

Aus dem
CharitéCentrum 15 für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurochirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy

Habilitationsschrift

Untersuchungen zum zerebralen Kollateralgefäßwachstum und intraoperativen Laser Speckle Imaging

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurochirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Nils Nicholas Hecht
Geboren in Rock Island, USA

Eingereicht: **Februar 2016**

Dekan: **Prof. Dr. med. Axel R. Pries**

1. Gutachter: **Prof. Dr. med. Alexander Brawanski**

2. Gutachter: **Prof. Dr. med. Claudius Thomé**

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Einleitung	4
Die chronisch hämodynamische Perfusionsminderung des Gehirns	4
Direkte Revaskularisierung (STA-MCA Bypass)	5
Indirekte Revaskularisierung (Encephalomyosynangiome)	6
Therapeutische Stimulation des zerebralen Kollateralgefäßwachstums	7
Laser Speckle Imaging zur zerebralen Blutflussmessung	10
Zielsetzung	12
Eigene Arbeiten	13
Teil A: Therapeutisches Kollateralgefäßwachstum	13
Einfluss des Alters auf die zerebrovaskuläre Reservekapazität und das spontane Kollateralgefäßwachstum bei chronisch zerebraler Ischämie	13
Endotheliale Vorläuferzellen zur therapeutischen Stimulation des Kollateralgefäßwachstums	26
Modelletablierung zur myoblasten-vermittelten Gentherapie und experimentellen Encephalomyosynangiome	37
Myoblasten-vermittelte VEGF Bereitstellung zur therapeutischen Stimulation des Kollateralgefäßwachstums bei experimenteller Encephalomyosynangiome	45
Teil B: Intraoperatives Laser Speckle Imaging	56
Intraoperatives Laser Speckle Imaging zur zerebralen Perfusionsüberwachung bei neurochirurgischen Operationen	56
Intraoperatives Laser Speckle Imaging zur Vorhersage von infarziertem Hirngewebe bei malignem Media Infarkt	65
Diskussion	77
Aspekte des zerebralen Kollateralgefäßwachstums bei der C57BL/6 Maus	77
Stellenwert der zerebrovaskulären Reservekapazität und Ruheperfusion	78
Altersabhängige Effekte bei chronisch zerebraler Ischämie	79
Endotheliale Vorläuferzellen zur Stimulation des Kollateralgefäßwachstums	80
Myoblasten-vermittelte Gentherapie bei Encephalomyosynangiome	81
Intraoperatives Laser Speckle Imaging am menschlichen Gehirn	83
Zusammenfassung	85
Literatur	87
Danksagung	95
Eidesstattliche Erklärung	96

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
C57BL/6	C57 Black 6
CBF	Cerebral Blood Flow
COSS	Carotid Occlusion Surgery Study
CT	Computertomographie
CVRC	Cerebrovascular Reserve Capacity
DWI	Diffusion Weighted Imaging
ECA	External Carotid Artery
EC-IC	Extracranial to Intracranial
EMS	Encephalomyosynangiose
EPC	Endothelial Progenitor Cell
e-EPC	embryonal-Endothelial Progenitor Cell
e-EPDC	embryonal-Endothelial Progenitor Derived Cell
EV	Empty Vector
ICA	Internal Carotid Artery
ICA-O	Internal Carotid Artery-Occlusion
iLSI	intraoperative Laser Speckle Imaging
LDF	Laser Doppler Flowmetry
LSI	Laser Speckle Imaging
M.	Musculus
MCA	Middle Cerebral Artery
MCA-O	Middle Cerebral Artery-Occlusion
MP-RAGE	Magnetization-Prepared Rapid Gradient Echo
MRT	Magnetresonanztomographie
PaCO ₂	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PCA	Posterior Cerebral Artery
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor-BB
PET	Positron Emission Tomography
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
STA-MCA	Superficial Temporal Artery to Middle Cerebral Artery
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
3-VO	3-Vessel Occlusion

Einleitung

Nach einer Schätzung der Weltgesundheitsorganisation belegt der Schlaganfall den 2. Platz der weltweiten Todesursachen und gilt als einer der führenden Gründe einer Behinderung und Pflegebedürftigkeit mit außerordentlicher sozialer und medizinisch-ökonomischer Belastung.¹ Während 15-20% aller Schlaganfälle durch eine intrazerebrale oder subarachnoidale Blutung verursacht werden, bleibt die Hauptursache eines Schlaganfalls in 80-85% eine akute zerebrale Ischämie. Die Kosten zur Versorgung von Patienten mit erstmaligem ischämischen Schlaganfall wurden 2006 in Deutschland auf etwa 108 Milliarde Euro für die kommenden 20 Jahren hochgerechnet.² Als vornehmliche Erkrankung des höheren Alters^{3,4} stellt uns die Vorbeugung des ischämischen Schlaganfalls aufgrund des demographischen Wandels in den westlichen Industrienationen somit vor eine der bedeutendsten medizinischen Herausforderungen.

Die chronisch hämodynamische Perfusionsminderung des Gehirns

Führende Ursache eines ischämischen Schlaganfalls ist in 90% der Fälle ein akutes, thrombembolisches Ereignis, entweder auf dem Boden einer Mikroangiopathie mit kleineren, lakunären Infarkten oder als Folge einer Makroangiopathie mit typischerweise arterio-arteriellen oder kardialen Embolien und größeren Territorialinfarkten. In den übrigen 10% der Fälle bewirken chronische, hämodynamische Perfusionsminderungen in den distalen Grenzzonen der intrakraniellen Hauptgefäßabschnitte die Entstehung eines ischämischen Schlaganfalls.⁵ Pathophysiologisch ist hierbei die zerebrale Perfusion aufgrund einer Stenose oder eines Verschlusses der proximalen, extra- oder intrakraniellen Arterien dauerhaft soweit herabgesetzt, dass der zerebrale Blutfluss (CBF) unter Ruhebedingungen gerade noch ausreicht, jedoch bei Belastung auf Werte unterhalb einer kritischen Perfusionsschwelle absinkt mit der Konsequenz eines vorübergehenden oder permanenten, ischämisch-neurologischen Defizits. Vergleichbare Krankheitsbilder sind die periphere arterielle Verschlusskrankheit oder die koronare Herzerkrankung. Wichtigster Risikofaktor eines hämodynamischen Schlaganfalls ist eine

Eerschöpfung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) auf dem Boden einer unzureichenden Kollateralisierung. Die Hauptursache bildet der symptomatische Verschluss der A. carotis interna (ICA) mit einem jährlichen Schlaganfallrisiko von 6-10%, welches bei Patienten mit vollständig erschöpfter CVRC bis zu 30% pro Jahr betragen kann.^{6,7} Die CVRC quantifiziert dabei die maximal mögliche CBF Steigerung als Antwort auf eine chronische Minderversorgung oder einen stimulierenden Reiz und dient somit als wesentlicher klinischer Parameter, um das Risiko eines hämodynamischen Schlaganfalls in Abhängigkeit des zerebralen Kollateralblutflusses abzuschätzen. Hier nehmen die A. communicans anterior und posterior als präformierte Kollateralgefäße im Bereich der basalen Hirngefäßabschnitte sowie die leptomeningealen Anastomosen zwischen den Endstromgebieten der A. cerebri anterior, media (MCA) und posterior (PCA) im Bereich der pialen Gehirnoberfläche eine Schlüsselstellung ein.⁸⁻¹¹

Direkte Revaskularisierung (STA-MCA Bypass)

Zur Vorbeugung einer zerebralen Ischämie bei hämodynamisch relevanter Stenose oder Okklusion der ICA oder proximalen MCA besteht aus neurochirurgischer Sicht die Möglichkeit einer operativen Revaskularisierung zur Verbesserung des extra- intrakraniellen (EC-IC) Kollateralblutflusses. Die klassische Operation besteht aus einer direkten mikrochirurgischen Anlage eines EC-IC Bypass zwischen einem Ast der Arteria temporalis superficialis (STA) und einem kortikalen M4 Ast der MCA (STA-MCA Bypass) und wurde erstmals im Jahre 1968 von Professor Yasargil durchgeführt.¹² In den 70er und 80er Jahren wurde dann in einer prospektiv randomisierten Multicenterstudie untersucht, ob die Anlage eines STA-MCA Bypass verglichen zur besten nicht-operativen Therapie einen überlegenen Schutz vor einer zerebralen Ischämie liefern könnte.¹³ Die Ergebnisse dieser EC-IC Bypass Studie waren jedoch ernüchternd, denn die Anlage eines STA-MCA Bypass ergab bei Patienten, die innerhalb der letzten 3 Monate einen ischämischen Schlaganfall auf dem Boden eines Verschlusses der ICA erlitten hatten, keinen Vorteil gegenüber einer nicht-operativen Therapie. Kritikpunkte der EC-IC Bypass Studie waren neben dem Einschluss von Patienten mit ätiologisch unklaren oder bereits

demarkierten Infarkten ohne neurologische Erholung insbesondere die fehlende Identifikation von Patienten mit transitorischer zerebraler Ischämie auf dem Boden einer klar gesicherten, hämodynamischen Perfusionseinschränkung. Im Laufe der nächsten Jahrzehnte konnte durch eine strikte Selektionierung von Patienten mit

- a) angiographisch hochgradiger Stenose oder Okklusion im Bereich der ICA oder MCA und unzureichender Kollateralisierung,
- b) rezidivierenden transitorisch ischämischen Attacken, kernspintomographischem Ausschluss von Infarktarealen und guter neurologischer Erholung sowie
- c) aufgehobener CVRC auf dem Boden einer hämodynamischen Perfusionseinschränkung, die durch eine funktionelle CBF Diagnostik wie Xenon-CT, SPECT oder PET mit und ohne Acetazolamid Stimulation gesichert wurde

gezeigt werden, dass ein STA-MCA Bypass in der Tat zu einer funktionellen hämodynamischen Erholung führt.^{14,15} Allerdings hat die aktuellste, prospektiv randomisierte STA-MCA Bypass Studie bei symptomatischem Verschluss der ICA (COSS) selbst unter Berücksichtigung dieser Auswahlkriterien gezeigt, dass die Anlage eines STA-MCA Bypass in bis zu 15% der Fälle mit einer perioperativen, ischämischen Komplikation verbunden sein kann.^{16,17} Die routinemäßige STA-MCA Bypass Anlage zur Behandlung einer chronisch zerebralen Ischämie wird daher nach wie vor kontrovers diskutiert^{18,19} und es besteht ein dringender Bedarf zur Entwicklung von sicheren therapeutischen Strategien zur effektiven Schlaganfallprävention bei betroffenen Patienten.

Indirekte Revaskularisierung (Encephalomyosynangiose)

Eine chirurgische Behandlungsalternative zu dem STA-MCA Bypass ist die indirekte Revaskularisierung, bei der die mikrochirurgische – und möglicherweise risikobehaftete – Anlage einer direkten Gefäßanastomose nicht erforderlich ist. Eine bewährte Form der indirekten Revaskularisierung stellt die sogenannte Encephalomyosynangiose (EMS) dar, wo nach Durchführung einer Kraniotomie und Eröffnung der Dura mater der über die A. carotis externa (ECA) perfundierte M. temporalis gestielt auf die Gehirnoberfläche transponiert wird.²⁰

Im Laufe der nächsten Monate entwickelt sich dann ein spontanes, extra- intrakranielles Kollateralgefäßnetzwerk zwischen dem Muskel und dem Gehirn mit Steigerung des extra- intrakraniellen Kollateralblutflusses im Zuge der fortschreitenden Kollateralisierung.²¹⁻²⁴ Der klare Vorteil einer EMS gegenüber einem direkten Bypass liegt in der technisch einfacheren Durchführbarkeit und dem geringeren, perioperativen Schlaganfallrisiko. Darüber hinaus kann eine EMS auch in Situationen angewendet werden, wo aufgrund insuffizienter Spender- oder Empfängergefäße keine direkte Bypass Anlage möglich ist. Ein entscheidender Nachteil der EMS bleibt, dass die Behandlung offenbar nur bei einer Untergruppe von Patienten mit Moyamoya Vaskulopathie effektiv zu sein scheint und nicht bei dem Großteil von Patienten mit chronisch zerebraler Ischämie auf dem Boden einer arteriosklerotischen Grunderkrankung.²⁵ Ein zweiter Nachteil ist die Latenz des Behandlungserfolges und die geringe hämodynamische Wirksamkeit einer EMS, da die Verbesserung des extra- intrakraniellen Kollateralblutflusses nicht unmittelbar, sondern schrittweise im Zuge einer unbeeinflussbaren Kollateralisierung eintritt.²⁶

Therapeutische Stimulation des zerebralen Kollateralgefäßwachstums

Das zerebrovaskuläre Gefäßsystem unterliegt einer kontinuierlichen Plastizität, um unter physiologischen und pathologischen Bedingungen eine ausreichende Gewebeoxygenierung sicherzustellen. Demgegenüber sind Wachstum und Neubildung zerebraler Kollateralgefäße im chronisch minderperfundierten Gehirn nur unzureichend verstanden. Die Arteriogenese beschreibt den molekularen und zellulären Prozess, der das Auswachsen von Kollateralgefäßen steuert und durch eine Erhöhung der arterio-arteriolären Querschnittsfläche letztlich in einer Verbesserung der Gewebepfusion resultiert.²⁷ Auslösender Reiz für die endotheliale Aktivierung der Arteriogenese sind Schub- und Scherkräfte innerhalb präformierter Kollateralgefäße als Folge einer Strömungsänderung auf dem Boden einer proximalen Hauptgefäßstenose. Im Gegensatz zu der embryonalen Vaskulogenese und postnatalen Angiogenese ist die Arteriogenese somit der primäre Mechanismus, durch den eine chronische hämodynamische Perfusionsminderung effektiv kompensiert werden kann. Auch im Gehirn

stellt dieses spontane Auswachsen der präformierten Kollateralgefäße – insbesondere im Bereich der basalen Hirngefäßabschnitte und der leptomeningealen Anastomosen – den effektivsten Mechanismus dar, um einer chronisch zerebralen Ischämie entgegenzuwirken. Allerdings ist die individuelle Ausbildung der Kollateralkreisläufe hoch variabel und das mögliche Ausmaß eines kompensatorischen Kollateralgefäßwachstums naturgemäß begrenzt. Vor diesem Hintergrund beschreibt die therapeutische zerebrale Arteriogenese ein experimentelles Behandlungskonzept zur Stimulation des Kollateralgefäßwachstums bei unzureichender Kollateralisierung. Die ursprüngliche Strategie bestand aus der systemischen Bereitstellung eines reinen Wachstumsfaktorproteins, was erstmals anhand eines experimentellen Modells zur chronisch zerebralen Ischämie bei der Ratte durch Applikation von Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor untersucht wurde.²⁸ Nachteile und Risiken einer systemischen Wachstumsfaktorbereitstellung sind eine unkontrollierbare Immunreaktion, eine geringe Wachstumsfaktorkonzentration am Zielorgan, eine begrenzte Halbwertszeit und eine schlechte Steuerbarkeit, was mitunter für das Scheitern dieses Versuchsansatzes in klinischen Studien zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit verantwortlich gemacht wurde.²⁹⁻³¹

Eine neue Behandlungsstrategie liefert der zelltherapeutische Ansatz einer autologen Transplantation von endothelialen Vorläuferzellen (EPC). EPCs sind multipotente, pro-angiogene Zellen aus dem peripheren Blut oder Knochenmark, die aufgrund ihrer promigratorischen Aktivität und Plastizität ein hohes Potential zur aktiven Inkorporierung in ein proliferierendes Gefäßsystem haben.^{32,33} Der grundsätzliche Vorteil einer autologen Zelltherapie durch EPCs basiert auf der Überlegung, dass immuno-privilegierte EPCs erstens ohne gentechnische Manipulation individuell gewonnen und expandiert werden können und zweitens, durch Migration und Differenzierung unmittelbar an der Neubildung von Blutgefäßen beteiligt sind, ohne dabei eine Immunreaktion auszulösen. Der Vorteil bei einer späteren klinischen Umsetzung wären daher das niedrige immunologische Behandlungsrisiko und die Möglichkeit, insbesondere bei Patienten mit hohem internistischen und anästhesiologischen Risikoprofil eine operative Therapie zu vermeiden.

Neben der therapeutischen Stimulation von präformierten intrakraniellen Kollateralgefäßen durch eine zell-basierte EPC Therapie besteht eine weitere unerforschte Behandlungsstrategie aus einer therapeutischen Stimulation des extra- intrakraniellen Kollateralgefäßwachstums zur Erhöhung des Nettoblutflusses im Bereich eines beeinträchtigten vaskulären Territoriums. Das Beispiel einer EMS mit unbeständiger Behandlungseffektivität liefert dabei ein ideales experimentelles Modell mit der Idee, das lokale extra- intrakranielle Kollateralgefäßwachstum im einer EMS durch eine gentherapeutische Wachstumsfaktorbereitstellung langwirksam und fokussiert zu stimulieren und die unbeständigen klinischen Ergebnisse einer indirekten EMS Revaskularisierung zu verbessern. Allerdings haben sich gentherapeutische Behandlungen, bei denen angiogene Nukleinsäuren meist durch virale Transfektion von somatischen Zellen (viraler Vektor) oder als nakttes Plasmid (Plasmidvektor) direkt in das Zielorgan der Neovaskularisation implantiert werden aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz, der Art des Vektors und der schlechten Dosisfindung bislang nicht bewährt.^{34,35} Ein vielversprechendes Konzept liefert hier der kombinierte zell- und gentherapeutische Ansatz einer myoblasten-vermittelten Gentherapie zur lokalen Bereitstellung des mitogenen Wachstumsfaktorproteins Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) im Bereich der Skelettmuskulatur.^{36,37} Auf das Modell einer EMS übertragen, wäre der erste Vorteil in der Verwendung von retroviral-transfizierten Myoblasten als Vektor eine direkte Fusionsmöglichkeit der Myoblasten mit den Wirtsmuskelfasern des M. temporalis, was die lokalisierte VEGF-Bereitstellung in der Zielregion der Neovaskularisation und die stabile Wirtsintegration mit langfristiger Genproduktexpression sicherstellen würde. Der zweite wesentliche Vorteil steht mit den biologischen Eigenschaften von VEGF in Zusammenhang: Obwohl die Hauptrolle von VEGF zur physiologischen und pathologischen Regulation der Angiogenese grundsätzlich akzeptiert ist, so wurde der regulierende Einfluss von VEGF auf das Wachstum und die Ausreifung von Kollateralgefäßen lange Zeit kontrovers diskutiert. Erst seit kurzem mehren sich die Hinweise, dass VEGF durch eine Arterialisierung von kapillären Gefäßen und eine Proliferation von bereits präformierten, arterio-arteriolären Gefäßabschnitten auch bedeutenden Einfluss auf die Regulation des Kollateralgefäßwachstums nimmt.^{38,39} Allerdings haben experimentelle Vorarbeiten in verschiedensten Tiermodellen

gezeigt, dass eine unkontrollierte VEGF Applikation auch das Risiko einer erhöhten vaskulären Permeabilität, einer aberranten Neovaskularisation oder einer Hämangiomindektion bergen kann.^{40,41} Die lokale VEGF Bereitstellung durch retroviral-transfizierte Myoblasten liefert hier den Vorteil, dass durch die Selektion einer monoklonalen Myoblastenpopulation mit definierter VEGF Produktion eine konstante VEGF Konzentration im lokalen Mikromilieu des Zielorgans sichergestellt werden kann, was als Schlüsselfaktor für eine erfolgreiche VEGF-induzierte Neovaskularisation gilt.^{42,43}

Laser Speckle Imaging zur zerebralen Blutflussmessung

Verglichen zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit oder der koronaren Herzkrankheit hat die experimentelle und klinische Forschung zur chronisch zerebralen Ischämie bisher wenig Aufmerksamkeit erhalten. Ein wesentlicher Grund hierfür ist der Mangel eines robusten Mausmodells zur Simulation einer chronisch zerebralen Ischämie durch permanente proximale Hauptgefäßokklusion, damit die molekularen Mechanismen der zerebralen Arteriogenese perspektivisch anhand transgener Mausstämmen untersucht werden können. Die Schwierigkeit bei der Modelletablierung liegt neben der heterogenen, präformierten Kollateralisierung von Versuchsmäusen⁴⁴⁻⁴⁶ an den physikalischen Eigenschaften der Laser Doppler Flowmetry (LDF), die vor über 20 Jahren als Standardverfahren zur experimentellen Perfusionsmessung in der Schlaganfallforschung eingeführt wurde,⁴⁷ denn LDF bleibt durch eine niedrige räumliche Auflösung methodisch limitiert. Im Rahmen der Modelletablierung einer chronisch zerebralen Ischämie erlaubt LDF aufgrund einer hohen inter- und intraindividuellen Messvariabilität somit keine robuste CVRC Bestimmung zur repetitiven Quantifizierung der hämodynamischen Perfusionseinschränkung an wiederholten Untersuchungszeitpunkten.

Eine der bedeutendsten Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der nicht-invasiven optischen Bildgebungsverfahren ist Laser Speckle Imaging (LSI). Analog zu LDF ermöglicht auch LSI eine nicht-invasive und kontinuierliche Echtzeitmessung der kortikalen Perfusion durch die intakte Kalotte der Maus, allerdings mit dem entscheidenden Vorteil, dass LSI die kortikale Perfusion in einer farbcodierten Echtzeitmatrix mit hoher räumlicher Auflösung über der

gesamten Gehirnoberfläche simultan visualisieren kann, wodurch die hämodynamische Situation innerhalb eines vaskulären Versorgungsgebietes wesentlich präziser abgebildet wird.⁴⁸ Zur Modelletablierung einer chronisch zerebralen Ischämie bei der Maus sollte LSI daher eine repräsentative und robuste Messung der CVRC und Ruheperfusion ermöglichen.

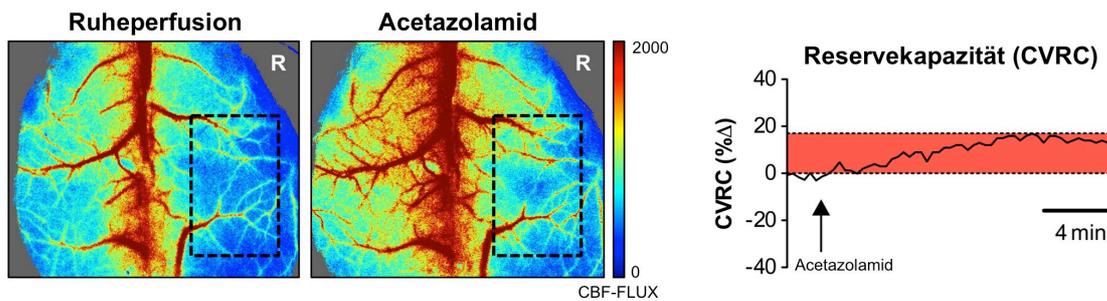


Abbildung: In vivo Laser Speckle Imaging durch die intakte Kalotte einer C57BL/6 Maus an Tag 7 nach rechtsseitiger Okklusion der A. carotis interna zur Simulation einer ipsilateralen chronisch zerebralen Ischämie. Die farbcodierten LSI Bildausschnitte visualisieren die kortikale Perfusion in der LSI-spezifischen Maßeinheit CBF-Flux zum Zeitpunkt der Ruheperfusionsmessung (links) und 15 Minuten nach Applikation von Acetazolamid (rechts) zur Bestimmung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC). Der eingeschränkte Perfusionsanstieg innerhalb der interessierenden Region ist graphisch als die prozentuale CBF Änderung im Zeitverlauf der Acetazolamid-Stimulation dargestellt.

Neben dem Einsatz in der experimentellen Schlaganfallforschung stellt LSI auch eine attraktive Technologie für den klinischen Anwendungsbereich dar, denn der zentrale Grundsatz bei neurochirurgischen Operationen ist die Erhaltung einer suffizienten Gewebeoxygenierung durch eine Aufrechterhaltung des CBF. Vor diesem Hintergrund hat die intraoperative CBF Messung zur frühestmöglichen Identifikation von Perfusionsstörungen höchste Relevanz, denn das klinische Ergebnis einer zerebralen Ischämie hängt entscheidend von der zeitnahen Wiederherstellung der Blutversorgung ab.⁴⁹ Obwohl ein breites Spektrum an intraoperativen Verfahren zur angiographischen Visualisierung des Blutflusses oder Messung der zerebralen Perfusion verfügbar ist, so ermöglicht keine dieser Technologien eine direkte und nicht-invasive, kontinuierliche Echtzeitmessung der kortikalen Perfusion in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung.⁵⁰⁻⁵⁴ Intraoperatives LSI (iLSI) könnte hier als mobiles und kosteneffizientes Verfahren eine sichere, einfache und robuste Messung der kortikalen Perfusion bei neurochirurgischen Operationen am menschlichen Gehirn ermöglichen. Die

grundsätzliche Anwendbarkeit, Sicherheit und Handhabung von iLSI haben wir bereits in einer ersten klinischen Arbeit beschrieben.⁵⁵ Im nächsten Schritt könnte daher die Verlässlichkeit, Sensitivität und Dynamik von iLSI anhand einer Patientenpopulation mit charakteristischer pathophysiologischer Komponente untersucht werden, um die intraoperative Validierung und praktische Anwendung von iLSI weiter voranzutreiben.

Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, neue Strategien zur therapeutischen Stimulation des zerebralen Kollateralgefäßwachstums zu erforschen und die Laser Speckle Bildgebung als nicht-invasives Verfahren zur kontinuierlichen Echtzeitmessung der Hirndurchblutung bei neurochirurgischen Operationen am menschlichen Gehirn zu etablieren.

Im ersten experimentellen Teil der Arbeit wird mit Hilfe von LSI zunächst ein Mausmodell zur chronisch zerebralen Ischämie etabliert und das spontane Wachstum der präformierten zerebralen Kollateralgefäße in Abhängigkeit des Alters erforscht. Anschließend wird der Effekt einer zell-basierten EPC Therapie auf die präformierten Kollateralgefäße und die Wirkung einer myoblasten-vermittelten VEGF Therapie auf die extra- intrakranielle Kollateralisierung im Bereich der Muskel / Gehirn Grenzsicht einer EMS untersucht. Der zweite, klinische Teil der Arbeit beschäftigt sich anhand von Patienten mit zerebrovaskulärer Pathologie und der Indikation zu einer neurochirurgischen Operation mit der praktischen Anwendung und intraoperativen Validierung von LSI zur kortikalen Perfusionsüberwachung des menschlichen Gehirns.

Eigene Arbeiten

Teil A: Therapeutisches Kollateralgefäßwachstum

Einfluss des Alters auf die zerebrovaskuläre Reservekapazität und das spontane Kollateralgefäßwachstum bei chronisch zerebraler Ischämie

Hohes Alter ist der wesentlichste, nicht-modifizierbare Risikofaktor für das Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls.⁵⁶ Aktuelle experimentelle Ergebnisse haben gezeigt, dass hohes Alter auch entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der nativen zerebralen Kollateralisierung zu haben scheint.⁵⁷ Der Zusammenhang zwischen dem Alter, dem Ausmaß der Kollateralisierung und dem Grad einer hämodynamischen CVRC Einschränkung ist gegenwärtig jedoch nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit haben wir anhand eines experimentellen Mausmodells untersucht, inwiefern Alter und das spontane zerebrale Kollateralgefäßwachstum den Verlauf einer hämodynamischen Perfusionsstörung beeinflussen: Bei männlichen C57BL/6 Mäusen im Alter von 4-6 Wochen, 12 Wochen und 18 Monaten wurde durch eine permanente, unilaterale Fadenokklusion der rechten ICA (ICA-O) eine chronisch zerebrale Ischämie simuliert. Die hämodynamische Perfusionseinschränkung wurde mittels LSI und CVRC Bestimmung durch Acetazolamid-Stimulation unmittelbar nach ICA-O (Tag 0) sowie an den Tagen 3, 7 und 14 quantifiziert. Das Wachstum der basalen und leptomeningealen Kollateralgefäße wurde an Tag 21 nach aortaler Latex / Carbon Black Perfusion zur Darstellung der zerebrovaskulären Angioarchitektur beurteilt. Die mikrovaskuläre Gefäßdichte und der Perizytenbesatz im Kortex der betroffenen Hemisphäre, die mikrovaskuläre Arterialisierung und die proliferative Aktivität im Bereich der basalen Kollateralgefäße wurde immunhistochemisch an Tag 21 beurteilt. Mit Hilfe von funktionellen CBF Messungen durch LSI konnten wir zunächst zeigen, dass eine unilaterale ICA-O bei der C57BL/6 Maus unabhängig von der Veranlagung einer PCA (P1 Segment) Anastomose zwischen dem vorderen und hinteren Stromkreislauf zu einer stabilen zerebralen hämodynamischen Perfusionsminderung über der primär betroffenen Hemisphäre

führt. Die Auswertung der zerebralen Angioarchitektur demonstrierte dabei ein signifikantes Wachstum der basalen und leptomeningealen Kollateralgefäße mit proliferativer Aktivität und Arterialisierung der kortikalen Mikrozirkulation. In Bezug auf den Altersaspekt war bei Mäusen im Alter von 18 Monaten bereits unmittelbar nach ICA-O sowohl die Ruheperfusion als auch der CBF Anstieg nach Acetazolamid (CVRC) signifikant gegenüber jüngeren Mäusen im Alter von 4-6 Wochen und 12 Wochen reduziert. Obwohl im Laufe von 14 Tagen nach ICA-O bei allen Altersgruppen eine spontane CVRC Erholung auf ein Niveau von etwa 40% beobachtet wurde, so zeigten Mäusen im Alter von 18 Monaten neben der bereits an Tag 0 höheren CVRC Einschränkung auch ein 20% geringeres Wachstum der präformierten Kollateralgefäße und eine 27%ige Ausdünnung der leptomeningealen Anastomosen. Unsere Ergebnisse demonstrieren daher erstmals, dass neben der morphologischen Einschränkung des spontanen zerebralen Kollateralgefäßwachstums auch eine rein funktionelle CVRC Einschränkung für das erhöhte Schlaganfallrisiko bei älteren Patienten verantwortlich sein könnte.

[Hecht N, He J, Kremenetskaia I, Nieminen M, Vajkoczy P, Woitzik J. Cerebral hemodynamic reserve and vascular remodeling in C57BL/6 mice are influenced by age. Stroke. 2012 Nov;43(11):3052-62.]

<http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.653204>

Endotheliale Vorläuferzellen zur therapeutischen Stimulation des

Kollateralgefäßwachstums

Die Arteriogenese wird durch zelluläre und molekulare Mechanismen reguliert, deren Manipulation eine Induktion des zerebralen Kollateralgefäßwachstums erlauben. Im Gegensatz zur Arteriogenese beschreibt die postnatale Vaskulogenese die vollständige Neubildung eines Blutgefäßsystems durch Proliferation und Migration von zirkulierenden EPC. Eine solche EPC-anhängige Neovaskularisation konnte klinisch und experimentell bereits am Beispiel der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und der koronaren Herzerkrankung demonstriert werden.⁵⁸⁻⁶¹ Daher haben wir untersucht, inwiefern dieser zelltherapeutische Ansatz einer EPC Transplantation auf ein Modell zur chronisch zerebralen Ischämie übertragbar ist und den Einfluss von zirkulierenden, embryonalen EPCs (e-EPC) auf das spontane zerebrale Kollateralgefäßwachstum nach 3-Gefäß Okklusion (3-VO) bei der Ratte studiert: Durch unilaterale Fadenokklusion der rechten A. carotis communis und bilaterale Thermokoagulation der Arteriae vertebrales wurde bei erwachsenen, männlichen Sprague-Dawley Ratten eine chronische zerebrale Ischämie simuliert. Die Versuchstiere wurden in 3 Behandlungsgruppen randomisiert und erhielten unmittelbar nach 3-VO (Tag 0) sowie an den Tagen 7 und 14 eine systemische, intravenöse Injektion von

- 1×10^6 e-EPC,
- 1×10^6 differenzierte e-EPC-abgeleitete Endothelzellen (e-EPDC), oder
- Kochsalz Trägerlösung

Die hämodynamische Perfusionseinschränkung wurde an Tag 0, 7 und 21 mittels LDF und Acetazolamid-Stimulation quantifiziert. Strukturelle Effekte auf die Angioarchitektur der Kollateralgefäße und die Mikrozirkulation des Parenchyms wurden an Tag 21 mittels Latex / Carbon Black Perfusion, Immunhistochemie und intravital Fluoreszenz-Mikroskopie beurteilt. Wir konnten zunächst zeigen, dass eine 3-VO mit einer unmittelbaren CVRC Einschränkung verbunden war, die bei Tieren der e-EPDC- und der Kochsalz-Kontrollgruppen bis Tag 21 nach 3-VO ohne Anzeichen einer spontanen Erholung war. Im Gegensatz dazu hat eine systemische e-EPC Behandlung bis Tag 21 zu einer signifikanten hämodynamischen Erholung (CVRC: e-

EPC $16\pm 8\%$; e-EPDC $4\pm 8\%$; Kochsalz $6\pm 9\%$), einem stärkeren basalen Kollateralgefäßwachstum, einem 20%igen Zuwachs an leptomeningealen Anastomosen und einer Erhöhung der mikrovaskulären Dichte geführt. Durch intravital Fluoreszenz-Mikroskopie konnte eine Interaktion zwischen zirkulierenden e-EPCs und dem zerebralen Gefäßendothel beobachtet werden, allerdings ohne histologischen Nachweis einer e-EPC Inkorporation in das zerebrale Gefäßsystem. Bei experimenteller e-EPC Behandlung einer chronisch zerebralen Ischämie scheint daher in erster Linie ein para- oder endokriner Mechanismus für die beobachteten funktionellen und morphologischen Effekte verantwortlich zu sein.

[Hecht N*, Schneider UC*, Czabanka M, Vinci M, Hatzopoulos AK, Vajkoczy P, Woitzik J. Endothelial progenitor cells augment collateralization and hemodynamic rescue in a model of chronic cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2014 Aug;34(8):1297-305. *equal contribution.]

<http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2014.78>

Modelletablierung zur myoblasten-vermittelten Gentherapie und experimentellen Encephalomyosynangiose

Angesichts der unbeständigen klinischen Ergebnisse nach indirekter Revaskularisierung^{25,26} beschreibt die Implantation von retroviral transfizierten Myoblasten in den M. temporalis eine bislang unerforschte Idee zur therapeutischen Stimulation des extra- intrakraniellen Kollateralgefäßwachstums im Bereich der Muskel / Gehirn Grenzschiicht einer EMS. Trotz positiver Ergebnisse hinsichtlich der Anwendung von VEGF-transfizierten Myoblasten zur therapeutischen Neovaskularisation bei peripherer arterieller Ischämie ist das Verhalten dieser myogenen Stammzellen nach Implantation in den nicht-ischämischen M. temporalis einer EMS bisher nicht bekannt.^{42,43} Das Ziel der vorliegenden Arbeit war auf der Basis unseres Modells zur chronisch zerebralen Ischämie bei der C57BL/6 Maus ein Modell zur experimentellen EMS zu etablieren. Nach Implantation von retroviral transfizierten, monoklonalen Maus-Myoblasten in den M. temporalis wurde anhand der lokalen Fusionsrate und Reporterexpression (β -Galactosidase) im Bereich der Implantationsregion die grundsätzliche Umsetzbarkeit und das effektivste Implantationsverfahren zur myoblasten-vermittelten Gentherapie in Kombination mit einer EMS ermittelt. Zunächst erfolgte bei männlichen C57BL/6 Mäusen im Alter von 6-8 Wochen die mikrochirurgische Anlage einer rechtsseitigen EMS mit Implantation von 4×10^5 allogenen, retroviral transfizierten, monoklonalen Myoblasten in den M. temporalis der EMS. Zur Simulation einer chronisch zerebralen Ischämie erfolgte anschließend eine ipsilaterale ICA-O. Das effektivste Implantationsverfahren wurde anhand 3 Implantationstechniken untersucht:

- Alleinige intramuskuläre Myoblasten Injektion
- Alleinige lokale Applikation eines Myoblasten-Pellets zwischen Muskel und Gehirn
- Kombinierte Injektion und Pellet Applikation

An Tag 14 nach Implantation erfolgte eine Analyse der fusionierten Hybrid-Muskelfasern sowie der Genproduktexpression im Bereich der Implantationsstelle und der Muskel / Gehirn Grenzschiicht der EMS durch immunhistochemischen Reportergennachweis. Zunächst konnten wir zeigen, dass eine problemlose klonale Expansion der primären Myoblastenpopulation ohne Änderung der zellulären Morphologie oder des Proliferationsverhaltens gelang. Vierzehn Tage

nach Implantation zeigten alle Implantationsgruppen spontan fusionierte Hybrid-Muskelfasern mit intrazellulärer β -Galactosidase Expression als Zeichen einer stabilen Fusion. Zusätzlich zeigten alle Implantationsgruppen eine extrazelluläre β -Galactosidase Akkumulation im Bereich der transpialen Muskel / Gehirn Grenzschicht der EMS. Eine vergleichbar hohe extrazelluläre β -Galactosidase Akkumulation und intramuskuläre Fusionsrate wurde dabei nach alleiniger Injektion (59 ± 28 Zellen/Schnitt) oder kombinierter Injektion und Pellet Applikation (60 ± 23 Zellen/Schnitt) beobachtet. Die alleinige Pellet Applikation führte dagegen zu einer signifikant niedrigeren Fusionsrate (37 ± 30 Zellen/Schnitt). Somit scheint die myoblasten-vermittelte Gentherapie im Bereich der Muskel / Gehirn Grenzschicht einer experimentellen EMS grundsätzlich anwendbar zu sein, wobei die Fusion und Genproduktbereitstellung durch Anwendung einer Injektionstechnik profitiert.

[Hecht N, Peña-Tapia P, Vinci M, von Degenfeld G, Woitzik J, Vajkoczy P. Myoblast-mediated gene therapy via encephalomyosynangiosis – a novel strategy for local delivery of gene products to the brain surface. J Neurosci Methods. 2011 Sep 30;201(1):61-6.]

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.07.011>

Myoblasten-vermittelte VEGF Bereitstellung zur therapeutischen Stimulation des Kollateralgefäßwachstums bei experimenteller Encephalomyosynangiose

Im nächsten Schritt haben wir die Wirkung einer myoblasten-vermittelten VEGF Bereitstellung im Bereich der Muskel / Gehirn Grenzsicht einer EMS untersucht. In Anlehnung an unsere vorherige Modelletablierung wurde hierzu bei erwachsenen, männlichen C57BL/6 Mäusen eine rechtsseitige EMS und ipsilaterale ICA-O durchgeführt. Während der EMS Operation (Tag 0) erfolgte durch alleinige Injektion in den M. temporalis eine randomisierte Implantation von

- 4×10^5 VEGF transfizierten monoklonalen Maus-Myoblasten, oder
- 4×10^5 retroviral transfizierten monoklonalen Maus-Myoblasten mit leerem Vektor (EV)

Zur Beurteilung des Behandlungseffekts gegenüber der spontanen hämodynamischen Erholung nach ICA-O, wurde neben den VEGF- und EV- Behandlungsgruppen eine dritte Versuchsserie mit alleiniger ICA-O ohne EMS durchgeführt. Die CVRC wurde an den Tagen 0, 3, 7, 14 und 21 mittels LSI und Acetazolamid-Stimulation quantifiziert. Die extra- intrakranielle Kollateralisierung und vaskuläre Permeabilität im Bereich der Muskel / Gehirn Grenzsicht wurde konfokalmikroskopisch nach Fluorescein Isothiocyanate-Lectin und Evans Blue Perfusion durch die ipsilaterale ECA beurteilt. Die Auswertung der mikrovaskulären Gefäßdichte und Perizytenbeteiligung im Kortex unterhalb der EMS erfolgte immunfluoreszenzmikroskopisch. Zuletzt wurde an Tag 21 die protektive Wirkung der extra-intrakraniellen Neovaskularisation auf einen akuten Schlaganfall in Folge einer MCA Okklusion (MCA-O) ipsilateral zur behandelten Hemisphäre evaluiert. Wir konnten zeigen, dass eine myoblasten-vermittelte VEGF Bereitstellung in Kombination mit einer EMS verglichen zur Behandlung mit EV-Myoblasten oder einer alleinigen ICA-O ohne EMS innerhalb von 14 Tagen zu einer signifikanten hämodynamischen Verbesserung geführt hat (CVRC: VEGF $48 \pm 12\%$; EV 42 ± 9 ; ICA-O ohne EMS $37 \pm 21\%$). Parallel dazu boten die VEGF-behandelten Mäuse eine um 42% höhere Anzahl an durchgängigen extra- intrakraniellen Anastomosen im Bereich der EMS Muskel / Gehirn Grenzsicht ohne Zeichen einer erhöhten vaskulären Permeabilität. Der positive funktionelle und morphologische Behandlungseffekt unter VEGF war von einer gesteigerten Angiogenese im Kortexparenchym unterhalb der EMS

begleitet. Trotz einer leicht gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität der EMS-assoziierten Neovaskularisation nach ipsilateraler MCA-O hat die VEGF-induzierte therapeutische Kollateralisierung zu einer 25%igen Volumenreduktion eines ipsilateralen kortikalen Schlaganfalls beigetragen, was durch eine erhaltene extra- intrakranielle Restperfusion im Bereich der Muskel / Gehirn Grenzsicht der EMS bestätigt werden konnte. An einem Modell zur chronisch zerebralen Ischämie liefert die myoblasten-vermittelte VEGF Bereitstellung in Kombination mit einer EMS somit effektiven Schutz vor einem ischämischen Schlaganfall und stellt einen aussichtsreichen Ansatz zur funktionellen und morphologischen Verbesserung der unbeständigen klinischen Kollateralisierungsergebnisse nach EMS Revaskularisierung dar.

[Hecht N, Marushima A, Nieminen M, Kremenetskaia I, von Degenfeld G, Woitzik J, Vajkoczy P. Myoblast-mediated gene therapy improves functional collateralization in chronic cerebral hypoperfusion. Stroke. 2015 Jan;46(1):203-11.]

<http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.006712>

Teil B: Intraoperatives Laser Speckle Imaging

Intraoperatives Laser Speckle Imaging zur zerebralen Perfusionsüberwachung bei neurochirurgischen Operationen

Im klinischen Teil dieser Arbeit wollten wir unsere Erfahrungen mit LSI auf den neurochirurgischen Anwendungsbereich übertragen. Basierend auf einer Vorarbeit⁵⁵ haben wir daher die Verlässlichkeit, Sensitivität und Dynamik von iLSI zur routinemäßigen CBF Messung bei neurochirurgischen Operationen am menschlichen Gehirn untersucht. Die Verlässlichkeit und Sensitivität wurde durch Messungen der Ruheperfusion und der CVRC bei 23 Patienten mit chronisch zerebraler Ischämie und 8 hämodynamisch gesunden Kontrollpatienten erforscht. Die Dynamik von iLSI wurde durch Testokklusion und Flussinitiierung eines EC-IC Interponat-Bypass bei 7 Patienten mit einem Riesen-Aneurysma untersucht. In Anknüpfung an unsere vorherigen Ergebnisse konnten wir zunächst bestätigen, dass iLSI eine robuste, pseudo-quantitative Messung der relativen kortikalen Perfusion erlaubt. Durch die Untersuchung von Patienten mit chronisch zerebraler Ischämie und STA-MCA Bypass Anlage konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass ein STA-MCA Bypass zu einer signifikanten Verbesserung der Ruheperfusion im Versorgungsgebiet des kortikalen Empfängergefäßes resultiert. Als Zeichen der Verlässlichkeit und Sensitivität konnte iLSI im Rahmen einer kontinuierlichen CBF Messung mit Anhebung des PaCO₂ bei hämodynamisch gesunden und hämodynamisch beeinträchtigten Patienten eine intakte gegenüber einer signifikant eingeschränkten CVRC abgrenzen (CVRC: Kontrolle: 31±5%; Arteriosklerose 10±9%; Moyamoya 9±8%). Hinsichtlich der Dynamik zeigte iLSI ein rasches und unmittelbares Ansprechverhalten, so dass eine akute kortikale Perfusionsänderung bei Testokklusion eines EC-IC Interponat-Bypass in Echtzeit überwacht werden konnte. Da sämtliche Messungen ohne Komplikationen und mit minimalem logistischen Aufwand durchgeführt werden konnten, stellt iLSI somit eine sichere und kosteneffiziente Methode zur dynamischen Echtzeitmessung und Überwachung der kortikalen Perfusion am menschlichen Gehirn dar.

[Hecht N, Woitzik J, König S, Horn P, Vajkoczy P. Laser speckle imaging allows real-time intraoperative blood flow assessment during neurosurgical procedures. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013 Jul;33(7):1000-7.]

<http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2013.42>

Intraoperatives Laser Speckle Imaging zur Vorhersage von infarziertem

Hirngewebe bei malignem Media Infarkt

Ein Nachteil von LSI bleibt, dass die Methode trotz ihrer Robustheit unter standardisierten Bedingungen lediglich eine relative Messung der kortikalen Perfusion in der LSI-spezifischen Maßeinheit CBF-Flux erlaubt. Um die intraoperative Validierung von LSI voranzutreiben, war das nächste Ziel normalisierte, iLSI-spezifische Perfusionsschwellen zur Identifikation von infarziertem und nicht-infarziertem Hirngewebe zu bestimmen. Hierfür wurde bei 22 Patienten mit malignem Media Infarkt und der Indikation zur dekompressiven Hemikraniektomie^{62,63} eine iLSI Perfusionsschwellenmessung der betroffenen Hemisphäre durchgeführt. Das tatsächliche morphologische Infarktausmaß wurde anhand einer frühen postoperativen Kernspintomographie (MRT) mit 3-dimensionaler Rekonstruktion der Infarktausdehnung (DWI) und der Gehirnoberfläche (MP-RAGE) auf die Laser Speckle Perfusionsschwellenkarte übertragen. Basierend auf der Häufigkeitsverteilung der iLSI-spezifischen Perfusionswerte innerhalb der infarzierten und nicht-infarzierten Areale wurde anhand einer Kontingenztafel für normalisierte Perfusionswerte zwischen 0% und 160% (bezogen auf die als 100%-definierte Perfusion im nicht-infarzierten Areal) in 5%-Schritten der jeweilige positive und negative prädiktive Wert für die Vorhersage von infarziertem Hirngewebe errechnet. Anschließend wurden die prädiktiven Werte in einer Wahrscheinlichkeitskurve aufgetragen, so dass die iLSI-spezifischen Perfusionsschwellen zur Vorhersage und dem Ausschluss von infarziertem Hirngewebe bei einer Wahrscheinlichkeit von 0.95 abgeleitet werden konnten. Es gelang zu zeigen, dass iLSI bei normalisierten Perfusionswerten unter 40% eine zu 95% verlässliche Vorhersage hinsichtlich eines späteren Infarkts treffen konnte. Umgekehrt erlaubte iLSI bei Perfusionswerten über 110% den zuverlässigen Ausschluss eines kortikalen Infarkts. Die anteilmäßige Verteilung der normalisierten Perfusionswerte bezogen auf diese Schwellenwerte ergab, dass insgesamt 73% der visualisierten Kortexoberfläche aller Patienten mit 95%iger Verlässlichkeit bereits intraoperativ durch iLSI kategorisiert werden konnte. Intraoperatives LSI scheint somit kritische Perfusionstörungen bereits während eines Operationsverlaufs zuverlässig und pseudoquantitativ identifizieren zu können.

[**Hecht** N, Müller M-M, Sandow N, Pinczolics A, Vajkoczy P, Woitzik J. Infarct prediction by intraoperative laser speckle imaging in patients with malignant hemispheric stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* Epub 2015 Oct 23. pii: 0271678X15612487.]

<http://dx.doi.org/10.1177/0271678X15612487>

Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat sich mit Gesichtspunkten des zerebralen Kollateralgefäßwachstums und der nicht-invasiven Überwachung der Hirndurchblutung durch iLSI beschäftigt. Im experimentellen Teil gelang mit Hilfe von LSI und einem Modell zur chronisch zerebralen Ischämie bei der C57BL/6 Maus, den negativen Einfluss des Alters auf die zerebrale Hämodynamik und die Veranlagung und das Wachstum der präformierten Kollateralgefäße zu demonstrieren. In Bezug auf die therapeutische Stimulation und Neubildung von zerebralen Kollateralgefäßen wurde gezeigt, dass sowohl eine systemische, zell-basierte e-EPC Therapie als auch eine lokale, myoblasten-vermittelte VEGF Bereitstellung erfolgreich im präklinischen Versuch eingesetzt werden kann. Im klinischen Teil der Arbeit wurde anhand von physiologischen und pathologischen Testergebnissen die intraoperative Einsetzbarkeit von iLSI zur direkten CBF Messung und Perfusionsüberwachung bei neurochirurgischen Operationen demonstriert. Anschließend wurden pseudo-quantitative, iLSI-spezifische Perfusionsschwellen ermittelt, um eine zuverlässige Vorhersage von ischämischen Perfusionsstörungen am menschlichen Gehirn zu ermöglichen.

Aspekte des zerebralen Kollateralgefäßwachstums bei der C57BL/6 Maus

Das Ergebnis eines akuten, distal der ICA gelegenen Schlaganfalls bei der Maus wird durch die Kollateralisierung zwischen dem vorderen und hinteren Stromkreislauf durch das variabel angelegte P1 Segment der PCA beeinflusst.^{45,46} In unserem hier vorgestellten Modell konnten wir einerseits diese variable Veranlagung des P1 Segments bestätigen, andererseits jedoch einen Einfluss des P1 Segments auf die kortikale Ruheperfusion des vorderen Stromkreislaufes nach permanenter ICA-O ausschließen. Auch im Vergleich zum etablierten Modell der chronisch zerebralen Ischämie bei der Ratte⁶⁴ führte die permanente ICA-O bei der C57BL/6 Maus nicht zu einem primären Wachstum des P1 Segments, sondern der A. communicans anterior, was eine alternative Umleitung des primären basalen Kollateralblutflusses über den vorderen anstelle den

hinteren Stromkreislauf andeutet. Neben den basalen Kollateralgefäßen tragen leptomeningeale Anastomosen als arterioläre Widerstandsgefäße maßgeblich zu der Regulation des Kollateralblutflusses bei.^{10,11} Bei der C57BL/6 Maus konnten wir in einer Vorarbeit erstmals zeigen, dass ein präkonditionierender, hypoxischer Stimulus oberhalb der Schwelle zur Ischämie mit einem spontanen Wachstum dieser leptomeningealen Kollateralgefäße verbunden ist.⁶⁵ Bei unserem aktuellen Modell zur chronisch zerebralen Ischämie, welches pathophysiologisch mit einer hypoxischen Präkonditionierung vergleichbar ist, führte eine permanente ICA-O ebenfalls zu einem spontanen Wachstum der leptomeningealen Anastomosen, was den Stellenwert dieser Kollateralgefäße zum Schutz gegen einen akuten Schlaganfall unterstreicht. Daneben konnte erstmals an einem Modell zur chronisch zerebralen Ischämie auch eine Aktivierung der Angiogenese mit Zunahme der mikrovaskulären Arterialisierung im Bereich des Kortexparenchyms nachgewiesen werden. Die resultierende Erhöhung der arterio-arteriolären Gesamtquerschnittsfläche auf Ebene dieser präkapillären Widerstandsgefäße und der leptomeningealen Anastomosen liefert neben dem Wachstum der basalen Kollateralgefäße die funktionelle Grundlage für die spontane CVRC Erholung nach unilateraler ICA-O, da eine reaktive Vasodilatation der zerebralen Widerstandsgefäße als fundamentaler Rettungsmechanismus gilt, um einem schädigenden Effekt nach proximaler Gefäßokklusion vorzubeugen.

Stellenwert der zerebrovaskulären Reservekapazität und Ruheperfusion

Die chronisch hämodynamische Perfusionseinschränkung des Gehirns ist durch eine allenfalls milde Reduktion der zerebralen Ruheperfusion und eine aufgehobene CVRC charakterisiert.^{6,7} Bisherige Versuche einer erfolgreichen Modelletablierung zur chronisch zerebralen Ischämie bei der Maus haben eine routinemäßige CVRC Quantifizierung sowie die Simulation einer hämodynamischen Perfusionsminderung durch eine ICA-O jedoch nicht berücksichtigt, was die grundsätzliche Charakterisierung der experimentell simulierten Perfusionseinschränkung sowie die Erforschung des Kollateralgefäßwachstums am Modell einer EMS limitiert.⁶⁶ In der vorliegenden Arbeit gelang mit Hilfe von LSI nun erstmals der Nachweis, dass eine unilaterale,

permanente ICA-O bei der C57BL/6 Maus zu einer stabilen, ipsilateralen CVRC Einschränkung mit spontaner Erholung führt, wobei im Gegensatz zu einer Vorarbeit mit Induktion einer Perfusionsminderung durch unilaterale A. carotis communis Okklusion und LDF Messung keine Änderung der kortikalen Ruheperfusion festgestellt werden konnte.⁶⁶ Tatsächlich könnte diese Beobachtung auf die unterschiedlichen Gefäßokklusionsmodelle zurückzuführen sein, da eine extra- intrakranielle Kollateralisierung über die ECA und A. ophthalmica bei ICA-O nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Zum anderen könnte die unveränderte Ruheperfusion nach ICA-O auch durch einen methodischen Verwässerungseffekt von LSI erklärt werden, da LSI aufgrund seiner hohen räumlichen Auflösung eine gemittelte Perfusionsmessung innerhalb einer größeren, interessierenden Region erlaubt.

Altersabhängige Effekte bei chronisch zerebraler Ischämie

Der Schweregrad einer Durchblutungsstörung nach Verschluss eines Hauptgefäßes hängt maßgeblich vom Ausbildungsgrad der Kollateralgefäßsysteme zum Zeitpunkt des Verschlusses ab. Insbesondere hohes Alter ist kann mit einer Ausdünnung der zerebralen Kollateralgefäße vergesellschaftet und gilt als einer der wichtigsten, nicht-modifizierbaren Risikofaktoren eines hämodynamischen, ischämischen Schlaganfalls.^{3,4,8,9,56} In der vorliegenden Arbeit konnte anhand eines experimentellen Modells zur chronisch zerebralen Ischämie bei der C57BL/6 Maus erstmals gezeigt werden, dass hohes Alter nicht nur zu einer spontanen Ausdünnung der leptomeningealen Anastomosen führt,⁵⁷ sondern auch zu einem geringeren Wachstum der basalen und leptomeningealen Kollateralgefäße. Eine Erklärung könnte die altersabhängige Herunterregulation der Scherkraft-induzierten Stickstoffmonoxid-Synthase, des Hypoxia-inducible factor-1 und VEGF als physiologische Regulations- und Erhaltungs-faktoren von Kollateralgefäßen sein.^{38,67-69} Zusätzlich gelang es erstmals, einen direkten Zusammenhang zwischen altersabhängigen, morphologischen Effekten und dem hämodynamischen Ausmaß einer CVRC Einschränkung herzustellen, wobei die bereits unmittelbar nach ICA-O niedrigere CVRC bei alten Tieren für eine zusätzliche, funktionelle Störung der zerebrovaskulären Reaktivität spricht, da zu diesem Zeitpunkt noch kein Einfluss eines verminderten zerebralen

Kollateralgefäßwachstums zu erwarten wäre. Mögliche Ursachen für diese funktionelle CVRC-Einschränkung sind die im Alter gesteigerte vaskuläre Unelastizität, endotheliale Dysfunktion und Apoptose sowie oxidativer Stress und eine Reduktion der Stickstoffmonoxid-Synthase-Expression.⁷⁰⁻⁷⁴

Endotheliale Vorläuferzellen zur Stimulation des Kollateralgefäßwachstums

Die adaptive Neovaskularisation im Rahmen des zerebralen Kollateralgefäßwachstums wird multifaktoriell durch Mechanismen der Angiogenese, Arteriogenese und postnatalen Vaskulogenese gesteuert. Bei diesen Mechanismen spielen EPCs eine entscheidende Rolle, da EPCs neben ihrer strukturellen Beteiligung an der Neubildung von Blutgefäßen auch eine Vielzahl von angiogenen Wachstumsfaktoren sezernieren, was im Hinblick auf unser Modell und der Notwendigkeit einer therapeutischen Neovaskularisation in entfernten Regionen außerhalb des minderperfundierten Hirngewebes vielversprechend scheint.⁷⁵⁻⁷⁸ Vor diesem Hintergrund haben wir anhand eines Xenotransplantatmodells zur chronisch zerebralen Ischämie an der Ratte das Potential von e-EPCs zur therapeutischen Stimulation des zerebralen Kollateralgefäßwachstums erforscht. Um unsere Hypothese zu testen, haben wir uns bewusst entschieden, eine e-EPC-Behandlung mit einer Behandlung durch biologische, aus e-EPC-differenzierte Kontroll-Endothelzellen (e-EPDC) zu vergleichen. Bereits innerhalb einer Woche nach Behandlungsbeginn führte die systemische e-EPC-Behandlung zu einer signifikanten Verbesserung der CVRC, was analog zu der funktionellen CVRC-Beeinflussung bei alten Mäusen durch die Beeinflussung der zerebrovaskulären Reaktivität verursacht sein könnte.⁷⁹ Morphologisch war die systemische e-EPC-Therapie von morphologischen Aspekten, wie einem gesteigerten Wachstum der basalen Kollateralgefäße, einer Zunahme der leptomeningealen Anastomosen und einer Aktivierung der Angiogenese im Kortexparenchym begleitet, die sich im Vergleich zu einer vorher berichteten Behandlung durch Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor positiv abgehoben haben.^{28,80} Da wir trotz einer Interaktion von zirkulierenden e-EPCs mit postkapillären Venolen keine e-EPC-Inkorporation in das zerebrale Gefäßendothel nachweisen konnten, scheint der funktionelle und morphologische

Behandlungseffekt einer e-EPC Applikation am ehesten durch einen endo- oder parakrinen Mechanismus und nicht durch eine Inkorporation von zirkulierenden e-EPCs in das proliferierende Gefäßendothel verursacht zu sein.⁷⁵⁻⁷⁷ Diese Hypothese konnten wir und andere durch den Nachweis von e-EPC Cluster in der Leber, Lunge und Milz jedoch nicht im Gehirn stützen.⁸¹ Ein möglicher Hauptgrund für diese Beobachtung könnte die intakte Blut-Hirn-Schranke in unserem Modell darstellen, da innerhalb des zerebralen Gefäßsystems eines akuten Schlaganfalls mit defekter Blut-Hirn-Schranke eine positive Inkorporation von therapeutisch applizierten EPCs nachgewiesen wurde.^{82,83}

Myoblasten-vermittelte Gentherapie bei Encephalomyosynangiose

Chirurgische Verfahren zur indirekten Revaskularisierung sind gegenwärtig durch unbeständige klinische Ergebnisse und eine Wirkungslatenz limitiert.²⁴ Die Ursache, warum bei Moyamoya Patienten nach Durchführung einer EMS dennoch eine hämodynamische Kollateralisierung eintritt, könnte in der erhöhten pro-angiogenen Aktivität bei dieser Patientenpopulation liegen.⁸⁴ Im nächsten Schritt haben wir daher das Behandlungskonzept einer lokalen, myoblasten-vermittelten Gentherapie zur Bereitstellung eines angiogenen Wachstumsfaktors mit einer experimentellen EMS kombiniert und auf unser Modell zur chronisch zerebralen Ischämie übertragen. Zunächst wurde dazu bei der C57BL/6 Maus eine mikrochirurgische EMS mit einer ipsilateralen ICA-O kombiniert. Da die erfolgreiche extra- intrakranielle Kollateralisierung einer EMS auf eine erhaltene Perfusion des M. temporalis durch die ECA angewiesen ist, wurde bewusst eine Okklusion der ICA durchgeführt. Anschließend wurde die optimale Implantationstechnik der retroviral-transfizierten, monoklonalen Maus-Myoblasten in den M. temporalis der EMS ermittelt, da die therapeutische Anwendung von myogenen Stammzellen durch verschiedene Faktoren, wie unbeständige Fusionsraten, ein begrenztes Überleben, eine schädliche Immunreaktion oder eine limitierte Expansionsmöglichkeit eingeschränkt sein kann.⁸⁵⁻⁸⁷ In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei anderen Tiermodellen^{42,43} hat die Myoblastenimplantation auch in unserem Modell innerhalb von 14 Tagen zu einer stabilen Fusion mit den Muskelfasern des Wirts geführt. Im Gegensatz zu früheren Bedenken⁸⁸⁻⁹⁰ wurde

eine erfolgreiche Fusion auch bei nicht-ischämischen, unbeschädigten Muskelfasern des M. temporalis beobachtet, ohne Anzeichen einer undifferenzierten Proliferation oder schädlichen Immunantwort. Im Hinblick auf unsere geplante Versuchsserie zur myoblasten-vermittelten VEGF Supplementierung wurde festgestellt, dass eine direkte Injektionstechnik den effektivsten Applikationsweg zur Sicherstellung einer stabilen Fusion mit Genproduktexpression im Bereich der Muskel / Gehirn Grenzschiicht darstellt. Hier konnten wir sowohl in der VEGF Behandlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe mit leerem Vektor (EV) eine spontane, extra- intrakranielle Kollateralisierung im Bereich der Muskel / Gehirn Grenzschiicht erkennen, was die klinische Beobachtung stützt, dass die chronische zerebrale Ischämie an sich als stimulierender Reiz für das spontane, extra- intrakranielle Kollateralgefäßwachstum einer EMS wirken kann.^{20-24,26} Ungeachtet dessen hat die myoblasten-vermittelte VEGF Supplementierung innerhalb von 21 Tagen zu einer signifikanten Verdreifachung dieser Kollateralgefäße geführt. Neben dieser höheren Anzahl waren die Kollateralgefäße in der VEGF Behandlungsgruppe auch durch eine stärker gewundene Morphologie als Zeichen der vaskulären Plastizität geprägt, wobei eine VEGF-induzierte Tumorproliferation oder Permeabilitätsstörung nicht beobachtet werden konnte. Als Zeichen der lokalen VEGF Wirkung wurde im Kortex unterhalb der EMS eine Angiogenese der nutritiven Gefäße mit positivem Perizytenbesatz festgestellt, so dass die lokale VEGF Bereitstellung auch zu einer Ausreifung des Gefäßsystems beigetragen hat.⁹¹ Diese morphologischen Aspekte bestätigen somit die Schlüsselfunktion von VEGF in der Veranlagung, Entwicklung und Ausreifung von Kollateralgefäßen.^{38,39,69,92} Neben den morphologischen Effekten führte die VEGF-Supplementierung innerhalb von 14-21 Tagen auch funktionell zu einer verbesserten CVRC Erholung und einem geringeren kortikalen Schlaganfallvolumen. Die mittels LSI visualisierte Restperfusion im Bereich der EMS nach MCA-O wurde als Hinweis einer unmittelbaren, neuroprotektiven Wirkung in Folge der extra- intrakraniellen Kollateralisierung gewertet. Die diskrete mikrovaskuläre Permeabilitätsstörung nach MCA-O in der VEGF Gruppe bestätigt jedoch auch die bekannten negativen Effekte nach alleiniger VEGF Supplementierung⁹³ und die Tatsache, dass die Stabilität eines ausgereiften vaskulären Netzwerkes auf die koordinierte Interaktion verschiedener Signalwege angewiesen

ist. Einer der Hauptfaktoren zur Steuerung dieser vaskulären Ausreifung und Perizyten Rekrutierung ist der Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF).⁹⁴ Zukünftige prä-klinische Studien sollten daher untersuchen, ob eine myoblasten-vermittelte VEGF und PEGF Co-Supplementierung die morphologischen und funktionellen Ergebnisse nach experimenteller EMS weiter verbessern könnte.⁹⁵

Intraoperatives Laser Speckle Imaging am menschlichen Gehirn

Die nicht-invasive CBF Messung durch LSI hat aufgrund technologischer Vorteile gegenüber LDF entscheidend zur erfolgreichen Etablierung unseres Mausmodells beigetragen. Da ein Verfahren zur direkten CBF Messung auch bei neurochirurgischen Operationen wünschenswert wäre, befasst sich der klinische Teil der Arbeit mit der intraoperativen Etablierung von LSI zur nicht-invasiven Perfusionsmessung am menschlichen Gehirn. Grundsätzliche Fragen bezüglich der Logistik und Handhabung von iLSI im neurochirurgischen Operationssaal konnten in einer Vorarbeit bereits beantwortet werden.⁵⁵ In der aktuellen Arbeit gelang erstmals der Nachweis, dass iLSI am menschlichen Gehirn eine verlässliche, pseudo-quantitative CBF Messung erlaubt, beispielsweise im Rahmen der Anlage eines STA-MCA Bypass. Wesentliche Einflussfaktoren für die robuste und interindividuell vergleichbare Perfusionsmessung in der iLSI-spezifischen Perfusionseinheit CBF-Flux waren unsere standardisierten Protokolle zu dem intraoperativen Geräteaufbau, der Softwarekonfiguration und der Anästhesieführung während der iLSI Messung.^{96,97} Als praktisches Anwendungsbeispiel würde iLSI durch eine kontinuierliche Perfusionsüberwachung helfen, eine ischämische Minderperfusion oder ein postoperatives Hyperperfusionssyndrom im vaskulären Versorgungsgebiet einer Bypass Anastomose bereits intraoperativ erkennen und behandeln zu können.^{98,99} Die intraoperative Quantifizierung der PaCO₂-spezifischen CVRC im Bereich der freigelegten Kortexoberfläche würde ermöglichen, das am besten geeignete kortikale Empfängergefäß in Abhängigkeit der hämodynamischen Perfusionseinschränkung zu identifizieren, um das klinische Ergebnis nach direkter Revaskularisierung zu optimieren. Daneben hat das dynamische Ansprechverhalten von iLSI während einer Testokklusion und Flussinitiation eines EC-IC Interponat-Bypass gezeigt, dass

iLSI auch zur Verifizierung einer suffizienten kortikalen Ersatzperfusion nach Anlage eines Interponat Bypass mit anschließender Hauptgefäßokklusion zur Behandlung einer komplexen vaskulären Pathologie erfolgreich eingesetzt werden kann.

Zur Umsetzung einer routinemäßigen, intraoperativen Anwendung haben wir im letzten Schritt iLSI-spezifische Perfusionsschwellen am menschlichen Gehirn identifiziert, da der pseudo-quantitative Charakter der Laser Speckle Technologie und der genaue Zusammenhang zwischen CBF-Flux und dem zugrunde liegenden CBF noch nicht vollständig verstanden ist.^{96,100} Wir haben diese Untersuchungen bewusst bei Patienten mit malignem Media Infarkt durchgeführt, da die unregelmäßige, kortikale Infarktmorphologie eines malignen Media Infarkts die gleichzeitige Visualisierung von sowohl infarziertem als auch nicht-infarziertem Hirngewebe innerhalb desselben optischen Bildgebungsfensters erlaubt, was eine spätere Normalisierung der iLSI-spezifischen Perfusionswerte (CBF-Flux) ermöglicht. Trotz logistischer und methodischer Einschränkungen, wie der Vergleich zwischen zwei physikalisch unterschiedlichen Technologien und einer zeitlichen Latenz zwischen der iLSI Messung dem postoperativen MRT konnte demonstriert werden, dass iLSI unter- und oberhalb der ermittelten Perfusionsschwellen von 40% und 110% letztendlich infarziertes Hirngewebe zuverlässig vorhersagen oder ausschließen konnte. Mit Hilfe dieser iLSI-spezifischen Perfusionsschwellen könnte der Operateur die 100%-Ausgangspfusion innerhalb einer interessierenden Gehirnregion zu Beginn einer Operation definieren, um kritische Perfusionsstörungen anhand einer kontinuierlichen Perfusionsüberwachung während des Operationsverlaufes zu erkennen. Das Ziel sollte sein, diese pseudo-quantitative Genauigkeit von iLSI mit Hilfe von multimodalem Monitoring – beispielsweise PET oder Reflektometrie – zu kombinieren, um in Zukunft nicht nur die Perfusion sondern auch den Metabolismus während neurochirurgischen Interventionen mit größerer Effektivität überwachen zu können.¹⁰¹

Zusammenfassung

Hämodynamische Perfusionsminderungen des Gehirns tragen in 10% der Fälle zur Entstehung eines ischämischen Schlaganfalls. Die Fähigkeit zur Kompensation dieser chronisch zerebralen Ischämie durch ein Auswachsen von präformierten Kollateralgefäßen ist naturgemäß begrenzt und gegenwärtige Strategien zur operativen Verbesserung des zerebralen Kollateralblutflusses sind durch ein hohes perioperatives Schlaganfallrisiko oder eine unbeständige hämodynamische Effektivität limitiert. Vor diesem Hintergrund wurde in der aktuellen Arbeit anhand experimenteller Modelle zur chronisch zerebralen Ischämie bei der C57BL/6 Maus und der Sprague-Dawley Ratte der Einfluss des Alters auf die chronisch zerebrale Ischämie und die Möglichkeit eines therapeutischen zerebralen Kollateralgefäßwachstums erforscht. Erstens gelang zu zeigen, dass ein hohes Alter einen negativen Einfluss auf das spontane, zerebrale Kollateralgefäßwachstum und die zerebrovaskuläre Reaktivität ausübt, was eine Erklärung für das gesteigerte Risiko eines hämodynamischen Schlaganfalls bei älteren Patienten liefert. Zweitens wurde am prä-klinischen Modell demonstriert, dass endotheliale Vorläuferzellen als Grundlage für eine nicht-operative Behandlungsstrategie bei Patienten mit insuffizienter Kollateralisierung und hämodynamischer Erschöpfung erfolgreich zur therapeutischen Stimulation des spontanen, zerebralen Kollateralgefäßwachstums eingesetzt werden könnten. Drittens wurde am experimentellen Mausmodell das Behandlungskonzept einer myoblasten-vermittelten Gentherapie in Kombination mit einer Encephalomyosynangiose (EMS) entwickelt und gezeigt, dass eine myoblasten-vermittelte VEGF Bereitstellung im Bereich der Muskel / Gehirn Grenzschicht einer EMS die unbeständigen klinischen Ergebnisse nach indirekter EMS Revaskularisierung durch eine effektive Stimulation der extra- intrakraniellen Kollateralisierung verbessern könnte.

Der zweite, klinische Teil der Arbeit hat sich mit der intraoperativen Validierung von Laser Speckle Imaging (LSI) im neurochirurgischen Anwendungsbereich beschäftigt, da intraoperatives LSI (iLSI) aufgrund seiner technologischen Vorteile ein attraktives jedoch am

menschlichen Gehirn unerforschtes Verfahren zur nicht-invasiven Perfusionsüberwachung darstellt. Anhand von Patienten mit der klinischen Indikation zu einer direkten Bypass-Revaskularisierung und hämodynamisch gesunden Kontrollpatienten konnte zunächst die grundsätzliche Verlässlichkeit, Sensitivität und Dynamik von iLSI im Rahmen der Routineanwendung am menschlichen Gehirn demonstriert werden. Zur weiteren Validierung der pseudo-quantitativen iLSI Perfusionsmessungen wurden anschließend iLSI-spezifische Perfusionsschwellen zur Vorhersage und zum Ausschluss von infarziertem Hirngewebe identifiziert, um den zerebralen Blutfluss während neurochirurgischen Operationen einfach, sicher und zuverlässig mittels iLSI überwachen zu können.

Literaturangaben

1. Johnston SC, Mendis S, Mathers CD. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. *Lancet Neurol.* 2009 Apr;8(4):345–54.
2. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundorfer B, et al. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke.* 2006 May;37(5):1179–83.
3. Heuschmann PU, Di Carlo A, Bejot Y, Rastenyte D, Ryglewicz D, Sarti C, et al. Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke.* 2009 May;40(5):1557–63.
4. Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE, et al. Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet.* 2005 ed. 2005 Nov 19;366(9499):1773–83.
5. Markus HS, Khan U, Birns J, Evans A, Kalra L, Rudd AG, et al. Differences in stroke subtypes between black and white patients with stroke: the South London Ethnicity and Stroke Study. *Circulation.* 2007;116(19):2157–64.
6. Klijn CJ, Kappelle LJ, Tulleken CA, van Gijn J. Symptomatic carotid artery occlusion. A reappraisal of hemodynamic factors. *Stroke.* 1997 Oct;28(10):2084–93.
7. Grubb RLJ, Derdeyn CP, Fritsch SM, Carpenter DA, Yundt KD, Videen TO, et al. Importance of hemodynamic factors in the prognosis of symptomatic carotid occlusion. *JAMA.* 1998 Sep 23;280(12):1055–60.
8. Menon BK, Smith EE, Coutts SB, Welsh DG, Faber JE, Goyal M, et al. Leptomeningeal collaterals are associated with modifiable metabolic risk factors. *Ann Neurol.* 2013 Aug;74(2):241–8.
9. Arsava EM, Vural A, Akpınar E, Gocmen R, Akcalar S, Oguz KK, et al. The detrimental effect of aging on leptomeningeal collaterals in ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2014 Mar;23(3):421–6.
10. Seeta Ramaiah S, Churilov L, Mitchell P, Dowling R, Yan B. The impact of arterial collateralization on outcome after intra-arterial therapy for acute ischemic stroke. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2014 Apr;35(4):667–72.
11. Lima FO, Furie KL, Silva GS, Lev MH, Camargo ECS, Singhal AB, et al. Prognosis of untreated strokes due to anterior circulation proximal intracranial arterial occlusions detected by use of computed tomography angiography. *JAMA Neurol.* 2014 Feb;71(2):151–7.
12. Yasargil MG, Yonekawa Y. Results of microsurgical extra-intracranial arterial bypass in the treatment of cerebral ischemia. *Neurosurgery.* 1977 Jul;1(1):22–4.
13. The EC/IC Bypass Study Group. Failure of extracranial-intracranial arterial bypass to reduce the risk of ischemic stroke. Results of an international randomized trial. *N Engl J Med.* 1985 Nov 7;313(19):1191–200.

14. Schmiedek P, Piepgras A, Leinsinger G, Kirsch CM, Einhuopl K. Improvement of cerebrovascular reserve capacity by EC-IC arterial bypass surgery in patients with ICA occlusion and hemodynamic cerebral ischemia. *J Neurosurg.* 1994 Aug;81(2):236–44.
15. Neff KW, Horn P, Dinter D, Vajkoczy P, Schmiedek P, Duber C. Extracranial-intracranial arterial bypass surgery improves total brain blood supply in selected symptomatic patients with unilateral internal carotid artery occlusion and insufficient collateralization. *Neuroradiology.* 2004 ed. 2004 Sep;46(9):730–7.
16. Powers WJ, Clarke WR, Grubb RL, Videen TO, Adams HP, Derdeyn CP, et al. Extracranial-intracranial bypass surgery for stroke prevention in hemodynamic cerebral ischemia: the Carotid Occlusion Surgery Study randomized trial. *JAMA.* 2011 ed. American Medical Association; 2011 Nov 9;306(18):1983–92.
17. Grubb RLJ, Powers WJ, Clarke WR, Videen TO, Adams HPI, Derdeyn CP. Surgical results of the Carotid Occlusion Surgery Study. *J Neurosurg.* 2013 Jan;118(1):25–33.
18. Esposito G, Amin-Hanjani S, Regli L. Role of and Indications for Bypass Surgery After Carotid Occlusion Surgery Study (COSS)? *Stroke.* 2016 Jan;47(1):282-90.
19. Reynolds MR, Derdeyn CP, Grubb RLJ, Powers WJ, Zipfel GJ. Extracranial-intracranial bypass for ischemic cerebrovascular disease: what have we learned from the Carotid Occlusion Surgery Study? *Neurosurg Focus.* 2014 Jan;36(1):E9.
20. Karasawa J, Kikuchi H, Furuse S, Sakaki T, Yoshida Y. A surgical treatment of "moyamoya" disease "encephalo-myo synangiosis." *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1977;17(1 Pt 1):29–37.
21. Kobayashi K, Takeuchi S, Tsuchida T, Ito J. [Encephalo-myo-synangiosis (EMS) in moyamoya disease -with special reference to postoperative angiography (author's transl)]. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1981 Dec;21(12):1229–38.
22. Matsushima T, Fujiwara S, Nagata S, Fujii K, Fukui M, Kitamura K, et al. Surgical treatment for paediatric patients with moyamoya disease by indirect revascularization procedures (EDAS, EMS, EMAS). *Acta Neurochir (Wien).* 1989;98(3-4):135–40.
23. Perren F, Meairs S, Schmiedek P, Hennerici M, Horn P. Power Doppler evaluation of revascularization in childhood moyamoya. *Neurology.* 2005 Feb;64(3):558–60.
24. Czabanka M, Vajkoczy P, Schmiedek P, Horn P. Age-dependent revascularization patterns in the treatment of moyamoya disease in a European patient population. *Neurosurg Focus.* 2009 Apr;26(4):E9.
25. Komotar RJ, Starke RM, Otten ML, Merkow MB, Garrett MC, Marshall RS, et al. The role of indirect extracranial-intracranial bypass in the treatment of symptomatic intracranial atheroocclusive disease. *J Neurosurg.* 2009 ed. 2009 May;110(5):896–904.
26. Czabanka M, Pena-Tapia P, Scharf J, Schubert GA, Munch E, Horn P, et al. Characterization of direct and indirect cerebral revascularization for the treatment of European patients with moyamoya disease. *Cerebrovasc Dis.* 2011;32(4):361–9.
27. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003rd ed. 2003 Jul 1;23(7):1143–51.

28. Buschmann IR, Busch HJ, Mies G, Hossmann K-A. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation*. 2003;108(5):610–36.
29. Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*. 2002 Jun;359(9323):2053–8.
30. van Royen N, Schirmer SH, Atasever B, Behrens CYH, Ubbink D, Buschmann EE, et al. START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation*. 2005 Aug;112(7):1040–6.
31. Rajagopalan S, Mohler ER3, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation*. 2003 Oct;108(16):1933–8.
32. Rookmaaker MB, Tolboom H, Goldschmeding R, Zwaginga J-J, Rabelink TJ, Verhaar MC. Bone-marrow-derived cells contribute to endothelial repair after thrombotic microangiopathy. *Blood*. 2002 Feb;99(3):1095.
33. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Bohm M, Dirnagl U, et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Oct;22(10):1567–72.
34. Gyongyosi M, Khorsand A, Zamini S, Sperker W, Strehblow C, Kastrup J, et al. NOGA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study. *Circulation*. 2005 Aug;112(9 Suppl):I157–65.
35. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, et al. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Apr;45(7):982–8.
36. Rando TA, Blau HM. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol*. 1994 Jun;125(6):1275–87.
37. Blau HM, Springer ML. Muscle-mediated gene therapy. *N Engl J Med*. 1995 ed. 1995 Dec 7;333(23):1554–6.
38. Tirziu D, Jaba IM, Yu P, Larrivee B, Coon BG, Cristofaro B, et al. Endothelial nuclear factor-kappaB-dependent regulation of arteriogenesis and branching. *Circulation*. 2012 Nov;126(22):2589–600.
39. Rissanen TT, Korpisalo P, Markkanen JE, Liimatainen T, Orden M-R, Kholova I, et al. Blood flow remodels growing vasculature during vascular endothelial growth factor gene therapy and determines between capillary arterialization and sprouting angiogenesis. *Circulation*. 2005 Dec;112(25):3937–46.

40. Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, et al. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest.* 2000 Jan;80(1):99–115.
41. Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell, P. C., Blau HM. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation.* 2000 Aug 22;102(8):898–901.
42. Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, et al. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest.* 2004 Feb;113(4):516–27.
43. Degenfeld von G, Banfi A, Springer ML, Wagner RA, Jacobi J, Ozawa CR, et al. Microenvironmental VEGF distribution is critical for stable and functional vessel growth in ischemia. *FASEB J.* 2006 Dec;20(14):2657–9.
44. Zhang H, Prabhakar P, Sealock R, Faber JE. Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 ed. 2010 May;30(5):923–34.
45. Barone FC, Knudsen DJ, Nelson AH, Feuerstein GZ, Willette RN. Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993 Jul;13(4):683–92.
46. Kitagawa K, Matsumoto M, Yang G, Mabuchi T, Yagita Y, Hori M, et al. Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998 May;18(5):570–9.
47. Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989 ed. 1989 Oct;9(5):589–96.
48. Briers JD. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiol Meas.* 2001 Nov;22(4):R35–66.
49. Khatri P, Abruzzo T, Yeatts SD, Nichols C, Broderick JP, Tomsick TA, et al. Good clinical outcome after ischemic stroke with successful revascularization is time-dependent. *Neurology.* 2009 ed. 2009 Sep 29;73(13):1066–72.
50. Raabe A, Beck J, Gerlach R, Zimmermann M, Seifert V. Near-infrared indocyanine green video angiography: a new method for intraoperative assessment of vascular flow. *Neurosurgery.* 2003 Jan;52(1):132–9–discussion139.
51. Bolognese P, Miller JI, Heger IM, Milhorat TH. Laser-Doppler flowmetry in neurosurgery. *J Neurosurg Anesthesiol.* 1993 Jul;5(3):151–8.
52. Nakagawa A, Fujimura M, Arafune T, Sakuma I, Tominaga T. Clinical implications of intraoperative infrared brain surface monitoring during superficial temporal artery-middle cerebral artery anastomosis in patients with moyamoya disease. *J Neurosurg.* 2009 ed. 2009 Dec;111(6):1158–64.
53. Vajkoczy P, Roth H, Horn P, Lucke T, Thome C, Hubner U, et al. Continuous monitoring of regional cerebral blood flow: experimental and clinical validation of a novel thermal diffusion microprobe. *J Neurosurg.* 2000 Aug;93(2):265–74.

54. van Santbrink H, Maas AI, Avezaat CJ. Continuous monitoring of partial pressure of brain tissue oxygen in patients with severe head injury. *Neurosurgery*. 1996 Jan;38(1):21–31.
55. Hecht N, Woitzik J, Dreier JP, Vajkoczy P. Intraoperative monitoring of cerebral blood flow by laser speckle contrast analysis. *Neurosurg Focus*. 2009 ed. 2009 Oct;27(4):E11.
56. Marini C, Triggiani L, Cimini N, Ciancarelli I, De Santis F, Russo T, et al. Proportion of older people in the community as a predictor of increasing stroke incidence. *Neuroepidemiology*. 2001st ed. 2001 May;20(2):91–5.
57. Faber JE, Zhang H, Lassance-Soares RM, Prabhakar P, Najafi AH, Burnett MS, et al. Aging causes collateral rarefaction and increased severity of ischemic injury in multiple tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 ed. 2011 Aug;31(8):1748–56.
58. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004 Jan;109(2):220–6.
59. Yamaguchi J-I, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003 Mar;107(9):1322–8.
60. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001 Feb;103(5):634–7.
61. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001 Apr;7(4):430–6.
62. Juttler E, Unterberg A, Woitzik J, Bosel J, Amiri H, Sakowitz OW, et al. Hemispherectomy in Older Patients with Extensive Middle-Cerebral-Artery Stroke. *N Engl J Med*. 2014 Mar 20;370(12):1091–100.
63. Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E, Vicaut E, George B, Algra A, et al. Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. *Lancet Neurol*. 2007 Mar;6(3):215–22.
64. Busch HJ, Buschmann IR, Mies G, Bode C, Hossmann K-A. Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(5):621–8.
65. Woitzik J, Hecht N, Schneider UC, Peña-Tapia PG, Vajkoczy P. Increased vessel diameter of leptomeningeal anastomoses after hypoxic preconditioning. *Brain Res*. 2006 Oct 18;1115(1):209–12.
66. Kitagawa K, Yagita Y, Sasaki T, Sugiura S, Omura-Matsuoka E, Mabuchi T, et al. Chronic mild reduction of cerebral perfusion pressure induces ischemic tolerance in focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2005 ed. 2005 Oct;36(10):2270–4.
67. Bosch-Marce M, Okuyama H, Wesley JB, Sarkar K, Kimura H, Liu YV, et al. Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia. *Circ Res*. 2007 ed. 2007 Dec 7;101(12):1310–8.

68. Dai X, Faber JE. Endothelial nitric oxide synthase deficiency causes collateral vessel rarefaction and impairs activation of a cell cycle gene network during arteriogenesis. *Circ Res.* 2010 ed. 2010 Jun 25;106(12):1870–81.
69. Clayton JA, Chalothorn D, Faber JE. Vascular endothelial growth factor-A specifies formation of native collaterals and regulates collateral growth in ischemia. *Circ Res.* 2008 ed. 2008 Oct 24;103(9):1027–36.
70. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res.* 2007 ed. 2007 Jun 8;100(11):1659–66.
71. Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences.* 2010 ed. 2010 Oct;65(10):1028–41.
72. Sun D, Huang A, Yan EH, Wu Z, Yan C, Kaminski PM, et al. Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 ed. 2004 Jun;286(6):H2249–56.
73. Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rossig L, Vasa M, Zeiher AM, et al. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res.* 2001st ed. 2001 Oct 12;89(8):709–15.
74. Woodman CR, Price EM, Laughlin MH. Aging induces muscle-specific impairment of endothelium-dependent dilation in skeletal muscle feed arteries. *J Appl Physiol.* 2002nd ed. 2002 Nov;93(5):1685–90.
75. Kupatt C, Horstkotte J, Vlastos GA, Pfosser A, Lebherz C, Semisch M, et al. Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia. *FASEB J.* 2005 Sep;19(11):1576–8.
76. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* 2004 Mar;109(12):1543–9.
77. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* 2004 Mar;94(5):678–85.
78. Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res.* 2004 Mar;94(5):573–4.
79. Zhou J, Cheng M, Liao Y-H, Hu Y, Wu M, Wang Q, et al. Rosuvastatin Enhances Angiogenesis via eNOS-Dependent Mobilization of Endothelial Progenitor Cells. *PLoS One.* 2013;8(5):e63126.
80. Schneider UC, Schilling L, Schroeck H, Nebe CT, Vajkoczy P, Woitzik J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced vessel growth restores cerebral blood supply after bilateral carotid artery occlusion. *Stroke.* 2007;38(4):1320–8.

81. Moubarik C, Guillet B, Youssef B, Codaccioni J-L, Piercecchi M-D, Sabatier F, et al. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem Cell Rev.* 2011 Mar;7(1):208–20.
82. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *The Journal of clinical investigation.* 2004 Aug;114(3):330–8.
83. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res.* 2002 Feb;90(3):284–8.
84. Rafat N, Beck G, Pena-Tapia PG, Schmiedek P, Vajkoczy P. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with Moyamoya disease. *Stroke.* 2008 ed. 2009 Feb;40(2):432–8.
85. Law PK, Goodwin TG, Fang Q, Duggirala V, Larkin C, Florendo JA, et al. Feasibility, safety, and efficacy of myoblast transfer therapy on Duchenne muscular dystrophy boys. *Cell Transplant.* 1992nd ed. 1992;1(2-3):235–44.
86. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature.* 1989 ed. 1989 Jan 12;337(6203):176–9.
87. Watt DJ. Factors which affect the fusion of allogeneic muscle precursor cells in vivo. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1982nd ed. 1982 Mar-Apr;8(2):135–47.
88. Fan Y, Maley M, Beilharz M, Grounds M. Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve.* 1996 ed. 1996 Jul;19(7):853–60.
89. Wernig A, Irintchev A, Hartling A, Stephan G, Zimmermann K, Starzinski-Powitz A. Formation of new muscle fibres and tumours after injection of cultured myogenic cells. *J Neurocytol.* 1991st ed. 1991 Dec;20(12):982–97.
90. Watt DJ, Morgan JE, Partridge TA. Allografts of muscle precursor cells persist in the non-tolerized host. *Neuromuscul Disord.* 1991st ed. 1991;1(5):345–55.
91. Zechariah A, ElAli A, Doeppner TR, Jin F, Hasan MR, Helfrich I, et al. Vascular endothelial growth factor promotes pericyte coverage of brain capillaries, improves cerebral blood flow during subsequent focal cerebral ischemia, and preserves the metabolic penumbra. *Stroke.* 2013 Jun;44(6):1690–7.
92. Lucitti JL, Mackey JK, Morrison JC, Haigh JJ, Adams RH, Faber JE. Formation of the collateral circulation is regulated by vascular endothelial growth factor-A and a disintegrin and metalloprotease family members 10 and 17. *Circ Res.* 2012 Dec;111(12):1539–50.
93. Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, et al. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature.* 2008 Dec;456(7223):809–13.
94. Gaengel K, Genove G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 May;29(5):630–8.

95. Banfi A, Degenfeld von G, Gianni-Barrera R, Reginato S, Merchant MJ, McDonald DM, et al. Therapeutic angiogenesis due to balanced single-vector delivery of VEGF and PDGF-BB. *FASEB J.* 2012 Jun;26(6):2486–97.
96. Duncan DD, Kirkpatrick SJ. Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool? *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis.* 2008 ed. 2008 Aug;25(8):2088–94.
97. Jones PB, Shin HK, Boas DA, Hyman BT, Moskowitz MA, Ayata C, et al. Simultaneous multispectral reflectance imaging and laser speckle flowmetry of cerebral blood flow and oxygen metabolism in focal cerebral ischemia. *J Biomed Opt.* 2008 ed. 2008 Jul-Aug;13(4):044007.
98. Kaku Y, Iihara K, Nakajima N, Kataoka H, Fukuda K, Masuoka J, et al. Cerebral blood flow and metabolism of hyperperfusion after cerebral revascularization in patients with moyamoya disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Nov;32(11):2066–75.
99. Uchino H, Kuroda S, Hirata K, Shiga T, Houkin K, Tamaki N. Predictors and clinical features of postoperative hyperperfusion after surgical revascularization for moyamoya disease: a serial single photon emission CT/positron emission tomography study. *Stroke.* 2012 Oct;43(10):2610–6.
100. Boas DA, Dunn AK. Laser speckle contrast imaging in biomedical optics. *J Biomed Opt.* 2010 ed. International Society for Optics and Photonics; 2010 Jan;15(1):011109–011109–12.
101. Gramer M, Feuerstein D, Steimers A, Takagaki M, Kumagai T, Sue M, et al. Device for simultaneous positron emission tomography, laser speckle imaging and RGB reflectometry: validation and application to cortical spreading depression and brain ischemia in rats. *NeuroImage.* 2014 Jul;94:250–62.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Chef und Mentor, Professor Dr. Peter Vajkoczy, für die Unterstützung, Motivation und Förderung seit meiner Studienzeit in Mannheim bedanken. Ohne sein klinisches und wissenschaftliches Vorbild wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinem Freund und Kollegen PD Dr. Johannes Woitzik danke ich für seine selbstlose Hilfe, unzählige fruchtbare Diskussionen und die hervorragende Zusammenarbeit.

Ich danke den MTA's und Doktoranden unserer Arbeitsgruppe für das überdurchschnittlich motivierte Engagement und die entgegengebrachte Unterstützung; mein besonderer Dank gilt Melina, Irina, Jin, Aiki und Marc. Auch meinen klinischen Kollegen Professor Dr. Michael Synowitz, PD Dr. Marcus Czabanka und Dr. Ulf Schneider möchte ich herzlich danken.

Zuletzt möchte ich mich bei Julia, meiner Familie und meinen engsten Freunden für das verständnisvolle, glückliche und abwechslungsreiche Umfeld bedanken, welches für eine akademische neurochirurgische Arbeit benötigt wird.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift