

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

DISSERTATION

Endotheliale Vorläuferzellen und Angiopoietine als Verlaufsparemeter bei Patienten mit der Moyamoya-Erkrankung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tobias Schenkel

aus Heidelberg

Datum der Promotion: 18.12.2020

VORWORT

Moyamoya ist eine Erkrankung der hirnversorgenden Gefäße, hervorgerufen durch Stenosen der *A. carotis interna* und deren Äste. Dadurch kommt zu einer Reduktion der zerebralen Durchblutung, die zu Schlaganfällen und damit verbundenen dauerhaften neurologischen Defiziten und oft dauerhafter Behinderung der Patienten führt. Einzigartig ist die Ausbildung sogenannter Moyamoya-Gefäße, also kleiner Gefäße, welche die Stenosen überbrücken, jedoch nicht ausreichen, um die zerebrale Blutversorgung sicherzustellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob sich endotheliale Vorläuferzellen oder Angiopoietine als Biomarker im prä- und postoperativen Krankheitsverlauf von Patienten mit Moyamoya-Erkrankung eignen. Es sollte ein potenzieller, möglichst einfach bestimmbarer Messparameter gefunden werden, der eine Auskunft über das neoangiogenetische Geschehen bei den betroffenen Patienten gibt.

Hierzu wurden in der Klinik für Neurochirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin (Leiter Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy) unter direkter Anleitung von Dr. Dietmar Frey erwachsene Patienten, die operativ versorgt wurden, vor und nach der OP der betroffenen Hemisphären zellbiologisch und biochemisch untersucht.

Die im Rahmen dieser Arbeit akquirierten Seren (siehe Kapitel 3.2.5.2) und die Erkenntnisse aus den Proteinanalysen (siehe Kapitel 3.2.12, 3.2.13, 3.2.14 und 4.3) wurden auch für weitere Untersuchungen verwendet, welche zum Teil schon publiziert wurden: Blecharz et al 2017 und Blecharz-Lang et al 2018.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| VORWORT..... | I |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | V |
| TABELLENVERZEICHNIS | VII |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | X |
| 1 ABSTRAKT | 1 |
| 2 EINLEITUNG | 3 |
| 2.1 Moyamoya-Erkrankung | 3 |
| 2.1.1 Pathophysiologie..... | 3 |
| 2.1.2 Epidemiologie..... | 5 |
| 2.1.3 Genetik..... | 6 |
| 2.1.4 Klinisches Erscheinungsbild..... | 7 |
| 2.1.5 Diagnostik..... | 8 |
| 2.1.6 Klassifikation nach Czabanka..... | 10 |
| 2.1.7 Therapie | 11 |
| 2.1.8 Verlauf und Prognose | 13 |
| 2.2 Endotheliale Progenitorzellen | 14 |
| 2.2.1 EPC Identifikation | 14 |
| 2.2.2 Oberflächenproteine von EPC | 15 |
| 2.2.3 Endotheliale Vorläuferzellen in der Moyamoya-Erkrankung | 16 |
| 2.3 Angiopoietine | 16 |
| 2.4 Atherosklerotische zerebrovaskuläre Erkrankung | 18 |
| 2.5 Fragestellung | 19 |
| 2.5.1 Definitionen der Zielparameter..... | 19 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN..... | 20 |
| 3.1 Material | 20 |
| 3.1.1 Geräte..... | 20 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.1.2 | Verbrauchsmaterialien | 20 |
| 3.1.3 | Chemikalien | 20 |
| 3.1.4 | Puffer | 21 |
| 3.1.5 | Kits..... | 21 |
| 3.1.6 | SDS-Polyacrylamid-Gele..... | 22 |
| 3.1.7 | ELISA Sets | 22 |
| 3.1.8 | Antikörper..... | 22 |
| 3.2 | Methoden..... | 23 |
| 3.2.1 | Patienten..... | 23 |
| 3.2.2 | Kontrollgruppen..... | 24 |
| 3.2.3 | Untersuchungs- und Behandlungsablauf | 24 |
| 3.2.4 | Blutentnahme | 25 |
| 3.2.5 | Blutauarbeitung | 25 |
| 3.2.6 | PBMNC-Färbung..... | 26 |
| 3.2.7 | FACS | 27 |
| 3.2.8 | FACS-Datenanalyse..... | 30 |
| 3.2.9 | Proteinfällung aus dem Serum..... | 30 |
| 3.2.10 | Quantitative Proteinbestimmung | 30 |
| 3.2.11 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 31 |
| 3.2.12 | Western Blot | 32 |
| 3.2.13 | ELISA | 34 |
| 3.2.14 | Analyse der Proteindaten | 36 |
| 3.2.15 | Statistik | 37 |
| 4 | ERGEBNISSE | 39 |
| 4.1 | Patientendaten | 39 |
| 4.1.1 | Alters- und Geschlechtsverteilung..... | 39 |
| 4.1.2 | NIHSS | 40 |
| 4.1.3 | EPC Identifizierung | 41 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1.4 | Czabanka-Score | 44 |
| 4.2 | EPC | 44 |
| 4.2.1 | EPC und EPC ¹⁰⁵ , Vergleich in der <i>baseline</i> Untersuchung | 44 |
| 4.2.2 | EPC in der <i>baseline</i> Untersuchung | 45 |
| 4.2.3 | EPC im Verlauf..... | 48 |
| 4.2.4 | Absolute Differenzen..... | 52 |
| 4.2.5 | Relative Differenzen | 53 |
| 4.2.6 | Prozentuale Veränderung..... | 53 |
| 4.3 | Angiopoietine | 55 |
| 4.3.1 | Western Blot vs. ELISA | 55 |
| 4.3.2 | Ang-1, Ang-2 und Ang-2/Ang-1 Ratio..... | 55 |
| 4.3.3 | Ang-1, Ang-2 Vergleich der Gruppen in der <i>baseline</i> | 56 |
| 4.3.4 | Ang-1, Ang-2 im Verlauf..... | 60 |
| 4.3.5 | Ang-1, Ang-2 Veränderungen gegenüber <i>baseline</i> | 67 |
| 4.3.6 | Ang-2/Ang-1 Ratio in der <i>baseline</i> Untersuchung | 70 |
| 4.3.7 | Ang-2/Ang-1-Ratio im Verlauf | 73 |
| 4.3.8 | Ang-2/Ang-1-Ratio Veränderungen gegenüber <i>baseline</i> | 76 |
| 5 | DISKUSSION..... | 78 |
| | LITERATURVERZEICHNIS | 86 |
| | EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG..... | 94 |
| | ANTEILSERKLÄRUNG..... | 95 |
| | LEBENS LAUF | 96 |
| | PUBLIKATIONEN..... | 97 |
| | DANKSAGUNG..... | 98 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 1-1: Angiopoietin Tie-2 System..... | 17 |
| Abbildung 3-1: zeitlicher Verlauf der Studie | 25 |
| Abbildung 3-2: Biocoll Gradientenzentrifugation | 26 |
| Abbildung 3-3: Zellmarkierung | 28 |
| Abbildung 3-4: FACS | 29 |
| Abbildung 3-5: Western Blot | 31 |
| Abbildung 3-6: Western Blot „Sandwich“ | 33 |
| Abbildung 3-7: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA..... | 34 |
| Abbildung 3-8: ELISA | 36 |
| Abbildung 4-1: FACS: alle erfasste Zellen | 42 |
| Abbildung 4-2: FACS: mononukleäre Zellen | 42 |
| Abbildung 4-3: FACS CD133 ⁺ und CD34 ⁺ mononukleären Zellen | 43 |
| Abbildung 4-4: FACS CD133 ⁺ , CD34 ⁺ und CD45 ^{low} mononukleären Zellen..... | 43 |
| Abbildung 4-5: präoperative EPC in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe | 47 |
| Abbildung 4-6: Vergleich der rangtransformierten EPC-baseline-Werte (Wilcoxon scores) in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe..... | 48 |
| Abbildung 4-7: Zeitlicher Verlauf der EPC-Werte für die MMD-Gruppe | 49 |
| Abbildung 4-8: EPC-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Geschlecht..... | 50 |
| Abbildung 4-9: EPC-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Alter | 51 |
| Abbildung 4-10: Einzelverläufe der EPC-Werte der MMD-Gruppe | 54 |
| Abbildung 4-11: Western Blot anti Ang-1 | 55 |
| Abbildung 4-12: Western Blot anti Ang-2..... | 55 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 4-13: Western Blot anti Tie-2..... | 55 |
| Abbildung 4-14: Ang-1- baseline-Werte in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe..... | 57 |
| Abbildung 4-15: Ang-2- baseline-Werte in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe..... | 58 |
| Abbildung 4-16: Vergleich der transformierten Ang-1-baseline-Werte (Wilcoxon-Scores) in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe..... | 59 |
| Abbildung 4-17: Vergleich der transformierten Ang-2-baseline-Werte (Wilcoxon-Scores) in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe..... | 60 |
| Abbildung 4-18: Ang-1-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Geschlecht..... | 62 |
| Abbildung 4-19: Ang-1-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Alterskategorien..... | 63 |
| Abbildung 4-21: Ang-2-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Geschlecht..... | 65 |
| Abbildung 4-22: Ang-2-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Alterskategorien..... | 66 |
| Abbildung 4-23: Einzelverläufe der Ang-1-Prozentuale Veränderungen gegenüber baseline der MMD-Gruppe..... | 69 |
| Abbildung 4-24: Einzelverläufe der Ang-2-Prozentuale Veränderungen gegenüber baseline der MMD-Gruppe..... | 70 |
| Abbildung 4-25: Ang-2/Ang-1 Ratio in der baseline Untersuchung nach Gruppen..... | 71 |
| Abbildung 4-26: Vergleich der rangtransformierten EPC-baseline-Werte (Wilcoxon scores) in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe..... | 73 |
| Abbildung 4-27: Ang-2/ang-1-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Geschlecht..... | 74 |
| Abbildung 4-28: Ang-2/Ang-1-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Alter..... | 75 |
| Abbildung 4-29: Einzelverläufe der Ang-2/Ang-1-Werte der MMD-Gruppe Dargestellt als prozentuale Veränderung zwischen standardisiertem präoperativen Untersuchungswert (=100%) und follow up 1 bzw. follow up 2..... | 77 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: National Institute of Health Stroke Scale | 10 |
| Tabelle 2: Suzuki Klassifikation | 11 |
| Tabelle 3: Czabanka Klassifikation..... | 11 |
| Tabelle 4: Untersuchungsvariablen..... | 37 |
| Tabelle 5: Verteilung von Alter und Geschlecht bei der baseline Untersuchung getrennt nach Gruppen | 39 |
| Tabelle 6: Alter bei der baseline Untersuchung (statistische Kennwerte) | 40 |
| Tabelle 7: NIHSS in der baseline und im Verlauf für die MMD- und ACVD-Gruppe..... | 41 |
| Tabelle 8: Czabanka-Score Score in der baseline bei der MMD-Gruppe insgesamt und getrennt nach Geschlecht | 44 |
| Tabelle 9: Vergleich von EPC und EPC ¹⁰⁵ in der baseline Untersuchung nach Gruppen | 44 |
| Tabelle 10: Präoperativen EPC Werte in den 3 Gruppen nach Geschlecht und Gesamt | 45 |
| Tabelle 11: Altersgruppenverteilung der präoperativen EPC Werte in den 3 Gruppen..... | 46 |
| Tabelle 12: Präoperative EPC Werte in der MMD-Gruppe nach dem Czabanka-Score Score | 46 |
| Tabelle 13: zeitlicher Verlauf der EPC Werte von MMD und ACVD Patienten | 49 |
| Tabelle 14: zeitlicher Verlauf der EPC Werte von MMD Patienten getrennt nach Geschlecht | 50 |
| Tabelle 15: zeitlicher Verlauf der EPC-Werte von MMD-Patienten getrennt nach Alterskategorien..... | 51 |
| Tabelle 16: Test der Zeiteffekte der EPC Werte der MMD-Gruppe..... | 52 |
| Tabelle 17: Differenzen der kleinste-Quadrate-Mittelwerte der paarweisen Vergleiche im zeitlichen Verlauf der EPC-Werte der MMD-Gruppe..... | 52 |
| Tabelle 18: Absolute Differenzen der EPC-Veränderungen gegenüber den baseline-Werten | 53 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 19: Relative Differenzen der EPC-Veränderungen gegenüber der baseline Untersuchung | 53 |
| Tabelle 20: prozentuale EPC-Veränderungen gegenüber standardisierten baseline-Werten... | 54 |
| Tabelle 21: Ang-2, Ang-1 und Ang-2/Ang-1 Ratio nach Gruppen..... | 56 |
| Tabelle 22: Zeitlicher Verlauf der Ang-1-Werte in der MMD-Gruppe nach Geschlecht..... | 61 |
| Tabelle 23: Zeitlicher Verlauf der Ang-1-Werte in der MMD-Gruppe nach Alterskategorien | 63 |
| Tabelle 24: Tests der festen Effekte der Ang-1 Werte der MMD-Gruppe | 64 |
| Tabelle 25: Differenzen kleinste-Quadrate-Mittelwerte der paarweisen zeitlichen Effekte der Ang-1-Werte der MMD-Gruppe..... | 64 |
| Tabelle 26: Zeitlicher Verlauf der Ang-2-Werte in der MMD-Gruppe nach Geschlecht..... | 64 |
| Tabelle 27: zeitlicher Verlauf der Ang-2-Werte in der MMD-Gruppe nach Alterskategorien | 66 |
| Tabelle 28: Test der festen Zeiteffekte der Ang-2- Werte der MMD-Gruppe..... | 67 |
| Tabelle 29: Differenzen kleinste-Quadrate-Mittelwerte der paarweisen zeitlichen Effekte der Ang-2-Werte der MMD-Gruppe..... | 67 |
| Tabelle 30: Ang-1 - Veränderungen gegenüber der baseline -Werte in der MMD-Gruppe | 68 |
| Tabelle 31: Ang-2 - Veränderungen gegenüber der baseline-Werte in der MMD-Gruppe | 68 |
| Tabelle 32: Ang-2/Ang-1 Ratio in der baseline Untersuchung nach Gruppen | 71 |
| Tabelle 33: Geschlechterverteilung der präoperativen Ang-2/Ang-1-Ratio in den 3 Gruppen | 71 |
| Tabelle 34: Altersgruppenverteilung der präoperativen Ang-2/Ang-1-Ratio in den 3 Gruppen | 72 |
| Tabelle 35: Präoperative Ang-2/Ang-1 Ratio in der MMD-Gruppe nach dem Czabanka-Score | 72 |
| Tabelle 36: zeitlicher Verlauf der Ang-2/Ang-1 Ratio in der MMD-Gruppe..... | 73 |
| Tabelle 37: zeitlicher Verlauf der Ang-2/Ang-1-Werte in der MMD-Gruppe nach Geschlecht | 74 |

Tabelle 38: zeitlicher Verlauf der Ang-2/Ang-1-Werte in der MMD-Gruppe nach Alterskategorien..... 75

Tabelle 39: Test der festen Effekte der Ang-2/Ang-1 Werte der MMD-Gruppe..... 76

Tabelle 40: Differenzen kleinste-Quadrate-Mittelwerte der paarweisen zeitlichen Effekte der EPC- Werte der MMD-Gruppe..... 76

Tabelle 41: Ang-2/Ang-1-Ratio Veränderungen gegenüber der baseline Untersuchung 77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------|--|
| A | <i>Arteria</i> |
| Aa | <i>Arteriae</i> |
| ACA | <i>Arteria cerebri anterior</i> |
| ACVD | atherosklerotische zerebrovaskuläre Erkrankung |
| AK | Antikörper |
| Ang | Angiopoietin |
| APC | Allophycocyanin |
| APS | Ammoniumperoxydisulfat |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| bFGF | <i>basic fibroblast growth factor</i> |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CD | Cluster of Differentiation |
| cEPC | zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (<i>circulating endothelial progenitor cells</i>) |
| CVRC | zerebrovaskuläre Reservekapazität |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DSA | digitale Subtraktionsangiographie |
| ECL | verstärkte Chemolumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EIA | enzymatischen Immunadsorptionsverfahren |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie) |
| FITC | Fluorescein-5-Isothiocyanat |
| f-MRT | funktionelle Kernspintomographie |

| | |
|----------------------------------|---|
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| H ₂ SO ₄ | Schwefelsäure |
| HIF-1 | Hypoxie-induzierte Faktor 1 |
| HLA | humanes Leukozytenantigen |
| HRP | Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| ICA | <i>Arteria carotis interna</i> |
| IgG | Gammaglobulin (Immunglobulin G) |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| Max | Maximum |
| MCA | <i>Arteria cerebri media</i> |
| Min | Minimum |
| min | Minute |
| MMD | Moyamoya_Erkrankung |
| MMP | Matrix-Metalloproteasen |
| MRT | Kernspintomographie |
| MW | Mittelwert |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NIHSS | National Institute of Health Stroke Scale |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBMNC | periphere mononukleäre Blutzellen |
| PBS | phosphatgepufferte Saline Lösung |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex |
| PET | Positronen-Emissionstomographie |

| | |
|----------------|--|
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RNF 213 | <i>really interesting new gene finger protein 213</i> |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumlaurylsulfat |
| STA | <i>Arteria temporalis superficialis</i> |
| Std | Standardabweichung |
| T | Tween 20 |
| TBS | TRIS gepufferte Saline Lösung |
| TCD | transkranielle Dopplersonographie |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TGF- β 1 | <i>transforming growth factor-beta 1</i> |
| TIA | transitorisch ischämische Attacke |
| Tie | <i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains</i> |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trometamol) |
| TRIS-HCl | Trometamol-Hydrochlorid |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| α | anti |

1 ABSTRAKT

Moyamoya ist eine Erkrankung der hirnversorgenden Gefäße, hervorgerufen durch Stenosen der *A. carotis interna* und deren Äste. Dadurch kommt zu einer Reduktion der zerebralen Durchblutung, die zu Schlaganfällen und damit verbundenen dauerhaften neurologischen Defiziten und oft dauerhafter Behinderung der Patienten führt. Einzigartig ist die Ausbildung sogenannter Moyamoya-Gefäße, also kleiner Gefäße, welche die Stenosen überbrücken, jedoch nicht ausreichen, um die zerebrale Blutversorgung sicherzustellen.

Die Therapie der Wahl ist eine Revaskularisierung mittels operativer Anlage eines extra-intrakraniellen Bypasses. Da der Nachweis des Revaskularisierungserfolges, beispielsweise mittels digitaler Subtraktionsangiographie, sehr aufwändig und invasiv ist, besteht die Notwendigkeit einen Verlaufsp Parameter zu identifizieren, der möglichst wenig invasiv den Erfolg der operativen Revaskularisierung widerspiegeln und damit als Biomarker dienen kann.

Unter der Annahme eines niedrigeren Neoangiogenesebedarfs nach Revaskularisierung sollen die Angiogenesemarker endotheliale Vorläuferzellen und Angiopoietine (Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2) im Serum auf ihre Qualifikation als Verlaufsp Parameter untersucht werden. Hierzu wurden bei 23 an der Charité behandelten Moyamoya-Patienten die Serumkonzentrationen im prä- und postoperativen Verlauf bestimmt. Die Konzentration endothelialer Vorläuferzellen wurde mittels Durchflusszytometrie, die der Angiopoietine mittels Western Blots und ELISA bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass die Konzentration der endothelialen Vorläuferzellen nach Revaskularisierung beider Hemisphären abnimmt. Bei den Angiopoietinen zeigten sich keine hinreichend eindeutigen Ergebnisse, lediglich die Angiopoietin-2 Konzentration nimmt im postoperativen Verlauf zu. Allerdings wirken sich offensichtlich andere Geschehen auch auf diese Parameter aus, weshalb diese Veränderungen individuell verlaufen.

Insgesamt sind die vorliegenden Ergebnisse ein wichtiger Schritt zur Identifizierung von Biomarkern im postoperativen Verlauf von Moyamoya-Patienten und verlangen nach weiteren Forschungsarbeiten in diesem Feld.

Moyamoya is a disorder of the cerebral vessels caused by stenoses of the internal carotid artery and its branches. This leads to a reduction of cerebral blood flow resulting in strokes and the associated permanent neurological deficits as well as in permanent disability. Unique is the formation of so-called Moyamoya vessels, small vessels bridging the stenosis but insufficient to ensure the cerebral blood supply.

The treatment of choice is a surgical revascularization in form of an extra-intracranial bypass. Since the proof of the revascularization success, for example in form of a digital subtraction angiography, is very complex and invasive, there is a need to identify a parameter which, as little invasively as possible, reflects the success of the surgical revascularization and subsequently qualify to serve as a biomarker.

Assuming a lower need for neoangiogenesis after revascularization, the angiogenic markers endothelial progenitor cells (EPC) and angiopoietins (angiopoietin-1 and angiopoietin-2) in the serum lend itself to be examined whether they qualify as biomarkers. For this purpose, the concentration of those parameters in the pre- and postoperative course was determined in 23 Moyamoya patients treated at Charité. The concentration of endothelial progenitor cells was determined by flow cytometry, that of angiopoietins by Western blotting and ELISA.

It was shown that the concentration of endothelial progenitor cells decreases following revascularization of both hemispheres. The Angiopoietins showed no clear results, though the Angiopoietin-2 concentration increases in the postoperative course. However, other events might also affect these parameters resulting in individual changes.

Taken together, the present study is a major improvement to identify biomarkers in the postoperative course of Moyamoya patients and calls for further research in this field.

2 EINLEITUNG

2.1 Moyamoya-Erkrankung

In den 1960er Jahren beobachteten die japanischen Ärzte Jiro Suzuki und Akira Takaku eine Reihe von Patienten mit abnormalen netzartigen Gefäßen an der Basis des Hirns, welche erstmals 1957 als „bilaterale Hypoplasie der *Aa. carotis internae*“ (hypoplasia of the bilateral internal carotid arteries) beschrieben wurde (Takeuchi und Shimizu, 1957). Das angiographische Bild erinnerte sie an die Rauchwolke einer Zigarette, was auf Japanisch *Moyamoya* (もやも) heißt, somit beschrieben sie erstmals die zerebrovaskuläre Moyamoya-Erkrankung (*Moyamoya disease*, MMD) (Suzuki und Takaku, 1969).

Die Moyamoya-Erkrankung ist eine seltene, progrediente, stenookklusive Erkrankung der hirnversorgenden Arterien (Horn, 2011, Achrol et al., 2009). Bei dieser zerebrovaskulären Erkrankung kommt es zur (häufig bilateralen) Stenose oder Verschluss des *Circulus arteriosus Willisii*. Das einzigartige Merkmal dieser Erkrankung ist, dass sich basale Kollateralgefäße im Bereich der Okklusionen bilden, sogenannte *moyamoya vessels* (Burke et al., 2009, Vajkoczy, 2009) bilden.

2.1.1 Pathophysiologie

Wie bereits oben beschrieben, kommt es bei der MMD zu einer langsamen, progredienten Stenose bis zum Verschluss der hirnversorgenden Arterien. Im Gegensatz zu atherosklerotischen Stenosen sind hiervon vor allem Kinder und jüngere Erwachsene betroffen (Greenberg, 2010, Smith und Scott, 2010).

Histopathologische Untersuchungen der stenosierten Gefäße zeigten eine fibrozelluläre Verdickung der *Lamina intima* durch proliferierende glatte Muskelzellen (Fukui et al., 2000, Houkin et al., 2012). Makrophagen und T-Zellen in Stenosen könnten ein Indiz dafür sein, dass inflammatorische Stimuli an der Pathogenese beteiligt sind (Masuda, Ogata und Yutani, 1993). Bei Untersuchungen der Signalkaskaden spielen inflammatorische Proteine (z. B. Interleukin-1 beta (IL-1 β) und der Tumor Nekrosefaktor-alpha (TNF- α) durch die Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa b* (NF- κ B)) eine Rolle. Es bleibt allerdings unklar, ob es sich dabei um eine Ursache oder eine Folge der Gefäßveränderungen handelt (Young et al., 2013, Collins et al., 1995). Weitere histopathologische Merkmale sind eine verdünnte *Lamina media* und Fibrinablagerungen im Gefäßlumen (Achrol et al., 2009, Burke et al., 2009). Die, oft als Primärläsion bezeichneten, Stenosen entstehen im Wesentlichen in der distalen *Arteria carotis interna* (ICA) und/oder deren Äste, also den proximalen Teilen

der *Arteria cerebri anterior* (ACA) bzw. der *Arteria cerebri media* (MCA), bei pädiatrischen Patienten sind diese seltener auch im Bereich der hinteren Zirkulation zu finden (Horn, 2011).

Die herausragende Einzigartigkeit der MMD besteht darin, dass sich, wahrscheinlich aufgrund der chronischen Hypoperfusion, Kollateralgefäße zur Überbrückung der Stenosen bilden. Diese, als Sekundärläsion bezeichneten pathologischen Moyamoya Gefäße könne sich an verschiedenen Bereichen darstellen: Häufig sind die basalen perforierenden Arterien, wie die *A. lenticulostriata* und die *A. thalamoperforata* in den Basalganglien und Thalamus betroffen. Ebenso sind bei vielen Patienten Dilatationen der *A. choroidea anterior* und der *A. pericallosa posterior* zu finden. Des Weiteren kann es zu leptomeningealen Kompensationswegen kommen. In fortgeschrittenen Stadien der Krankheit kann es sogar zu extra-intrakraniellen Kollateralen kommen, zum Beispiel aus der *A. meningea media*, oder über die *Aa. ethmoidales* aus der *A. ophthalmica* (Vajkoczy, 2009, Kuroda und Houkin, 2008, Czabanka et al., 2011). Diese Kollateralgefäße können allerdings die Stenose der hirnversorgenden Arterien in den meisten Fällen nicht suffizient kompensieren, was zu einer Einschränkung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) führt, von der das klinische Bild der MMD Patienten abhängig ist (Horn, 2011). Durch die Veränderungen des zerebralen Blutflusses kann es zur Bildung von Aneurysmen, meistens der *A. cerebri posterior* oder am Basilariskopf, kommen (Scott und Smith, 2009). Als Moyamoya-Erkrankung wird hierbei die idiopathische Form bezeichnet, kommt es im Rahmen anderer Erkrankungen zu den oben genannten Pathologien spricht man von einem „Moyamoya-Syndrom“ (Horn, 2011).

In der Literatur werden verschiedene biochemische Faktoren beschrieben, die der Moyamoya-Erkrankung eine Rolle spielen könnten: der *Hypoxie-induzierte Faktor 1* (HIF-1), der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der *basic fibroblast growth factor* (bFGF), der *transforming growth factor-beta 1* (TGF- β 1), der *hepatocyte growth factor* (HGF), *Matrix-Metalloproteasen* (MMP) und andere Faktoren werden genannt (Achrol et al., 2009, Burke et al., 2009), wobei eine erhöhte bFGF Konzentration im Liquor MMD spezifisch zu sein scheint (Yoshimoto et al., 1996). Es wurde postuliert, dass VEGF bei MMD Patienten zwar erhöht, aber nicht an der Genese der Moyamoya Gefäße beteiligt sei (Sakamoto et al., 2008). Auf die Rolle von Angiopoietinen (Ang) und endothelialen Progenitorzellen (EPC) wird in den Kapiteln 2.2 und 2.3 detailliert eingegangen. Neben diesen humoralen Faktoren scheinen bei Moyamoya Patienten auch Antiautokörper eine Rolle zu spielen. So kann bei einem Großteil der Patienten der antiendotheliale *anti-alpha-fordin* Autoantikörper nachgewiesen werden (Ogawa et al., 2003). In einer ausführlichen Analyse konnten mehrere Autoantikörper identifiziert werden, die als MMD assoziiert postuliert wurden. Es handelt sich um Autoantikörper gegen das

Amyloid-beta-A4-Protein (APP), den *G-Protein-Pathway-Suppressor-1 (GPS1)*, die *stimulated-by-retinoic-acid-13 (STRA13)*, das *beta-1-Catenin (CTNNB1)*, den *receptor-tyrosinekinase-like-orphan-receptor-1 (ROR1)* und gegen die *EGF-like-repeats-and-discoidin-I-like-domains-3 (EDIL3)* (Sigdel et al., 2013). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass bei MMD Patienten erhöhte Schilddrüsenautoantikörper zu finden sind (Lei et al., 2014). Horn postuliert, dass "...es sich bei der Moyamoya-Erkrankung primär um eine systemische vaskuläre, vielleicht auch autoimmun vermittelte Erkrankung mit bevorzugt intrakranieller Manifestation handeln könnte." (Horn, 2011)

Dass die Veränderungen des Gefäßsystems nicht rein lokal sind, zeigt sich durch eine hohe Komorbidität mit anderen vaskulären Anomalien, wie arteriovenösen Malformationen (Achrol et al., 2009), Aneurysmen (Burke et al., 2009), oder Kavernomen (Kerchner et al., 2006); außerdem wurden bei MMD Patienten auch außerhalb des Gehirns (zum Beispiel in Lunge und Niere) eine fibrozelluläre Verdickung der Intima beschrieben (Burke et al., 2009, Ou, Dupont und Bonnet, 2006).

2.1.2 Epidemiologie

Am häufigsten kommt die Moyamoya-Erkrankung in Ostasien vor, vor allem über MMD in Japan gibt es viele Untersuchungen. So wurden Im Jahr 2003 etwa 7200 Patienten in Japan an MMD behandelt, bei einer Inzidenz von 0,54 pro 100.000 Einwohner (Kuriyama et al., 2008). Diese Zahlen scheinen jedoch zu steigen 2006 betrug die jährliche Inzidenz 0,94 und die Prävalenz 10,5 pro 100.000 Einwohner (Kuroda und Houkin, 2008). Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten wird als 1,8 zu 1 angegeben. Männer erkranken vor allem in einem Alter von 10-14 Jahren, weitere Altersgipfel bei Männern sind 35-39 und 55-59 Jahre. Frauen erkranken am häufigsten im Alter von 20-24 Jahren, gefolgt von 50-54 Jahren. In etwas über 10% der Fälle tritt MMD familiär auf, wobei bei diesen Fällen Frauen wesentlich häufiger betroffen sind als Männer und Patienten bereits jünger erkranken (Burke et al., 2009). In Korea scheint die Krankheit in ähnlicher Art aufzutreten. Für das Jahr 2008 wird eine Prävalenz von 9,1 und eine Inzidenz von 1 pro 100.000 Einwohner angegeben. Auch das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten und die Altersgipfel sind mit Japan vergleichbar (Im et al., 2012).

Außerhalb des ostasiatischen Raums scheint die Prävalenz der Moyamoya-Erkrankung geringer zu sein. Da, außer für Japan und Korea, keine landesweiten epidemiologischen Datenerhebungen existieren, können über die Epidemiologie außerhalb dieser Länder keine genauen Angaben gemacht werden (Takahashi und Miyamoto, 2010). Untersuchungen in den

amerikanischen Bundesstaaten Washington und Kalifornien von 1987-1998 zeigten eine Inzidenz von 0,087 pro 100.000 Einwohnern, wobei asiatisch-stämmige (0,28/100.000) und afro-amerikanische (0,13/100.000) Einwohner wesentlich häufiger betroffen waren als kaukasische (0,06/100.000) oder hispanische (0,03/100.000) Einwohner (Uchino et al., 2005). In Europa wird die Inzidenz auf etwa ein Zehntel der Inzidenz in Japan geschätzt (Smith und Scott, 2010). Generell scheinen sich die ostasiatische und die kaukasische Version der MMD zu unterscheiden. Untersuchungen in Deutschland zeigten ein späteres Krankheits-Onset von durchschnittlich 34 Jahren (Kinder waren in dieser Studie nicht betroffen) und ein weiblich-zu-männlich Verhältnis von 4,25:1. Außerdem kann es seltener zu Hirnblutungen, aber häufiger zu rezidivierenden zerebralen Ischämien und perioperativen Schlaganfällen als bei japanischen Patienten (Kraemer, Heienbrok und Berlit, 2008), dies scheint auch für Patienten in den USA zu gelten (Gross und Du, 2013).

Im ostasiatischen Raum tritt MMD meistens bilateral auf, wobei bei kaukasischen Patienten häufiger unilaterale Manifestationen beobachtet werden (Vajkoczy, 2009).

2.1.3 Genetik

Vor allem in Japan ist eine familiäre Häufung von MMD seit längerem gesichert (Kuriyama et al., 2008), so dass eine genetische Komponente sehr wahrscheinlich scheint. 2011 gelang erstmals die Identifizierung eines „Moyamoya Gens“ bei japanischen MMD Patienten. Es handelt sich um eine Mutation des *really interesting new gene ring finger protein 213* (RNF 213) Gens (Kamada et al., 2011). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die c.14576G>A Variante des Gens stark mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert. Es konnte auch gezeigt werden, dass homozygote Träger schwerer betroffen sind als heterozygote Träger (Miyatake et al., 2012). Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass Kamada und Miyatake rein japanische Populationen untersucht haben. Bereits vor der Identifizierung von RNF 213 wurden unterschiedliche Polymorphismen bei ostasiatischen und kaukasischen MMD Patienten gefunden (Liu et al., 2010). Weitere Untersuchungen konnten RNF 213 als Suszeptibilitätsgen für ostasiatische Patienten bestätigt werden, wobei sich bei europäischen MMD Patienten keine Mutationen an diesem Locus zeigten (Liu et al., 2011, Roder et al., 2011). Insgesamt konnte noch kein eindeutiges Suszeptibilitätsgen für kaukasische Patienten identifiziert werden (Krischek et al., 2011). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass MMD spezifische humane Leukozytenantigen-Marker (HLA) existieren (Kraemer et al., 2012a). Außerdem wurde eine direkte Vererbung der Erkrankung auch in Europa beobachtet (Kraemer et al., 2012b).

Vaskuläre Veränderungen bei einem RNF 213 knock-out Zebrafisch lieferten Hinweise auf eine loss-of-function Mutation (Liu et al., 2011), wobei sich bei RNF 213 knock-out Mäusen

keine Gefäßveränderungen, auch nicht nach Ischämie, zeigten, was darauf schließen lässt dass es sich entweder um eine gain-of-function Mutation handelt, oder andere bzw. weitere Faktoren zur Pathogenese notwendig sind (Fujimura et al., 2014).

Eine weitere Rolle scheinen die Matrixmetalloproteasen (MMP) und die entsprechenden Gene zu spielen, so wurden Mutationen im MMP-3 Gen bei chinesischen Patienten nachgewiesen (Ma und You, 2015, Li et al., 2010, Wang et al., 2013). Einige Studien zeigen, dass der MMP Haushalt gestört ist (Kang et al., 2010, Sonobe et al., 2014), insbesondere scheint MMP-9 betroffen zu sein (Bedini et al., 2016).

2.1.4 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild von Moyamoya wird hauptsächlich durch die Folgen der Primärläsion (arterielle Stenose) und der Sekundärläsion (pathologische Kollateralgefäße) bestimmt. Allerdings sind auch hier Unterschiede zwischen der juvenilen und der adulten Form und zwischen asiatischen und kaukasischen Patienten zu beobachten.

Am häufigsten sind die Symptome der hämodynamischen Insuffizienz zu beobachten: transitorisch ischämische Attacken (TIA) bis zu kompletten ischämischen Schlaganfällen mit konsekutiver intermittierender oder persistierender fokaler neurologischer Symptomatik, wie sensorischen Defiziten, Sprachstörungen, Sehstörungen, Bewusstseinsstörungen und anderen. Des Weiteren kann es zu fokalen epileptischen Anfällen und, durch Reizung duraler Nozizeptoren durch die Moyamoyagefäße, zu migräneartigen Zephalgien kommen. Bei einer Ruptur der pathologischen Kollateralgefäße kommt es zu Hirnblutungen (hämorrhagischer Typ), hierbei handelt es sich vor allem um parenchymatöse Blutungen im Bereich der Stammganglien, intraventrikuläre Blutungen und Subarachnoidalblutungen. Gerade bei pädiatrischen Patienten kann es in Folge der kortikalen Minderperfusion zu einer Einschränkung der psychosozialen Entwicklung kommen. Selten zeigen sich auch choreiforme Bewegungen oder isolierte psychiatrische Symptome, wie Wesensveränderungen oder demenzielle Symptome (Horn, 2011, Scott und Smith, 2009).

Die TIA werden, gerade bei der juvenilen Form, häufig durch Hyperventilation oder Anstrengung getriggert. Außerdem treten sie bei bilateralen Gefäßveränderungen beidseitig auf, so dass ein für die Moyamoya-Erkrankung suggestives Symptom bilateral alternierende Hemiparesen sind (Greenberg, 2010).

Das japanische Gesundheitsministerium unterscheidet zwischen vier Subtypen: Am häufigsten ist mit 63,4 % der ischämische Typ. Hiervon betroffene Patienten präsentieren häufig Hemiparesen, Sprechstörungen und Bewusstseinsminderungen. Der hämorrhagische Typ ist mit

21,6% der zweithäufigste, hiervon sind vor allem erwachsene Patienten betroffen. In 7,6% kommt es zum epileptischen Typ, wobei hiervon vor allem Kinder betroffen sind. 7,5% der Patienten sind keinem dieser Typen zuzuordnen und bleiben entweder asymptomatisch oder zeigen sonstige Symptome, wie isolierte Zephalgien (Burke et al., 2009).

Untersuchungen von kaukasischen Patienten haben gezeigt, dass, wie bereits oben erwähnt, Kinder deutlich seltener betroffen sind, außerdem scheint der ischämische Typ im Vergleich zu ostasiatischen Patienten deutlich häufiger vor zu kommen als der hämorrhagische Typ (Smith und Scott, 2010, Krischek et al., 2011). Eine monozentrische Untersuchung von allen in Boston, USA zwischen 2003 und 2011 behandelten Patienten (hierbei handelte es sich allerdings nicht ausschließlich um kaukasische Patienten) zeigte folgendes Verteilungsmuster: 74% der Patienten zeigten den ischämischen Typ, 17% den hämorrhagischen Typ, 5% den epileptischen Typ und 5% der Patienten zeigten isolierte Kopfschmerzen (Gross und Du, 2013).

Das klinische Erscheinungsbild ist auch stark von Begleiterkrankungen abhängig. Moyamoya assoziierte Erkrankungen sind: Neurofibromatose Typ 1, Trisomie 21, kongenitale Herzfehler, Nierenarterienstenose und Hyperthyreose. Bestrahlung von Kopf oder Hals scheint ein Risikofaktor für Moyamoya zu sein (Smith und Scott, 2010).

2.1.5 Diagnostik

Da sich die Moyamoya-Erkrankung sehr variabel präsentiert, sind bildgebende Verfahren bei der Diagnosestellung von zentraler Bedeutung. Zur Beurteilung pathologisch veränderter Gefäße und zur Planung der Therapie, also um ein geeignetes extrakranielles Gefäß (im Regelfall die *A. temporalis superficialis* (STA)) für den Bypass zu finden (Vajkoczy, 2011) werden mittels digitaler Subtraktionsangiographie (DSA) die Konfiguration extra- und intrakranieller Gefäße ermittelt. Die digitale Subtraktionsangiographie stellt den diagnostischen Goldstandard dar (Horn, 2011, Burke et al., 2009).

Mittels Kernspintomographie (MRT) können morphologische Veränderungen, sowie frische und ältere ischämische Läsionen detektiert, auch über die Kernspinnangiographie kann die Diagnose gesichert werden, allerdings lassen sich Kollateralkreisläufe hier nur eingeschränkt darstellen (Horn, 2011).

Da sich über die genannten bildgebenden Verfahren die hämodynamische Insuffizienz nicht darstellen lässt, sind weitere funktionale Untersuchungen zur Abschätzung der zerebralen Reservekapazität (CVRC) sinnvoll. Als direktes Verfahren eignet sich Positronen-Emissionstomographie, weitere direkte Verfahren sind die Perfusions-Kernspin- oder Computertomographie, die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie, ¹³³Xenon und weitere. Zusätzlich

stehen indirekte Verfahren, wie die transkranielle Dopplersonographie (TCD), die Kernspinspektroskopie oder die funktionelle Kernspintomographie (f-MRT) zur Verfügung. (Horn, 2011). Bei allen Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurde eine DSA, eine MRT und eine PET durchgeführt, bei einigen Patienten wurden zusätzlich indirekte Verfahren zur CVRC Bestimmung angewandt.

Da das angiographische Bild von MMD sehr spezifisch ist, spielt differentialdiagnostisch vor allem die Unterscheidung zwischen Moyamoya-Erkrankung und Moyamoya-Syndrom eine Rolle. Beim Moyamoya-Syndrom handelt es sich um das gleiche angiographische Bild wie bei der Moyamoya-Erkrankung (MMD), allerdings durch andere Grunderkrankungen bedingt. Besonders hervor zu heben sind hier: Neurofibromatose Typ 1, Trisomie 21, kongenitale Herzfehler, Sichelzellanämie, tuberöse Sklerose, Morbus Hirschsprung, Marfan-Syndrom, Fanconi-Anämie, Nierenarterienstenose und Hyperthyreose. Strahlentherapeutische Behandlung von Hals oder Kopf (besonders die Bestrahlung von optochiasmalen Tumoren und Kraniopharyngeomen im Kindesalter) und entzündliche Prozesse, wie Meningitiden sind weitere Faktoren die zur Ausbildung eines Moyamoya-Syndroms führen können (Horn, 2011, Smith und Scott, 2010, Horn et al., 2004).

Zur Einschätzung des Schweregrads der klinischen Symptomatik kann die National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) genutzt werden (Brott et al., 1989). Hierbei handelt es sich um eine mehrfach validierte (Muir et al., 1996, De Haan et al., 1993) Anleitung zur standardisierten neurologischen Untersuchung und einem definierten Punktesystem für neurologische Defizite. Die Skala reicht von 0 (keine neurologische Auffälligkeit) bis maximal 42 (sehr starke neurologische Beeinträchtigung) Punkte. Bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten wurde die deutsche Version der NIHSS angewandt (Berger et al., 1999), siehe Tabelle 1.

| | |
|--|---|
| Bewusstseinslage (Vigilanz) | (0) Wach , unmittelbar antwortend. (1) Benommen , aber durch geringe Stimulation zum Befolgen von Aufforderungen, Antworten/Reaktionen zu bewegen. (2) Somnolent , bedarf wiederholter Stimulation um aufmerksam zu sein, oder ist soporös und bedarf starker oder schmerzhafter Stimulation zum Erzielen von Bewegungen. (3) Koma , antwortet nur mit motorischen oder vegetativen Reflexen oder reagiert gar nicht, ist schlaff und ohne Reflexe. <i>Anmerkung: bei Koma erhält Skala 7 (Extremitätenataxie) 0 Punkte.</i> |
| Orientierung | Frage nach Monat und Alter (0) beide Fragen richtig beantwortet. (1) eine Frage richtig beantwortet. (2) keine Frage richtig beantwortet |
| Befolgung von Aufforderungen | Aufforderung die Augen und die nicht paretische Hand zu öffnen und zu schließen (0) beide Aufforderung richtig befolgt. (1) eine Aufforderung richtig befolgt. (2) keine Aufforderung richtig befolgt. |
| Blickbewegungen (Okulomotorik) | (0) Normal. (1) Partielle Blickparese = wenn die Blickrichtung von einem oder bds. Augen abnormal ist, jedoch keine forcierte Blickdeviation oder komplette Blickparese besteht (e. g. Augenmuskelparese). <i>Auch bei unzureichender Kooperation 1 Pkt.</i> (2) Forcierte Blickdeviation oder komplette Blickparese, die durch Ausführen des okulozephalen Reflexes nicht überwunden werden kann. |
| Gesichtsfeld | (0) keine Einschränkung. (1) partielle Hemianopsie. (2) komplette Hemianopsie. (3) bilaterale Hemianopsie (Blindheit oder kortikale Blindheit). |
| Fazialisparese | (0) normal. (1) gering (abgeflachte Nasolabialfalte, Asymmetrie beim Lächeln). (2) partiell (vollständige oder fast vollständige Parese des unteren Gesichts). (3) vollständig auf einer oder bds. Seiten (fehlende Bewegungen unterer und oberer Teil des Gesichts). |
| Motorik Arme getrennt für links und rechts | (0) kein Absinken (der Arm wird über 10 Sekunden in der 90°/45° Position gehalten) (1) Absinken (der Arm wird zunächst bei 90°/45° gehalten, sinkt aber im Verlauf von 10 Sek. ab) (2) Anheben gegen Schwerkraft möglich (der Arm kann die 90°/45° Position nicht erreichen oder halten, sinkt auf die Liegefläche ab, kann aber gegen Schwerkraft angehoben werden) (3) Kein (aktives) Anheben gegen Schwerkraft, der Arm fällt nach passivem Anheben sofort auf die Liegefläche. (4) Keine Bewegung. |
| Motorik Beine getrennt für beide Seiten | (1) Absinken (das Bein sinkt am Ende der 5 Sekundenperiode, berührt aber die Liegefläche nicht). (2) Aktive Bewegung gegen die Schwerkraft (das Bein sinkt in 5 s ab, kann aber gegen die Schwerkraft gehoben werden). (3) Kein (aktives) Anheben gg. die Schwerkraft, das Bein fällt nach passivem Anheben sofort auf die Liegefläche. (4) Keine Bewegung. |
| Extremitätenataxie | (1) in einer Extremität vorhanden. (2) in zwei Extremitäten vorhanden. (0) Normal; kein Sensibilitätsverlust. |
| Sensibilität | (1) Leichter bis mittelschwerer Sensibilitätsverlust; Patient empfindet Nadelstiche auf der betroffenen Seite als stumpf, oder er nimmt diese nur als Berührung wahr. (2) Schwerer bis vollständiger Sensibilitätsverlust; Patient nimmt die Berührung von Gesicht, Arm und Bein nicht wahr. (0) normal; keine Aphasie. |
| Sprache | (1) Leichte bis mittelschwere Aphasie; deutliche Einschränkung der Wortflüssigkeit oder des Sprachverständnisses, keine relevante Einschränkung von Umfang oder Art des Ausdrucks. Die Einschränkung des Sprachvermögens und/oder des Sprachverständnisses macht die Unterhaltung schwierig bis unmöglich. (2) Schwere Aphasie; die Kommunikation findet über fragmentierte Ausdrucksformen statt. Der Untersucher muss das Gesagte in großem Umfang interpretieren, nachfragen oder erraten. Er trägt im Wesentlichen die Kommunikation. (3) Stumm, globale Aphasie; Sprachproduktion oder Sprachverständnis nicht verwertbar (auch bei Koma). |
| Dysarthrie | (1) Leicht bis mittelschwer; der Patient spricht zumindest einige Worte verwaschen und kann nur mit Schwierigkeiten verstanden werden. (2) Schwer, anarthrisch; die verwaschene Sprache (0) Keine Abnormität. |
| Neglekt | (1) Visuelle, taktile, auditive oder personenbezogene Unaufmerksamkeit oder Auslöschung bei Überprüfung von gleichzeitiger bilateraler Stimulation in einer der sensiblen Qualitäten. (2) Schwere halbseitige Unaufmerksamkeit. Kein Erkennen der eigenen Hand/Orientierung nur zu einer Seite des Raumes. |

Tabelle 1: National Institute of Health Stroke Scale

Verwendete deutsche Fassung (NIH Stroke Scale, 2002)

2.1.6 Klassifikation nach Czabanka

Anhand der angiographischen Befunde kann die Moyamoya-Erkrankung in sechs Schweregrade eingeteilt werden (Suzuki und Takaku, 1969), siehe Tabelle 2. Diese Klassifikation ist allerdings rein deskriptiv und korreliert nicht mit der Schwere der klinischen Befunde. Die Klassifikation nach Czabanka betrachtet neben der DSA auch MRT Untersuchungen, also

Hinweise auf Ischämie, zerebrale Atrophie und Hirnblutungen, und als funktionalen Parameter für die zerebrovaskuläre Insuffizienz die zerebrovaskuläre Reservekapazität (Czabanka et al., 2011), siehe Tabelle 3. Alle in der hier vorgestellten Studie inkludierten Patienten wurden nach der Czabanka Klassifikation eingeteilt.

| Grad | Beschreibung | Details |
|------|--------------------------|--|
| 1 | Stenose der Karotisgabel | Stenose der ICA Bifurkation |
| 2 | Beginnende MMD | Beginnende Entwicklung der Kollateralgefäße |
| 3 | Intensivierung von MMD | Zunahme der Kollateralgefäße |
| 4 | Minimierung von MMD | Beginnende extrakranielle Kollateralisierung |
| 5 | Reduktion von MMD | Zunahme der extrakraniellen Kollateralgefäße |
| 6 | Verschwinden von MMD | Komplette Versorgung durch extrakranielle Kollateralen |

Tabelle 2: Suzuki Klassifikation

Klassifizierung des Schweregrads der Moyamoya-Erkrankung (MMD) anhand des angiographischen Bildes nach Suzuki. (Suzuki und Takaku, 1969, Gross und Du, 2013)

| Variable | Merkmale | Punkte |
|----------|---|--------|
| DSA | Stenookklusion + MMD Gefäße | 1 |
| | Stenookklusion + MMD Gefäße + intrakranielle Kompensation | 2 |
| | Stenookklusion + MMD Gefäße + extra-intrakranielle Kompensation | 3 |
| MRT | Keine Ischämie/Blutung/Atrophie | 0 |
| | Ischämie/Blutung/Atrophie | 1 |
| CVRC | Kein <i>Steal Phänomen</i> (>-5%) | 0 |
| | <i>Steal Phänomen</i> (<-5%) | 2 |

Tabelle 3: Czabanka Klassifikation

Einteilung des Schweregrades der Moyamoya-Erkrankung (MMD) nach Czabanka. Kriterien sind die digitale Subtraktionsangiographie (DSA), die Magnetresonanztomographie (MRT) und die zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC). (Czabanka et al., 2011)

2.1.7 Therapie

Ziel der Behandlung von MMD Patienten ist eine Verbesserung der zerebralen Perfusion. Hierzu gibt es verschiedene Therapieoptionen:

2.1.7.1 Medikamentöse Therapie

Zur Verbesserung des Blutflusses kann eine Thrombozytenaggregationshemmung, beispielsweise mittels Acetylsalicylsäure erfolgen. Außerdem kann versucht werden, die Perfusion mittels Kortikosteroiden, Kalziumkanalblockern oder Antifibrinolytika zu verbessern (Horn, 2011).

Unter Berücksichtigung der Pathogenese (siehe Kapitel 2.1.1) gibt es Versuche inflammatorische Faktoren, die in Zukunft eine Rolle in der Therapie spielen könnten, medikamentös zu modulieren (Young et al., 2013). Insbesondere ist hier Minocyclin-Hydrochlorid zu erwähnen, welches die MMP inhibiert. Dieser Wirkstoff verbessert als zusätzliche Therapie zu einer operativen Versorgung das neurologische Outcome (Fujimura et al., 2014). Insgesamt ist allerdings bisher die operative Therapie als die „einzig effektive Behandlung“ von MMD anzusehen (Pandey und Steinberg, 2011). Die medikamentöse Therapie spielt jedoch in der symptomatischen Behandlung, wie zum Beispiel in der antiepileptischen Therapie, eine Rolle (Horn, 2011).

2.1.7.2 Operative Therapie

Die operative Behandlung hat zwei Ziele: Zum einen soll durch eine Revaskularisierung die zerebrale Perfusion verbessert werden, zum anderen soll die Gefahr einer Blutung durch die verminderte Notwendigkeit von Kollateralgefäßen vermindert werden. Patienten, die unter dem ischämischen MMD Typ leiden, scheinen stark von einer operativen Revaskularisierung zu profitieren, bei asymptomatischen oder hämorrhagischen Patienten ist die Indikationsstellung diffiziler, es sollte eine Bestimmung der zerebralen Reservekapazität erfolgen (Horn, 2011).

Generell stehen zwei operative Techniken zur Verfügung: die indirekte und die direkte Revaskularisierung.

Bei indirekten Revaskularisierungsverfahren wird versucht die kortikale Perfusion zu fördern. Hierzu kann zum Beispiel *Dura mater* (*Encephalodurosynangiose*), *M. temporalis* (*Encephalomyosynangiose*), oder *Dura mater* mit arterieller Versorgung (*Encephaloduroarteriosynangiose*) auf die minderperfundierte Kortextbereiche aufgelegt werden. Eine andere Möglichkeit ist die autologe Transplantation des *Omentum majus* oder die Anfertigung von multiplen Bohrlochtrepationen (Baaj et al., 2009).

Bei der direkten Revaskularisierung handelt es sich um einen extra-/intrakraniellen Bypass. In den meisten Fällen handelt es sich um eine Anastomisierung zwischen einem Ast der *A. temporalis superficialis* und einem kortikalen Ast der *A. cerebri media* (STA/MCA Bypass) (Vajkoczy, 2011). Im Gegensatz zu den indirekten Verfahren erfolgt durch solch einen Bypass, eine sofortige Verbesserung der zerebralen Perfusion. Allerdings ist eine direkte

Revaskularisierung technisch wesentlich anspruchsvoller, woraus eine etwas höhere perioperative Morbidität resultiert (Horn, 2011). Hier ist jedoch zu erwähnen, dass sich die Operationstechnik in den letzten Jahren erheblich weiterentwickelt hat, wie zum Beispiel durch intraoperative Erfolgskontrollen mittels *indocyanin green* Videoangiographie (Woitzik et al., 2005), oder einer Laser-assistierten Operationsmethode, die ohne einen temporären Gefäßverschluss auskommt (*Eximer laser-assisted nonocclusive anastomosis*) (Langer et al., 2008).

Es erscheint sinnvoll direkte und indirekte Revaskularisierungsverfahren zu kombinieren, zum Beispiel im Sinne eines STA/MCA Bypasses mit zusätzlicher encephaloduromyoarterio-perikraniellen Synangiose (Kuroda und Houkin, 2012). Eine koreanische Studie zeigte, dass das kombinierte Verfahren einer alleinigen indirekten Revaskularisierung überlegen ist. Allerdings liegt hierzu bisweilen keine große randomisierte Studie vor (Kim et al., 2012).

2.1.8 Verlauf und Prognose

Ausschlaggebend für Verlauf und Prognose der MMD, sowohl für den kaukasischen, als auch für den asiatischen Typ, sind das Alter der Erstmanifestation und die Art der klinischen Symptomatik. Bei pädiatrischen Patienten wurde eine zunächst schnelle Progredienz beobachtet. Mit zunehmendem Alter scheint sich der Krankheitsprogress allerdings zu stabilisieren. Patienten, die vor dem Erreichen des fünften Lebensjahrs erkranken, haben eine ungünstige Prognose. Ohne adäquate Therapie kommt es in bis zu 34% zu einer mentalen Retardierung und in 47% der Fälle zu leichten bis mittelgradigen intellektuellen Beeinträchtigungen. Insgesamt sind 80% der pädiatrischen Patienten nach einer geeigneten Therapie nicht oder nur leicht eingeschränkt, so dass ein selbstständiges Leben möglich ist. Etwa ein Drittel der Patienten zeigen leichte neurologische Defizite, wobei 2-6% permanent hilfsbedürftig sind. Insgesamt kommt es bei einer Großzahl der erkrankten Kinder zu einer Verzögerung der psychosozialen Entwicklung und zu einer eingeschränkten körperlichen Belastbarkeit. (Horn, 2011, Horn et al., 2004).

Auch beim adulten Typ ist die Erstmanifestation ausschlaggebend. Bei Ischämie beträgt die Mortalität etwa 2,4%, bei Hämorrhagie hingegen bis zu 16,4% (Horn, 2011). Der Verlauf von ostasiatischen und kaukasischen MMD Patienten scheint sich deutlich zu unterscheiden, so spielt die Ischämie bei kaukasischen Patienten eine größere Rolle. Eine Untersuchung aus Deutschland zeigte ein prozentuales Jahresrisiko für ischämische Schlaganfälle von 80,95% (Krischek et al., 2011). Untersuchungen in den USA ergaben ein jährliches Risiko für ischämische Insulte von 13%, wobei das jährliche Blutungsrisiko bei 1,7% lag, also deutlich niedriger als in Japan, wo das jährliche Blutungsrisiko bei 6-7% liegt (Gross und Du, 2013). Eine japanische Untersuchung zeigt, dass es bei 40-50% der Patienten, welche unter dem

hämorrhagischen Typ leiden, im Verlauf zu einem permanenten neurologischen Defizit kommt (Ikezaki et al., 1997).

2.2 Endotheliale Progenitorzellen

Schon mindestens seit den 1950er Jahren ist bekannt, dass es eine Zellpopulation gibt, welche im Blut zirkulierend für eine *de novo* Endothelialisierung verantwortlich sein muss. Diese Rolle wurde zirkulierenden Endothelzellen zugeschrieben (Prater et al., 2007). 1997 gelang es erstmals eine putative Zellpopulation aus peripherem Blut zu isolieren, welche *in vitro* zu Endothel differenzierte. Außerdem wurde im Tiermodell gezeigt, dass nach autologer Implantation diese Zellen zu Ischämiefoki wandern (Asahara, 1997). Die nahezu revolutionäre Neuigkeit an dieser Zellpopulation war, dass nun eine postembryonale Vaskulogenese, also die Neuentstehung von Gefäßen durch monozytäre Zellen bei Erwachsenen, möglich erschien. Zuvor war man von einer Angiogenese in Form von hypoxieinduziertem Wachstum von neuen Gefäßen aus vorbestehenden Gefäßen ausgegangen. (Prater et al., 2007, Heil et al., 2006). Als Mechanismus dieser Neovaskulogenese wurde in diesem Modell folgendes beschrieben: zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen, also monozytäre Stammzellen, welche aus dem Knochenmark stammen, migrieren zu Angiogeneseloki, wo sie zu endothelialen Zellen differenzieren und so einen Großteil des neuen Gefäß bilden, wobei erwähnt werden sollte, dass es über die genauen Mechanismen unterschiedliche Meinungen gibt (Pearson, 2009).

2.2.1 EPC Identifikation

Zur Untersuchung von EPC stehen im Wesentlichen zwei Techniken zur Verfügung:

- 1.) Die Extraktion von mononukleären Zellen aus dem zu untersuchenden Blut und Identifikation der EPC über ihre Oberflächenproteine mittels Durchflusszytometrie. Diese Methode wurde bei dieser Arbeit angewandt und wird in Kapitel 3.2 ausführlich beschrieben.
- 2.) Die Anzucht von EPC aus mononukleären Zellen in der Zellkultur. Hierzu wurden zahlreiche unterschiedliche Methoden und Techniken beschrieben. Im wesentlichen werden –in Abhängigkeit der angewandten Methode- drei Unterformen der EPC genannt: Die ursprünglich beschriebenen Zellen, welche im Tierversuch zu einer postnatalen Vaskulogenese führten, werden als *colony-forming-unit Endothelzellen*, oder auch als *colony-forming-unit Hill Zellen* (Prater et al., 2007, Asahara, 1997, Hill et al., 2003) bezeichnet. Die andere Unterform ähnelt der ersten in Funktion, hat aber in der Zellkultur keine Kolonie-formenden Eigenschaften und wird auch als *circulatingangigenic-Zellen* (Prater et al., 2007, Dimmeler et al., 2001) bezeichnet. Diese beiden Unterarten werden aufgrund

des raschen Wachstums in der Zellkultur auch als *early outgrowth* EPC bezeichnet. Die dritte Unterart, welche langsamer wächst und somit auch als *late outgrowth* EPC bezeichnet wird, besteht aus *endothelial-colony-forming-Zellen*. Diese Zellen lassen sich nicht mehr von kultivierten Endothelzellen unterscheiden und werden mit der *de novo* Vaskulogenese in Verbindung gebracht (Prater et al., 2007, Lin et al., 2000, Ingram et al., 2004).

2.2.2 Oberflächenproteine von EPC

Für die oben angesprochene erste Methode zur EPC-Identifizierung aus peripherem Blut erfolgt die durchflusszytometrische Untersuchung von mononukleären Zellen. Hierfür ist es nötig eine genau definierte Kombination von Oberflächenproteinen festzulegen, an die -an Farbstoffe gekoppelten- spezifischen Antikörper binden. Seit Beginn der EPC-Forschung konnte man sich in den Fachkreisen noch nicht auf eine Definition einigen. Die generelle Herausforderung bei der durchflusszytometrischen EPC-Identifizierung besteht darin, dass die Spezifität der Bestimmung mit zunehmender Anzahl unterschiedlicher Oberflächenmarker zunimmt, gleichzeitig allerdings die Anzahl an Messungen und somit auch die Anzahl an Fehlerquellen steigt. Folgende Oberflächenproteine werden häufig zur EPC-Identifizierung genutzt:

- 1.) *CD34*: auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert
- 2.) *CD45*: auch *protein tyrosine phosphatase receptor type C* oder *leucocyte common antigen*, wird auf allen Leukozyten exprimiert
- 3.) *CD133*: auf hämatopoetischen Stammzellen und auf EPC exprimiert (Corbeil et al., 2000). Auch auf glialen Stammzellen und Tumoren exprimiert
- 4.) *CD105*: auch *Endoglin*, wird auf Endothel exprimiert, starke Expression während der Angiogenese
- 5.) *VEGFR-2*: einer der Rezeptoren des *vascular endothelial growth factor*. Wird auf Endothel exprimiert, stimuliert Monozytenmigration
- 6.) *CD31*: auf Endothel, Monozyten, Thrombozyten und Granulozyten exprimiert, dient der Steuerung der Leukozyten-Transmigration.
- 7.) *Tie-2*: *Angiopoietin Rezeptor 2*, auf Endothel exprimiert siehe Abbildung 2-1
- 8.) *VE-cadherin*: Adhäsionsprotein auf Endothel exprimiert
- 9.) *CD146*: Adhäsionsprotein auf Endothel exprimiert

Diese Proteine werden in verschiedenen Kombinationen als Marker für humane zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (cEPC) genutzt, wobei hier nur die häufigsten verwendeten Oberflächenmoleküle beschrieben sind, in der Literatur finden sich auch andere

Oberflächenmoleküle (Timmermans et al., 2009). Die als erstes von Asahara beschriebenen Zellen waren CD34 und VEGFR-2 positiv und exprimierten außerdem CD45, CD31 und Tie-2 (Asahara, 1997, Asahara et al., 1999). In den folgenden fast 20 Jahren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen diverse unterschiedliche Oberflächenproteinkombinationen vorgeschlagen. Besonders häufig wurden folgende Kombinationen verwendet:

- 1.) CD133⁺, CD34⁺, VEGFR-2⁺ (Prater et al., 2007, Rafat et al., 2009)
- 2.) CD34⁺, CD133⁺, CD45⁺ (Martin et al., 2008)
- 3.) CD34⁺, CD45⁺, CD146⁺ (Delorme et al., 2005)
- 4.) CD34⁺, CD133⁺, VEGFR-2⁺, CD45⁺ (Kondo et al., 2004)
- 5.) CD133⁺, CD34⁺, CD45^{low}, CD31⁺ (Duda et al., 2007)

2.2.3 Endotheliale Vorläuferzellen in der Moyamoya-Erkrankung

Da bei der Moyamoya-Erkrankung die Angiogenese der Kollateralgefäße ein zentraler Punkt ist, haben verschiedene Arbeitsgruppen EPC bei MMD Patienten untersucht. Diese Vorläuferzellen sind bei MMD besonders interessant, da die herausragende Einzigartigkeit von MMD wie oben beschrieben die Neubildung der Kollateralgefäße ist. EPC scheinen für eben solche angiogenetische Prozesse von zentraler Bedeutung zu sein (siehe Kapitel 2.2).

Eine koreanische Arbeitsgruppe hat mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PB-MNC) kultiviert, hierbei zeigte sich, dass bei MMD Patienten die Anzahl an Kolonie-formenden Einheiten deutlich geringer war als in der Kontrollgruppe. Außerdem konnten bei signifikant mehr MMD Patienten *outgrowth* Zellen isoliert werden (Jung et al., 2008). Eine japanische Publikation beschreibt eine erhöhte Zahl zirkulierender CD34 positive Zellen, welche als Subgruppe der EPC bezeichnet werden, bei MMD Patienten (Yoshihara et al., 2008). Eine weitere koreanische Untersuchung von EPC bei Kindern mit MMD zeigte eine niedrigere EPC-Zahl, sowie eine gestörte EPC-Funktion, als in der Kontrollgruppe. Als EPC wurden in dieser Arbeit CD34⁺, CD133⁺ und VEGFR-2⁺ Zellen bezeichnet (Kim et al., 2010).

Eine der Grundlagen dieser Arbeit sind die Untersuchungen einer Mannheimer Arbeitsgruppe. Diese konnte eine signifikant höhere Zahl an zirkulierenden EPC bei Patienten mit MMD, als bei gesunden Kontrollen oder Patienten mit ACVD nachweisen. Auch diese Gruppe definierte EPC als CD34⁺, CD133⁺ und VEGFR-2⁺ Zellen (Rafat et al., 2009).

2.3 Angiopoietine

Weitere für die Angiogenese wichtige Faktoren sind die Angiopoietine. Hierbei handelt es sich um Liganden des *tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2* (Tie-2)

Rezeptors. Dies ist eine Rezeptor Tyrosinkinase, welche auch als *TEK receptor tyrosine kinase* bekannt ist und fast ausschließlich auf Endothelzellen auftritt.

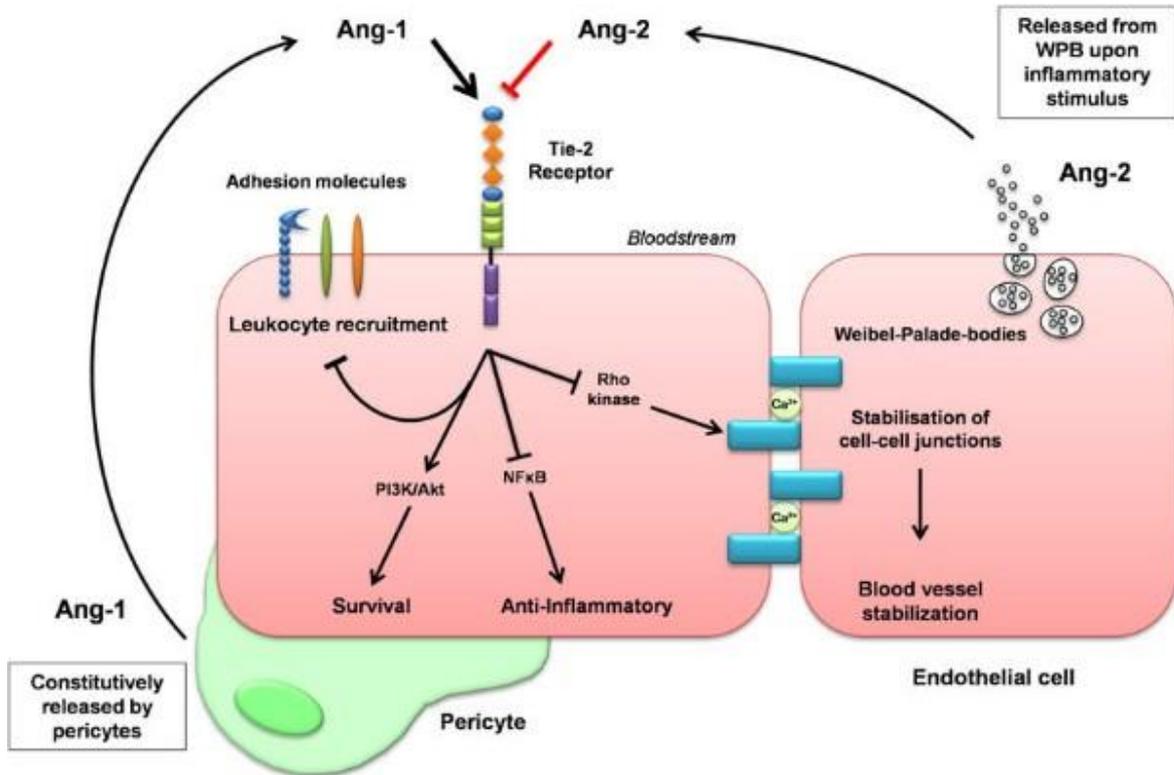


Abbildung 2-1: Angiopoietin Tie-2 System

Schematische Darstellung der Signaltransduktion des Tie-2 Rezeptors. Angiopoietin 1 (Ang-1) ist Agonist, Angiopoietin 2 (Ang-2) wirkt als kompetitiver Antagonist. WPB: Weibel-Palade-bodies. (Kümpers, 2007)

Angiopoietin 1 (Ang-1) ist ein direkter Agonist des Tie-2 Rezeptors (Davis et al., 1996). Ang-1 wird in Perizyten produziert und kontinuierlich freigesetzt. Aktivierung des Tie-2 Rezeptors führt zu einer Stabilisierung des Endothels unter anderem über eine Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte. Angiopoietin 2 (Ang-2) ist ein kompetitiver Antagonist des Tie-2 Rezeptors, welcher in sogenannten *Weibel-Palade-bodies* in Endothelzellen produziert und stimulusgesteuert ausgeschüttet wird. (siehe Abbildung 2-1). Die Inhibition des Tie-2 Rezeptors bewirkt zunächst eine Destabilisierung des Endothels, welche zu einer Gefäßregression führen kann. Allerdings sind Endothelzellen, bei denen durch die Ang-2 gesteuerte Tie-2 Inhibition die Zell-Zell-Kontakte lockerer sind um ein vielfaches sensibler für VEGF. Daraus resultiert, dass die Wirkung von Ang-2 in Kombination mit VEGF deutlich angiogenesefördernd ist. Dabei ist zu beachten, dass hier nicht nur die einzelnen biochemischen Faktoren, sondern vor allem ihr Verhältnis zu einander ausschlaggebend ist (Maisonpierre et al., 1997, Karamysheva, 2008). So wurde zum Beispiel postuliert, dass sich das Ang-1 zu Ang-2 Verhältnis während der Schwangerschaft verändert (Hurliman et al., 2010). Ein erhöhtes Ang-2 zu Ang-1 Verhältnis bei unterschiedlichen Tumorentitäten (unter anderem auch bei hirneigenen Tumoren) korreliert mit

Tumorangiogenese, Malignität und damit auch schlechterer Prognose (Fagiani und Christofori, 2013). Einen weiteren Einfluss auf zerebrovaskuläre Pathologien hat das Angiopoietin/Tie-2-System im Bereich der Vasospasmen nach aneurysmatischer Subarachnoidalblutung. Es zeigten sich deutlich niedrigere Ang-1 Konzentrationen bei Patienten nach Subarachnoidalblutung als bei gesunden Kontrollen, wobei die Ang-2 Konzentration unverändert bleibt. Dieser Effekt war bei Patienten, bei denen es im weiteren Krankheitsverlauf zu Vasospasmen kam, wesentlich stärker, sodass postuliert wurde, dass die -aus dem zugunsten von Ang-2 verschobene Faktorenverhältnis- verminderte Gefäßintegrität eine Rolle bei der Pathogenese der Vasospasmen spielt (Fischer et al., 2011).

In vitro Untersuchungen der Angiopoietine zeigten, dass sowohl Ang-1 als auch Ang-2, wenn auch in deutlich geringeren Maß als Ang-1, den Tie-2 Rezeptor aktivieren (Teichert-Kuliszewska et al., 2001). Dies untermauert die Aussage, dass die Ang-2 Wirkung stark von anderen biochemischen Faktoren abhängig ist.

Für diese Arbeit besonders interessant sind die Ergebnisse einer koreanischen Arbeitsgruppe, welche die angiogenetische Aktivität von Ang-2 bei EPC untersucht hat. Es zeigt sich, dass Ang-2 bei EPC –im Gegensatz zu reifen Endothelzellen- eine proangiogene Wirkung hat. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der Tie-2 Rezeptor durch Tie-1 (ein Rezeptor ohne bekannten Liganden) so moduliert wird, dass es durch Binden von Ang-2 an den Tie-2/Tie-1 Rezeptorkomplex zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade kommt (Kim et al., 2006).

Da es sich bei MMD um eine angiogene Erkrankung handelt ist die Rolle von Angiopoietinen von größtem Interesse. Zum Zeitpunkt der Planung dieser Studie lagen noch keine Untersuchungen vor, welche Angiopoietine bei MMD Patienten untersucht haben.

2.4 Atherosklerotische zerebrovaskuläre Erkrankung

Bei der atherosklerotischen zerebrovaskulären Erkrankung (ACVD) handelt es sich um eine vaskuläre Pathologie, die eine Minderperfusion des Gehirns zur Folge hat, was sich zum Beispiel in Form von Schlaganfällen oder transitorisch ischämische Attacken (TIA) darstellt (Heyden und Gerber, 1969). Bis 1985 war der extra-intrakranielle Bypass eine geläufige Therapie, was sich dann allerdings aufgrund der negativen Ergebnisse der „Bypassstudie“ änderte (Failure of extracranial-intracranial arterial bypass to reduce the risk of ischemic stroke. Results of an international randomized trial. The EC/IC Bypass Study Group, 1985). Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass Patienten mit einer hämodynamischen Einschränkung, etwa durch eine

hochgradige Stenose und konsekutiver Reduktion des zerebralen Perfusionsdruckes durchaus durch einen STA-MCA Bypass profitieren (Vajkoczy, 2011).

ACVD Patienten eignen sich besonders gut als Kontrollgruppe, da sie im Gegensatz zu Gesunden (oder auch Schlaganfall-Patienten) nicht nur sehr ähnliche Symptome haben, sondern ebenfalls mittels Bypass therapiert werden, sich die angiogene Aktivität deutlich von MMD Patienten unterscheidet (Czabanka et al., 2014).

Hierbei muss erwähnt werden, dass große randomisierte Studien, welche während der Bearbeitungszeit der vorliegenden Studie veröffentlicht wurden die Indikation zur operativen Therapie von ACVD Patienten stark einschränkte (Kataoka et al., 2015, Rodriguez-Hernandez, Josephson und Lawton, 2012).

2.5 Fragestellung

Unter der Hypothese, dass sich die Notwendigkeit der Neoangiogenese nach erfolgter operativer Revaskularisierung bei Patienten mit Moyamoya-Erkrankung ändert, ergibt sich folgende Fragestellung für diese Arbeit: Eignen sich endotheliale Vorläuferzellen oder Angiopoietine als Verlaufsp Parameter im prä- und postoperativen Krankheitsverlauf von Patienten mit Moyamoya-Erkrankung?

2.5.1 Definitionen der Zielp Parameter

2.5.1.1 Hauptzielp Parameter

Bestimmung der peripheren Blutbahn zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (EPC) und die Angiopoietine 1 und 2 (Ang-1, Ang-2) vor therapeutischer Intervention, nach Revaskularisierung der ersten Hemisphäre und nach Revaskularisierung der zweiten Hemisphäre.

2.5.1.2 Nebenzielp Parameter

Zur Schweregradeinschätzung der klinischen Symptomatik wurde die deutsche Version der NIHSS genutzt (Brott et al., 1989). Zur Einschätzung des Schweregrades der Moyamoya-Erkrankung wurde die Czabanka-Klassifikation verwendet.

Zudem wurde die Medikation, insbesondere die Einnahme von Statinen, sowie Besonderheiten im klinischen Verlauf erhoben.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| | |
|-----------------------------|--|
| Absaugpumpe | Bechergläser verschiedene Größen |
| Blotkammer für Western Blot | Eppendor fzentrifuge |
| FACS | Gelkammer |
| Glasplatten für SDS Gel | Mikroliterpipette, 20µl; 100µl; 1000µl |
| Pipettierhilfe | Zentrifuge |

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|-------------------------------------|
| Butterfly Kanüle | EDTA Vacutainer, 6 ml |
| Eppendorf-Reaktionsgefäß, 0,5ml; 1,5ml | FACS Reaktionsgefäß |
| Glaspipetten, 2ml; 5ml; 10ml; 20ml | Kamm, 10 für Taschen, für SDS Gel |
| Kanüle, 18 Gauge | Mikrotiterplatte, 96 Wells |
| Pipettenspitze 20µl; 100µl; 1000µl | Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran |
| Preseparation Filter | Schwamm für Proteintransfer |
| Whatman-Filterpapier | Zentrifugenröhrchen 25ml, 50ml |

3.1.3 Chemikalien

| | |
|------------------------------|---|
| Aceton | Acrylamid/Bisacrylamid |
| Ammoniumperoxidisulfat (APS) | Bicinchoninsäure (BCA) |
| Beta-Mercaptoethanol | Methanol |
| bovines Serumalbumin (BSA) | Bromphenolblau |
| Casein | Coomassie-Brilliant-Blue R250 |
| Destilliertes Wasser | Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) |
| Ethanol | Glycerin |
| Kaliumchlorid (KCl) | Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) |
| Natriumchlorid (NaCl) | Natriumlaurylsulfat (SDS) |

| | |
|--|---|
| Polysorbat 20 (<i>Tween 20</i> , T) | Ponceau S |
| Proteaseinhibitor, Single Use, Halt™ | Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), 2N |
| SeeBlue® Pre-Stained Standard, novex ® | Tetramethylbenzidin, R&D Systems |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Tris(hydroxymethyl)-aminometha |
| Triton X-100 (Octoxinol 9) | Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) |

3.1.4 Puffer

Lysepuffer zur Proteinaufarbeitung pH 8,0 (200ml):

1,75g NaCl (Endkonzentration 150mM), 2ml 1% Triton X-100 (Octoxinol 9), 1,21g TRIS (Endkonzentration 50mM), ad 200ml mit dd H₂O

Lämmli-Probenpuffer (x2) pH 6,8:

Bio-Rad

65,8mM TRIS-HCl, 2,1% SDS, 26,3% Glycerol, 0,01% Bromphenolblau

Direkt vor Anwendung wurden 950µl des Puffers mit 50µl beta-Mercaptoethanol gemischt

Elektrophoresepuffer pH 8,3:

30g TRIS, 144g Glycin, 10g SDS ad 1000ml dd H₂O

Transferpuffer:

200ml Methanol, 4g TRIS-HCl pH 7,6; 14,4g Glycin, 0,03% SDS ad 1000ml dd H₂O

TBS/T:

100ml 10x TBS, 1ml Tween 20, ad 1000ml mit dd H₂O

PBS für ELISA pH 7,2-7,4 (sterilfiltriert)

137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄

Waschpuffer für ELISA pH 7,2-7,4

0,05% Tween 20 in PBS

Reagent Diluent für ELISA

1% BSA in PBS

3.1.5 Kits

BCA Protein Assay Reagent

Pierce

BCA Reagent A (BCA und Tartat in alkalischem Carbonatpuffer)

BCA Reagent B (4%ige Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat-Lösung)

Albumin Standardampullen

ECL Western Blotting Substrate Pierce

Detection Reagent 1 (Peroxislösung)

Detection Reagent 2 (Luminol Verstärker Lösung)

3.1.6 SDS-Polyacrylamid-Gele

10ml 10% SDS-PAGE (Trenngel):

4,1ml destilliertes Wasser, 3,3 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (Verhältnis 37,5:1), 2,5ml TRIS-HCl (150mM; pH8,8), , 0,1ml 10% SDS, 50µl 10% APS, 10µl 99% TEMED

10ml 5% SDS-PAGE (Sammelgel):

5,7ml destilliertes Wasser, 1,7 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (Verhältnis 37,5:1), 2,5ml TRIS-HCl (150mM; pH8,8), 0,1ml 10% SDS, 50µl 10% APS, 10µl 99% TEMED

Die Gellösungen wurden wie oben beschriebenen gemischt und in die vorbereitete Gelapparatur gegossen. Die Probestaschen wurden mit einem 10-taschigen Kamms ausgespart. Nach der Polymerisation wurde der Kamm unter Wasser entfernt und das Gel in eine Laufkammer gespannt, welche mit Elektrophorese-Puffer aufgefüllt wurde (Abbildung 3-5).

3.1.7 ELISA Sets

Human Angiopoietin-1 DuoSet R&D Systems

Capture Antibody (anti-humanes Ang-1 Maus IgG)

Detection Antibody (biotinyliertes anti-humanes Ang-1 Ziegen IgG)

Standardreihe (rekombinantes humanes Ang-1)

Streptavidin (Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase)

Human Angiopoietin-2 DuoSet R&D Systems

Capture Antibody (anti-humanes Ang-2 Maus IgG)

Detection Antibody (biotinyliertes anti-humanes Ang-2 Maus IgG)

Standardreihe (rekombinantes humanes Ang-2)

Streptavidin (Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase)

3.1.8 Antikörper

3.1.8.1 FACS

Anti-CD34-Antikörper gekoppelt mit PerCP:

Becton-Dickinson Bestellnummer 340430

Anti-CD133-Antikörper gekoppelt mit PE:

Miltenyi Biotec Bestellnummer 130-090-853

Anti-CD45-Antikörper gekoppelt mit FITC:

BD Pharmingen Bestellnummer 555482

Anti-CD105-Antikörper gekoppelt mit APC:

BioLegend Bestellnummer 323208

3.1.8.2 Western Blot

Anti-Ang1-Antikörper

Abcam

Anti-Ang2-Antikörper

Abcam

Anti-Tie2-Antikörper

Abcam

3.2 Methoden

3.2.1 Patienten

In die Studie wurden Moyamoya Patienten (> 18 Jahre), die mittels operativer Revaskularisierung therapiert wurden, aufgenommen. Grundvoraussetzung für die Aufnahme in die Studie war, dass bei diesen Patienten keine anderen gravierenden Erkrankungen bekannt waren. Details siehe Tabelle 6.

3.2.1.1 Diagnostik und Therapie

Alle in die vorliegende Studie inkludierten Patienten wurden in die Klinik für Neurochirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin am Campus Virchow Klinikum aufgenommen. Es folgten, wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben, umfangreiche Maßnahmen zur Diagnosestellung. Nach Indikationsstellung wurde die Operation geplant und immer vom selben Operateur (Prof. Dr. med. P. Vajkoczy) ausgeführt. Danach wurden die Patienten ihren Bedürfnissen entsprechend für einige Tage auf der Neurointensivstation engmaschig überwacht und nach Sicherstellung der kardiopulmonalen und neurologischen Stabilität auf eine neurochirurgische Normalstation verlegt.

Zur Überprüfung des Revaskularisierungserfolges erfolgte unmittelbar nach der Operation zunächst eine CT-Angiographie, nach einigen Tagen eine DSA. Um eine Restenosierung zu vermeiden wurde eine lebenslange medikamentöse Therapie mit Acetylsalicylsäure (im Regelfall 100 mg, einmal täglich) begonnen. Die Thrombozytenfunktion wurde standardmäßig (im Regelfall über die *in vitro* Blutungszeit mittels *Platelet Function Analyzer* (PFA)-100) überprüft und die Dosierung gegebenenfalls angepasst.

Drei Monate postoperativ wurde eine Kontrollangiographie durchgeführt und gegebenenfalls die zweite Hemisphäre äquivalent zur ersten Hemisphäre operativ versorgt. Weitere Kontrollangiographien erfolgten in zunächst drei-, dann sechs- und dann zwölfmonatigen Abständen.

3.2.1.2 Einverständniserklärung

Allen Patienten wurde im Verlauf der präoperativen Diagnostik ein ausführlicher Aufklärungsbogen mit Informationen über Risiken, Art und Ziel der Studie ausgehändigt, sie wurden mündlich über die Freiwilligkeit der Teilnahme, datenrechtliche Gegebenheiten und individuelle Fragen aufgeklärt. Es wurde darauf hingewiesen, dass ein Ausscheiden aus der Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Auswirkung auf den weiteren Behandlungsverlauf möglich ist. Das Einverständnis wurde durch Unterschrift dokumentiert.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin bewilligt und entspricht den Anforderungen der Deklaration von Helsinki für medizinische Forschung an Menschen. Die Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden eingehalten.

3.2.2 Kontrollgruppen

3.2.2.1 Gesunde Kontrolle

Eine Kontrollgruppe bestand aus gesunden erwachsenen Freiwilligen. Nach Aufklärung und Einverständniserklärung an der Teilnahme wurde den Probanden entsprechend den Patienten Blut abgenommen und dieses aufgearbeitet. Klinische Daten wurden nicht erhoben, Details siehe Tabelle 5 und Tabelle 6.

3.2.2.2 ACVD Kontrolle

Die zweite Kontrollgruppe bestand aus Patienten mit akuter zerebrovaskulärer Erkrankung (ACVD), welche einer operativen Revaskularisierung unterzogen wurden. Bei diesen Patienten wurden die gleichen diagnostischen Maßnahmen wie bei MMD Patienten vorgenommen, die Teilnahme an der Studie, Therapie und stationärer Verlauf verliefen, unter Anpassung an individuelle Gegebenheiten, äquivalent, Details siehe Tabelle 5 und Tabelle 6.

3.2.3 Untersuchungs- und Behandlungsablauf

Die Patienten wurden wie oben geschildert operativ versorgt, der Revaskularisierungserfolg überprüft und gegebenenfalls die zweite Hemisphäre operativ versorgt.

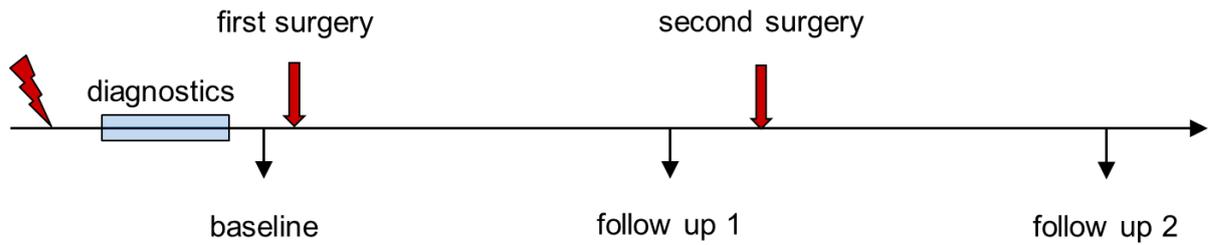


Abbildung 3-1: zeitlicher Verlauf der Studie

Der Blitz markiert den Erkrankungsbeginn. Die von oben kommenden roten dicken Pfeile markieren den Zeitpunkt der Operation von erster und zweiter Hemisphäre, die schwarzen dünnen Pfeile die Messzeitpunkte.

Die Probengewinnung und Datenerhebung (Abb. 3-1) für die Studie erfolgte unmittelbar präoperativ (*baseline*), zum Zeitpunkt der zweiten Kontrollangiographie, also circa drei Monate postoperativ, (*follow up 1*) und – bei Operation der zweiten Hemisphäre – circa drei Monate nach der zweiten Operation (*follow up 2*).

3.2.4 Blutentnahme

Zur Bestimmung von cEPC und Angiopoietinen wurde venöses Blut genutzt, das nach Standardmethoden (möglichst im Rahmen von Routineblutentnahmen) genommen, in drei mit EDTA vorbehandelte 6ml Vacutainer gefüllt, sofort gekühlt und chiffriert wurde.

3.2.5 Blutaufarbeitung

3.2.5.1 Biocoll Gradientenzentrifugation

50ml Zentrifugenröhrchen wurden mit 10ml Biocoll befüllt. Danach wurde das Patientenblut mit Hilfe einer 10ml Glaspipette vorsichtig aufgeschichtet und in der Zentrifuge bei 2000 rpm für 20 min zentrifugiert, die Bremsfunktion der Zentrifuge war zur Aufrechterhaltung des Gradienten inaktiviert. Aufgrund ihrer Dichte werden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMNC) im Biocollgradienten von den restlichen Blutzellen (vor allem Erythrozyten) getrennt, das Serum liegt über den Zellschichten. So bilden sich im Röhrchen folgende Banden: Serum, PBMNC, Biocoll und darunter die verbleibenden Zellen (siehe Abbildung 3-2).

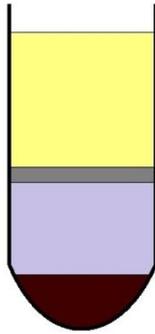


Abbildung 3-2: Biocoll Gradientenzentrifugation

Schema der Bicolldichtegradientenzentrifugation von venösem Blut: Die Banden von oben nach unten: Serum (gelb), periphere mononukleäre Blutzellen (PBMNC, dunkelgrau), Biocoll (hellgrau), restliche Blutzellen (rot).

3.2.5.2 Serumabtrennung

Nach der Zentrifugation wurde das Serum quantitativ abgenommen, in 1,5ml Aliquots sofort eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.2.5.3 PBMNC-Präparation

Die PBMNC-Bande wurde abgenommen und in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt, der Rest wurde verworfen. Die PBMNC-Suspension wurde im doppelten Volumen Puffer (0,5% BSA in PBS pH 7,4) aufgenommen und für 10min bei 4°C und 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet aus PBMNC mit 2ml 0,5% BSA in PBS resuspendiert und mit 2ml Puffer nachgespült. Das Suspendat wurde mit einem *preseparation Filter* von Debris getrennt und in einem 10ml Zentrifugenröhrchen auf Eis gelagert.

3.2.6 PBMNC-Färbung

Drei 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden mit je $600\mu\text{l}$ PBMNC-Suspendat befüllt und für 6min bei 4°C und 2400rpm zentrifugiert und wie folgt aufgeteilt:

- Patientencode und *All* für die zu färbenden Zellen
- Patientencode und *Iso* für die Isotypenkontrolle
- Patientencode und *No Stain* für die Negativkontrolle

3.2.6.1 Vorbereitung der Färbereagenzien:

Vor der Zellfärbung wurden zwei Färbungsreagenzien als Mastermix angesetzt:

- $10\mu\text{l}$ an Peridin-Chlorophyll-Protein Komplex (PerCP) gekoppelte anti-CD34-Antikörper ($\alpha\text{CD34 AK PerCP}$)
- $10\mu\text{l}$ an Phycoerythrin (PE) gekoppelte anti-CD133-Antikörper ($\alpha\text{CD133 AK PE}$)

- 10µl an Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC) gekoppelte anti-CD45-Antikörper (α CD45 AK FITC)
- 20µl an Allophycocyanin (APC) gekoppelte anti-CD105-Antikörper (α CD105 AK APC)
- 50µl 0,5% BSA in PBS

Für die Isotypenkontrolle bestand der Mastermix aus an die gleichen Farbstoffe gekoppelten unspezifischen Gammaglobulin (IgG) Antikörpern, nämlich: 10 µl anti-PE, 10 µl anti-PerCP, 10 µl anti-APC, 10 µl anti-FITC sowie 60 µl 0,5% BSA in PBS je Patientenprobe.

3.2.6.2 Färbung

Durch die Zentrifugation bildete sich in den Reaktionsgefäßen mit PBMNC (*All, Iso, No Stain*) ein Zellpellet. Der Überstand wurde mit einer 18 Gauge Kanüle abgesaugt und die Pellets im entsprechenden Mastermix resuspendiert:

- *All* mit 100µl mit dem spezifischen, an FACS-Farbstoffe gekoppelten Antikörper-Mastermix
- *Iso* mit 100µl Isotypenkontrolle-Mastermix
- *No Stain* mit 100µl 0,5% BSA in PBS.

Die Reaktionsgefäße wurden 40min auf Eis lichtgeschützt inkubiert.

3.2.6.3 Waschschritte

Um ungebundene Antikörper zu entfernen wurden nach der Färbung zu jedem Ansatz 1ml 0,5% BSA in PBS pipettiert und anschließend bei 4°C und 2400rpm für 6min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets in 300µl 0,5% BSA in PBS resuspendiert. Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt und unverzüglich im FACS analysiert.

3.2.7 FACS

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist eine Methode zur Detektion spezifischer Zelloberflächenmoleküle. Damit können über die Kombination bestimmter

Oberflächenmoleküle Zellen eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 3-3).

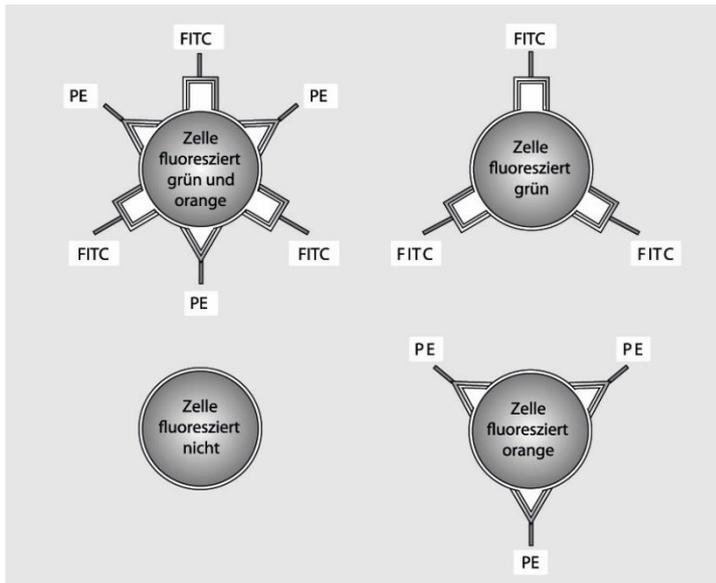


Abbildung 3-3: Zellmarkierung

Oberflächenantigene. Spezifische Antikörper können mit Antigenen auf der Oberfläche von Zellen reagieren. Mit Hilfe von Zweitantikörpern, die gegen die Erstantikörper gerichtet sind und an die ein fluoreszierender Farbstoff gekoppelt ist, kann man einzelne Proteine auf der Oberfläche einer Zelle nachweisen. Die Abbildung zeigt Zellen, die kein Oberflächenantigen tragen, das mit einem der angebotenen Antikörper reagieren kann, und Zellen, die mit einem der beiden Antikörper reagieren können, sowie Zellen, die beide Antikörper binden können. Die fluoreszierenden Farbstoffe sind FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) und PEC (Phycoerythrin). (Schenkel, 2006)

Die Zellen werden in einer Kapillare einzeln an verschiedenen Lasern mit definierten Wellenlängen vorbeigeführt, dabei können Größe und Granularität (*forward/sideward scatter*) und fluoreszierende Farbstoffe, welche Laserlicht mit entsprechender Wellenlänge ablenken, durch die Veränderung des Signals detektiert werden (Chattopadhyay, Hogerkorp und Roederer, 2008, Chattopadhyay und Roederer, 2012, Picot et al., 2012) (Abbildung 3-4). Werden diese Farbstoffe an ein für ein Oberflächenmolekül spezifischen Antikörper gekoppelt können damit die entsprechenden Trägerzellen quantifiziert werden (Givan, 2011).

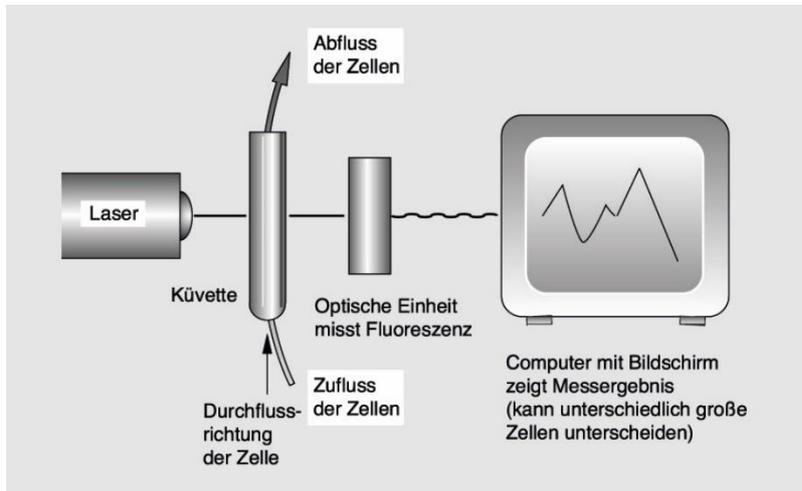


Abbildung 3-4: FACS

Durchflusszytometrie. Zellen, die wie in Abbildung 3-3 gezeigt, angefärbt wurden, können mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert werden. Die angefärbten Zellen werden durch eine Küvette gepumpt, in der diese mit Laserlicht bestrahlt werden. Entsprechend der Fluoreszenz der Antikörper geben diese Zellen spezifische Fluoreszenzsignale ab, die anschließend analysiert werden können. (Schenkel, 2006)

3.2.7.1 Kontrollen

Zum Nachweis der spezifischen Bindung des Farbstoff-gekoppelten Antikörpers an das entsprechende Oberflächenantigen wird eine Isotypenkontrolle durchgeführt: Eine parallele Probe wird mit Antikörpern inkubiert, die mit den gleichen Farbstoffen gekoppelt sind, aber keine spezifische Bindung eingehen können. Wird das Isotypensignal vom Signal der zu untersuchenden Probe subtrahiert so werden nur die Signale erfasst, die spezifisch sind (Stewart und Stewart, 2004). Von jeder Probe wurde eine Isotypenkontrolle angefertigt.

Als weitere Kontrolle wurde von jeder Probe zusätzlich ein ungefärbtes Zellsuspendat gemessen um eine Fehlkalibrierung des FACS-Geräts auszuschließen.

Die Membranintegrität der präparierten Zellen wurde mit einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbung nachgewiesen. DAPI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an DNA bindet, wofür eine Diffusion durch die Zellmembran notwendig ist. DAPI eignet sich als Marker für Zellen, deren Zellmembran beschädigt ist, da DAPI dann die Membran schnell passieren kann (Bertho, Santiago und Coutinho, 2000).

Die wie oben beschrieben gefärbten und aufgearbeiteten Patientenproben wurden in ein FACS-Reaktionsgefäß überführt, das Färbegefäß wurde mit 300µl 0,5% BSA in PBS nachgespült. Die Zellproben wurde mit einem Labormixer („Vortex“) sorgfältig resuspendiert und zur FACS-Analyse mit der geräteseitigen Saugkapillare aspiriert. Zunächst wurde die ungefärbte Probe gemessen, dann die gefärbte Probe und schließlich die Isotypenkontrolle. Das Kalibrieren, das

Gating (siehe Abbildung 4-1, Abbildung 4-2, Abbildung 4-3, Abbildung 4-4) sowie die gesamte Zellaufarbeitung erfolgte mit Anpassungen auf Basis des Protokolls von Duda (2007).

3.2.8 FACS-Datenanalyse

Die durch den Zellsorter in der Fluoreszenz gewonnenen Daten wurden mit der Software FlowJo analysiert. Zunächst wurden die Zellen nach Größe und Granularität mittels vorwärts- und seitwärts-Scatter sortiert dargestellt, die mononukleären Zellen markiert und quantitativ bestimmt (Duda et al., 2007). Aus dieser Zellpopulation („*cells*“) wurden alle Zellen, welche CD34 und CD133 positiv, sowie CD45 niedrig positiv waren, ausgewählt und als zirkulierende vorläuferzellartige Zellen identifiziert. Von den cEPC wurden jene Zellen selektiv betrachtet, die zusätzlich das CD105 Oberflächenantigen trugen.

3.2.9 Proteinfällung aus dem Serum

Aus dem wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben aus dem EDTA – Blut der Patientenproben erhaltenen Serum wurden Proteine präpariert: Um hydrophile Proteine wie die Angiopoietine 1 und 2 (Witzenbichler et al., 1998) zu quantifizieren wurde das Serum mit Aceton im Verhältnis 1:4 oder mit Methanol im Verhältnis 1:1 versetzt, sorgfältig gemischt (Zellner et al., 2005), bei -20°C für mindestens 15min gefällt und mit einer Zentrifugation (10min, 10 000rpm) präzipitiert. Das Proteine enthaltende Pellet wurde in Lysepuffer (2ml mit Proteaseinhibitor [Halt™, Single-Use] 1:100) resuspendiert.

3.2.10 Quantitative Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der optimalen Menge für die weitere Analyse wurde die Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure (BCA) quantifiziert: Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde in jede 96-Loch-Mikrotiterplatte die im BCA Protein Assay Reagent Kit enthaltene standardisierte Albuminlösung in sechs Verdünnungen (2000µg/ml, 1500µg/ml, 1000µg/ml, 750µg/ml, 500µg/ml und 0µg/ml jeweils zweimal pipettiert. In die restlichen *Wells* wurden die Proteinlysate der Patientenproben in verschiedenen Verdünnungen gegeben, je *Well* 10µl Probe.

BCA Reagent A (BCA und Tartar in alkalischem Carbonatpuffer) und BCA Reagent B (4%ige Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat-Lösung) wurden im Verhältnis 49:1 gemischt, in jedes *Well* wurden 190µl des Gemischs pipettiert und im Dunkeln für 30min bei 37°C inkubiert.

Die eigentliche Proteinquantifizierung erfolgte photometrisch über eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 562nm im Photometer. Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes an Hand der Albumin-Eichkurve

berechnet. Die so ermittelten Probenkonzentrationen entsprachen einer 1:50 Verdünnung für Ang-1 und unverdünnt für Ang-2.

3.2.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Western Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine. Dabei werden Proteine in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt und auf eine Membran transferiert, auf der sie dann mittels Antigen-Antikörperreaktionen detektiert werden (Towbin, Staehelin und Gordon, 1979, Jung, Sekeris und Schenkel, 1998) (Abbildung 3-5). Eine Quantifizierung ist mit dieser Technik nur sehr schwer möglich (Laemmli, 1970). 20µg Protein aus den Proteinlysaten wurden 1:1 mit Laemmli-Probenpuffer gemischt, 5min bei 95°C denaturiert und bis zum Auftragen auf das Gel bei -20°C gelagert.

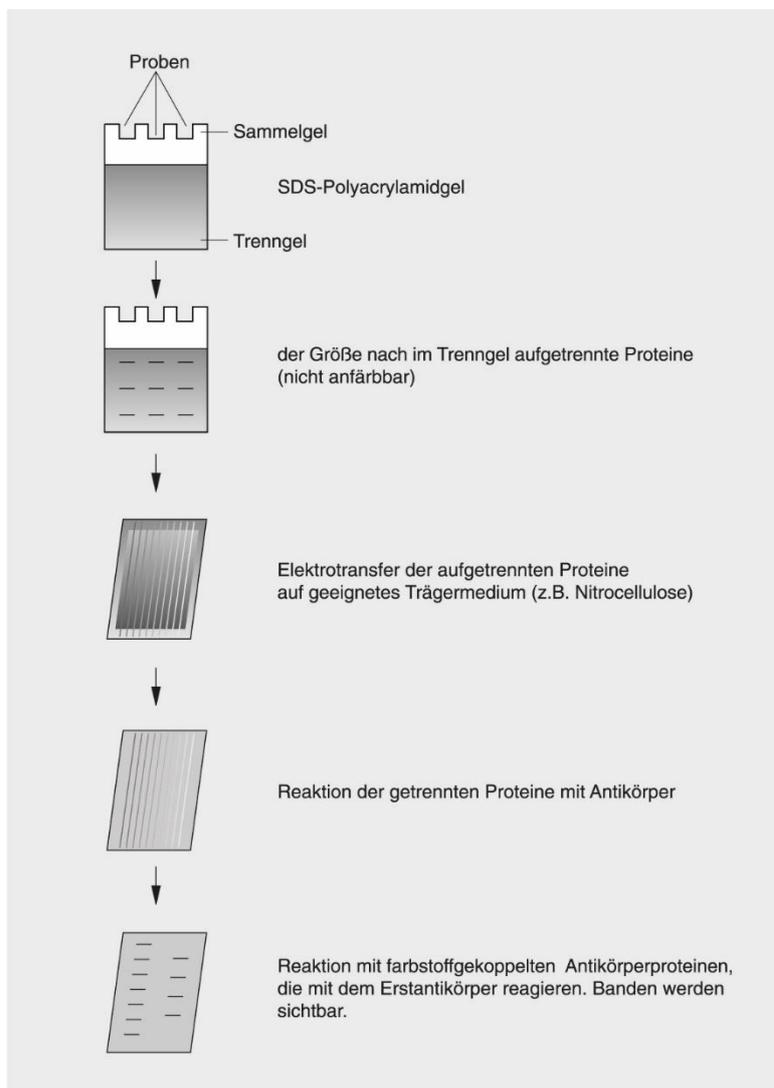


Abbildung 3-5: Western Blot

Proteine werden auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend mit einem Elektrotransfer auf ein geeignetes Trägermedium transferiert. Antikörper, die mit einem dort anhaftenden Protein reagieren können, binden an diese. Mit einem geeigneten Detektionsverfahren

werden die Stellen, an denen der Antikörper bindet, sichtbar gemacht. Mit Markern lässt sich die Größe der an den Antikörper bindenden Proteine bestimmen. (Schenkel, 2006)

3.2.11.1 Elektrophorese

Die SDS –Polyacrylamid Gele wurden wie oben beschrieben präpariert. Die erste Tasche des Sammelgels wurde mit 10µl eines Proteinmarkers (SeeBlue® Pre-Stained Standard) mit einer Molekulargewichten von 4 bis 250kDa beladen, die übrigen Taschen mit den Probelysaten, zuvor wurde die Kammer mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Zur Konzentrierung der Probe im Sammelgel wurde die Elektrophorese mit 80V begonnen, nach Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf maximal 160V erhöht.

3.2.11.2 Färbung

Die im Gel getrennten Proteine werden mit Coomassie-Brilliant-Blau R250-Lösung (1g Coomassie-Brilliant-Blau R250 gelöst in 60ml Methanol und 20ml Essigsäure in 200ml H₂O) unter Schütteln bei RT fixiert und für 1 bis 2h gefärbt. Das Gel wurde in 30% Methanol, 10% Essigsäure, und 60% H₂O unter Schütteln entfärbt bis das Gel selbst transparent und die Proteinbanden blau gefärbt sichtbar wurden.

3.2.12 Western Blot

Die im Gel getrennten Proteine wurden zur weiteren Analyse unfixiert auf eine geeignete Membran transferiert. Die PVDF-Membranen wurden zugeschnitten und mit Ethanol, Whatman-Filterpapier und Schwämmen mit Transferpuffer befeuchtet. Anschließend wurde ein „Sandwich“ aus Gel und Membran, umgeben von je einem Filterpapier und einem Schwamm, zusammengebaut, wobei Luftblasen zwingend zu vermeiden sind (Abbildung 3-6). Der Sandwich wurde in die Blotkammer eingespannt und eine Spannung von 100V bei einer Stromstärke von maximal 400mA für 1h angelegt. Um eine Überhitzung zu verhindern wurden Coolpads beigelegt. Auf eine korrekte Polung wurde geachtet.



Abbildung 3-6: Western Blot „Sandwich“

SDS-Gel und Nitrocellulosemembran (im Versuch wurden PVDF-Membranen verwendet) umgeben von Whatman-Filterpapier und Schwämmen, eingespannt in eine Plastik-Blotkammer, Darstellung der Polung (Blüthner, 1998).

Nach dem Transfer wurden die an die Membran gebundenen Proteine reversibel mit Ponceau S (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure) gefärbt und dokumentiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden wurden freie Bindungsstellen der Membran mit Casein Lösung blockiert, (1h auf dem Schüttler). Hierbei wurde die Ponceaufärbung rückgängig gemacht. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde das Gel mit Coomassie-Brilliant-Blau R250 gefärbt, Proteinbanden durften nicht mehr nachweisbar sein.

3.2.12.1 Antigen-Antikörperreaktion

Zunächst wurden die Membranen mit spezifischen Antikörpern gegen Ang-1, Ang-2, Tie-2, wobei jeweils nur ein Antikörper je Membran verwendet wurde, in eine Küvette mit 3ml Casein Lösung und 10 µl des entsprechenden Antikörpers über Nacht bei 8°C inkubiert. Danach wurden die Membranen dreimal für 20-30min in TBS/T gewaschen.

Der Sekundärantikörper ist ein Immunglobulin, welcher an den zuvor verwendeten spezifischen Antikörper binden kann und an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist. Die Membranen wurden in eine frische Küvette überführt und mit 10ml 1% Caseinlösung und NaAc und 1µl des Sekundärantikörpers (Perox-Rabbit) für 90min bei RT oder für 45min bei 37,5°C inkubiert.

Der Proteinnachweis erfolgte über eine Chemolumineszenzreaktion: Luminol reagiert mit einem Oxidationsmittel in Anwesenheit eines Katalysators unter Lichtemission, welches detektiert wird. Diese Reaktion wurde mit dem ECL (*enhanced chemiluminescence*) Western Blotting Substrate Kit (Pierce) durchgeführt. Es wurden jeweils 1ml *Detection Reagent 1* (ein Peroxid welches als Oxidationsmittel fungiert) und *Detection Reagent 2* (Luminol) gemischt und die zuvor abgetupfte Membran für 5min lichtgeschützt darin inkubiert. Als Katalysator für die

Reaktion diente die an die Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase, weshalb es spezifisch bei den nachzuweisenden Proteinen zu Chemolumineszenz kam. Nach der Entwicklung wurden die Membranen in eine Kunststoffolie gelegt und in der Dunkelkammer fotografiert und mit der dafür vorgesehenen Software (GenesLab) die Proteinbanden auf den Membranen sichtbar gemacht.

3.2.13 ELISA

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein enzymatisches Immunadsorptionsverfahren (EIA) zum quantitativen Nachweis von Proteinen. Hierbei wird im Falle des *Sandwich-ELISA* das nachzuweisende Protein an einen spezifischen Primärantikörper (*capture antibody*) gebunden. Nach Auswaschen der ungebundenen Proteine wird ein Sekundärantikörper (*detection antibody*), der mit einem Reporterenzym gekoppelt ist, hinzugefügt. Dieser bildet mit dem nachzuweisenden Protein einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Die Quantifizierung erfolgt über eine photometrische Absorptionsmessung der durch das Reporterenzym katalysierten Farbreaktion (Engvall und Perlmann, 1971, Lequin, 2005); Abbildung 3-7.

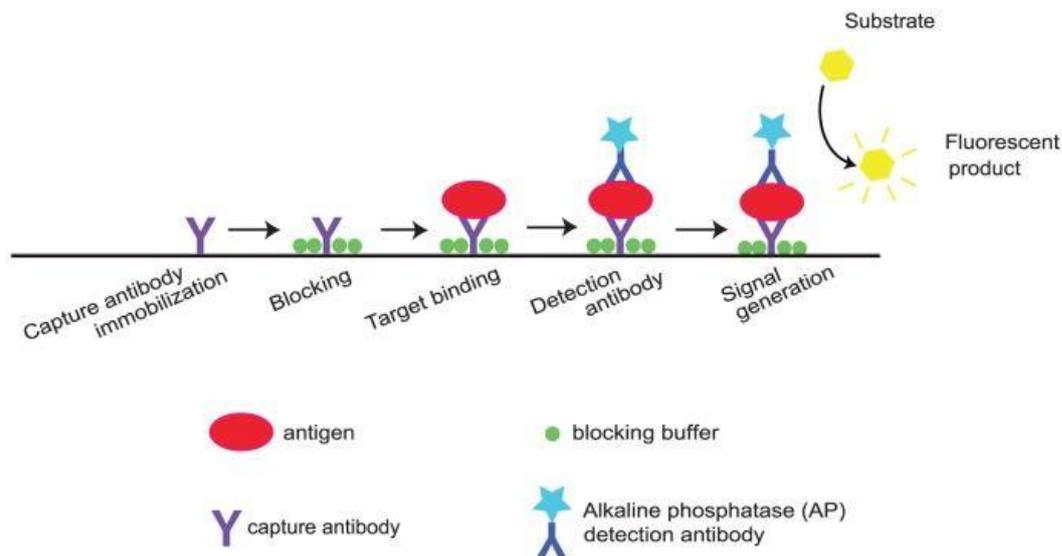


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA

Zuerst wird der Primärantikörper geblockt, dann das nachzuweisende Protein hinzugefügt, welches an den Primärantikörper bindet. Daran bindet wiederum der Sekundärantikörper, an dem ein Enzym gekoppelt ist, welches eine Farbreaktion katalysiert. Im Schema AP, im beschriebenen Versuch wurde hier Meerrettichperoxidase verwendet (Thaitrong et al., 2013).

In dieser Arbeit wurden Ang-1 und Ang-2 quantifiziert, dabei wurden Lysate zum Nachweis von Ang-1 (1:50 verdünnt) und von Ang-2 (unverdünnt) verwendet (siehe Kapitel 3.2.10). Es wurden das Human Angiopoietin-1- und das Human Angiopoietin-2 DuoSet von R&D Systems entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

3.2.13.1 Plattenvorbereitung

Direkt vor der Benutzung wurde der Primärantikörper (720µg/ml anti-humanes Ang-1 Maus IgG bzw. 180µg/ml anti-humanes Ang-2 Maus IgG) mit 1ml sterilfiltriertem PBS verdünnt und jedes *Well* einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit 100µl befüllt, danach wurde die Platte abgedeckt und über Nacht bei RT inkubiert. Der *Reagent Diluent* wurde wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben aufgesetzt und sterilfiltriert. Im Anschluss wurden die am Vortag wie oben beschrieben beschichteten Mikrotiterplatten drei Mal mit 400 µl je *Well* gewaschen, jedes *Well* mit 300µl *Reagent Diluent* geblockt und für 1h verschlossen bei RT inkubiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben erneut gewaschen.

3.2.13.2 Assay

Die so mit dem Primärantikörper beschichteten Mikrotiterplatten wurden mit den zu untersuchenden Proben beladen. Hierfür wurden von den Proteinlysaten in Form von Triplets (je drei *Wells* pro Probe), und von der Standardreihe jeweils 100µl in ein *Well* pipettiert und für 2h abgedeckt bei RT inkubiert. Für die Standardreihe wurde zunächst das rekombinante humane Ang-1 bzw. Ang-2 mit 0,5ml *Reagent Diluent* resuspendiert und anschließend verdünnt. Danach wurde die Platte drei Mal mit dem Waschpuffer gewaschen.

Um den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex zu komplettieren wurde der Sekundärantikörper mit 1ml *Reagent Diluent* verdünnt (somit 36µg/ml biotinyliertes anti-humanes Ang-1 Ziegen IgG bzw. 360µg/ml biotinyliertes anti-humanes Ang-2 Maus IgG) und jeweils 100µl in jedes *Well* gegeben. Die verschlossene Platte wurde für 2h bei RT gelagert und anschließend wie oben beschrieben drei Mal gewaschen.

Jedes *Well* wurde mit 100µl der Streptavidin-konjugierten Meerrettichperoxidase lichtgeschützt inkubiert und wie oben beschrieben drei Mal gewaschen. Damit die Farbreaktion ablaufen konnte wurden 100µl pro *Well* eines 1:1 Gemisch aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin zugegeben. Nach 20min wurde die Reaktion mit 50µl 2N H₂SO₄ gestoppt und sofort die Konzentration der zu untersuchenden Proteine photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm und –zum Ausgleich optischer Mängel in der Mikrotiterplatte- bei einer Wellenlängenkorrektur bei 540nm, bestimmt (Abbildung 3-8).

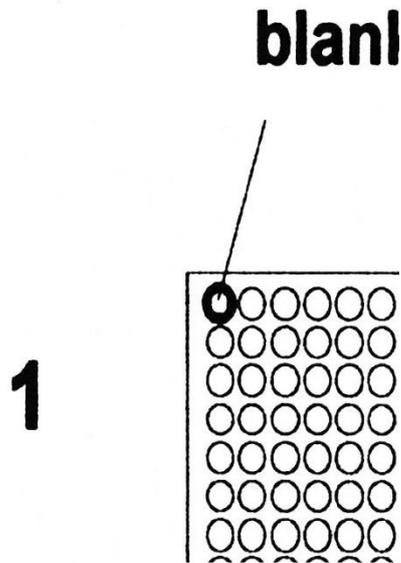


Abbildung 3-8: ELISA

Die Wells einer 96-Loch-Platte werden mit dem Antigen beschichtet. Nach mehreren Waschschrinen werden die unspezifischen Bindungsstellen mit Reagent Diluent blockiert. Die Löcher der Platten werden dann mit unterschiedlich verdünnten Markern bzw. Serum befüllt und inkubiert. Nach Waschschrinen wird die Bindungsstärke des Antikörpers mit einer Farbreaktion nachgewiesen, diese wird mit einem entsprechenden Lesegerät bestimmt, die Konzentration wird anhand einer Eichgeraden ausgewertet. (Blüthner, 1998)

3.2.14 Analyse der Proteindaten

3.2.14.1 Western Blot Daten

Mit GeneLabs wurden die Aufnahmen der Membranen nach der Chemoluminiszenreaktion generiert und mit den Graustufen von ImageJ 1.43u (National Institute of Health, USA) die Proteinkonzentration bestimmt.

3.2.14.2 ELISA Daten

Über photometrische Absorbtionsmessung wurde jeweils die Extinktion der Proben bestimmt. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes $E_{\lambda} = \left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$ (E: Extinktion; λ : Wellenlänge; I_1 : Intensität des transmittierten Lichts; I_0 : Intensität des einfallenden Lichts; ε : Extinktionskoeffizient; c: Stoffmengenkonzentration; d: Schichtdicke des durchstrahlten Körpers) wurde die Konzentration anhand der vordefinierten Standardreihe errechnet (Otto, 2011, Wedler, 1982), jeweils das Mittel der drei errechneten Konzentrationen pro Probe.

3.2.15 Statistik

Alle erhobenen Daten (Laborparameter, klinische Parameter) wurden patientenweise (nach ID-Nr.) in Microsoft Excel (14.0.7106.5003)- Tabellen eingegeben. Die Umrechnung von Variablen und die statistische Auswertung erfolgten in SAS 9.3.

3.2.15.1 Variablen

In der Tabelle 4 werden alle Variablen beschrieben, die bei der statistischen Analyse verwendet wurden. Alle Variablen wurden zu den oben beschriebenen Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*, soweit verfügbar, bestimmt.

| Variable | Beschreibung | Wertebereich |
|-------------------------------|--------------------------|---|
| ID | Patientenidentifizierung | Fortlaufende Nummer |
| Alter | quantitativ, stetig | Jahre |
| Geschlecht | kategorial | Männlich (m); weiblich (f) |
| Alterskategorien | kategorial | <35 Jahre, ≥ 35 Jahren |
| Gruppe | kategorial | Kontrolle, MMD, ACVD |
| Zeit | kategorial | <i>baseline</i> , <i>follow up 1</i> , <i>follow up 2</i> |
| NIHSS | kategorial | 0, 1, 2, 3, 4 |
| Czabanka-Score | kategorial | 2, 3 |
| EPC, EPC¹⁰⁵ | quantitativ | Stetige Zahl |
| Ang-1, Ang-2 | quantitativ | Stetige Zahl |
| Ang-2/ Ang-1 | quantitativ | Stetige Zahl |

Tabelle 4: Untersuchungsvariablen

Beschreibung der Variablen und der Variablenwerte, die in der statistischen Analyse verwendet wurden

Zur Darstellung der Veränderung von *follow up 1* und *follow up 2* gegenüber dem *baseline*-Wert der quantitativen Variablen wurden einerseits die absoluten Differenzen gebildet (Differenz 1 = *follow up 1* – *baseline*; Differenz 2 = *follow up 2* - *baseline*) und andererseits auch die relativen Differenzen (relative Differenz 1 = (Differenz 1 / *baseline*) * 100; relative Differenz 2 = (Differenz 2 / *baseline*) * 100)) bestimmt. Zusätzlich wurde die prozentuale Veränderung der quantitativen Variablen als prozentuale Veränderung zwischen dem standardisiertem *baseline*-Wert (=100%) und den Werten zum *follow up 1* bzw. *follow up 2* (prozentuale Veränderung

$1 = (\text{follow up } 1 / \text{baseline}) * 100$; prozentuale Veränderung $2 = (\text{follow up } 2 / \text{baseline}) * 100$ gebildet. Zur Vermeidung einer Division durch Null wurden *baseline*-Werte, die den Wert „0.00000“ hatten, mit „0.000001“ ersetzt.

3.2.15.2 Statistische Analyse

In die statistische Analyse wurden alle aufgenommenen Studienteilnehmer einbezogen. Alle oben aufgeführten Variablen wurden anhand von statistischen Standardverfahren deskriptiv ausgewertet und tabellarisch sowie graphisch dargestellt. Die Darstellung erfolgte getrennt nach den drei Gruppen und zusätzlich, wenn es angebracht war, auch stratifiziert nach demographischen Merkmalen wie Alters- und Geschlechtskategorien bzw. nach nosographischen Merkmalen wie NHISS und dem Czabanka-Score. Für kategoriale Variablen erfolgte eine Auszählung der absoluten und prozentualen Häufigkeiten. Für quantitative Variablen wurden die statistischen Kennwerte Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimum, Maximum berechnet. Die graphische Darstellung erfolgte anhand von Kurvendiagrammen und von Box- und Whiskerplots. Der Vergleich der drei Gruppen bezüglich der quantitativen Variablen in der *baseline* Untersuchung wurde anhand des Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die Intragruppenvergleiche der Veränderungen der quantitativen Variablen im Verlauf wurden mit dem Wilcoxon Sign Rank-Test für abhängige Beobachtungen durchgeführt.

Die statistische Prüfung auf Unterschiede zwischen den drei Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe erfolgte mit dem gemischten Modell für wiederholte Messungen (Brown und Prescott, 2001). In das Modell wurde der Zeitfaktor als fester Effekt und die Patienten als individuelle Effekte dargestellt. Durch dieses Verfahren konnten auch Patienten mit fehlenden Werten zu den einzelnen Zeitpunkten in die Analyse einbezogen werden. Dadurch konnte eine Verminderung der Stichprobengröße die zur Verzerrung der Ergebnisse als Folge haben könnte, vermieden werden. Die statistische Prüfung erfolgte in SAS 9.3 mit Hilfe der *Mixed* Prozedur.

Aufgrund der kleinen Stichprobe und der Unkenntnis der wahren Verteilung der Variablen wurden als Alternative zu parametrischen Verfahren, die bestimmte Annahmen bezüglich der Verteilungen voraussetzen, nicht-parametrische (rangabhängige) Verfahren gewählt. Alle statistischen Testungen wurden explorativ, zweiseitig und zum Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ und $\beta=20\%$ durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Patientendaten

4.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung

In die Analyse gingen Beobachtungen von 48 Personen ein, davon waren elf in der gesunden Kontrollgruppe, 24 in der MMD Gruppe und 13 in der ACVD Gruppe. Von einem MMD Patienten fehlten die Angaben zum Alter und Geschlecht, weshalb er nicht in Tabelle 5 eingeht.

In Tabelle 5 ist die Alters- und Geschlechtsverteilung getrennt nach den drei Gruppen dargestellt. Bei allen drei Gruppen ist die Geschlechtsverteilung inhomogen. Der Frauenanteil ist bei den gesunden Kontrollen (sieben Frauen und vier Männer) und in der MMD Gruppe (17 weibliche und sechs männliche Patienten) größer, wohingegen die ACVD Gruppe aus drei weiblichen und zehn männlichen Patienten besteht.

Auch in den Alterskategorien gibt es Unterschiede zwischen den Gruppen. acht von elf (72.7%) gesunden Kontrollen waren unter 35 Jahre alt, wohingegen zehn von 23 (43.5%) MMD Patienten unter 35 Jahre und 13 (56.5%) über 35 Jahre alt waren. Alle ACVD Patienten waren über 35 Jahre alt. Die relativen Häufigkeiten bei den einzelnen Alters- und Geschlechtskategorien sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

| Alter bei <i>baseline</i> | | <35 Jahre | | ≥35 Jahre | | Gesamt |
|---------------------------|--------|-----------|------|-----------|-------|--------|
| | | N | % | N | % | N |
| Kontrolle | F | 6 | 54.5 | 1 | 9.1 | 7 |
| | M | 2 | 18.2 | 2 | 18.2 | 4 |
| | Gesamt | 8 | 72.7 | 3 | 27.3 | 11 |
| MMD | F | 8 | 34.8 | 9 | 39.1 | 17 |
| | M | 2 | 8.7 | 4 | 17.4 | 6 |
| | Gesamt | 10 | 43.5 | 13 | 56.5 | 23 |
| ACVD | F | . | . | 3 | 23.1 | 3 |
| | M | . | . | 10 | 76.9 | 10 |
| | Gesamt | . | . | 13 | 100.0 | 13 |

Tabelle 5: Verteilung von Alter und Geschlecht bei der *baseline* Untersuchung getrennt nach Gruppen

Alterskategorien: unter bzw. gleich oder über 35 Jahre. N entspricht der Anzahl der Beobachtungen, f: weiblich, m: männlich.

Das durchschnittliche Alter war in der Gruppe der gesunden Kontrollen 34.5 Jahre bei der MMD Gruppe 36.9 Jahre und bei der ACVD Gruppe 55.9 Jahre. Die statistischen Kennwerte

wie Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum der Altersverteilung nach Gruppen getrennt sind in der Tabelle 6 dargestellt.

| <i>Alter bei baseline</i> | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|---------------------------|----------|-----------|------------|---------------|------------|------------|
| Kontrolle | 11 | 34.5 | 14.4 | 27.0 | 22 | 58 |
| MMD | 23 | 36.9 | 12.0 | 36.0 | 18 | 61 |
| ACVD | 13 | 55.9 | 9.5 | 54.0 | 44 | 77 |

Tabelle 6: Alter bei der baseline Untersuchung (statistische Kennwerte)

N: Anzahl der Beobachtungen, MW: Mittelwerte, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

4.1.2 NIHSS

Bei den beiden Patientengruppen (MMD und ACVD) wurde der Schweregrad des neurologischen Defizits anhand der NIHSS erhoben. Bei der Mehrzahl der Patienten war dieser Score sehr niedrig. Es wurden lediglich Werte von 0 bis 4, bei einem maximal erreichbaren Wert von 42, gemessen. Aufgrund der kleinen Werte wurde der Score mit den fünf Ausprägungen (0, 1, 2, 3, 4) als kategoriale Variable dargestellt. In der Tabelle 7 ist der Score bei der *baseline* Untersuchung und im Verlauf für die MMD-Gruppe bzw. in der *baseline* Untersuchung für die ACVD-Gruppe dargestellt. Von den 18 Patienten der MMD-Gruppe hatten bereits in der *baseline* Untersuchung zwölf (66.7%) Patienten einen Score von null, drei (16.7%) Patienten einen Score von eins und jeweils ein Patient (5.6%) einen Score von zwei, drei, bzw. vier. In der *follow up 1* Untersuchung hatten 12 (85.7%) Patienten einen Score von null und zwei (14.3%) Patienten einen Score von drei. In der *follow up 2* Untersuchung hatten fünf (61.5%) Patienten einen Score von null, zwei (15.4%) Patienten einen Score von zwei und ein (12.5%) Patient einen Score von 3. Acht von 13 Patienten der ACVD-Gruppe hatten acht (61.5%) Patienten in der *baseline* Untersuchung einen Score von null, zwei (15.4%) Patienten einen Score von eins, ein (7.7%) Patient einen Score von zwei und zwei (15.4%) Patienten einen Score von drei.

| NIHSS | | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
|-------------|--------------------------------|----|------|---|------|---|------|---|------|---|-----|
| | | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| MMD | <i>baseline</i> (N=18=100%) | 12 | 66.7 | 3 | 16.7 | 1 | 5.6 | 1 | 5.6 | 1 | 5.6 |
| | <i>follow up 1</i> (N=14=100%) | 12 | 85.7 | . | . | . | . | 2 | 14.3 | . | . |
| | <i>follow up 2</i> (N=8=100%) | 5 | 62.5 | . | . | 2 | 25.0 | 1 | 12.5 | . | . |
| ACVD | <i>Baseline</i> (N=13=100%) | 8 | 61.5 | 2 | 15.4 | 1 | 7.7 | 2 | 15.4 | . | . |

Tabelle 7: NIHSS in der baseline und im Verlauf für die MMD- und ACVD-Gruppe

N entspricht der Anzahl der Beobachtungen in der jeweiligen NIHSS-Kategorie (0 bis 4) bzw. zum jeweiligen Zeitpunkt. Die prozentualen Angaben sind auf der Basis der Patienten mit Angaben bezüglich der NIHSS bei dem jeweiligen Zeitpunkt berechnet.

4.1.3 EPC Identifizierung

Bei der FACS-Analyse wurden alle aufgenommenen Zellen nach Größe und Granularität dargestellt. Abbildung 4-1 zeigt die Analyse eines Beispielpatienten. Die Zellpopulation der mononukleären Zellen konnte klar abgegrenzt werden.

Diese Population wurde in einem nächsten Graph nach CD133 und CD34 dargestellt (Abbildung 4-2). Hier wurde die Zellpopulation die für beide Färbungen positiv war ausgewählt und im nächsten Schritt wurden die CD45^{low} Zellen ausgewählt (Abbildung 4-3). Die so erfasste Zellpopulation entspricht CD34 und CD133 positiven und CD45 niedrig positiven mononukleären Zellen, also EPC.

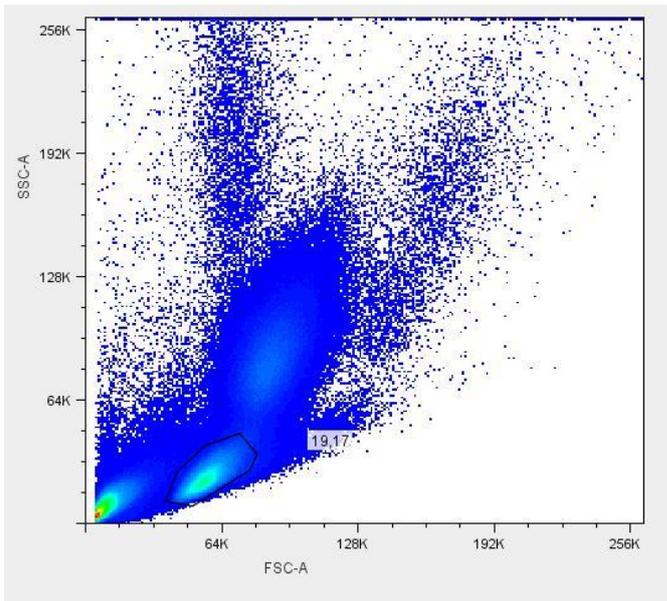


Abbildung 4-1: FACS: alle erfasste Zellen

Darstellung der erfassten Zellen eines Beispielpatienten nach *sideways scatter* (SSC) und Größe *forward scatter* (FSC). Die blau umrandete Zellpopulation entspricht in Granularität und Größe mononukleären Zellen.

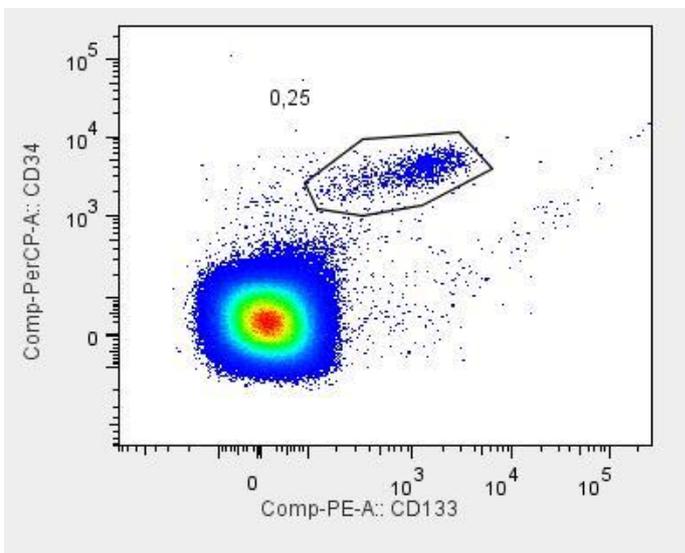


Abbildung 4-2: FACS: mononukleäre Zellen

Darstellung der in Abbildung 4-1 ausgewählten Zellpopulation (mononukleäre Zellen) eines Beispielpatienten. Die y-Achse zeigt die CD34-Dichte (PerCP Laser), die x-Achse die CD133-Dichte (PE Laser). Die blau umrandete Zellpopulation entspricht CD34 und CD133 positiven mononukleären Zellen.

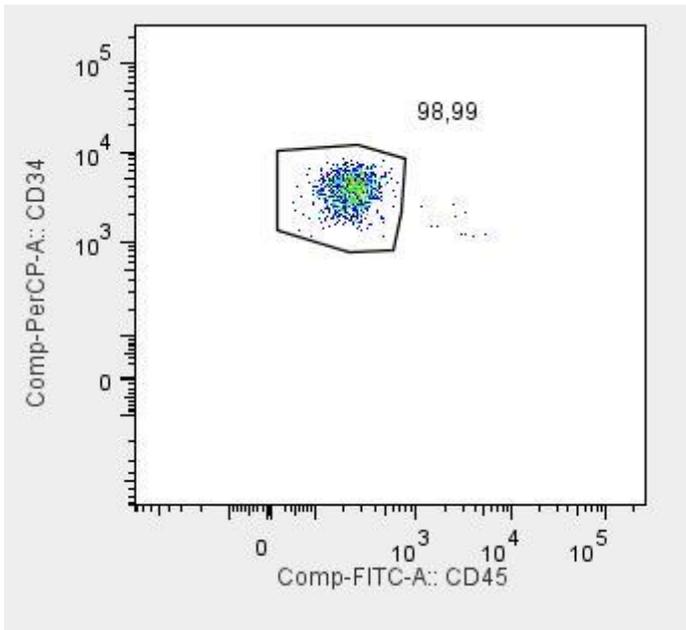


Abbildung 4-3: FACS $CD133^+$ und $CD34^+$ mononukleären Zellen

Darstellung der in Abbildung 4-2 ausgewählten Zellpopulation ($CD133$ und $CD34$ positive mononukleäre Zellen) eines Beispielpatienten. Die y-Achse zeigt die $CD34$ -Dichte (PerCP Laser), die x-Achse die $CD45$ -Dichte (FITC Laser). Die blau umrandete Zellpopulation entspricht $CD34$ und $CD133$ positiven und $CD45$ niedrig positiven mononukleären Zellen.

Die oben beschriebene Zellpopulation wurde zusätzlich nach $CD105$ dargestellt, hier konnte allerdings keine klare $CD105$ positive Zellpopulation abgegrenzt werden, wie in Abbildung 4-4 zu sehen ist. Dies spiegelt sich auch in den in Kapitel 4.2.1 dargestellten Daten wieder.

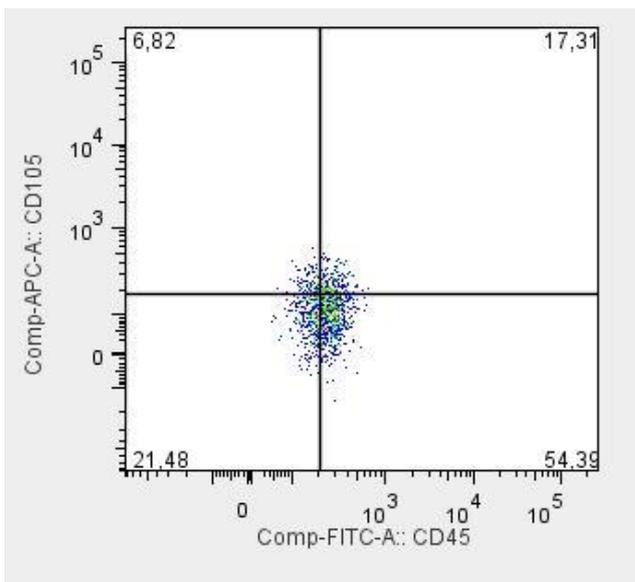


Abbildung 4-4: FACS $CD133^+$, $CD34^+$ und $CD45^{low}$ mononukleären Zellen

Darstellung der in Abbildung 4-2 ausgewählten Zellpopulation ($CD34$ und $CD133$ positive und $CD45$ niedrig positive mononukleäre Zellen) eines Beispielpatienten. Die y-Achse zeigt die $CD105$ -Dichte (APC Laser), die x-Achse die $CD45$ -Dichte (FITC Laser). Zur besseren Übersicht wurde der Graph in vier Quadranten aufgeteilt. Eine $CD105$ positive Population ist nicht klar abgrenzbar.

4.1.4 Czabanka-Score

Angaben zum Czabanka-Score in der *baseline* lagen bei zwölf MMD-Patienten vor. Neun Patienten (fünf weiblich und vier männlich) hatten einen Czabanka-Score von zwei und drei (alle weiblich) einen Czabanka-Score von drei. Tabelle 8 stellt den Czabanka-Score bei der *baseline* Untersuchung für die MMD Gruppe dar.

| Czabanka-Score bei <i>baseline</i> | 2 | | 3 | | Gesamt | |
|------------------------------------|---|------|---|------|--------|-------|
| | N | % | N | % | N | % |
| F | 5 | 41.7 | 3 | 25.0 | 8 | 66.7 |
| M | 4 | 33.3 | . | . | 4 | 33.3 |
| Gesamt | 9 | 75.0 | 3 | 25.0 | 12 | 100.0 |

Tabelle 8: Czabanka-Score Score in der baseline bei der MMD-Gruppe insgesamt und getrennt nach Geschlecht

N entspricht der Anzahl der Beobachtungen in der jeweiligen Kategorie (2, 3) f: weiblich, m: männlich.

4.2 EPC

4.2.1 EPC und EPC¹⁰⁵, Vergleich in der *baseline* Untersuchung

EPC sind CD34 und CD133 positiven und CD45 niedrig positiven mononukleären Zellen, EPC¹⁰⁵ sind zusätzlich CD105 positiv. Tabelle 9 stellt die statistischen Kennwerte der EPC und EPC¹⁰⁵ in der *baseline* Untersuchung vergleichend dar. Bei alle drei Gruppen sind die EPC Werte größer als die EPC¹⁰⁵ Werte. Am stärksten sind die Unterschiede zwischen EPC und EPC¹⁰⁵ in der MMD-Gruppe (MW: 0.060 vs. 0.013, Median: 0.046 vs. 0.010) und in der ACVD-Gruppe (MW: 0.059 vs. 0.016, Median: 0.050 vs. 0.014) zu beobachten. Die Kontrollgruppe weist die niedrigsten EPC-Werte (MW: 0.049, Median: 0.045) und die höchsten EPC¹⁰⁵-Werte (MW: 0.024, Median: 0.020) auf.

| Gruppe | Variable | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|------------------|--------------------|----|-------|-------|--------|-------|-------|
| Kontrolle | EPC | 11 | 0.049 | 0.020 | 0.045 | 0.023 | 0.075 |
| | EPC ¹⁰⁵ | | 0.024 | 0.016 | 0.020 | 0.010 | 0.055 |
| MMD | EPC | 18 | 0.060 | 0.058 | 0.046 | 0.011 | 0.252 |
| | EPC ¹⁰⁵ | | 0.013 | 0.012 | 0.010 | 0.000 | 0.043 |
| ACVD | EPC | 13 | 0.059 | 0.030 | 0.050 | 0.018 | 0.140 |
| | EPC ¹⁰⁵ | | 0.016 | 0.012 | 0.014 | 0.000 | 0.053 |

Tabelle 9: Vergleich von EPC und EPC¹⁰⁵ in der baseline Untersuchung nach Gruppen

Darstellung der präoperativen Werte von EPC (CD133⁺, CD34⁺ und CD45^{low} mononukleären Zellen) und EPC¹⁰⁵(CD133⁺, CD34⁺, CD45^{low} und CD105⁺ mononukleären Zellen) getrennt nach Gruppen. N: Anzahl der Beobachtungen der spezifischen Variable, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

4.2.2 EPC in der *baseline* Untersuchung

Ein MMD-Patient (ID# 200) hatte weder in der *baseline* noch im Verlauf EPC-Messungen und wurde von der EPC-Analyse ausgeschlossen.

4.2.2.1 EPC nach Geschlechts- und Alterskategorien

In der Tabelle 10 sind die statistischen Kennwerte der EPC Werte der *baseline* Untersuchung in den drei Gruppen und innerhalb der Gruppen nach Geschlecht und Gesamt dargestellt. In der Kontrollgruppe sind die EPC-Werte kleiner (EPC-Mittelwert: 0.049, Median: 0.045) als die in der MMD-Gruppe (MW: 0.060, Median: 0.046) bzw. der ACVD-Gruppe (MW: 0.059, Median: 0.050). In alle drei Gruppen sind die EPC-Werte der Frauen niedriger als die der Männer. Am deutlichsten sind die Geschlechterunterschiede in der MMD-Gruppe zu beobachten. Der EPC-Mittelwert der MMD-Patientinnen beträgt 0.051 (Median: 0.046) und der der männlichen Patienten 0.079 (Median: 0.050).

| | | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|------------------|---------------|----|-------|-------|--------|-------|-------|
| Kontrolle | f | 7 | 0.042 | 0.019 | 0.041 | 0.023 | 0.074 |
| | m | 4 | 0.062 | 0.015 | 0.065 | 0.041 | 0.075 |
| | Gesamt | 11 | 0.049 | 0.020 | 0.045 | 0.023 | 0.075 |
| MMD | f | 12 | 0.051 | 0.037 | 0.046 | 0.011 | 0.152 |
| | m | 6 | 0.079 | 0.088 | 0.050 | 0.019 | 0.252 |
| | Gesamt | 18 | 0.060 | 0.058 | 0.046 | 0.011 | 0.252 |
| ACVD | f | 3 | 0.056 | 0.026 | 0.046 | 0.035 | 0.085 |
| | m | 10 | 0.060 | 0.032 | 0.054 | 0.018 | 0.140 |
| | Gesamt | 13 | 0.059 | 0.030 | 0.050 | 0.018 | 0.140 |

Tabelle 10: Präoperativen EPC Werte in den 3 Gruppen nach Geschlecht und Gesamt

EPC Werte von Kontroll-, MMD und ACVD Gruppe bei der *baseline* Untersuchung getrennt nach Geschlecht und Gesamt. N: Anzahl der Beobachtungen der spezifischen Variable, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

Auch bezüglich der Altersverteilung gibt es Unterschiede in den EPC Werten der *baseline* Untersuchung, wobei diese Unterschiede am deutlichsten in der MMD-Gruppe sind, wo die jüngeren Patienten höhere EPC-Werte (MW: 0.078, Median: 0.065) als die älteren Patienten (MW: 0.050, Median: 0.039) aufweisen. Die anderen statistischen Kennwerte der EPC-Werte nach den zwei Alterskategorien sind in der Tabelle 11 zu entnehmen.

| | | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|------------------|---------------------|----------|-----------|------------|---------------|------------|------------|
| Kontrolle | <35 Jahre | 8 | 0.052 | 0.020 | 0.053 | 0.023 | 0.075 |
| | ≥35 Jahre | 3 | 0.043 | 0.021 | 0.041 | 0.023 | 0.065 |
| MMD | <35 Jahre | 7 | 0.078 | 0.080 | 0.065 | 0.014 | 0.252 |
| | ≥35 Jahre | 9 | 0.050 | 0.042 | 0.039 | 0.011 | 0.152 |
| ACVD | ≥35 Jahre | 13 | 0.059 | 0.030 | 0.050 | 0.018 | 0.140 |

Tabelle 11: Altersgruppenverteilung der präoperativen EPC Werte in den 3 Gruppen

EPC Werte von Kontroll-, MMD und ACVD Gruppe bei der *baseline* Untersuchung getrennt nach den beiden Altersgruppen (<35 Jahre und ≥35 Jahre). N: Anzahl der Beobachtungen der spezifischen Variable, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

4.2.2.2 EPC nach dem Czabanka-Score

Angaben zum Czabanka-Score in der *baseline* Untersuchung lagen bei zwölf MMD-Patienten vor. Tabelle 12 stellt die präoperativen EPC-Werte getrennt nach dem Czabanka-Score dar. Dabei ist festzuhalten, dass Patienten mit einem Czabanka-Score von zwei höhere Mittelwerte (0.073) aufweisen. Bei beiden Kategorien sind jedoch die Mediane ähnlich (0.039 und 0.045). Die höheren Mittelwerte weisen auf einige Extremwerte in der Kategorie mit dem Score zwei hin.

| | | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|-----------------------|----------|----------|-----------|------------|---------------|------------|------------|
| Czabanka-Score | 2 | 9 | 0.073 | 0.079 | 0.039 | 0.011 | 0.252 |
| | 3 | 3 | 0.039 | 0.012 | 0.045 | 0.025 | 0.047 |

Tabelle 12: Präoperative EPC Werte in der MMD-Gruppe nach dem Czabanka-Score

EPC Werte von der MMD Gruppe bei der *baseline* Untersuchung getrennt nach dem Czabanka-Score (2 und 3). N: Anzahl der Beobachtungen der spezifischen Variable, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

4.2.2.3 EPC, Vergleich der Gruppen in der *baseline* Untersuchung

Die statistischen Kennwerte der EPC-Werte in der *baseline* Untersuchung der drei Gruppen sind in der Tabelle 10 jeweils in der Spalte „Gesamt“ dargestellt. Daraus kann man entnehmen, dass die EPC-Werte in den beiden Patientengruppen etwas höher liegen (MMD-Gruppe (MW: 0.060, Median: 0.046) bzw. ACVD-Gruppe (MW: 0.059, Median: 0.050)) als die EPC-Werte in der Kontrollgruppe (MW: 0.049, Median: 0.045). In der Abbildung 4-5 sind die EPC-Werte der drei Gruppen anhand von Box- und Whiskerplots dargestellt.

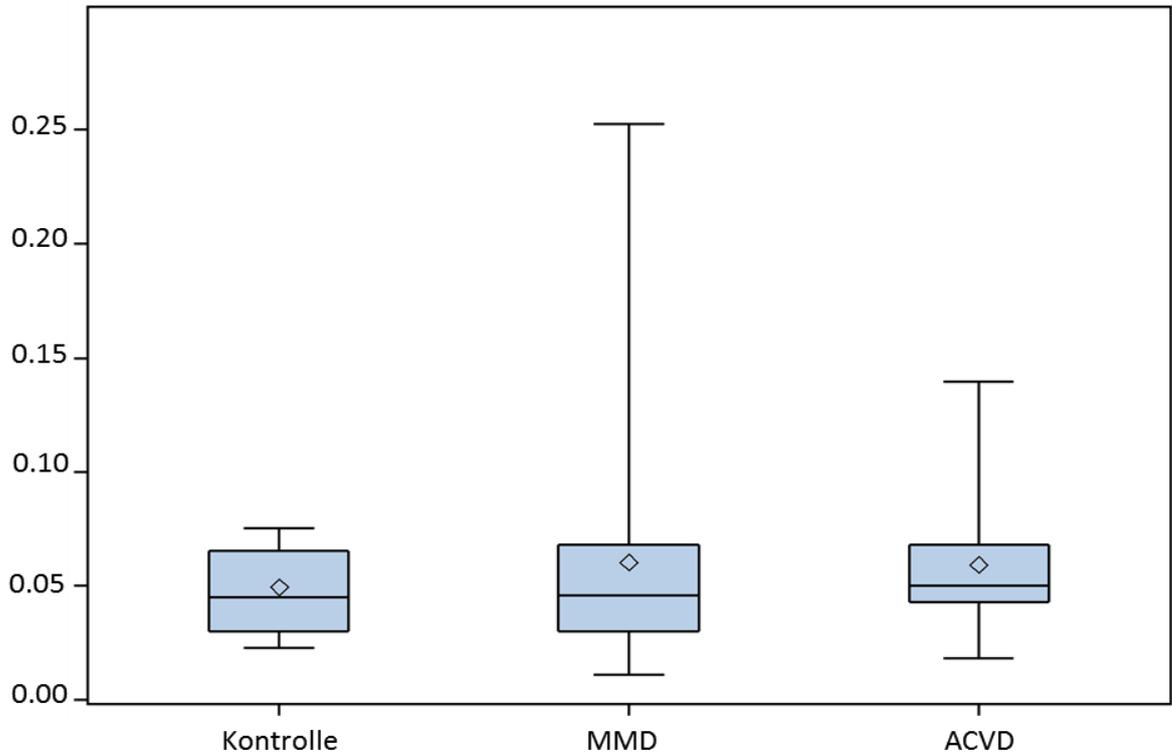


Abbildung 4-5: präoperative EPC in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe

Beschreibung der Box- und Whiskerplots: Die Box stellt das 25%-Quantil bzw. 75%-Quantil dar; in der Box, stellt der Querstrich den Median und der Rhombus den Mittelwert dar. Die Linien (Whiskers) außerhalb der Box, stellen das Minimum bzw. Maximum der EPC-Werte dar.

Der Vergleich der drei Gruppen bezüglich der EPC Werte in der *baseline* Untersuchung wurden anhand des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Dabei wurden zuerst den EPC-Werte Ränge (Wilcoxon-Scores) zugewiesen und dann statistisch geprüft. Abbildung 4-6 zeigt die Verteilung der Wilcoxon-Scores der EPC-Werte. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen bezüglich den EPC-Werte in der *baseline* sind jedoch nicht nachweisbar ($p=0.6688$).

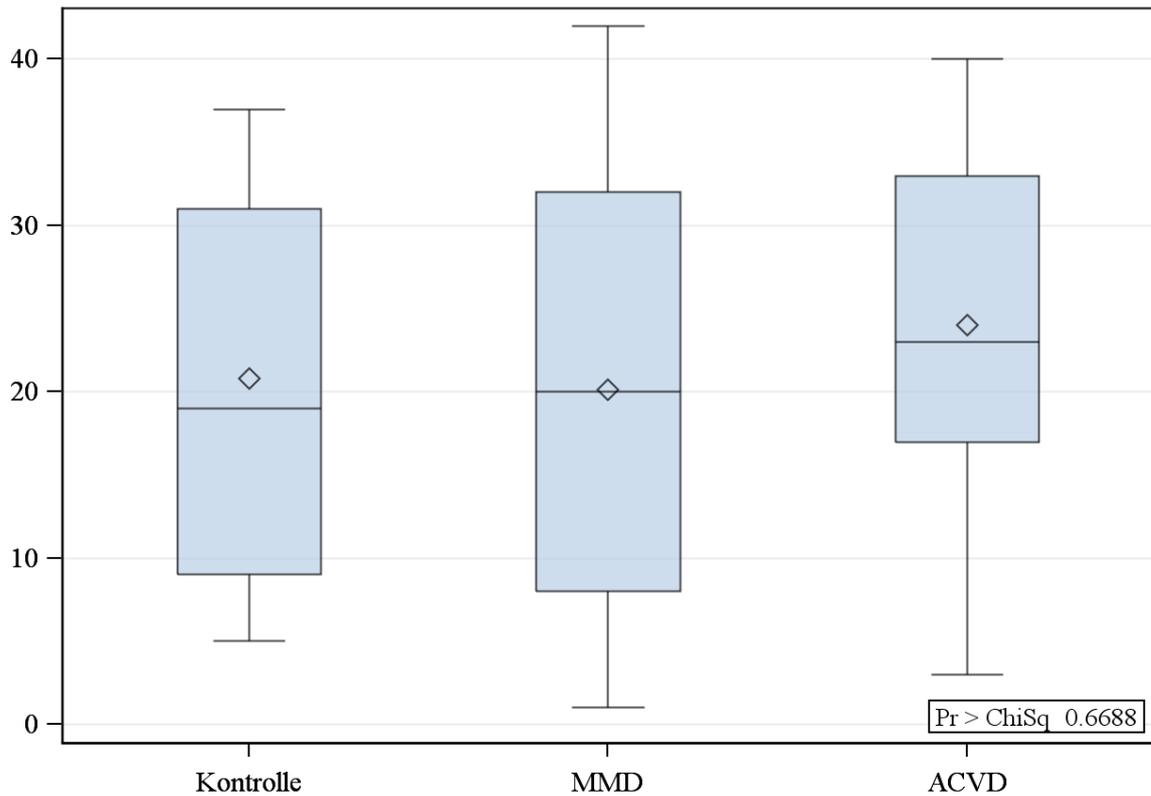


Abbildung 4-6: Vergleich der rangtransformierten EPC-baseline-Werte (Wilcoxon scores) in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe

Die Box stellt das 25%-Quantil bzw. 75%-Quantil dar; in der Box stellt der Querstrich den Median und der Rhombus den Mittelwert dar. Die Linien (Whiskers) außerhalb der Box, stellen das Minimum bzw. Maximum der EPC-Werte dar. Die Legende innerhalb der Abbildung stellt den p-Wert (0.6688) als Ergebnis des Kruskal-Wallis Test dar.

4.2.3 EPC im Verlauf

Der zeitliche Verlauf der EPC Werte getrennt nach den zwei Patientengruppen (MMD und ACVD) ist in der Tabelle 13 dargestellt. Da in der ACVD-Gruppe lediglich von einem Patienten Messungen im Verlauf vorlagen, werden in den folgende Ausführungen die Veränderung der EPC-Werte im Verlauf nur für die MMD-Gruppe dargestellt.

In der MMD-Gruppe ist eine kontinuierliche Abnahme der EPC-Werte im Verlauf zu beobachten. Am deutlichsten ist diese Abnahme anhand der Mediane erkennbar (0.046 vs. 0.038 vs. 0.026). Hier ist anzumerken, dass bei zwei MMD-Patienten keine präoperative EPC-Messungen und bei einigen Patienten keine Verlaufsmessungen vorlagen (vgl. Tabelle 13).

| Gruppe | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|--------|--------------------|----|-------|-------|--------|-------|-------|
| MMD | <i>baseline</i> | 18 | 0.060 | 0.058 | 0.046 | 0.011 | 0.252 |
| | <i>follow up 1</i> | 14 | 0.058 | 0.056 | 0.038 | 0.011 | 0.182 |
| | <i>follow up 2</i> | 8 | 0.034 | 0.028 | 0.026 | 0.004 | 0.091 |
| ACVD | <i>baseline</i> | 13 | 0.059 | 0.030 | 0.050 | 0.018 | 0.140 |
| | <i>follow up 1</i> | 1 | 0.112 | - | 0.112 | 0.112 | 0.112 |
| | <i>follow up 2</i> | 0 | - | - | - | - | - |

Tabelle 13: zeitlicher Verlauf der EPC Werte von MMD und ACVD Patienten

EPC-Werte der MMD- und der ACVD-Gruppe zu den Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

Abbildung 4-7 stellt den zeitlichen Verlauf der EPC-Werte für die MMD-Gruppe dar:

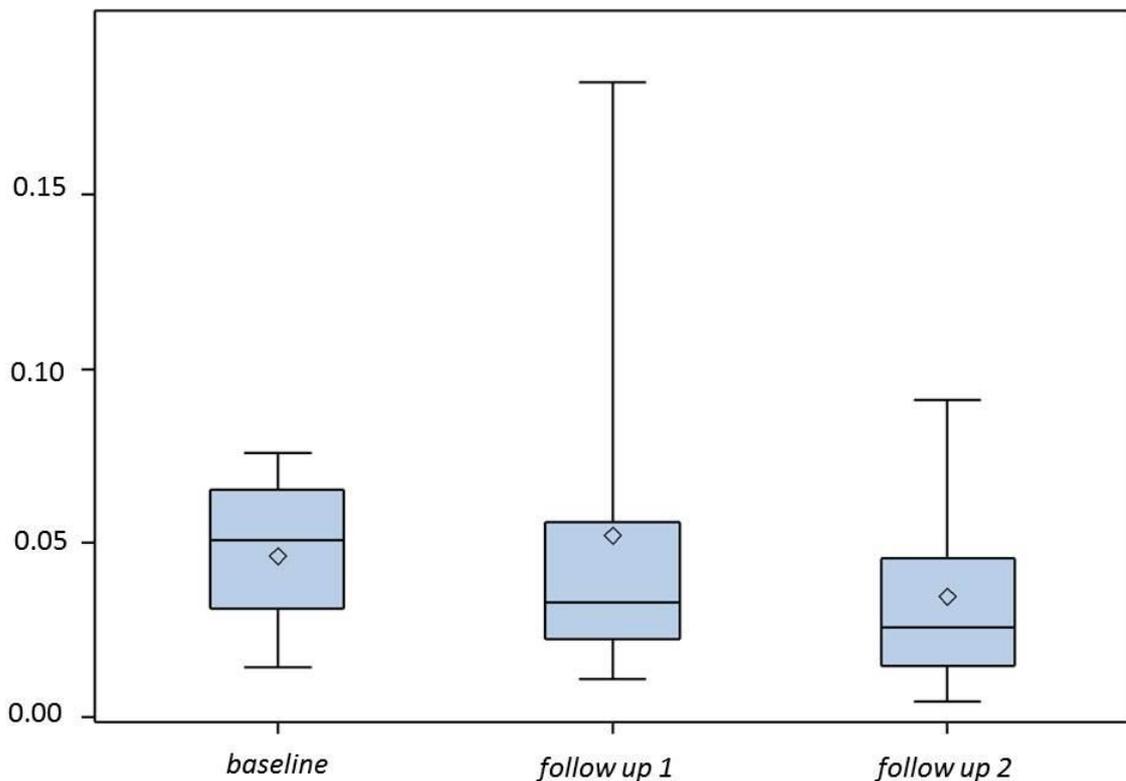


Abbildung 4-7: Zeitlicher Verlauf der EPC-Werte für die MMD-Gruppe

EPC Werte zu den drei Untersuchungszeitpunkten *präoperativ*, *follow up 1* und *follow up 2*. Die Box stellt das 25%-Quantil bzw. 75%-Quantil dar; in der Box stellt der Querstrich den Median und der Rhombus den Mittelwert dar. Die Linien (Whiskers) außerhalb der Box, stellen das Minimum bzw. Maximum der EPC-Werte dar.

Tabelle 14 und Abbildung 4-8 stellen den Verlauf der EPC-Werte der MMD-Patienten getrennt nach dem Geschlecht dar. Auch im Verlauf sind die EPC-Werte der weiblichen Patientinnen niedriger als die der männlichen Patienten.

| Ge- schlecht | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|-----------------|--------------------|----|-------|-------|--------|-------|-------|
| f | <i>baseline</i> | 12 | 0.051 | 0.037 | 0.046 | 0.011 | 0.152 |
| | <i>follow up 1</i> | 12 | 0.049 | 0.047 | 0.034 | 0.011 | 0.182 |
| | <i>follow up 2</i> | 7 | 0.033 | 0.030 | 0.022 | 0.004 | 0.091 |
| m | <i>baseline</i> | 6 | 0.079 | 0.088 | 0.050 | 0.019 | 0.252 |
| | <i>follow up 1</i> | 2 | 0.109 | 0.098 | 0.109 | 0.040 | 0.179 |
| | <i>follow up 2</i> | 1 | 0.046 | . | 0.046 | 0.046 | 0.046 |

Tabelle 14: zeitlicher Verlauf der EPC Werte von MMD Patienten getrennt nach Geschlecht

EPC-Werte der MMD-Gruppe zu den Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert

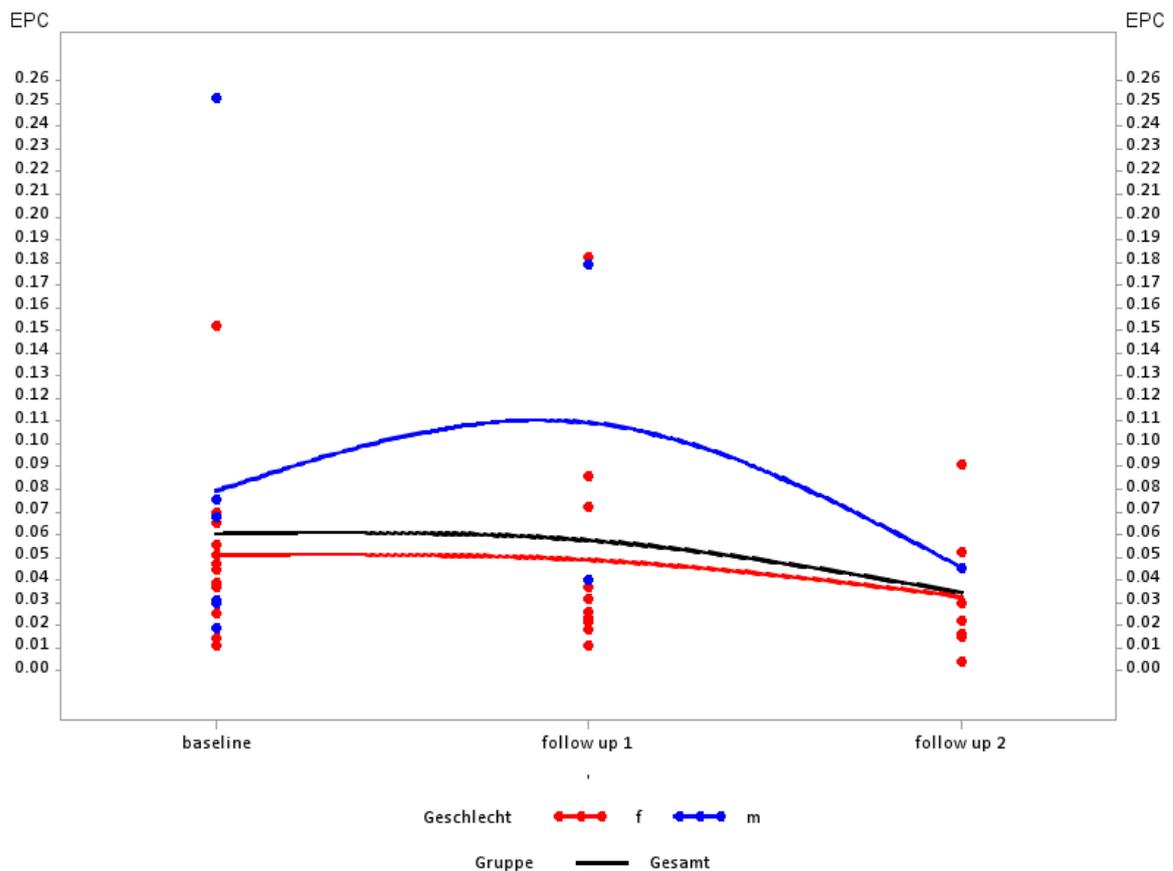


Abbildung 4-8: EPC-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Geschlecht

Die rote Kurve zeigt den Verlauf von weiblichen, die blaue Kurve den Verlauf von männlichen Patienten zu den Untersuchungszeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. Der Verlauf insgesamt wird durch die schwarze Kurve dargestellt. Die Punkte stellen Einzelwerte der verschiedenen Patienten dar, hier gilt die gleiche Farbkodierung wie für die Kurven.

Tabelle 15 und Abbildung 4-9 stellen den Verlauf der EPC-Werte der MMD-Patienten getrennt nach den Alterskategorien dar. Auch bezüglich Alterskategorien gibt es Unterschiede. Die EPC-Werte der jüngeren Patienten sind niedriger als die der älteren Patienten.

| Alterskategorien | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|------------------|-------------|----|-------|-------|--------|-------|-------|
| < 35 Jahre | baseline | 12 | 0.051 | 0.037 | 0.046 | 0.011 | 0.152 |
| | follow up 1 | 12 | 0.049 | 0.047 | 0.034 | 0.011 | 0.182 |
| | follow up 2 | 7 | 0.033 | 0.030 | 0.022 | 0.004 | 0.091 |
| ≥35 Jahre | baseline | 6 | 0.079 | 0.088 | 0.050 | 0.019 | 0.252 |
| | follow up 1 | 2 | 0.109 | 0.098 | 0.109 | 0.040 | 0.179 |
| | follow up 2 | 1 | 0.046 | . | 0.046 | 0.046 | 0.046 |

Tabelle 15: zeitlicher Verlauf der EPC-Werte von MMD-Patienten getrennt nach Alterskategorien
 EPC-Werte der MMD-Gruppe zu den Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert

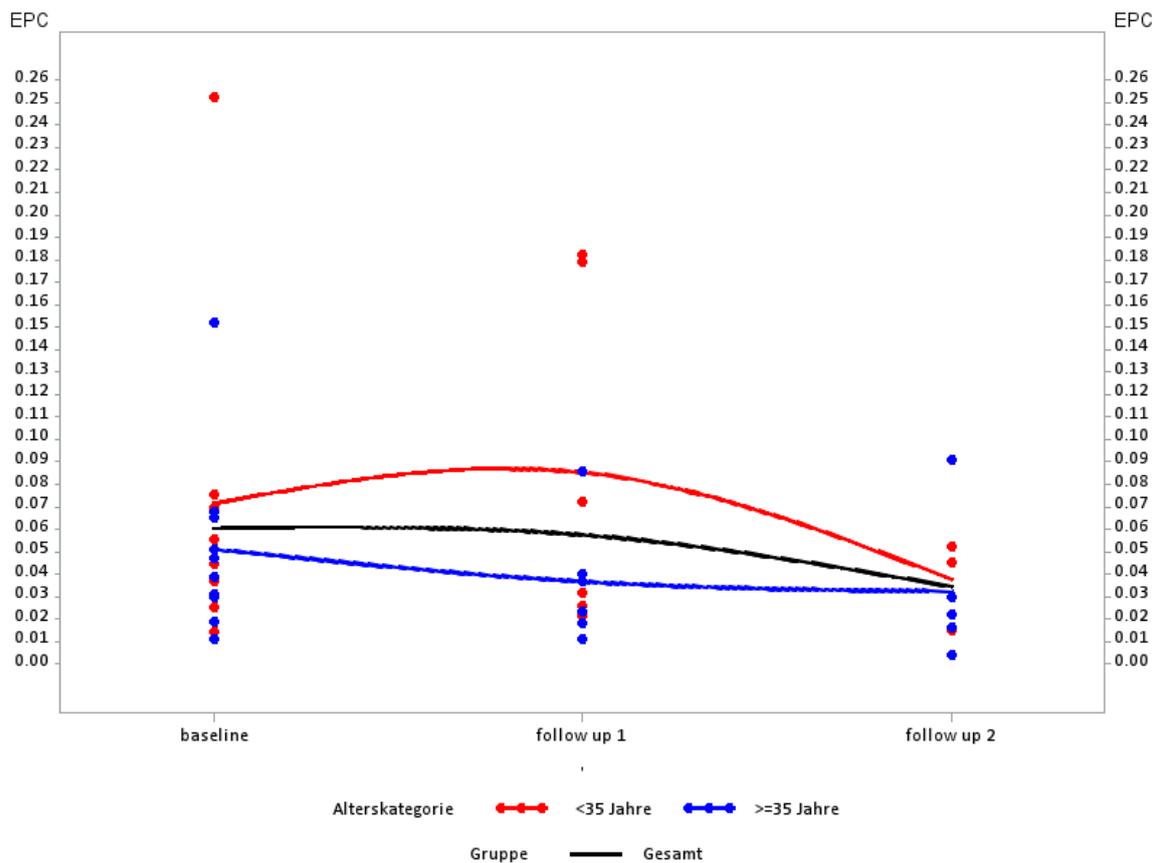


Abbildung 4-9: EPC-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Alter

Die rote Kurve zeigt den Verlauf von Patienten unter 35 Jahren, die rote Kurve den Verlauf von Patienten im Alter von 35 oder mehr Jahren zu den Untersuchungszeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. Der Verlauf insgesamt wird durch die schwarze Kurve dargestellt. Die Punkte stellen Einzelwerte der verschiedenen Patienten dar, hier gilt die gleiche Farbkodierung wie für die Kurven.

Aus den deskriptiven Tabellen und Abbildungen kann man einen abnehmenden Zeittrend für die Gesamtgruppe erkennen, der aufgrund der unterschiedlichen individuellen Verläufen und den fehlenden Werten im Verlauf nicht deutlich genug wird. Außerdem werden bedeutende

geschlechts- und altersspezifische Unterschiede sichtbar (vgl. Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9). Zur Beantwortung der Fragestellung, ob es innerhalb der MMD-Gruppe statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Zeitpunkten gibt, wurde ein geeignetes statistisches Verfahren für wiederholte Messungen gewählt, das sogenannte gemischte Modell (vgl. 3.2.16), bei dem sowohl der Zeiteffekt, als auch die individuelle Effekte berücksichtigt werden konnten. Mit dem statistische Modell wurden sowohl der zeitlichen Verlauf als fester Zeiteffekt als auch die paarweisen Vergleiche zwischen den einzelnen Zeitpunkten geprüft. Das Testergebnis zeigt einen signifikanten festen Zeiteffekt (F-Test, $p < 0.0159$, vgl. Tabelle 16).

| Effekt | Zähler Freiheitsgrade | Nenner Freiheitsgrade | F-Statistik | p-Wert |
|--------|--------------------------|--------------------------|-------------|--------|
| Zeit | 2 | 16.2 | 5.41 | 0.0159 |

Tabelle 16: Test der Zeiteffekte der EPC Werte der MMD-Gruppe

Gemischtes Modell für Messwiederholungen. Der zeitliche Verlauf wird als fester Zeiteffekt berücksichtigt.

Die Ergebnisse der statistischen Überprüfung der paarweisen Vergleiche zwischen den einzelnen Zeitpunkten sind in der Tabelle 17 dargestellt. Dabei zeigte der Vergleich *baseline* vs. *follow up 1* keinen signifikanten Unterschied ($p=0.8323$), der Vergleich *baseline* vs. *follow up 2* jedoch zeigte signifikante Unterschiede ($p=0.0159$). Der Vergleich *follow up 1* vs. *follow up 2* zeigte ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede ($p=0.0051$).

| Zeit | Zeit | Schätzwert | Standardfehler | Freiheitsgrade | t-Wert | P-Wert |
|--------------------|--------------------|------------|----------------|----------------|--------|--------|
| <i>baseline</i> | <i>follow up 1</i> | -0.4198 | 1.9506 | 16.1 | -0.22 | 0.8323 |
| <i>baseline</i> | <i>follow up 2</i> | 7.2761 | 2.7354 | 18.1 | 2.66 | 0.0159 |
| <i>follow up 1</i> | <i>follow up 2</i> | 7.6959 | 2.3635 | 15.6 | 3.26 | 0.0051 |

Tabelle 17: Differenzen der kleinste-Quadrate-Mittelwerte der paarweisen Vergleiche im zeitlichen Verlauf der EPC-Werte der MMD-Gruppe

Gemischtes Modell für Messwiederholungen. Paarweise Vergleiche zwischen den einzelnen Zeitpunkten.

4.2.4 Absolute Differenzen

Tabelle 18 stellt die absoluten Differenzen der EPC-Werte dar. Zu beachten ist, dass bei dieser Darstellung nur Patienten eingehen, bei denen Paardifferenzen zwischen *baseline* und den jeweiligen *follow up* Zeitpunkten gebildet werden konnten. D.h., dass die Differenz 1 (*baseline* - *follow up 1*) aus den Daten von 9 Patienten und die Differenz 2 (*baseline* - *follow up 2*) aus den Daten von zwei Patienten berechnet wurden. Bei der Differenz 1 liegen sowohl der Mittelwert als auch der Median bei null. Bei der Differenz 2 sind Mittelwert und Median gleich (MW=

Median= -0.103), aber da diese aus den Daten von nur zwei Patienten gebildet wurde, ist diese Differenz statistisch nicht relevant.

| Gruppe | Zeitpunkte | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|--------|------------------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| MMD | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | -0.001 | 0.054 | 0.000 | 0.074 | 0.113 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | -0.134 | -0.103 | -0.134 | -0.207 | -0.061 |

Tabelle 18: Absolute Differenzen der EPC-Veränderungen gegenüber den baseline-Werten

Veränderung der EPC-Werte der MMD-Gruppe im zeitlichen Verlauf, dargestellt über die Differenz zwischen dem präoperativen Untersuchungswert und *follow up 1* bzw. *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen mit Paardifferenzen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

4.2.5 Relative Differenzen

Die relativen Differenzen (Definition siehe Kapitel 3.2.15) wurden ebenfalls nur für Patienten mit vollständigem Datensatz berechnet. Bei der relativen Differenz 1 liegen Mittelwert (15.065) und Median (-0.004) weit auseinander. Bei der relativen Differenz 2 sind Mittelwert und Median gleich groß (MW= Median= -61.086), aber da sie aus den Daten von nur zwei Patienten gebildet wurde, ist diese Differenz statistisch nicht relevant (vgl. Tabelle 19).

| Gruppe | Zeitpunkte | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|--------|------------------------------|---|---------|--------|---------|---------|---------|
| MMD | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | 15.009 | 65.065 | -0.004 | -43.433 | 162.543 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | -61.086 | 29.544 | -61.086 | -81.976 | -40.195 |

Tabelle 19: Relative Differenzen der EPC-Veränderungen gegenüber der baseline Untersuchung

Veränderung der EPC-Werte der MMD-Gruppe im zeitlichen Verlauf, dargestellt über die relative Differenzen zwischen dem präoperativen Untersuchungswert und *follow up 1* bzw. *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen mit Paardifferenzen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

4.2.6 Prozentuale Veränderung

Zusätzlich wurde die prozentuale Veränderung der EPC-Werte als prozentuale Veränderung zwischen dem standardisiertem *baseline*-Wert (=100%) und den Werten zum *follow up 1* bzw. *follow up 2* (prozentuale Veränderung 1 = $(\text{follow up 1} / \text{baseline}) * 100$; prozentuale Veränderung 2 = $(\text{follow up 2} / \text{baseline}) * 100$) gebildet. Die prozentualen Veränderungen wurden ebenfalls nur für Patienten mit vollständigem Datensatz berechnet. In Tabelle 20 sind die statistischen Kennwerte der prozentualen Veränderungen dargestellt. Bei der prozentualen Veränderung 1 deutet sowohl der Mittelwert (MW=115) als auch der Median (Median=100) auf bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten hin (Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben, $p=0.004$). Bei der prozentualen Veränderung 2 sind Mittelwert und Median gleich

groß (MW= Median= 39), aber da sie aus den Daten von nur zwei Patienten gebildet wurde, ist diese Differenz statistisch nicht relevant.

| Gruppe | Zeitpunkte | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|--------|-----------------------|---|---------|--------|--------|--------|---------|
| MMD | baseline- follow up 1 | 9 | 115.009 | 65.065 | 99.996 | 56.567 | 262.543 |
| | baseline- follow up 2 | 2 | 38.914 | 29.544 | 38.914 | 18.024 | 59.805 |

Tabelle 20: prozentuale EPC-Veränderungen gegenüber standardisierten baseline-Werten

Veränderung der EPC-Werte der MMD-Gruppe im zeitlichen Verlauf, dargestellt über die prozentuale Veränderung zwischen standardisiertem präoperativen Untersuchungswert (=100%) und follow up 1 bzw. follow up 2. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

Abbildung 4-10 stellt die Einzelverläufe der prozentualen Veränderungen dar.

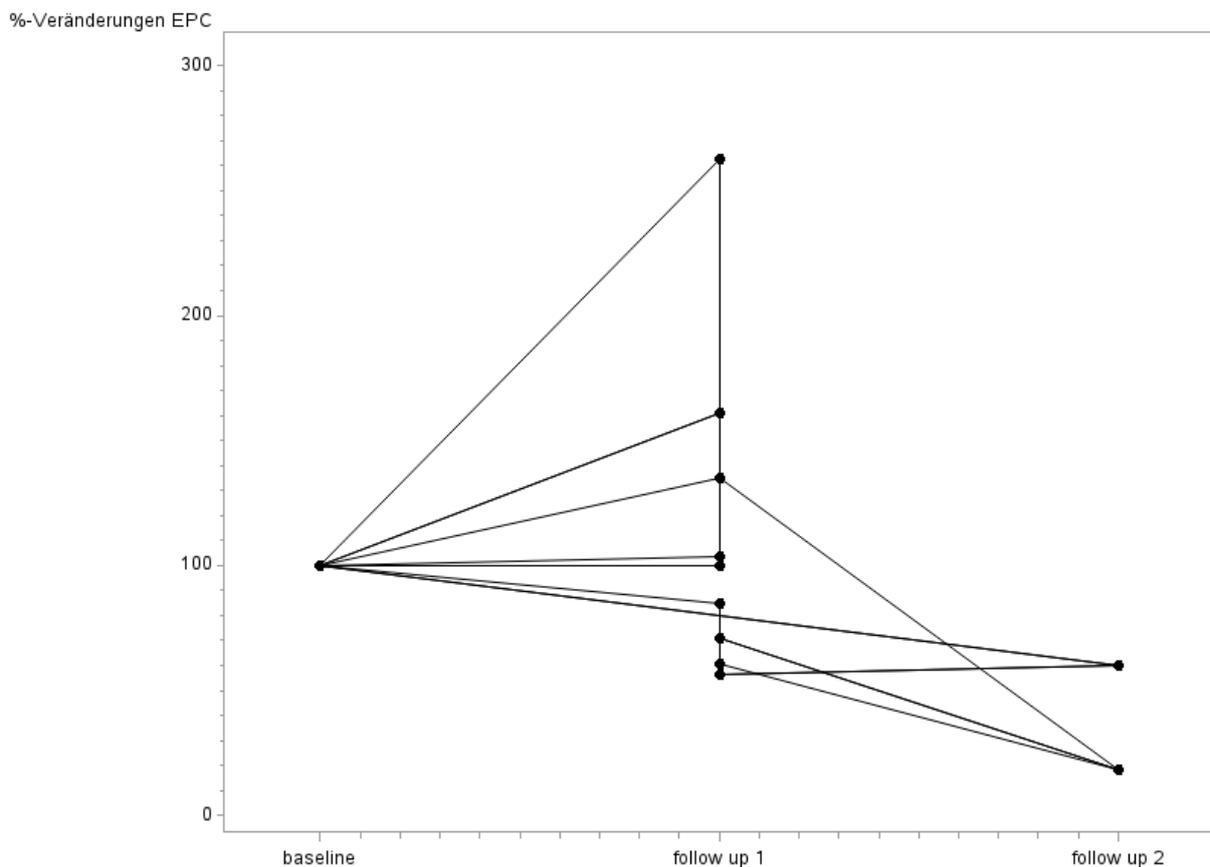


Abbildung 4-10: Einzelverläufe der EPC-Werte der MMD-Gruppe

Dargestellt als prozentuale Veränderung zwischen standardisiertem präoperativen Untersuchungswert (=100%) und follow up 1 bzw. follow up 2.

4.3 Angiopoietine

4.3.1 Western Blot vs. ELISA

Mittels Western Blots konnte die Anwesenheit von Ang1, Ang2 und Tie2 im Serum qualitativ nachgewiesen werden. Abbildung 4-11, Abbildung 4-12 und Abbildung 4-13 zeigen repräsentative Western Blots. Zur quantitativen Analyse wurden im folgendem ELISA verwendet, weshalb auf eine densitrometische Auswertung der Western Blots verzichtet wurde.

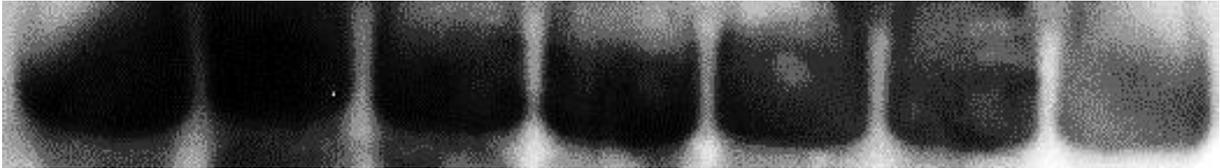


Abbildung 4-11: Western Blot anti Ang-1

Beispielabbildung. In der SDS-PAGE aufgetrennte Serumproteine nach Reaktion mit einem anti-Ang-1-AK (57 kDa). Die ersten drei Banden von links stellen gesunde Kontrollen dar, die folgenden vier Banden MMD-Patienten.



Abbildung 4-12: Western Blot anti Ang-2

Beispielabbildung. In der SDS-PAGE aufgetrennte Serumproteine nach Reaktion mit einem anti-Ang-2-AK (65 kDa). Die ersten drei Banden von links stellen gesunde Kontrollen dar, die folgenden vier Banden MMD-Patienten.



Abbildung 4-13: Western Blot anti Tie-2

Beispielabbildung. In der SDS-PAGE aufgetrennte Serumproteine nach Reaktion mit einem anti-Tie-2-AK (126 kDa). Die ersten drei Banden von links stellen gesunde Kontrollen dar, die folgenden vier Banden MMD-Patienten.

4.3.2 Ang-1, Ang-2 und Ang-2/Ang-1 Ratio

Tabelle 21 stellt die drei Variablen Ang-1, Ang-2 und des Quotienten aus Ang-2 durch Ang-1 getrennt nach Gruppen zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten vergleichend dar. Bei zwei MMD-Patienten (ID=107 und 108) konnten weder in der *baseline* noch im Verlauf Messungen durchgeführt werden, sie wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt. Die Variablen Ang-1 und Ang-2 werden in den Kapiteln 4.3.3 bis 4.3.5 beschrieben, die Ang-2/Ang-1-Ratio wird ausführlich in den Kapiteln 4.3.6 bis 4.3.8 vorgestellt.

| Variable | Gruppe | Zeitpunkt | N | MW | Std | Min | Median | Max |
|-------------|-----------|--------------------|----|-------|-------|-------|--------|-------|
| Ang-1 | Kontrolle | <i>baseline</i> | 9 | 90.94 | 48.99 | 53.83 | 75.48 | 211.5 |
| | MMD | <i>baseline</i> | 17 | 96.20 | 47.56 | 36.70 | 104.4 | 157.9 |
| | MMD | <i>follow up 1</i> | 14 | 125.8 | 52.23 | 30.76 | 138.0 | 225.5 |
| | MMD | <i>follow up 2</i> | 8 | 107.4 | 49.61 | 37.29 | 134.6 | 153.1 |
| | ACVD | <i>baseline</i> | 13 | 81.87 | 45.57 | 27.82 | 70.25 | 151.0 |
| | ACVD | <i>follow up 1</i> | 1 | 128.5 | . | 128.5 | 128.5 | 128.5 |
| Ang-2 | Kontrolle | <i>baseline</i> | 9 | 0.422 | 0.102 | 0.319 | 0.413 | 0.626 |
| | MMD | <i>baseline</i> | 17 | 0.846 | 0.909 | 0.250 | 0.528 | 3.601 |
| | MMD | <i>follow up 1</i> | 14 | 1.287 | 1.379 | 0.513 | 0.659 | 4.511 |
| | MMD | <i>follow up 2</i> | 8 | 1.130 | 0.742 | 0.487 | 0.845 | 2.660 |
| | ACVD | <i>baseline</i> | 13 | 0.561 | 0.132 | 0.317 | 0.611 | 0.697 |
| | ACVD | <i>follow up 1</i> | 1 | 0.583 | . | 0.583 | 0.583 | 0.583 |
| Ang-2/Ang-1 | Kontrolle | <i>baseline</i> | 9 | 0.005 | 0.002 | 0.002 | 0.006 | 0.008 |
| | MMD | <i>baseline</i> | 17 | 0.009 | 0.007 | 0.002 | 0.008 | 0.025 |
| | MMD | <i>follow up 1</i> | 14 | 0.011 | 0.009 | 0.003 | 0.005 | 0.029 |
| | MMD | <i>follow up 2</i> | 8 | 0.014 | 0.011 | 0.004 | 0.009 | 0.032 |
| | ACVD | <i>baseline</i> | 13 | 0.009 | 0.006 | 0.004 | 0.008 | 0.022 |
| | ACVD | <i>follow up 1</i> | 1 | 0.005 | . | 0.005 | 0.005 | 0.005 |

Tabelle 21: Ang-2, Ang-1 und Ang-2/Ang-1 Ratio nach Gruppen

Darstellung der Werte von Ang-1, Ang-2 und des Quotienten aus Ang-2 durch Ang-1 getrennt nach Gruppen und Untersuchungszeitpunkten. N: Anzahl der Beobachtungen der spezifischen Variable, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert

4.3.3 Ang-1, Ang-2 Vergleich der Gruppen in der *baseline*

Die statistischen Kennwerte der zwei Variablen in der *baseline* Untersuchung getrennt nach den drei Gruppen sind in der Tabelle 32 dargestellt. Abbildung 4-14 stellt die *baseline*-Werte von Ang-1 getrennt nach den drei Gruppen anhand von Box- und Whiskerplots dar.

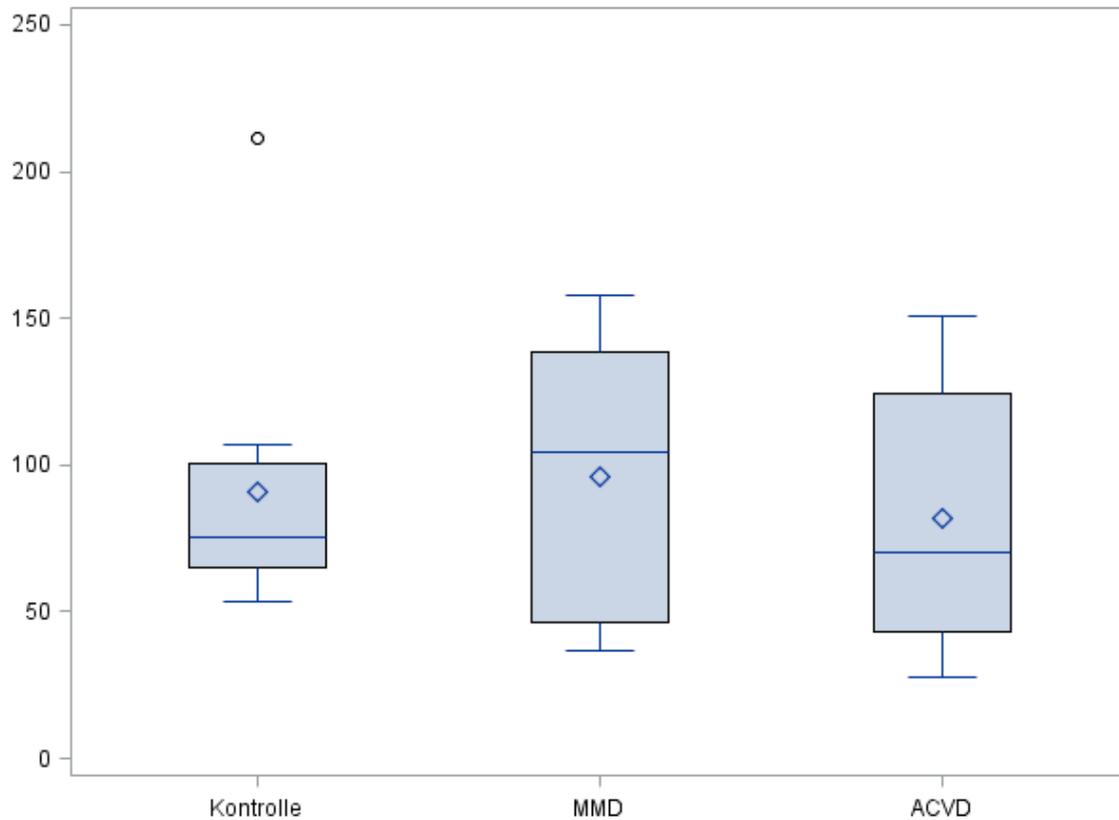


Abbildung 4-14: Ang-1- baseline-Werte in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe.

Die Box stellt das 25%-Quantil bzw. 75%-Quantil dar; in der Box stellt der Querstrich den Median und der Rhombus den Mittelwert dar. Die Linien (Whiskers) außerhalb der Box, stellen das Minimum bzw. Maximum der EPC-Werte dar. Die einzelnen Werte außerhalb des Box- und Whiskerplots stellen die Ausreißer dar.

In der Abbildung 4-15 sind die *baseline*-Werte von Ang-2 nach den drei Gruppen anhand von Box- und Whiskerplots dargestellt. Auffallend ist hier die weite Streuung in der MMD-Gruppe.

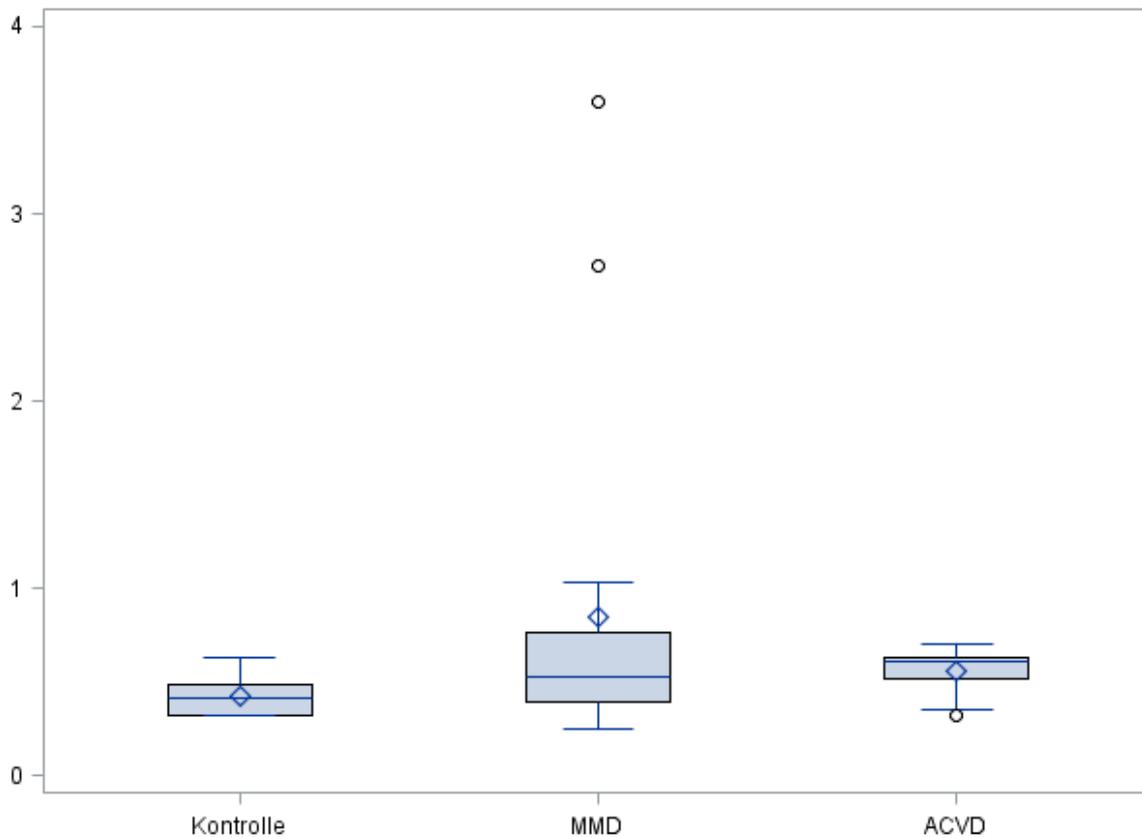


Abbildung 4-15: Ang-2- baseline-Werte in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe.

Die Box stellt das 25%-Quantil bzw. 75%-Quantil dar; in der Box stellt der Querstrich den Median und der Rhombus den Mittelwert dar. Die Linien (Whiskers) außerhalb der Box, stellen das Minimum bzw. Maximum der EPC-Werte dar. Die einzelnen Werte außerhalb des Box- und Whiskerplots stellen die Ausreißer dar.

Die statistische Prüfung des Vergleichs der drei Gruppen bezüglich der Ang-1- und Ang-2-Werte in der *baseline* Untersuchung wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Abbildung 4-16 zeigt die Verteilung der Wilcoxon-Scores der Ang-1- Werte. Die *baseline*-Werte der beiden Patienten-Gruppen MMD und ACVD haben eine größere Streuung als die der gesunden Kontrollen, statistisch bedeutende Unterschiede zwischen den drei Gruppen bezüglich den *baseline*-Werten sind jedoch nicht nachweisbar (Kruskal-Wallis-Test, $p=0.8327$).

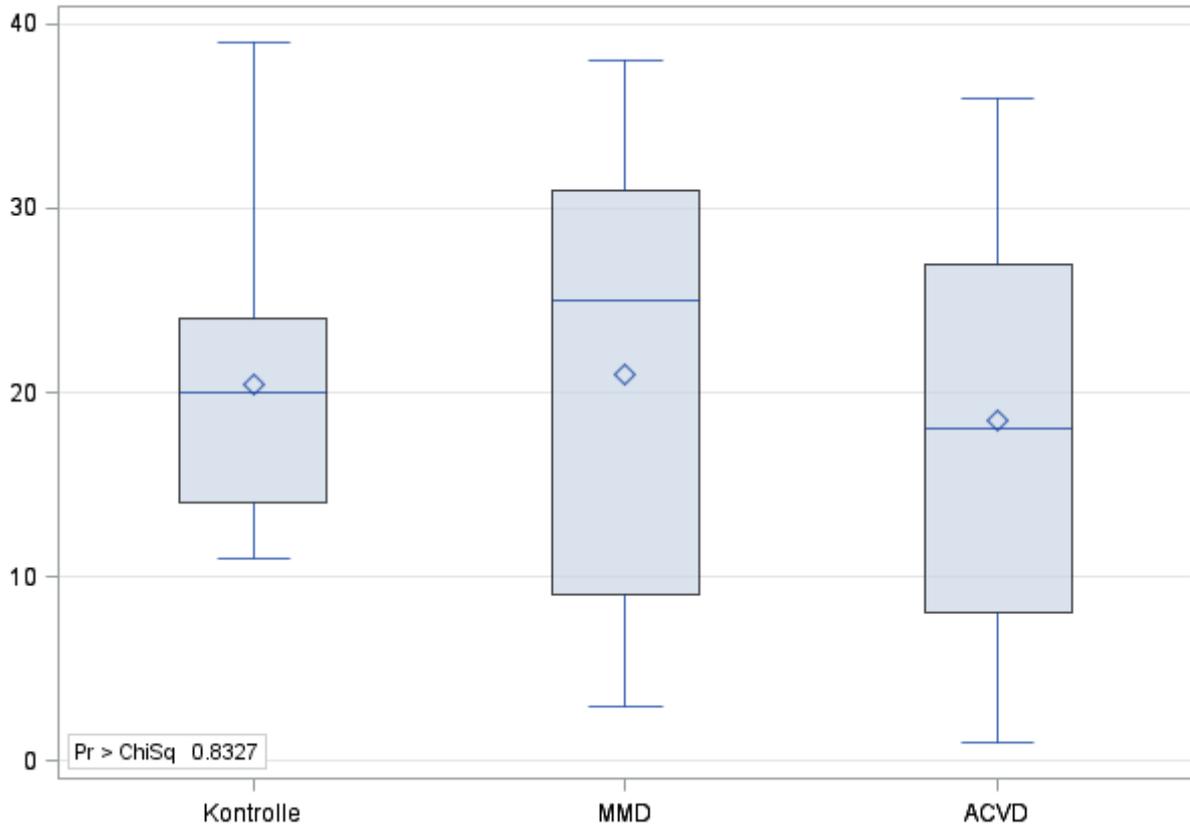


Abbildung 4-16: Vergleich der transformierten Ang-1-baseline-Werte (Wilcoxon-Scores) in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe.

Die Box stellt das 25%-Quantil bzw. 75%-Quantil dar; in der Box stellt der Querstrich den Median und der Rhombus den Mittelwert dar. Die Linien (Whiskers) außerhalb der Box, stellen das Minimum bzw. Maximum der EPC-Werte dar. Die Legende innerhalb der Abbildung stellt den P-Wert (0.8327) als Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests dar.

Abbildung 4-17 zeigt die Verteilung der Wilcoxon-Scores der Ang-2-Werte. Die *baseline*-Werte der beiden Patienten-Gruppen MMD und ACVD liegen höher als die der gesunden Kontrollen, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den *baseline*-Werten der drei Gruppen sind zum 5% Signifikanzniveau nicht nachweisbar (Kruskal-Wallis-Test, $p=0.0789$).

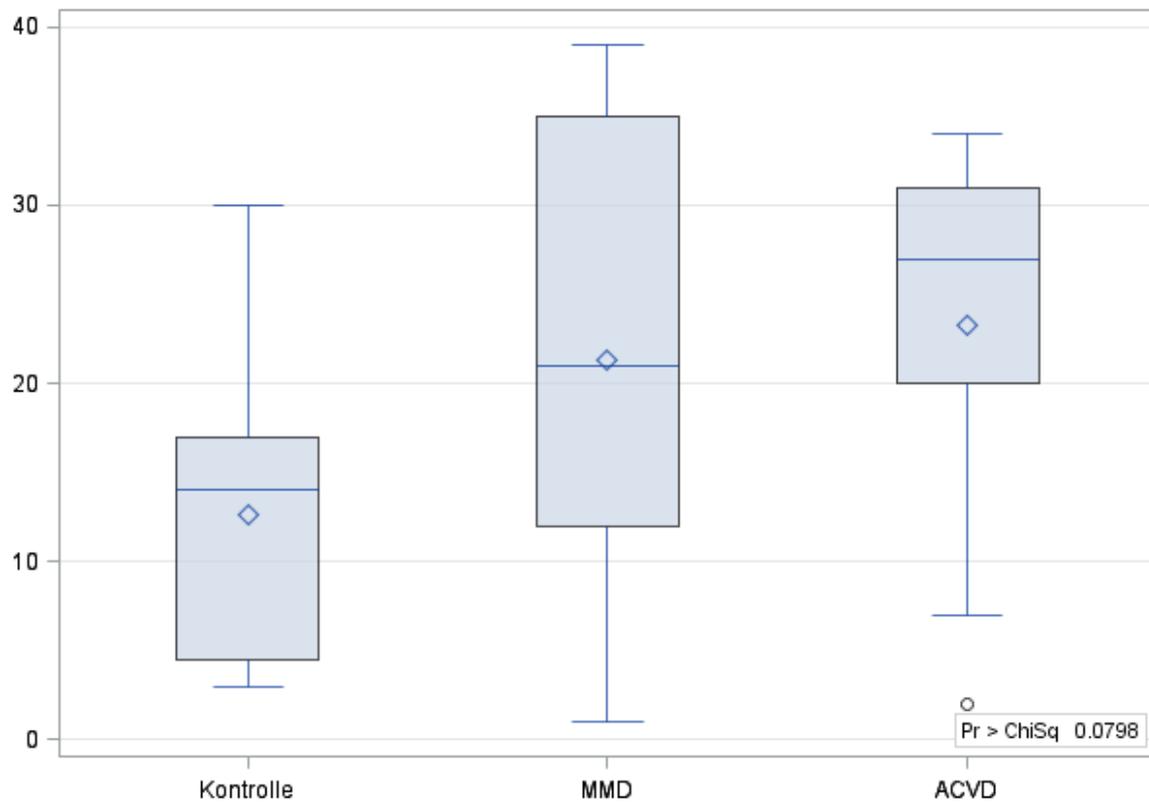


Abbildung 4-17: Vergleich der transformierten Ang-2-baseline-Werte (Wilcoxon-Scores) in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe.

Die Box stellt das 25%-Quantil bzw. 75%-Quantil dar; in der Box stellt der Querstrich den Median und der Rhombus den Mittelwert dar. Die Linien (Whiskers) außerhalb der Box, stellen das Minimum bzw. Maximum der EPC-Werte dar. Die Legende innerhalb der Abbildung stellt den P-Wert(0.0798) als Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests dar.

4.3.4 Ang-1, Ang-2 im Verlauf

Der Verlauf der Variablen Ang-1 und Ang-2 getrennt nach Gruppen zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten ist in der Tabelle 21: Ang-2, Ang-1 und Ang-2/Ang-1 Ratio nach Gruppen dargestellt. Tabelle 22, Tabelle 23 und Tabelle 25 stellen den zeitlichen Verlauf der Ang-1- und Ang-2-Werte der MMD-Gruppe getrennt nach Geschlecht und Alterskategorien dar.

Tabelle 33 stellt die statistischen Kennwerte der Variablen Ang-1 der MMD-Gruppe stratifiziert nach Geschlecht im zeitlichen Verlauf dar. Auch hier sind die Mittelwerte und Mediane der weiblichen Patientinnen niedriger als die der männlichen Patienten.

| Geschlecht | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|------------|-------------------|----|--------|-------|--------|--------|--------|
| f | <i>baseline</i> | 11 | 93.82 | 49.33 | 91.80 | 37.57 | 157.92 |
| | <i>follow up1</i> | 12 | 123.20 | 56.16 | 138.01 | 30.76 | 225.50 |
| | <i>follow up2</i> | 7 | 102.90 | 51.83 | 133.11 | 37.29 | 153.13 |
| m | <i>baseline</i> | 6 | 100.56 | 48.33 | 127.26 | 36.70 | 138.28 |
| | <i>follow up1</i> | 2 | 141.20 | 14.87 | 141.20 | 130.68 | 151.72 |
| | <i>follow up2</i> | 1 | 138.56 | . | 138.56 | 138.56 | 138.56 |

Tabelle 22: Zeitlicher Verlauf der Ang-1-Werte in der MMD-Gruppe nach Geschlecht

Ang-1 getrennt nach weiblichen (f) und männlichen (m) MMD-Patienten zu den Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

Der zeitliche Verlauf der einzelnen Ang-1-Werte der MMD-Gruppe getrennt nach Geschlecht ist in der Abbildung 4-18 dargestellt. Auffallend ist hier der Kurvenverlauf der männlichen Patienten (blaue Kurve), der über die Kurven der weiblichen Patienten (rote Kurve) und der Gesamtgruppe (schwarze Kurve) liegt.

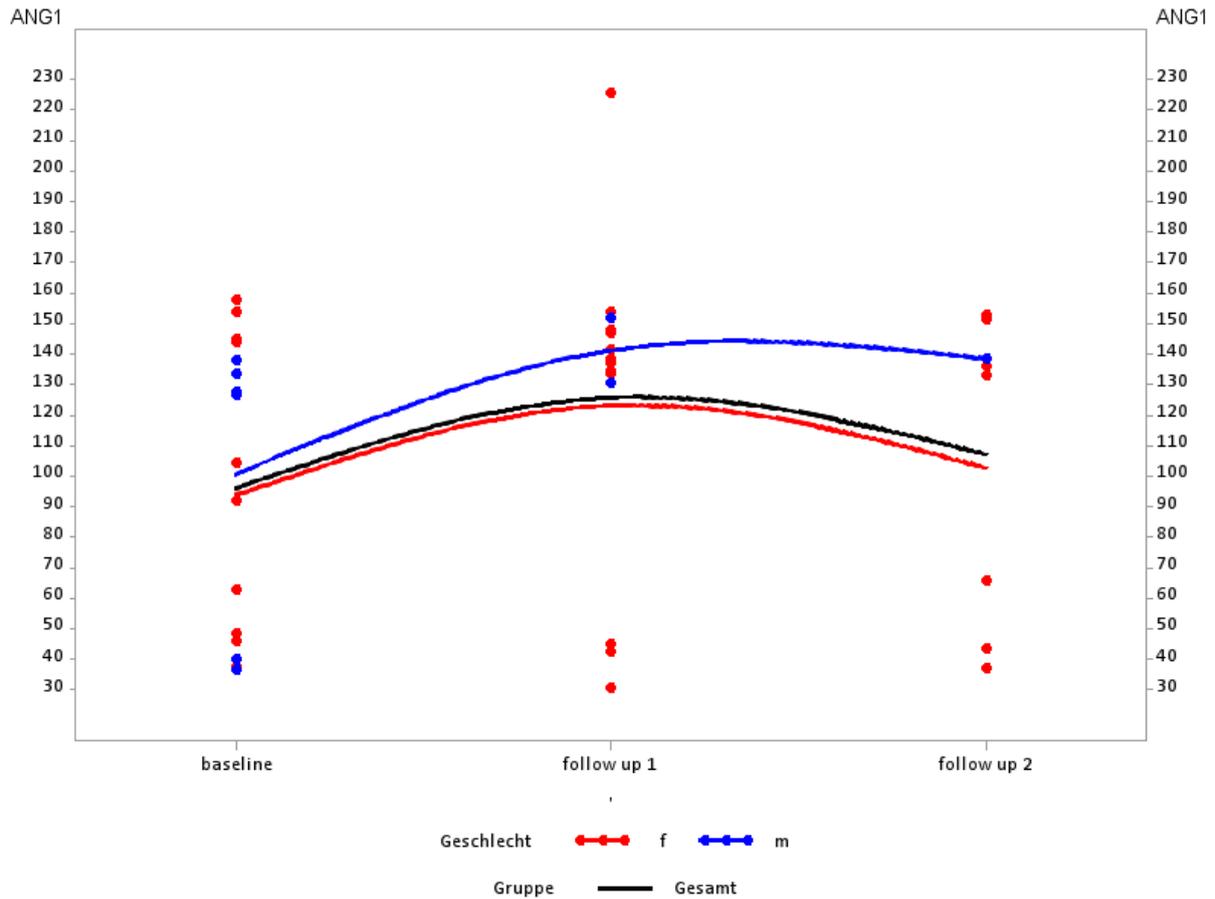


Abbildung 4-18: Ang-1-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Geschlecht

Die rote Kurve zeigt den Verlauf von weiblichen, die blaue Kurve den Verlauf von männlichen Patienten zu den Untersuchungszeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. Der Verlauf der Ang-1-Werte von allen MMD-Patienten wird durch die schwarze Kurve dargestellt. Die Punkte stellen Einzelwerte der verschiedenen Patienten dar, hier gilt die gleiche Farbkodierung wie für die Kurven.

Tabelle 23 stellt die statistischen Kennwerte der Variablen Ang-1 der MMD-Gruppe stratifiziert nach Alterskategorien im zeitlichen Verlauf dar. Mittelwerte und Mediane der älteren (≥ 35 Jahre) Patienten sind niedriger als die der jüngeren (< 35 Jahren) Patienten. Der zeitliche Verlauf der einzelnen Ang-1-Werte der MMD-Gruppe, getrennt nach Alterskategorien, ist in der Abbildung 4-19 dargestellt.

| Alters-kate- gorie | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|-----------------------|--------------------|---|--------|-------|--------|-------|--------|
| <35 Jahre | <i>baseline</i> | 7 | 97.31 | 52.13 | 127.76 | 37.57 | 145.15 |
| | <i>follow up 1</i> | 6 | 127.32 | 42.31 | 141.14 | 42.75 | 153.70 |
| | <i>follow up 2</i> | 3 | 111.16 | 59.05 | 138.56 | 43.40 | 151.54 |
| ≥35 Jahre | <i>baseline</i> | 9 | 88.92 | 44.83 | 91.80 | 36.70 | 157.92 |
| | <i>follow up 1</i> | 8 | 124.61 | 61.52 | 138.01 | 30.76 | 225.50 |
| | <i>follow up 2</i> | 5 | 105.07 | 50.46 | 133.11 | 37.29 | 153.13 |

Tabelle 23: Zeitlicher Verlauf der Ang-1-Werte in der MMD-Gruppe nach Alterskategorien

Ang-1 getrennt nach jüngeren (<35 Jahren) und älteren (≥35 Jahre) MMD-Patienten zu den Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

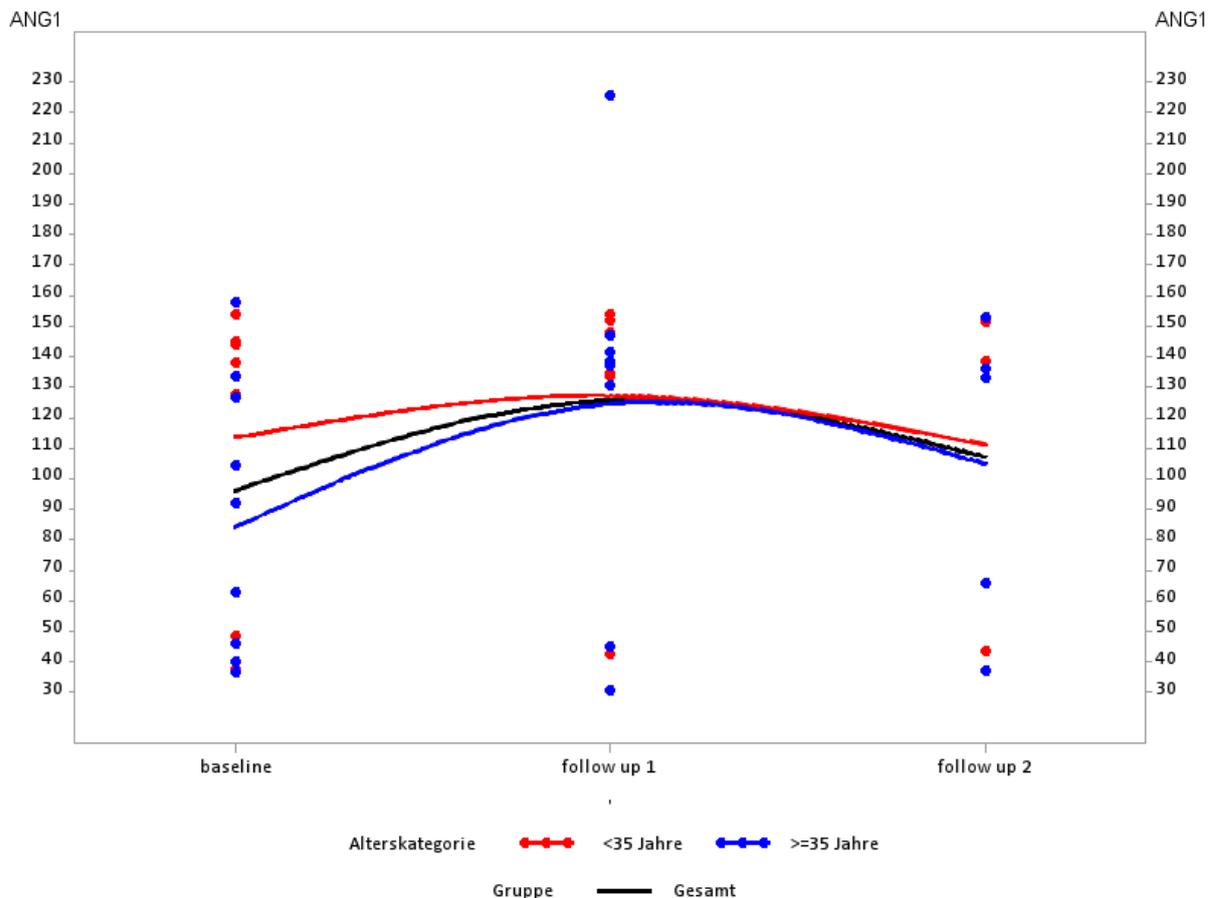


Abbildung 4-19: Ang-1-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Alterskategorien

Die rote Kurve zeigt den Verlauf von jüngeren (<35 Jahre) Patienten, die blaue Kurve den Verlauf der älteren (≥35 Jahre) Patienten zu den Untersuchungszeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. Der Verlauf insgesamt wird durch die schwarze Kurve dargestellt. Die Punkte stellen Einzelwerte der verschiedenen Patienten dar, hier gilt die gleiche Farbkodierung wie für die Kurven.

Aus den deskriptiven Tabellen und Abbildungen kann man keinen klaren Zeittrend für die Variable Ang-1 in der Gesamtgruppe erkennen. Außerdem werden sowohl individuelle

Unterschiede als auch geschlechts- und altersspezifische Unterschiede sichtbar (vgl. Abbildung 4-18 Abbildung 4-19). Die statistische Prüfung erfolgte auch hier mit Hilfe des gemischten Modells und bestätigt die deskriptiven Ergebnisse, d.h. es konnte kein fester Zeiteffekt nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 24, F-Test $p=0.1734$). Die Ergebnisse der statistischen Überprüfung der paarweisen Vergleiche bestätigen diesen Trend ebenfalls (vgl. Tabelle 25).

| Effekt | Zähler Freiheitsgrade | Nenner Freiheitsgrade | F-Statistik | p-Wert |
|--------|--------------------------|--------------------------|-------------|--------|
| Zeit | 2 | 21.5 | 1.90 | 0.1734 |

Tabelle 24: Tests der festen Effekte der Ang-1 Werte der MMD-Gruppe

Statistische Prüfung auf Unterschiede der Ang-1 Werte zwischen den drei Zeitpunkten innerhalb der MMD-Gruppe mit dem gemischten Modell für wiederholte Messungen. In das Modell wurde der Zeitfaktor als fester Effekt und die Patienten als individuelle Effekte dargestellt.

| Zeit | _Zeit | Schätzwert | Standardfehler | Freiheitsgrade | t-Wert | p-Wert |
|--------------------|--------------------|------------|----------------|----------------|--------|--------|
| <i>baseline</i> | <i>follow up 1</i> | -6.6164 | 3.3891 | 20.6 | -1.95 | 0.0646 |
| <i>baseline</i> | <i>follow up 2</i> | -4.2563 | 4.4759 | 27.5 | -0.95 | 0.3499 |
| <i>follow up 1</i> | <i>follow up 2</i> | 2.3601 | 4.1505 | 19.9 | 0.57 | 0.5760 |

Tabelle 25: Differenzen kleinste-Quadrate-Mittelwerte der paarweisen zeitlichen Effekte der Ang-1-Werte der MMD-Gruppe

Paarweise Vergleiche der Ang-1 Werte der MMD-Gruppe zwischen den drei Messzeitpunkten (*baseline* vs. *follow up 1*, *baseline* vs. *follow up 2* und *follow up 1* vs. *follow up 2*)

Tabelle 26 stellt die statistischen Kennwerte der Variablen Ang-2 der MMD-Gruppe stratifiziert nach Geschlecht im zeitlichen Verlauf dar. Hier sind die Unterschiede zwischen den Mittelwerten und Medianen der weiblichen und der männlichen Patienten deutlicher als bei Ang-1 zu sehen. Der zeitliche Verlauf der einzelnen Ang-2-Werte der MMD-Gruppe, getrennt nach Geschlecht, ist in der Abbildung 4-20 dargestellt.

| Geschlecht | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|------------|--------------------|----|------|------|--------|------|------|
| F | <i>baseline</i> | 11 | 0.80 | 0.95 | 0.50 | 0.25 | 3.60 |
| | <i>follow up 1</i> | 12 | 1.12 | 1.25 | 0.63 | 0.51 | 4.51 |
| | <i>follow up 2</i> | 7 | 0.91 | 0.44 | 0.67 | 0.49 | 1.74 |
| M | <i>baseline</i> | 6 | 0.94 | 0.91 | 0.57 | 0.34 | 2.73 |
| | <i>follow up 1</i> | 2 | 2.28 | 2.30 | 2.28 | 0.66 | 3.91 |
| | <i>follow up 2</i> | 1 | 2.66 | . | 2.66 | 2.66 | 2.66 |

Tabelle 26: Zeitlicher Verlauf der Ang-2-Werte in der MMD-Gruppe nach Geschlecht

Ang-2 getrennt nach weiblichen (f) und männlichen (m) MMD-Patienten zu den Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

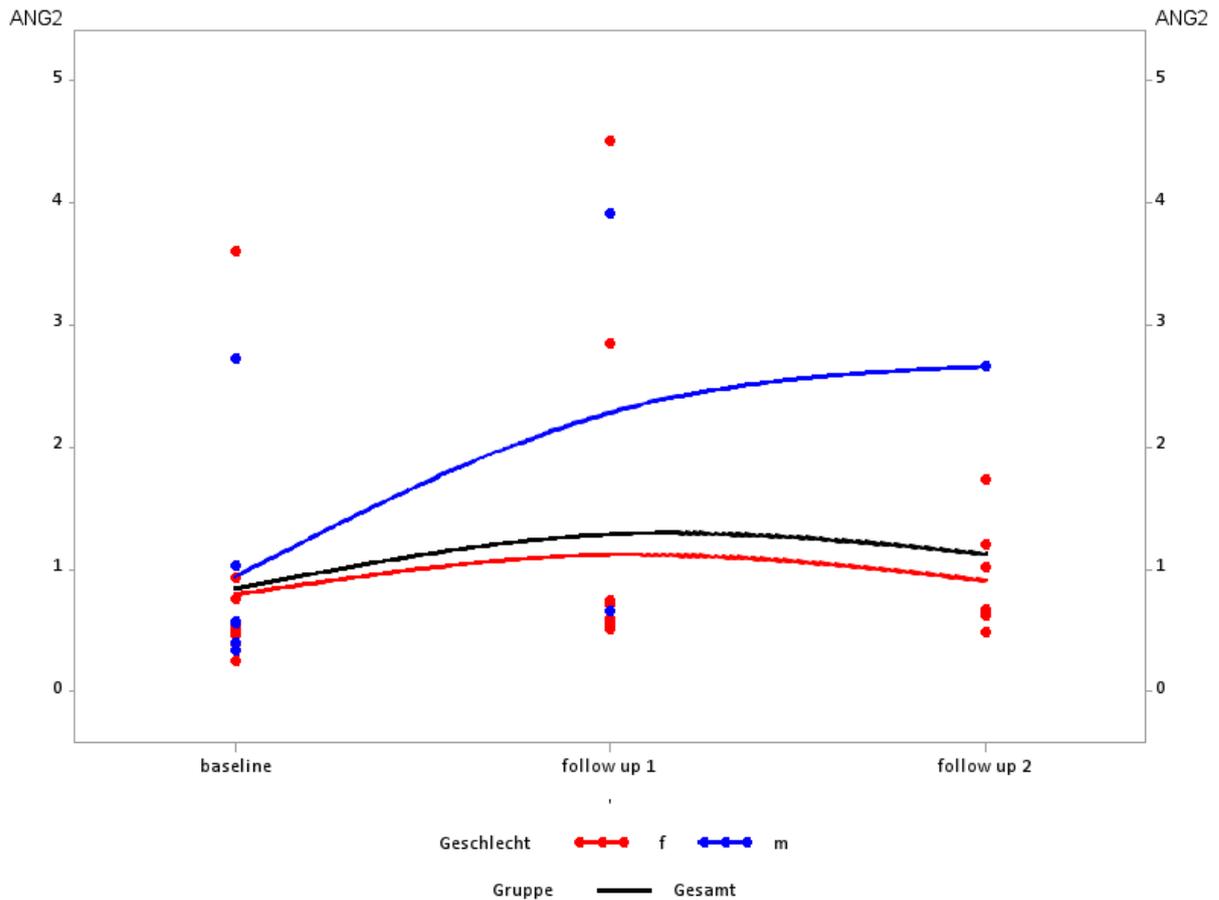


Abbildung 4-20: Ang-2-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Geschlecht

Die rote Kurve zeigt den Verlauf von weiblichen, die blaue Kurve den Verlauf von männlichen Patienten zu den Untersuchungszeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. Der Verlauf der Ang-1-Werte insgesamt wird durch die schwarze Kurve dargestellt. Die Punkte stellen Einzelwerte der verschiedenen Patienten dar, hier gilt die gleiche Farbkodierung wie für die Kurven.

Tabelle 27 stellt die statistischen Kennwerte der Variablen Ang-2 der MMD-Gruppe stratifiziert nach Alterskategorien im zeitlichen Verlauf dar. Bei beiden Variablen sind die Mittelwerte und Mediane der älteren (≥ 35 Jahre) Patienten niedriger als die der jüngeren (< 35 Jahre) Patienten.

| Alters-kategorie | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|------------------|--------------------|---|------|------|--------|------|------|
| <35 Jahre | <i>baseline</i> | 7 | 1.31 | 1.31 | 0.55 | 0.39 | 3.60 |
| | <i>follow up 1</i> | 6 | 2.19 | 1.79 | 1.76 | 0.57 | 4.51 |
| | <i>follow up 2</i> | 3 | 1.39 | 1.13 | 1.02 | 0.49 | 2.66 |
| ≥35 Jahre | <i>baseline</i> | 9 | 0.52 | 0.22 | 0.53 | 0.25 | 0.93 |
| | <i>follow up 1</i> | 8 | 0.61 | 0.08 | 0.58 | 0.51 | 0.74 |
| | <i>follow up 2</i> | 5 | 0.97 | 0.49 | 0.67 | 0.63 | 1.74 |

Tabelle 27: zeitlicher Verlauf der Ang-2-Werte in der MMD-Gruppe nach Alterskategorien

Ang-2 getrennt nach jüngeren (<35 Jahren) und älteren (≥35 Jahre) MMD-Patienten zu den Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

Der zeitliche Verlauf der einzelnen Ang-2-Werte der MMD-Gruppe, getrennt nach Alterskategorien, ist in der Abbildung 4-21 dargestellt. Hier sind die Unterschiede zwischen *älteren und jüngeren* Patienten sehr deutlich zu sehen.

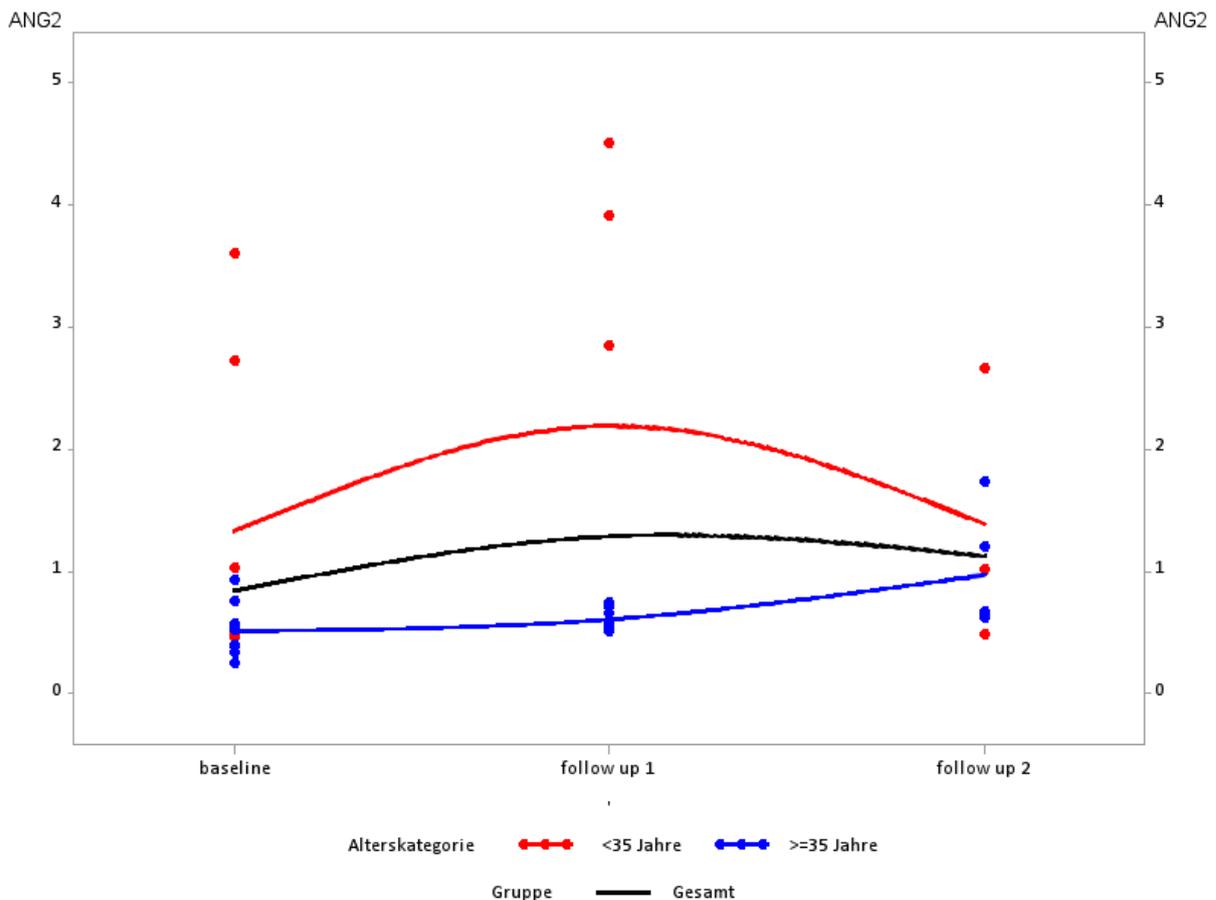


Abbildung 4-21: Ang-2-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Alterskategorien

Die rote Kurve zeigt den Verlauf von jüngeren (<35 Jahre) Patienten, die blaue Kurve den Verlauf der älteren (≥35 Jahre) Patienten zu den Untersuchungszeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*.

up 2. Der Verlauf insgesamt wird durch die schwarze Kurve dargestellt. Die Punkte stellen Einzelwerte der verschiedenen Patienten dar, hier gilt die gleiche Farbkodierung wie für die Kurven.

Aus den deskriptiven Tabellen und Abbildungen kann man sowohl individuelle Unterschiede als auch bedeutende Geschlechts- und Altersspezifische Unterschiede erkennen (vgl. Abbildung 4-20, Abbildung 4-21). Die statistische Prüfung erfolgte auch hier mit Hilfe des gemischten Modells und bestätigt die deskriptiven Ergebnisse, d.h. es sind feste Zeiteffekte nachweisbar (vgl. Tabelle 28, F-Test, $p=0.0501$). Die Ergebnisse der statistischen Überprüfung der paarweisen Vergleiche bestätigen diesen Trend für die ersten zwei Vergleiche (vgl. Tabelle 29).

| Effekt | Zähler Freiheitsgrade | Nenner Freiheitsgrade | F-Statistik | p-Wert |
|--------|--------------------------|--------------------------|-------------|--------|
| Zeit | 2 | 25.7 | 3.37 | 0.0501 |

Tabelle 28: Test der festen Zeiteffekte der Ang-2- Werte der MMD-Gruppe

Gemischtes Modell für Messwiederholungen. Der zeitliche Verlauf wird als fester Zeiteffekt berücksichtigt.

| Zeit | Zeit | Schätzwert | Standardfehler | Freiheitsgrade | t-Wert | p-Wert |
|--------------------|--------------------|------------|----------------|----------------|--------|--------|
| <i>baseline</i> | <i>follow up 1</i> | -7.3258 | 3.5164 | 24.4 | -2.08 | 0.0479 |
| <i>baseline</i> | <i>follow up 2</i> | -10.3709 | 4.4941 | 31.9 | -2.31 | 0.0277 |
| <i>follow up 1</i> | <i>follow up 2</i> | -3.0450 | 4.3288 | 23.9 | -0.70 | 0.4886 |

Tabelle 29: Differenzen kleinste-Quadrate-Mittelwerte der paarweisen zeitlichen Effekte der Ang-2-Werte der MMD-Gruppe

Gemischtes Modell für Messwiederholungen. Paarweise Vergleiche zwischen den einzelnen Zeitpunkten.

4.3.5 Ang-1, Ang-2 Veränderungen gegenüber *baseline*

Tabelle 30 und Tabelle 31 stellen die absolute Differenzen, die relativen Differenzen und die prozentuale Veränderungen gegenüber *baseline* der Ang-1- bzw. der Ang-2-Werte dar. Interessant sind dabei die Veränderungen *baseline-follow up 1*, die bei allen Variablen relevant sind und auf bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten hinweisen (Wilcoxon Signed Rank-Test für Paardifferenzen: absolute Differenzen, relative Differenzen: $p=0.055$; prozentuale Veränderungen: $p=0.004$).

| Variabel | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max | Signed Rank p-Wert |
|---------------------------|------------------------------|---|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------|
| Absolute Differenzen | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | 40.094 | 56.230 | 23.957 | -10.936 | 162.836 | 0.055 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | -7.009 | 25.178 | -7.009 | -24.812 | 10.795 | |
| Relative Differenzen | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | 68.397 | 108.713 | 18.751 | -6.925 | 259.839 | 0.055 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | -3.631 | 17.084 | -3.631 | -15.712 | 8.449 | |
| Prozentuale Veränderungen | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | 168.397 | 108.713 | 118.751 | 93.075 | 359.839 | 0.004 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | 96.369 | 17.084 | 96.369 | 84.288 | 108.449 | |

Tabelle 30: Ang-1 - Veränderungen gegenüber der baseline -Werte in der MMD-Gruppe

Veränderung der Ang-1-Werte der MMD-Gruppe im zeitlichen Verlauf, dargestellt über die absolute, relative Differenz bzw. prozentuale Veränderung zwischen dem präoperativen Untersuchungswert und *follow up 1* bzw. *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen mit Paardifferenzen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert

| Variable | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max | Signed Rank p-Wert |
|----------------------------------|------------------------------|---|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------|
| Absolute Differenzen | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | 0.549 | 0.836 | 0.166 | -0.332 | 2.389 | 0.055 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | -0.102 | 0.051 | -0.102 | -0.138 | -0.066 | |
| Relative Differenzen | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | 90.170 | 173.020 | 25.264 | -35.796 | 523.045 | 0.055 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | -10.219 | 11.048 | -10.219 | -18.031 | -2.407 | |
| Prozentuale Veränderungen | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | 190.170 | 173.020 | 125.264 | 64.204 | 623.045 | 0.004 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | 89.781 | 11.048 | 89.781 | 81.969 | 97.593 | |

Tabelle 31: Ang-2 - Veränderungen gegenüber der baseline-Werte in der MMD-Gruppe

Veränderung der Ang-2-Werte der MMD-Gruppe im zeitlichen Verlauf, dargestellt über die absolute, relative Differenz bzw. prozentuale Veränderung zwischen dem präoperativen Untersuchungswert und *follow up 1* bzw. *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen mit Paardifferenzen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert

Abbildung 4-22 und Abbildung 4-23 stellen die Einzelverläufe der prozentualen Veränderungen gegenüber *baseline* dar.

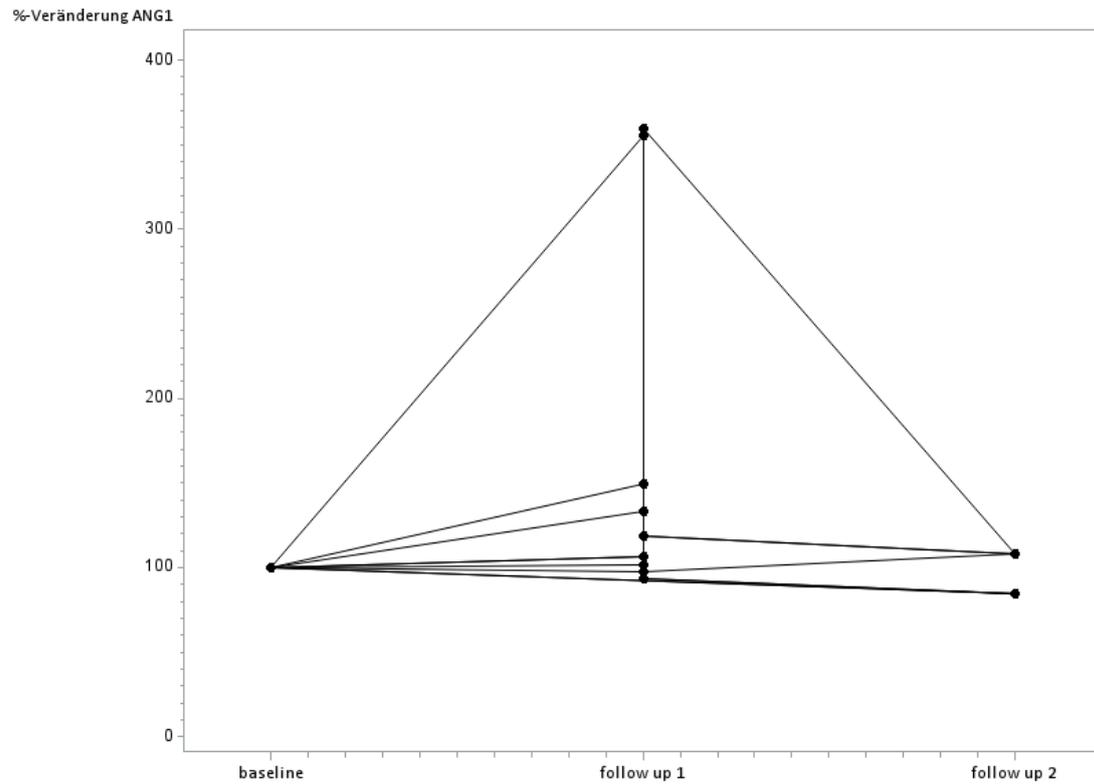


Abbildung 4-22: Einzelverläufe der Ang-1-Prozentuale Veränderungen gegenüber baseline der MMD-Gruppe

Dargestellt als prozentuale Veränderung zwischen standardisiertem präoperativen Untersuchungswert (=100%) und follow up 1 bzw. follow up 2.

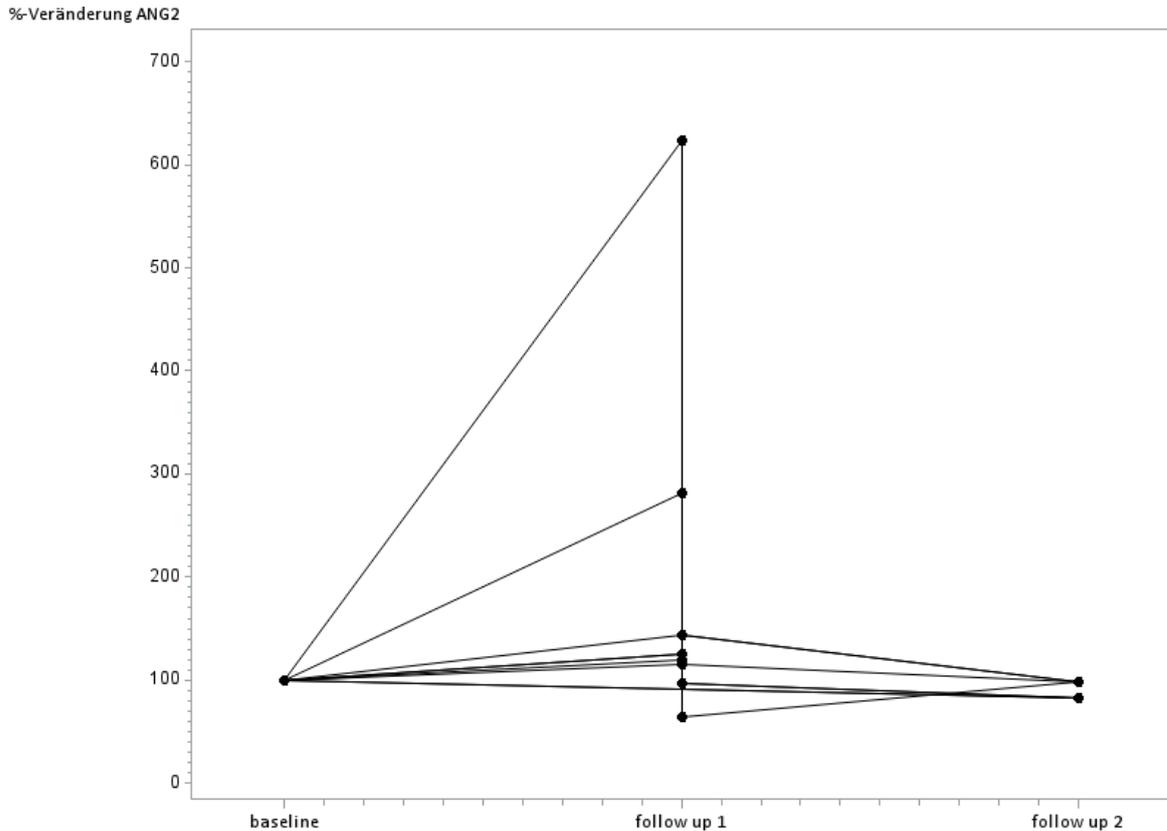


Abbildung 4-23: Einzelverläufe der Ang-2-Prozentuale Veränderungen gegenüber baseline der MMD-Gruppe

Dargestellt als prozentuale Veränderung zwischen standardisiertem präoperativem Untersuchungswert (=100%) und *follow up 1* bzw. *follow up 2*.

4.3.6 Ang-2/Ang-1 Ratio in der *baseline* Untersuchung

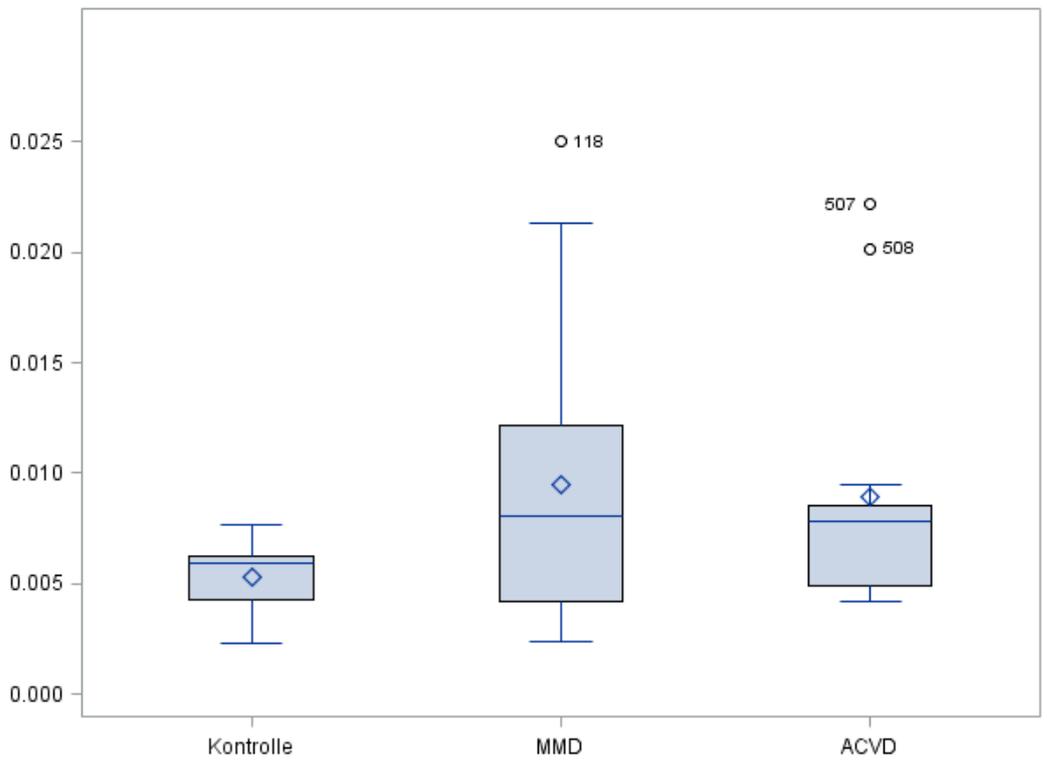
4.3.6.1 Vergleich der Gruppen in der *baseline*

Die statistischen Kennwerte in der *baseline* Untersuchung nach den drei Gruppen sind in Tabelle 32 dargestellt. Mittelwerte und Mediane sind in den beiden Patientengruppen MMD und ACVD identisch (MW: 0.009, Median: 0.008). In der Kontrollgruppe sind die Ang-2/Ang-2-Ratios etwas kleiner (EPC-Mittelwert: 0.005, Median: 0.006). In der Abbildung 4-24 sind die *baseline*-Werte des Ang-2/Ang-1 Ratios in den drei Gruppen anhand von Box- und Whiskerplots dargestellt.

| Gruppe | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|-----------|----|-------|-------|--------|-------|-------|
| Kontrolle | 9 | 0.005 | 0.002 | 0.006 | 0.002 | 0.008 |
| MMD | 17 | 0.009 | 0.007 | 0.008 | 0.002 | 0.025 |
| ACVD | 13 | 0.009 | 0.006 | 0.008 | 0.004 | 0.022 |

Tabelle 32: Ang-2/Ang-1 Ratio in der baseline Untersuchung nach Gruppen

Darstellung der *baseline*-Werte des Quotienten aus Ang-2 durch Ang-1 getrennt nach Gruppen. N: Anzahl der Beobachtungen der spezifischen Variable, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

**Abbildung 4-24: Ang-2/Ang-1 Ratio in der baseline Untersuchung nach Gruppen**

Die Box stellt das 25%-Quantil bzw. 75%-Quantil dar; in der Box stellt der Querstrich den Median und der Rhombus den Mittelwert dar. Die Linien (Whiskers) außerhalb der Box, stellen das Minimum bzw. Maximum der EPC-Werte dar. Die einzelnen Werte außerhalb des Box- und Whiskerplots stellen die Ausreißer dar.

Tabelle 33 und Tabelle 34 stellen die *baseline*-Werte des Ang-2/Ang-1 Ratios in den drei Gruppen getrennt nach Geschlechtern und Alterskategorien dar.

| Gruppe | | N | Min | Median | Max | MW | Std |
|-----------|---|----|-------|--------|-------|-------|-------|
| Kontrolle | f | 5 | 0.005 | 0.006 | 0.008 | 0.006 | 0.001 |
| | m | 4 | 0.002 | 0.004 | 0.008 | 0.004 | 0.002 |
| MMD | f | 11 | 0.002 | 0.008 | 0.025 | 0.009 | 0.007 |
| | m | 6 | 0.003 | 0.009 | 0.021 | 0.010 | 0.007 |
| ACVD | f | 3 | 0.004 | 0.008 | 0.022 | 0.011 | 0.010 |
| | m | 10 | 0.005 | 0.008 | 0.020 | 0.008 | 0.005 |

Tabelle 33: Geschlechterverteilung der präoperativen Ang-2/Ang-1-Ratio in den 3 Gruppen

Ang-2/Ang-1-Ratio von Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe bei der *baseline* Untersuchung getrennt nach Geschlecht. N: Anzahl der Beobachtungen der spezifischen Variable, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

| Gruppe | N | Min | Median | Max | MW | Std | |
|-----------|-----------|-----|--------|-------|-------|-------|-------|
| Kontrolle | <35 Jahre | 6 | 0.002 | 0.006 | 0.008 | 0.006 | 0.002 |
| | ≥35 Jahre | 3 | 0.003 | 0.004 | 0.006 | 0.005 | 0.002 |
| MMD | <35 Jahre | 7 | 0.004 | 0.010 | 0.025 | 0.013 | 0.008 |
| | ≥35 Jahre | 9 | 0.002 | 0.005 | 0.015 | 0.008 | 0.005 |
| ACVD | ≥35 Jahre | 13 | 0.004 | 0.008 | 0.022 | 0.009 | 0.006 |

Tabelle 34: Altersgruppenverteilung der präoperativen Ang-2/Ang-1-Ratio in den 3 Gruppen

Ang-2/Ang-1-Ratio von Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe bei der *baseline* Untersuchung getrennt nach den beiden Altersgruppen (<35 Jahre und ≥35 Jahre). N: Anzahl der Beobachtungen der spezifischen Variable, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

Tabelle 35 stellt die präoperativen Ang-2/Ang-1-Ratio Werte getrennt nach dem Czabanka-Score dar.

| | N | MW | Std | Median | Min | Max | |
|----------------|---|----|-------|--------|-------|-------|-------|
| Czabanka-Score | 2 | 9 | 0.009 | 0.006 | 0.010 | 0.002 | 0.021 |
| | 3 | 3 | 0.011 | 0.012 | 0.004 | 0.004 | 0.025 |

Tabelle 35: Präoperative Ang-2/Ang-1 Ratio in der MMD-Gruppe nach dem Czabanka-Score

Ang-2/Ang-1-Ratio von der MMD-Gruppe bei der *baseline* Untersuchung getrennt nach der Czabanka-Score (2 und 3). N: Anzahl der Beobachtungen der spezifischen Variable, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

Der Vergleich der drei Gruppen bezüglich der Ang-2/Ang-1-Werte in der *baseline* Untersuchung wurde anhand des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Dabei wurden zuerst die Ang-2/Ang-1-Werte in Ränge (Wilcoxon Scores) überführt und dann statistisch überprüft. Abbildung 4-25 zeigt die Verteilung der Wilcoxon Scores der Ang-2/Ang-1-Werte. Die *baseline*-Werte der beiden Patienten-Gruppen MMD und ACVD liegen höher als die der gesunden Kontrollen, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen bezüglich den *baseline*-Werten sind jedoch nicht nachweisbar ($p=0.2282$).

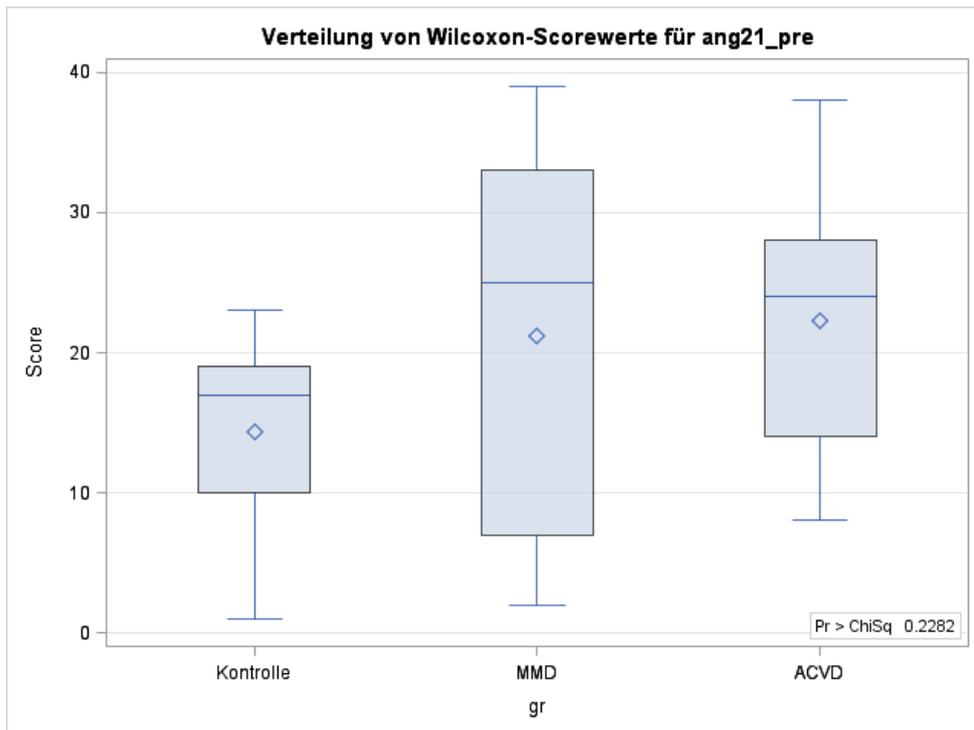


Abbildung 4-25: Vergleich der rangtransformierten EPC-baseline-Werte (Wilcoxon scores) in Kontroll-, MMD- und ACVD-Gruppe.

Die Box stellt das 25%-Quantil bzw. 75%-Quantil dar; in der Box stellt der Querstrich den Median und der Rhombus den Mittelwert dar. Die Linien (Whiskers) außerhalb der Box, stellen das Minimum bzw. Maximum der EPC-Werte dar. Die legende innerhalb der Abbildung stellt den P-Wert(0.6688) als Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests dar.

4.3.7 Ang-2/Ang-1-Ratio im Verlauf

Der zeitliche Verlauf des Ang-2/Ang-1-Ratios ist in der Tabelle 36 dargestellt. Im Gegensatz zum zeitlichen Verlauf der EPC-Werte ist hier eine leichte Zunahme der Ang-2/Ang-1-Werte im Verlauf bei den Mittelwerten (0.009 vs. 0.011 vs. 0.014) zu beobachten. Bei den Medianen jedoch ist eine leichte Zunahme nur zum Zeitpunkt *follow up 2* zu beobachten. Zum Zeitpunkt *follow up 1* ist der Median sogar niedriger als in der *baseline* Untersuchung.

| Gruppe | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|------------|--------------------|----|-------|-------|--------|-------|-------|
| | <i>baseline</i> | 17 | 0.009 | 0.007 | 0.008 | 0.002 | 0.025 |
| MMD | <i>follow up 1</i> | 14 | 0.011 | 0.009 | 0.005 | 0.003 | 0.029 |
| | <i>follow up 2</i> | 8 | 0.014 | 0.011 | 0.009 | 0.004 | 0.032 |

Tabelle 36: zeitlicher Verlauf der Ang-2/Ang-1 Ratio in der MMD-Gruppe

Ang-2/Ang-1-Ratio der MMD-Gruppe zu den Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

Tabelle 37 und Abbildung 4-26 stellen den Verlauf der Ang-2/Ang-1-Werte der MMD-Patienten getrennt nach dem Geschlecht dar. Die tabellarische Darstellung zeigt, dass bei allen

Zeitpunkten die Ang-2/Ang-1-Werte der weiblichen Patientinnen niedriger liegen als die der männlichen Patienten.

| Geschlecht | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|------------|-------------|----|-------|-------|--------|-------|-------|
| F | baseline | 11 | 0.009 | 0.007 | 0.008 | 0.002 | 0.025 |
| | follow up 1 | 12 | 0.010 | 0.009 | 0.005 | 0.003 | 0.029 |
| | follow up 2 | 7 | 0.013 | 0.012 | 0.007 | 0.004 | 0.032 |
| M | baseline | 6 | 0.010 | 0.007 | 0.009 | 0.003 | 0.021 |
| | follow up 1 | 2 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.005 | 0.026 |
| | follow up 2 | 1 | 0.019 | . | 0.019 | 0.019 | 0.019 |

Tabella 37: zeitlicher Verlauf der Ang-2/Ang-1-Werte in der MMD-Gruppe nach Geschlecht

Ang-2/Ang-1 Ratio getrennt nach weiblichen (f) und männlichen (m) MMD-Patienten zu den Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

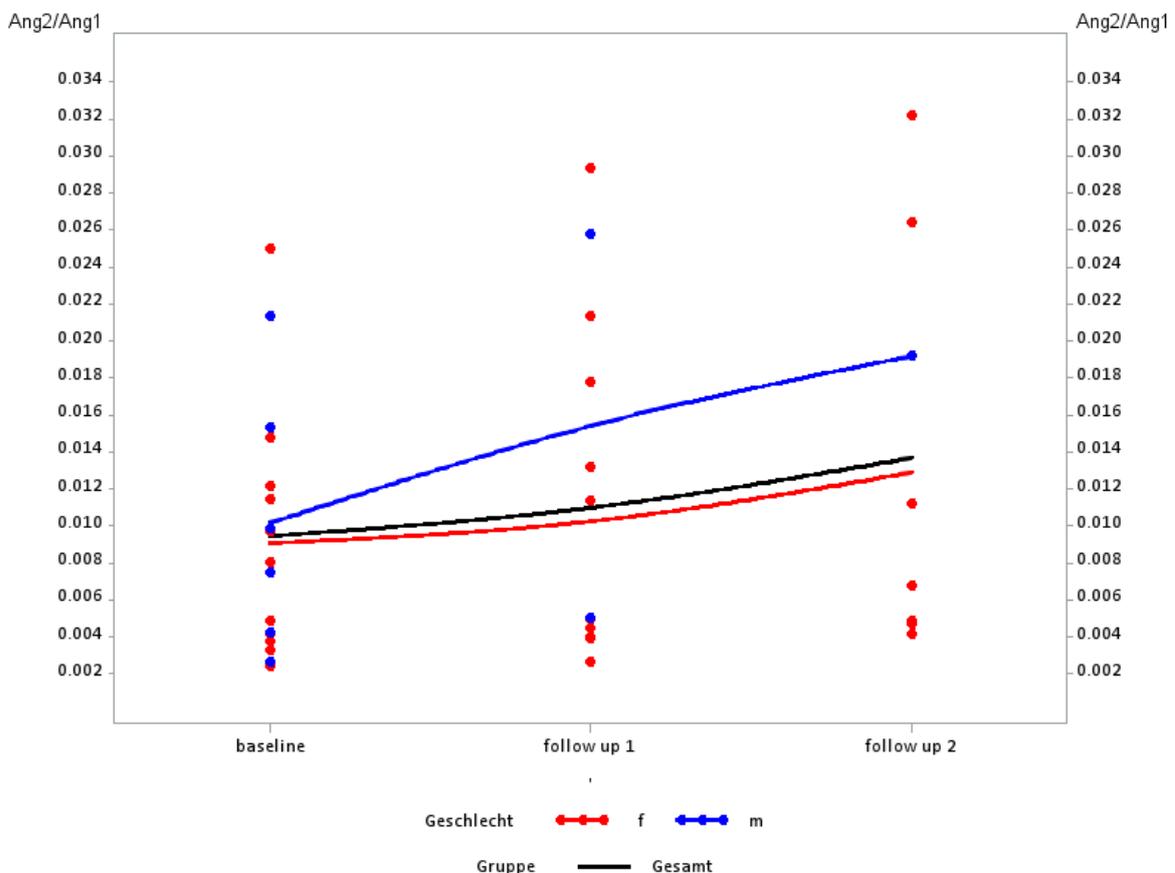


Abbildung 4-26: Ang-2/ang-1-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Geschlecht

Die rote Kurve zeigt den Verlauf von weiblichen, die blaue Kurve den Verlauf von männlichen Patienten zu den Untersuchungszeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. Der Verlauf insgesamt wird durch die schwarze Kurve dargestellt. Die Punkte stellen Einzelwerte der verschiedenen Patienten dar, hier gilt die gleiche Farbkodierung wie für die Kurven.

Tabelle 38 und Abbildung 4-27 stellen den Verlauf der Ang-2/Ang-1-Werte der MMD-Patienten getrennt nach den zwei Alterskategorien dar. Dabei ist zu beobachten, dass bei allen Zeitpunkten die Ang-2/Ang-1-Werte der jüngeren (<35 Jahren) Patienten höher liegen als die der älteren Patienten.

| Alters-kategorie | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max |
|------------------|--------------------|---|-------|-------|--------|-------|-------|
| <35 Jahre | <i>baseline</i> | 7 | 0.013 | 0.008 | 0.010 | 0.004 | 0.025 |
| | <i>follow up 1</i> | 6 | 0.017 | 0.011 | 0.017 | 0.004 | 0.029 |
| | <i>follow up 2</i> | 3 | 0.012 | 0.006 | 0.011 | 0.007 | 0.019 |
| ≥35 Jahre | <i>baseline</i> | 9 | 0.008 | 0.005 | 0.005 | 0.002 | 0.015 |
| | <i>follow up 1</i> | 8 | 0.007 | 0.005 | 0.005 | 0.003 | 0.018 |
| | <i>follow up 2</i> | 5 | 0.014 | 0.014 | 0.005 | 0.004 | 0.032 |

Tabelle 38: zeitlicher Verlauf der Ang-2/Ang-1-Werte in der MMD-Gruppe nach Alterskategorien
Ang-2/Ang-1-Ratio getrennt nach jüngeren (<35 Jahren) und älteren (≥35 Jahre) MMD-Patienten zu den Zeitpunkten *baseline*, *follow up 1* und *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

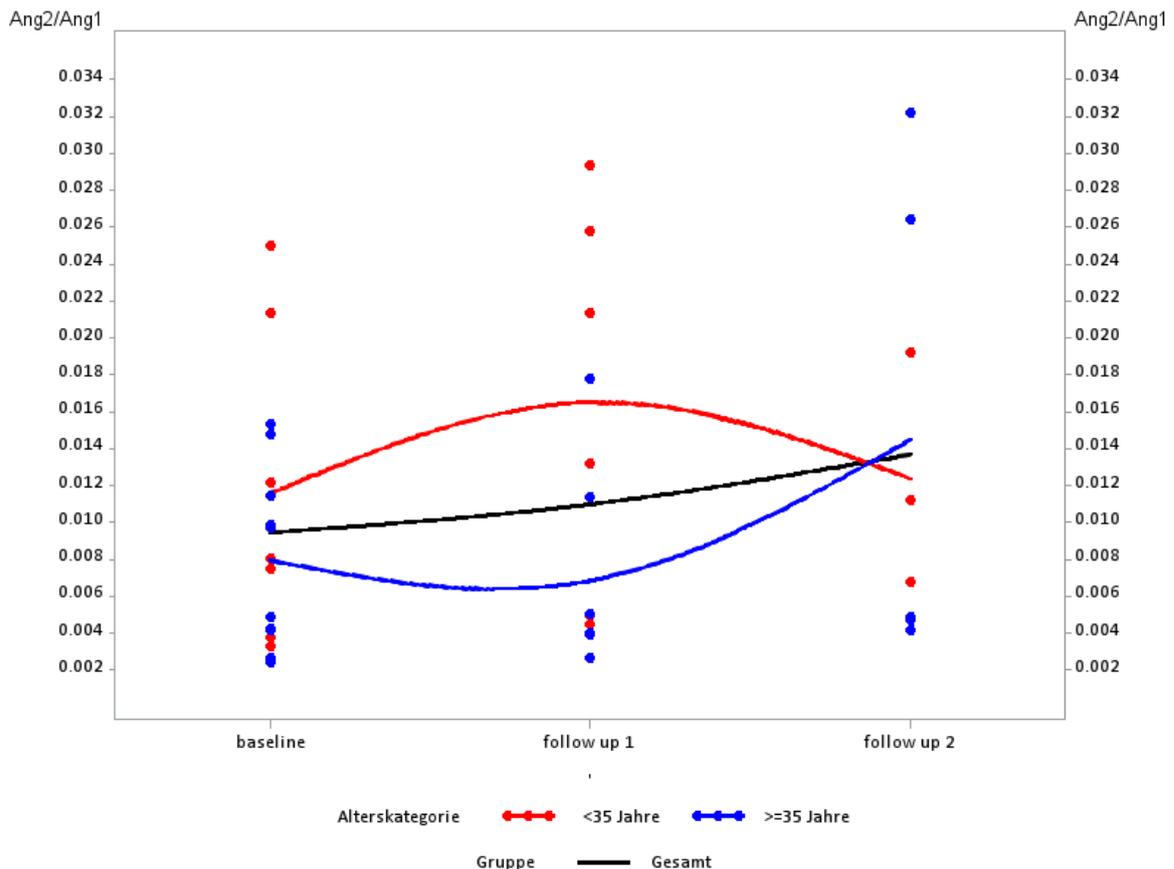


Abbildung 4-27: Ang-2/Ang-1-Werte im Verlauf der MMD-Gruppe nach Alter

Die rote Kurve zeigt den Verlauf von Patienten unter 35 Jahren, die rote Kurve den Verlauf von Patienten im Alter von 35 oder mehr Jahren zu den Untersuchungszeitpunkten *baseline*, *follow up 1*

und *follow up 2*. Der Verlauf insgesamt wird durch die schwarze Kurve dargestellt. Die Punkte stellen Einzelwerte der verschiedenen Patienten dar, hier gilt die gleiche Farbkodierung wie für die Kurven.

Bezüglich des Ang-2/Ang-2-Ratios ist aufgrund der unterschiedlichen individuellen Verläufe und den fehlenden Werten im Verlauf kein eindeutiger Zeittrend für die Gesamtgruppe zu erkennen. Die Geschlechts- und Altersspezifische Unterschiede sind hier bedeutend (vgl. Abbildung 4-26, Abbildung 4-27). Die statistische Prüfung erfolgte hier ebenfalls mit Hilfe des gemischten Modells. Das Testergebnis zeigt keinen signifikanten festen Zeiteffekt (F-Test, $p < 0.6529$, vgl. Tabelle 39). Die Ergebnisse der statistischen Überprüfung der paarweisen Vergleiche der Differenzen liefern keine signifikanten Unterschiede bezüglich den Ang-2/Ang-1-Werte im Verlauf für das Gesamtkollektiv (vgl. Tabelle 40).

| Effekt | Zähler Freiheitsgrade | Nenner Freiheitsgrade | F-Statistik | p-Wert |
|--------|--------------------------|--------------------------|-------------|--------|
| Zeit | 2 | 21.4 | 0.43 | 0.6529 |

Tabelle 39: Test der festen Effekte der Ang-2/Ang-1 Werte der MMD-Gruppe

Gemischtes Modell für Messwiederholungen. Der zeitliche Verlauf wird als fester Zeiteffekt berücksichtigt.

| Zeit | Zeit | Schätzwert | Standardfehler | DF | t-Wert | p-Wert |
|--------------------|--------------------|------------|----------------|------|--------|--------|
| <i>baseline</i> | <i>follow up 1</i> | -1.2650 | 2.9548 | 20.9 | -0.43 | 0.6730 |
| <i>baseline</i> | <i>follow up 2</i> | -3.7102 | 3.9791 | 25.8 | -0.93 | 0.3597 |
| <i>follow up 1</i> | <i>follow up 2</i> | -2.4453 | 3.6033 | 20.2 | -0.68 | 0.5051 |

Tabelle 40: Differenzen kleinste-Quadrate-Mittelwerte der paarweisen zeitlichen Effekte der EPC- Werte der MMD-Gruppe

Gemischtes Modell für Messwiederholungen. Paarweise Vergleiche zwischen den einzelnen Zeitpunkten.

4.3.8 Ang-2/Ang-1-Ratio Veränderungen gegenüber *baseline*

Tabelle 41 stellt die absolute Differenzen, die relativen Differenzen und die prozentuale Veränderungen gegenüber *baseline* der Ang-1/Ang-2-Werte dar. Interessant sind dabei die prozentuale Veränderungen 1. Hier deuten sowohl der Mittelwert (MW=120) als auch der Median (Median=117) auf bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten hin (Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben, $p=0.004$). Abbildung 4-28 stellt die Einzelverläufe der prozentualen Veränderungen dar.

| Variable | Zeitpunkt | N | MW | Std | Median | Min | Max | Signed Rank p-Wert |
|----------------------------------|------------------------------|---|---------|--------|---------|---------|---------|--------------------|
| Absolute Differenzen | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | 0.001 | 0.006 | 0.001 | -0.012 | 0.009 | 0.164 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | -0.001 | 0.001 | -0.001 | -0.002 | -0.000 | |
| Relative Differenzen | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | 19.747 | 53.308 | 17.309 | -82.157 | 111.542 | 0.129 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | -6.381 | 5.133 | -6.381 | -10.010 | -2.751 | |
| Prozentuale Veränderungen | <i>baseline- follow up 1</i> | 9 | 119.747 | 53.308 | 117.309 | 17.843 | 211.542 | 0.004 |
| | <i>baseline- follow up 2</i> | 2 | 93.619 | 5.133 | 93.619 | 89.990 | 97.249 | |

Tabelle 41: Ang-2/Ang-1-Ratio Veränderungen gegenüber der baseline Untersuchung

Veränderung der Ang-2/Ang-1-Werte der MMD-Gruppe im zeitlichen Verlauf, dargestellt über die absolute, relative Differenz bzw. prozentuale Veränderung zwischen dem präoperativen Untersuchungswert und *follow up 1* bzw. *follow up 2*. N: Anzahl der Beobachtungen mit Paardifferenzen zu dem spezifischen Zeitpunkt, MW: Mittelwert, Std: Standardabweichung, Min/ Max: kleinster bzw. größter Beobachtungswert.

%-Veränderung ANG2/ANG1

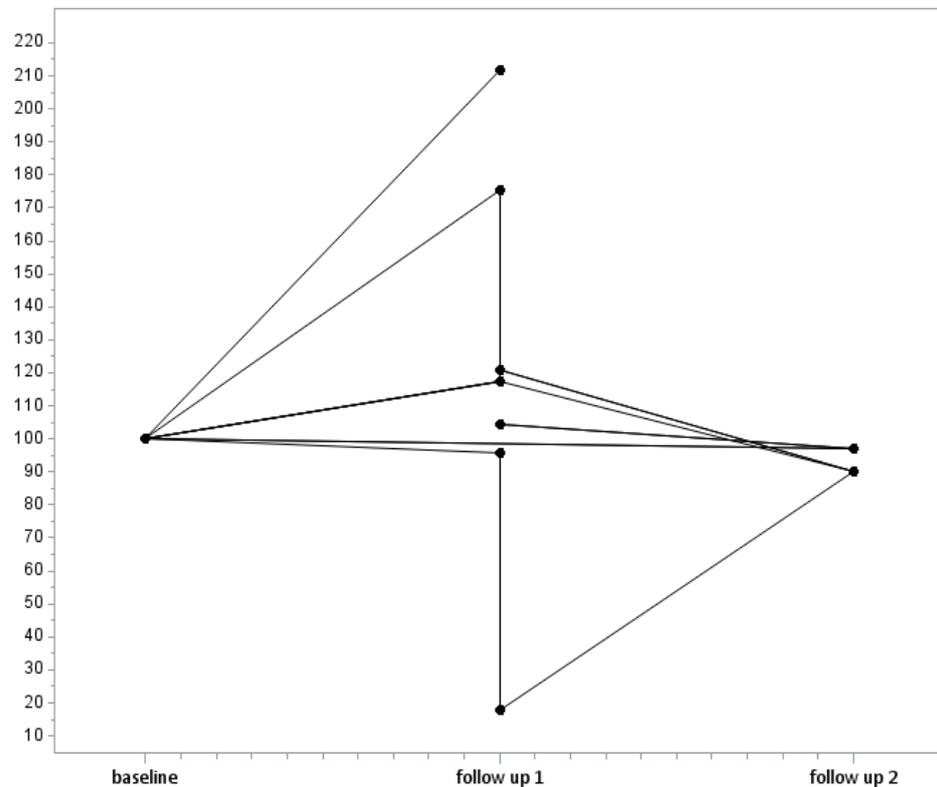


Abbildung 4-28: Einzelverläufe der Ang-2/Ang-1-Werte der MMD-Gruppe
Dargestellt als prozentuale Veränderung zwischen standardisiertem präoperativen Untersuchungswert (=100%) und follow up 1 bzw. follow up 2.

5 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob sich endotheliale Vorläuferzellen oder Angiopoietine als Biomarker im prä- und postoperativen Krankheitsverlauf von Patienten mit Moyamoya-Erkrankung eignen, unter der Annahme, dass sich die Notwendigkeit der Neoangiogenese nach erfolgter operativer Revaskularisierung ändert. Ziel war dabei einen potenziellen, möglichst einfach bestimmbareren Messparameter zu finden, der eine Auskunft über das neoangiogenetische Geschehen bei den betroffenen Patienten gibt (Tabelle 4 bis Tabelle 8).

Hierzu wurde die Serumkonzentration von zirkulierenden EPC mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 4-1 bis Abbildung 4-4) sowie die Serumkonzentration von Angiopoietinen mittels Western Blot (Abbildung 4-11, Abbildung 4-12 und Abbildung 4-13) und ELISA (Abbildung 4-14 bis Abbildung 4-28) bestimmt. Dies erfolgte bei der Zielpopulation der Moyamoya Patienten, bei einer gesunden Kontrollgruppe, sowie bei einer Kontrollgruppe von Patienten mit der atherosklerotischen zerebrovaskulären Erkrankung (Tabelle 9). Bei allen Probanden erfolgten die Bestimmung eines *baseline*-Wertes vor der operativen Revaskularisierung, bei MMD erfolgten zusätzliche Untersuchungen der Zielparameter im Verlauf, nämlich nach der Revaskularisierung der ersten und nochmals nach der Revaskularisierung der zweiten Hemisphäre. Bei allen Patienten erfolgte die Revaskularisierung mittels operativer Anlage eines Bypasses von der *A. temporalis superficialis* auf die ipsilaterale *A. cerebri media*.

Als Nebenzielparameter wurde der Schweregrad der Erkrankung mittels Czabanka-Klassifikation erhoben, der Schweregrad der klinischen Symptomatik wurde mittels NIHSS bestimmt.

Alle Messdaten wurden ausführlich statistisch analysiert (Tabelle 10 nach Geschlechtern, Tabelle 11 nach Alter, Tabelle 7 nach NIHSS und Tabelle 12 nach dem Czabanka Score). Beim Vergleich der *baseline* Untersuchungen der verschiedenen Gruppen zeigte sich, dass die **Werte aller Variablen der gesunden Kontrollgruppe niedriger als bei den Patientengruppen waren**. Statistisch signifikante Unterschiede der *baseline*-Werte zwischen den drei Gruppen waren nicht nachweisbar. Es fiel jedoch auf, dass es bei EPC- und Angiopoietin-Werten bei MMD Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine deutlich größere Heterogenität gab. (Siehe Abbildung 4-5 und Abbildung 4-6).

5.1.1.1 EPC-Konzentration nach Revaskularisierung signifikant niedriger

Betrachtet man die Verlaufsuntersuchungen der MMD Gruppe (Tabelle 13 bis Tabelle 17 und Abbildung 4-7 bis Abbildung 4-10) zeigt sich, dass die **EPC Konzentration vor Beginn der**

operativen Therapie signifikant höher ist, als nach der Revaskularisierung der zweiten Hemisphäre. Dieser Effekt ist bei männlichen Patienten deutlicher als bei weiblichen. Nach der Revaskularisierung der ersten Hemisphäre ist dieser Effekt so nicht zu beobachten, offensichtlich sind die Faktoren, die die EPC-Proliferation verstärken, zu diesem Zeitpunkt noch nicht behoben. Das erscheint logisch, da das entsprechende Geschehen zu diesem Zeitpunkt nur einseitig behandelt wurde. Es war auch zu beobachten, dass der EPC-Anteil bei MMD-Patienten nach der OP der ersten Hemisphäre sich sehr unterschiedlich verändert, z.T. in erheblichem Umfang ansteigt, die Heterogenität ist hier auch sehr hoch. Dies lässt auf eine individuell sehr unterschiedliche Reaktion auf diesen Eingriff schließen. Eine Herunterregulierung ist wie erwähnt erst nach der Revaskularisierung der zweiten Hemisphäre zu beobachten (Tabelle 18 und Tabelle 19)

Ein weiterer Einfluss ist durch parallele (patho-) physiologische Einflüsse zu beobachten. Diese können die EPC-Zahl auch stark beeinflussen, z.B. durch unterschiedlich verlaufende Wundheilung. Neben der grundsätzlichen Reduktion der EPC nach der Versorgung beider Hemisphären bleibt festzustellen, dass die EPC-Zahl von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird. **Somit erscheint es sinnvoller nicht die absoluten Werte der einzelnen Patienten zu vergleichen, sondern den individuellen Verlauf zu betrachten. Hierbei kommt es zu einer deutlichen Abnahme nach der 2. Revaskularisierung.** Um die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Patienten zu ermöglichen, wurden die prozentualen Veränderungen berechnet. Hierbei wird der *baseline* Messwert als 100% definiert (siehe Tabelle 20, Abbildung 4-10).

5.1.1.2 *Kein signifikanter Effekt bei Angiopoietin*

Bei der Untersuchung der Angiopoietine wurde zunächst die Anwesenheit von Angiopoietin 1 und 2 formal im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12). Als Kontrolle wurde ebenso der Angiopoietinrezeptor Tie2 nachgewiesen (Abbildung 4-14). Allerdings sind Western Blots für eine Quantifizierung wenig geeignet. In den darauffolgenden Experimenten wurde deshalb mittels ELISA der entsprechende quantitative Konzentrationsnachweis beider Angiopoietine durchgeführt. Bei Ang-1 zeigte sich kein Zeiteffekt. Die Ang-2-Konzentration steigt jedoch signifikant im Verlauf. Einschränkend ist hier jedoch zu erwähnen, dass die Probandenzahl für diesen Messwert sehr gering war (siehe Tabelle 31). Keine signifikanten Unterschiede zeigen sich im Vergleich der Ang2/Ang1 Ratio in *baseline* und Verlauf (Tabelle 21 bis Tabelle 30 und Abbildung 4-15 bis Abbildung 4-22).

Insgesamt zeigten die Angiopoietine keinen Effekt, der ausreichen würde um als Messparameter für die MMD-Diagnostik genutzt werden zu können. Eine weiterführende Studie (Blecharz et al., 2017) führte zu dem etwas überraschenden Ergebnis, dass sich die

Angiopoietine nicht gleichmäßig im Körper des Patienten verteilen, sondern nur lokal in den Moyamoya Gefäßen beeinflusst werden. Dies wurde über quantitative RT-PCR nachgewiesen. **Dies erklärt die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie, bei der sehr unterschiedliche Angiopoietin-Werte im Serum gemessen wurden.** Die Bedeutung der signifikanten Änderung von Ang-2, beim Vergleich von *baseline* Untersuchung und *follow up* Untersuchungen ist stark in Frage zu stellen, da die Probandenzahl sehr klein war. Somit ist anzunehmen, dass sich die Konzentrationen von Ang-1 und Ang-2 im Serum nicht als Verlaufsparameter eignen. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen einer Arbeit von (He et al., 2014) überein. In dieser wurden verschiedene Angiogenesefaktoren bei MMD Patienten im Verlauf vor und nach indirekter Revascularisierung untersucht. Hier zeigten sich zwar Änderungen bei der VEGF Konzentration, nicht jedoch bei den Angiopoietinen.

Da die Konzentration von EPC und Angiopoietinen bei MMD Patienten stark gestreut sind, also die Ausgangskonzentration der untersuchten proangiogenetischen Parametern sich von Patient zu Patient stark unterscheidet, wurden, um eine vergleichende Auswertung zu ermöglichen, die prozentualen Effekte berechnet. Hierfür wurde der *baseline*-Wert eines jeden Individuums als 100 Prozent gesetzt und im Folgenden die prozentuale Veränderung der Verlaufsuntersuchungen im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung dargestellt. Somit können trotz der großen interindividuellen Streuung, die Verläufe der verschiedenen Patienten miteinander verglichen werden. Hierbei bestätigen sich die oben beschriebenen Ergebnisse der Verlaufsuntersuchungen, es zeigt sich jedoch zusätzlich, dass zum *follow up 1* Untersuchungszeitpunkt, wenn also eine Hemisphäre bereits revascularisiert, die andere jedoch noch nicht operativ versorgt ist, eine sehr starke Divergenz im interindividuellen Vergleich besteht. Nach Revascularisierung der zweiten Hemisphäre, also zum Zeitpunkt *follow up 2*, nähern sich die Werte der Patienten wieder an. Dies zeigt sich für EPC in Tabelle 20 und Abbildung 4-10. Der prozentuale Anteil von Angiopoietin 1 und 2, sowie deren Verhältnis wird in Tabelle 30, Tabelle 31 und Tabelle 41 und in Abbildung 4-22, Abbildung 4-23 und Abbildung 4-28 dargestellt.

5.1.1.3 Klinik

Bei Betrachtung der klinischen Symptomatik der Patienten zeigte sich, dass alle in die Studie eingeschlossenen Patienten (sowohl MMD, als auch ACVD Patienten) vergleichsweise mild betroffen waren. Es wurden lediglich Werte von 0 bis 4, bei einem maximal erreichbaren Wert von 42, gemessen. Betrachtet man den Schweregrad der neurologischen Defizite von MMD Patienten im Verlauf zeigen sich nur minimale Unterschiede. Vor therapeutischer Intervention hatten 66,7% der Patienten keine neurologischen Ausfälle (NIHSS von 0). Nach

Revaskularisierung von beiden Hemisphären hatten 32,5% der Patienten einen Punktwert von 0 auf der NIHSS (siehe Tabelle 7).

Auch der Schweregrad der Moyamoya-Erkrankung war vergleichsweise mild ausgeprägt. 75% der Patienten hatten einen Punktwert von 2 in der Czabanka Klassifizierung, die restlichen Patienten zeigten einen Punktwert von 3 (siehe Tabelle 8). Der maximale Punktwert ist 6.

Betrachtet man alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich folgende Kernaussagen treffen:

- Die Anzahl zirkulierender EPC im Blut von MMD Patienten sinkt im Verlauf nach operativer Revaskularisierung signifikant.
- Die Ang-2 Serumkonzentration von MMD Patienten steigt im Verlauf nach operativer Revaskularisierung signifikant. Dies ist allerdings kritisch zu hinterfragen.
- Bei genauerer Betrachtung von altersspezifischen Verläufen der sich signifikant ändernden Variablen EPC und Ang-2 zeigt sich, dass bei jüngeren Patienten die Angiogenesefaktoren nach der ersten Operation deutlich steigen, bei älteren Patienten hingegen sinken diese nach der ersten Operation. Nachdem beide Hemisphären revascularisiert wurden nähern sich treffen sich die Verlaufskurven von jüngeren und älteren Patienten wieder.
- Betrachtet man die geschlechtsspezifischen Verläufe, zeigen sich bei allen untersuchten Variablen bei männlichen Patienten deutlichere Effekte.
- Bei der Untersuchung der prozentualen Effekte fällt eine deutliche Divergenz nach der ersten Operation auf, nach der zweiten Operation nähern sich die Effekte wieder an.

Wie bereits in Kapitel 2.2.3 umrissen, wird die Rolle von EPC bei Patienten mit MMD kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen (Rafat et al., 2009, Jung et al., 2008, Yoshihara et al., 2008, Kim et al., 2010) zeigen sich in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen MMD Patienten und den Kontrollgruppen. Es fällt jedoch auf, dass die Verteilung der EPC Konzentrationen von MMD Patienten in der *baseline* Untersuchung wesentlich weiter verteilt sind, als in den Kontrollgruppen, sodass anzunehmen ist, dass die EPC Konzentration bei MMD Patienten verändert ist, es kann anhand der Ergebnisse dieser Studie jedoch keine klare Aussage darüber getroffen werden, wie genau die Moyamoya Krankheit die EPC affiziert. Dies steht im Wesentlichen im Einklang mit den Ergebnissen der oben genannten Arbeiten, welche auch sehr unterschiedlich ausfallen.

In diesem Zusammenhang ist zu betrachten, dass es keine einheitliche Definition der EPC gibt. Bei jeder der genannten Studien inklusive der vorliegenden Arbeit werden EPC mittels Durchflusszytometrie anhand von bestimmten Oberflächenmolekülen identifiziert. Jedoch wurden in jeder Arbeit eine andere Kombination aus Oberflächenmarker gewählt.

Die in dieser Arbeit verwendete Definition von EPC sind mononukleäre Zellen, welche CD34 und CD133 positive und CD45 niedrig positive Zellen sind, was einer Variation der von Duda beschriebenen EPC Definition ist (Duda et al., 2007), darstellt. Die Kombination aus CD34 und CD133 findet sich in der überwiegenden Mehrheit der publizierten EPC-Definition, meist in einer Kombination mit einem oder mehreren anderen Oberflächenmolekülen:

- 1.) CD133⁺, CD34⁺, VEGFR-2⁺ (Prater et al., 2007, Rafat et al., 2009)
- 2.) CD34⁺, CD133⁺, CD45⁺ (Martin et al., 2008)
- 3.) CD34⁺, CD45⁺, CD146⁺ (Delorme et al., 2005)
- 4.) CD34⁺, CD133⁺, VEGFR-2⁺, CD45⁺ (Kondo et al., 2004)
- 5.) CD133⁺, CD34⁺, CD45^{low}, CD31⁺ (Duda et al., 2007)

CD34 und CD133 sind Marker für hämatopoetische Stammzellen und eignen sich somit natürlich gut für den Nachweis für Vorläuferzellen. Für den Nachweis von EPC sind jedoch weitere Oberflächenmarker spezifisch für den endothelialen Aspekt nötig. Hier unterscheiden sich die Publikationen wie oben aufgelistet jedoch deutlich, siehe auch Kapitel 2.2.2.

VEGFR-2 also der Rezeptor 2 für den *vascular endothelial growth factor* wurde schon früh als wichtiger Oberflächenmarker für EPC verwendet (Asahara, 1997) und findet sich bis heute in vielen Publikationen, weshalb diese Definition auch zunächst für die vorliegende Arbeit avisiert wurde. Die im Vorfeld der Arbeit durchgeführten vorbereitenden Versuche zeigten jedoch einen sehr hohen Anteil unspezifischer Bindungen des VEGFR-2 Antikörpers. Dies zeigte sich konstant in sämtlichen Versuchen, obwohl Antikörper verschiedener Hersteller verwendet wurden und die Modalitäten der Versuche vielfach verändert wurden. Somit konnte nicht sicher genug gewährleistet werden, dass es zu spezifischen Bindungen zwischen dem an den VEGFR-2 Antikörper gekoppelten Farbstoff und der zu untersuchenden Zellen kommt, weshalb eine alternative EPC Definition verwendet werden musste. Hierfür wurde das im Labor bereits etablierte modifizierte Protokoll von Duda angewendet. Zusätzlich zu den beiden Stammzellmarkern CD34 und CD133 wurde die Zellpopulation mit einer niedrigen Expression von CD45 ausgewählt. Das *leucocyte common antigen* (CD45) ist auf Leukozyten stark exprimiert. Eine niedrige Expression von CD45 wird mit EPC in Verbindung gebracht (Kondo et al., 2004; Martin et al 2008; Duda et al., 2007). Statt der von Duda beschriebenen zusätzlichen Expression

von CD31 wurde der Endothelmarker CD105 angefärbt. Wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, zeigte sich in den im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen eine klare Zellpopulation mit folgenden Oberflächenmarkern: CD133⁺, CD34⁺, CD45^{low}. Wurde diese Population zusätzlich mit CD105 gefärbt (EPC¹⁰⁵) ergab sich keine klare Expression des Endothelmarkers. Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, waren die als EPC¹⁰⁵ gefärbten Zellpopulation so niedrig, dass keine sinnvolle statische Auswertung möglich war. Auch um zu kleine Zellpopulationen zu vermeiden, wurden EPC in dieser Arbeit als CD133⁺, CD34⁺, CD45^{low} Zellen definiert.

Eindeutig zeigt sich in dieser Arbeit, dass eine operative Revaskularisierung Einfluss auf die Anzahl zirkulierender EPC hat. Dies erscheint logisch, da durch die Operation die Blutversorgung des Cortex verbessert wird und somit die Notwendigkeit einer Neoangiogenese zur Überbrückung der krankheitsbedingten Minderversorgung durch stenosierte Arterien abzunehmen scheint. Dies hieße also, dass durch den Bypass der Cortex nun wieder ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird und somit keine Moyamoya-Gefäße benötigt werden um die ACI Stenose zu umgehen. Aus diesem Grund müssen keine neuen Gefäße entstehen und folglich sinkt die EPC Konzentration im Blut, da diese eine entscheidende Rolle bei der Entstehung neuer Gefäße spielen.

Diese Arbeit wurde als prospektiv durchgeführte klinische Studie ausgeführt. Dies hat den großen Vorteil, dass man alle direkt betroffenen Patienten untersuchen kann und Unzulänglichkeiten von retrospektiven Analysen, wie bias, ausgeschlossen werden. Als ein Nachteil kann jedoch angesehen werden, dass das untersuchte Patientenkollektiv sehr inhomogen sein kann. Viele individuelle Faktoren oder eventuell nicht diagnostizierte Zweiterkrankungen können jedoch die Messergebnisse beeinflussen, was bei der Erstellung von Markern für eine komplexe Krankheit problematisch sein kann. Die Inhomogenität des zur Verfügung stehenden Patientenkollektivs, die kleine Stichprobengröße und die Tatsache, dass es bei dieser Studie um keinen randomisierten Vergleich handelt, sind wesentliche Faktoren, die die Präzision und Aussagekraft der Ergebnisse negativ beeinflussen können.

Da die Moyamoya-Erkrankung eine seltene Krankheit darstellt, die in nur wenigen Zentren behandelt werden kann, waren viele Patienten von weit her für diesen Eingriff angereist und gelegentlich für weitere Untersuchungen (Blutentnahme) nicht mehr verfügbar. Aus diesem Grund ist die Darstellung des zeitlichen Verlaufs unvollständig. Hinzu kommt, dass auf Grund des zeitlichen Verlaufs einer Untersuchung nur einmal die Möglichkeit besteht, zu diesem einen Zeitpunkt eine Probe zu entnehmen. Sollte es bei der anschließenden Aufarbeitung im Labor

zu technischen Problemen kommen, so ist die Probe vom entsprechenden Zeitpunkt unwiederbringlich verloren.

5.1.1.4 Limitationen

Betrachtet man die Limitationen dieser Arbeit ist als wichtigster Punkt die Anzahl der Patienten. Wie oben beschrieben ist die Moyamoya-Erkrankung eine sehr seltene Krankheit. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 23 MMD Patienten untersucht, diese Patientenzahl ist natürlich deutlich geringer als die Patientenzahlen in Untersuchungen zu häufigeren Krankheitsbildern. In anderen Arbeiten, welche sich mit MMD beschäftigen, sind die Patientenzahlen ähnlich. So haben Rafat (Rafat et al., 2009) 20 und Kim (Kim et al., 2010) 28 Patienten untersucht.

Eine weitere Limitation ist es, dass nicht von allen untersuchten Patienten sämtliche *follow up* Daten erhoben werden konnten. Die Gründe sind, wie oben beschreiben, neben den vereinzelten technischen Schwierigkeiten, zu denen es kam, vor allem die sehr eingeschränkte Verfügbarkeit der Patienten, zumal gemäß Beschluss der Ethikkommission die Blutentnahmen nur im Rahmen der medizinisch notwendigen Blutentnahmen möglich waren.

Eingeschränkt waren neben der Patientenanzahl durch die oben genannten Herausforderungen auch die Messzeitpunkte, sämtliche Daten konnten nur erfasst werden, wenn die Patienten im Rahmen einer Operation oder Kontrollangiographie in stationärer Behandlung waren. Die Frage, ob bei einem längeren *follow up* der Patienten andere Ergebnisse erzielt worden wären, bleibt unbeantwortet. Es wäre interessant zu prüfen, ob bei einer längeren Beobachtungszeit die Zeiteffekte auf die Patienten andere wären als in dieser Arbeit beobachtet.

Zur besseren Kontrollierbarkeit war ein Vergleich der *follow up* Parameter zwischen MMD und ACVD Patienten vorgesehen. Da allerdings nur zwei der 13 untersuchten ACVD Patienten zu den vereinbarten Kontrolluntersuchungen erschienen, waren diese *follow-up* Untersuchungen nicht vergleichbar. Somit wurden nur die Ergebnisse der *baseline* Untersuchung verglichen. Dies ist natürlich eine deutliche Einschränkung der Aussagekraft dieses Kontrollgruppenvergleichs. Für nachfolgende Studien wäre es wünschenswert, diesen Vergleich mit größeren Patientenzahlen vorzunehmen, was sich jedoch als sehr herausfordernd gestalten dürfte, da aufgrund der kontinuierlichen Verbesserung der konservativen Therapie der ACVD immer seltener die Indikation zur Therapie mittels operativer Revaskularisierung gestellt wird.

Diese Arbeit zeigt, dass die Anzahl zirkulierender EPC im Blut nach operativer Revaskularisierung **signifikant abnimmt**. Somit kann postuliert werden, dass sich die individuelle Änderung der EPC Anzahl im prä- zu postoperativen Vergleich als Parameter zum

Revaskularisierungserfolg eignet. Es sind jedoch weitere Untersuchungen von größeren Patientenkollektiven und längeren postoperativen Untersuchungsintervallen nötig, um genauere Aussagen über die Quantifizierbarkeit des Revaskularisierungserfolges mittels EPC treffen zu können.

Bezüglich der Angiopoietine lassen sich keine eindeutigen Aussagen treffen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass sich die Serumangiopoietinkonzentration nicht als Verlaufsparemeter zum Revaskularisierungserfolg eignet, da sich die lokalen Änderungen der Angiopoietinkonzentrationen in den Moyamoyagefäßen nicht ausreichend auf die Serumgesamt-konzentration auswirken.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Takeuchi K, Shimizu K: Hypoplasia of the bilateral internal carotid arteries. *Brain nerve* 1957, 9:37-43.
2. Suzuki J, Takaku A: Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Archives of neurology* 1969, 20(3):288-299.
3. Horn P: Moyamoya-Erkrankung - Diagnostik und Therapie. In: *Vaskuläre Neurochirurgie, funktionelle Neurochirurgie*. Herausgeber: Raabe A, Rohde V. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2011: 181-195.
4. Achrol AS, Guzman R, Lee M, Steinberg GK: Pathophysiology and genetic factors in moyamoya disease. *Neurosurg Focus* 2009, 26(4):E4.
5. Burke GM, Burke AM, Sherma AK, Hurley MC, Batjer HH, Bendok BR: Moyamoya disease: a summary. *Neurosurg Focus* 2009, 26(4).
6. Vajkoczy P: Moyamoya disease: collateralization is everything. *Cerebrovascular diseases* 2009, 28(3):258.
7. Greenberg M: Handbook of Neurosurgery, Band Handbook of Neurosurgery, 7. Auflage. New York: Thieme Medical Publishers; 2010.
8. Smith ER, Scott RM: Moyamoya: epidemiology, presentation, and diagnosis. *Neurosurgery clinics of North America* 2010, 21(3):543-551.
9. Fukui M, Kono S, Sueishi K, Ikezaki K: Moyamoya disease. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 2000, 20 Suppl:S61-64.
10. Houkin K, Ito M, Sugiyama T, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Kuroda S: Review of past research and current concepts on the etiology of moyamoya disease. *Neurologia medico-chirurgica* 2012, 52(5):267-277.
11. Masuda J, Ogata J, Yutani C: Smooth muscle cell proliferation and localization of macrophages and T cells in the occlusive intracranial major arteries in moyamoya disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1993, 24(12):1960-1967.
12. Young AM, Karri SK, Ogilvy CS, Zhao N: Is there a role for treating inflammation in moyamoya disease?: a review of histopathology, genetics, and signaling cascades. *Frontiers in neurology* 2013, 4:105.
13. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1995, 9(10):899-909.
14. Kuroda S, Houkin K: Moyamoya disease: current concepts and future perspectives. *Lancet neurology* 2008, 7(11):1056-1066.
15. Czabanka M, Pena-Tapia P, Schubert GA, Heppner FL, Martus P, Horn P, Schmiedek P, Vajkoczy P: Proposal for a new grading of Moyamoya disease in adult patients. *Cerebrovascular diseases* 2011, 32(1):41-50.
16. Scott RM, Smith ER: Moyamoya Disease and Moyamoya Syndrome. *New England Journal of Medicine* 2009, 360(12):1226-1237.

17. Yoshimoto T, Houkin K, Takahashi A, Abe H: Angiogenic factors in moyamoya disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1996, 27(12):2160-2165.
18. Sakamoto S, Kiura Y, Yamasaki F, Shibukawa M, Ohba S, Shrestha P, Sugiyama K, Kurisu K: Expression of vascular endothelial growth factor in dura mater of patients with moyamoya disease. *Neurosurgical review* 2008, 31(1):77-81; discussion 81.
19. Ogawa K, Nagahiro S, Arakaki R, Ishimaru N, Kobayashi M, Hayashi Y: Anti-alpha-fodrin autoantibodies in Moyamoya disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2003, 34(12):e244-246.
20. Sigdel TK, Shoemaker LD, Chen R, Li L, Butte AJ, Sarwal MM, Steinberg GK: Immune response profiling identifies autoantibodies specific to Moyamoya patients. *Orphanet journal of rare diseases* 2013, 8:45.
21. Lei C, Wu B, Ma Z, Zhang S, Liu M: Association of moyamoya disease with thyroid autoantibodies and thyroid function: a case-control study and meta-analysis. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2014, 21(7):996-1001.
22. Kerchner GA, Smith W, Lawton MT, Singh V: Co-occurrence of a cavernous malformation and contralateral moyamoya. *Neurology* 2006, 66(10):1601-1602.
23. Ou P, Dupont P, Bonnet D: Fibromuscular dysplasia as the substrate for systemic and pulmonary hypertension in the setting of Moya-Moya disease. *Cardiology in the young* 2006, 16(5):495-497.
24. Kuriyama S, Kusaka Y, Fujimura M, Wakai K, Tamakoshi A, Hashimoto S, Tsuji I, Inaba Y, Yoshimoto T: Prevalence and clinicoepidemiological features of moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2008, 39(1):42-47.
25. Im SH, Cho CB, Joo WI, Chough CK, Park HK, Lee KJ, Rha HK: Prevalence and epidemiological features of moyamoya disease in Korea. *Journal of cerebrovascular and endovascular neurosurgery* 2012, 14(2):75-78.
26. Takahashi JC, Miyamoto S: Moyamoya disease: recent progress and outlook. *Neurologia medico-chirurgica* 2010, 50(9):824-832.
27. Uchino K, Johnston SC, Becker KJ, Tirschwell DL: Moyamoya disease in Washington State and California. *Neurology* 2005, 65(6):956-958.
28. Kraemer M, Heienbrok W, Berlitz P: Moyamoya disease in Europeans. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2008, 39(12):3193-3200.
29. Gross BA, Du R: The natural history of moyamoya in a North American adult cohort. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 2013, 20(1):44-48.
30. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S: A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *Journal of human genetics* 2011, 56(1):34-40.
31. Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S,

Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N: Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology* 2012, 78(11):803-810.

32. Liu W, Hashikata H, Inoue K, Matsuura N, Mineharu Y, Kobayashi H, Kikuta K, Takagi Y, Hitomi T, Krischek B, Zou LP, Fang F, Herzig R, Kim JE, Kang HS, Oh CW, Tregouet DA, Hashimoto N, Koizumi A: A rare Asian founder polymorphism of Raptor may explain the high prevalence of Moyamoya disease among East Asians and its low prevalence among Caucasians. *Environmental health and preventive medicine* 2010, 15(2):94-104.

33. Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, Hashikata H, Matsuura N, Yamazaki S, Toyoda A, Kikuta K, Takagi Y, Harada KH, Fujiyama A, Herzig R, Krischek B, Zou L, Kim JE, Kitakaze M, Miyamoto S, Nagata K, Hashimoto N, Koizumi A: Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PloS one* 2011, 6(7):e22542.

34. Roder C, Peters V, Kasuya H, Nishizawa T, Takehara Y, Berg D, Schulte C, Khan N, Tatagiba M, Krischek B: Common genetic polymorphisms in moyamoya and atherosclerotic disease in Europeans. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 2011, 27(2):245-252.

35. Krischek B, Kasuya H, Khan N, Tatagiba M, Roder C, Kraemer M: Genetic and clinical characteristics of Moyamoya disease in Europeans. *Acta neurochirurgica Supplement* 2011, 112:31-34.

36. Kraemer M, Horn PA, Roder C, Khan N, Diehl RR, Berlit P, Heinemann FM: Analysis of human leucocyte antigen genes in Caucasian patients with idiopathic moyamoya angiopathy. *Acta neurochirurgica* 2012a, 154(3):445-454.

37. Kraemer M, Heinemann FM, Horn PA, Venker C, Berlit P, Krischek B, Khan N: Inheritance of moyamoya disease in a Caucasian family. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2012b, 19(3):438-442.

38. Fujimura M, Sonobe S, Nishijima Y, Niizuma K, Sakata H, Kure S, Tominaga T: Genetics and Biomarkers of Moyamoya Disease: Significance of RNF213 as a Susceptibility Gene. *Journal of stroke* 2014, 16(2):65-72.

39. Ma J, You C: Association between matrix metalloproteinase-3 gene polymorphism and moyamoya disease. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 2015, 22(3):479-482.

40. Li H, Zhang ZS, Liu W, Yang WZ, Dong ZN, Ma MJ, Han C, Yang H, Cao WC, Duan L: Association of a functional polymorphism in the MMP-3 gene with Moyamoya Disease in the Chinese Han population. *Cerebrovascular diseases* 2010, 30(6):618-625.

41. Wang X, Zhang Z, Liu W, Xiong Y, Sun W, Huang X, Jiang Y, Ni G, Sun W, Zhou L, Wu L, Zhu W, Li H, Liu X, Xu G: Impacts and interactions of PDGFRB, MMP-3, TIMP-2, and RNF213 polymorphisms on the risk of Moyamoya disease in Han Chinese human subjects. *Gene* 2013, 526(2):437-442.

42. Kang HS, Kim JH, Phi JH, Kim YY, Kim JE, Wang KC, Cho BK, Kim SK: Plasma matrix metalloproteinases, cytokines and angiogenic factors in moyamoya disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2010, 81(6):673-678.

43. Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, Fujimura T, Furudate S, Nishijima Y, Kure S, Tominaga T: Increased vascular MMP-9 in mice lacking RNF213: moyamoya disease susceptibility gene. *Neuroreport* 2014, 25(18):1442-1446.
44. Bedini G, Blecharz KG, Nava S, Vajkoczy P, Alessandri G, Ranieri M, Acerbi F, Ferroli P, Riva D, Esposito S, Pantaleoni C, Nardocci N, Zibordi F, Ciceri E, Parati EA, Bersano A: Vasculogenic and Angiogenic Pathways in Moyamoya Disease. *Current medicinal chemistry* 2016, 23(4):315-345.
45. Vajkoczy P: Extra-/intrakranielle Bypassoperationen. In: *Vaskuäre Neurochirurgie, funktionelle Neurochirurgie*. Herausgeber: Raabe A, Rohde V. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2011: 173-180.
46. Horn P, Pfister S, Bueltmann E, Vajkoczy P, Schmiedek P: Moyamoya-like vasculopathy (moyamoya syndrome) in children. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 2004, 20(6):382-391.
47. Brott T, Adams HP, Jr., Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, Spilker J, Holleran R, Eberle R, Hertzberg V, et al.: Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1989, 20(7):864-870.
48. Muir KW, Weir CJ, Murray GD, Povey C, Lees KR: Comparison of neurological scales and scoring systems for acute stroke prognosis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1996, 27(10):1817-1820.
49. De Haan R, Horn J, Limburg M, Van Der Meulen J, Bossuyt P: A comparison of five stroke scales with measures of disability, handicap, and quality of life. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1993, 24(8):1178-1181.
50. Berger K, Weltermann B, Kolominsky-Rabas P, Meves S, Heuschmann P, Bohner J, Neundorfer B, Hense HW, Buttner T: [The reliability of stroke scales. The german version of NIHSS, ESS and Rankin scales]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* 1999, 67(2):81-93.
51. NIH Stroke Scale, Wittlich, Verbundkrankenhaus Bernkastel / Wittlich, 2002 (Aufgerufen am 07.02.2014 unter <http://www.neurologie-wittlich.de/seiten/doku/NIHSS.pdf>)
52. Pandey P, Steinberg GK: Neurosurgical advances in the treatment of moyamoya disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2011, 42(11):3304-3310.
53. Baaj AA, Agazzi S, Sayed ZA, Toledo M, Spetzler RF, Lovren H: Surgical management of moyamoya disease. *Neurosurg Focus* 2009, 26(4).
54. Woitzik J, Horn P, Vajkoczy P, Schmiedek P: Intraoperative control of extracranial-intracranial bypass patency by near-infrared indocyanine green videoangiography. *Journal of neurosurgery* 2005, 102(4):692-698.
55. Langer DJ, Van Der Zwan A, Vajkoczy P, Kivipelto L, Van Doormaal TP, Tulleken CA: Excimer laser-assisted nonocclusive anastomosis. An emerging technology for use in the creation of intracranial-intracranial and extracranial-intracranial cerebral bypass. *Neurosurg Focus* 2008, 24(2):E6.
56. Kuroda S, Houkin K: Bypass surgery for moyamoya disease: concept and essence of surgical techniques. *Neurologia medico-chirurgica* 2012, 52(5):287-294.

57. Kim DS, Huh PW, Kim HS, Kim IS, Choi S, Mok JH, Huh CW: Surgical treatment of moyamoya disease in adults: combined direct and indirect vs. indirect bypass surgery. *Neurologia medico-chirurgica* 2012, 52(5):333-338.
58. Ikezaki K, Fukui M, Inamura T, Kinukawa N, Wakai K, Ono Y: The current status of the treatment for hemorrhagic type moyamoya disease based on a 1995 nationwide survey in Japan. *Clinical neurology and neurosurgery* 1997, 99 Suppl 2:S183-186.
59. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC: Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia* 2007, 21(6):1141-1149.
60. Asahara T: Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 1997, 275(5302):964-966.
61. Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W: Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *Journal of cellular and molecular medicine* 2006, 10(1):45-55.
62. Pearson JD: Endothelial progenitor cells - hype or hope? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2009, 7(2):255-262.
63. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine* 2003, 348(7):593-600.
64. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM: HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *The Journal of clinical investigation* 2001, 108(3):391-397.
65. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP: Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *The Journal of clinical investigation* 2000, 105(1):71-77.
66. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC: Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004, 104(9):2752-2760.
67. Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, Simmons PJ, Peault B, Buck DW, Huttner WB: The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *The Journal of biological chemistry* 2000, 275(8):5512-5520.
68. Timmermans F, Plum J, Yoder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J: Endothelial progenitor cells: identity defined? *Journal of cellular and molecular medicine* 2009, 13(1):87-102.
69. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM: Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circulation research* 1999, 85(3):221-228.
70. Rafat N, Beck G, Pena-Tapia PG, Schmiedek P, Vajkoczy P: Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with Moyamoya disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2009, 40(2):432-438.

71. Martin K, Stanchina M, Kouttab N, Harrington EO, Rounds S: Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in obstructive sleep apnea. *Lung* 2008, 186(3):145-150.
72. Delorme B, Basire A, Gentile C, Sabatier F, Monsonis F, Desouches C, Blot-Chabaud M, Uzan G, Sampol J, Dignat-George F: Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thrombosis and haemostasis* 2005, 94(6):1270-1279.
73. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T: Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004, 24(8):1442-1447.
74. Duda DG, Cohen KS, Scadden DT, Jain RK: A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. *Nature protocols* 2007, 2(4):805-810.
75. Jung KH, Chu K, Lee ST, Park HK, Kim DH, Kim JH, Bahn JJ, Song EC, Kim M, Lee SK, Roh JK: Circulating endothelial progenitor cells as a pathogenetic marker of moyamoya disease. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2008, 28(11):1795-1803.
76. Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-Taura A, Soma T, Stern DM, Yoshikawa H, Kasahara Y, Moriwaki H, Nagatsuka K, Naritomi H: Increase in circulating CD34-positive cells in patients with angiographic evidence of moyamoya-like vessels. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2008, 28(6):1086-1089.
77. Kim JH, Jung JH, Phi JH, Kang HS, Kim JE, Chae JH, Kim SJ, Kim YH, Kim YY, Cho BK, Wang KC, Kim SK: Decreased level and defective function of circulating endothelial progenitor cells in children with moyamoya disease. *Journal of neuroscience research* 2010, 88(3):510-518.
78. Kämpers P, The Angiopoietin-Tie2 ligand-receptor system, Hannover, Medizinische Hochschule Hannover, 2007 (Aufgerufen am 17.02.2014 unter http://www.angiopoietin.de/pageID_6911126.html)
79. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996, 87(7):1161-1169.
80. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997, 277(5322):55-60.
81. Karamysheva AF: Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry Biokhimiia* 2008, 73(7):751-762.
82. Hurliman AK, Speroff L, Stouffer RL, Patton PE, Lee A, Molskness TA: Changes in circulating levels and ratios of angiopoietins during pregnancy but not during the menstrual cycle and controlled ovarian stimulation. *Fertility and sterility* 2010, 93(5):1493-1499.

83. Fagiani E, Christofori G: Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer letters* 2013, 328(1):18-26.
84. Fischer M, Broessner G, Dietmann A, Beer R, Helbok R, Pfausler B, Chemelli A, Schmutzhard E, Lackner P: Angiopoietin-1 is associated with cerebral vasospasm and delayed cerebral ischemia in subarachnoid hemorrhage. *BMC neurology* 2011, 11:59.
85. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ: Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovascular research* 2001, 49(3):659-670.
86. Kim KL, Shin IS, Kim JM, Choi JH, Byun J, Jeon ES, Suh W, Kim DK: Interaction between Tie receptors modulates angiogenic activity of angiopoietin2 in endothelial progenitor cells. *Cardiovascular research* 2006, 72(3):394-402.
87. Heyden S, Gerber CJ: Atherosclerotic cerebrovascular disease--its nature and management. *The American journal of medicine* 1969, 46(5):763-773.
88. Failure of extracranial-intracranial arterial bypass to reduce the risk of ischemic stroke. Results of an international randomized trial. The EC/IC Bypass Study Group. *The New England journal of medicine* 1985, 313(19):1191-1200.
89. Czabanka M, Acker G, Jussen D, Finger T, Pena-Tapia P, Schubert GA, Scharf J, Martus P, Schmiedek P, Vajkoczy P: Collateralization and ischemia in hemodynamic cerebrovascular insufficiency. *Acta neurochirurgica* 2014, 156(11):2051-2058; discussion 2058.
90. Kataoka H, Miyamoto S, Ogasawara K, Iihara K, Takahashi JC, Nakagawara J, Inoue T, Mori E, Ogawa A: Results of Prospective Cohort Study on Symptomatic Cerebrovascular Occlusive Disease Showing Mild Hemodynamic Compromise [Japanese Extracranial-Intracranial Bypass Trial (JET)-2 Study]. *Neurologia medico-chirurgica* 2015, 55(6):460-468.
91. Rodriguez-Hernandez A, Josephson SA, Lawton MT: Bypass surgery for the prevention of ischemic stroke: current indications and techniques. *Neurocirugia (Asturias, Spain)* 2012, 23(1):5-14.
92. Schenkel J: Grundlagen der Embryologie und Molekularbiologie. In: *Transgene Tiere*. Springer Berlin Heidelberg; 2006: 13-38.
93. Chattopadhyay PK, Hogerkorp CM, Roederer M: A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. *Immunology* 2008, 125(4):441-449.
94. Chattopadhyay PK, Roederer M: Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods (San Diego, Calif)* 2012, 57(3):251-258.
95. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM: Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 2012, 64(2):109-130.
96. Givan AL: Flow cytometry: an introduction. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2011, 699:1-29.
97. Stewart CC, Stewart SJ: Multiparameter data acquisition and analysis of leukocytes. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2004, 263:45-66.

98. Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG: Flow cytometry in the study of cell death. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2000, 95(3):429-433.
99. Witzensbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM: Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *The Journal of biological chemistry* 1998, 273(29):18514-18521.
100. Zellner M, Winkler W, Hayden H, Diestinger M, Eliassen M, Gesslbauer B, Miller I, Chang M, Kungl A, Roth E, Oehler R: Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis* 2005, 26(12):2481-2489.
101. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979, 76(9):4350-4354.
102. Jung F, Sekeris C, Schenkel J: Isolation and Immunochemical Characterization of hnRNP Particles. In: *RNP Particles, Splicing and Autoimmune Diseases*. Herausgeber: Schenkel J: Springer Berlin Heidelberg; 1998: 1-28.
103. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227(5259):680-685.
104. Blüthner M: Methods in Immunolocalization of Autoantigens. In: *RNP Particles, Splicing and Autoimmune Diseases*. Herausgeber: Schenkel J: Springer Berlin Heidelberg; 1998: 155-183.
105. Engvall E, Perlmann P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971, 8(9):871-874.
106. Lequin RM: Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry* 2005, 51(12):2415-2418.
107. Thaitrong N, Charlermroj R, Himananto O, Seepiban C, Karoonuthaisiri N: Implementation of Microfluidic Sandwich ELISA for Superior Detection of Plant Pathogens. *PloS one* 2013, 8(12):e83231.
108. Otto M: Analytische Chemie, 4. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH; 2011.
109. Wedler G: Lehrbuch der Physikalischen Chemie. Weinheim: Verlag Chemie; 1982.
110. Brown H, Prescott R: Applied Mixed Models in Medicine. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.; 2001.
111. Blecharz KG, Frey D, Schenkel T, Prinz V, Bedini G, Krug SM, Czabanka M, Wagner J, Fromm M, Bersano A, Vajkoczy P: Autocrine release of angiopoietin-2 mediates cerebrovascular disintegration in Moyamoya disease. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2017, 37(4):1527-1539.
112. He J, Wang R, Zhang D, Zhang Y, Zhang Q, Zhao J: Expression of circulating vascular endothelial growth factor-antagonizing cytokines and vascular stabilizing factors prior to and following bypass surgery in patients with moyamoya disease. *Experimental and therapeutic medicine* 2014, 8(1):302-308.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Tobias Schenkel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Endotheliale Vorläuferzellen und Angiopoietine als Verlaufsparemeter bei Patienten mit der Moyamoya-Erkrankung 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.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

ANTEILSERKLÄRUNG

Tobias Schenkel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Blecharz KG, Frey D, Schenkel T, Prinz V, Bedini G, Krug SM, Czabanka M, Wagner J, Fromm M, Bersano A, Vajkoczy P: Autocrine release of angiopoietin-2 mediates cerebrovascular disintegration in Moyamoya disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017:

Blutentnahme, Blutaufbereitung, Proteinfällung aus dem Serum, Western Blot, ELISA, Interpretation und Diskussion der Daten

Blecharz-Lang KG, Prinz V, Burek M, Frey D, Schenkel T, Krug SM, Fromm M, Vajkoczy P: Gelatinolytic activity of autocrine matrix metalloproteinase-9 leads to endothelial de-arrangement in Moyamoya disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018:

Blutentnahme, Blutaufbereitung, Proteinfällung aus dem Serum, Interpretation und Diskussion der Daten

LEBENS LAUF

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

PUBLIKATIONEN

1. Blecharz KG, Frey D, Schenkel T, Prinz V, Bedini G, Krug SM, Czabanka M, Wagner J, Fromm M, Bersano A, Vajkoczy P: Autocrine release of angiopoietin-2 mediates cerebrovascular disintegration in Moyamoya disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Apr;37(4):1527-1539. doi: 10.1177/0271678X16658301
2. Blecharz-Lang KG, Prinz V, Burek M, Frey D, Schenkel T, Krug SM, Fromm M, Vajkoczy P: Gelatinolytic activity of autocrine matrix metalloproteinase-9 leads to endothelial de-arrangement in Moyamoya disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018 Jan 1:271678X18768443. doi: 10.1177/0271678X18768443. [Epub ahead of print]

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Dr. Dietmar Frey, der meine Dissertation betreut und mich von Anfang bis zum Ende unterstützt hat. Mein Dank gilt außerdem Julian Ulrich, Irina Kremenetskaia und Dr. Susan Brandenburg aus der experimentellen Neurochirurgie der Charité, ohne deren Hilfe keine einzige Zelle durchs FACS geflossen wäre. Mein besonderer Dank gilt Dr. Kinga Blecharz-Lang, die mich nicht nur bei Western Blot und ELISA, sowie inhaltlichen Ratschlägen und bei der Korrektur der Dissertationsschrift, sondern auch jederzeit seelisch und moralisch unterstützt hat.

Bei Prof. Dr. Peter Vajkoczy, dem Direktor der Klinik für Neurochirurgie, möchte ich mich für die Möglichkeit die Arbeit anzufertigen, Patientenmaterial zu bekommen, für alle Unterstützung und für die Übernahme der offiziellen Betreuung der Arbeit bedanken.

Ohne meine Familie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Irini Karapanagiotou-Schenkel und Prof. Dr. Johannes Schenkel, die mich nicht nur bei der Erarbeitung meiner Dissertation inhaltlich, seelisch und moralisch unterstützt, sondern mir auch mein Medizinstudium ermöglicht haben.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinem Sohn Lukas und vor allem meiner Ehefrau Sarah bedanken, die meine Unausgeglichenheit bei der Bearbeitung meiner Dissertation nicht nur ertragen, sondern es auch geschafft hat mich zu motivieren die Dissertationsschrift trotz vieler anderer Herausforderungen zum Abschluss zu bringen.