIs, and  $P$  values) are shown in Table 2 and Figure 2. Detail effect plots including confidence bands are shown in Figure I in the online-only Data Supplement. For the purposes of illustration, specific results could be read as follows. Compared with women, men were more likely to have type VI plaque than type V plaque (OR, 2.76; 95% CI, 1.68–4.51;  $P<0.001$ ). Compared with asymptomatic patients, symptomatic patients were less likely to have type VII plaques than type VI plaques (OR, 0.53; 0.34–0.83;  $P=0.005$ ). Moreover, older patients (per 10-year increase) were more likely to have type VII plaques than type V plaques (OR, 1.57; 95% CI, 1.19–2.06;  $P=0.001$ ). According to the multivariable multinomial regression, all results could be considered as independent effects (or as adjusted for all other variables).

### Histological Characteristics of the Plaque

All tests of parallel lines were not significant. This indicated that the proportional odds assumption could not be rejected and the (one equation) ordinal regression model could be considered valid. Figure 3 shows the association between age, sex, and history of neurological symptoms and the histological characteristics of carotid plaques (Table III in the online-only Data Supplement).

Compared with women, men were more likely to have higher cellularity (OR, 1.56; 95% CI, 1.17–2.10;  $P=0.003$ ), more inflammatory infiltrates (OR, 1.75; 95% CI, 1.31–2.34;  $P<0.001$ ), and more neovascularization (OR, 1.47; 95% CI, 1.10–1.97;  $P=0.010$ ). In contrast, women tended to have higher amounts of calcification (men versus women; OR, 0.78; 95% CI, 0.59–1.04;  $P=0.090$ ), but this was not statistically significant. Compared with symptomatic patients, asymptomatic patients tended to have higher amounts of elastin (OR, 1.41; 95% CI, 0.99–2.01;  $P=0.057$ ). Finally, a higher age (per 10-year increase) was significantly associated with higher amounts of calcification (OR, 1.23; 95% CI, 1.05–1.43;  $P=0.009$ ).

### Discussion

This study revealed that plaque morphology differed significantly between men and women and changes with age. Certain types of plaques (especially type VI and VI/VII, both with intraplaque hemorrhage) and plaques with thin fibrous caps were significantly associated with a history of neurological symptoms. Thus, this study reinforces the view that early detection of type VI plaques (or plaque hemorrhage) or a thin fibrous cap is a promising approach to identify patients at risk for stroke.

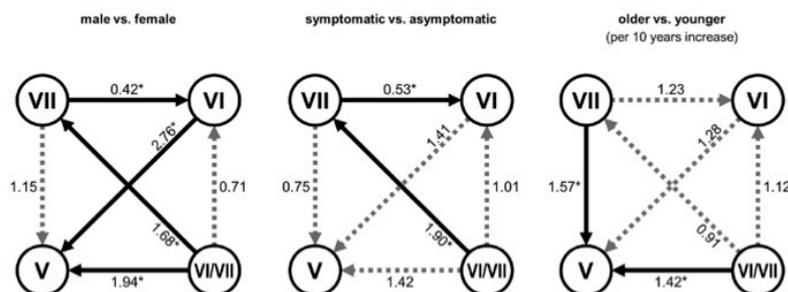
In our study, thin fibrous caps ( $<200\ \mu\text{m}$ ) were slightly more frequent in men than in women (OR, 1.12), but this was not statistically significant ( $P=0.530$ ). In contrast, in the study by Ota et al,<sup>24</sup> the latter association showed the same trend but was found to be statistically significant ( $P=0.047$ ), although with a broad CI. These differences might not qualify as a contradiction and are most likely due to different methods of measurement (magnetic resonance imaging versus histology).

Interestingly, compared with women, we found that men were generally more likely to have type VI or VI/VII plaques (atheromatous, containing mainly intraplaque hemorrhage or extensive calcification) than type VII or V plaques. This is in line with one of the largest comparable studies analyzing the effect of sex on plaque morphology. In the aforementioned study of 450 carotid specimens, Hellings et al<sup>15</sup> showed that atheromatous plaques were also more frequent in men than in women. In accordance with our findings, inflammatory infiltrates (macrophages) were also found to be increased in men compared with women.<sup>15</sup> In a recent in vivo magnetic resonance imaging study, Ota et al<sup>24</sup> found that the prevalence of intraplaque hemorrhage and type VI plaques was higher in men than in women. In addition, in a more recent study evaluating the association between sex and plaque type, Vrijenhoek et al<sup>25</sup> determined that the presence of plaque hemorrhage was also higher in men than in women.

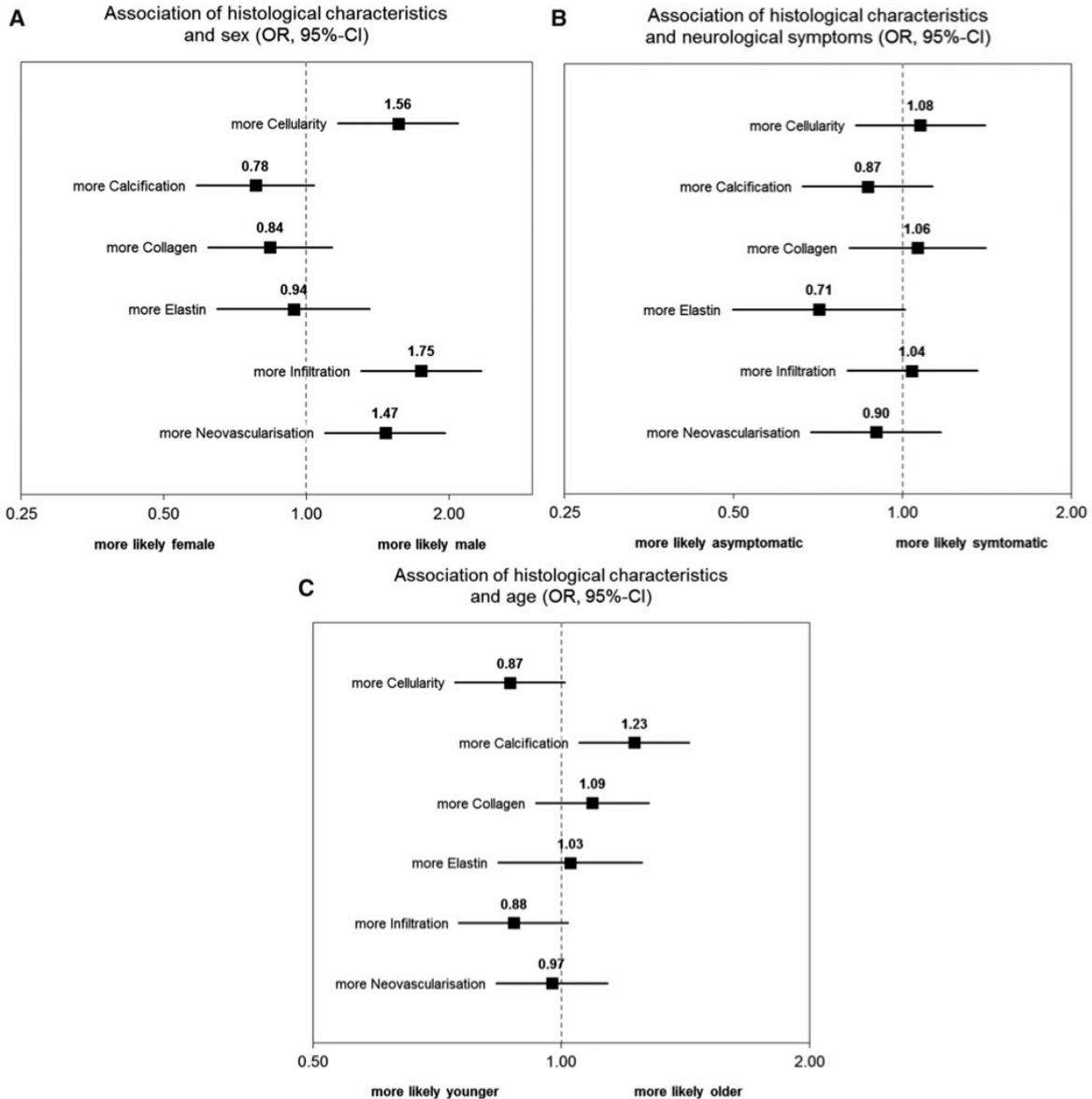
In summary, the findings from our investigation and other studies showed that male sex is most likely associated with increased neovascularization, increased inflammatory infiltration, and a higher prevalence of type VI plaques (atheromatous plaques, including plaque hemorrhage). Plaque hemorrhage has already been considered an important vulnerable plaque component that was shown to be associated with increased risk of stroke in clinical studies.<sup>26–28</sup> In addition, intraplaque hemorrhage noninvasively detected on magnetic resonance imaging was demonstrated to be a strong predictor for cerebrovascular events and might therefore be used for noninvasive risk stratification.<sup>29–31</sup>

However, contradictory results have also been published showing that there is no association between plaque hemorrhage and microembolic signals<sup>32</sup> or the risk of stroke on a histopathologic analysis.<sup>33</sup>

In this study, elderly patients were more likely to have type VII plaques (calcified) or type VI/VII plaques (atheromatous, plaque hemorrhage, or calcification) than type V plaques (fibromatous). Comparable results were found in a study on 383 carotid atherosclerotic plaques harvested from patients



**Figure 2.** Illustration of the association (adjusted odds ratios) between plaque type and sex, history of neurological symptoms, and age. Arrows give the direction of comparison. Significant associations ( $P<0.05$ ) are plotted red and marked with an asterisk. Confidence intervals are given in Table 2.



**Figure 3. A–C,** Associations (odds ratio [OR]; 95% confidence interval [CI]) between sex, age, the presence of neurological symptoms, and the histological characteristics of carotid plaques. All results were adjusted for arterial hypertension, diabetes mellitus, hyperlipidemia, smoking, medication (antiplatelet drugs, statins, angiotensin-converting enzyme inhibitors, and  $\beta$ -blockers), and history of coronary heart disease or history peripheral artery diseases. Further details are given in Table III in the online-only Data Supplement.

aged 39 to 89 years.<sup>17</sup> The authors showed that with aging, a decrease in fibrous plaques and an increase in atheromatous plaques could be observed.<sup>17</sup> Studies published by the group of Gerard Pasterkamp have also shown that plaques of elderly patients had a higher degree of plaque calcification and larger atheromas but less amounts of smooth muscle cells.<sup>3,17</sup> Furthermore, fibrous plaques were found to be more stable, whereas atheromatous plaques and inflammatory plaques were more frequently associated with neurological symptoms.<sup>14</sup> In accordance with these findings, in our study, the level of plaque calcification was found to be significantly higher in

elderly people. In addition, the content of collagenous fibers was also higher, although this was only a trend and was not statistically significant.

Interestingly, plaque stability (thin fibrous cap thickness,  $\geq 200 \mu\text{m}$ ) was not associated with age in our study. This is in line with the Oxford plaque study that also did not find any statistically significant association between plaque stability (using the same definition) and age.<sup>16</sup>

In contrast, other previous studies have reported that increased age was associated with decreased plaque stability.<sup>3</sup> These differences are most likely due to different

definition criteria of plaque stability/vulnerability used in these studies.

Another interesting finding of our study is that no significant differences were observed between atherosclerotic type VI plaques and complex lesions (type VI/VII) in terms of history of neurological symptoms (Figure 2). Accordingly, these results indicate that plaque calcification may not have a protective effect as was previously suggested. Currently, the impact of calcification on plaque stability is not clearly defined in the literature. Although Davaine et al<sup>34</sup> showed that vascular calcification is associated with plaque stability, other studies revealed ambiguous results.<sup>26,33,35</sup> Howard et al<sup>33</sup> did not find any relationships between calcification, intraplaque hemorrhage, or lymphocyte infiltration and stroke occurrence. In accordance with the latter findings, our study confirmed the assumption that increased calcification or higher amounts of inflammatory infiltration were also not associated with a history of neurological symptoms. Future analyses involving in-depth characteristics of the calcification pattern (eg, patchy versus coalesced) will likely be more meaningful in investigations of the impact of calcification on plaque stability.<sup>26</sup>

### Limitations

Although our study included a large number of atherosclerotic plaques harvested from unselected and consecutively treated patients, some important points that may have compromised the validity of our results must be mentioned.

The most important shortcoming is that this investigation was an observational study with cross-sectional design. Thus, only associations rather than causal effects of any individual factors could be analyzed. In addition, the statistical models applied only to the estimation of ORs that usually slightly overestimate the underlying effects (relative risks). Nevertheless, it is a major strength of multinomial regression models that all effect measures (OR) could be simultaneously adjusted for the other factors (Table II in the online-only Data Supplement), resulting in so-called independent effect measures.

By default, surgical treatment was performed using eversion endarterectomy allowing for en bloc removal of the plaque. In contrast, endarterectomy with patch plastic needed to be applied in some cases for morphological reasons. Therefore, some plaques were cut along and the relevant portion of lesion or the thinnest part of fibrotic cap may have been destroyed. In addition, the method for selecting the relevant segment of a plaque remains to a certain degree subjective, although in this study, it was applied in a standardized fashion. In other studies on this topic, the culprit lesion was defined directly as the portion of the plaque showing the highest plaque burden, without providing an exact definition.<sup>33,36,37</sup> However, neither totally objective nor international standardized methods for identifying the relevant culprit lesions are readily available. This point should be taken into account when interpreting studies that have analyzed carotid plaque histology.

Measurements of cellularity, calcification, collagen content, elastin content, inflammatory infiltration, and neovascularization were performed only in a semiquantitative fashion; however, all specimens were analyzed by the same team of independent and experienced investigators. Nevertheless, absolute outcome values may be different when analyzed by

other investigators, but the relative order would be most likely the same. Therefore, applying an ordinal scale level should have minimized any potential bias. In addition, it is a major strength of ordinal regression modeling that ordinal outcome variables (eg, semiquantitative histological measures) need not to be dichotomized and analyses could be adjusted for typical confounders.

### Summary/Conclusions

In summary, the results of this study emphasize the assumption that plaque morphology differs significantly between men and women and changes with age. Certain subtypes of lesions (type VI and VI/VII, predominately plaque hemorrhage with or without calcification) and plaques with thin fibrous caps were significantly associated with a history of neurological symptoms in our patient cohort. Because of the applied statistical methods, all stated effects could be considered independent from each other and adjusted for the analyzed risk factors.

From a histopathologic point of view, this study emphasizes the assumption that atherosclerotic plaque composition and consequently the potential risk for stroke should be differentially considered in male and female patients, as well as in elderly patients in comparison with younger affected individuals. Read in conjunction with other reports,<sup>27,29–31</sup> this study reinforces the view that early detection of specific plaque types (first of all type VI lesions, including intraplaque hemorrhage) or plaques with thin fibrous caps might be a promising approach to identify patients who are potentially at risk for stroke.

### Acknowledgments

We thank Renate Hegenloh for her excellent technical assistance.

### Disclosures

None.

### References

- Bonati LH, Dobson J, Algra A, Branchereau A, Chatellier G, Fraedrich G, et al; Carotid Stenting Trialists' Collaboration. Short-term outcome after stenting versus endarterectomy for symptomatic carotid stenosis: a preplanned meta-analysis of individual patient data. *Lancet*. 2010;376:1062–1073. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61009-4.
- Halliday A, Harrison M, Hayter E, Kong X, Mansfield A, Marro J, et al; Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. 10-year stroke prevention after successful carotid endarterectomy for asymptomatic stenosis (ACST-1): a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2010;376:1074–1084. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61197-X.
- van Lammeren GW, Reichmann BL, Moll FL, Bots ML, de Kleijn DP, de Vries JP, et al. Atherosclerotic plaque vulnerability as an explanation for the increased risk of stroke in elderly undergoing carotid artery stenting. *Stroke*. 2011;42:2550–2555. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.607382.
- Eckstein HH, Kühnl A, Dörfler A, Kopp IB, Lawall H, Ringleb PA; Multidisciplinary German-Austrian Guideline Based on Evidence and Consensus. The diagnosis, treatment and follow-up of extracranial carotid stenosis. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110:468–476. doi: 10.3238/arztebl.2013.0468.
- Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*. 1998;339:1415–1425. doi: 10.1056/NEJM199811123392002.
- Kuehl A, Soellner H, Eckstein HH. Epidemiology and inpatient treatment of vascular diseases in Germany. *Gefäßchirurgie*. 2015;20:204–213.

7. Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Williams J, Rayner M, Townsend N. The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014. *Heart*. 2015;101:1182–1189. doi: 10.1136/heartjnl-2015-307516.
8. Seo SR, Kim SY, Lee SY, Yoon TH, Park HG, Lee SE, et al. The incidence of stroke by socioeconomic status, age, sex, and stroke subtype: a nationwide study in Korea. *J Prev Med Public Health*. 2014;47:104–112. doi: 10.3961/jpmph.2014.47.2.104.
9. Jacobs BS, Boden-Albala B, Lin IF, Sacco RL. Stroke in the young in the northern Manhattan stroke study. *Stroke*. 2002;33:2789–2793.
10. Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, Ibañez B, López-Melgar B, Laclaustra M, et al. Prevalence, vascular distribution, and multiterritorial extent of subclinical atherosclerosis in a middle-aged cohort: the PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation*. 2015;131:2104–2113. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014310.
11. Pelisek J, Eckstein HH, Zernecke A. Pathophysiological mechanisms of carotid plaque vulnerability: impact on ischemic stroke. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60:431–442. doi: 10.1007/s00005-012-0192-z.
12. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med*. 1997;336:1276–1282. doi: 10.1056/NEJM199705013361802.
13. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92:657–671.
14. Verhoeven B, Hellings WE, Moll FL, de Vries JP, de Kleijn DP, de Bruin P, et al. Carotid atherosclerotic plaques in patients with transient ischemic attacks and stroke have unstable characteristics compared with plaques in asymptomatic and amaurosis fugax patients. *J Vasc Surg*. 2005;42:1075–1081. doi: 10.1016/j.jvs.2005.08.009.
15. Hellings WE, Pasterkamp G, Verhoeven BA, De Kleijn DP, De Vries JP, Seldenrijk KA, et al. Gender-associated differences in plaque phenotype of patients undergoing carotid endarterectomy. *J Vasc Surg*. 2007;45:289–296. doi: 10.1016/j.jvs.2006.09.051.
16. Redgrave JN, Lovett JK, Rothwell PM. Histological features of symptomatic carotid plaques in relation to age and smoking: the oxford plaque study. *Stroke*. 2010;41:2288–2294. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.587006.
17. van Oostrom O, Velema E, Schoneveld AH, de Vries JP, de Bruin P, Seldenrijk CA, et al. Age-related changes in plaque composition: a study in patients suffering from carotid artery stenosis. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:126–134. doi: 10.1016/j.carpath.2005.03.002.
18. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1177–1178.
19. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:120–134.
20. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355–1374.
21. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:840–856.
22. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1262–1275.
23. Redgrave JN, Gallagher P, Lovett JK, Rothwell PM. Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: the oxford plaque study. *Stroke*. 2008;39:1722–1729. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.507988.
24. Ota H, Reeves MJ, Zhu DC, Majid A, Collar A, Yuan C, et al. Sex differences of high-risk carotid atherosclerotic plaque with less than 50% stenosis in asymptomatic patients: an in vivo 3T MRI study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013;34:1049–1155, S1. doi: 10.3174/ajnr.A3399.
25. Vrijenhoek JE, Den Ruijter HM, De Borst GJ, de Kleijn DP, De Vries JP, Bots ML, et al. Sex is associated with the presence of atherosclerotic plaque hemorrhage and modifies the relation between plaque hemorrhage and cardiovascular outcome. *Stroke*. 2013;44:3318–3323. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002633.
26. van den Bouwhuisen QJ, Bos D, Ikram MA, Hofman A, Krestin GP, Franco OH, et al. Coexistence of calcification, intraplaque hemorrhage and lipid core within the asymptomatic atherosclerotic carotid plaque: the Rotterdam study. *Cerebrovasc Dis*. 2015;39:319–324. doi: 10.1159/000381138.
27. Hellings WE, Peeters W, Moll FL, Piers SR, van Setten J, Van der Spek PJ, et al. Composition of carotid atherosclerotic plaque is associated with cardiovascular outcome: a prognostic study. *Circulation*. 2010;121:1941–1950. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.887497.
28. Park JS, Kwak HS, Lee JM, Koh EJ, Chung GH, Hwang SB. Association of carotid intraplaque hemorrhage and territorial acute infarction in patients with acute neurological symptoms using carotid magnetization-prepared rapid acquisition with gradient-echo. *J Korean Neurosurg Soc*. 2015;57:94–99. doi: 10.3340/jkns.2015.57.2.94.
29. Saam T, Hetterich H, Hoffmann V, Yuan C, Dichgans M, Poppert H, et al. Meta-analysis and systematic review of the predictive value of carotid plaque hemorrhage on cerebrovascular events by magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:1081–1091. doi: 10.1016/j.jacc.2013.06.015.
30. Wasserman BA. Advanced contrast-enhanced MRI for looking beyond the lumen to predict stroke: building a risk profile for carotid plaque. *Stroke*. 2010;41(10 suppl):S12–S16. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.596288.
31. Altaf N, Daniels L, Morgan PS, Auer D, MacSweeney ST, Moody AR, et al. Detection of intraplaque hemorrhage by magnetic resonance imaging in symptomatic patients with mild to moderate carotid stenosis predicts recurrent neurological events. *J Vasc Surg*. 2008;47:337–342. doi: 10.1016/j.jvs.2007.09.064.
32. Truijman MT, de Rotte AA, Aaslid R, van Dijk AC, Steinbuch J, Liem MI, et al. Intraplaque hemorrhage, fibrous cap status, and microembolic signals in symptomatic patients with mild to moderate carotid artery stenosis: the Plaque at RISK study. *Stroke*. 2014;45:3423–3426. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006800.
33. Howard DP, van Lammeren GW, Rothwell PM, Redgrave JN, Moll FL, de Vries JP, et al. Symptomatic carotid atherosclerotic disease: correlations between plaque composition and ipsilateral stroke risk. *Stroke*. 2015;46:182–189. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.007221.
34. Davaine JM, Quillard T, Brion R, Lapérine O, Guyomarch B, Merlini T, et al. Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability. *PLoS One*. 2014;9:e107642. doi: 10.1371/journal.pone.0107642.
35. Pelisek J, Hahntow IN, Eckstein HH, Ockert S, Reeps C, Heider P, et al. Impact of chronic kidney disease on carotid plaque vulnerability. *J Vasc Surg*. 2011;54:1643–1649. doi: 10.1016/j.jvs.2011.05.049.
36. van Lammeren GW, den Hartog AG, Pasterkamp G, Vink A, de Vries JP, Moll FL, et al. Asymptomatic carotid artery stenosis: identification of subgroups with different underlying plaque characteristics. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012;43:632–636. doi: 10.1016/j.ejvs.2012.03.011.
37. van Lammeren GW, den Ruijter HM, Vrijenhoek JE, van der Laan SW, Velema E, de Vries JP, et al. Time-dependent changes in atherosclerotic plaque composition in patients undergoing carotid surgery. *Circulation*. 2014;129:2269–2276. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007603.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Supplemental Table I:** Applied classification scheme for the histological characterization of atherosclerotic lesions.

Type	Histological characterization of atherosclerotic lesions according to the AHA <sup>1-5</sup> .
I	<b>Early lesion:</b> first microscopically visible lipid deposits, intima consisting of isolated groups of macrophages and macrophages-derived foam cells.
II	<b>Fatty streak:</b> thickening of the intima, visible fatty streaks, mainly intracellular lipid accumulation, increased number of macrophages and foam cells, visible intimal SMCs in fatty streaks
III	<b>Preatheroma:</b> adaptive intimal thickening, overall increase of scattered pools of extracellular lipid deposits associated with foam cells and macrophages.
IV	<b>Atheroma:</b> the first advanced lesion characterized by massive aggregates of extracellular lipid (a lipid core) without fibrotic cap, thrombosis or hemorrhage, neovessels often border the lipid core at the shoulders of the intimal thickening together with macrophages and foam cells.
V	<b>Fibroatheroma:</b> a thick layer composed of proliferating SMCs and collagen fibers (fibrotic cap) located in the region between the lipid core and the endothelial cell layer. Increased number of neovessels at the shoulders of the lipid core may be larger than in the atheroma stage. Substantial increase of collagen and synthetic SMCs, lymphocytes, macrophages, and plasma cells are frequently collocated with neovessels.
VI	<b>Complicated atheroma:</b> in addition to lesion V, thrombotic deposits and/or hematoma-hemorrhage, more often unstable lesions with erosion or ulceration of the surface, impairment of ECs.
VII	<b>Calcific lesion:</b> similar to lesion V but with calcium deposits that replace the accumulated remnants of dead cells and extracellular lipids.
VIII	<b>Fibrotic lesion:</b> large lesions with small lumen consisting almost entirely of scar collagen, lipid components are minimal or absent.
VI/VII	<b>Complex lesions:</b> similar to lesion VI but with extensive amount of calcium deposits (as found in type VII lesions).

**Supplemental Table II:** Dependent and independent variables used in regression analyses.

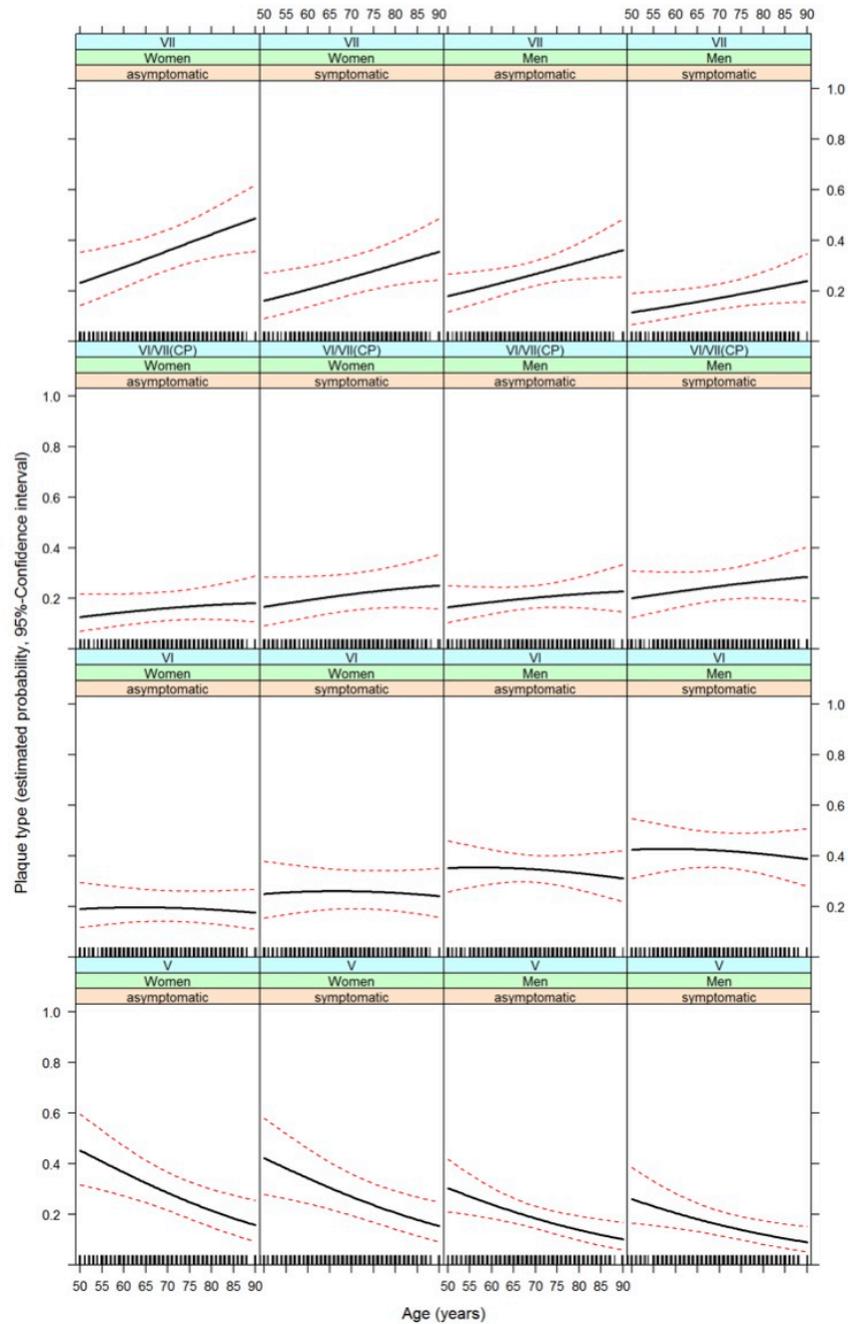
Variables	Type	Scale	Analysis
Age	Independent	Metric	Descriptive statistics Table 1
Sex		Dichotomous	
Neurological symptoms			
Arterial hypertension	Independent <sup>#</sup>	Dichotomous	Descriptive statistics Table 1
Diabetes			
Hyperlipidemia			
Smoking			
History of CHD			
History of PAOD			
Antiplatelet drug use			
Statin use			
ACE-Inhibitor use			
Beta-blocker use			
Stability of fibrous cap	Dependent	Dichotomous	Logistic regression
Plaque type		Nominal, 4 levels	Multinomial regression Table 2, Figure 2
Cellularity		Ordinal, 8 levels	Ordinal regression Figure 3a-c
Calcification			
Collagen deposition			
Elastin deposition			
Inflammatory infiltrates			
Neovascularization			

# These variables were entered a-priori into the regression models as they were considered possible confounders of the associations to be analyzed in this study<sup>6</sup>.

**Supplemental Table III:** Detailed results of the ordinal regression analysis. 95%-CI = 95% confidence interval.

<b>Independent Variable</b>	<b>Dependent variable</b>	<b>Odds-Ratio</b>	<b>95%-CI lower bound</b>	<b>95%-CI upper bound</b>	<b>p-value</b>
<b>Sex</b>	Cellularity	1.56	1.17	2.10	p=0.003
	Calcification	0.78	0.59	1.04	p=0.090
	Collagen	0.84	0.62	1.13	p=0.254
	Elastin	0.94	0.65	1.36	p=0.748
	Infiltrates	1.75	1.31	2.34	p<0.001
	Neovessels	1.47	1.10	1.97	p=0.010
<b>Symptoms</b>	Cellularity	1.08	0.83	1.40	p=0.589
	Calcification	0.87	0.66	1.13	p=0.295
	Collagen	1.06	0.80	1.41	p=0.669
	Elastin	0.71	0.50	1.01	p=0.057
	Infiltrates	1.04	0.80	1.36	p=0.768
	Neovessels	0.90	0.69	1.17	p=0.425
<b>Age</b>	Cellularity	0.87	0.74	1.01	p=0.069
	Calcification	1.23	1.05	1.43	p=0.009
	Collagen	1.09	0.93	1.28	p=0.280
	Elastin	1.03	0.84	1.25	p=0.803
	Infiltrates	0.88	0.75	1.02	p=0.087
	Neovessels	0.97	0.83	1.14	p=0.744

**Supplemental Figure I:** Effect plots showing the estimated probability (black lines) and the corresponding 95% confidence interval (broken red lines) for a particular type of plaque differentiated by patient's age, sex and presence of neurological symptoms. All results were adjusted for arterial hypertension, diabetes, hyperlipidemia, smoking, medication (antiplatelet drugs, statins, ACE-inhibitors, and beta-blockers), and history of neurological symptoms, coronary heart disease, and PAOD. The rug plots show the distribution of patients age on the horizontal axis.



## Supplemental references:

1. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1177-8.
2. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Jr., Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:120-34.
3. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92:1355-74.
4. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:840-56.
5. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1262-75.
6. van Lammeren GW, den Hartog AG, Pasterkamp G, Vink A, de Vries JP, Moll FL, et al. Asymptomatic carotid artery stenosis: identification of subgroups with different underlying plaque characteristics. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012;43:632-6.

## Carotid Plaque Morphology Is Significantly Associated With Sex, Age, and History of Neurological Symptoms

Carina Wendorff, Heiko Wendorff, Jaroslav Pelisek, Pavlos Tsantilas, Alexander Zimmermann, Alma Zerneck, Andreas Kuehnl and Hans-Henning Eckstein

*Stroke*. published online October 8, 2015;

*Stroke* is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2015 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0039-2499. Online ISSN: 1524-4628

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://stroke.ahajournals.org/content/early/2015/10/08/STROKEAHA.115.010558>

Data Supplement (unedited) at:

<http://stroke.ahajournals.org/content/suppl/2015/10/08/STROKEAHA.115.010558.DC1.html>

**Permissions:** Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Stroke* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

**Reprints:** Information about reprints can be found online at:  
<http://www.lww.com/reprints>

**Subscriptions:** Information about subscribing to *Stroke* is online at:  
<http://stroke.ahajournals.org/subscriptions/>

## **Publikation II:**



# Impact of sex and age on carotid plaque instability in asymptomatic patients—results from the Munich Vascular Biobank

Carina Wendorff<sup>1</sup>, Heiko Wendorff<sup>1</sup>, Andreas Kuehn<sup>1</sup>, Pavlos Tsantilas<sup>1</sup>, Michael Kallmayer<sup>1</sup>, Hans-Henning Eckstein<sup>1,2</sup>, and Jaroslav Pelisek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Vascular and Endovascular Surgery, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Germany

<sup>2</sup>DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Munich Heart Alliance, Munich, Germany

**Background:** It is still a controversial issue whether carotid endarterectomy (CEA) for asymptomatic carotid stenosis is superior to best medical treatment. The aim of this study was therefore to analyze the impact of sex and age on carotid plaque instability in asymptomatic patients undergoing CEA. **Patients and methods:** Atherosclerotic plaques from 465 asymptomatic patients with high-grade carotid artery stenosis (2004–2013) at the Munich Vascular Biobank were analyzed. Ascertainment of lesion stability/instability was performed on formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples using hematoxylin-eosin and elastic van Gieson staining. Unstable plaques were considered lesions with a fibrous cap < 200 µm overlaying lipid-rich atheroma. **Results:** The average age of the patients was 69.3 ± 8.2 years. Independent of age, asymptomatic men had in total more frequently unstable plaques in contrast to women (41 % versus 52%,  $p = 0.042$ ). No differences were found in plaque instability between age-related quartiles (< 65, 65–69, 70–74, > 74 years) for female sex ( $p = 0.422$ ). In men, a continuous increase in plaque instability with age was observed, without achieving statistical significance ( $p = 0.125$ ). The greatest differences between male and female sex were found in the last quartile (> 74 years), without achieving statistical significance ( $p = 0.053$ ). The chance of unstable carotid plaques in men was significantly higher than in women (OR = 1.562,  $p = 0.040$ ). The probability of age-associated quartiles related to the first quartile demonstrated significant increase in plaque instability in the group of 65- to 69-year-old patients (OR 1.867,  $p = 0.024$ ) and for patients older than 74 years (OR 1.740,  $p = 0.040$ ). **Conclusions:** Asymptomatic men had in total more frequently unstable plaques in contrast to women. Thus, male sex seems to be an additional risk factor for ischemic stroke.

**Key words:** Asymptomatic patients, carotid artery, atherosclerotic plaque, aging, sex

## Introduction

Stroke is one of the leading causes of death and disability in western societies and a prevalent public health concern worldwide [1]. Extracranial carotid artery stenosis due to atherosclerotic plaque burden is one of the major risk factors of forthcoming stroke [2]. Epidemiologic data document that ischemic stroke attributable to a diseased carotid artery corresponds with up to 18% of all incidents leading to neurological events [3, 4]. Furthermore, the prevalence of a cervical internal carotid artery stenosis increases with age and can be found in 6.9% of the elderly population (> 65 years) [5]. Large randomized clinical trials (the North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) and the European Carotid Surgery Trial (ECST)) have provided clear evidence of the usefulness of surgical treatment of patients with neurological symptoms for a degree of stenosis >50% in NASCET and >70% in ECST [6, 7]. In contrast, the benefit of carotid endarterectomy (CEA) for asymptomatic patients is less clear. Large multicenter randomized studies for asymptomatic carotid artery disease (the Asymptomatic

Carotid Surgery Trial (ACST) and the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study (ACAS)) demonstrated a small reduction in secondary stroke risk using CEA compared to medical treatment [8, 9]. However, the absolute risk reduction was rather small [10, 11].

Epidemiological studies have already revealed that aging and sex are independent risk factors for cardiovascular disease [12, 13]. However, the question as to how far potential changes in carotid plaque morphology might contribute to ischemic stroke during aging, especially due to unstable atherosclerotic lesions, has not yet been elucidated. Interestingly, very few studies have focused so far on lesion morphology and instability as a function of age, sex, or patient symptomatology [14–20]. The data suggest that especially neurological symptoms are often caused by critical changes in carotid plaque morphology, leading to lesion instability. Consequently, unfavorable alterations in the pathophysiology of atherosclerotic plaques in asymptomatic patients might cause an increased risk of stroke.

The aim of the current study was therefore to analyze plaque instability as a function of age and sex in patients with asymptomatic carotid artery stenosis by means of his-

tological examination of pathomorphological features of the corresponding atherosclerotic lesions.

## Patients and methods

### Study population

In total, atherosclerotic plaques from 465 asymptomatic patients with high-grade ( $\geq 70\%$ ) carotid artery stenosis (2004–2013) of the Munich Vascular Biobank were analyzed. Criteria to include carotid specimens in the current study were sufficient quality of plaque tissue for reliable histological and morphological characterization, the availability of corresponding patient history and clinical data, as described previously [20]. The indication of patients for surgical intervention was based upon the recommendation of the German Society of Vascular Surgery according to the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study and the North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial [9, 21]. In most cases, Doppler ultrasonography was used to assess the degree of stenosis. Whenever not evident, an additional imaging technique was applied to affirm the grade of carotid stenosis (computed tomography or magnetic resonance angiography). All patients underwent detailed neurological examination within two days before and after the procedure by an experienced neurologist. The surgical intervention on the carotid artery was performed in accordance with the German guidelines S3 ([http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/004-028l\\_S3\\_Extra-cranielle\\_Carotisstenose\\_2012\\_verlaengert.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/004-028l_S3_Extra-cranielle_Carotisstenose_2012_verlaengert.pdf)). The incidence of PAD was diagnosed in accordance with the German guidelines for PAD patients (<http://www.awmf-leitlinien.de>). The study was performed according to the Guidelines of the World Medical Association Declaration of Helsinki. The local ethics committee of our university hospital approved the study and written informed

consent for being included in the Munich Vascular Biobank was given by all patients.

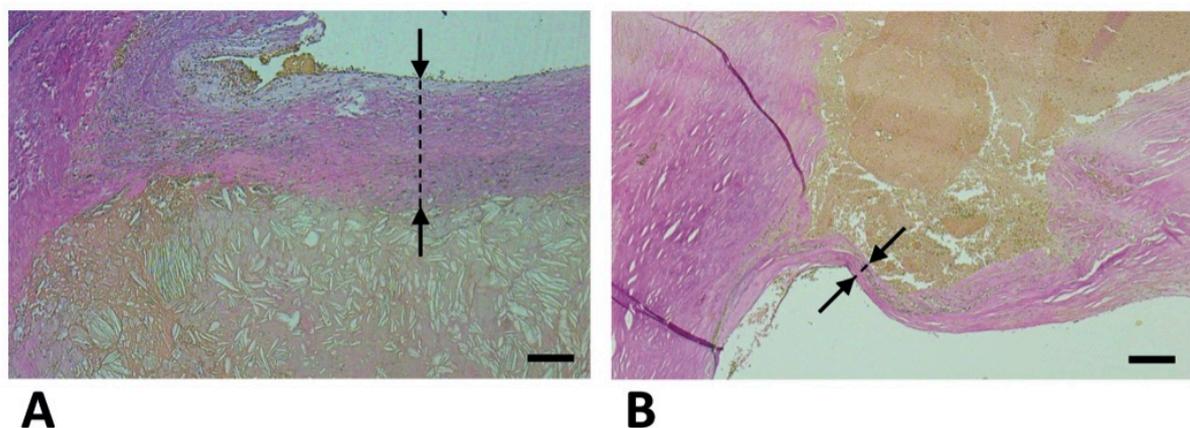
### Histological analysis of atherosclerotic plaques

All carotid atherosclerotic lesions were segmented in 3 to 5 blocks of 3–4 mm depending upon the plaque size, fixed in formalin overnight and embedded in paraffin (FFPE). Histological characterization of atherosclerotic plaques was performed following the hematoxylin-eosin and elastic van Gieson staining procedures to assess the pathomorphological features of all segments, as described previously [5, 20, 22]. Lesion stability was defined as described by Redgrave et al. [23], considering a thin fibrous cap of less than 200  $\mu\text{m}$  over a large lipid-rich atheroma as a cut-off to distinguish between stable and unstable atherosclerotic plaques (Figure 1).

Plaque features such as collagen and elastin content, inflammation, neovascularization, and calcification were determined by light microscopy using semi-quantitative scoring ranging from absence (-) to strong positive (+++) staining. All histological analyses were performed by two experienced investigators blinded to the study outcome.

### Statistical analysis

All results were analyzed using SPSS for Windows version 20.0. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R (Open-Source, Version 3.1.2). Nominal variables were compared using  $\chi^2$  test. For multivariable analysis, a logistic regression model was applied in order to calculate odds ratios with corresponding 95% confidence intervals. Plaque stability (unstable vs. stable) was used as the dichotomous outcome variable. Sex (male vs. female) and age (continuous) were entered as independent variables. The following parameters for adjustment were entered into the model: hyperten-



**Figure 1.** Examples of the histology of stable (A) and unstable (B) carotid atherosclerotic plaques used in this study to distinguish between the study groups. Vessel stability was assessed by measuring the cap thickness in accordance with Redgrave et al. [26]. The arrows show the minimum cap thickness. Elastic van Gieson. Scale bar: 200  $\mu\text{m}$ .

sion, hyperlipidemia, diabetes mellitus, smoking, chronic kidney disease, history of coronary heart disease, history of peripheral arterial occlusive disease, antiplatelet drugs, ACE-inhibitor, beta-blocker, diuretics, and statins. For age-related analysis, the following quartiles were empirically determined: (Q1) <65 (n=119), (Q2) 65–69 (n=112), (Q3) 70–74 (n=117), and (Q4) >74 (n=117) years. All statistical comparisons were performed two sided in terms of an exploratory data analysis using  $p < 0.05$  level of significance.

## Results

### Study population

The patient characteristics, risk factors and concomitant diseases are summarized in Table I. The average age was  $69.4 \pm 8.1$  years for men and  $69.1 \pm 8.2$  years for women ( $p=0.586$ ); 72.5% were male. No significant differences in the baseline characteristics were observed between men and women. However, there was a tendency for males to suffer more often from coronary heart disease (12.8% vs. 11.0%,  $p=0.057$ ) and males took fewer statins than females (67.1% vs. 76.6%,  $p=0.055$ ). The majority of the patients suffered from hypertension and hyperlipidemia (85.8% and 61.3%). Furthermore, of the study individuals, 26.5% suffered from diabetes mellitus, 8.6% from chronic kidney disease, 6.7% had in addition peripheral arterial disease (PAD), and 54.5% of the patients were smokers.

### Plaque instability as a function of age and sex

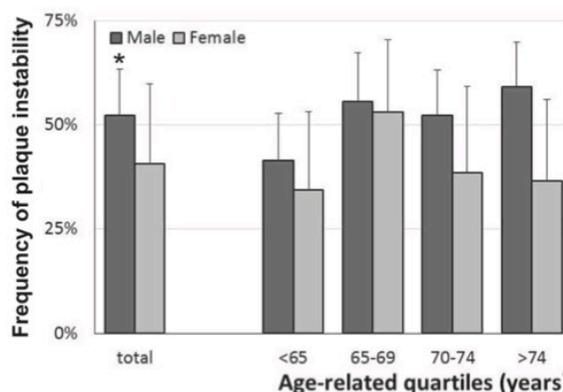
With regard to plaque instability, female asymptomatic patients had a lower frequency of unstable plaques compared to male individuals (41% vs. 52%,  $p=0.042$ ) (Figure 2A, total). Considering the sex of the patients separately and comparing the age-related quartiles, no significant differences were observed in lesion instability during aging for both female ( $p=0.422$ ) and male patients ( $p=0.125$ ) (Figure 2, age-related quartiles).

In order to consider additional parameters influencing plaque instability, a logistic regression analysis of all available data was performed (Figure 3). The probability of having an unstable carotid plaque was significantly increased in male compared to female individuals (OR 1.562,  $p=0.040$ ). Regarding plaque instability as a function of age, unstable lesions had a significant higher frequency in the elderly, when comparing the higher age-related quartiles to the first quartile comprising younger patients (<65 years). Significantly more unstable plaques were observed in the group of 65 to 69-year-old patients (OR 1.867,  $p=0.024$ ) and in patients older than 74 years (OR 1.740,  $p=0.040$ ) (Figure 3).

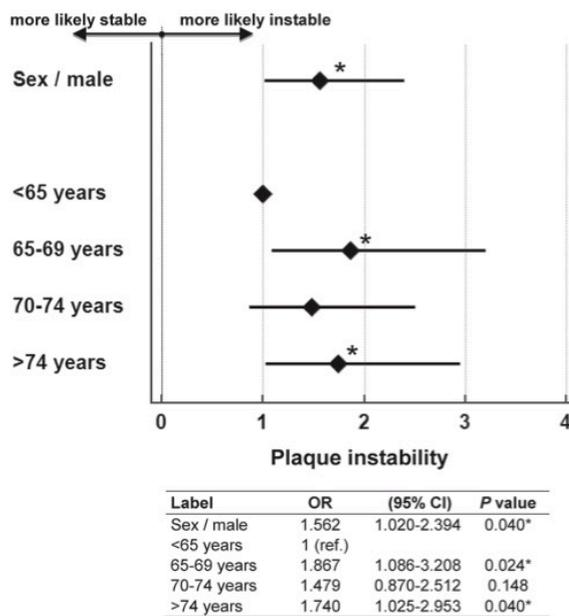
**Table I.** Patient baseline characteristics

Parameter	Male (n = 337)	Female (n = 128)	p-value
Age (years)	$69.4 \pm 8.1$	$69.1 \pm 8.2$	0.586
Gender (males)	–	–	–
Hypertension	86.4 %	84.4 %	0.655
Hyperlipidemia	61.1 %	61.7 %	1.000
Hypercholesterolemia	9.5 %	8.6 %	0.859
Diabetes mellitus	25.5 %	28.9 %	0.481
Chronic kidney disease	9.5 %	6.3 %	0.354
Coronary heart disease	12.8 %	11.0 %	0.057
Peripheral arterial disease	7.4 %	6.3 %	0.405
Nicotine abuse	58.5 %	49.2 %	0.076
Aspirin/clopidogrel	85.8 %	83.6 %	0.546
ACE inhibitor	29.7 %	23.4 %	0.204
Beta-blocker	38.9 %	35.2 %	0.521
Diuretics	14.5 %	12.5 %	0.654
Statins	67.1 %	76.6 %	0.055

Other features of plaque morphology were analyzed as well. No significant differences were observed for the collagen and elastin content, inflammation, neovascularization, or calcification between the individual age-related quartiles ( $p=0.553$ , 0.396, 0.655, 0.581, 0.146). Furthermore, regression analysis, adjusted for the common confounders of cardiovascular disease, did not show any association of the histological plaque characteristics with age (data not shown).



**Figure 2.** Age-associated differences in plaque instability between male and female sex using age-related quartiles. The fault indicators show 95% confidence interval. \*  $p < 0.05$ .



**Figure 3.** Forest plot of the effect of plaque instability on sex and age-related quartiles showing odds ratio and 95% confidence interval (95% CI) for sex in favor of male sex (upper plot) and for age-associated quartiles related to the first quartile (<65 years). The table in the lower section provides the exact values and the corresponding statistics.

In addition, to exclude the influence of statin therapy on plaque stability, patients with or without statin use were analyzed separately. Independent of comparing the whole study population or the subgroups male and female sex, no significant influence of statin treatment on plaque stability was observed (Table II).

## Discussion

In the current study, we analyzed the influence of aging in men and women on plaque stability in asymptomatic patients with advanced carotid artery stenosis. Our results demonstrate a possible impact of sex and age on the frequency of unstable plaques in patients undergoing CEA, especially in men.

Only few studies have addressed carotid plaque morphology and lesion instability as a function of sex or increasing age [14–19]. Furthermore, the most of these studies focused on a study population including both patients with and without neurological symptoms, male and female. The only study dealing with asymptomatic patients

**Table II.** Influence of statin treatment on plaque instability

Parameter	OR (95% CI)	p-value
All patients (n = 465)	0.971 (0.644 – 1.464)	0.017
Male sex (n = 337)	0.937 (0.586 – 1.498)	0.812
Female sex (n = 128)	0.881 (0.362 – 2.147)	0.782

and carotid plaque morphology we are aware of is the work of van Lammeren et al. [24]. These authors analyzed 264 asymptomatic patients, focusing not directly on age or sex, but on patients with ipsilateral clinical events more than 6 months before CEA. In our recently published work [20], we analyzed patients with high-grade carotid artery stenosis using a complex multinomial regression model. Our results revealed that male sex was significantly associated with inflammation and neovascularization. Furthermore, symptomatic patients had lower amounts of elastin and were significantly associated with unstable plaques. In addition, neurological symptoms were also related to specific plaque types according to AHA, especially type VI, which is often considered unstable. The bottleneck of the analysis of symptomatic patients is, however, that these individuals are already intended for surgical intervention.

Analyzing the whole study population, our results demonstrate that asymptomatic men had more unstable plaques in comparison to women according to Redgrave [23] and thus were at higher risk of ischemic stroke, independent of patient age. With regard to different age-related quartiles that were used in this work, no differences were observed in the group of asymptomatic female individuals, which could be interpreted that, for women, the increased risk of stroke in the elderly does not seem to be caused by changes in plaque morphology towards unstable lesions. Interestingly, in asymptomatic male patients, the number of unstable plaques increased continuously with age. Even if these differences did not achieve statistical significance, the tendency was obstructive and the differences between men and women increased in each age-related quartile, almost showing significant difference in the last quartile of patients older than 74 years. Consequently, the increased risk of ischemic stroke in men in comparison to women seems to be more apparent at a higher age. These results were reinforced by regression analysis that showed a significant increase in unstable plaques in male sex with increasing age. Our findings are in accordance with Redgrave et al. [16], who also observed an increase in the prevalence of unstable plaques in the elderly. However, these authors did not distinguish between male and female patients and analyzed symptomatic patients, in contrast to our study. Similar results were observed by van Lammeren et al. [18], who found that plaque stability decreased with age. Older patients with high-grade carotid artery stenosis had more unstable atherosclerotic lesions with a smaller number of smooth muscle cells and a large necrotic core in comparison to younger individuals. However, these authors did not differentiate between asymptomatic and symptomatic patients and between sexes. The only study, as far as we are aware of, that compared plaque morphology in association with sex was by Hellings et al. [13]. These authors observed that carotid plaques obtained from women were more stable with a less inflammatory phenotype compared to men. Furthermore, the group of asymptomatic female subjects showed the highest prevalence of stable plaques. The data of the current study confirm these findings, demonstrating that especially older

men are at higher risk of ischemic stroke. Recently, a systematic review was published about the sex differences in patients with carotid stenosis [25]. This overview of the recent literature demonstrated that ischemic stroke occurs more frequently in men than in women and that especially male patients seem to benefit from surgical treatment. The authors also inferred that such distinctions between the sexes might be caused by smaller vessel diameters in women, hormonal differences, or possible differences in plaque morphology. Accompanying diseases and medication did not seem to play any significant role in our comparison, because no statistical significant differences were observed between the study groups. Thus, we have shown sex to be a relevant factor, which should be taken into account in the treatment of future patients with high-grade carotid stenosis.

### Limitations

Several limitations of the study should be considered. First, there may have been selection bias for CEA subjected to age or sex. Furthermore, we performed an observational cross-sectional study focusing on asymptomatic patients. Consequently, our results show an association rather than implied causality. Also, similar to our previous study [20], we calculated odds ratios, which tend to overestimate the underlying effects. In addition, the estimation of plaque instability was determined according to Redgrave and Rothwell in 2008 [23], which might lead to subjective results. However, two independent and experienced investigators performed the histological characterization to reduce such bias to a minimum. It should also be noted that the indication of CEA has changed in the recent years towards a more conservative trend. Consequently, at the beginning of the study, the included asymptomatic patients might have had more stable plaques (these patients would currently obtain best medical treatment) than the individuals included later. Finally, we do not have complete information about the history of stroke or contralateral CEA, which might also have an influence on the plaque stability and might be a source of potential bias in our study.

### Conclusions

The data of our present study indicate the possible importance of considering sex as an independent risk factor of stroke in patients with asymptomatic carotid atherosclerosis [26, 27]. Our results show obvious differences in the incidence of unstable plaques in patients with asymptomatic carotid artery stenosis, not only between female and male sex, but also during aging. There is an obvious tendency towards an increase in plaque instability in older men. Thus, especially male sex seems to be an additional risk factor for ischemic stroke.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Renate Hegenloh for her excellent technical support in the histological analysis and characterization of the carotid plaques.

### References

1. Mukherjee D, Patil CG. Epidemiology and the global burden of stroke. *World Neurosurg* 2011; 76 (6 Suppl): S85 – 90.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 129 (3): e28 – e292.
3. Flaherty ML, Flemming KD, McClelland R, et al. Population-based study of symptomatic internal carotid artery occlusion: incidence and long-term follow-up. *Stroke* 2004; 35 (8): e349 – 52.
4. Petty GW, Brown RD Jr, Whisnant JP, et al. Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence and risk factors. *Stroke* 1999; 30 (12): 2513 – 6.
5. Pelisek J, Eckstein HH, Zernecke A. Pathophysiological mechanisms of carotid plaque vulnerability: impact on ischemic stroke. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012; 60 (6): 431 – 42.
6. NASCET. Clinical alert: benefit of carotid endarterectomy for patients with high-grade stenosis of the internal carotid artery. National Institute of Neurological Disorders and Stroke Stroke and Trauma Division. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) investigators. *Stroke* 1991; 22 (6): 816 – 7.
7. ECST. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998; 351 (9113): 1379 – 87.
8. ACAS. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA* 1995; 273 (18): 1421 – 8.
9. Halliday A, Mansfield A, Marro J, et al. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 363 (9420): 1491 – 502.
10. King A, Shipley M, Markus H, Investigators A. The effect of medical treatments on stroke risk in asymptomatic carotid stenosis. *Stroke* 2013; 44 (2): 542 – 6.
11. Abbott AL, Paraskevas KI, Kakkos SK, et al. Systematic review of guidelines for the management of asymptomatic and symptomatic carotid stenosis. *Stroke* 2015; 46 (11): 3288 – 301.
12. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation* 2003; 107 (1): 139 – 46.
13. Hellings WE, Pasterkamp G, Verhoeven BA, et al. Gender-associated differences in plaque phenotype of patients undergoing carotid endarterectomy. *J Vasc Surg* 2007; 45 (2): 289-96; discussion 96 – 7.
14. Grufman H, Schiopu A, Edsfieldt A, et al. Evidence for altered inflammatory and repair responses in symptomatic carotid plaques from elderly patients. *Atherosclerosis* 2014; 237 (1): 177 – 82.
15. Howard DP, van Lammeren GW, Rothwell PM, et al. Symptomatic carotid atherosclerotic disease: correlations between plaque composition and ipsilateral stroke risk. *Stroke* 2015; 46 (1): 182 – 9.
16. Redgrave JN, Lovett JK, Rothwell PM. Histological features of symptomatic carotid plaques in relation to age and smoking: the oxford plaque study. *Stroke* 2010; 41 (10): 2288 – 94.
17. Spagnoli LG, Mauriello A, Palmieri G, et al. Relationships between risk factors and morphological patterns of human ca-

- rotid atherosclerotic plaques. A multivariate discriminant analysis. *Atherosclerosis* 1994; 108 (1): 39–60.
18. van Lammeren GW, Reichmann BL, Moll FL, et al. Atherosclerotic plaque vulnerability as an explanation for the increased risk of stroke in elderly undergoing carotid artery stenting. *Stroke* 2011; 42 (9): 2550–5.
  19. van Oostrom O, Velema E, Schoneveld AH, et al. Age-related changes in plaque composition: a study in patients suffering from carotid artery stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14 (3): 126–34.
  20. Wendorff C, Wendorff H, Pelisek J, et al. Carotid plaque morphology is significantly associated with sex, age, and history of neurological symptoms. *Stroke* 2015; 46 (11): 3213–9.
  21. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial C. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med* 1991; 325 (7): 445–53.
  22. Pelisek J, Well G, Reeps C, et al. Neovascularization and angiogenic factors in advanced human carotid artery stenosis. *Circ J* 2012; 76 (5): 1274–82.
  23. Redgrave JN, Gallagher P, Lovett JK, et al. Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: the oxford plaque study. *Stroke* 2008; 39 (6): 1722–9.
  24. van Lammeren GW, den Hartog AG, Pasterkamp G, et al. Asymptomatic carotid artery stenosis: identification of subgroups with different underlying plaque characteristics. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012; 43 (6): 632–6.
  25. Stoberock K, Debus ES, Gülsen A, et al. Gender differences in patients with carotid stenosis. *Vasa* 2016; 45 (1): 11–16.
  26. Buratti L, Balestrini S, Avitabile E, et al. Sex-associated differences in the modulation of vascular risk in patients with asymptomatic carotid stenosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35 (4): 684–8.
  27. Ota H, Reeves MJ, Zhu DC, et al. Sex differences of high-risk carotid atherosclerotic plaque with less than 50% stenosis in asymptomatic patients: an in vivo 3T MRI study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013; 34 (5): 1049–55, S1.
- Submitted: 26.02.2016  
 Accepted after revision: 19.04.2016  
 There are no conflicts of interest existing.
- Correspondence address**  
 Jaroslav Pelisek, PhD  
 Department of Vascular and Endovascular Surgery  
 Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München  
 Ismaninger Str. 22  
 81675 Munich  
 Germany  
 j.pelisek@tum.de