

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von „Endothelial Colony Forming Cells“ (ECFC) auf das
zerebrale Kollateralgefäßwachstum bei der Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Rodrigo Marticorena Garcia
aus Lima / Perú

Datum der Promotion: 11.12.2015

para mis padres

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	5
2.1 Chronisch zerebrale Hypoperfusion	5
2.1.1 Zerebrovaskuläre Reservekapazität	6
2.1.2 Therapie der chronisch arteriellen Verschlusskrankheit der <i>A. carotis</i>	7
2.2 Gefäßwachstum	8
2.2.1 Vaskulogenese	9
2.2.2 Angiogenese	9
2.2.3 Arteriogenese	10
2.3 Endotheliale Vorläuferzellen	11
2.3.1 Charakterisierung	12
2.3.2 <i>In vitro</i> Gefäßneubildung	14
2.3.3 Rolle der ECFC bei Gefäßreparaturen und Neovaskularisation.....	15
2.3.4 <i>In vivo</i> Studien zu EPC in diversen Ischämie modellen.....	16
2.4 Modell der immunkompromittierten Maus	16
2.4.1 Die NuNu-Maus (NMRI nu/nu).....	17
2.4.2 Chronisch zerebrale Hypoperfusion bei der Nacktmaus.....	17
2.5 Zielsetzung der Arbeit	18
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Zelllinien	19

3.1.2	Mäuse	19
3.1.3	Geräte	20
3.1.4	Material	21
3.1.5	Puffer und Standardlösungen	21
3.1.6	Chemikalien und Reagenzien.....	22
3.1.7	Antikörper	22
3.1.8	Zellmedium	23
3.1.9	Medikamente.....	24
3.1.10	Software	24
3.2	Zellbiologische Methoden	25
3.2.1	Zellkultivierung und -aufbewahrung.....	25
3.2.2	Wachstumsverhalten / Zellmorphologie.....	26
3.2.3	DiI-Markierung der ECFC zur Vorbereitung des <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Nachweises	26
3.2.4	Zellaufbereitung und -injektion.....	27
3.3	Durchflusszytometrie.....	27
3.4	Tierversuche	29
3.4.1	Gruppen/Versuchsablauf	29
3.4.2	Operationen.....	32
3.4.3	Laser Speckle Bildgebung (LSI).....	35
3.4.4	Latexangiographie.....	37
3.4.5	Immunhistochemie	38
3.4.6	<i>In vivo</i> Multifluoreszenzvideomikroskopie.....	42

3.4.7	Statistik.....	43
4.	ERGEBNISSE.....	44
4.1	Zellcharakterisierung.....	44
4.1.1	Zellmorphologie und -wachstum.....	44
4.1.2	Zellcharakterisierung mittels Durchflusszytometrie	45
4.2	Einfluss der ECFC auf die chronisch zerebrale Hypoperfusion	46
4.2.1	Modelletablierung der chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der NuNu-Maus	46
4.2.2	Einfluss der ECFC auf die Gehirndurchblutung nach unilateraler OACI/E	49
4.3	Strukturelle Veränderungen der basalen und leptomeningealen Hirnarterien nach ECFC-Applikation im Modell der chronisch zerebralen Hypoperfusion.	53
4.3.1	Etablierung der Latexangiographie bei der NuNu-Maus nach unilateraler OACI/E	53
4.3.2	Einfluss der ECFC auf die basalen und leptomeningealen Hirnarterien nach unilateraler OACI/E.....	56
4.4	Zerebrale Mikrogefäßarchitektur nach OACI/E und ECFC Behandlung.....	63
4.4.1	Proliferation der basalen Hirngefäße.....	63
4.4.2	Immunhistochemie der zerebralen Mikrogefäßarchitektur	67
4.5	Nachweis von ECFC in der Nacktmaus	72
4.5.1	Immunhistochemischer Nachweis DiI-markierter ECFC	72
4.5.2	<i>In vivo</i> Nachweis von ECFC mittels Intravitalmikroskopie.....	75
5.	DISKUSSION	77
5.1	Zellmorphologie, -wachstum und Oberflächenantigene.....	77
5.2	Modelletablierung der chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der NuNu-Maus.....	78
5.2.1	Die immunkompromittierte Maus.....	78

5.2.2	Einfluss der unilateralen OACI/E auf die funktionelle Gehirndurchblutung	79
5.2.3	Einfluss der unilateralen OACI/E auf die zerebralen Mikro- und Makrogefäße	80
5.3	ECFC zeigen im Rahmen der chronisch zerebralen Hypoperfusion einen positiven Effekt auf die zerebrovaskuläre Funktionalität und Anatomie	81
5.3.1	ECFC führen zu einer funktionellen Wiederherstellung der CVRC	81
5.3.2	ECFC führen zu Gefäßwachstum der zerebralen Gefäße	83
5.4	Nachweis von ECFC in der Nacktmaus	85
5.5	Limitationen und methodische Einschränkungen.....	87
5.6	Ausblick.....	88
6.	VERZEICHNISSE.....	89
6.1	Literaturverzeichnis	89
6.2	Abbildungsverzeichnis	100
6.3	Tabellenverzeichnis	102
7.	LEBENS LAUF	103
8.	PUBLIKATIONS LISTE.....	105
9.	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	106
10.	DANKSAGUNG.....	107

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	<i>Arteria</i>
AB	<i>A. basilaris</i>
Abb	Abbildung
ACA	<i>A. cerebri anterior</i>
ACE	<i>A. carotis externa</i>
ACI	<i>A. carotis interna</i>
ACM	<i>A. cerebri media</i>
AcomP	<i>A. communicans posterior</i>
ACP	<i>A. cerebri posterior</i>
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C57/BL6	Charles River 57/Black 6
CA1	<i>Cornu amonis</i> 1-Segment des Hippocampus
CAC	<i>Circulating Angiogenic Cells</i>
CAW	<i>Circulus arteriosus Willisii</i>
CBF	zerebraler Blutfluss (<i>Cerebral Blood Flow</i>)
CCA	<i>A. carotis communis</i> (<i>Common Carotid Artery</i>)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFU-EC	<i>Colony Forming Unit-Endothelial Cells</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPP	zerebraler Perfusionsdruck (<i>Cerebral Perfusion Pressure</i>)
Cpu	<i>Striatum</i> (<i>Caudate Putamen</i>)
CVRC	Zerebrovaskuläre Reservekapazität (<i>Cerebrovascular Reserve Capacity</i>)
Cy5	Cytochrom 5
d	Wanddicke
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DiI	1,1'- <i>Diocadecyl-3,3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate</i>
EBM®-2	Endothelial Cell Basal Medium-2
ECFC	<i>Endothelial Colony Forming Cells</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM™-2	Endothelial Cell Growth Media Kit-2
EPC	Endotheliale Vorläuferzellen (<i>Endothelial Progenitor Cells</i>)
EphB4	<i>Erythropoietin-producing Human Hepatocellular Carcinoma Receptor B4</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calb Serum</i>)
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>Forward Scatter</i>)
g	Erdschwerebeschleunigung
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
Gl	<i>Glandula</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor</i>
HD	Hochdosiert
HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>

ICP	Intrakranieller Druck (<i>Intracranial Pressure</i>)
LSI	Laser Speckle Bildgebung (<i>Laser Speckle Imaging</i>)
M	<i>Musculus</i>
MAP	Mittlerer arterieller Druck (<i>Mean Arterial Pressure</i>)
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
mmHg	Millimeter Quecksilber
MMP	Matrix Metalloproteinase
MNC	mononukleare Zelle
N	<i>Nervus</i>
N ₂ O	Stickoxydul
NaCl	Natriumchlorid
NOS	<i>Nitrous Oxide Synthetase</i>
NuNu-Maus	Charles River Nacktmaus (<i>Nude Mouse</i> , NMRI nu/nu)
O ₂	Sauerstoff
OACI	Okklusion der <i>A. carotis interna</i>
OACI/E	Okklusion der <i>A. carotis interna / externa</i>
p	Passage
P	Druck
PB-MNC	Mononukleare Zellen des peripheren Blutes (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
P _{CO₂}	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
P _{O₂}	Sauerstoff-Partialdruck
R	Gefäßradius
ROI	Interessierender Bereich (<i>Region of Interest</i>)
RT	Raumtemperatur
S1	Primärer somatosensorischer Kortex
SDF-1 α	<i>Stromal cell-derived factor-1α</i>
SMC	Glatte Muskelzelle (<i>Smooth Muscle Cell</i>)
T	Wandspannung
Tab	Tabelle
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TIA	Transitorische ischämische Attacke
V	<i>Vena</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
α -SMA	α -Aktin der glatten Muskulatur (<i>α-Smooth Muscle Actin</i>)

1. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund/Ziel: Die hämodynamische zerebrale Perfusionsminderung gilt als Risikofaktor für einen Schlaganfall bei Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit der Hirnarterien und trägt mit 10 % zu diesem bei. Als Hauptursache für eine hämodynamische Perfusionseinschränkung wurde der Verschluss der *A. carotis interna* mit einem jährlichen Risiko für einen ischämischen Schlaganfall von 5,5–10 % identifiziert. Die Ausbildung eines primitiven Gefäßnetzwerkes wurde *in vitro* durch Endothelvorläuferzellen, *Endothelial Colony Forming Cells* (ECFC), gezeigt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Potential *ex vivo* expandierter ECFC zum *in vivo* Gefäßwachstum (Arteriogenese) der Hirnarterien mit funktioneller Wiederherstellung des zerebralen Blutflusses zu untersuchen.

Methoden: In einem mehrschrittigen Versuchsaufbau wurde als erstes das Modell der chronisch zerebralen Hypoperfusion (unilaterale Okklusion der *A. carotis interna* und *externa*, OACI/E) bei weiblichen NuNu-Mäusen etabliert (Sham vs. OACI/E). In einem zweiten Experiment wurden NuNu-Mäuse zufällig in die Gruppen entsprechend der Behandlung eingeteilt: ECFC HD (hochdosiert, 1×10^6 Zellen), ECFC (niedrigdosiert, 3×10^5 Zellen), HUVEC (biologische Kontrolle, 3×10^5 Zellen) und *Phosphate Buffered Saline* (PBS, Kontrolle mit der zellfreien Trägerflüssigkeit). Die intravenösen Injektionen erfolgten an den Tagen 0, 3 und 7. In allen Gruppen wurden die Ruheperfusion und die zerebrovaskuläre Reservekapazität mittels Laser Speckle Bildgebung an den Tagen 0, 3, 7 und 14 gemessen. Im Anschluss wurden die basalen und leptomeningealen Hirngefäße aller Tiere an Tag 21 mit Hilfe der Latexangiographie dargestellt. Die Analyse der Mikrogefäßarchitektur (CD31, Desmin, α -SMA, Ki-67) erfolgte an Tag 7 in einer separaten Kohorte durch Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Analyse der ECFC-Inkorporation in den Wirt nach vorangegangener DiI-Färbung erfolgte *in vitro* (Immunhistochemie) und *in vivo* (transkraniale Intravitalmikroskopie).

Ergebnisse: Die erfolgreiche Etablierung des Modells wurde mit einer signifikanten Minderung der CVRC über die gesamte Versuchsdauer belegt ($P < 0.05$, OACI/E vs. Sham). Im Modell der chronisch zerebralen Hypoperfusion bewirkten ECFC eine funktionelle Wiederherstellung der CVRC ($P < 0.05$, ECFC HD vs. PBS; ECFC HD vs. HUVEC). Dieser Effekt zeigte sich in Abhängigkeit der Dosis und wurde nur in der hochdosierten ECFC-Gruppe beobachtet (CVRC,

hochdosiert: $39,9 \pm 10$ %, niedrigdosiert: $32,7 \pm 15$ %). Als anatomisches Korrelat wurde ein Anstieg der Anzahl der leptomeningealen Anastomosen ($P < 0.05$, ECFC HD vs. übrige Gruppen) und der Gefäßdurchmesser ($P < 0.05$, ECFC HD vs. ECFC) identifiziert. Die Effizienz der leptomeningealen Arteriogenese spiegelte sich durch ausbleibendes Gefäßwachstum auf basaler Makrogefäßebene wider.

Schlussfolgerung: ECFC haben im Rahmen der chronisch zerebralen Hypoperfusion das Potential zur funktionellen Wiederherstellung des zerebralen Blutflusses. Diese Effekte zeigen sich in Abhängigkeit von der applizierten ECFC-Dosis. Eine Kompensation des zerebralen Blutflusses auf leptomeningealer Ebene scheint der basalen überlegen zu sein.

ABSTRACT

Objectives: Decrease in hemodynamic cerebral perfusion was found as a risk factor for stroke in patients with arterial occlusive disease and contributes to ischemic strokes in 10 % of the case. Occlusion of the internal carotid artery is identified as a major cause of hemodynamic compromise with an annual stroke risk of 5.5–10 %. *In vitro* formation of a primitive vascular network has been shown in endothelial progenitor cells, endothelial colony forming cells (ECFC).

The aim of the present study is to evaluate the impact of *ex vivo* expanded ECFC in *in vivo* vessel growth (arteriogenesis) in cerebral blood vessels and functional recovery of cerebral blood flow.

Methods: First a model of cerebral hypoperfusion (unilateral occlusion of the internal and external carotid artery, OACI/E) in female NuNu-mice was established (Sham vs. OACI/E). In a second experiment NuNu-mice were divided randomly in subsequent groups: ECFC HD (high-dose, 1×10^6 cells), ECFC (low-dose, 3×10^5 cells), HUVEC (biological control, 3×10^5 cells) and Phosphate Buffered Saline (PBS, control with cell-free medium). All injections were performed intravenously at day 0, 3 and 7. In all groups cerebral baseline perfusion and cerebrovascular reserve capacity (CVRC) were measured at days 0, 3, 7 and 14 by laser speckle imaging. Following analyses of basal and leptomeningeal vessels of the same animals were performed by latexangiography at day 21. Microvasculature (CD31, Desmin, α -SMA, Ki-67) was analysed at day 7 in a separate group by immunofluorescence microscopy. Host vessel interaction of DiI-labeled ECFC was analysed *in vitro* (immunohistochemistry) *in vivo* (transcranial intravitalmicroscopy).

Results: Successful model establishment was proved by a constant, significant decrease in CVRC during the whole experimental time ($P < 0.05$, OACI/E vs. Sham). ECFC-injection resulted in a functional recovery of CVRC in a model of chronic cerebral hypoperfusion ($P < 0.05$, ECFC vs. PBS; ECFC vs. HUVEC). This effect is dose-dependent and only observed in the high-dose group (CVRC, high-dose: 39.9 ± 10 %, low-dose: 32.7 ± 15 %). These results paralleled with an increase in leptomeningeal anastomosis ($P < 0.05$, ECFC HD vs. other groups) and vessel diameter ($P < 0.05$, ECFC HD vs. ECFC). Efficiency of leptomeningeal arteriogenesis was attended by absence of growth in basal macrovasculature.

Conclusion: In cerebral hypoperfusion ECFC potential to functional recovery of cerebral blood flow was shown. These dose-dependent effects seem to be more efficient in blood flow compensation in leptomeningeal levels compared to basal ones.

2. EINLEITUNG

In der Bundesrepublik Deutschland erleiden jährlich fast 300.000 Menschen einen Schlaganfall, ein Drittel davon als Rezidiv (Stand 2012). Er zählt in der Bundesrepublik Deutschland zu der häufigsten Ursache einer Behinderung im Erwachsenenalter.¹ Gemäß der offiziellen Todesursachenstatistik war der Schlaganfall (ICD-10: I60–I69) im Jahr 2008 mit 8 % die dritthäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland.² Schlaganfälle treten vor allem in der zweiten Lebenshälfte auf. Das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden nimmt mit dem Alter zu. In Europa ereignet sich die Hälfte aller Schlaganfälle in einem Alter über 73 Jahren.³ Mit Hinblick auf den demographischen Wandel kommt dem Schlaganfall durch steigende Gesundheitskosten eine zunehmende gesellschaftliche Bedeutung zu.⁴

Ein Schlaganfall (*Stroke*) beschreibt ein akutes Ereignis mit einem fokalen zerebralen Defizit. Prinzipiell können diesem zwei Pathomechanismen zugrunde liegen: eine zerebrale Durchblutungsstörung oder eine intrakranielle Blutung. Dabei ist die zerebrale Ischämie mit 80–85 % die häufigste Schlaganfallursache. Intrazerebralen Blutungen treten in 10–15 % auf.

Die hohe Prävalenz der vaskulären Verschlusskrankheit und das damit einhergehende hohe Risiko eines ischämischen Schlaganfalls sind die Grundlage für die große gesellschaftliche und wissenschaftliche Relevanz der Erforschung alternativer therapeutischer Strategien.

2.1 Chronisch zerebrale Hypoperfusion

Unter den Ursachen für einen ischämischen Infarkt ist eine hämodynamische Perfusionsminderung von einem thrombembolischen Geschehen abzugrenzen. Ein besonders hohes Risiko für hämodynamische Perfusionsminderungen haben Patienten mit einer intra- und extrakraniellen arteriellen Verschlusskrankheit. In diesem Kollektiv trägt die Minderperfusion mit 10 % zu einem ischämischen Infarkt bei.⁵ Die Hauptursache für eine hämodynamische Perfusionsminderung stellt der Verschluss der *Arteria (A.) carotis interna* (ACI) mit einem jährlichen Risiko für einen ischämischen Schlaganfall von 5,5–10 % dar.^{6,7} Dabei ist der Grad der Stenose entscheidend für ihre pathophysiologische Relevanz. Sind über 70 % des Gefäßlumens verlegt, kommt es distal der Stenose zu einer hämodynamisch relevanten Perfusionsminderung.⁸

Bei Patienten mit Okklusion der *A. carotis* konnte eine signifikant verminderte zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC) nachgewiesen werden.^{7,9,10} Bei diesen Patienten (mit reduzierter CVRC) besteht ein jährliches Risiko bis zu 41 % einen Schlaganfall zu erleiden, so dass die Ausschöpfung der CVRC mit dem Auftreten eines Schlaganfalls korreliert.^{7,11}

2.1.1 Zerebrovaskuläre Reservekapazität

Die CVRC beschreibt die Steigerung des zerebralen Blutflusses (CBF) aufgrund der Dilatationsfähigkeit der zerebralen Widerstandsgefäße als Antwort auf einen bestimmten Stimulus (z. B. Erhöhung des Kohlenstoffdioxid-Partialdruckes [P_{CO_2}] oder Gewebsazidose). Sie stellt somit einen endogenen Kompensationsmechanismus bei vermindertem CBF dar, mit welchem trotz prästenotischer Minderperfusion eine gleichbleibende bzw. gesteigerte poststenotische zerebrale Perfusion durch Minderung des Strömungswiderstandes bewirkt werden kann. Die vaskuläre Dilatations- und Konstriktionsfähigkeit beruht dabei im Wesentlichen auf dem Muskeltonus der präkapillaren Widerstandsgefäße, den Arteriolen. Diese reagieren direkt und sehr sensibel auf Änderungen des P_{CO_2} mit einer Vasodilatation oder -konstriktion. Eine Minderung der CVRC spiegelt somit einen Zustand der Beeinträchtigung der metabolischen Funktion wider.

Anhand experimenteller Untersuchungen der CVRC lassen sich Informationen über den vasomotorischen Funktionszustand der zerebralen Arteriolen gewinnen. In der klinischen Praxis findet hierbei der Acetazolamid (Diamox®) Test bei Patienten mit chronisch zerebraler Hypoperfusion im Zusammenhang mit operativen revaskularisierenden Verfahren Anwendung.¹² Die CVRC lässt sich aus der Differenz zwischen dem basalen und dem Anstieg des zerebralen Blutflusses nach Acetazolamid-Applikation bestimmen.¹³ Der genaue Wirkmechanismus von Acetazolamid ist weitgehend ungeklärt. Es ist bekannt, dass Erythrozyten funktionell als Haupttransporteure des Kohlenstoffdioxids (CO_2) fungieren. Sie enthalten das Enzym Carboanhydrase, welches die Hydratation des CO_2 erleichtert. Es wird angenommen, dass Acetazolamid eine Hemmung der Carboanhydrase in den Erythrozyten und konsekutiv einen Anstieg des Eduktes, dem im Blut physikalisch gelösten CO_2 bewirkt. Die erhöhte CO_2 -Konzentration führt letztendlich zu einer reaktiven zerebralen Vasodilatation.¹⁴

Bei der Betrachtung der CVRC ist prinzipiell die Abgrenzung zur zerebralen Autoregulation zu beachten. Diese beschreibt die konstante Aufrechterhaltung des mittleren arteriellen Druckes in Bereichen zwischen 60 und 160 mmHg durch gegenregulatorische Vasodilatation und -konstriktion. Im Gegensatz zur CVRC erfolgt die Reaktion der Blutgefäße bei der Autoregulation allein auf Blutdruckänderungen. Im Allgemeinen ist bei verminderter CVRC auch mit einer eingeschränkten Autoregulation zu rechnen – jedoch liegen beiden Mechanismen unterschiedliche Reaktionen zugrunde. So konnte im Rahmen einer Studie bei Patienten mit aufgehobener CVRC weiterhin eine Vasodilatation in Orthostase bewirkt werden.¹⁵

2.1.2 Therapie der chronisch arteriellen Verschlusskrankheit der *A. carotis*

Fehlende vaskuläre Kollateralisierung bei signifikanten Stenosen ($\geq 70\%$) erhöhen das Schlaganfallrisiko um das 6-fache.¹⁶ Ein vermindertes oder defektes Kollateralnetzwerk kann somit als wichtiger Risikofaktor für einen ischämischen Schlaganfall betrachtet werden. Für die Therapie bzw. Prophylaxe eines Schlaganfalles stellt die Kollateralgefäßversorgung eine besondere Bedeutung dar. Therapeutisch stellt die medikamentöse Plättchenaggregationshemmung (325 mg Aspirin täglich für die gesamte postinsult Phase und zusätzlich 75 mg Clopidogrel pro Tag über eine Zeitspanne bis 90 Tage postinsult) aktuell den Goldstandard dar.¹ Alternativ werden direkte (Bypass zwischen der *A. temporalis superficialis* und der *A. cerebri media* [ACM]) und indirekte Bypass-Operationen (wie Encephaloduroarteriomyosynangiosis) zwischen intra- und extrakranialen Gefäßen durchgeführt.¹⁷ Eine Verbesserung der Hämodynamik bei der symptomatischen atherosklerotischen Verschlusskrankheit der ACI wird kontrovers diskutiert.^{18,19} Ein weiteres Verfahren – jedoch für die symptomatische atherosklerotische Verschlusskrankheit der ACI bislang ohne klinische Evidenz – stellt die interventionell radiologisch durchgeführte Gefäßdilataion (perkutane transluminale Angioplastie und Stentimplantation) dar. Fehlende Methoden zur therapeutisch induzierten Gefäßneubildung bedingen die Notwendigkeit der Entwicklung alternativer Revaskularisierungstechniken.

2.2 Gefäßwachstum

Blutgefäße gehen aus endothelialen Vorläuferzellen hervor, welche mit hämatopoetischen Zellen aus einem gemeinsamen Vorläufer, dem Hämangioblasten, stammen und eine enge Verbindung zwischen dem Blut und dem vaskulären System erkennen lassen.²⁰ Nach heutigem Wissensstand wird das Blutgefäßwachstum (beim erwachsenen Menschen) in drei Formen, die Vaskulo-, Angio-, und Arteriogenese, unterteilt welche im Folgenden näher erläutert werden.²¹ Eine nach Carmeliet *et al.*²² modifizierte schematische Darstellung des Gefäßwachstums ist in der *Abbildung (Abb.) 1* dargestellt.

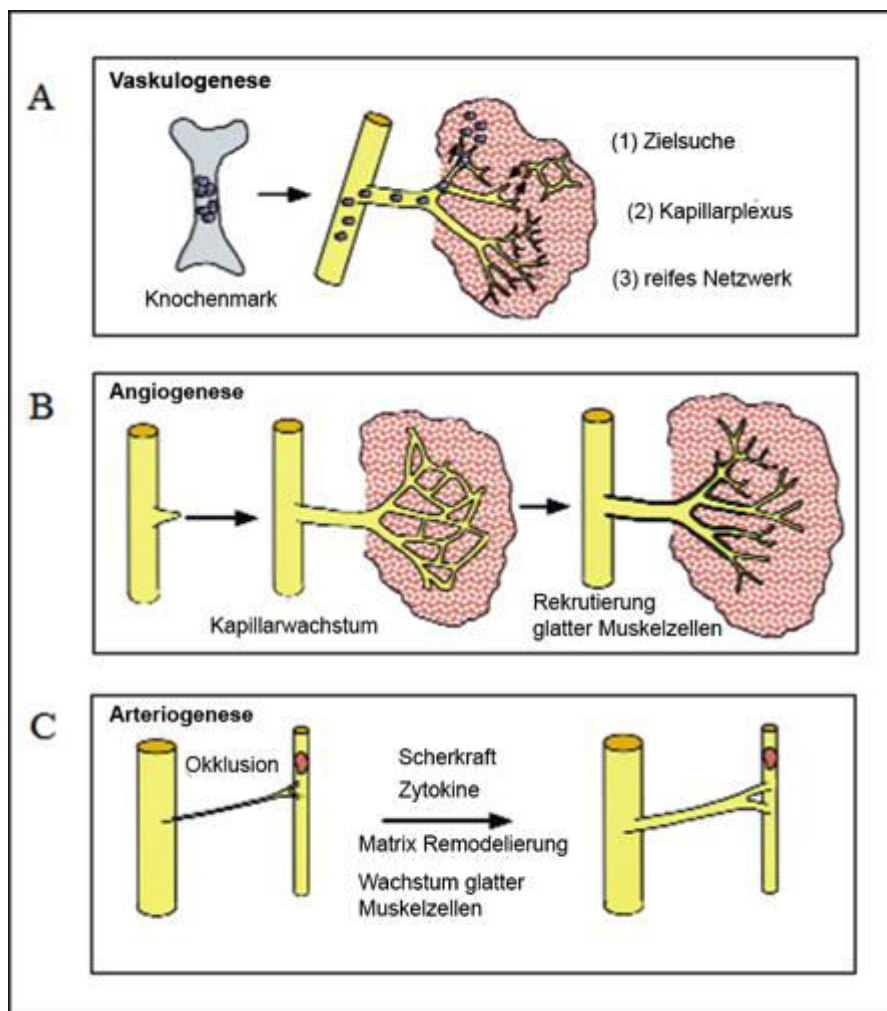


Abbildung 1: Formen des Gefäßwachstums

A) Vaskulogenese: Einwanderung von Angioblasten und Ausbildung von Blutgefäßen, B) Angiogenese: Kapillarsprossung aus vorhandenen Blutgefäßen, C) Arteriogenese: Rekrutierung von Kollateralgefäßen. Modifiziert nach Carmeliet *et al.*²²

2.2.1 Vaskulogenese

Die Vaskulogenese beschreibt die Migration und die *in situ* Differenzierung von undifferenzierten Vorläuferzellen (Angioblasten) zu Endothelzellen, welche in der Folge zu einem primitiven Gefäßplexus verschmelzen (*Abb. 1*).²² Daraus resultiert eine *de novo* Blutgefäßbildung, welche sowohl prä- als auch postnatal stattfindet.²² Obwohl die Vaskulogenese hauptsächlich in der Embryonalphase vorkommt, konnte dieser Prozess auch postnatal und beim Erwachsenen gezeigt werden. Dabei werden Endothelvorläuferzellen bzw. aus dem Rückenmark stammende Zellen lokal in das Gefäßbett eingebaut.^{23,24}

2.2.2 Angiogenese

Im Gegensatz zur Vaskulogenese findet das Blutgefäßwachstum sowohl bei der Angio- als auch der Arteriogenese an bereits vorhandenen Blutgefäßen statt. Angiogenese beschreibt einen mehrschrittigen Prozess mit dem Ziel der Aussprossung neuer, kleinkalibriger Kapillaren aus einem vorhandenen Kapillarplexus (*Abb. 1*).²⁵ Hierbei proliferieren die Kapillaren entweder durch Sprossung oder intussuszeptiv*.²² Es entsteht dabei eine Zunahme der Gefäßdichte und des Gesamtwiderstandes ohne Erhöhung der arteriellen Versorgung oder des Nettoblutflusses. Die Angiogenese stellt somit einen unzureichenden Kompensationsmechanismus bei einer Gefäßokklusion dar.²⁶

Die Angiogenese ist durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen verschiedenen Zellen, Faktoren und der Extrazellulärmatrix charakterisiert. Der wichtigste Initiator der Angiogenese ist eine lokale Hypoxie. Eine Hypoxie führt zu einem verringerten Sauerstoffpartialdruck und leitet dadurch die Expression von hypoxieabhängigen Genen und des Transkriptionsfaktors *Hypoxia-inducible Factor-1* (HIF-1) ein. Voraussetzungen für die Aussprossung neuer Gefäße sind die Proteolyse der umgebenden Extrazellulärmatrix durch das Plasminogen Aktivator System und Matrix Metalloproteinasen (MMP). Als wesentliche Mediatoren der Signalkaskade wurden bislang die Chemokine aus der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Familie, Angiopoetin-1 und -2 identifiziert. Daneben haben Untersuchungen dem Ephrin-System und den Integrinen, einer Gruppe von Zelladhäsionsrezeptoren, eine bedeutende Rolle während der Angiogenese zugesprochen.^{22,23,25}

* Intussuszeption beschreibt die Proliferation des Endothels von der Gefäßwand in das Lumen hinein. Dabei wird ein zweites Lumen gebildet wodurch ein neues Blutgefäß entsteht.²⁹

2.2.3 Arteriogenese

Ausgelöst durch Scherkräfte und veränderte Strömungseigenschaften ist die Arteriogenese durch eine Zunahme des Gefäßdurchmessers proliferierender Endothel- und glatter Muskelzellen in Arterien und Arteriolen ohne Aussprossung neuer Kapillaren gekennzeichnet (*Abb. 1*). Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille[†] erfolgt durch die Zunahme des Gefäßdurchmessers eine Steigerung des Nettoblutflusses und gleichzeitig auch eine Absenkung der Scherkräfte. Letzteres ist auch für die Selbstlimitierung dieses Kompensationsmechanismus verantwortlich und könnte eine Erklärung für eine unvollständige Kompensation bei arteriellem Verschluss sein.²⁶

Im Bereich einer arteriellen Stenose oder Okklusion entsteht ein okklusionsbedingter Druckgradient über dem vorhandenen Kollateralgefäßbett. Dieser führt durch Veränderung der Blutströmungsgeschwindigkeit und -eigenschaften in der Folge zu einer Zunahme der Scherkraft[‡]. Über endotheliale, membranständige Rezeptoren und Ionenkanäle, z. B. TRPV4,²⁷ modulieren die Scherkräfte die Expression verschiedener Gene, zum Beispiel die Aktivierung der Promoterregion *Shear Stress Responsive Element*.²⁸⁻³¹ Im Rahmen der Synthese verschiedener Zytokine wie *Nitrous Oxide Synthetase* (NOS), *Platelet Derived Growth Factor*³² nimmt die Bildung von *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) durch glatte Muskelzellen eine entscheidende Funktion ein.³¹ MCP-1 führt zu einer erhöhten Chemoattraktion von mononuklearen Zellen, allen voran Monozyten.^{33,34} Über den monozytären *Macrophage* (Mac)-1-Rezeptor an den endothelialen Rezeptoren *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) und den *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* kommt es zu einer gesteigerten Adhäsion und Migration³⁵⁻³⁸ – insbesondere in die Adventitia, wo eine Transformation in Makrophagen stattfindet.²⁶ Diese und glatte Muskelzellen sezernieren weitere proinflammatorische Moleküle wie *Tumor Necrosis Factor- α* ^{39,40} und *inducible NOS*.^{26,32} Die Hochregulierung von monozytären Überlebensfaktoren wie *Granulocyte Monocyte-Colony*

[†] Gesetz von Hagen-Poiseuille: $Stromstärke (I) = \frac{V}{t} = \frac{\pi r^4 \Delta P}{8 \eta l}$ (V = Volumen, t = Zeit, r = Lumenradius, ΔP =Druckdifferenz zwischen Rohranfang und -ende, η = Viskosität der Flüssigkeit, l = Länge des Rohres). Der größten Bedeutung kommt dieser Gesetzmäßigkeit zu, dass der Strömungswiderstand bei laminarer Strömung mit der 4. Potenz der Radiusänderung abnimmt.

[‡] Bei der Scherkraft handelt es sich um eine auf eine Fläche wirkende Kraft, deren Richtungsvektor parallel zu dieser Fläche liegt.

Stimulating Factor (GM-CSF) ermöglichen ein stabiles Umfeld für die Monozytenproliferation.^{32,41} Monozyten/Makrohagen bilden Wachstumsfaktoren wie VEGF-A⁴² und *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2)^{39,42} und regen die Mitose in Endothel- und glatten Muskelzellen an.⁴³⁻⁴⁵ Die folgende Phase der Remodellierung ist durch eine Umstrukturierung der Gefäßwand³² sowie eine Lockerung der umliegenden Extrazellulärmatrix durch MMPs gekennzeichnet. Dadurch wird der nötige Raum für das wachsende Gefäß geschaffen.⁴⁶

Von den oben genannten Mechanismen der Gefäßneubildung kommt es *nur* bei der Arteriogenese zu einer Erhöhung des Nettoblutflusses. Somit stellt die künstlich erzeugte Induktion der Arteriogenese eine therapeutische Behandlungsstrategie minderperfundierter Gehirnareale wie bei der stenookklusiven Gefäßerkrankung dar. Die erfolgreiche Induktion der Arteriogenese haben Buschmann *et al.* mit Hilfe der Stimulierung durch Wachstumsfaktoren nachgewiesen.⁴¹ Ein anderer Ansatz, der in dieser Arbeit erläutert werden soll, ist die Stimulierung der Arteriogenese durch die Applikation von (spät ausdifferenzierten) endothelialen Vorläuferzellen.

2.3 Endotheliale Vorläuferzellen

Im humanen, peripheren Blut zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (EPC) wurden erstmalig im Jahr 1997 durch Asahara *et al.* beschrieben.⁴⁷ Dieses Erkenntnis hat das vormals bestandene Dogma der alleinigen Neovaskularisation während der Embryonalphase durchbrochen. EPC scheinen eine wichtige Rolle in der postnatalen Neovaskularisation zu spielen.^{48,49} Entgegen vergangener Kenntnisse nach Erstbeschreibung sind EPC nicht nur als struktureller Reservemechanismus des Knochenmarkes, sondern vielmehr als Teil eines ständigen Umbauprozesses der Blutgefäße mit Rekrutierung von EPC aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut anzusehen. Als EPC werden in der Literatur häufig endotheliale Vorläuferzellen unterschiedlicher Differenzierungsstufen zusammengefasst. Innerhalb der heterogenen Gruppe der EPCs stellen *Endothelial Colony Forming Cells* (ECFC) eine Subpopulation *spät ausdifferenzierter* Endothelvorläuferzellen dar.

2.3.1 Charakterisierung

ECFC konnten erfolgreich aus dem peripheren Blut erwachsener Menschen, aus Nabelschnurblut von Neugeborenen, aus der fetalen Leber, aus Knochenmark⁵⁰⁻⁵⁴ und in jüngerer Vergangenheit auch aus dem weißen Fettgewebe (Erstbeschreibung 2013)⁵⁵ gewonnen werden.

EPCs können anhand ihres Wachstumsverhaltens in der Zellkultur oder durch spezifische Oberflächenantigene charakterisiert werden.

Gemäß der Zellkultivierungstechnik wurden von Prater *et al.* drei verschiedene EPC-Populationen beschrieben: (a) *Colony Forming Unit-Endothelial Cells* (CFU-EC), (b) *Circulating Angiogenic Cells* (CAC), auch als *early outgrowth* oder *Pro-angiogenic Cells* bekannt, und (c) ECFC (Abb. 2).⁵⁶ Zuletzt genannte proliferieren erst nach 1–2 Wochen und werden somit als *late outgrowth* (Spätauswuchs) EPC oder ECFC bezeichnet. Nur ECFC zeigen endotheliale Eigenschaften und haben das Potential zur Entwicklung reifer Endothelzellen⁵⁷ sowie der Inkorporation in vorhandene Blutgefäße.^{51,58-62} Davon abzugrenzen sind primär nicht adhärente Zellen, welche im Vergleich zu ECFC früh - nach 48 Stunden - eine Adhäsion zeigen. Diese Zellen mit angiogenetischen-monozytären Eigenschaften werden als *early outgrowth* (Frühauswuchs) EPC bezeichnet und besitzen nicht die Fähigkeit der Differenzierung zu Endothelzellen. Ihre Effekte werden vielmehr der Produktion von Wachstumsfaktoren zugesprochen.⁶³

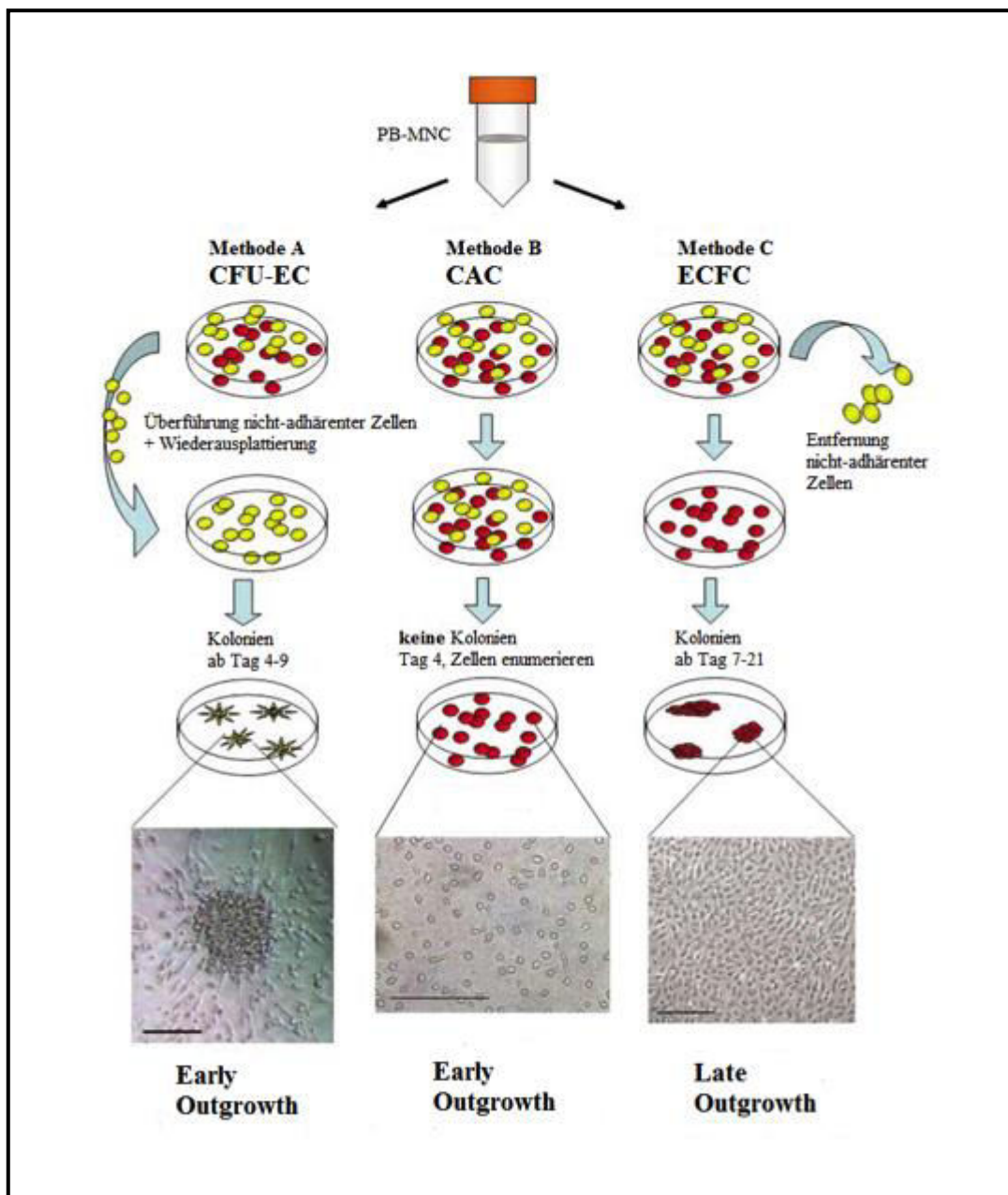


Abbildung 2: Methoden zur endothelialen Vorläuferzellgewinnung

Allen Zellkulturprotokollen dienen mononukleare Zellen aus dem peripheren Blut als Ursprung (PB-MNC). Methode A) *Colony Forming Unit-Endothelial Cells* (CFU-EC) werden aus primär nicht-adhärenter Zellen gewonnen und bilden bereits zu einem *frühen* Zeitpunkt Kolonien aus, Maßstabsleiste=100 μm ; Methode B) *Circulating Angiogenic Cells* (CAC) sind adhärenere mononukleare Zellen, die sich nach einem 4- bis 7-tägigen Kultivierungsprozess darstellen. Sie bilden typischerweise *keine* Kolonien aus, Maßstabsleiste=200 μm ; Methode C) *Endothelial Colony Forming Cells* (ECFC) werden nach 7 bis 21 Tagen aus reinen adhärenteren mononuklearen Zellen unter endothelzellspezifischen Bedingungen gewonnen. Diese Zellen bilden Kolonien aus und besitzen eine charakteristische pflastersteinartige Morphologie, Maßstabsleiste=400 μm . Modifiziert nach Prater *et al.*⁵⁶

Neben der Charakterisierung über das Verhalten in der Zellkultur werden ECFC über die Oberflächenantigenexpression charakterisiert. Verschiedene Autoren charakterisieren uneinheitlich das Expressionsmuster der Oberflächenproteine der (a) hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD34, CD133, CD45) und (b) der endothelialen Zellen (VEGFR-2, PECAM [CD31], CD144, CD146, CD105, von Willebrand Faktor, acetyliertes *Low Density Lipoprotein*, Lectin-Bindung wie *Ulex Europaeus* Agglutinin-1). Nicht abschließend geklärt ist die Frage, ob sich ECFC aus hämatopoetischen oder nicht-hämatopoetischen Vorläuferzellen entwickeln.^{62,64-71} Veränderungen des Oberflächenproteinexpressionsmusters der ECFC während der *in vitro* Zellreifung deuten auf einen Wechsel von einem hämatopoetischen zu einem endothelialen Phänotyp hin.⁶⁴

2.3.2 *In vitro* Gefäßneubildung

Zur Untersuchung der *in vitro* Gefäßneubildung wurden *Tube-Formation Assays* entwickelt. Dabei wird die Bildung neuer Gefäße in einem Matrigelassay durch eine Extrazellulärmatrix, basierend auf (aus Mäusen stammenden) Sarkomzellen, unterstützt. Es wurde gezeigt, dass ECFC im Gegensatz zu anderen EPC unter den o. g. Bedingungen in der Lage sind *in vitro* ein primitives Gefäßnetz zu bilden.⁷² In der *Abb. 3* ist die *in vitro* Ausbildung eines primitiven Gefäßnetzes nach Anfärbung mit Calcein nach 24 Stunden gezeigt.

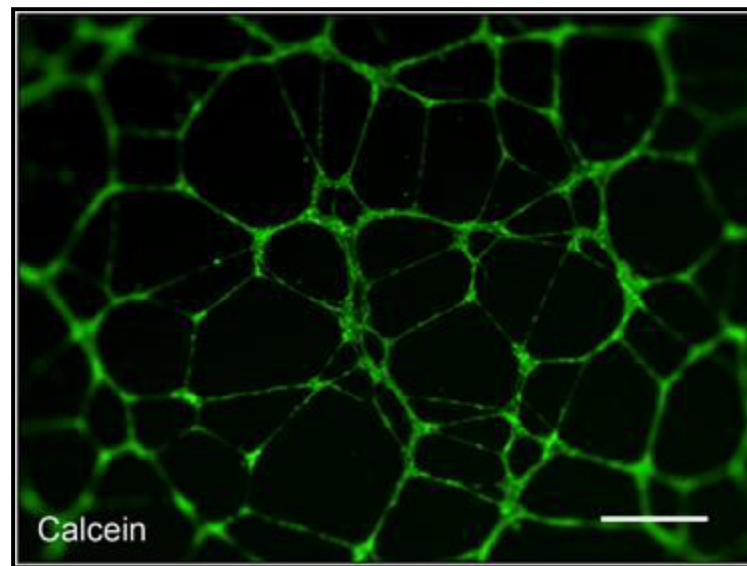


Abbildung 3: *In vitro* Bildung eines primären Gefäßnetzwerkes durch ECFC

Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer *in vitro* Ausbildung eines primären Gefäßnetzwerkes durch ECFC mittels Tube-Formation Assay nach 24 Stunden. Maßstabsleiste=50 μ m. Mit freundlicher Genehmigung von Irina Kremenetskaia, Experimentelle Neurochirurgie, Charité–Universitätsmedizin Berlin.

2.3.3 Rolle der ECFC bei Gefäßreparaturen und Neovaskularisation

In vitro kultivierte ECFC bzw. EPC benötigen ca. 10–20 Tage bis sie zu adhären, weiterdifferenzierten Endothelvorläuferzellen reifen, um daraufhin in der Zellkulturflasche als Monolayer weiter zu expandieren. *In vivo* ist dieser Vorgang durch Interaktion mehrerer Zelltypen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Matrixproteinen weitaus komplexer und bislang weitgehend unerforscht.

Es wurde gezeigt, dass ECFC u. a. im peripheren Blut als zirkulierende Zellen vorkommen⁵¹ und diese als stark proliferierende, endothelzellartige Zelltypen an Reparaturmechanismen und Neovaskularisation beteiligt sind.⁷³⁻⁷⁶ Bei entsprechendem Endothel- bzw. Gefäßschaden werden ECFC mobilisiert und an den Ort des Geschehens geleitet. Zweites wird als *Homing* bezeichnet und beinhaltet einen mehrschrittigen Prozess mit Migration und Adhäsion an freigelegter Extrazellulärmatrix. Unter Regulation verschiedener Zytokine und entsprechender Rezeptoren differenzieren die Vorläuferzellen zu reifen Endothelzellen, um im Anschluss neue Gefäße bilden zu können.⁷⁷ Als angiogenetische, an der Mobilisierung von EPC beteiligte Zytokine wurden

bislang in verschiedenen Studien VEGF,⁷⁸ *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (G-CSF),⁷⁹ GM-CSF,⁸⁰ Erythropoetin,^{81,82} *Stromal cell-derived factor-1 α* (SDF-1 α),⁸³⁻⁸⁵ E-Selectin,⁸⁶ die Membranproteine *Erythropoietin-producing Human Hepatocellular Carcinoma Receptor* B4 (EphB4), Ephrin-B2⁸⁷ und β 2-Integrine⁸⁸ sowie die Rezeptoren *CXC Chemokine Receptor 2*,⁸⁹ beschrieben. Heissig *et al.* schreiben der MMP-9 eine mögliche Schlüsselrolle zu Beginn der Rekrutierungskaskade von endothelialen Stammzellen durch Freisetzung des Zytokins *Soluble Kit-ligand* zu.⁹⁰ Weiterhin bleibt zu bemerken, dass diese Studien einzelne Hinweise auf die Beteiligung an Reparaturmechanismen bzw. Neovaskularisation liefern, ohne dabei ein vollständiges Verständnis über den gesamten Ablauf zu leisten.

2.3.4 *In vivo* Studien zu EPC in diversen Ischämie modellen

Nachdem das Potential der EPC zur Organvaskularisation und -regeneration gezeigt wurde,⁴⁹ ist das Interesse an *in vivo* Studien im letzten Jahrzehnt gestiegen. Erstmals hat die Arbeitsgruppe von Kalka *et al.* die therapeutische Neovaskularisation durch humane EPC im Modell der Hinterbeinischämie bei der Nacktmaus gezeigt.⁹¹ Die Ergebnisse von Murohara *et al.* konnten ebenfalls die Gefäßneubildung und die Blutflusssteigerung nach EPC-Transplantation in der (athymischen) Nacktmaus zeigen.⁹² Seit diesen Erkenntnissen wurden auch *in vivo* Untersuchungen zur Ischämie in anderen Organsystemen durchgeführt. Experimentell wurde das postnatale Gefäßwachstum durch EPC im Modell der Myokardischämie bei der (athymischen) NuNu-Ratte⁹³⁻⁹⁵ und im Mausmodell der Hautlappenischämie demonstriert.⁹⁶ Auch im Gehirn konnte *in vivo* das zerebrale Gefäßwachstum nach EPC-Injektion im zerebralen Ischämiemodell bei der C57 BL/6-, FVB- und Nacktmaus gezeigt werden.⁹⁷⁻⁹⁹

2.4 Modell der immunkompromittierten Maus

Zur Erforschung eines grundlegenden Verständnisses und verschiedenster Therapien zur Gefäßneubildung wurden in jüngster Vergangenheit verschiedene Modelle der chronisch zerebralen Hypoperfusion entwickelt. Eine eingeschränkte CVRC konnte im Modell der Ratte und der C57 BL/6-Maus nachgewiesen werden.^{41,100,101} Im Mittelpunkt stehen Überlegungen zum Gefäßwachstum durch (endotheliale) Vorläuferzellen oder Wachstumsfaktoren wie

GM-CSF. Die Maus hat als Versuchstier durch die Vielfalt genetisch manipulierter Stämme mit Über- und Unterexpression einzelner Gene an Bedeutung gewonnen.¹⁰²

2.4.1 Die NuNu-Maus (NMRI nu/nu)

Im Rahmen des Experimentes werden ECFC *humanen* Ursprungs verwendet. Um immunologische Abstoßungsreaktionen möglichst gering zu halten, wird in diesem Experiment die NuNu-Maus (Nacktmaus, NMRI nu/nu) verwendet. Bereits in anderen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass die NuNu-Maus durch ihr herabgesetztes Immunsystem zur Implantation xenogenen Gewebes wie humane Tumore geeignet ist.^{103,104} Erstmals hat Flanagan, S.P. im Jahr 1966 von der NuNu-Maus berichtet und diese weiter charakterisiert.¹⁰⁵ Eine der markantesten Eigenschaften der NuNu-Maus ist neben dem Fehlen der Haare, das kongenitale Fehlen des Thymus durch einen Defekt im Ektoderm während der Embryonalphase. Hierbei kommt es zu einer fehlenden Ausreifung von T-Zellen, welche im Rahmen der zellvermittelten Immunabwehr eine zentrale Rolle spielen.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Darüber hinaus wurde eine absolute Verringerung der Lymphozytenzahl im zirkulierenden Blut sowie in den Lymphknoten gefunden. Dagegen wurden eine normale, thymusunabhängige Population von Plasmazellen, die Bildung von Antikörpern sowie eine im Alter zunehmende Hyperplasie der retikulären Zellen beobachtet.¹⁰⁹

2.4.2 Chronisch zerebrale Hypoperfusion bei der Nacktmaus

An der Charles River 57/Black 6 (C57/BL6) Maus wurde gezeigt, dass das Modell der chronischen Hypoperfusion an dieser Spezies reproduzierbar ist.¹⁰⁰ Aktuell gibt es kein chronisch zerebrales Hypoperfusionsmodell in einer immunkompromittierten Maus (wie der NuNu-Maus). Aufgrund der heterogenen Kollateralisierung zwischen den diversen Mausstämmen und den damit verbundenen unterschiedlichen Reaktionen auf ischämische Reize¹¹⁰ ist die Etablierung eines Hypoperfusionsmodelles für jeden Mausstamm notwendig. Darüber hinaus ist bei der Etablierung eines solchen Modelles die chronisch zerebrale Hypoperfusion von einer globalen Ischämie abzugrenzen. Bei Ersterer wird ein Schwellenwert an der Grenze zur Ischämie zwar erreicht, jedoch nicht überschritten und somit kein Infarkt induziert.

Mit Hilfe eines chronisch zerebralen Hypoperfusionsmodelles in der NuNu-Maus bestünde eine weitere Möglichkeit, pathophysiologische Zusammenhänge und die Therapie der chronisch arteriellen Verschlusskrankheit durch xenogene Zellimplantation zu erforschen.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Kollateralgefäßwachstum stellt einen zentralen Ansatzpunkt für die Therapie bzw. Prävention einer chronisch zerebralen Hypoperfusion dar. Problematisch dabei ist, dass das Kollateralgefäßwachstum von der Endothelzell- und Perizytenproliferation abhängig ist und diese beiden Faktoren naturgemäß limitiert sind. Daher werden alternative Wege benötigt, um dieses endogene Kollateralgefäßwachstum zu stimulieren. Möglichkeiten hierfür sind direkte Wachstumsfaktorapplikation oder indirekte Applikation der Faktoren über sezernierende (endotheliale Vorläufer-) Zellen. Das grundsätzliche Potential der *in vitro* Neubildung eines primären Gefäßgeflechtes durch ECFC wurde bereits gezeigt. Das Hauptziel dieser Arbeit ist es den Einfluss von ECFC auf die *in vivo* Arteriogenese bei der chronisch zerebralen Hypoperfusion zu charakterisieren. Dazu wurden mit Hilfe eines mehrstufigen Versuchsaufbaus in der NuNu-Maus folgende Fragen geklärt:

- Welchen Einfluss hat die unilaterale Okklusion der ACI und *A. carotis externa* (ACE) auf die zerebrale Ruhedurchblutung, die CVRC sowie die zerebralen Mikro- und Makrogefäße bei der NuNu-Maus (Modelletablierung der chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der NuNu-Maus)?
- Wie beeinflussen ECFC die zerebrale Ruhedurchblutung und die CVRC im Modell der chronisch zerebralen Hypoperfusion?
- Welchen Einfluss haben ECFC auf die Gefäßneubildung auf mikro- und makrovaskulärer Ebene im Modell der chronisch zerebralen Hypoperfusion?
- Schließlich soll eine direkte *in vivo*- und *in vitro*-Lokalisation der ECFC nach Injektion im Modell der chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der NuNu-Maus gezeigt werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Endothelial Colony Forming Cells (ECFC)

ECFC wurden aus einem Reservoir CD34 positiver mononuklearer Zellen aus humanem Nabelschnurblut, wie von Prater *et al.*⁵⁶ und Critser *et al.*¹¹¹ beschrieben, gewonnen und durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Karen Bieback, Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie der Universität Heidelberg/Mannheim, kultiviert und ab Passage (p) 3 (*vgl. 2.3.1*) zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden ECFC aus drei verschiedenen Nabelschnurblutproben verwendet. Die ECFC-Gewinnung erfolgte nach Einwilligung der Mütter und nach den lokalen Gesetzen und ethischen Richtlinien.⁶⁴

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Die kommerziell gewonnenen HUVEC (Lonza, Walkersville, US) sind reife, ausdifferenzierte Endothelzellen und stammen aus humanen Nabelschnüren. Sie stellen innerhalb endothelialer Zelllinien eine biologische Kontrolle zu möglichen spezifischen Vorläuferzeleigenschaften dar. Für die Zellinjektion wurden HUVEC äquivalent zu den ECFC Zellkulturen bis zur p5 verwendet.

3.1.2 Mäuse

Weibliche, erwachsene NuNu-Mäuse (Nacktmaus, NMRI *Nude Mouse*, NMRI nu/nu; Charles River, Sulzfeld, DE) im Alter von 6–8 Wochen (Ankunftsgewicht 23–27 g) wurden in einer Gruppenstärke von bis zu 6 Tieren pro Käfig unter kontrollierten, artgerechten Bedingungen (Temperatur 21–22°, Luftfeuchtigkeit 60 %, Lichtperiode 6–18 Uhr) gehalten. Alle Mäuse erhielten freien Zugang zu Standardtrockenfutter und Wasser. Nach Ankunft wurde allen Tieren eine einwöchige Eingewöhnungszeit gewährleistet. Die Tierversuche erfolgten gemäß der Tierschutzbestimmung des Landes Berlin vom 13.05.2008, Aktenzeichen G 0262/07.

3.1.3 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analyse- und Feinwagen Abj	Kern
Begasungsbrutschrank	Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometer; FACS Canto™ II	BD Pharmingen™
Eisbereiter	Scotsman
Fluoreszenzmikroskop; Zeiss Axio Observer Z1	Zeiss
Gefrierbox	Carl Roth
<i>In vivo</i> Multifluoreszenzvideomikroskop: Axiotech vario Mikroskop, Attoarc / integriertes Kamerasystem	Zeiss / Kappa
Inkubator Heraeus BBD620	Thermo Fisher Scientific
Kryostat MICROM HM 560	MICROM
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr
Laser Speckle Gerät (<i>Laser Speckle Imager</i>)	MoorFLPI; Moor Instruments
Magnetrührer Yellowline	MSH
Mikrobohrer	Fine Science Tools
Operationsmikroskop M650	Wild/Leica Microsystems GmbH
S-VHS-Rekorder	Panasonic
Sicherheits-Sterilwerkbänke Hera Safe	Thermo Fisher Scientific
Vortex-Genie II	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert
Zellzähler: Casy	Roche
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific

3.1.4 Material

Tabelle 2: Verwendetes Material

Material	Hersteller
Flexüle: Innendurchmesser 0,76 mm, Vasofix Braunüle	Braun
Ligatur: 4-0, geflochten, Ethibond Excel	Ethicon
Ligatur: 5-0, monofil, Prolene	Ethicon
Ligatur: 7-0, monofil, resorbierbar, PDS*II	Ethicon
Ligatur: 8-0, monofil, Seide, Suprama	Feuerstein GmbH
Filter: Millex®GP, 0,22 µm	Merck Millipore
Totraumvolumenfreie Spritze: BD Micro-Fine Sterile Spritzen, Kanüle 0,30 mm (30G) x 8mm	Becton Dickinson
Zellkulturflasche: Falcon™, 25 cm ² /75 cm ²	BD Bioscience

3.1.5 Puffer und Standardlösungen

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Standardlösungen

Puffer / Standardlösungen	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	100 ml TBS/T, 5g Magermilchpulver
Casein 0,5 %	5 g/l PBS
Casein 1 %	10 g/l PBS
Casyton	Roche
PBS/BSA	PBS + 1 g/l BSA
<i>Tris Buffered Saline</i> (TBS)	87,66 g NaCl, 12,11g Tris base pH 7,4 in dH ₂ O

3.1.6 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Lösungen/Suspensionen

Chemikalien	Hersteller
0,9 % Natriumchlorid-Lösung (NaCl)	Merck Millipore
1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)	Life technologies
2 %-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran-Lösung	Sigma
Einbettmedium Jung	Leica Microsystems
IS Mounting Medium PI + 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Dianova
Latex/Carbon Black Lösung: Latex (Chigaco Latex Product no. 563) + 20 µl/ml Carbon Black (Derussol N25/L) + NaCl, 10:2	Chigaco Latex Products
Methanol	Merck Millipore
Paraffinöl	Charité Apotheke
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Gibco® life technologies
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	PAA Laboratories

3.1.7 Antikörper

Tabelle 5: Immunhistochemie – Primäre Antikörper

Antigen	Epitop	Hersteller
CD31	Ratte gegen Maus	Pharmingen™
Desmin	Kaninchen gegen Maus	Abcam
α-SMA	Maus IgG	Sigma-Alldrich
Ki-67	Kaninchen gegen Maus	Thermo Scientific

Tabelle 6: Immunhistochemie – Sekundäre Antikörper

Epitop	Fluorochrom	Hersteller
Esel gegen Ratte	Cy5	Dianova
Schaf gegen Kaninchen	Cy3	Dianova
Esel gegen Kaninchen	FITC	Dianova

Tabelle 7: FACS – Antikörper

Antigen	Epitop	Hersteller
CD146	Maus gegen Human	BioLegend®
CD105	Maus gegen Human	BioLegend®
CD34	Maus gegen Human	BD Pharmingen™
CD133	Maus gegen Human	Miltenyi Biotec
VEGFR-2	Maus gegen Human	R&D Systems
CD45	Maus gegen Human	BD Pharmingen™

3.1.8 Zellmedium

Tabelle 8: Medium für Zellkultur

Medium / Zusatz	Hersteller
Endothelial Cell Basal Medium-2 (EBM®-2) + Endothelial Cell Growth Media Kit-2 (EGM™-2) SingleQuots®	Lonza
Einfriermedium	
<input type="checkbox"/> 10 % Dimethylsulfoxid	Merck Millipore
<input type="checkbox"/> 90 % Fötale Kälberserum	PAA Laboratories GmbH

3.1.9 Medikamente

Tabelle 9: Im Rahmen der Tierversuche verwendete Medikamente

Medikament	Hersteller
Acetazolamid (Diamox®)	Goldshield Pharmaceuticals Ltd
Benzylpenicillin-Natrium (InfectoCillin®)	InfectoPharm
Bepanthen®	Roche
Ketamin (Ketavet®)	Pfizer
Lidocain (Xylocain®)	AstraZeneca GmbH
Xylazinhydrochlorid (Rompun®)	Bayer

3.1.10 Software

Tabelle 10: Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS6	Adobe
AxioVision 4	Carl Zeiss
Excel 2010	Microsoft®
FlowJo 7	Tree Star Inc. Ashland
Graphpad Prism Version 6.0	GraphPad Software
ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html)	National Institutes of Health
MoorFLPI Measurement Software Version 3.0	Moor Instruments
Word 2010	Microsoft®

3.2 Zellbiologische Methoden

Folgende Protokolle wurden für ECFC und HUVEC angewendet, welche im Folgenden vereinheitlicht als Zellen bezeichnet wurden.

3.2.1 Zellkultivierung und -aufbewahrung

Bis zum Beginn der Experimente wurden die Zellen in einem Einfriermedium (Dimethylsulfoxid + fötales Kälberserum [FCS] im Verhältnis 1:10) gelöst, in Kryotubes überführt und bei -130 °C in einem Stickstofftank gelagert.

Die Zellen wurden in 10 ml endothelzellspezifisches Nährmedium (Endothelial Cell Basal Medium-2 [EBM®-2] + Endothelial Cell Growth Media Kit-2 [EGM™-2]) und in T75-Zellkulturflaschen aufbewahrt. Die Kultivierung der Zellen fand in einem Brutschrank unter konstanten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂-Gehalt, 95 % Luftfeuchtigkeit) statt. Die Aussaat betrug 5×10^5 ECFC/T75-Zellkulturflasche. Bei Wechsel des Nährmediums im Intervall von 2 Tagen wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % in Kultur gehalten. Kontrolliert wurden die Zellen dabei täglich lichtmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung auf Vitalität, Wachstumsverhalten und bakterielle Kontamination. Zum Ablösen der adhären Zellen wurden die Zellen mit 2 ml 0,5 % Trypsin/EDTA-Lösung über 1 min bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 ml EBM®-2/EGM™-2-Lösung beendet. Die Zellsuspension wurde bei 1300 x g für 4 min abzentrifugiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Nährmedium oder *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gewaschen und, wie oben beschrieben, erneut ausgesät oder für Zellinjektionen verwendet. Zellzahlen wurden mit Hilfe eines automatisierten Zellzählers nach geeigneter Verdünnung in Casyton-Lösung bestimmt. Alle Zellen wurden bis maximal p5 kultiviert.

Ein Zyklus vom Aussäen bis zur erneuten Trypsin/EDTA-Ablösung wurde als eine Passage (p) definiert. Alle Arbeiten an den Zellen wurden während des Experimentes unter einer sterilen Arbeitsbank mit sterilem Werkzeug/Material durchgeführt.

3.2.2 Wachstumsverhalten / Zellmorphologie

Das Wachstumsverhalten wurde täglich lichtmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung untersucht. Qualitativ wurde das Erreichen einer 80-prozentigen Konfluenz bestimmt. Im Rahmen der Analyse der Zellmorphologie wurden Zellen eingeschlossen, die sowohl eine Adhärenz am Boden der Zellkulturflaschen als auch eine polygonale Zellform zeigten. Scharf berandete, kugelförmige, nicht adhärente Zellen wurden als tote Zellen definiert und ausgeschlossen.

3.2.3 DiI-Markierung der ECFC zur Vorbereitung des *in vivo* und *in vitro* Nachweises

ECFC wurden, wie unter 3.2.1 beschrieben, kultiviert und bei Erreichen einer 80-prozentigen Konfluenz während der p4 über Nacht in einer Konzentration von 1:133 im Dunkeln mit dem *in vivo* Fluoreszenzfarbstoff 1,1'-*Di*octadecyl-3,3,3'-*tetramethylindocarbocyanine perchlorate* (DiI) in einer Zellkulturflasche (T75) gefärbt. Die Aufbewahrung erfolgte in einem Brutschrank unter konstanten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂-Gehalt, 95 % Luftfeuchtigkeit). Laut Hersteller penetriert DiI dabei die Zellwand ohne Beeinflussung des Metabolismus. Die Kontrolle der Färbung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 200-facher Vergrößerung. Nach der Färbung wurden die Zellen dreifach mit einer sterilen EBM®-2/EGM™-2-Lösung gewaschen. Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurden 2 ml 0,5 % Trypsin/EDTA verwendet und anschließend mit EBM®-2/EGM™-2 neutralisiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines automatisierten Zellzählers und entsprechender Verdünnung in Casyton-Lösung bestimmt. Alle Teilschritte, bei denen sich die Zellen nicht in einer Zellkulturflasche befanden, wurden unter einer sterilen Arbeitsbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Als Kontrolle für den Einfluss des Zellfarbstoffes DiI auf die Vitalität, Zellvermehrung und Fluoreszenzstärke wurde ein Teil des Überstandes erneut in eine T25-Zellkulturflasche überführt und eine Woche lang täglich per Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

3.2.4 Zellaufbereitung und -injektion

Die Zellen wurden wie unter 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben kultiviert und kontrolliert, mit sterilem PBS gewaschen und anschließend zur Ablösung größerer Zellklumpen filtriert. Die Lösung der Zellen erfolgte in sterilem PBS in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/0,1 ml PBS bzw. 1×10^6 Zellen/0,1 ml PBS in einem sterilen Reagiergefäß. Die entsprechenden Teilschritte wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

Nach Lösung und kontinuierlichem Schwenken wurde die Zellsuspension unmittelbar mittels einer totraumvolumenfreien Spritze luftfrei aufgezogen und 0,1 ml davon langsam und kontinuierlich in die Schwanzvene injiziert. Um eine Aufsättigung der jeweiligen Zellen zu erhalten, fanden die Injektionen an drei Tagen statt: Tag 0, 3 und 7.

Die Kontrollgruppen Sham und PBS erhielten Injektionen über 0,1 ml der sterilen, zellfreien Trägerlösung PBS.

3.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie am FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) können Analysen von Zellen auf Einzelzellebene durchgeführt werden. Dabei lassen sich die Zellgröße, die Granularität sowie Zelloberflächenantigene (indirekt über Fluoreszenzstärken) bestimmen. Nach Zellmarkierung mit Fluorochrom-Antikörperkonjugaten durchlaufen die Zellen nacheinander in einem Flüssigkeitsstrom zwei Laserstrahlen (Argon- [488 nm] und Diodenlaser [635 nm]). Die Fluoreszenzmoleküle werden durch die Laser angeregt. Die anschließende Emission des Fluoreszenzlichtes erlaubt die Charakterisierung anhand der Streuung des Lichtes: a) Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*) und b) Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*). Das Vorwärtsstreulicht (Lichtstreuung im Winkel von $3-10^\circ$) korreliert mit der Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht (Lichtstreuung im Winkel von 90°) mit der Granularität einhergeht. Zusätzlich wird die Lichtemission der Fluoreszenzmoleküle durch Photodetektoren gemessen.¹¹² Die verwendeten Detektoren sind der *Tabelle (Tab.) 11* zu entnehmen.

Tabelle 11: Im Rahmen der FACS-Analyse verwendete Detektoren

Fluoreszenzfarbstoffe: FITC=Fluoresceinisothiocyanat; PE=Phycoerythrin; PerCP=Peridinin-Chlorophyll; APC=Allophycocyanin; Cy5=Cytochrom 5

Detektor	Wellenlänge	Farbstoff
FL1	530 nm	FITC
FL2	585 nm	PE/PI
FL3	670 nm	PerCP
FL4	661 nm	APC/Cy5

Nachdem die Zellen (ECFC/HUVEC) von der Zellkulturflasche abgelöst und in ein Reagiergefäß überführt wurden, folgte ein Waschschriff mit PBS/BSA. Anschließend wurden die Antikörper in 200 μ l PBS/BSA gelöst (die verwendeten Antikörper sind der *Tab. 12* zu entnehmen) und 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS/BSA wurden die Zellen in 300 μ l PBS/BSA aufgenommen und in FACS Tubes überführt.

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am FACS und die Analysen mittels FlowJo Software durchgeführt. Mit Hilfe eines Analysefensters erfolgte eine selektive Betrachtung vitaler ECFC bzw. HUVEC.

Es wurden exemplarisch sowohl isolierte Proben ECFC (p5) als auch HUVEC (p5) auf die Expression verschiedener Oberflächenproteine mittels FACS quantifiziert und auf das Vorliegen eines endothelialen, hämatopoetischen oder Immunzellphänotypen untersucht (*Tab. 12*). Zum Nachweis von Endothelzellen wurden die Zellen auf die Antigene CD146 und CD105 untersucht. Zur Darstellung hämatopoetischer Stammzellen dienten die Oberflächenmoleküle CD34, CD133 und VEGFR-2. Zum Ausschluss von Immunzellen wurde die Expression von CD45 quantifiziert. Eine nicht-angefärbte Probe der jeweiligen Zelllinie diente als Kontrolle. Die Ergebnisse wurden in Form von Graphen als Fluoreszenzintensität mit dem Prozentwert des Maximums dargestellt.

Tabelle 12: Im Rahmen der FACS-Analyse verwendete Antikörper

Untersuchte Antigene: Endothelzellen=CD146 und CD105; hämatopoetische Stammzellen=CD34, CD133 und VEGFR-2; Immunzellen=CD45. Fluoreszenzfarbstoffe: APC=Allophycocyanin; PerCP=Peridinin-Chlorophyll; PE=Phycoerythrin; FITC=Fluoresceinisothiocyanat

Antigen	Fluorochrom
CD146	APC
CD105	APC
CD34	PerCP
CD133	PE
VEGFR-2	APC
CD45	FITC

3.4 Tierversuche

3.4.1 Gruppen/Versuchsablauf

Im Rahmen der Modelletablierung wurde der Effekt der unilateralen (rechtsseitigen) Okklusion der *A. carotis interna / externa* (OACI/E) mit der nicht okkludierten Gruppe (Sham) mittels Laser Speckle Gerät an den Tagen 0, 3, 7 und 14 (Funktionalität), Latexangiographie an Tag 21 (zerebrale Makrogefäße) und Immunhistochemie an Tag 7 (zerebrale Mikrogefäße) verglichen (*Abb. 4* und *Abb. 6*).

Äquivalent zur Modelletablierung wurden in den Behandlungsversuchen in allen Gruppen die Effekte der jeweiligen Injektionen (ECFC HD, ECFC, HUVEC und PBS) mit Hilfe des Laser Speckle Gerätes (Tag 0, 3, 7 und 14), der Latexangiographie (Tag 21) und der Immunhistochemie (Tag 7) durchgeführt (*Abb. 5* und *Abb. 6*). Die Immunhistochemie erfolgte in allen Gruppen in einer separaten Kohorte.

Alle Tiere wurden randomisiert in folgende Gruppen unterteilt:

- a) ECFC HD (hochdosiert): OACI/E und Behandlung mit intravenös applizierter ECFC (jeweils 1×10^6 ECFC in 1 ml PBS an 3 Untersuchungstagen)
- b) ECFC (niedrigdosiert): OACI/E und Behandlung mit intravenös applizierter ECFC (jeweils 3×10^5 ECFC in 1 ml PBS an 3 Untersuchungstagen)
- c) HUVEC: OACI/E und Behandlung mit intravenös applizierter HUVEC als biologische Kontrolle (jeweils 3×10^5 HUVEC in 1 ml PBS an 3 Untersuchungstagen)
- d) OACI/E / PBS: OACI/E und intravenöse Applikation von 1 ml PBS (zellfrei).
- e) Sham: Hautschnitt und intravenöse Applikation von 1 ml PBS *ohne* OACI/E; physiologische Kontrolle im Rahmen der Modelletablierung.

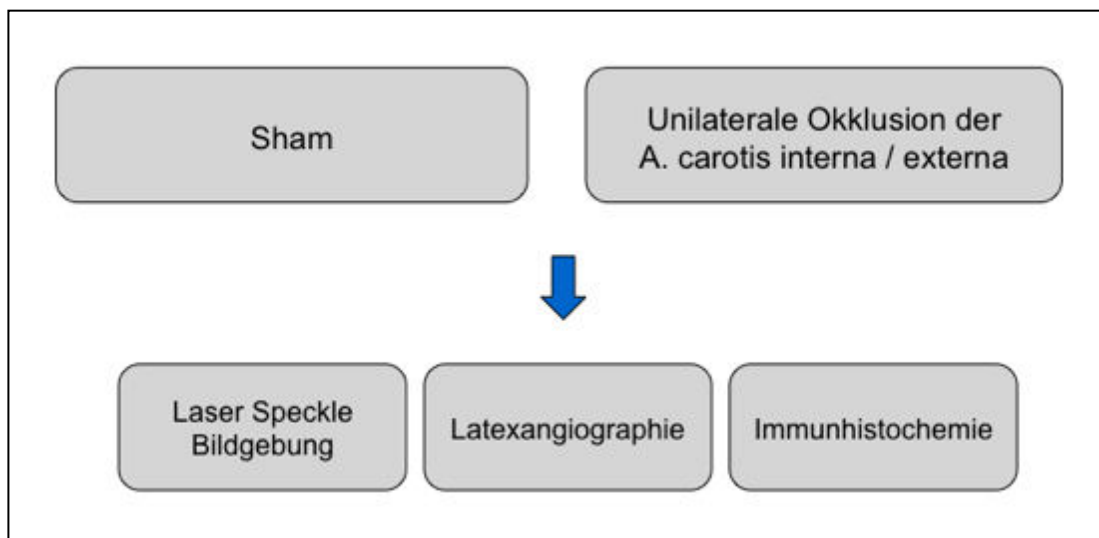


Abbildung 4: Modelletablierung

Schematische Darstellung der Etablierung des Modells der chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der NuNu-Maus. Unilaterale Okklusion der *A. carotis interna* und *externa* (OACI/E) vs. physiologischer Kontrolle (Sham). Beide Gruppen wurden mittels Laser Speckle Gerät, Latexangiographie und Immunhistochemie (separate Kohorte) analysiert. Sham=Kontrolle ohne Gefäßokklusion (Hautschnitt).

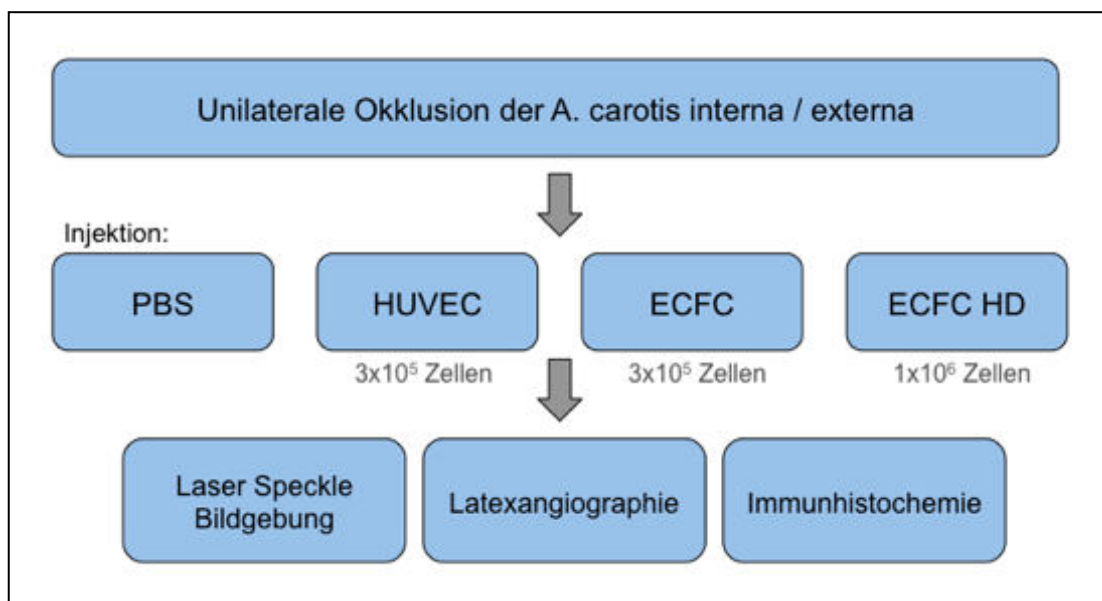


Abbildung 5: Behandlungsgruppen

Schematische Darstellung der Behandlungsgruppen nach unilateraler OACI/E. Behandlung mit hochdosierten ECFC (ECFC HD), niedrigdosierten ECFC (ECFC) und HUVEC (biologische Kontrolle mit ausdifferenzierten Endothelzellen). PBS entspricht der zellfreien Kontrolle mit der reinen Trägerlösung. Alle Gruppen wurden mittels Laser Speckle Bildgebung, Latexangiographie und Immunhistochemie (separate Kohorte) untersucht.

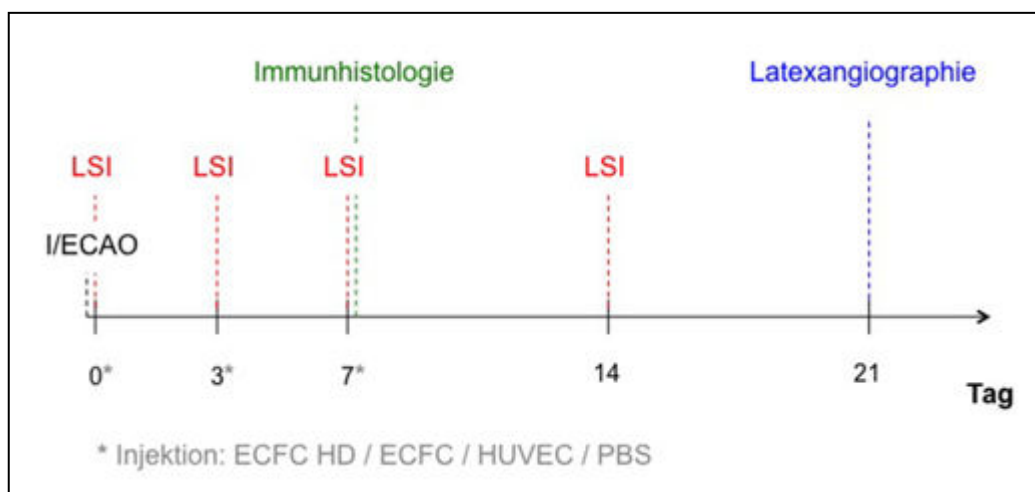


Abbildung 6: Versuchsablauf

OACI/E an Tag 0 mit Behandlung (ECFC HD, ECFC, HUVEC oder PBS) an den Tagen 0, 3 und 7. Funktionelle Blutflussmessung an den Tagen 0, 3, 7 und 14 sowie anschließende Latexangiographie an Tag 21. Eine Immunhistologie erfolgte in einer separaten Gruppe an Tag 7. OACI/E=unilaterale Okklusion der *A. carotis interna* und *externa*. LSI=Laser Speckle Bildgebung (*Laser Speckle Imaging*).

3.4.2 Operationen

Vor jedem operativen Eingriff wurden alle Versuchstiere intraperitoneal mit 70 mg/kg Ketamin (Ketavet®) und 16 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun®) narkotisiert. Die ausreichende Sedierung wurde durch fehlende Reflexe der Hinterläufe bestimmt. Mit Hilfe eines Heizkissens wurde die Körpertemperatur aufrechterhalten. Zum Schutz der Augen wurde während der Sedierung Bepanthen®-Salbe lokal aufgetragen. Zur präventiven Reduktion der Keimbelastung erfolgte in allen Versuchsgruppen eine perioperative Antibiose vor Schnittbeginn mittels intramuskulärer Gabe von Penicillin. Postoperativ wurde auf alle Wunden nach lokaler Desinfektion das Lokalanästhetikum Lidocain (Xylocain®) aufgetragen. Im Anschluss wurden die Tiere engmaschig auf Vitalparameter (Atemfrequenz) und Verhalten (Aktivität, Nahrungsaufnahme und Putzverhalten) überprüft. Während der Haltung wurden die Tiere täglich durch Tierpflegepersonal kontrolliert. Die Tötung aller Tiere erfolgte artgerecht am Ende der Experimente. Tiere mit Gewichtsverlusten über 20 % wurden ausgeschlossen und ebenfalls artgerecht getötet.

Unilaterale Okklusion der *A. carotis interna* und *externa* (OACI/E)

Operationsmikroskopisch gestützt erfolgte bei 160- bis 200-facher Vergrößerung nach Hautdesinfektion und linearem prätrachealem, medianem Hautschnitt (Schnittlänge 2–3 cm), die stumpfe Spaltung der Bindegewebskapsel der prä- und paratracheal gelegenen *Glandula* (Gl.) *submandibularis*. Zur besseren Übersicht wurde mit Hilfe eines Spreizers die Gl. zu gleichen Anteilen lateral bzw. medial fixiert. Nach lateraler Mobilisation des *Musculus* (*M.*) *sternocleidomastoideus* wurden die rechte *A. carotis communis* (ACC) und die rechte ACI mit mikrochirurgischen Pinzetten unter Schonung umliegender Gefäß- und Nervenstränge von ihren Faszien abgelöst. Dabei wurde der *Nervus* (*N.*) *vagus* in der Non-touch-Technik nach *lateral* von der Faszie verlegt. Im Anschluss erfolgte die Präparation der rechten ACE unter Mobilisierung des *N. glossopharyngeus* sowie des an der Bifurkation liegenden *Glomus caroticum* von der Faszie. Die permanente, unilaterale (rechtsseitige) Okklusion der ACI und ACE erfolgte durch eine Ligatur (8-0, monofil) unmittelbar distal der Carotisbifurkation. Nach Entfernung des Spreizers wurden die Anteile der *Gl. submandibularis* auf Vitalität überprüft und wieder nach prä- bzw. paratracheal positioniert. Nach gründlicher Blutstillung wurde die Haut mit einer

fortlaufenden Naht (4-0, geflochten) verschlossen. Zur Markierung und anschließender Identifikation wurden Löcher in die Ohren der Tiere gestanzt.

Bei der Sham-Gruppe wurde die Operation entsprechend nach Hautinzision und Präparation der *Gl. submandibularis* ohne Berührung und Ligatur der Halsgefäße durchgeführt. Äquivalent fand ein Hautverschluss mit einer fortlaufenden kutanen Naht (4-0, geflochten) statt.

Im Anschluss wurden *alle* Tiere splenektomiert und in die Gruppen Laser Speckle Imaging (3.4.3), Latexangiographie (3.4.4), Immunhistologie (3.4.5) und *in vivo* Multifluoreszenzmikroskopie (3.4.6) eingeteilt und entsprechende operative Vorbereitungen durchgeführt.

Splenektomie

Die Organisation der Milz der Nacktmaus ist im Vergleich zu anderen Mausstämmen ähnlich. Die Proportion der roten zur weißen Pulpa ist dabei zugunsten der roten verteilt.¹⁰⁹ Voruntersuchungen zeigten eine vermehrte Akkumulation der intravenös injizierten Zellen in der Milz (*Daten nicht gezeigt*). Zur Reduzierung der immunologischen Abwehr gegenüber der humanen Zellen und der Hypothese einer konsekutiven Erhöhung des im Blutgefäßsystem zirkulierenden Anteils der humanen ECFC wurden die Tiere in *allen* Versuchsgruppen splenektomiert. Mit Hilfe eines Operationsmikroskopes wurde nach Hautdesinfektion in 160- bis 200-facher Vergrößerung eine mediane Laparotomie durchgeführt. Dabei folgten auf einen linearen, 2–3 cm langen Hautschnitt die Spaltung des *M. rectus abdominis* entlang der *Linea alba* und eine Mobilisierung beider Anteile gleichermaßen nach *lateral*. Mit stumpfem, mikrochirurgischem Werkzeug wurde die Milz nach *ventral* unter Schonung der umliegenden Gefäße, Nerven und Darmanteile freigelegt. Es folgte eine Ligatur der *A. splenica* sowie weiterer akzessorischer Arterien. Nach Ligatur und Ablösung der Faszie wurden die zuführenden arteriellen Gefäße mit einer mikrochirurgischen Pinzette durchtrennt und die Milz *in toto* extrahiert. Eine Peritoneallavage wurde mittels einer warmen, sterilen 0,9 % Natriumchlorid-Lösung (NaCl) durchgeführt. Im Anschluss erfolgten die Verschlüsse des *M. rectus abdominis* durch eine fortlaufende, resorbierbare Naht (7-0, monofil) und der Haut durch eine fortlaufende kutane Naht (4-0, geflochten).

Operative Vor-/Nachbereitung der Laser Speckle Bildgebung (LSI)

Zur Vorbereitung der Laser Speckle Bildgebung (LSI) wurde die Maus in Bauchlage fixiert. Die Kopfhaut der Maus wurde nach Hautdesinfektion durch einen linearen, sagittalen, ca. 3 cm langen Schnitt eröffnet. Die beiden Anteile wurden jeweils nach *lateral* mit einem Faden (4-0, geflochten) fixiert. Zur Vermeidung austrocknungsbedingter Artefakte wurde die Schädelkalotte nach stumpfer Präparation des Periosts mit sterilem Paraffinöl bedeckt. Nach der LSI wurde die Kopfhaut mit einer fortlaufenden Naht (5-0, monofil) verschlossen.

Operative Vorbereitung der Latexperfusion

An Tag 21 wurde nach Fixierung in Rückenlage und lokaler Hautdesinfektion eine mediane Laparotomie (Schnittlänge ca. 4 cm) durchgeführt. Nach stumpfer Mobilisierung der Dünndarmschlingen wurden das Retroperitoneum, die *Aorta abdominalis* und die *Vena (V.) cava inferior* mittels mikrochirurgischer Instrumente freigelegt. Proximal der Iliakalbifurkation wurden die *Aorta abdominalis* und die *V. cava inferior* ligiert. Proximal der *Aa. renales* wurde ein zweiter Knoten vorgelegt. Die *Aorta abdominalis* wurde mittels einer Flexüle innerhalb beider Fäden kanüliert und durch Zug des vorgelegten Knotens fixiert. Mit Hilfe einer subletalen Injektion von 50 mg/kg Papaverin-Hydrochlorid über den Katheter konnten verschiedene funktionelle, autoregulatorische Zustände durch maximale Vasodilatation vermieden werden. Zur Gewährleistung eines venösen Abflusses wurde die *V. cava inferior* nach 60 s inzidiert.

Operative Vorbereitung der Immunhistochemie

An Tag 7 wurden die Mäuse artgerecht getötet. Alle Gehirne wurden unter mikroskopischer Kontrolle vorsichtig entfernt und in flüssigem Stickstoff bei -130 °C schockgefroren. Anschließend wurden die Gehirne bei -80 °C aufbewahrt.

Operative Vorbereitung der *in vivo* Multifluoreszenzvideomikroskopie

Um die Auswirkung der Inflammation möglichst gering zu halten, wurden die Operationen der kranialen Schädelfenster zwei Tage vor der unilateralen OACI/E durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse in Bauchlage fixiert und nach lokaler Hautdesinfektion mit einem linearen, sagittalen Hautschnitt (Schnittlänge ca. 4 cm) inzidiert. Beide Hautlappen wurden zu gleichen Anteilen mit

Fäden (4-0, geflochten) *lateral* fixiert. Es folgte die Operationsmikroskop gestützte Präparation des Periosts mit stumpfen, mikrochirurgischen Instrumenten. Im Anschluss wurde eine Kraniektomie oberhalb des Medialstromgebietes (unilateral, rechts) durchgeführt. Dabei wurden sowohl ein Teil der Schädelkalotte (6x9 mm) mit Hilfe eines Mikrobohrers als auch die *Dura mater* entfernt. Unter permanenter Spülung mit NaCl wurde das Gehirn konstant feucht gehalten. Die Anlage eines transparenten Schädelfensters (Kunststoff) erfolgte mit mikrochirurgischen Instrumenten unter strenger Schonung des Gehirns. Im Anschluss wurde das Schädelfenster zirkulär mit Zementkleber an der übrigen Schädelkalotte fixiert. Nach der Schädelfensteranlage bzw. der *in vivo* Multifluoreszenzvideomikroskopie wurde die Kopfhaut mit einer fortlaufenden Naht (5-0, monofil) verschlossen.

3.4.3 Laser Speckle Bildgebung (LSI)

Die LSI erlaubt die dynamische Erfassung zerebraler Blutflussänderungen über einem interessierenden Feld (*Region of Interest*, ROI) in Echtzeit. Es ist ein optisches Verfahren, welches Laserstrahlung mit einer hohen und lokalen Auflösung verwendet. Ein durch diese gleichbleibende Lichtquelle erzeugtes Licht wird an der Oberfläche reflektiert und resultiert in einer Überlagerung der Teilstrahlen mit zufälligen Phasen. Die reflektierten Strahlen werden in einem konstanten Abstand (in der Beobachtungsebene) mit der *charge coupled device* (CCD)-Kamera erfasst. Das so entstandene Fleckenmuster (Speckle-Muster) entspricht einem Bild heller und dunkler Punkte mit einem bestimmten Kontrast und führte zu dessen Namensgebung. Bei Analyse von Bewegungsmustern senkrecht zur Aufnahmeebene macht man sich den Effekt zunutze, dass sich die reflektierten Speckles mit den beleuchteten Objekten bewegen als wären sie Teil dieser – ohne dabei Detailstrukturen des Objektes aufzulösen. Medizinische Anwendung findet dieses Verfahren bei der Analyse von Blutflüssen kleinerer Blutgefäße. Hierbei nutzt man die Blutzellen als reflektierende Objekte des Laserlichtes. Fließende Blutzellen in einem entsprechenden ROI verändern das Speckle-Muster und erscheinen unscharf. Konsekutiv resultiert ein verminderter Kontrast. Verschiedene Geschwindigkeiten werden auf diese Weise als Abweichung des Laser Speckle Kontrastes kodiert. Ein verminderter Kontrast geht daher mit einem erhöhten und ein erhöhter Kontrast entsprechend mit einem verringerten Blutfluss einher. Zur Vereinfachung wird die Varianz des Laser Speckle Kontrastes als Intensität in der arbiträren Einheit [Flux] angegeben.^{113,114}

In der C57/BL6-Maus wurde gezeigt, dass sich die Acetazolamid induzierte CVRC durch die LSI darstellen lässt.¹⁷⁵ Auf dieser Grundlage wurde in einem ersten Teilschritt das Modell der CVRC nach unilateraler OACI/E in der NuNu-Maus etabliert. Hierzu wurde der Einfluss einer unilateralen OACI/E auf die zerebrale Ruheperfusion und die CVRC im Vergleich zu nicht-operierten NuNu-Mäusen (Sham-Gruppe) untersucht. In einem zweiten Schritt wurden die Ruheperfusion und die CVRC nach OACI/E unter Applikation von ECFC (niedrig- und hochdosiert) mit der biologischen Kontrollgruppe (HUVEC) sowie mit der zellfreien Kontrollgruppe (PBS) verglichen. Die LSI-Messungen erfolgten in allen Gruppen im Anschluss an die OACI/E bzw. Sham an Tag 0 und an den Tagen 3, 7 und 14. Tiere mit weniger als 3 Messzeitpunkten (flache Inspirationslage bei zu tiefer Narkose, Unwirksamkeit des Acetazolamids, Operationskomplikationen) wurden aus den Experimenten ausgeschlossen.

Das Laser Speckle Gerät wurde in einem Abstand von 20 cm über der Schädelkalotte der Tiere positioniert und an einen Standard Laptop angeschlossen. Aufgrund der Eindringtiefe des Lasers von ca. 500–1000 μm ¹¹⁵ ist bei der Maus die Messung ohne Entfernung der Schädelkalotte möglich. Das Laser-Doppler-Flusssignal wurde über der rechten Hirnhemisphäre (ipsilateral zur OACI/E) kontinuierlich in einem ROI von 6x4 mm über der ACM erfasst. Parallel dazu wurden zur anatomischen Lokalisation Schwarz-Weiß-Aufnahmen der entsprechenden Region erstellt. Die farbliche Kodierung der Intensitäten innerhalb des erfassten Gewebes korreliert mit der zerebralen Blutflussgeschwindigkeit (rot=hoher Fluss, blau=niedriger Fluss). Eine Bildaufnahmezeit von 0,25 Hz mit einer Aufnahmezeit von 4 ms wurde für alle Messungen gewählt.

Nach Erfassung der basalen regionalen Blutflusswerte und intraperitonealer Gabe von 50 mg/kg Acetazolamid erfolgte eine kontinuierliche Messung des Laser-Doppler-Flusssignals über 15 min. Aus der Differenz zwischen der Ruhedurchblutung und dem Anstieg wurde die CVRC berechnet.

Mit Hilfe einer LSI spezifischen Software (MoorFLPI Measurement Software Version 3.0) wurden die LSI-Signale erfasst und sowohl numerisch als auch graphisch dargestellt. Aus 15 kontinuierlichen Messungen vor Acetazolamid-Applikation wurde die Ruheperfusion als Mittelwert bestimmt. Aus 15 weiteren kontinuierlichen Messungen nach Acetazolamid-Injektion wurden nach Erreichen eines Plateaus die CVRC bestimmt und als Mittelwert angegeben. Alle Ergebnisse wurden tabellarisch in einer Excel-Tabelle erfasst und ausgewertet.

3.4.4 Latexangiographie

Zur Beurteilung der basalen und leptomeningealen Gefäßdurchmesser sowie der Anzahl der Anastomosen zwischen der ACM und der *A. cerebri anterior* (ACA) bzw. der ACM und der *A. cerebri posterior* (ACP) wurde in allen Versuchsgruppen im Anschluss an die CVRC-Messungen eine Latexangiographie *postmortem* an Tag 21 durchgeführt. In einem zweistufigen Versuchsaufbau wurde im Rahmen der Modelletablierung der Einfluss der unilateralen OACI/E auf die zerebralen Makrogefäße untersucht. In der Behandlungsgruppe wurde der Einfluss der diversen intravenösen Injektionen (ECFC HD, ECFC, HUVEC oder PBS) verglichen. Die Experimente erfolgten nach dem von Maeda *et al.* etablierten¹¹⁶ und von Woitzik *et al.* für das Mausmodell modifizierten Verfahren.¹¹⁷ Tiere mit technisch bedingter, unvollständiger Perfusion (Ruptur der Aorta beim Versuch der Kanülierung, Latexextravasation, Beschädigung der Kortexoberfläche) wurden aus den Versuchen ausgeschlossen.

Die weiße, flüssige Latex-Suspension wurde mit 20 $\mu\text{l/ml}$ Carbon Black gemischt und im Verhältnis 10:2 mit NaCl verdünnt. Die retrograde aortale Applikation der Latex/Carbon-Suspension erfolgte über eine Druckmanschette bei konstantem Perfusionsdruck (150 mmHg) und Raumtemperatur über eine Zeitspanne von 5 min. Zur Aushärtung des flüssigen Latex wurden die Tiere für 20 min in ein eiskaltes Wasserbad überführt. Im Anschluss wurden die Gehirne vorsichtig unter Erhaltung der Hirngefäße entfernt und die basalen und leptomeningealen Gefäße mit einer Standardfotokamera fotografiert.

Die Auswertung erfolgte digital mit der freierhältlichen Bildverarbeitungssoftware ImageJ. Die Analyse der äußeren Durchmesser erfolgte durch dreifache Messungen und anschließende Mittelwertbestimmung der jeweiligen Gefäße des *Circulus arteriosus Willisii* (CAW): ACA, ACM, ACI, *A. communicans posterior* (AcomP), ACP, *A. basilaris* (AB). Leptomeningeale Gefäßdurchmesser wurden äquivalent zu den basalen Gefäßen bestimmt und als relative Häufigkeit in Prozent angegeben (Gruppeneinteilung: Gruppe A: 5–25 μm ; Gruppe B: 25–45 μm). Anastomosen der leptomeningealen Gefäße wurden als Konfluenzpunkte zwischen der unilateralen ACM und ACA sowie zwischen der ACM und ACP definiert und deren Anzahl bestimmt. Die Ergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle erfasst und analysiert.

3.4.5 Immunhistochemie

Zerebrale Mikrogefäßarchitektur

Vorangegangene LSI-Untersuchungen der CVRC zeigten nach ECFC-Applikation bei unilateraler OACI/E eine Erholung der CVRC an Tag 7. Entsprechend erfolgten in einer separaten Serie immunhistochemische Experimente zur Analyse auf Ebene der zerebralen Mikrogefäße mittels Endothelzell- und Perizytenfärbung an Tag 7. Im Rahmen der Modelletablierung wurde in einem ersten Teilversuch der Einfluss der OACI/E auf die zerebrale Mikrogefäßarchitektur untersucht. Als Vergleichsgruppe dienten nicht-operierte NuNu-Mäuse (Sham). Es wurden jeweils die rechten Hirnhemisphären miteinander verglichen. Nach funktioneller und makroanatomischer Darstellung des dosisabhängigen Effektes der ECFC HD wurde in einem zweiten Teilversuch der Einfluss (hochdosierter) ECFC HD auf die zerebralen Mikrogefäße im Vergleich zur (zellfreien) PBS-Gruppe analysiert. Entsprechende immunhistochemische Mehrfachfärbungen sind der *Tab. 14* zu entnehmen.

Die Anfärbung des Antigens Ki-67 dient dem unspezifischen Nachweis einer aktiven, sich teilenden Zelle – somit lassen sich Rückschlüsse auf die Zellproliferation ziehen. Entsprechend der *Tab. 13* wurden die basalen Gefäße des CAW identifiziert und bezüglich der Proliferation der Endothel- und glatten Muskelzellen analysiert. Die Endothelzellproliferationen wurden beidseits anhand der Kolokalisationen von CD31 und Ki-67 identifiziert. Entsprechend lässt sich die Proliferation der glatten Muskelzellen durch Kolokalisationen von α -SMA und Ki-67 nachweisen.

CD31 wird auf Endothelzellen exprimiert. Der immunhistochemische Nachweis erlaubt die Identifikation von Endothelzellen.

Zur unspezifischen Darstellung der Perizyten dient die immunhistochemische Anfärbung des Desmins. Hierbei werden alle Perizyten unterschiedlicher Gefäßgrößen angefärbt – auch in kleinen Gefäßen ($<9 \mu\text{m}$).

Im Unterschied zur o. g. (unspezifischen) Perizytenfärbung erfolgt mit der immunhistochemischen Färbung des α -SMA die spezifische Darstellung der Perizyten der glatten Muskulatur in Arteriolen und dient so dem Nachweis von Arteriolen.

Der primär sensomotorische Kortex (S1), das *Striatum* (Cpu), das *Cornu amonis* 1-Segment des Hippocampus (CA1) sowie die basalen Gefäße des CAW (ACA, ACM, ACI, AcomP und ACP (s. *Tab. 13*) wurden in 200-facher Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Es wurden von den basalen Hirngefäßen jeweils eine und von den übrigen Regionen (S1, Cpu, CA1) jeweils drei, nicht überlappende Aufnahmen erstellt, aus denen Mittelwerte berechnet wurden. Die Analyse erfolgte mit einer freierhältlichen Bildverarbeitungssoftware ImageJ. Die Ergebnisse wurden tabellarisch in einer Excel-Tabelle zusammengetragen und ausgewertet.

Die Proliferation der basalen Hirngefäße wurde als Proliferation der Endothelzellen bzw. der glatten Muskelzellen pro Hirngefäße pro Gesichtsfeld dargestellt. Endothelzellen wurden als CD31-positive Zellen charakterisiert. Die absolute Anzahl wurde als Mikrogefäßdichte definiert und als Gefäße/mm² gezeigt. Desmin positive Zellen wurden durch Kollokationen CD31 und Desmin positiver Zellen quantifiziert. Der Anteil der Perizyten an den gesamten Endothelzellen (Grundwert) wurde als relativer (Desmin-) Besatz definiert und als Prozentsatz (%) angegeben. α -SMA positive Gefäße wurden durch die Anzahl der Kollokationen CD31 und α -SMA positiver Zellen bestimmt und als α -SMA positive Gefäße/mm² dargestellt.

Nachweis DiI-markierter ECFC

In einer unabhängigen Gruppe erfolgte exemplarisch der immunhistochemische Nachweis DiI-markierter ECFC in zwei NuNu-Mäusen (vgl. 3.2.3). Die Tiere erhielten eine unilaterale OACI/E sowie eine einmalige Injektion 1×10^6 ECFC/0,1 ml PBS an Tag 0. Nach 36 Stunden erfolgte die artgerechte Tötung und Entnahme der Gehirne. Es folgte die Untersuchung der ECFC in Gefrierschnitten mit anatomischer Korrelation entsprechend der *Tab. 13*. Um die Lokalisation möglicher ECFC in Bezug zu den Endothelzellen und Perizyten des Wirtes analysieren zu können, wurden diese immunhistochemisch entsprechend der *Tab. 14* angefärbt. Die Analyse erfolgte neben dem Gehirn ebenfalls in der Leber und in der Lunge. Letztere sind als immunologisch aktive Organe bekannt und dienen einem weiteren intraparenchymatösen Nachweis und der Kontrolle einer erfolgreichen ECFC-Injektion.

Immunhistochemische Vorbereitung

Bei -20 °C wurden die Gehirne (Leber/Lungen) in Tissue-Tek® eingebettet und mit Hilfe eines Kryotoms geschnitten. Dabei wurden 6 µm dicke, koronare Schnitte im Intervall von 1,0 mm angefertigt. In Bezug zum Bregma erfolgten Schnitte innerhalb eines Intervalls von +1,0 mm bis -4,0 mm. Die Schnittebenen wurden mit Hilfe eines anatomischen Atlas des Mausgehirns¹¹⁸ kalkuliert. Es wurden die Gehirnnareale S1, Cpu, CA1 sowie die basalen Gefäße des CAW (ACA, ACM, ACI, AcomP und ACP) untersucht. In der *Tab. 13* sind die Areale und basalen, zerebralen Gefäße pro Schnittebene dargestellt.

Tabelle 13: Schnitthöhe der Gefrierschnitte zur Darstellung parenchymatöser Gefäße entsprechender Areale und der basalen Hirngefäße des CAW

Schnitthöhe in Bezug zum Bregma. Hirnnareal und entsprechendes basales Hirngefäß pro Schnitthöhe. Modifiziert nach dem anatomischen Atlas des Mausgehirns.¹¹⁸

Schnitthöhe	Areal	Gefäß
+1,0	S1, CPu	ACA
0,0	S1, CPu	ACA, ACM
-1,0	S1, CPu	ACI
-2,0	CA1	AcomP
-3,0	CA1	ACP
-4,0		AB

Immunhistochemisches Färbeprotokoll

Nach 8-minütiger Fixierung in Methanol folgte ein dreifacher Waschvorgang mit PBS bei Raumtemperatur (RT). Unspezifische Bindungen wurden durch die Versetzung in einer 1 %-igen Casein/PBS-Lösung über eine Stunde bei RT geblockt. Es folgte die zweistündige Inkubation

primärer monoklonaler Antikörper (AK) bei RT. Zum Auswaschen nicht gebundener AK wurde eine 0,5%-ige Casein/PBS-Lösung verwendet. Im Anschluss wurden die Schnitte 1 ½ Stunden bei RT mit sekundären monoklonalen AK inkubiert. Überschüssige AK wurde mit PBS gewaschen und in einem letzten Schritt mit IS Mounting Medium (4',6-Diamidin-2-phenylindol [DAPI] zur Zellkernfärbung enthalten) eingedeckt. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Als Kontrolle für die Spezifität der sekundären Antikörper wurden Gefrierschnitte gleicher Hirnregionen ohne primäre AK bei sonst gleichen Bedingungen angefertigt. Primäre und sekundäre AK sind der *Tab. 14* zu entnehmen. Zur Erarbeitung der optimalen AK-Konzentrationen der Mehrfachfärbungen wurden zuvor in eigenen Serien verschiedene Verdünnungsreihen in diversen AK-Kombinationen erstellt (*Daten nicht gezeigt*).

Zum Nachweis DiI markierter ECFC über das Cy3-Signal und deren Korrelation mit Endothelzellen und Perizyten wurde das Protokoll entsprechend modifiziert. Verwendete primäre und sekundäre Antikörper wurden in der *Tab. 14* dargestellt.

Tabelle 14: Die im Rahmen der Endothelzell- und Perizytenfärbung verwendeten Antikörper

Färbung A) Gefäßdarstellung; Färbung B) Gefäßzellproliferation; Färbung C) ECFC (DiI) + Gefäßdarstellung.

*Antikörper-Verdünnung in 0,5 % Casein/PBS. ** FITC-konjugierter primärer Antikörper.

Färbung	Antigen	Konzentration*	Epitop	Fluorochrom
<u>primäre AK</u>				
A, B, C	CD31	1:50	Ratte gegen Maus	-
A, C	Desmin	1:100 ^{A)} ; 1:300 ^{C)}	Kaninchen gegen Maus	-
A, B	α -SMA**	1:300	Maus IgG	FITC
B	Ki-67	1:200	Kaninchen gegen Maus	-
<u>sekundäre AK</u>				
A, B, C		1:300	Esel gegen Ratte	Cy5
A, B		1:400	Schaf gegen Kaninchen	Cy3
C		1:200	Esel gegen Kaninchen	FITC

3.4.6 *In vivo* Multifluoreszenzvideomikroskopie

Mit Hilfe der *in vivo* Multifluoreszenzmikroskopie können DiI-markierte ECFC (vgl. 3.2.3) sowie deren dynamische Interaktion mit der Mikrovaskulatur des Wirtes nachgewiesen werden. ECFC-Wechselwirkungen mit den zerebralen Wirtsgefäßen wurden bereits im Tumormodell demonstriert.⁶⁴

In einer separaten Gruppe (n=2) wurde zwei Tage vor unilateraler OACI/E ein kraniales Schädelfenster, wie unter 3.4.2 beschrieben, oberhalb der rechten ACM implantiert. Die Tiere erhielten an Tag 0 eine unilaterale OACI/E und eine Splenektomie (3.4.2) sowie eine einmalige Injektion von 1×10^6 ECFC/0,1 ml PBS. ECFC wurden vor der Injektion *in vitro*, wie unter 3.2.1 beschrieben, expandiert und mittels DiI-Zellfärbung markiert (3.2.3). Die *in vivo* Multifluoreszenzmikroskopie wurde, wie von der Arbeitsgruppe Vajkoczy *et al.* zuvor herausgearbeitet¹¹⁹, in 10-facher Vergrößerung durchgeführt und mit einem integrierten Kamerasystem und S-VHS-Rekorder aufgezeichnet. Zur Kontrastierung der Mikrogefäße des Wirtes wurden 0,1 ml einer 2%-FITC-Dextran-Lösung (Molekulargewicht=150.000) mit Hilfe eines Operationsmikroskopes intravenös in die Zungenvene gespritzt sowie Fluoreszenzmikroskopien mit Epi-Fluoreszenz und blauem Filter (Wellenlänge 450–490 nm) durchgeführt. DiI gefärbte ECFC wurden fluoreszenzmikroskopisch mit Epi-Fluoreszenz und grünem Filter (Wellenlänge 520–570 nm) dargestellt. Es wurden 6, nicht überlappende Regionen abgebildet und über 60 s an Tag 0, 1 und 6 aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte qualitativ unter den Aspekten des Nachweises der ECFC sowie der Interaktion mit den Wirtsgefäßen (Arteriolen, Venolen, Transmigration in die perivaskuläre Nische).

3.4.7 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Zum Vergleich der Ruheperfusion sowie der CVRC an den Zeitpunkten Tag 0, 3, 7 und 14 wurde eine zweifache Varianzanalyse (two-way-ANOVA) mit anschließendem Fisher's *projected least significant difference test* durchgeführt. Die Durchmesser der basalen und leptomeningealen Gefäße sowie die Anzahl der leptomeningealen Anastomosen wurden mit der einfachen Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur auf die statistische Signifikanz hin untersucht. Dabei wurden die leptomeningealen Durchmesser in zwei Gruppen eingeteilt und innerhalb dieser die relativen Anteile untersucht. Die histologische Auswertung (Ki-67, CD31, Desmin, α -SMA) erfolgte mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten Student-*t*-Testes. Alle Statistiken wurden mit der Software GraphPad Prism Version 6.0 erstellt. Werte $P < 0.05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Zellcharakterisierung

4.1.1 Zellmorphologie und -wachstum

Innerhalb der ersten Stunde nach Aussaat setzten sich die ECFC und HUVEC am Boden der Zellkulturflasche ab und wuchsen nebeneinander als Monolayer. Aus einer Zellteilung gingen zwei Tochterzellen hervor, so dass nach 4 Tagen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht wurde. Die einzelnen, polygonalen Zellen zeigten in der Zellkulturflasche ein homogenes, pflastersteinartiges Gesamtbild (Abb. 7).

Sowohl in Bezug auf die Morphologie als auch in dem Wachstumsverhalten (80 prozentige Konfluenz nach 4 Tagen) ließen sich *in vitro* keine Unterschiede zwischen ECFC und HUVEC darstellen.

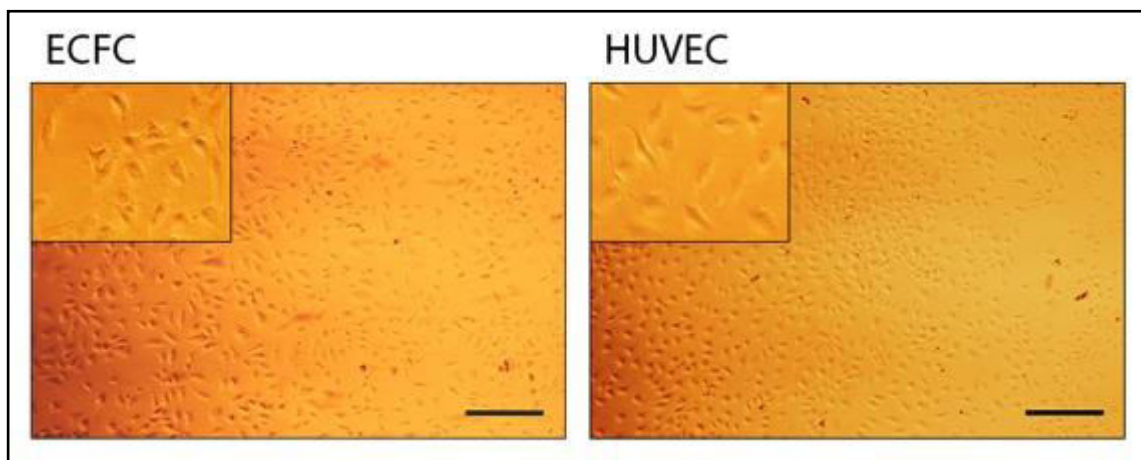


Abbildung 7: Zellmorphologie der ECFC und HUVEC

Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der ECFC und HUVEC. Beide Zellarten zeigen eine polygonale Zellmorphologie sowie ein pflastersteinartiges Gesamtbild. 200-fache Vergrößerung. Ausschnitt in 1000-facher Vergrößerung. Maßstabsleiste=100 μm .

4.1.2 Zellcharakterisierung mittels Durchflusszytometrie

Die Untersuchung einzelner Proben ergab keinen Unterschied bezüglich des Expressionsmusters der untersuchten Antigene zwischen der ECFC- und der HUVEC-Gruppe (jeweils p5). Im Vergleich zu den jeweiligen (ungefärbten) Kontrollen fiel der Nachweis für die endothelialen Antigene CD146 und CD105 sowohl in der ECFC- als auch in der HUVEC-Gruppe positiv aus. Im Rahmen des Nachweises der hämatopoetischen Stammzellmarker fiel die Expression des Antigens VEGFR-2 in beiden Gruppen leicht positiv und die Antigene CD34 und CD133 negativ aus. Die Untersuchung des Markers für Immunzellen (CD45) ergab in beiden Gruppen ebenfalls keinen Unterschied zur ungefärbten Kontrolle. Zusammenfassend zeigten ECFC der p5 in Bezug auf die hier untersuchten Antigene ein Expressionsmuster ausdifferenzierter Endothelzellen (Abb. 8).

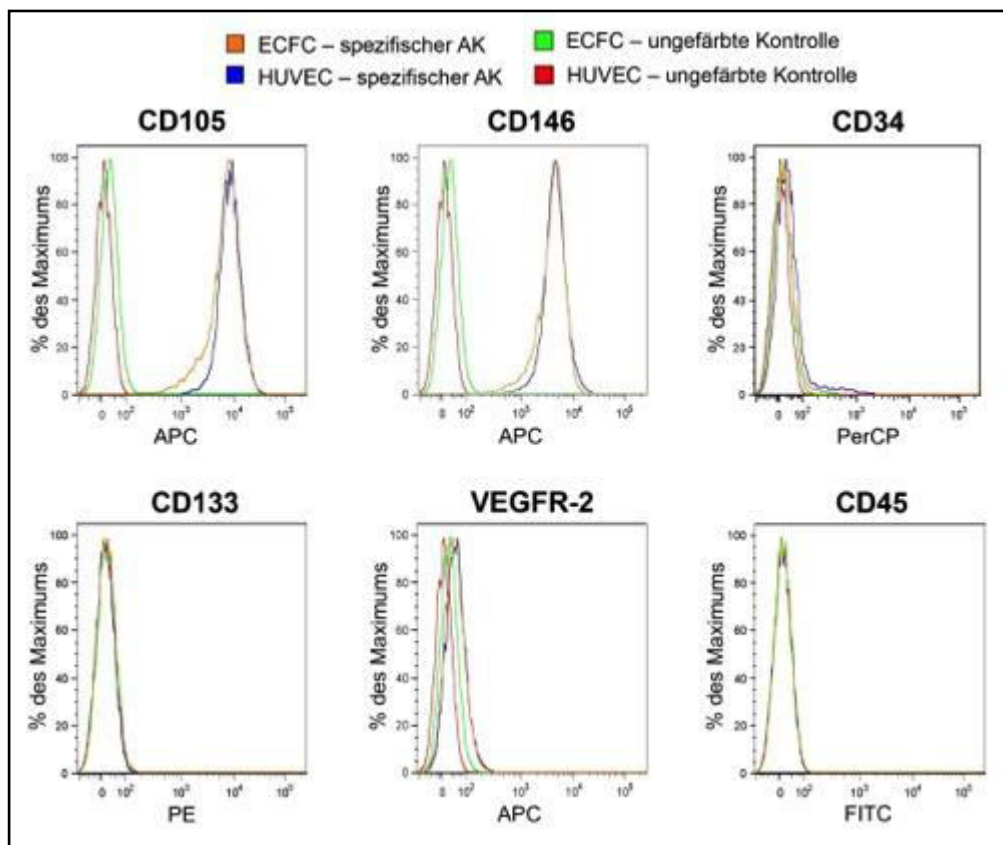


Abbildung 8: Expression eines endothelialen Phänotyps der ECFC mittels FACS

ECFC zeigen einen ausdifferenzierten endothelialen Phänotyp. Mittels FACS erstellte Histogramme der jeweiligen Antigene (% des Maximums). Kein Unterschied zwischen ECFC und HUVEC (Kontrolle ausdifferenzierter Endothelzellen). Positiver Nachweis der endothelialen Marker CD105 und CD106. Die hämatopoetischen Stammzellmarker (CD34, CD133, VEGFR-2) und der Marker für Immunzellen (CD45) fielen negativ aus.

4.2 Einfluss der ECFC auf die chronisch zerebrale Hypoperfusion

4.2.1 Modelletablierung der chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der NuNu-Maus

Einfluss der OACI/E auf die Ruheperfusion

Mittels Laser Speckle Gerät erstellte Abbildungen des zerebralen Blutflusses vor und nach Acetazolamid-Applikation sind in der *Abb. 9* dargestellt. Die unilaterale OACI/E führte an Tag 0 zu einer signifikanten Reduktion der zerebralen Ruheperfusion um 57 % (** $P < 0.001$) und an Tag 3 um 44 % (** $P < 0.01$) über dem ipsilateralen Mediastromgebiet (*Abb. 10*). An Tag 7 und 14 wurde ein Anstieg der zerebralen Ruheperfusion in der OACI/E-Gruppe verzeichnet, so dass zwischen beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied vorlag.

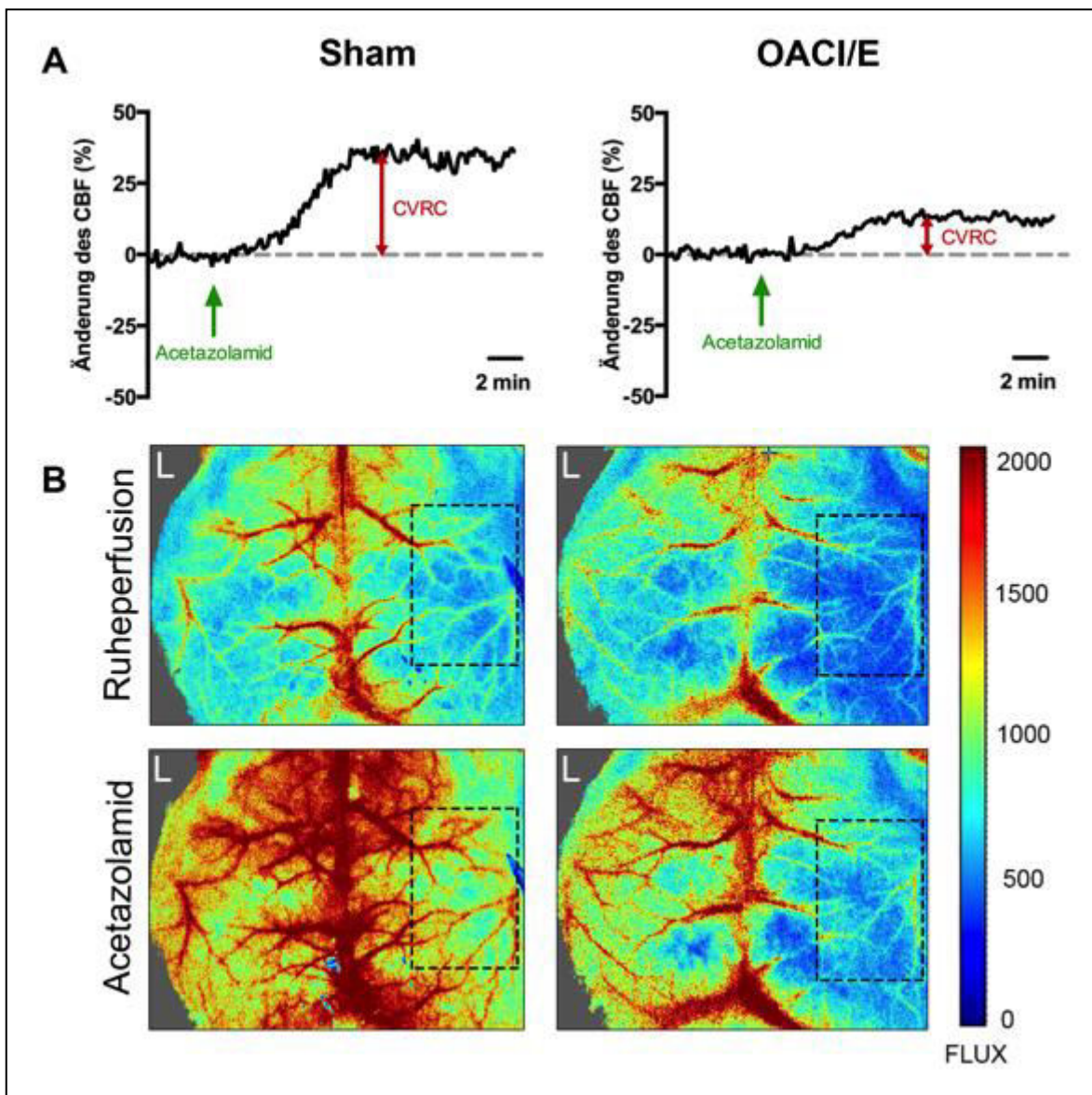


Abbildung 9: Zerebraler Blutfluss nach unilateraler Okklusion der ACI/E

Messungen des zerebralen Blutflusses (CBF) an Tag 14 mittels Laser Speckle Gerät. A) Graphische Darstellung des CBF vor und nach Acetazolamid-Injektion über die Zeit. Links: Physiologischer Anstieg der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) nach Acetazolamid-Applikation (Sham); rechts: Verminderte CVRC nach Acetazolamid-Injektion nach (unilateraler) rechtsseitiger Okklusion der *A. carotis interna* und *externa* (OACI/E). B) Farbkodierte Darstellung des zerebralen Blutflusses (rot=hoher Blutfluss, blau=niedriger Blutfluss). Obere Zeile: Ruheperfusion; untere Zeile: CBF nach Acetazolamid-Applikation. Linke Spalte: Sham; rechte Spalte: OACI/E. Ansicht von kranial. Rechteck=ROI (*Region of Interest*) über dem rechten Medialstromgebiet. L=linke Hirnhemisphäre.

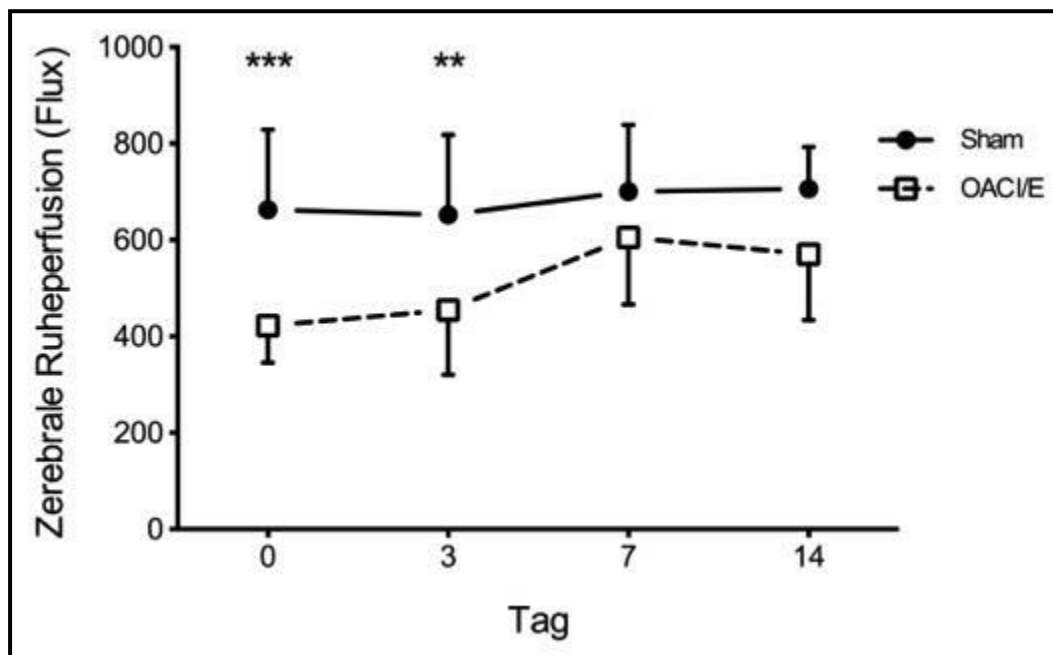


Abbildung 10: Zerebrale Ruheperfusion – Modelletablierung

Liniengraphen der Gesamtmittelwerte der OACI/E- und Sham-Gruppe mit Standardabweichungen über eine Versuchsdauer von 14 Tagen (n=11–16 Tiere/Gruppe); angegeben in der arbiträren Einheit [Flux]. Die Messungen mit dem Laser Speckle Gerät zeigten eine signifikante Minderung der zerebralen Ruheperfusion an den Tagen 0 (** $P < 0.01$) und 3 (** $P < 0.01$) nach unilateraler OACI/E. (Endogene) Erholung der zerebralen Ruheperfusion an den Tagen 7 und 14 ($P > 0.05$). OACI/E=(unilaterale) Okklusion der *A. carotis interna* und *externa*.

Einfluss der unilateralen OACI/E auf die zerebrovaskuläre Reservekapazität

Die unilaterale Okklusion der rechten ACI und ACE führte im Vergleich zur Sham-Gruppe zu einer signifikanten Reduktion der CVRC über dem ipsilateralen Mediastromgebiet nach Acetazolamid-Applikation. Diese wurde konstant über alle Versuchstage nachgewiesen (Abb. 11, Tag 0, *** $P < 0.001$; Tag 3, **** $P < 0.0001$; Tag 7, *** $P < 0.001$; Tag 14: * $P < 0.05$). Die Differenz beider Gruppen lag im Mittel über alle Versuchstage bei 27 ± 5 %. Über die gesamte Versuchsdauer (Tag 0, 3, 7 und 14) wurden innerhalb der physiologischen Kontrolle (Sham-Gruppe) konstante Werte der CVRC um 47 ± 1 % nachgewiesen (Abb. 11).

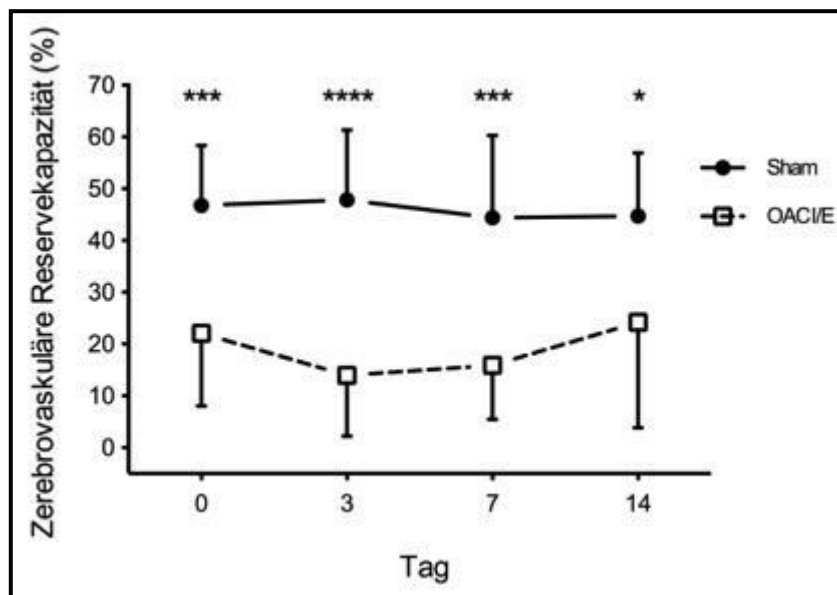


Abbildung 11: Einfluss der unilateralen Okklusion der ACI/ACE auf die zerebrovaskuläre Reservekapazität

Mittels Laser Speckle Gerät ermittelte Liniengraphen der Gesamtmittelwerte mit Standardabweichungen der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) der OACI/E- und Sham-Gruppe über eine Versuchsdauer von 14 Tagen (n=11–16 Tiere/Gruppe), angegeben in Prozent [%]. Eine OACI/E führt über die gesamte Versuchsdauer zu einer signifikant verminderten vaskulären Reaktion auf die Acetazolamid-Applikation über dem ipsilateralen Mediastromgebiet. (**** $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$; * $P < 0.05$). OACI/E=(unilaterale) rechtsseitige Okklusion der *A. carotis interna* und *externa*.

4.2.2 Einfluss der ECFC auf die Gehirndurchblutung nach unilateraler OACI/E

Einfluss der ECFC auf die Ruheperfusion nach unilateraler OACI/E

Mittels Laser Speckle Gerät erstellte exemplarische Darstellung des zerebralen Blutflusses nach unilateraler OACIE sind in der *Abb. 12* dargestellt. Die Messung der zerebralen Ruheperfusion im kortikalen Mediastromgebiet ergab an allen Zeitpunkten (Tag 0, 3, 7 und 14) keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen (unilaterale Okklusion der rechten ACI und ACE mit jeweils intravenöser Injektion von: PBS, HUVEC, ECFC, ECFC HD). In allen Gruppen konnte im zeitlichen Verlauf innerhalb einer Gruppe ein Anstieg der Ruheperfusion von Tag 0 (*Abb. 13*, Ruheperfusion PBS: $397,3 \pm 83$ Flux; HUVEC: $403,1 \pm 101$ Flux; ECFC: $385,3 \pm 85$ Flux; ECFC HD: $365,6 \pm 81$ Flux) bis zum Tag 14 (Ruheperfusion PBS: $587,5 \pm 126$ Flux; HUVEC: $638,3 \pm 164$ Flux; ECFC: $571,3 \pm 119$ Flux; ECFC HD: $649,2 \pm 75$ Flux) beobachtet werden.

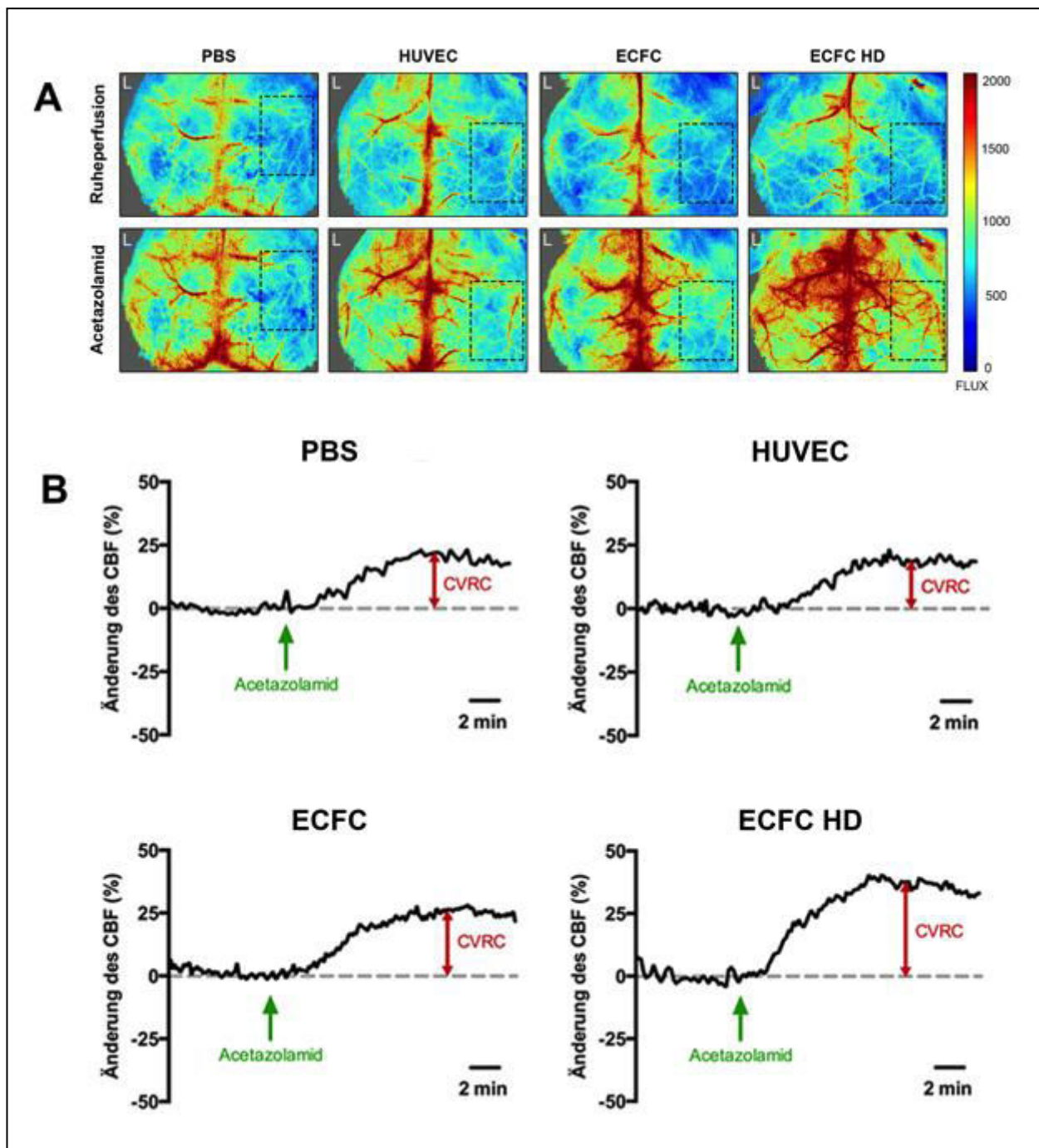


Abbildung 12: Einfluss verschiedener Behandlungen auf den zerebralen Blutfluss nach unilateraler OACI/E

Funktionelle zerebrale Blutfluss (CBF)-Messung mittels Laser Speckle Gerät an Tag 14 nach (unilateraler) rechtsseitiger Okklusion der *A. carotis interna* und *externa* (OACI/E) und Behandlung mit: ECFC HD, ECFC, HUVEC oder PBS. A) Farbkodierte Darstellung des zerebralen Blutflusses (rot=hoher Blutfluss, blau=niedriger Blutfluss). Obere Zeile: Ruheperfusion; untere Zeile: CBF nach Acetazolamid-Applikation. Ansicht von kranial. Rechteck=ROI über dem rechten Mediastromgebiet. L=linke Hirnhemisphäre. B) Graphische Darstellung der prozentualen Änderung des CBF aller Gruppen nach Acetazolamid-Injektion über die Zeit.

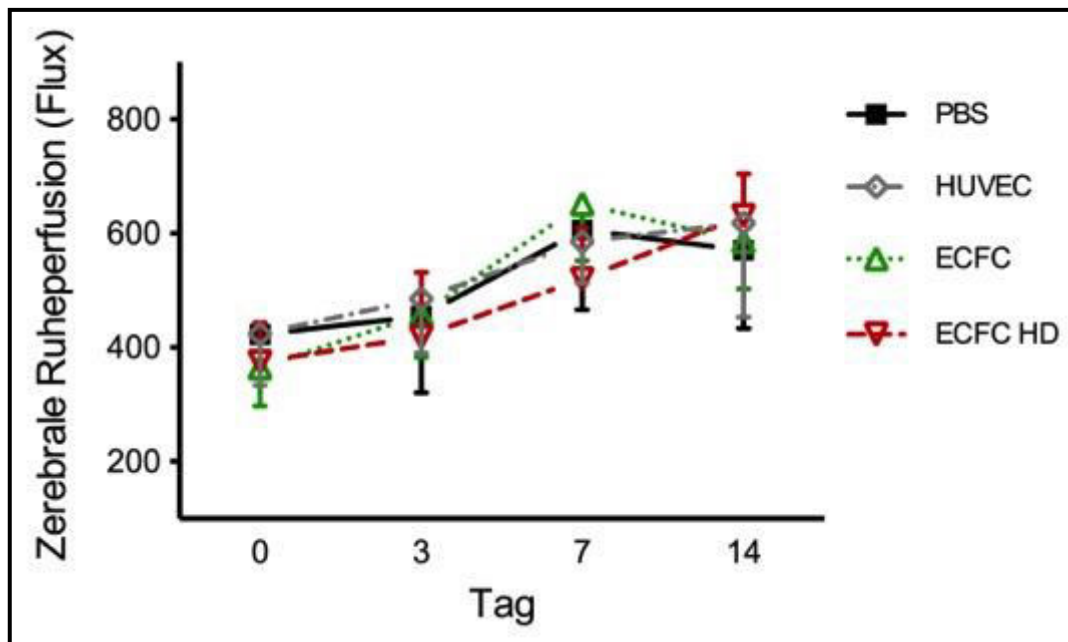


Abbildung 13: Mittels LSI transkranial gemessene zerebrale Ruheperfusion der rechten Hirnhemisphäre nach unilateraler OACI/E

Messung der zerebralen Ruheperfusion mittels Laser Speckle Gerät nach OACI/E und Behandlung mit: ECFC HD, ECFC, HUVEC oder PBS. Liniengraphen der Gesamtmittelwerte mit Standardabweichungen der zerebralen Ruheperfusion verschiedener Gruppen über eine Versuchsdauer von 14 Tagen (n=8–16 Tiere/Gruppe), angegeben in der arbiträren Einheit [Flux]. Keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Versuchsgruppen bei Anstieg der zerebralen Ruheperfusion über 14 Tage.

Einfluss der ECFC auf die CVRC

Mittels Laser Speckle Gerät erstellte exemplarische Darstellung verschiedener Reaktionen auf die Acetazolamid-Applikation nach unilateraler OACI/E sind der *Abb. 12* zu entnehmen. Nach unilateraler OACI/E bestand nach Laser Speckle Messung über dem ipsilateralen Mediastromgebiet an Tag 0 kein signifikanter Unterschied der CVRC zwischen allen Gruppen (*Abb.14*, CVRC an Tag 0, PBS: $22,1 \pm 14$ %; HUVEC: $31,3 \pm 11$ %; ECFC: $32,2 \pm 17$ %; ECFC HD: $29,1 \pm 18$ %). Eine hochdosierte ECFC-Applikation (1×10^6 Zellen/Zeitpunkt) führte an Tag 3 jeweils zu einer signifikanten Prozenterrhöhung der CVRC um 186 % gegenüber der PBS-Gruppe und um 67 % gegenüber der niedrigdosierten ECFC-Gruppe. An Tag 3 wies die HUVEC-Gruppe eine signifikante Erhöhung der CVRC um 99 % gegenüber der PBS-Gruppe auf. Die Applikation niedrigdosierter ECFC führte zu einer Erhöhung der CVRC um 71 %

gegenüber der PBS-Gruppe, ohne dabei eine statistische Signifikanz zu erreichen. Sowohl die HUVEC- als auch die (niedrigdosierte) ECFC-Gruppe zeigten eine CVRC unterhalb der (hochdosierten) ECFC HD-Gruppe. (*Abb.14*, CVRC an Tag 3, PBS: $13,9 \pm 12$ %; HUVEC: $27,7 \pm 11$ %*; ECFC: $23,8 \pm 14$ %; ECFC HD $39,7 \pm 20,5$ %*[§]; * $P < 0.05$ vs. PBS, [§] $P < 0.05$ vs. ECFC). An Tag 7 ließ sich weiterhin eine signifikante Prozenterhöhung der CVRC um 115 % der ECFC HD-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe verzeichnen. Daneben bewirkte eine niedrigdosierte ECFC-Injektion eine abgemilderte (nicht signifikante) Prozenterhöhung der CVRC um 77 %. Zwischen der HUVEC- und der PBS-Gruppe war kein Unterschied zu verzeichnen (*Abb.14*, CVRC an Tag 7, PBS: $15,9 \pm 20$ %; HUVEC: $18,3 \pm 13$ %; ECFC: $28,1 \pm 21$ %; ECFC HD $34,2 \pm 19$ %*; * $P < 0.05$ vs. PBS). An Tag 14 war eine signifikante Prozenterhöhung der CVRC um 65 % der ECFC HD-Gruppe gegenüber der PBS-Kontrolle und um 78 % gegenüber der HUVEC-Gruppe zu erkennen. Die ECFC-Gruppe zeigte eine nicht signifikante Prozenterhöhung der CVRC um 35 % im Vergleich zur PBS-Gruppe. Wie an Tag 7 zeigte die HUVEC-Applikation keinen Unterschied zu der PBS-Kontrolle. (*Abb.14*, CVRC an Tag 14, PBS: $24,2 \pm 20$ %; HUVEC: $22,4 \pm 18$ %; ECFC $32,7 \pm 15$ %; ECFC HD $39,9 \pm 10$ %*[#]; * $P < 0.05$ vs. PBS, [#] $P < 0.05$ vs. HUVEC). Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass nur die Behandlung mit hochdosierten ECFC zu einer signifikanten Erhöhung der CVRC an allen Folgetagen (Tag 3, 7 und 14) führte.

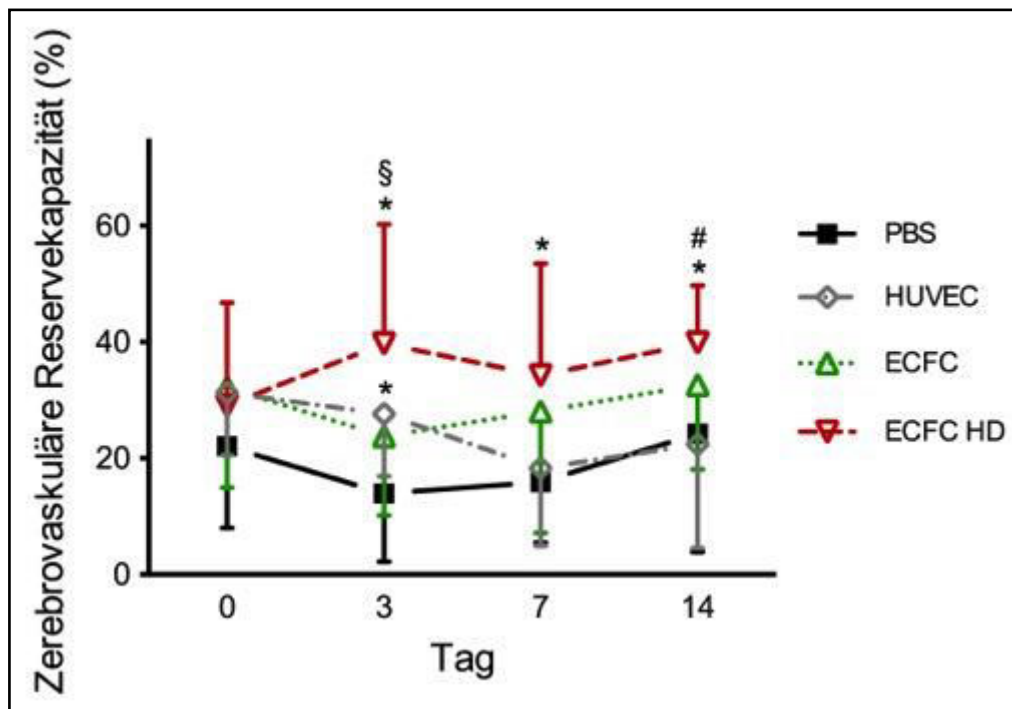


Abbildung 14: Einfluss der ECFC auf die zerebrovaskuläre Reservekapazität nach unilateraler OACI/E

ECFC beeinflussen die zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC). Funktionelle zerebrale Blutfluss (CBF)-Messung mittels Laser Speckle Gerät nach OACI/E und Behandlung mit: ECFC HD, ECFC, HUVEC oder PBS. Liniengraphen der Gesamtmittelwerte mit Standardabweichungen der CVRC verschiedener Gruppen über eine Versuchsdauer von 14 Tagen (n=8–16 Tiere/Gruppe); angegeben in Prozent [%]. ECFC HD führen bis zum Tag 14 zu einer signifikanten Erholung der CVRC. In den Kontrollgruppen verbleibt an Tag 14 eine funktionelle Beeinträchtigung. (* $P < 0.05$ vs. PBS, § $P < 0.05$ vs. ECFC, # $P < 0.05$ vs. HUVEC).

4.3 Strukturelle Veränderungen der basalen und leptomeningealen Hirnarterien nach ECFC-Applikation im Modell der chronisch zerebralen Hypoperfusion.

4.3.1 Etablierung der Latexangiographie bei der NuNu-Maus nach unilateraler OACI/E

Einfluss der unilateralen OACI/E auf die basalen Hirngefäße

Exemplarische Darstellung der basalen Hirngefäßarchitektur der Sham- und der OACI/E-Gruppe sind in der Abb. 15 dargestellt. In der NuNu-Maus ließen sich physiologisch (Sham-Gruppe) basale Hirngefäßdurchmesser zwischen 175 und 200 μm nachweisen. Eine unilaterale OACI/E

fürhte ohne weitere medikamentöse Therapie im Vergleich zur nicht-operierten Kontrolle (Sham) zu einer signifikanten Vergrößerung der basalen Hirnarterien in den Abschnitten ACA um 29 %, ACI um 22 % und AB um 29 %. Im Vergleich der ACM, AcomP und ACP bewirkte die unilaterale Okklusion der OACI/E keinen signifikanten Unterschied zwischen der OACI/E- und der Sham-Gruppe (Abb. 16, Gefäßdurchmesser A) Sham-Gruppe, ACA: $187,2 \pm 21,3 \mu\text{m}$; ACM: $181,0 \pm 15,5 \mu\text{m}$; ACI: $197,5 \pm 17,3 \mu\text{m}$; AcomP: $175,1 \pm 10,6 \mu\text{m}$; ACP: $107,9 \pm 51,1 \mu\text{m}$; AB: $199,7 \pm 32,7 \mu\text{m}$; B) OACI/E-Gruppe, ACA: $241,3 \pm 28,8 \mu\text{m}^*$; ACM: $193,7 \pm 13,7 \mu\text{m}$; ACI: $240,1 \pm 28,5 \mu\text{m}^*$; AcomP: $181,2 \pm 23,8 \mu\text{m}$; ACP: $128,3 \pm 60,2 \mu\text{m}$; AB: $257,0 \pm 24,3 \mu\text{m}^*$; $*P < 0.05$).

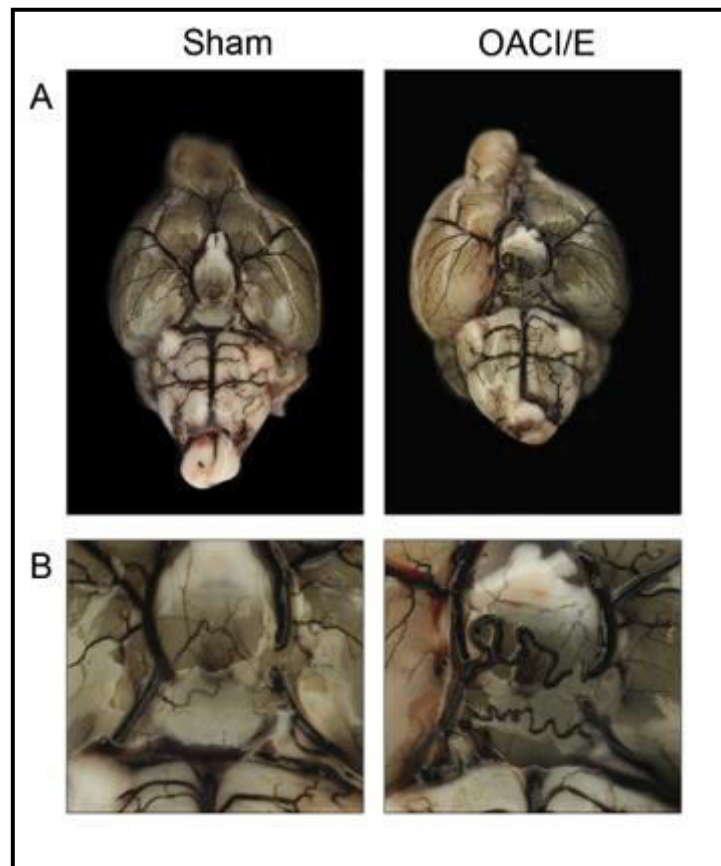


Abbildung 15: Latexangiographie der basalen Hirngefäßdurchmesser nach OACI/E

A) Exemplarische Darstellung der basalen Hirngefäße (*Circulus arteriosus Willisii*, CAW) nach Latexangiographie an Tag 21 nach unilateraler OACI/E (rechts) im Vergleich zur Sham-Gruppe (links), Ansicht von kaudal. 20-fache Vergrößerung. B) Detaillierte Darstellung des CAW (links=Sham; rechts= OACI/E).

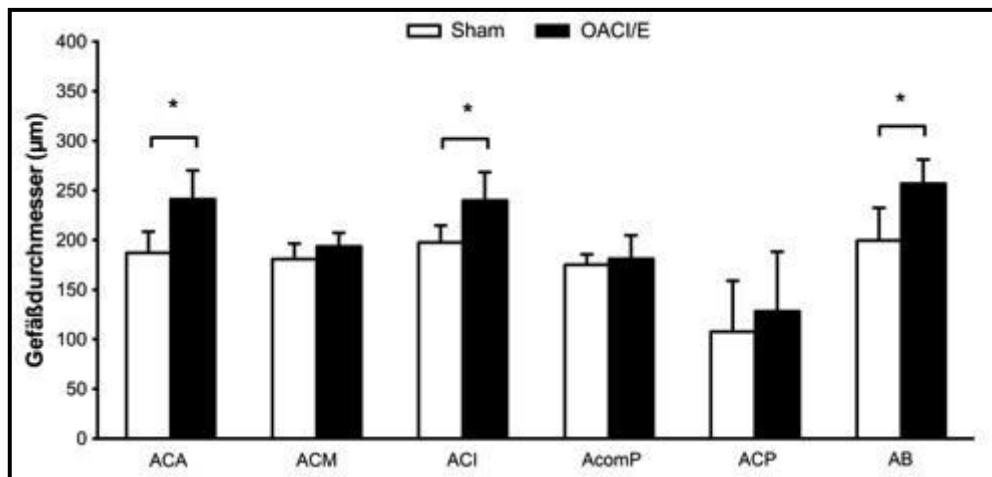


Abbildung 16: Einfluss der chronisch zerebralen Hypoperfusion auf die basalen Hirngefäße

Balkendiagramme der Mittelwerte mit Standardabweichungen der äußeren Gefäßdurchmesser nach Latexangiographie an Tag 21 (n=9–10 Tiere/Gruppe); angegeben in [μm]. Endogene Zunahme der äußeren Gefäßdurchmesser in den Bereichen der ACA, ACI und AB im Modell der chronisch zerebralen Hypoperfusion (unilaterale OACI/E) bei der NuNu-Maus. * $P < 0.05$.

Einfluss der unilateralen OACI/E auf die leptomeningealen Hirngefäße

An Tag 21 ließ sich nach unilateraler OACI/E latexangiographisch eine signifikante Zunahme der äußeren Gefäßdurchmesser der leptomeningealen Arterien nachweisen. Exemplarische Darstellungen der leptomeningealen Gefäße sind in den *Abb. 17A* und *17B* dargestellt. Dabei verschoben sich die Anteile zugunsten der größeren Gefäßdurchmesser (25–45 μm) (*Abb. 17C*; relative Häufigkeit der leptomeningealen Arterien; Sham: 5–25 μm : 90,1 \pm 2 %; 25–45 %: 9,9 \pm 2 %; OACI/E: 5–25 μm : 72 \pm 8 %; 25–45 %: 28 \pm 8 %; **** $P < 0.0001$, Sham vs. OACI/E)

Die chronisch zerebrale Hypoperfusion zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der leptomeningealen Anastomosen zwischen dem Media- und dem Anteriorstromgebiet bzw. zwischen dem Media- und dem Posteriorstromgebiet (*Abb. 17D*; Anzahl der leptomeningealen Anastomosen, Sham: 30,0 \pm 1; OACI/E: 31,0 \pm 1).

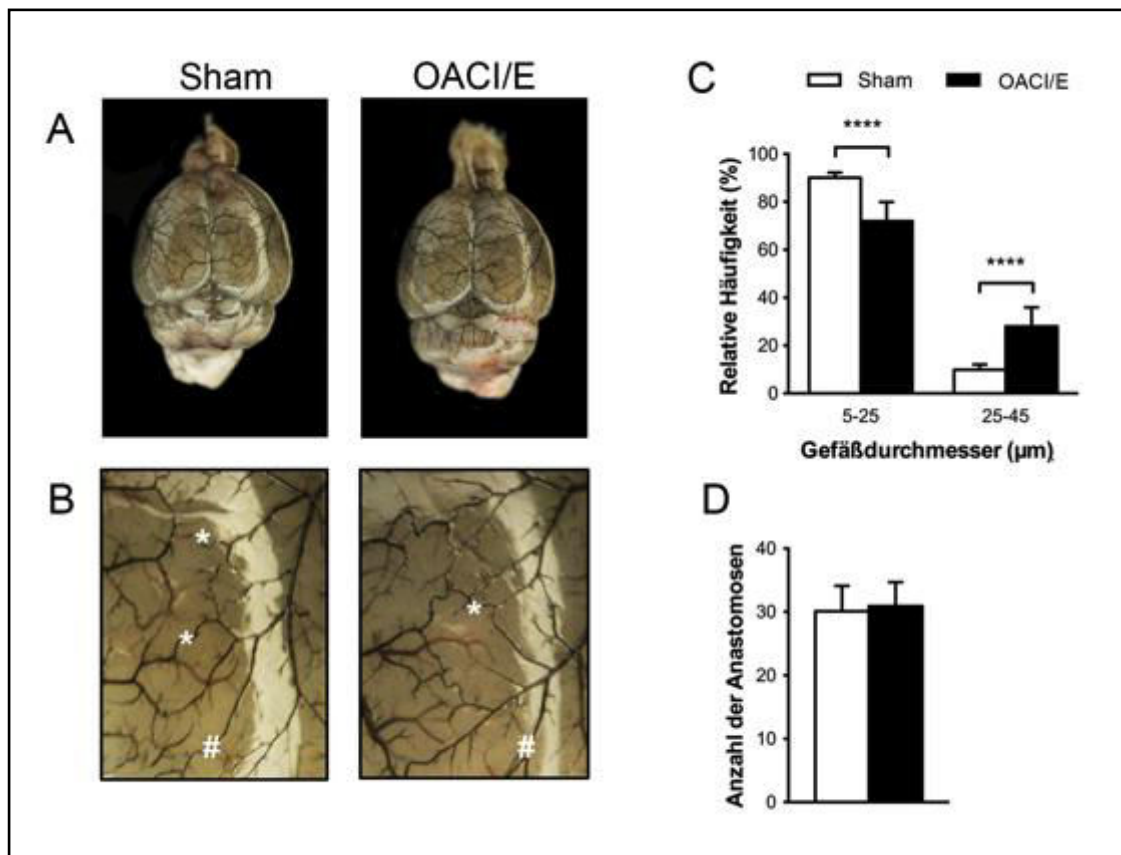


Abbildung 17: Einfluss der chronisch zerebralen Hypoperfusion auf die leptomeningealen Arterien

A) Exemplarische Darstellung der leptomeningealen Hirngefäße nach Latexangiographie an Tag 21 nach unilateraler OACI/E im Vergleich zur Sham-Gruppe (keine Okklusion), Ansicht von kranial. 20-fache Vergrößerung. B) Detaillierte Darstellung der (rechtsseitigen) leptomeningealen Gefäße und Anastomosen zwischen der ACM und ACA (*) sowie der ACM und ACP (#). C) Die unilaterale OACI/E bewirkt eine Verlagerung der Anteile der leptomeningealen Gefäßdurchmesser zugunsten der kaliberstärkeren Gefäße. **** $P < 0.0001$. D) Kein signifikanter Einfluss der chronisch zerebralen Hypoperfusion auf die Anzahl der leptomeningealen Anastomosen. Dargestellt sind Balkendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen. $n=9$ Tiere/Gruppe.

4.3.2 Einfluss der ECFC auf die basalen und leptomeningealen Hirnarterien nach unilateraler OACI/E

Einfluss der ECFC auf die basalen Hirnarterien

Exemplarische Darstellungen der Gefäße des CAW der verschiedenen Behandlungsgruppen nach unilateraler OACI/E sind der Abb. 18 zu entnehmen. In der PBS-Kontrollgruppe wurden nach

unilateraler OACI/E im Bereich des CAW mit Werten über $240\ \mu\text{m}$ die größten Gefäßdurchmesser in der ACA, der ACI und der AB beobachtet. Im Vergleich zu diesen fielen die Durchmesser der ACM, der AcomP und der ACP kleiner aus. Die AB zeigte innerhalb des CAW mit $257,0\pm 24,3\ \mu\text{m}$ den kaliberstärksten und die ACP mit $128,3\pm 60,2\ \mu\text{m}$ den kaliberschwächsten Gefäßabschnitt (*Abb. 19*, Gefäßdurchmesser PBS-Gruppe, ACA: $241,3\pm 28,8\ \mu\text{m}$; ACM: $193,7\pm 13,7\ \mu\text{m}$; ACI: $240,1\pm 28,5\ \mu\text{m}$; AcomP: $181,2\pm 23,8\ \mu\text{m}$; ACP: $128,3\pm 60,2\ \mu\text{m}$; AB: $257,0\pm 24,3\ \mu\text{m}$).

Die HUVEC-Applikation nach unilateraler OACI/E führte gegenüber der PBS-Kontrolle in der ACA zu einer signifikanten Vergrößerung des Gefäßdurchmessers um 19 % ($P<0.05$). Beim Vergleich der ACI konnte man in der HUVEC-Gruppe eine signifikante Erhöhung des Gefäßkalibers um 16 % gegenüber der PBS-Kontrolle erkennen ($P<0.05$). Die HUVEC-Injektion nach unilateraler OACI/E zeigte in Bezug zur ACM, zur AcomP, zur ACP und zur AB keinen signifikanten Unterschied zur PBS-Gruppe (*Abb. 19*, Gefäßdurchmesser HUVEC-Gruppe, ACA: $287,6\pm 11,1\ \mu\text{m}^*$; ACM: $195,1\pm 11,1\ \mu\text{m}$; ACI: $282,3\pm 17,6\ \mu\text{m}^*$; AcomP: $193,4\pm 13,5\ \mu\text{m}$; ACP: $137,3\pm 43,7\ \mu\text{m}$; AB: $235\pm 42,2\ \mu\text{m}$; $*P<0.05$ vs. PBS und ECFC HD).

Die Applikation niedrigdosierter ECFC führte innerhalb der ACA zu einer signifikanten Erhöhung der Gefäßkaliber um 27 % gegenüber der ACA der PBS-Kontrolle ($P<0.05$). Eine (niedrigdosierte) ECFC-Injektion führte zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßdurchmesser der ACI um 26 % gegenüber der ACI der PBS-Gruppe ($P<0.05$). In Bezug zur AcomP konnte eine signifikante Erhöhung des Durchmessers nach niedrigdosierter ECFC-Gabe um 19 % im Vergleich zur PBS-Gruppe und um 24 % im Vergleich zur ECFC HD-Gruppe beobachtet werden ($P<0.05$). Dagegen zeigte die niedrigdosierte ECFC-Applikation nach unilateraler OACI/E-Applikation jeweils keinen signifikanten Unterschied der ACM, der ACP und der AB im Vergleich zu den gleichen Gefäßen der PBS-Kontrolle (*Abb. 19*, Gefäßdurchmesser ECFC-Gruppe, ACA: $306,9\pm 31,1\ \mu\text{m}^*$; ACM: $193,3\pm 19,9\ \mu\text{m}$; ACI: $303,4\pm 34,8\ \mu\text{m}^*$; AcomP: $215,4\pm 34,5\ \mu\text{m}^*$; ACP: $158,2\pm 41,3\ \mu\text{m}$; AB: $253,0\pm 25,6\ \mu\text{m}$; $*P<0.05$ vs. PBS und ECFC HD).

Nach hochdosierter ECFC-Injektion war eine signifikante Erniedrigung der ACA um 21 % und der ACI um 23 % gegenüber der HUVEC-Gruppe sowie der ACA um 29 % und der ACI um 32 % gegenüber der (niedrigdosierten) ECFC-Gruppe zu verzeichnen ($P<0.05$). Das Niveau der ECFC HD-Gruppe verblieb dabei auf dem der PBS-Kontrolle und unterschied sich nicht signifikant von dieser. Im Vergleich der ACM gegenüber den anderen Gruppen führte die

hochdosierte ECFC-Applikation zu einer signifikanten Erniedrigung des Kalibers der ACM (prozentuale Erniedrigung, ECFC HD vs. PBS 19 %[#]; ECFC HD vs. HUVEC 20 %[#]; ECFC HD vs. ECFC 20 %[#], [#] $P < 0.05$). Die AcomP zeigte eine signifikante Erniedrigung gegenüber der ECFC-Gruppe um 24 % ($P < 0.05$). Die ACP und die AB zeigten dagegen gegenüber allen Gruppen keinen signifikanten Unterschied. (*Abb. 19*, Gefäßdurchmesser ECFC HD-Gruppe, ACA: $237,6 \pm 24,4 \mu\text{m}^*$; ACM: $163,0 \pm 17,6 \mu\text{m}^{\#}$; ACI: $229,8 \pm 21,7 \mu\text{m}^*$; AcomP: $173,6 \pm 21,0 \mu\text{m}^*$; ACP: $129,8 \pm 54,6 \mu\text{m}$; AB: $231,0 \pm 26,0 \mu\text{m}$; * $P < 0.05$ vs. HUVEC und ECFC, [#] $P < 0.05$ vs. alle Gruppen).

Die ACA wies sowohl in der HUVEC- als auch in der (niedrigdosierten) ECFC-Gruppe eine signifikante Erhöhung gegenüber der PBS-Kontrolle auf. Dabei erreichten die Gefäßdurchmesser der ACA der (niedrigdosierten) ECFC-Gruppe um 7 % größere Werte im Vergleich zur ACA der HUVEC-Gruppe. Dagegen entsprachen die ACA-Gefäßkaliber der (hochdosierten) ECFC HD-Gruppe mit $237,6 \pm 24,4 \mu\text{m}$ denen der PBS-Kontrolle ($241,3 \pm 28,8 \mu\text{m}$, $P > 0.05$). Äquivalent zur ACA verhielt sich die ACI. Hier lag jeweils eine statistisch belegte Erhöhung der ACI der HUVEC- und der ECFC-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe vor. Die ACI Durchmesser der (niedrigdosierten) ECFC-Gruppe zeigten um 7 % höhere Werte gegenüber der ACI der HUVEC-Gruppe. Im Gegensatz zur (niedrigdosierten) ECFC- und HUVEC-Gruppe entsprachen die ACI-Durchmesser der (hochdosierten) ECFC HD-Gruppe mit $229,8 \pm 21,7 \mu\text{m}$ denen der PBS-Kontrollgruppe ($240,1 \pm 28,5 \mu\text{m}$, $P > 0.05$). Bei der Untersuchung der ACM wurden signifikant erniedrigte Gefäßkaliber allein in der ECFC HD-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe verzeichnet. Bezüglich der AcomP war eine signifikante Erhöhung allein in der (niedrigdosierten) ECFC-Gruppe gegenüber der PBS- und ECFC-Gruppe erkennbar ($P < 0.05$). Bei der Betrachtung der ACP und der AB konnten jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gezeigt werden (*Abb. 19*).

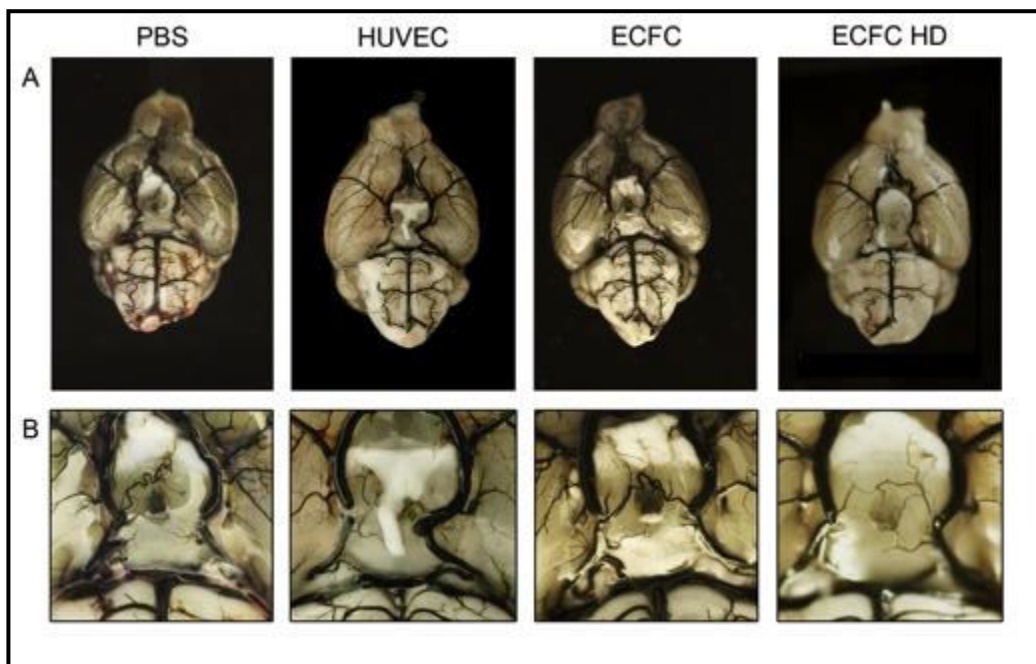


Abbildung 18: Latexangiographie der basalen Hirngefäßdurchmesser nach OACI/E und ECFC-Applikation

A) Übersicht der basalen Hirngefäße (*Circulus arteriosus Willisii*, CAW) nach Latexangiographie an Tag 21 nach unilateraler OACI/E und entsprechender Injektion (PBS, HUVEC, ECFC oder ECFC HD), Ansicht von kaudal. 20-fache Vergrößerung. B) Detaillierte Darstellung des CAW.

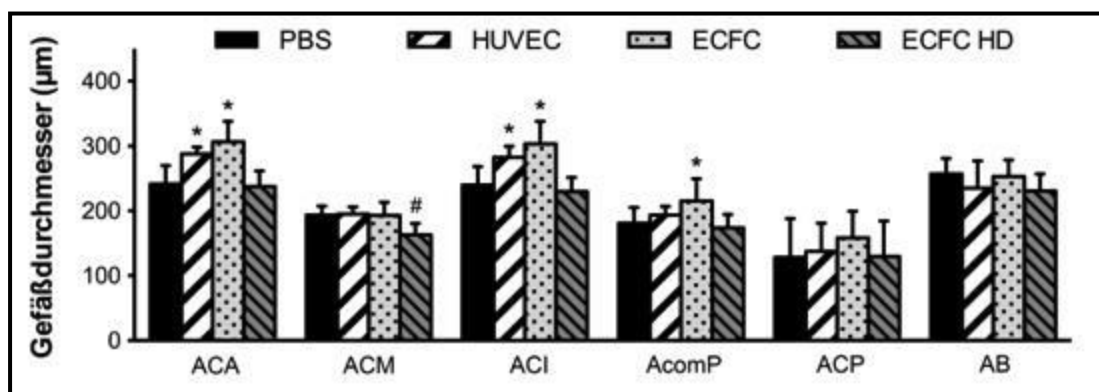


Abbildung 19: Einfluss der ECFC auf die basalen Hirngefäßdurchmesser

Balkendiagramme der Latexangiographie an Tag 21 nach unilateraler OACI/E und entsprechender Behandlung (PBS, HUVEC, ECFC oder ECFC HD). Signifikante Steigerung der Gefäßdurchmesser in den Bereichen der ACA, ACI und AcomP nach HUVEC- und (niedrigdosierter) ECFC-Applikation. Ausbleibende Zunahmen der Hirngefäßdurchmesser auf basaler Ebene nach ECFC HD-Applikation spiegeln effizientere Kompensationsmechanismen auf leptomeningealer Ebene wider. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. n=7–11 Tiere/Gruppe. * $P < 0.05$ vs. PBS und ECFC HD, # $P < 0.05$ vs. alle Gruppen.

Einfluss der ECFC auf die leptomeningealen Gefäßdurchmesser

Die Durchmesser der leptomeningealen Arterien zeigten in allen untersuchten Gruppen eine Spanne von 5 bis 45 μm . Eine exemplarische Darstellung der leptomeningealen Gefäße der verschiedenen Behandlungsgruppen nach unilateraler OACI/E ist der *Abb. 20* zu entnehmen.

Die PBS-Gruppe zeigte nach unilateraler OACI/E mit 2/3 der gesamten Durchmesser der leptomeningealen Arterien einen höheren Anteil an kleineren Gefäßdurchmessern (5 bis 25 μm). Ein Drittel machten dementsprechend leptomeningeale Arterien mit größeren Durchmessern (25 bis 45 μm) aus (*Abb. 21, links*; PBS-Gruppe, relative Häufigkeit der leptomeningealen Arterien; 5–25 μm : 72,0 \pm 7,9 %; 25–45 μm : 28,0 \pm 7,9 %).

Nach Applikation von HUVEC wurde nach OACI/E keine signifikante Veränderung gegenüber der PBS-Kontrolle verzeichnet (*Abb. 21, links*; HUVEC-Gruppe, relative Häufigkeit der leptomeningealen Arterien; 5–25 μm : 70,0 \pm 11,7 %; 25–45 %: 30,0 \pm 11,7 %).

Äquivalent zur HUVEC-Gruppe konnte in der (niedrigdosierten) ECFC-Gruppe keine signifikante Veränderung im Vergleich zur PBS-Gruppe beobachtet werden (*Abb. 21, links*; ECFC-Gruppe, relative Häufigkeit der leptomeningealen Arterien; 5–25 μm : 74,1 \pm 6,0 %; 25–45 %: 24,6 \pm 6,4 %).

Die Applikation hochdosierter ECFC führte dagegen innerhalb der ECFC HD-Gruppe zu einer Verschiebung des Anteils kleiner Durchmesser (5–25 μm) zugunsten einer Erhöhung der großen Durchmesser (25–45 μm). Im Vergleich zwischen der niedrigdosierten und hochdosierten ECFC-Gruppen war eine signifikante Erhöhung der relativen Häufigkeit von 64 % zugunsten der kaliberstärkeren leptomeningealen Arterien zu verzeichnen ($P < 0.05$). Die ECFC HD-Gruppe zeigte gegenüber der PBS-Kontrolle eine (nicht signifikante) Erniedrigung in der Gruppe mit kleinen Gefäßdurchmessern (5–25 μm) und eine entsprechend (nicht signifikante) Erhöhung der größeren Durchmesser (25–45 μm) um 44 %. (*Abb. 21, links*; ECFC HD-Gruppe, relative Häufigkeit der leptomeningealen Arterien; 5–25 μm : 58,9 \pm 14,5 %*; 25–45 %: 40,4 \pm 14,0 %*, * $P < 0.05$, ECFC HD vs. ECFC).

Einfluss der ECFC auf die Anzahl der leptomeningealen Anastomosen

Die PBS-Gruppe zeigte nach unilateraler OACI/E über der ipsilateralen Hirnhemisphäre durchschnittlich 31 Anastomosen zwischen den Endästen der ACM und der ACA bzw. ACM und ACP.

Die Injektion von HUVEC nach OACI/E ließ in Bezug auf die Anzahl der leptomeningealen Anastomosen keinen signifikanten Unterschied zwischen der HUVEC- und der PBS-Gruppe verzeichnen.

Äquivalent zur HUVEC-Gruppe bewirkte die Applikation niedrigdosierter ECFC im Vergleich zur PBS-Kontrolle keinen signifikanten Unterschied bei der Analyse der leptomeningealen Anastomosen.

Nach unilateraler OACI/E führte die ECFC-Applikation zu einem weiteren dosisabhängigen Effekt. Die hochdosierte ECFC Applikation (ECFC HD-Gruppe) resultierte in einer signifikanten Steigerung der durchschnittlichen Anastomosenzahl um 17 % gegenüber der PBS-Kontrolle ($P < 0.05$). Ebenfalls ließ sich jeweils eine signifikante Erhöhung der Anastomosenzahl um 28 % im Vergleich zur HUVEC-Gruppe und um 26 % gegenüber der niedrigdosierten ECFC-Gruppe verzeichnen ($P < 0.05$). (Abb. 21, rechts; Anzahl der leptomeningealen Anastomosen, PBS $30,9 \pm 4$; HUVEC $28,3 \pm 4$; ECFC $28,8 \pm 2$; ECFC HD $36,2 \pm 4^*$, $*P < 0.05$, ECFC HD vs. übrige Gruppen).

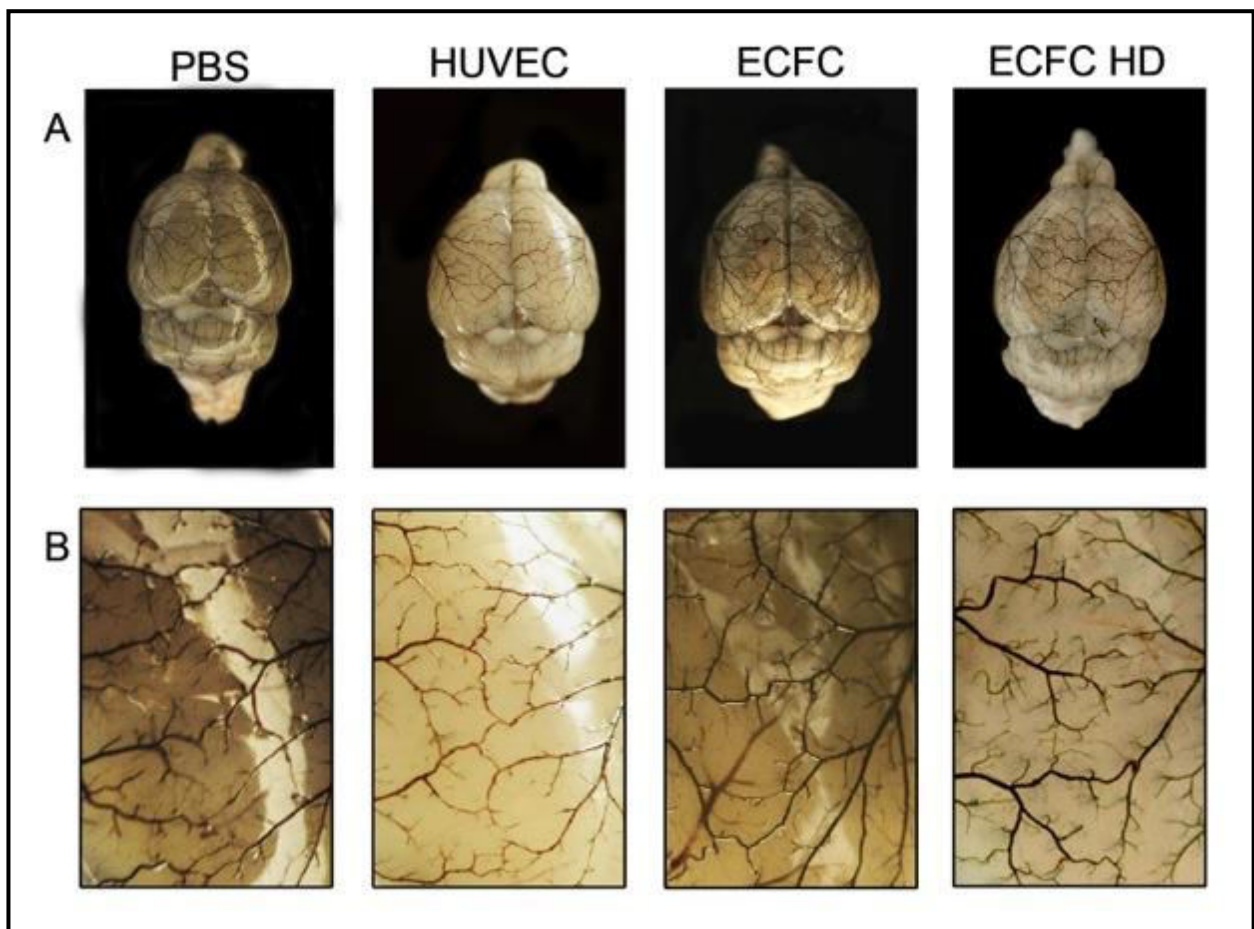


Abbildung 20: Latexangiographie der leptomeningealen Hirngefäßdurchmesser und -anastomosen nach OACI/E und ECFC-Behandlung

A) Übersicht der leptomeningealen Hirngefäße nach Latexangiographie an Tag 21 nach unilateraler OACI/E und entsprechender Injektion, Ansicht von kranial. 20-fache Vergrößerung. B) Detaillierte Darstellung der (rechtsseitigen) leptomeningealen Gefäße und Anastomosen zwischen der ACM und ACA sowie der ACM und ACP.

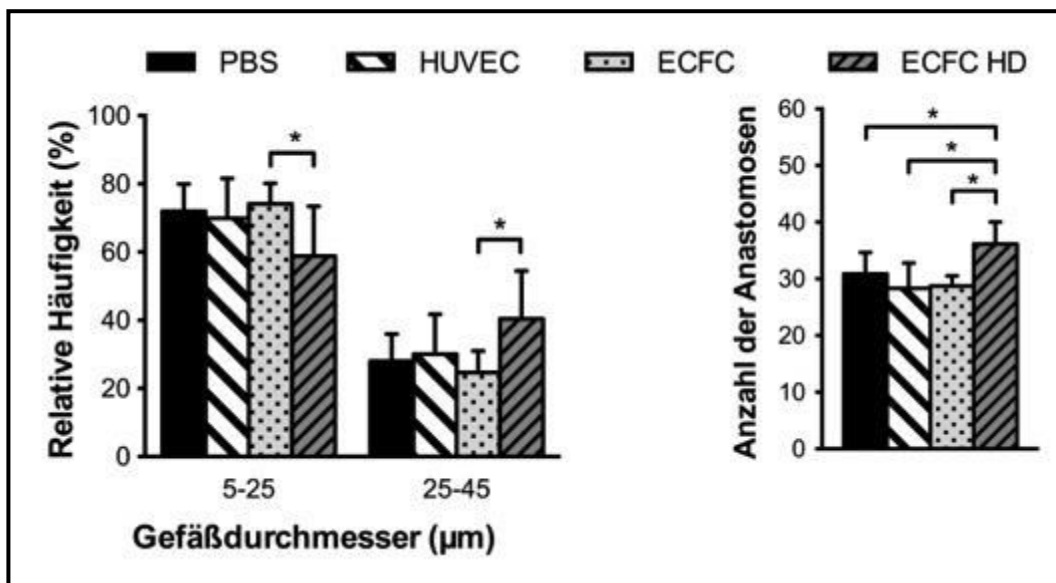


Abbildung 21: Einfluss der ECFC auf die leptomeningealen Gefäßdurchmesser und -anastomosen

Latexangiographie an Tag 21 nach unilateraler OACI/E und entsprechender Injektion (PBS, HUVEC, ECFC oder ECFC HD). Balkendiagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Links: Relative Häufigkeit der Gefäßdurchmesser (%) nach Gruppierung in zwei Größenkategorien (5–25 µm und 25–45 µm). Die Injektion hochdosierter ECFC (ECFC HD) führt auf leptomeningealer Ebene zu einer signifikanten Verlagerung kleiner zu Gunsten größerer Gefäßdurchmesser. Rechts: Absolute Anzahl der leptomeningealen Anastomosen (Anastomosen zwischen den Endästen der ACM und der ACA sowie der ACA und der ACP). ECFC HD-Applikation führte zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der leptomeningealen Anastomosen. $n=7-10$ Tiere/Gruppe. $*P<0.05$, ECFC HD vs. übrige Gruppen.

4.4 Zerebrale Mikrogefäßarchitektur nach OACI/E und ECFC Behandlung

4.4.1 Proliferation der basalen Hirngefäße

Einfluss der OACI/E auf die Proliferation der basalen Hirngefäße

Exemplarische Darstellung der Gefäßzellen und entsprechende Proliferationen im Bereich der ACA der Sham-Gruppe im Vergleich zur OACI/E-Gruppe sind in der *Abb. 22A (links und rechts)* dargestellt. Die unilaterale OACI/E führte an Tag 7 zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferation der Endothelzellen der ACA um vier Zellproliferationen/Gesichtsfeld (*Abb. 22B*, $**P<0.01$, Sham vs. OACI/E) und der ACI um drei Zellproliferationen/Gesichtsfeld (*Abb. 22B*,

* $P < 0.05$, Sham vs. OACI/E) gegenüber der (nicht okkludierten) Sham-Gruppe. Die ACM, AcomP, ACP und AB zeigten keine signifikanten Unterschiede der Endothelzellproliferation zwischen der PBS und Sham-Gruppe. Die ACM, AcomP, ACP und AB zeigten keine signifikanten Unterschiede der Endothelzellproliferation zwischen der OACI/E- und der Sham-Gruppe (*Abb. 22B*).

Innerhalb der ACI ließ sich eine signifikant erhöhte Proliferation der glatten Muskelzellen um zwei Zellproliferationen/Gesichtsfeld nach unilateraler OACI/E gegenüber der Sham-Gruppe nachweisen (*Abb. 22C*, * $P < 0.05$, Sham vs. OACI/E). In der AcomP und AB zeigte sich jeweils ein nicht signifikanter Trend zur Erhöhung der Proliferation der glatten Muskelzellen um zwei Zellproliferationen/Gefrierschnitt. Die ACA, ACM und ACP zeigten keine signifikanten Unterschiede der Proliferationsrate der glatten Muskelzellen zwischen der OACI/E- und der Sham-Gruppe (*Abb. 22C*).

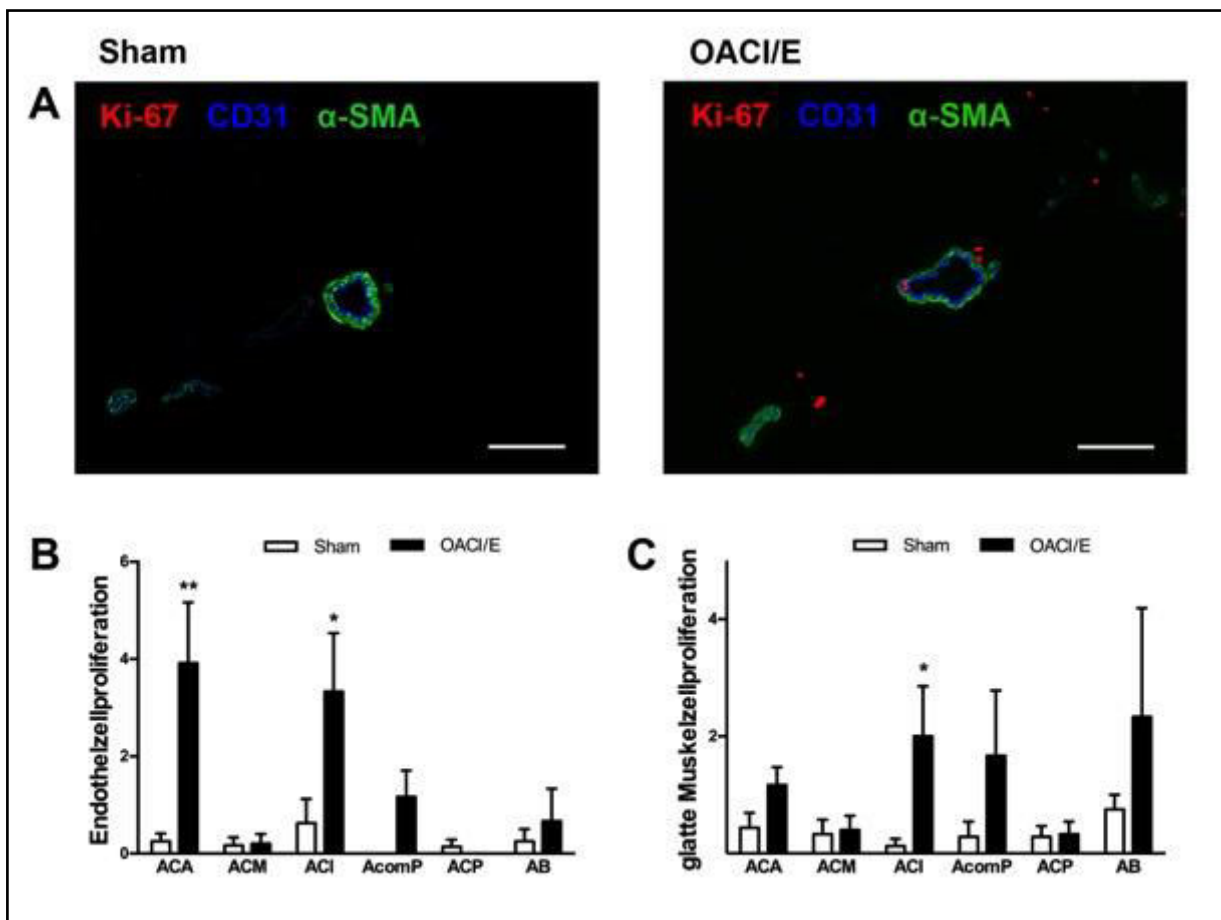


Abbildung 22: Zellproliferation der basalen Hirnarterien nach unilateraler OACI/E

A) Exemplarische Darstellung der ACA (links=Sham; rechts=OACI/E). Ki-67=Proliferationsmarker; CD31=Endothelzelle; α-SMA=glatte Muskelzelle. Maßstabsleiste=100 μm. B) Signifikant vermehrte Proliferation der Endothelzellen innerhalb der ACA und der ACI gegenüber der Sham-Gruppe an Tag 7 nach unilateraler OACI/E. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, Sham vs. OACI/E. C) Signifikant vermehrte Proliferation der Muskelzellen innerhalb der ACI gegenüber der Sham-Gruppe nach unilateraler OACI/E. Proliferationsraten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben (n=3–4 Tiere/Gruppe). * $P < 0,05$, Sham vs. OACI/E.

Einfluss der ECFC HD auf die Proliferation der basalen Hirngefäße

Exemplarische Darstellung der Gefäßzellen und entsprechende Proliferationen im Bereich der ACA der PBS-Gruppe im Vergleich zur ECFC HD-Gruppe sind in der *Abb. 23A* (links und rechts) dargestellt. Nach ECFC-Applikation wurde eine Proliferation der Endothelzellen der basalen Gefäße festgestellt. Sie unterschied sich innerhalb der gesamten basalen Hirngefäße

(ACA, ACM, ACI, AcomP, ACP, AB) nicht signifikant von der (zellfreien) PBS-Kontrolle. Die höchste Proliferationsrate wurde in der ACA und ACI beobachtet (*Abb. 23B*).

Im Vergleich der Proliferationsraten der glatten Muskelzellen innerhalb der ACA, ACM, ACI, AcomP, ACP, AB ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der ECFC HD- und der PBS-Gruppe verzeichnen (*Abb. 23*).

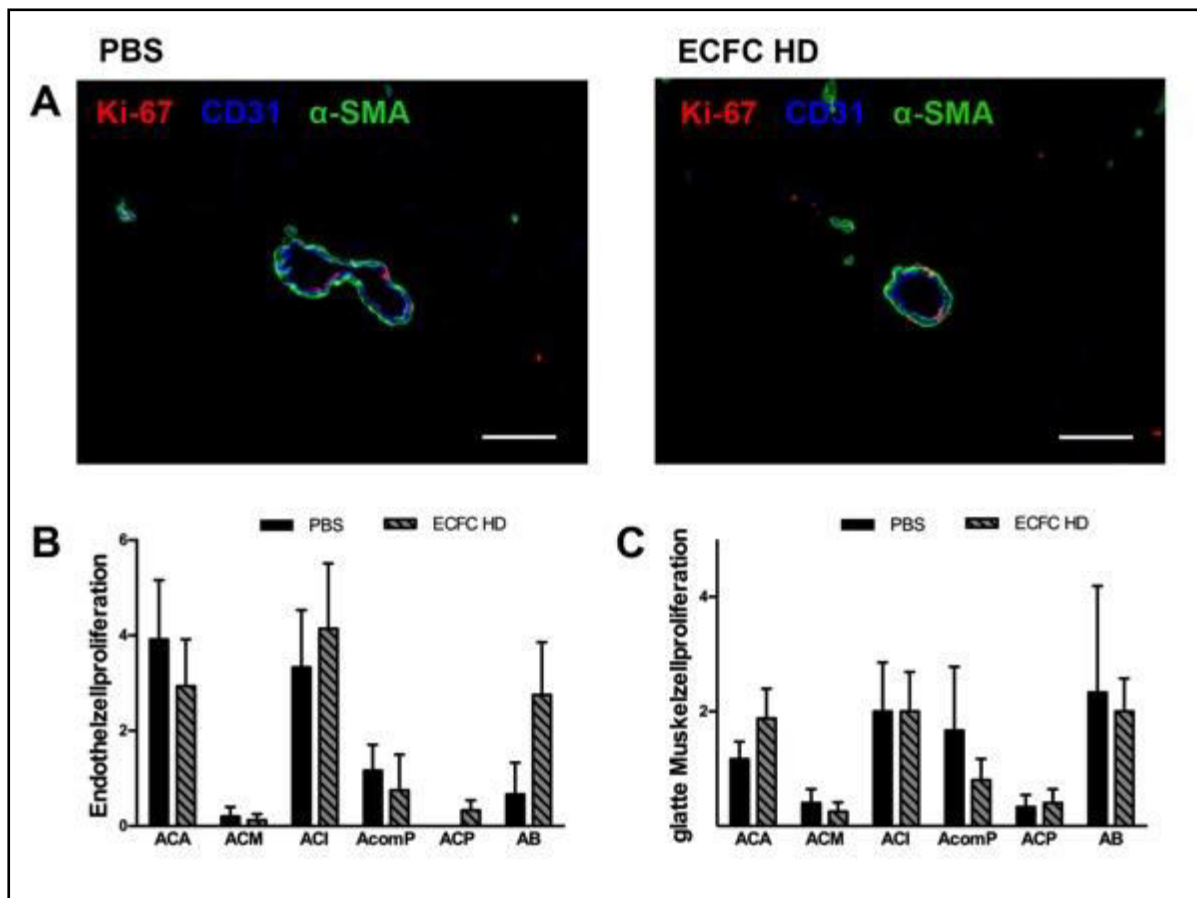


Abbildung 23: Zellproliferation der basalen Hirnarterien nach OACI/E und ECFC-Behandlung

A) Exemplarische Darstellung der ACA (links=PBS; rechts=ECFC HD). Ki-67=Proliferationsmarker; CD31=Endothelzelle; α -SMA=glatte Muskelzelle. Maßstabsleiste=100 μ m. B und C) Nach unilateraler OACI/E wurden Proliferation der Endothelzellen (B) und der glatten Muskelzellen (C) an Tag 7 nachgewiesen. Eine Behandlung mit ECFC HD führte im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu keinem signifikanten Unterschied. Die Proliferationsraten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben (n=3–4 Tiere/Gruppe).

4.4.2 Immunhistochemie der zerebralen Mikrogefäßarchitektur

Einfluss der unilateralen OACI/E auf die zerebrale Mikrogefäßarchitektur

Die unilaterale OACI/E zeigte im Bereich des S1 eine Mikrogefäßdichte von $527,2 \pm 69,7$ Gefäßen pro mm^2 und führte in Bezug zur Mikrogefäßdichte zu keiner signifikanten Veränderung gegenüber der OACI/E-Gruppe. Nach unilateraler OACI/E zeigten $\frac{3}{4}$ der zerebralen Gefäße des S1 eine Kolokalisation mit Perizyten. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Sham- und der OACI/E-Gruppe gefunden. Die Dichte der α -SMA positiven Gefäße betrug nach unilateraler OACI/E $18,9 \pm 5,3$ Gefäße pro mm^2 . Es fand sich kein signifikanter Unterschied der α -SMA positiven Gefäße der OACI/E- im Vergleich zu denen der Sham-Gruppe (*Abb. 24* und *Tab. 15*).

Die Mikrogefäßdichte lag im Cpu nach OACI/E bei $396,6 \pm 49,5$ Gefäßen pro mm^2 . Bei der Analyse der Mikrogefäßdichte fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der OACI/E- und der Sham-Gruppe. Von diesen Mikrogefäßen zeigten $78,2 \pm 4,0$ % eine Kolokalisation mit Desmin, ohne sich signifikant von der Sham-Gruppe zu unterscheiden. Die Dichte der α -SMA positiven Gefäße betrug nach unilateraler OACI/E $12,8 \pm 1,4$ Gefäße pro mm^2 , dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der unilateralen OACI/E und der nicht okkludierten Gruppe (*Abb. 24* und *Tab. 15*).

Im CA1 wurde nach unilateraler OACI/E eine Mikrogefäßdichte von $330,3 \pm 9,1$ Gefäße/ mm^2 nachgewiesen. Dabei lag kein signifikanter Unterschied bezüglich der Mikrogefäßdichte gegenüber der Sham-Gruppe vor. Der relative Desmin-Besatz betrug im CA1 $61,6 \pm 4,3$ %, ohne sich dabei signifikant von der Sham-Gruppe zu unterscheiden. Die Dichte der α -SMA positiven Gefäße zeigte mit $16,8 \pm 0,7$ Gefäße/ mm^2 eine nicht signifikante Erhöhung um 27 % in der OACI/E- gegenüber der Sham-Gruppe (*Abb. 24* und *Tab. 15*).

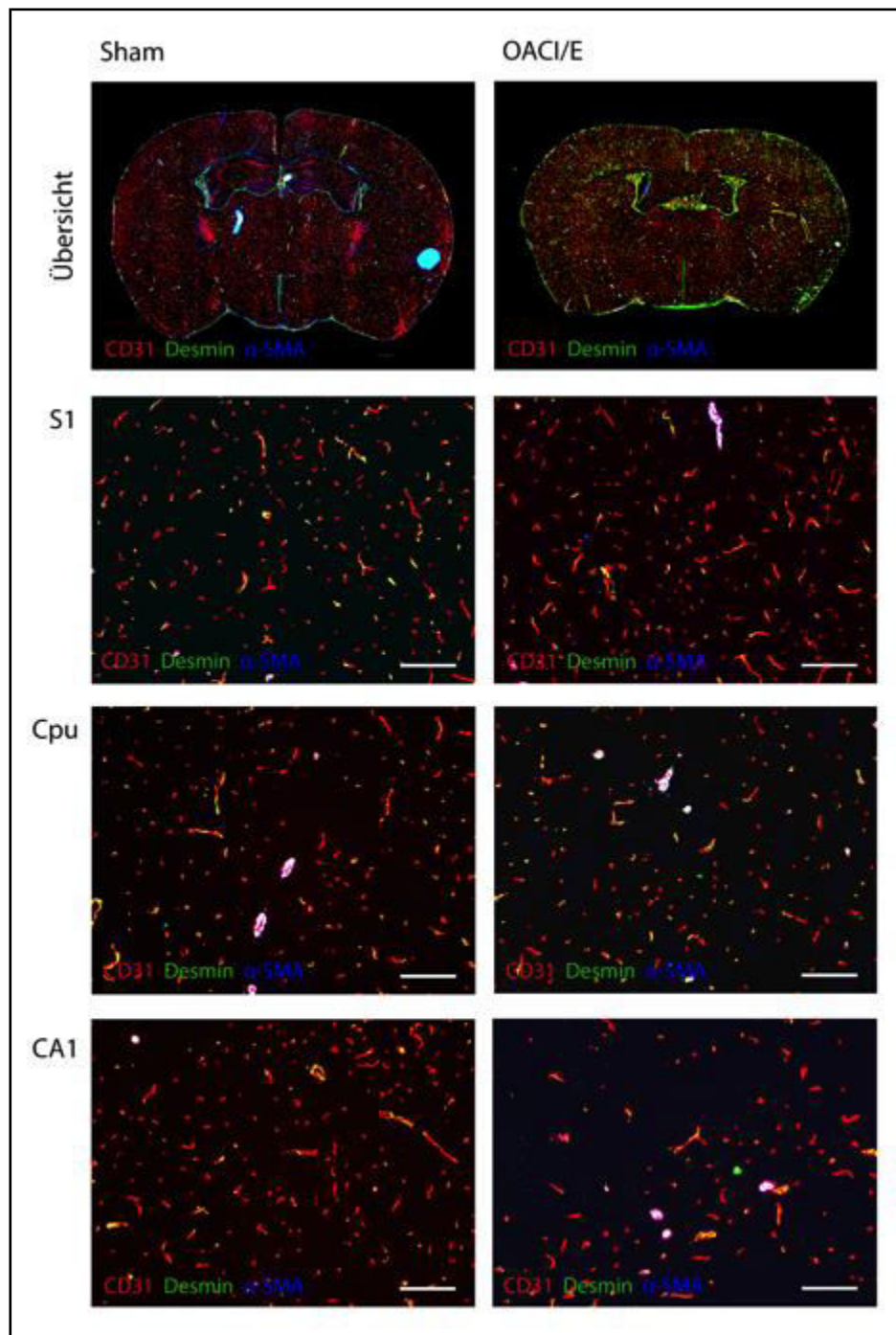


Abbildung 24: Immunhistochemie der zerebralen Mikrogefäßarchitektur nach OACI/E

Exemplarische Abbildungen der zerebralen, parenchymatösen Endothelzellen (rot=CD31) und Perizyten (grün=Desmin; blau= α -SMA) mittels Immunhistochemie nach OACI/E vs. Sham (physiologische Kontrolle). Dargestellt sind eine Übersicht (Höhe des Bregmas), der sensomotorische Kortex (S1), das Striatum (Cpu) und der Hippocampus (CA1). Die OACI/E beeinflusst nicht das Gefäßwachstum auf Mikrogefäßebene. Darstellung der Übersichten als Mosaik 100-facher Vergrößerungen. Übrige Hirnregionen in 200-facher Vergrößerung. Maßstabsleisten=100 μ m.

Tabelle 15: Einfluss der OACI/E auf die zerebrale Mikrogefäßarchitektur

n=3–4 Tiere/Gruppe

	CD31 (1/mm ²)		Desmin (%)		α-SMA (1/mm ²)	
	Sham	OACI/E	Sham	OACI/E	Sham	OACI/E
S1	546,0±76,7	527,2±69,7	74,8±6,8	74,4±4,4	18,9±5,3	17,5±4,8
Cpu	444,8±57,7	396,6±49,5	73,6±5,9	78,2±4,0	13,6±3,6	12,8±1,4
CA1	357,0±47,6	330,3± 9,1	65,5±4,8	61,6±4,3	12,2±5,5	16,8±0,7

Einfluss der ECFC auf die zerebrale Mikrogefäßarchitektur nach unilateraler OACI/E

Die Gefäßdichte CD31-positiver Zellen lag im S1 der ECFC HD-Gruppe bei 541,4±71,9 Gefäße pro mm² und wies keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur (zellfreien) PBS-Gruppe auf. Von diesen Mikrogefäßen zeigten 71,2±3,9 % einen Desmin-Besatz. Beim Vergleich des Desmin-Besatzes der ECFC HD- und der PBS-Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied gefunden. Im S1 wurde nach ECFC HD-Injektion eine signifikante 65-prozentige Erniedrigung der α-SMA positiven Gefäße gegenüber der (zellfreien) PBS-Gruppe gezeigt (**P*<0.05, ECFC vs. PBS) (Abb. 25 und Tab. 16).

In der ECFC HD-Gruppe lag die Mikrogefäßdichte bei 436,0±48,0 Gefäße/mm². In Bezug auf die Mikrogefäßdichte fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der ECFC HD- und der PBS-Gruppe. Der Desmin-Besatz lag in der ECFC HD-Gruppe bei 78,4±4,2 % und zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der PBS-Kontrolle. In der ECFC HD-Gruppe wurde im Cpu eine Dichte der α-SMA positiven Gefäße von 10,9±1,4 Gefäße/mm² nachgewiesen. Dabei wurde in Bezug auf die α-SMA-Mikrogefäßdichte kein signifikanter Unterschied zwischen der ECFC HD- und PBS-Gruppe festgestellt (Abb. 25 und Tab. 16).

Im CA1 führte die Applikation hochdosierter ECFC zu einer signifikanten Erhöhung der CD31-Mikrogefäßdichte um 27 % gegenüber der zellfreien PBS-Gruppe (* $P < 0.05$, ECFC HD vs. PBS). Dabei zeigte der Desmin-Besatz in der ECFC HD-Gruppe eine nicht signifikante Erhöhung um 16 % gegenüber der PBS-Gruppe. Die α -SMA-Gefäßdichte lag in der ECFC HD-Gruppe bei $17,5 \pm 1,5$ Gefäße pro mm^2 und zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der PBS-Kontrolle (*Abb. 25* und *Tab. 16*).

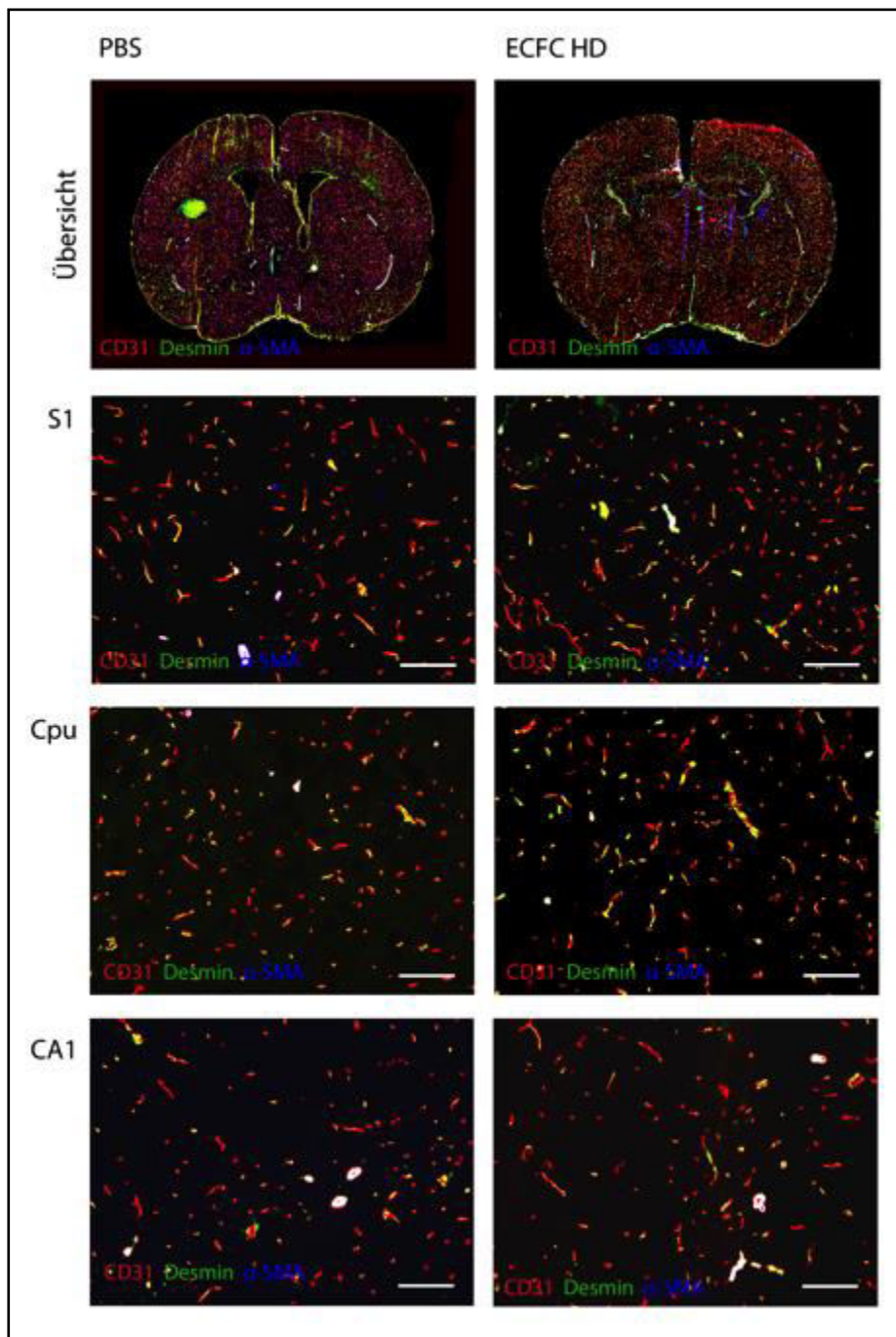


Abbildung 25: Immunhistochemie der Mikrogefäßarchitektur nach OACI/E und ECFC-Applikation

Exemplarische Abbildungen der zerebralen, parenchymatösen Endothelzellen (rot=CD31) und Perizyten (grün=Desmin; blau= α -SMA) mittels Immunhistochemie nach OACI/E und ECFC-Applikation vs. Kontrolle (OACI/E und PBS). Dargestellt sind eine Übersicht (Höhe des Bregmas), der sensomotorische Kortex (S1), das Striatum (Cpu) und der Hippocampus (CA1). Erhöhung der Endothelzellzahl im CA1 bei konstantem Desmin-Besatz sowie Erniedrigung α -SMA positiver Perizyten im S1 nach ECFC-Applikation. Darstellung der Übersichten als Mosaik in 100-facher Vergrößerungen. Übrige Hirnregionen in 200-facher Vergrößerung. Maßstabsleisten=100 μ m.

Tabelle 16: Einfluss der ECFC auf die zerebrale Mikrogefäßarchitektur nach unilateraler OACI/En=3–4 Tiere/Gruppe. * $P < 0.05$ vs. PBS

	CD31 (1/mm ²)		Desmin (%)		α -SMA (1/mm ²)	
	PBS	ECFC HD	PBS	ECFC HD	PBS	ECFC HD
S1	527,0±69,7	541,4±71,9	74,4±4,4	72,2±3,9	17,5±4,8	10,6±1,5*
Cpu	396,6±49,5	436,0±48,0	78,2±4,0	78,4±4,2	12,8±1,4	10,9±1,4
CA1	330,0±9,1	419,9±45,0*	61,6±4,3	71,5±10,8	16,8±0,7	17,5±1,5

4.5 Nachweis von ECFC in der Nacktmaus

4.5.1 Immunhistochemischer Nachweis DiI-markierter ECFC

Vitalitäts-/Wachstumskontrolle

Die DiI-Färbung der ECFC bewirkte keine qualitative Einschränkung der *in vitro* Zellproliferation. Bei in der Zellkultur befindlichen ECFC konnte nach mehrfacher Zellteilung keine Abnahme der Fluoreszenzstärke innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 7 Tagen beobachtet werden (*Abb. 26*).

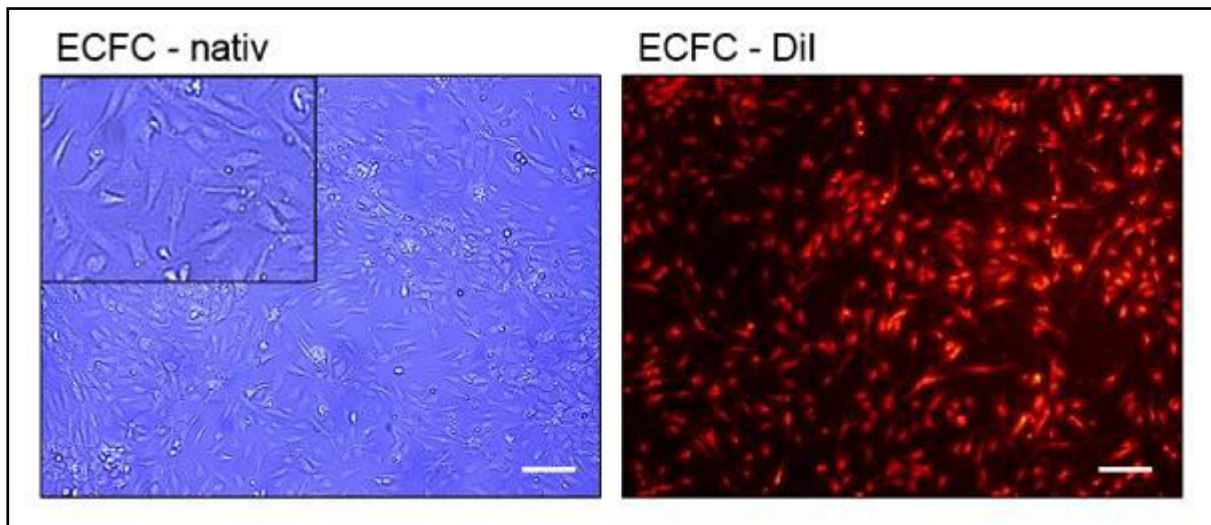


Abbildung 26: ECFC *in vitro* Zellwachstum nach Anfärbung mit DiI

Repräsentative Aufnahmen der ECFC in Zellkultur. ECFC nativ (links); ECFC nach *in vitro* DiI-Färbung (rechts). Homogene Fluoreszenzintensität nach intrazellulärer DiI-Aufnahme. 100-fache Vergrößerung. Ausschnitt links in 1000-facher Vergrößerung. Maßstabsleisten=100 μm .

DiI gefärbte ECFC in Gehirn, Leber und Lunge

36 Stunden nach intravenöser Injektion wurden im Gehirn bis zu zwei DiI markierte ECFC/Gesichtsfeld im Kortex nachgewiesen. Durch Kollokationen mit der zellkernspezifischen Färbung DAPI wurde ein unspezifisches Fluoreszenzsignal ausgeschlossen. In der Leber dagegen konnten multiple ECFC nachgewiesen werden. Die ECFC zeigten Kollokationen mit CD31-positiven Zellen innerhalb der Leber. In den größeren, intrahepatischen Arterien oder Venen wurden keine ECFC nachgewiesen. In der Lunge wurden ebenfalls multiple ECFC gezeigt. Die intrapulmonalen ECFC zeigten Kollokationen mit der intraparenchymatösen Mikrovaskulatur (*Abb. 27*).

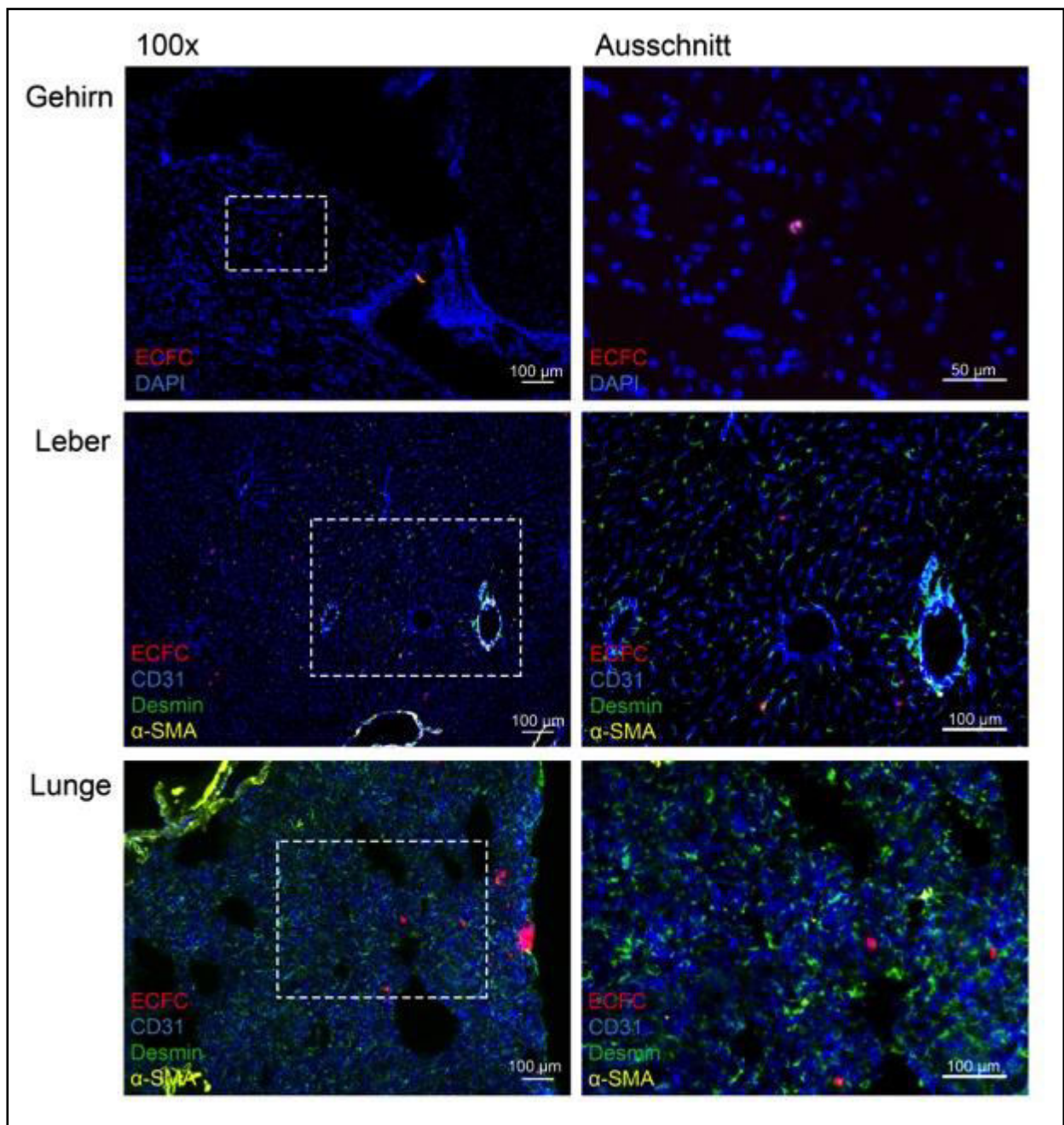


Abbildung 27: *In vitro* Untersuchung DiI markierter ECFC in verschiedenen Organen

Repräsentative Abbildungen DiI markierter ECFC (rot) in immunhistochemisch angefärbten Schnitten des Gehirns, der Leber und der Lunge nach 36 Stunden postinjektionem (n=2). Solitärer ECFC-Nachweis im Kortex (Kokalisation DiI/zellkernspezifische Färbung, DAPI). In der Leber und in der Lunge wurden dagegen multiple ECFC in den Bereichen der Mikrogefäße (CD31/Desmin) des Wirtes nachgewiesen. Übersichten in 100-facher Vergrößerung. Ausschnitt des Gehirns in 400-facher Vergrößerung; Ausschnitte der Leber und der Lunge in 200-facher Vergrößerung. Maßstabsleisten=Referenz wie in den Abbildungen angegeben.

4.5.2 *In vivo* Nachweis von ECFC mittels Intravitalmikroskopie

An Tag 0 konnten ECFC unmittelbar nach intravenöser Injektion im arteriellen Gefäßbett des rechten Medialstromgebietes nachgewiesen werden (ECFC-Anzahl an Tag 0: 1 ECFC / Sichtfeld; *Abb. 28*). Dabei kam es zu intraluminalen Interaktionen der ECFC mit der Gefäßwand. An Tag 1 zeigte sich ein Mischbild multipler adhärenter ECFC. ECFC wurden im arteriellen Gefäßbett, in den postkapillären Venolen und in der perivaskulären Nische nachgewiesen. (*Abb. 28*: ECFC-Anzahl an Tag 1: 9–12 ECFC/Gesichtsfeld). An Tag 6 waren ECFC weiterhin nachweisbar, jedoch im Vergleich zum Tag 1 in der Anzahl regredient und nur in den postkapillären Venolen vorzufinden (ECFC-Anzahl an Tag 6: 2 ECFC/Gesichtsfeld; *Abb. 28*). An allen Untersuchungszeitpunkten zeigten ECFC Veränderungen zwischen statischen, muralen Adhärenzen und dynamischen Bewegungen in Form von intraluminalen Rollen entlang der Gefäßwand, Ablösungen von der Gefäßwand und Zirkulation im peripheren Blut. Zusammenfassend zeigten ECFC über die Zeit eine Dynamik in der Interaktion mit dem Wirtsgefäßbett auf arterieller (Arteriolen) und venöser Ebene (Venolen), in der nachweisbaren Anzahl der ECFC und in der Transmigration in die perivaskuläre Nische.

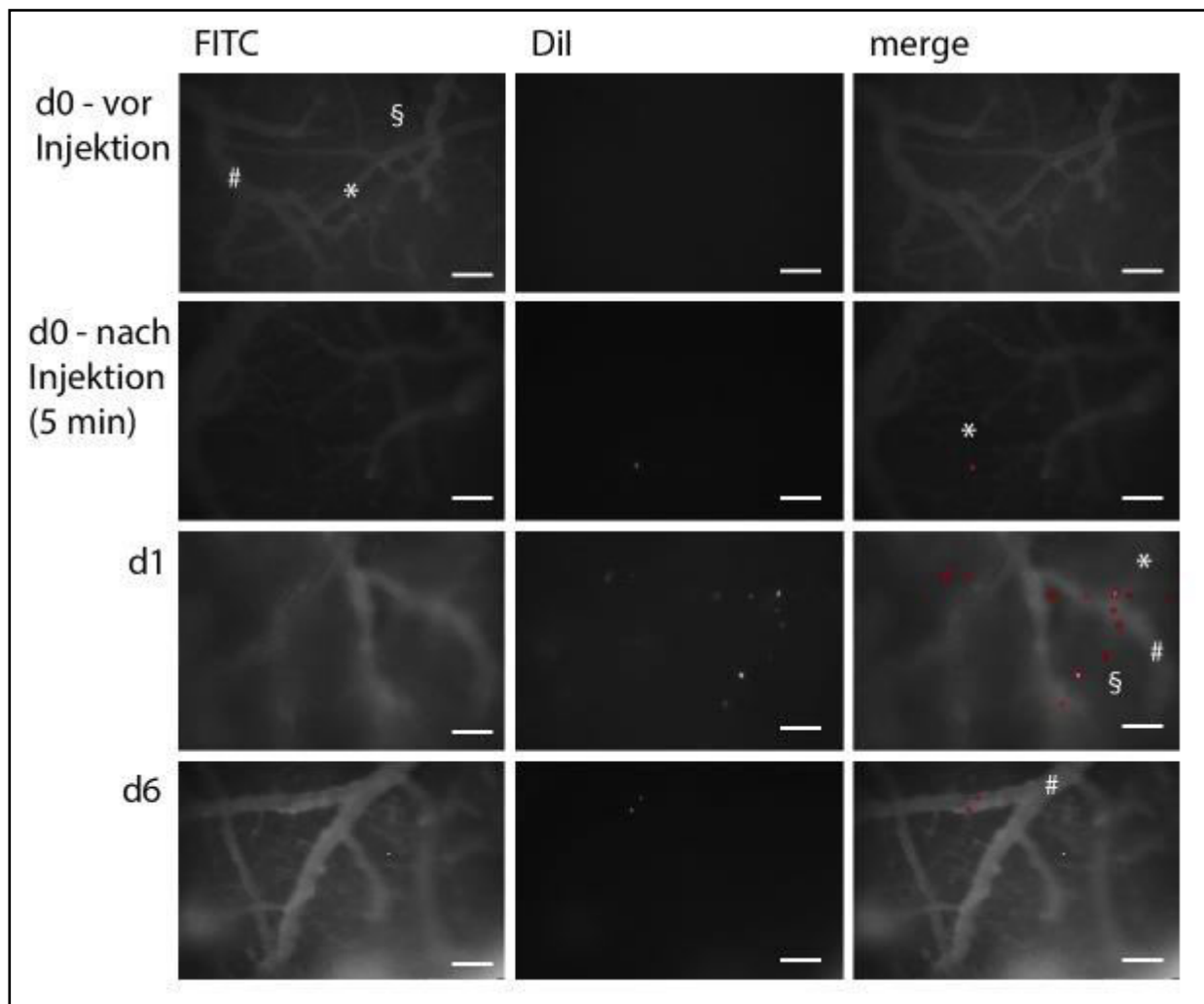


Abbildung 28: *In vivo* Analyse DiI vorgefärbter ECFC in den suprakortikalen Gefäßen nach OACI/E

Mikroskopische *in vivo* Aufnahmen über dem rechten Medialstromgebiet nach OACI/E (n=2). Vereinzelter ECFC-Nachweis (rot) unmittelbar nach Injektion in den Arteriolen (*). Mischbild multipler ECFC (rot) in den Arteriolen (*) und Venolen (#) sowie Transmigration in die perivaskuläre Nische (§) an Tag 1. ECFC-Nachweis (rot) in den postkapillären Venolen (#) sowie Abnahme der nachgewiesenen Anzahl der ECFC (rot) an Tag 6. Enhancement der Arteriolen (*) und Venolen (#) nach FITC-Applikation. Mit DiI vorgefärbte ECFC (merge, rot eingefärbt). 100-fache Vergrößerung. Maßstabsleiste=200 μ m. *=Arteriole; #=Venole; §=perivaskuläre Nische.

5. DISKUSSION

Die zerebrale Hypoperfusion ist eine der Hauptursachen des Schlaganfalls und als solche medizinisch und gesellschaftlich von größter Relevanz. Zu ihrer Pathogenese und möglichen Therapieansätzen gibt es bisher nur wenige Daten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modell zur chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der immunkompromittierten Maus etabliert. Anhand dieses Modells war es möglich, die funktionelle Erholung der CVRC durch spät ausdifferenzierte, humane, endotheliale Vorläuferzellen (ECFC) zu untersuchen. Die gewonnenen Daten weisen potentielle Möglichkeiten zur Therapie der chronisch zerebralen Hypoperfusion auf.

5.1 Zellmorphologie, -wachstum und Oberflächenantigene

Gegenüber den anderen ECFC-Ressourcen (peripheres Blut, Knochenmark) hat die Auswahl humanen Nabelschnurblutes den Vorteil, dass sich zum einen daraus die höchste Anzahl an ECFC gewinnen lässt und zum anderen, dass die Kollektivierung *post partum* nichtinvasiv erfolgt.^{51,120}

ECFC zeigen während des Durchlaufes verschiedener Differenzierungsstufen unterschiedliche Expressionen der Oberflächenmoleküle.⁶⁴ Die in diesem Versuch verwendeten ECFC der Passage (p) 3 bis p5 wiesen in Bezug auf die Morphologie (*Abb. 7*), das *in vitro* Wachstumsverhalten und die Expression der untersuchten Oberflächenantigene (*Abb. 8*) keinen Unterschied zu ausdifferenzierten Endothelzellen auf. Unter Berücksichtigung der Verwendung einer einzelnen Stichprobe entsprach das Expressionsmuster der untersuchten Oberflächenantigene dem vorbeschriebenen Muster der Arbeitsgruppe von Bieback *et al.*⁶⁴ In Zusammenschau mit den funktionellen Daten dieser Arbeit (*vergleiche 4.2.2*) sowie dem vorbeschriebenen Potential der *in vitro* Gefäßneubildung⁷² und der Integration in ein vorhandenes Gefäßnetzwerk im Tumormodell⁶⁴ wird von der Hypothese ausgegangen, dass es sich bei ECFC um ausdifferenzierte Vorläuferzellen mit hohem Proliferationspotential und Stammzellcharakter bei bereits erworbenem endothelialen Phänotyp handelt.

Ideen zu einer präzisen phänotypischen Definition werden kontrovers diskutiert. Die Schwierigkeit der Charakterisierung besteht darin, dass bisher kein ECFC spezifisches

Oberflächenantigen identifiziert wurde. Somit versuchen verschiedene Arbeitsgruppen ECFC über verschiedenste Kombinationen diverser Antigene (CD34, CD133, CD45, VEGFR-2, PECAM [CD31], CD144, CD146, CD105, von Willebrand Faktor, acetyliertes *Low Density Lipoprotein* und *Ulex Europaeus* Agglutinin-1) zu beschreiben.^{62,64-71} Dabei ist zu beachten, dass diese exprimierten Oberflächenantigene ebenfalls auf diversen anderen Zellen, wie beispielsweise hämatopoetische Stammzellen, nachweisbar sind. Nach wie vor erfolgt die Identifikation der ECFC über die Wege der Zellisolierung und -kultivierung.⁵⁶ Dabei führten spezifische Eigenschaften, wie das Wachstum in Zellkolonien 14 Tage nach Aussaat, zu deren Namensgebung.⁴⁷ Eine weitere Hürde in der Vergleichbarkeit bereits publizierter Ergebnisse besteht darin, dass diverse Zellreifungsstufen unter dem Begriff EPC zusammengefasst wurden. Innerhalb der beschriebenen Endothelvorläuferzellen bilden ECFC eine Subgruppe. Für die weiterführende Diskussion der heterogenen Verwendung des Begriffes EPC wird an dieser Stelle auf die Übersichtsarbeit von Timmermanns *et al.* verwiesen.¹²¹

5.2 Modelletablierung der chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der NuNu-Maus

Bislang sind keine Modelle der chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der NuNu-Maus beschrieben worden. Individuelle Unterschiede in der Gefäßanatomie und -physiologie bewirken geringgradige Differenzen innerhalb einer Vergleichsgruppe.¹¹⁰ Deswegen bestand die Notwendigkeit der Etablierung eines Modelles der chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der NuNu-Maus.

5.2.1 Die immunkompromittierte Maus

Mit Hinblick auf eine intravenöse Applikation *humaner* ECFC wurde ein Xenograft-Modell gewählt, bei welchem das Risiko einer immunologischen Abstoßungsreaktion vermindert wurde. Hintergrund der Wahl humaner, endothelialer Vorläuferzellen ist zum einen das bekannte Potential der *in vitro* Gefäßneubildung⁷² und zum anderen die Darstellung einer potentiellen Therapie beim Menschen. Die NuNu-Maus hat sich bereits in anderen Experimenten als geeigneter Empfänger für xenogene Zellen erwiesen.^{103,104} Durch die fehlende bzw. verminderte spezifische T-Zell-Reaktion wird die immunologische Abwehr verringert, aber dennoch nicht vollständig eliminiert. Neben standardisierten hygienischen Maßnahmen war eine gesonderte Haltung in keimarmer Umgebung nicht notwendig.

Die Milz als primäres lymphatisches Organ bildet im Körper eine der ersten Barrieren für körperfremde Zellen. Sie wirkt wie ein Filter des Blutes und trägt nach Kumulation körperfremden Materials zu dessen organisierter Bekämpfung bei. In Voruntersuchungen wurde eine verstärkte Kumulation der ECFC in der Milz beobachtet (*Daten nicht gezeigt*). Um den Abbau der injizierten ECFC durch den Wirt gering zu halten, wurden alle Tiere zusätzlich splenektomiert. Da die Milz in *allen* Versuchstieren gleichermaßen entfernt wurde, ist ein Einfluss auf die im Folgenden näher beschriebenen (Zell-)Effekte ausgeschlossen.

Zusammenhänge zwischen immunologischen Zellen und Arteriogenese sind beschrieben worden. Stabile *et al.* und van Weel *et al.* haben in ihren Arbeiten die Beteiligung natürlicher Killerzellen, CD-4 und CD-8 positiver Zellen an der Arteriogenese gezeigt.^{122,123} Auch Bergmann *et al.* stellten einen Zusammenhang zwischen Monozyten und der Arteriogenese dar.¹²⁴ Inwiefern die in dieser Arbeit gezeigten ECFC-Effekte auch mit einer Milz zu gleichen Ergebnissen führen und welche Rolle dabei die Immunabwehr und die Milz spielen, bleiben in dieser Arbeit ungeklärt.

5.2.2 Einfluss der unilateralen OACI/E auf die funktionelle Gehirndurchblutung

Der Organismus reagiert im Rahmen der chronisch stenookklusiven zerebrovaskulären Erkrankung sehr dynamisch mit Anpassung des Gefäßnetzes auf unterschiedliche Perfusionen. Die Durchblutung der Hirnhemisphäre nach unilateraler OACI/E erfolgt im Wesentlichen über den CAW und die ipsilateralen leptomeningealen Anastomosen zwischen der ACM und der ACA sowie der ACM und der ACP.

Derzeit sind keine Hypoperfusionsmodelle bei der NuNu-Maus bekannt, die auf der unilateralen Okklusion der ACI *und* ACE beruhen. Die zusätzliche Okklusion der ACE verhindert den retrograden Blutfluss. Ein großer Vorteil besteht darin, dass im Gegensatz zur reinen Okklusion der ACI¹⁰⁰ die reduzierte CVRC über die gesamte Versuchsdauer von 14 Tagen konstant erhalten bleibt (*Abb. 11*). Dadurch lassen sich therapeutische Effekte eindeutig von Einflüssen der unilateralen Okklusion abgrenzen. Dagegen erfolgt eine spontane Erholung der Ruheperfusion ab Tag 7 nach vorangegangener Reduktion (*Abb. 10*). Diese Resultate unterstützen die Ergebnisse von Untersuchungen an Patienten mit symptomatischem arteriellen Verschluss der *A. carotis*, die zeigen, dass eine verminderte zerebrale Ruheperfusion nicht mit einer erhöhten Inzidenz eines Schlaganfalles einhergeht.¹⁰ Konsekutiv ist die zerebrale Ruheperfusion kein

geeigneter Marker für eine kompromittierte zerebrale Perfusion und nicht als Vorhersagewert eines Schlaganfalles geeignet. Dagegen korreliert eine verminderte CVRC mit dem Auftreten eines Schlaganfalles, welcher auf einer hämodynamischen Perfusionsminderung wie beim symptomatischen arteriellen Verschluss der ACI basiert.^{7,11}

Diverse vorbeschriebene Modelle der chronisch zerebralen Hypoperfusion basieren auf der Verwendung verschiedener Spezies (Maus, Ratte) sowie Okklusionen unterschiedlicher Gefäße (unilaterale OACI,¹²⁵ unilaterale Okklusion der CCA,⁴¹ bilaterale Okklusion der *Aa. carotes communes*,¹⁰¹ 3-Gefäßokklusion^{41,126}). Dieser Umstand erlaubt keinen direkten Vergleich der Daten anderer Arbeiten zur zerebralen Hypoperfusion mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten ergaben Untersuchungen gleichaltriger C57/BL6-Mäuse mit unilateraler OACI ebenfalls an Tag 0 eine Verminderung der zerebralen Perfusion mit einer CVRC um 25 %. An Tag 3 wird bereits eine endogene Kompensation der CVRC auf 35 % und eine vollständige funktionelle Wiederherstellung der CVRC an Tag 14 demonstriert.¹⁰⁰ Dagegen findet in dieser Arbeit bei der NuNu-Maus keine Erholung der CVRC über die gesamte Versuchsdauer von 14 Tagen statt. Die maximal erreichte endogene CVRC liegt an Tag 14 mit 25 % (*Abb. 11*) deutlich unter der CVRC der C57/BL 6-Maus (CVRC an Tag 14: 40 %). Gründe für diese Unterschiede könnten in einer schlechteren endogenen Kollateralisierung sowie an den verschiedenen Gefäßokklusionsmodellen liegen. Mit dem Hintergrund der veränderten Bindegewebsstruktur der NuNu-Maus könnten darüber hinaus veränderte Gefäßwandstrukturen zu einer verminderten Vasoreaktivität (z. B. Dilatation über endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetasen) und in der Folge zu einer verringerten Kompensation führen.

Auf Grund der Tatsache der reproduzierbaren, signifikanten Abnahme der CVRC nach unilateraler OACI/E mit *lang* andauerndem Effekt (über die gesamte Versuchsdauer von 14 Tagen) stellt die unilaterale OACI/E bei der NuNu-Maus ein ausgezeichnetes Modell zur Untersuchung der chronisch zerebralen Hypoperfusion dar.

5.2.3 Einfluss der unilateralen OACI/E auf die zerebralen Mikro- und Makrogefäße

Die Zunahme von Gefäßdurchmessern ist mit einem vermehrten Nettoblutfluss verbunden. Die latexangiographisch dargestellte Zunahme der Durchmesser der ACA, ACI, AB und

leptomeningealen Arterien nach OACI/E stellen eine endogene Reaktion auf die induzierte zerebrale Hypoperfusion dar. Diese Ergebnisse gehen mit den immunhistochemisch erhobenen Proliferationen der Endothel- und der glatten Muskelzellen in den Bereichen der ACA und ACI einher. Da die CVRC über die gesamte Versuchsdauer signifikant erniedrigt bleibt, kann man bei der NuNu-Maus von einem insuffizienten Kompensationsmechanismus sprechen. Unter Berücksichtigung eines anderen Gefäßokklusionsmodelles (unilaterale Okklusion der ACI) wurde dagegen im Modell der chronisch zerebralen Hypoperfusion bei der C57/BL6-Maus eine reaktive Zunahme nahezu aller basalen zerebralen Gefäßdurchmesser (ACA, ACM, ACI, AcomP und AB) bei Zunahme der leptomeningealen Gefäßdurchmesser sowie intraparenchymatöser Remodellierung der zerebralen Mikrogefäßarchitektur identifiziert. Diese strukturellen Veränderungen gehen bei der C57/BL6-Maus mit der Wiederherstellung der CVRC an Tag 14 einher.¹⁰⁶

5.3 ECFC zeigen im Rahmen der chronisch zerebralen Hypoperfusion einen positiven Effekt auf die zerebrovaskuläre Funktionalität und Anatomie

5.3.1 ECFC führen zu einer funktionellen Wiederherstellung der CVRC

Erstmals wurde in dieser Arbeit die funktionelle Wiederherstellung der zerebralen Blutperfusion durch humane ECFC im Rahmen der chronisch zerebralen Hypoperfusion gezeigt.

Die Behandlung mit ECFC nach unilateraler OACI/E hatte zunächst keinen signifikanten Einfluss auf die Ruheperfusion (*Abb. 13*). Ein kontinuierlicher Anstieg der zerebralen Ruheperfusion nach OACI/E in allen Gruppen spiegelt die endogene Reaktion auf die veränderte Physiologie wider, ohne dabei von der jeweiligen Therapie beeinflusst worden zu sein. Wie unter 5.2.2 erläutert, repräsentiert die Ruheperfusion keinen geeigneten Parameter zur Quantifizierung einer hämodynamischen Perfusions Einschränkung.^{7,11} Somit stellt die Betrachtung des therapeutischen Effektes der ECFC auf die CVRC die Hauptbedeutung dieser Arbeit dar. Mittels hochdosierter ECFC (ECFC HD) wurde eine funktionelle Wiederherstellung der CVRC mit einer signifikanten Prozenzterhöhung der CVRC um 186 % gegenüber der PBS-Gruppe herbeigeführt (*Abb. 14*). Da die Werte der CVRC nahezu der Größenordnung der Sham-Gruppe („unbehandelte“ Tiere) entsprachen (CVRC an Tag 14, ECFC HD: 39,9±10 %,

Sham: $44,0 \pm 9\%$), kann man von einer funktionellen Wiederherstellung der CVRC sprechen. Dieser Effekt zeigte sich dabei in Abhängigkeit von der applizierten ECFC-Dosis und wies nur in der hochdosierten ECFC-Gruppe einen signifikanten Anstieg auf. Eine nicht signifikante Prozenthöhung der CVRC um 35 % an Tag 14 in der niedrigdosierten ECFC- gegenüber der PBS-Gruppe spiegelt dennoch die Tendenz des Zellpotentials wider (*Abb. 14*). Sowohl die PBS- als auch die ECFC-Gruppen erhielten eine unilaterale OACI/E und unterschieden sich in nur einer Variable, der ECFC-Injektion. Somit konnte die Kausalität auf diese zurückgeführt werden. Therapieansätze in chronisch zerebralen Hypoperfusionsmodellen, die auf Effekte von spät ausdifferenzierten Endothelvorläuferzellen beruhen (ECFC), sind aktuell nicht beschrieben worden. Bei der C57/BL6-Maus konnte eine Erholung der CVRC nach 7 Tagen durch Injektion von G-CSF nach unilateraler Okklusion der CCA gezeigt werden.¹²⁷ Möglicherweise könnten ECFC über eine verbesserte Vasoreaktivität (Dilatation über endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase) in der frühen Phase und synergistisch im weiteren Verlauf mit der Gefäßkollateralisierung ihre Wirkung entfalten. Daneben könnte der frühe Applikationszeitpunkt von entscheidender Bedeutung für den Effekt sein. Ob die funktionelle Wiederherstellung der CVRC bereits an Tag 1 oder 2 stattfindet, liegt außerhalb des untersuchten Blickwinkels. Die über den gesamten Versuch konstante Erholung der CVRC könnte durch die weiteren ECFC-Applikationen an den Tagen 3 und 7 bedingt sein. Diese Hypothese bleibt im Rahmen dieser Arbeit allerdings unbeantwortet.

Unerwartet führte auch eine niedrigdosierte HUVEC-Injektion an Tag 3 zu einer signifikanten Prozenthöhung der CVRC um 99 % gegenüber der PBS-Gruppe. Diese Daten ergänzen die Ergebnisse der neuroprotektiven Effekte durch HUVEC im Rattenmodell der neonatalen hypoxischen Ischämie.¹²⁸ Dabei konnte die Interaktion der HUVEC auf Ebene der SDF-1- und CXCR4-Interaktion,¹²⁸ wie zuvor für aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen gezeigt,¹²⁹ demonstriert werden. Darüber hinaus wurde ein Verlust der Zellfunktion durch Rezeptorherabregulierung mit Erreichen der p8 im Vergleich zur p4 beschrieben.¹²⁸ Die in diesem Experiment verwendeten HUVEC wurden nach p5 injiziert und entsprechen dem Fenster, in dem experimentell ein parakriner Effekt nachgewiesen wurde. Das Potential der HUVEC zur *in vitro* Gefäßneubildung wurde ebenfalls gezeigt.⁷² Es liegt somit nahe, dass auch HUVEC, wenn sie einer niedrigen p entsprechen, prinzipiell über Zellrezeptorinteraktionen einen parakrinen Effekt auf die Arteriogenese mit konsekutiver CVRC-Erhöhung aufweisen. Jedoch waren im Rahmen dieser Arbeit die durch HUVEC bedingten Effekte zum einen nur bis zum

Tag 7 nachzuweisen und zum anderen gegenüber den Ergebnissen der ECFC-Gruppe von nachrangigem Ausmaß.

5.3.2 ECFC führen zu Gefäßwachstum der zerebralen Gefäße

Der CAW stellt auf Höhe der Hirnbasis eine zirkuläre (Niedrigwiderstands-) Verbindung dar und fungiert nach unilateraler Halsgefäßokklusion als primärer Umgehungskreislauf zur Aufrechterhaltung des CBF.^{127,130,131} Daneben existiert ein weiteres Kollateralgefäßnetzwerk im Bereich der leptomeningealen Gefäße,¹³² welches einen Blutfluss auf suprakortikaler Ebene nach (Teil-) Okklusionen ermöglicht.¹³¹ In dieser Arbeit wurden erstmalig strukturelle Veränderungen der Hirngefäßarchitektur bei der NuNu-Maus nach OACI/E und ECFC-Applikation nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass ECFC die Kapazität zur dosisabhängigen Stimulierung der Arteriogenese besitzen. Dabei wird der Effekt von der Höhe der injizierten Zellzahl bestimmt. In einer hohen Dosis (1×10^6) führen ECFC zu vaskulären Umbauprozessen auf *leptomeningealer* Ebene, wo hingegen niedrige Zellzahlen (3×10^5) auf *basaler* zerebrovaskulärer Ebene agieren. Die histologischen Daten belegen die ausbleibenden Effekte auf basaler zerebrovaskulärer Ebene durch verminderte Zellproliferationen nach hochdosierter ECFC-Applikation bei unilateraler OACI/E. Den funktionellen Daten folgend geht die Erhöhung leptomeningealer Gefäßdurchmesser und -anastomosen mit einer *effizienteren* zerebralen Hirnperfusion einher, welche in der *frühen* Wiederherstellung der CVRC widerspiegelt wird. Die erhöhte Anzahl der leptomeningealen Anastomosen nach hochdosierter ECFC-Injektion führt zu einer höheren Gefäßdichte sowie Gesamtleitfähigkeit (reziproker Gesamtwiderstand). Die Zunahme der leptomeningealen Gefäßdurchmesser bewirkt dem Gesetz von Hagen-Poiseuille folgend eine Abnahme des Strömungswiderstandes. Beide Mechanismen resultieren in einer Erhöhung der zerebralen Blutperfusion. In Zusammenschau der Daten kann man die Hypothese aufstellen, dass die Kompensation der zerebralen Blutperfusion auf leptomeningealer Ebene gegenüber der basalen Ebene (CAW) überlegen ist.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass sowohl niedrigdosierte ECFC als auch HUVEC das Potential der Arteriogenese im Bereich der *basalen* Hirngefäße bei unveränderten leptomeningealen Gefäßen besitzen (*Abb. 19*). Dabei kann man feststellen, dass gerade die Arteriogenese nur in den Gefäßen stattfindet, die bereits ein endogenes Potential nach unbehandelter OACI/E (*Abb. 16*) aufweisen. Dass sich dabei die Arteriogenese auf den Bereich des vorderen Anteils bzw. des

Verbindungssegmentes des CAW (ACA, ACI, AcomP) beschränkt, könnte Ausdruck unterschiedlicher Strömungseigenschaften (Perfusionsdrücke, Scherkräfte) sein. Im Rahmen der vaskulären Anpassungsreaktionen lagen die Gefäßdurchmesser um maximale Werte von 300 μm . Dies sind Werte, bei denen experimentell gerade noch eine hohe Fluidität durch Axialmigration der Erythrozyten beobachtet wurde und welche die Wirksamkeit der Anpassung widerspiegeln.¹³³ Die größeren Gefäßdurchmesser der (niedrigdosierten) ECFC- gegenüber der HUVEC-Gruppe sind ein weiteres Beispiel einer erhöhten Effizienz der ECFC bei Remodellierungsprozessen. Diese Daten unterstreichen die unter 5.3.1 erläuterten neuroprotektiven Effekte durch HUVEC.¹²⁸ Die hier dargestellte Verbesserung der zerebralen Vaskularisation durch HUVEC könnte ein Grund für die funktionellen Effekte sein.

Latexangiographien bei zerebralen Hypoperfusionsmodellen an NuNu-Mäusen, die auf Grundlage einer unilateralen Gefäßokklusion der ACI und ACE erfolgten, sind bisher nicht beschrieben worden. Diverse vorbeschriebene Modelle der chronisch zerebralen Hypoperfusion basieren auf der Verwendung verschiedener Spezies (Maus, Ratte) sowie der Okklusion unterschiedlicher Gefäße (unilaterale OACI,¹²⁵ unilaterale Okklusion der *Aa. carotes communes*,⁴¹ bilaterale Okklusion der *Aa. carotes communes*,¹⁰¹ 3-Gefäßokklusion^{41,126}) mit anderen Behandlungen, wie beispielsweise G-CSF/GM-CSF-Stimulierung.^{41,101,127} Dies erlaubt keinen direkten Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der o. g. Arbeitsgruppen. Dennoch lässt sich bei den vorangegangenen Untersuchungen die effiziente Anpassungsreaktion der Hirnperfusion durch Arteriogenese erkennen. Es wurde im Mausmodell nach unilateraler Halsgefäßokklusion die Zunahme der Gefäßdurchmesser im Bereich des CAW^{100,127} und der leptomeningealen Gefäße^{100,125} bei gleichbleibender Anzahl der Anastomosen auf leptomeningealer Ebene gezeigt. Andere Hypoperfusionsmodelle mit ebenfalls funktioneller Wiederherstellung der CVRC bei der Ratte spiegelten ein anatomisches Korrelat in Form einer Zunahme der Gefäßdurchmesser im CAW wider.^{41,101,126} In einem Experiment bei der Ratte wurden Anpassungsreaktionen auf leptomeningealer Ebene mit erhöhter Anzahl der Anastomosen bei gleich bleibenden Gefäßdurchmessern beschrieben.¹⁰¹

5.3.3 Effekte der ECFC auf die zerebrale Mikrogefäßarchitektur

Mittels Latexangiographie wurde angenommen, dass die Kompensation einer chronisch zerebralen Hypoperfusion durch hochdosierte ECFC über die leptomeningealen Gefäße

(Abb. 21) so effektiv und ausreichend ist, dass die Antwort auf basaler Ebene (CAW) (Abb. 19) ausgeblieben ist. Folglich wurde die Reaktion der Mikrogefäßarchitektur auf eine hochdosierte ECFC-Injektion distal des CAW untersucht. Als Untersuchungszeitpunkt der zerebralen Mikrogefäßarchitektur wurde Tag 7 gewählt, weil zu diesem Zeitpunkt die Funktionalität der Hirnperfusion bereits vollständig wiederhergestellt wurde (Abb. 14).

Arteriolen wurden als Ort der Arteriogenese identifiziert.^{134,135} Diese Arbeit zeigte, dass eine hochdosierte ECFC-Applikation keinen Einfluss auf die Angio- und Arteriogenese im S1 und im Cpu hatte. Arteriolen sind als Widerstandsgefäße für die lokale Blutflussregulation bekannt. Die unveränderte Mikrogefäßdichte und die signifikant verminderte Arteriolendichte spiegeln nicht die funktionelle Wiederherstellung der CVRC wider. Demzufolge muss ein anderer Mechanismus für die funktionelle Verbesserung verantwortlich sein. Die in dieser Arbeit dargestellte Arteriogenese auf leptomeningealer Ebene könnte ein Grund sein. An der C57/BL6-Maus bewirkte dagegen die Induktion einer chronisch zerebralen Hypoperfusion mittels unilateraler OACI eine erhöhte Kapillardichte bei Abnahme der Perizytenabdeckung und führte zu der Annahme einer Angiogenese mit erhöhter Gefäßplastizität sowie Arteriogenese innerhalb des Hirnparenchyms.¹⁰⁰ Beachten muss man allerdings, dass es sich bei diesen Experimenten um einen anderen Mausstamm und ein anderes Hypoperfusionsmodell handelte (unilaterale OACI ohne Okklusion der ACE) mit endogener Wiederherstellung der CVRC nach 14 Tagen. Somit lassen sich die Ergebnisse beider Arbeiten nicht direkt miteinander vergleichen.

Im Gegensatz zum S1 und Cpu führte die Applikation hochdosierter ECFC zur Angiogenese im CA1. Der nicht signifikant erhöhte Desmin-Besatz zeigt, dass es sich dabei um unreife, von wenigen Perizyten umgebende Mikrogefäße handelt. Der Hippocampus wurde als hypoxiesensibler Bereich identifiziert.^{136,137} Ein Grund für die unterschiedlichen Veränderungen der Mikrogefäßarchitektur innerhalb des Hirnparenchyms könnte eine mögliche gefäßokklusionsinduzierte Hypoxie im CA1 sein. Dies könnte bedeuten, dass ECFC unterschiedlich auf Hypoxie reagieren.

5.4 Nachweis von ECFC in der Nacktmaus

In dieser Arbeit wurden die Interaktionen der ECFC mit den zerebralen Mikrogefäßen im Rahmen der chronisch zerebralen Hypoperfusion nachgewiesen (Abb. 27 und 28). Rezeptor-

Liganden-Interaktion könnte diesen Beobachtungen zugrunde liegen. Andere Arbeitsgruppen stellten ebenfalls markierte Vorläuferzellen im Modell der Hinterlaufischämie histologisch postmortal dar.⁷⁵ Dagegen fiel der Nachweis markierter Vorläuferzellen in anderen Arbeitsgruppen negativ aus.^{42,98,138,139} Insgesamt fällt die Anzahl der zerebral nachgewiesenen ECFC deutlich geringer als in der Peripherie aus. Ein Grund hierfür könnte der anatomische Unterschied im Gefäßaufbau zwischen peripheren und zerebralen Gefäßen sein, insbesondere durch die Bluthirnschranke.¹⁴⁰ Die positiven Nachweise in der Leber sowie in der Lunge belegen den Erfolg der intravenösen Injektion (*Abb. 27*).

Mittels *in vivo* Multifluoreszenzmikroskopie wurde eine erhöhte Anzahl an zerebralen, Gefäß assoziierten ECFC (bis zu 12 ECFC/Gesichtsfeld) an Tag 1 gegenüber einer geringeren Anzahl (n=2) in der Immunhistologie dargestellt. Es ist davon auszugehen, dass innerhalb der beiden Untersuchungszeitpunkte eine anhaltende Zirkulation im Blutssystem stattgefunden hat. Eine Dynamik der ECFC und Intima-Interaktion kann mit einer bloßen Momentaufnahme wie bei der Immunhistochemie nicht erfasst werden und in der Folge eine geringere Anzahl an ECFC suggerieren. Darüber hinaus sei an dieser Stelle zu bemerken, dass die histologische Untersuchung des Gehirns in größeren Abständen von jeweils 1 mm erfolgte. Möglicherweise ist eine Inkorporation im dazwischen liegenden, nicht untersuchten Bereich erfolgt. Dies würde allerdings auch beinhalten, dass nur eine sehr geringe Anzahl an ECFC an einem Einbau in die Gefäßarchitektur und in der Folge an der Kompensation beteiligt sei. Jedoch zeigte die Darstellung der zerebralen Anatomie mittels Latexangiographie eine langstreckige Zunahme der Gefäßdurchmesser (*Abb. 18 und 19*) sowie eine Erhöhung der Anzahl der leptomeningealen Anastomosen (*Abb. 20 und 21*). Der alleinige Einbau einer sehr niedrigen ECFC-Menge könnte diesen Effekt nicht ausreichend erklären. Vielmehr ist ein Mechanismus über eine Zytokinausschüttung durch ECFC ggf. in Zusammenhang mit der Initiierung einer Folgekaskade vorstellbar. Die Zytokinausschüttung könnte unabhängig vom Ort der ECFC erfolgen, solange die Zytokinkonzentration im Blut ausreichend hoch ist. Dies schließt eine Adhäsion der ECFC an das zerebrale Gefäßbett in keiner Weise aus. Es ist sehr gut denkbar, dass die ECFC einen unterschiedlichen Funktionszustand besitzen und nach Adhäsion eine Aktivierung erfahren. Dieser Prozess ist bei immunologischen Zellen erforscht worden und könnte auch hier zum Tragen kommen. Da dieser Prozess einer gewissen Dynamik unterliegt, wäre eine zeitliche Lücke in der Erfassung der Daten durchaus vorstellbar.

5.5 Limitationen und methodische Einschränkungen

Bei der atherosklerotisch bedingten Lumeneinengung erfolgen die pathologischen Veränderungen der Gefäßwände und in der Folge auch die pathophysiologisch verminderte CVRC langsam und kontinuierlich (über einen Zeitraum von Monaten/Jahren). Im Gegensatz dazu wird die Minderperfusion in diesem Experiment akut und unmittelbar (durch Fadenokklusion der ACI und ACE) mit einer Minderung der Ruheperfusion um 57 % und konsekutiv veränderten Strömungseigenschaften bewirkt. In der Literatur wurden bisher keine Modelle veröffentlicht, bei denen eine experimentelle, langsame, progrediente zerebrale Hypoperfusion induziert wurde. Somit stellt dieses Modell aktuell das am besten geeignete und reproduzierbare Modell zur Untersuchung der chronisch zerebralen Hypoperfusion dar – nicht zuletzt durch das Ausbleiben einer fulminanten zerebralen Ischämie mit neurologischer Symptomatik.

Mittels LSI lässt sich die hämodynamische Situation eines bestimmten Areals in Echtzeit darstellen, ohne dabei die Oberfläche scannen zu müssen.¹¹³ Die dargestellte Methode beruht auf einer oberflächlichen Messung, so dass LSI keine quantitative Blutflussmessung erlaubt. Daneben werden Oxygenierungszustände des Blutes und die Anzahl der sauerstofftransportierenden, roten Blutzellen nicht berücksichtigt. Die Methodik erlaubt dennoch die Interpretation der gemessenen Werte in Relation zu einer Referenz.

Eine Eigenschaft von Arteriolen ist der Durchmesser von mindestens 9 μm . α -SMA wurde als Bestandteil der Arteriolen assoziierten Perizyten identifiziert. Bei Nachweis geringer Anzahlen α -SMA positiver Zellen und methodisch bedingter tangentialer Anschnitte der Gefäße war eine objektive Darstellung der *vollständigen* Gefäßdurchmesser methodisch nicht möglich. In dieser Arbeit wurden alle α -SMA positiven Gefäße als Arteriolen gewertet. Möglicherweise wurden andere Perizyten assoziierte Gefäße eingeschlossen, die nicht der Größe einer Arteriole entsprachen.

Der Nachweis des arteriogenetischen Potentials der ECFC wurde in diesen Experimenten nachgewiesen. Der Wirkmechanismus der ECFC bleibt in dieser Arbeit unbeantwortet. Der alleinige Effekt auf Grundlage einer direkten Inkorporation in die Gefäßwand des Wirtes kann als nachrangig betrachtet werden. Durch ECFC induzierte parakrine Effekte könnten bei der Vermittlung arteriogenetischer Prozesse eine Rolle spielen. Im Rahmen dieser Arbeit bleiben

diese Fragen unbeantwortet. Ergänzende Untersuchungen zum Nachweis von Zytokinen könnten in Folgeexperimenten die hier gefundenen Ergebnisse ergänzen.

5.6 Ausblick

Voranschreitende Entwicklungen in der *in vivo* und *in vitro* Forschung der Arterio- und Angiogenese, insbesondere im Rahmen der Tumorgefäßbildung, geben zunehmend Aufschluss über Zusammenhänge und die molekularen Mechanismen. Während bislang in der Forschungsgemeinschaft ein verstärktes Augenmerk auf die Untersuchung des Schlaganfalles mit bereits eingetretenem Verlust der neuronalen Integrität gelegt wurde, blieb die chronisch zerebrale Hypoperfusion bisher weitgehend unergründet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Subgruppe *humaner* Endothelvorläuferzellen verwendet und erfolgreich deren Potential zur Wiederherstellung der zerebralen Funktionalität sowie zum zerebralen Gefäßwachstum gezeigt. Humane ECFC könnten zukünftig nach Gewährleistung eines gewissen Sicherheitsstandards zur therapeutischen Sekundärprophylaxe der stenookklusiven Gefäßerkrankung beim Menschen dienen. Somit eröffnen humane ECFC ein neues Feld in der Therapie der chronisch zerebralen Hypoperfusion mit dem Ziel der Prävention von neurovaskulären Ausfallerscheinungen.

6. VERZEICHNISSE

6.1 Literaturverzeichnis

1. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (<http://www.dgn.org>; Stand: 14.09.2014).
2. Statistisches Bundesamt (<https://http://www.destatis.de>; Stand: 14.09.2014).
3. European Registers of Stroke, I., *et al.* Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **40**, 1557-1563 (2009).
4. Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft (<http://www.dsg-info.de>; Stand: 14.09.2014).
5. Markus, H.S., *et al.* Differences in stroke subtypes between black and white patients with stroke: the South London Ethnicity and Stroke Study. *Circulation* **116**, 2157-2164 (2007).
6. Flaherty, M.L., Flemming, K.D., McClelland, R., Jorgensen, N.W. & Brown, R.D., Jr. Population-based study of symptomatic internal carotid artery occlusion: incidence and long-term follow-up. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **35**, e349-352 (2004).
7. Klijn, C.J., Kappelle, L.J., Tulleken, C.A. & van Gijn, J. Symptomatic carotid artery occlusion. A reappraisal of hemodynamic factors. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **28**, 2084-2093 (1997).
8. Kasner, S.E., *et al.* Predictors of ischemic stroke in the territory of a symptomatic intracranial arterial stenosis. *Circulation* **113**, 555-563 (2006).
9. Piepgras, A., Leinsinger, G., Kirsch, C.M. & Schmiedek, P. STA-MCA bypass in bilateral carotid artery occlusion: clinical results and long-term effect on cerebrovascular reserve capacity. *Neurological research* **16**, 104-107 (1994).
10. Yonas, H., Smith, H.A., Durham, S.R., Pentheny, S.L. & Johnson, D.W. Increased stroke risk predicted by compromised cerebral blood flow reactivity. *Journal of neurosurgery* **79**, 483-489 (1993).
11. Grubb, R.L., Jr., *et al.* Importance of hemodynamic factors in the prognosis of symptomatic carotid occlusion. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **280**, 1055-1060 (1998).
12. Kuroda, S., *et al.* Acetazolamide test in detecting reduced cerebral perfusion reserve and predicting long-term prognosis in patients with internal carotid artery occlusion. *Neurosurgery* **32**, 912-918; discussion 918-919 (1993).
13. Piepgras, A., *et al.* A simple test to assess cerebrovascular reserve capacity using transcranial Doppler sonography and acetazolamide. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **21**, 1306-1311 (1990).

14. Vorstrup, S., Henriksen, L. & Paulson, O.B. Effect of acetazolamide on cerebral blood flow and cerebral metabolic rate for oxygen. *The Journal of clinical investigation* **74**, 1634-1639 (1984).
15. Stoll, M., Seidel, A., Schimrigk, K. & Hamann, G.F. Orthostasis as a test for cerebral autoregulation in normal persons and patients with carotid artery disease. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging* **9**, 113-117 (1999).
16. Liebeskind, D.S., *et al.* Collaterals dramatically alter stroke risk in intracranial atherosclerosis. *Annals of neurology* **69**, 963-974 (2011).
17. Dusick, J.R., Gonzalez, N.R. & Martin, N.A. Clinical and angiographic outcomes from indirect revascularization surgery for Moyamoya disease in adults and children: a review of 63 procedures. *Neurosurgery* **68**, 34-43; discussion 43 (2011).
18. Grubb, R.L., Jr., *et al.* Surgical results of the Carotid Occlusion Surgery Study. *Journal of neurosurgery* **118**, 25-33 (2013).
19. Powers, W.J., *et al.* Extracranial-intracranial bypass surgery for stroke prevention in hemodynamic cerebral ischemia: the Carotid Occlusion Surgery Study randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **306**, 1983-1992 (2011).
20. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932-936 (2005).
21. Schaper, W. & Ito, W.D. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circulation research* **79**, 911-919 (1996).
22. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* **6**, 389-395 (2000).
23. Carmeliet, P. & Jain, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298-307 (2011).
24. Lutun, A. & Carmeliet, P. De novo vasculogenesis in the heart. *Cardiovascular research* **58**, 378-389 (2003).
25. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674 (1997).
26. Troidl, K. & Schaper, W. Arteriogenesis versus angiogenesis in peripheral artery disease. *Diabetes/metabolism research and reviews* **28 Suppl 1**, 27-29 (2012).
27. Troidl, C., *et al.* Trpv4 induces collateral vessel growth during regeneration of the arterial circulation. *Journal of cellular and molecular medicine* **13**, 2613-2621 (2009).
28. Davies, P.F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological reviews* **75**, 519-560 (1995).

29. Eitenmuller, I., *et al.* The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circulation research* **99**, 656-662 (2006).
30. Resnick, N. & Gimbrone, M.A., Jr. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 874-882 (1995).
31. Shyy, Y.J., Hsieh, H.J., Usami, S. & Chien, S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4678-4682 (1994).
32. Buschmann, I. & Schaper, W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* **14**, 121-125 (1999).
33. Ito, W.D., *et al.* Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circulation research* **80**, 829-837 (1997).
34. Polverini, P.J., Cotran, P.S., Gimbrone, M.A., Jr. & Unanue, E.R. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* **269**, 804-806 (1977).
35. Hoefler, I.E., *et al.* Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1- mediated mechanisms. *Circulation research* **94**, 1179-1185 (2004).
36. Tsuboi, H., Ando, J., Korenaga, R., Takada, Y. & Kamiya, A. Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **206**, 988-996 (1995).
37. Rao, R.M., Yang, L., Garcia-Cardena, G. & Luscinskas, F.W. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circulation research* **101**, 234-247 (2007).
38. Scholz, D., *et al.* Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **436**, 257-270 (2000).
39. Arras, M., *et al.* Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *The Journal of clinical investigation* **101**, 40-50 (1998).
40. Hoefler, I.E., *et al.* Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis. *Circulation* **105**, 1639-1641 (2002).
41. Buschmann, I.R., Busch, H.J., Mies, G. & Hossmann, K.A. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* **108**, 610-615 (2003).

42. Ziegelhoeffer, T., *et al.* Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circulation research* **94**, 230-238 (2004).
43. Poling, J., *et al.* Induction of smooth muscle cell migration during arteriogenesis is mediated by Rap2. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**, 2297-2305 (2011).
44. Sato, K., *et al.* Efficacy of intracoronary versus intravenous FGF-2 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *The Annals of thoracic surgery* **70**, 2113-2118 (2000).
45. Schaper, W. Collateral circulation: past and present. *Basic research in cardiology* **104**, 5-21 (2009).
46. Deryugina, E.I. & Quigley, J.P. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochimica et biophysica acta* **1803**, 103-120 (2010).
47. Asahara, T., *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967 (1997).
48. Asahara, T., Kawamoto, A. & Masuda, H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem cells* **29**, 1650-1655 (2011).
49. Rafii, S. & Lyden, D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature medicine* **9**, 702-712 (2003).
50. Ingram, D.A., *et al.* Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* **105**, 2783-2786 (2005).
51. Ingram, D.A., *et al.* Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* **104**, 2752-2760 (2004).
52. Reinisch, A. & Strunk, D. Isolation and animal serum free expansion of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells (MSCs) and endothelial colony forming progenitor cells (ECFCs). *Journal of visualized experiments : JoVE* (2009).
53. Yoder, M.C., *et al.* Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* **109**, 1801-1809 (2007).
54. Richardson, M.R. & Yoder, M.C. Endothelial progenitor cells: quo vadis? *Journal of molecular and cellular cardiology* **50**, 266-272 (2011).
55. Lin, R.Z., *et al.* Human white adipose tissue vasculature contains endothelial colony-forming cells with robust in vivo vasculogenic potential. *Angiogenesis* (2013).
56. Prater, D.N., Case, J., Ingram, D.A. & Yoder, M.C. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia* **21**, 1141-1149 (2007).

57. Young, P.P., Vaughan, D.E. & Hatzopoulos, A.K. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. *Progress in cardiovascular diseases* **49**, 421-429 (2007).
58. Au, P., *et al.* Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood* **111**, 1302-1305 (2008).
59. Melero-Martin, J.M., *et al.* In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood* **109**, 4761-4768 (2007).
60. Critser, P.J., Kreger, S.T., Voytik-Harbin, S.L. & Yoder, M.C. Collagen matrix physical properties modulate endothelial colony forming cell-derived vessels in vivo. *Microvascular research* **80**, 23-30 (2010).
61. Critser, P.J., Voytik-Harbin, S.L. & Yoder, M.C. Isolating and defining cells to engineer human blood vessels. *Cell proliferation* **44**, 15-21 (2011).
62. Tura, O., *et al.* Late outgrowth endothelial cells resemble mature endothelial cells and are not derived from bone marrow. *Stem cells* **31**, 338-348 (2013).
63. Zhang, S.J., *et al.* Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte/macrophage function throughout in vitro culture. *Cell research* **16**, 577-584 (2006).
64. Bieback, K., *et al.* Recruitment of human cord blood-derived endothelial colony-forming cells to sites of tumor angiogenesis. *Cytotherapy* (2013).
65. Bompais, H., *et al.* Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* **103**, 2577-2584 (2004).
66. Duda, D.G., Cohen, K.S., Scadden, D.T. & Jain, R.K. A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. *Nature protocols* **2**, 805-810 (2007).
67. Masouleh, B.K., Baraniskin, A., Schmiegel, W. & Schroers, R. Quantification of circulating endothelial progenitor cells in human peripheral blood: establishing a reliable flow cytometry protocol. *Journal of immunological methods* **357**, 38-42 (2010).
68. Mund, J.A. & Case, J. The ontogeny of endothelial progenitor cells through flow cytometry. *Current opinion in hematology* **18**, 166-170 (2011).
69. Mund, J.A., Estes, M.L., Yoder, M.C., Ingram, D.A., Jr. & Case, J. Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, 1045-1053 (2012).

70. Peichev, M., *et al.* Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* **95**, 952-958 (2000).
71. Schmidt-Lucke, C., *et al.* Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PLoS one* **5**, e13790 (2010).
72. Mukai, N., *et al.* A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Experimental cell research* **314**, 430-440 (2008).
73. Hur, J., *et al.* Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**, 288-293 (2004).
74. Lin, Y., Weisdorf, D.J., Solovey, A. & Hebbel, R.P. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *The Journal of clinical investigation* **105**, 71-77 (2000).
75. Yamaguchi, J., *et al.* Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* **107**, 1322-1328 (2003).
76. Strunk, D. Endothelial progenitor cells: quod erat demonstrandum? *Current pharmaceutical design* **17**, 3245-3251 (2011).
77. Hristov, M., Zerneck, A., Liehn, E.A. & Weber, C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thrombosis and haemostasis* **98**, 274-277 (2007).
78. Asahara, T., *et al.* VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *The EMBO journal* **18**, 3964-3972 (1999).
79. Orlic, D., *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10344-10349 (2001).
80. Takahashi, T., *et al.* Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature medicine* **5**, 434-438 (1999).
81. Bahlmann, F.H., *et al.* Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney international* **64**, 1648-1652 (2003).
82. Lipsic, E., *et al.* A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* **20**, 135-141 (2006).

83. Hattori, K., *et al.* Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* **97**, 3354-3360 (2001).
84. Massberg, S., *et al.* Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1221-1233 (2006).
85. Yin, Y., *et al.* SDF-1alpha involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* **19**, 218-227 (2010).
86. Sun, J., Li, Y., Graziani, G.M., Filion, L. & Allan, D.S. E-Selectin Mediated Adhesion and Migration of Endothelial Colony Forming Cells Is Enhanced by SDF-1alpha/CXCR4. *PloS one* **8**, e60890 (2013).
87. Foubert, P., *et al.* PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *The Journal of clinical investigation* **117**, 1527-1537 (2007).
88. Chavakis, E., *et al.* Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *The Journal of experimental medicine* **201**, 63-72 (2005).
89. Hristov, M., *et al.* Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circulation research* **100**, 590-597 (2007).
90. Heissig, B., *et al.* Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* **109**, 625-637 (2002).
91. Kalka, C., *et al.* Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3422-3427 (2000).
92. Murohara, T., *et al.* Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1527-1536 (2000).
93. Iwasaki, H., *et al.* Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation* **113**, 1311-1325 (2006).
94. Kawamoto, A., *et al.* Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* **103**, 634-637 (2001).
95. Kawamoto, A., *et al.* CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation* **114**, 2163-2169 (2006).

96. Nagano, M., *et al.* Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood. *Blood* **110**, 151-160 (2007).
97. Fan, Y., *et al.* Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Annals of neurology* **67**, 488-497 (2010).
98. Hess, D.C., *et al.* Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells After stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **33**, 1362-1368 (2002).
99. Zhang, Z.G., Zhang, L., Jiang, Q. & Chopp, M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circulation research* **90**, 284-288 (2002).
100. Hecht, N., *et al.* Cerebral hemodynamic reserve and vascular remodeling in C57/BL6 mice are influenced by age. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **43**, 3052-3062 (2012).
101. Schneider, U.C., *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced vessel growth restores cerebral blood supply after bilateral carotid artery occlusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **38**, 1320-1328 (2007).
102. Carmeliet, P., Moons, L. & Collen, D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovascular research* **39**, 8-33 (1998).
103. Povlsen, C.O. & Rygaard, J. Heterotransplantation of human adenocarcinomas of the colon and rectum to the mouse mutant Nude. A study of nine consecutive transplantations. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology* **79**, 159-169 (1971).
104. Rygaard, J. & Povlsen, C.O. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* **77**, 758-760 (1969).
105. Flanagan, S.P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetical research* **8**, 295-309 (1966).
106. Pantelouris, E.M. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* **217**, 370-371 (1968).
107. Pantelouris, E.M. Observations on the immunobiology of 'nude' mice. *Immunology* **20**, 247-252 (1971).
108. Parrott, D.V., De Sousa, M.A. & East, J. Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. *The Journal of experimental medicine* **123**, 191-204 (1966).
109. De Sousa, M.A., Parrott, D.M. & Pantelouris, E.M. The lymphoid tissues in mice with congenital aplasia of the thymus. *Clinical and experimental immunology* **4**, 637-644 (1969).

110. Barone, F.C., Knudsen, D.J., Nelson, A.H., Feuerstein, G.Z. & Willette, R.N. Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **13**, 683-692 (1993).
111. Critser, P.J. & Yoder, M.C. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. *Current opinion in organ transplantation* **15**, 68-72 (2010).
112. Radbruch, A. *Flow Cytometry and Cell Sorting - a laboratory handbook*. Springer Verlag, Heidelberg (1992).
113. Briers, J.D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiological measurement* **22**, R35-66 (2001).
114. Boas, D.A. & Dunn, A.K. Laser speckle contrast imaging in biomedical optics. *Journal of biomedical optics* **15**, 011109 (2010).
115. Dunn, A.K., Bolay, H., Moskowitz, M.A. & Boas, D.A. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **21**, 195-201 (2001).
116. Maeda, K., Hata, R. & Hossmann, K.A. Differences in the cerebrovascular anatomy of C57black/6 and SV129 mice. *Neuroreport* **9**, 1317-1319 (1998).
117. Woitzik, J., Hecht, N., Schneider, U.C., Pena-Tapia, P.G. & Vajkoczy, P. Increased vessel diameter of leptomeningeal anastomoses after hypoxic preconditioning. *Brain research* **1115**, 209-212 (2006).
118. National Institute of Mental Health (http://www.mbl.org/mbl_main/atlas.html; Stand: 14.09.2014).
119. Vajkoczy, P., Schilling, L., Ullrich, A., Schmiedek, P. & Menger, M.D. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifuorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* **18**, 510-520 (1998).
120. Hristov, M., Erl, W. & Weber, P.C. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**, 1185-1189 (2003).
121. Timmermans, F., *et al.* Endothelial progenitor cells: identity defined? *Journal of cellular and molecular medicine* **13**, 87-102 (2009).
122. Stabile, E., *et al.* CD8⁺ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4⁺ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation* **113**, 118-124 (2006).

123. van Weel, V., *et al.* Natural killer cells and CD4⁺ T-cells modulate collateral artery development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 2310-2318 (2007).
124. Bergmann, C.E., *et al.* Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *Journal of leukocyte biology* **80**, 59-65 (2006).
125. Todo, K., *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances leptomeningeal collateral growth induced by common carotid artery occlusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **39**, 1875-1882 (2008).
126. Busch, H.J., Buschmann, I.R., Mies, G., Bode, C. & Hossmann, K.A. Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **23**, 621-628 (2003).
127. Duelsner, A., *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor improves cerebrovascular reserve capacity by enhancing collateral growth in the circle of Willis. *Cerebrovascular diseases* **33**, 419-429 (2012).
128. Wu, C.C., *et al.* Human umbilical vein endothelial cells protect against hypoxic-ischemic damage in neonatal brain via stromal cell-derived factor 1/C-X-C chemokine receptor type 4. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **44**, 1402-1409 (2013).
129. Wang, Y., Deng, Y. & Zhou, G.Q. SDF-1 α /CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain research* **1195**, 104-112 (2008).
130. Willis, T. *Cerebri anatome: cui accessit nervorum descripto et usus*, (J. Martyn and J. Allestry, London, 1664).
131. Liebeskind, D.S. Collaterals in acute stroke: beyond the clot. *Neuroimaging clinics of North America* **15**, 553-573, x (2005).
132. Heubner, O. *Die leutischen Erkrankungen der Hirnarterien*. FC Vogel, Leipzig, Germany (1874).
133. Klinke R, P.H., Silbernagel S. *Physiologie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart (2005).
134. Liebeskind, D.S. Anatomic considerations in therapeutic arteriogenesis for cerebral ischemia. *Circulation* **109**, e4 (2004).
135. Buschmann, I. & Schaper, W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *The Journal of pathology* **190**, 338-342 (2000).
136. De Jong, G.I., *et al.* Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment. *Neuroscience* **91**, 203-210 (1999).

137. Schmidt-Kastner, R. & Freund, T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* **40**, 599-636 (1991).
138. Moubarik, C., *et al.* Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem cell reviews* **7**, 208-220 (2011).
139. Nih, L.R., *et al.* Neuroblast survival depends on mature vascular network formation after mouse stroke: role of endothelial and smooth muscle progenitor cell co-administration. *The European journal of neuroscience* **35**, 1208-1217 (2012).
140. Rubin, L.L. & Staddon, J.M. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual review of neuroscience* **22**, 11-28 (1999).

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Formen des Gefäßwachstums	8
Abbildung 2: Methoden zur endothelialen Vorläuferzellgewinnung	13
Abbildung 3: <i>In vitro</i> Bildung eines primären Gefäßnetzwerkes durch ECFC	15
Abbildung 4: Modelletablierung	30
Abbildung 5: Behandlungsgruppen.....	31
Abbildung 6: Versuchsablauf	31
Abbildung 7: Zellmorphologie der ECFC und HUVEC.....	44
Abbildung 8: Expression eines endothelialen Phänotyps der ECFC mittels FACS.....	45
Abbildung 9: Zerebraler Blutfluss nach unilateraler Okklusion der ACI/E.....	47
Abbildung 10: Zerebrale Ruheperfusion – Modelletablierung	48
Abbildung 11: Einfluss der unilateralen Okklusion der ACI/ACE auf die zerebrovaskuläre Reservekapazität.....	49
Abbildung 12: Einfluss verschiedener Behandlungen auf den zerebralen Blutfluss nach unilateraler OACI/E	50
Abbildung 13: Mittels LSI transkranial gemessene zerebrale Ruheperfusion der rechten Hirnhemisphäre nach unilateraler OACI/E.....	51
Abbildung 14: Einfluss der ECFC auf die zerebrovaskuläre Reservekapazität nach unilateraler OACI/E.....	53
Abbildung 15: Latexangiographie der basalen Hirngefäßdurchmesser nach OACI/E	54
Abbildung 16: Einfluss der chronisch zerebralen Hypoperfusion auf die basalen Hirngefäße	55

Abbildung 17: Einfluss der chronisch zerebralen Hypoperfusion auf die leptomeningealen Arterien.....	56
Abbildung 18: Latexangiographie der basalen Hirngefäßdurchmesser nach OACI/E und ECFC-Applikation	59
Abbildung 19: Einfluss der ECFC auf die basalen Hirngefäßdurchmesser	59
Abbildung 20: Latexangiographie der leptomeningealen Hirngefäßdurchmesser und -anastomosen nach OACI/E und ECFC-Behandlung	62
Abbildung 21: Einfluss der ECFC auf die leptomeningealen Gefäßdurchmesser und -anastomosen.....	63
Abbildung 22: Zellproliferation der basalen Hirnarterien nach unilateraler OACI/E	65
Abbildung 23: Zellproliferation der basalen Hirnarterien nach OACI/E und ECFC-Behandlung	66
Abbildung 24: Immunhistochemie der zerebralen Mikrogefäßarchitektur nach OACI/E	68
Abbildung 25: Immunhistochemie der Mikrogefäßarchitektur nach OACI/E und ECFC-Applikation	71
Abbildung 26: ECFC <i>in vitro</i> Zellwachstum nach Anfärbung mit DiI	73
Abbildung 27: <i>In vitro</i> Untersuchung DiI markierter ECFC in verschiedenen Organen.....	74
Abbildung 28: <i>In vivo</i> Analyse DiI vorgefärbter ECFC in den suprakortikalen Gefäßen nach OACI/E.....	76

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	20
Tabelle 2: Verwendetes Material	21
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Standardlösungen.....	21
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Lösungen/Suspensionen	22
Tabelle 5: Immunhistochemie – Primäre Antikörper	22
Tabelle 6: Immunhistochemie – Sekundäre Antikörper	23
Tabelle 7: FACS – Antikörper	23
Tabelle 8: Medium für Zellkultur	23
Tabelle 9: Im Rahmen der Tierversuche verwendete Medikamente	24
Tabelle 10: Verwendete Software	24
Tabelle 11: Im Rahmen der FACS-Analyse verwendete Detektoren	28
Tabelle 12: Im Rahmen der FACS-Analyse verwendete Antikörper	29
Tabelle 13: Schnitthöhe der Gefrierschnitte zur Darstellung parenchymatöser Gefäße entsprechender Areale und der basalen Hirngefäße des CAW	40
Tabelle 14: Die im Rahmen der Endothelzell- und Perizytenfärbung verwendeten Antikörper...	41
Tabelle 15: Einfluss der OACI/E auf die zerebrale Mikrogefäßarchitektur.....	69
Tabelle 16: Einfluss der ECFC auf die zerebrale Mikrogefäßarchitektur nach unilateraler OACI/E.....	72

7. LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8. PUBLIKATIONSLISTE

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgendem Kongress vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

- Hecht N, **Martcorena S**, Bieback K, Woitzik J, Vajkoczy P (2013): Dose-dependent effect of late outgrowth endothelial colony forming cells (ECFC) on collateral remodeling in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. Vortrag, *64. Jahreskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC)*, 26–29. Mai 2013, Düsseldorf

Weitere Publikationen:

- Jussen D, **Martcorena S**, Vajkoczy P, Horn P (2012): Ultra early decompressive craniectomy in aneurysmal intracerebral hemorrhage: a retrospective observation study. *Minerva Anesthesiol.* 29.09.2014
- Jussen D, **Martcorena S**, Vajkoczy P, Horn P (2012): Ultra early decompressive craniectomy in aneurysmal intracerebral hemorrhage. Vortrag, *63. Jahreskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC)*, 13–16. Juni 2012, Leipzig

9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Stephan Rodrigo Marticorena Garcia, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von ‘Endothelial Colony Forming Cells‘ (ECFC) auf das zerebrale Kollateralgefäßwachstum bei der Maus“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

10. DANKSAGUNG

Zuerst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Vajkoczy für die Möglichkeit meine Dissertation in der Experimentellen Neurochirurgie absolvieren zu dürfen. Die konstruktive Kritik habe ich stets gerne angenommen.

Ich danke PD Dr. Johannes Woitzik und Dr. Nils Hecht für die Betreuung der Arbeit.

Frau PD Dr. Karen Bieback und Frau Susanne Elvers-Hornung danke ich für die freundliche Hospitation in ihrem Labor und das Erlernen der Theorie und Praxis der endothelialen Stammzellen.

Ich danke Melina Nieminen-Kelhä, Irina Kremenetskaia und Susan Brandenburg sowie allen Mitarbeitern der Experimentellen Neurochirurgie für die praktische Umsetzung im Labor und den vielen wichtigen Hinweisen.

Mein größter Dank gilt meiner Ehefrau Beatrix. Ihre Liebe und Ihre positive Einstellung haben mich immer motiviert und mich angehalten meine Ziele zu erreichen. Die herzliche Unterstützung während einer besonderen persönlichen Lebenslage bleibt stets in meiner Erinnerung.

Zuletzt danke ich meiner Familie – insbesondere Susanne, Marianne und Christian, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und ermutigt haben sowie meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist und welche immer in meiner Erinnerung bleiben werden.