

Aus dem CharitéCentrum 15 für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie mit dem
Arbeitsbereich für Pädiatrische Neurochirurgie und dem Institut für Neuropathologie
Klinik für Neurochirurgie mit dem Arbeitsbereich für Pädiatrische Neurochirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy

Habilitationsschrift

Untersuchungen zu plastischen Gefäßsystemen anhand des Glioblastoma multiforme und der Moyamoya Vaskulopathie

zur Erlangung der Lehrbefugnis
für das Fach Neurochirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Marcus Czabanka
geboren am 12.03.1978 in Ravensburg

Eingereicht: 08/2012

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	2
Einleitung	3
Glioblastoma multiforme	5
Moyamoya Vaskulopathie	7
Ziel.....	10
Material und Methoden	11
Glioblastoma multiforme - Experimentelle Untersuchungstechniken	11
Subkutane Xenografts	11
Das Rückenhautkammermodell	11
Intravitalmikroskopie.....	12
Biodistributionsanalyse des Antikörpers L19-SIP	13
Biodistributionsanalyse während antiangiogener Therapie	13
Analyse der Mikrohämodynamik	13
Intravitale konfokale Laser-Mikroskopie	14
Immunhistochemie	15
Western-Blot-Analyse	16
Moyamoya Vaskulopathie - Klinische Untersuchungsmethoden	16
Die ICG-Videoangiographie	16
Einteilung des kortikalen Gefäßsystems	16
Die mikrohämodynamische Analyse der kortikalen Mikrovaskularisierung.....	17
Evaluation der angiographischen Revaskularisierungsergebnisse	18
Klinische Evaluation des Revaskularisierungsergebnisses.....	19
Beschreibung des Klassifikationssystems der Moyamoya-Vaskulopathie.....	19
Ergebnisse	22
I. Glioblastoma multiforme	22
Identifikation der Tank-Binding-Kinase I als antiangiogenes Zielmolekül	22
Bedeutung mikrohämodynamischer Konsequenzen einer antiangiogenen Therapie für die kombinierte Behandlung mit Chemotherapeutika	24
Charakterisierung der Biodistribution des antiangiogenen Antikörpers L19-SIP als Mediator gezielter neovaskulärer Therapiestrategien.....	26
II. Moyamoya Erkrankung	28
Charakterisierung der kortikalen Mikrozirkulation	28
Klinische Implikationen der kortikalen Mikrozirkulation.....	30
Charakterisierung zerebraler Revaskularisierungsmethoden	31
Altersabhängige Revaskularisierungsergebnisse bei der Moyamoya-Erkrankung	32
Klassifikation der Moyamoya-Vaskulopathie.....	33
Diskussion	34
Glioblastoma multiforme	35
Tank-Binding Kinase 1 als Mediator des inflammatorischen und angiogenen Systems	36
Hämodynamische Konsequenzen einer antiangiogenen Therapie	38
Extradomäne B von Fibronectin – Ziel vaskulärer Targetingstrategien	40
Moyamoya Vaskulopathie	42
Kortikale Vaskularisierung bei der Moyamoya-Vaskulopathie	43
Kompensation der zerebralen Minderperfusion	45
Altersabhängige Revaskularisierung	46
Zerebrale Revaskularisierung bei europäischen Moyamoya Patienten	47
Klassifikation der Moyamoya-Vaskulopathie.....	48
Zusammenfassung	51
Literatur	53
Danksagung	58
Eidesstattliche Erklärung	59

Abkürzungverzeichnis

GBM	=	Glioblastoma multiforme
HIF-1	=	Hypoxia Inducible Factor-1
VEGF(R)	=	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)
WHO	=	World Health Organization
L19-SIP	=	L19-Small Immunoprotein
HGF	=	Hepatocyte Growth Factor
STA-MCA Bypass	=	Arteria temporalis superficialis – Arteria cerebri media Bypass
EMS	=	Encephalomyosynangiose
FITC	=	Fluoresceinisothiocyanat
ROI	=	Region of Interest
ICG	=	Indocyaningrün
MCA	=	Middle cerebral artery, Arteria cerebri media
ACA	=	Anterior cerebral artery, Arteria cerebri anterior
TIA	=	Transitorisch ischämische Attacke
MRT	=	Magnetresonanztomographie
PDGF(R)	=	Platelet Derived Growth Factor (Receptor)
NFKappaB	=	Nuclear Factor KappaB
TBK1	=	Tank Binding Kinase 1
IRF3	=	Interferon Regulatory Factor 3
FGF(R)	=	Fibroblast Growth Factor (Receptor)
HUVEC	=	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
FLT3	=	FMS-like tyrosine kinase 3

Einleitung

Die Hauptfunktion von Blutgefäßen wird heute als die Bereitstellung von Sauerstoff und Nährstoffen definiert. Evolutionsbiologisch bestand die Funktion von Blutgefäßen in der Bereitstellung der Immunüberwachung des Körpers¹. Interessanterweise entwickelte sich das Gefäßsystem nachdem sich das Nervensystem gebildet hatte. Primitive Organismen, wie z.B. der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* benötigen für die Koordination motorischer Funktionen die Entwicklung eines Nervensystems². In diesen kleinen Organismen ist es jedoch möglich, dass mittels Diffusion sämtliche Zellen mit Sauerstoff versorgt werden, so dass diese Organismen nicht auf ein Gefäßsystem angewiesen sind². Später in der Evolution, als die Organismen größer und metabolisch aktiv wurden, war ein organisiertes Gefäßsystem für den Sauerstofftransport vonnöten. Das beste Beispiel in diesem Zusammenhang ist das menschliche Gehirn, welches nur 2% der Gesamtkörpermasse ausmacht, jedoch 20% des Herzzeitvolumens zum Funktionserhalt benötigt.

Blutgefäße können durch die Differenzierung von Angioblasten in Endothelzellen entstehen, die sich zu einem primitiven vaskulären Labyrinth zusammensetzen³. In der Folge kommt es zur Differenzierung in arterielle und venöse Gefäße sowie zur Ausbildung eines Lumens als Grundvoraussetzung für die Durchblutung des primitiven Gefäßsystems⁴. Dabei spielen insbesondere die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen eine entscheidende Rolle, da sie den primitiven Endothelzellaggregaten Stabilität verleihen und die Regulation der Durchblutung ermöglichen^{1, 5}. In diesem Zusammenhang wird der Begriff Angiogenese oft für die Entstehung von Blutgefäßen als Synonym verwendet. Im wissenschaftlich korrekten Sinn bedeutet jedoch der Begriff Angiogenese das Aussprossen von neuen Gefäßen aus bereits existierenden Blutgefäßen.^{1, 5} In den letzten Jahren konnten grundwissenschaftliche Arbeiten zeigen, dass es sich bei der sprossenden Angiogenese um einen äußerst komplexen und aktiven zellulären Prozess handelt, bei welchem invasive Endothelzellen durch proangiogene Signale stimuliert werden und in der Folge Filopodien ausbilden¹. Diese sogenannten „Tip“-Zellen interagieren mit im Interstitium lokalisierten „Guidance“-Molekülen, um mit anderen Endothelzellen zu fusionieren und damit die Grundlage für neue

Gefäßabschnitte zu bilden^{1, 6}. Den „Tip“-Zellen folgen die sogenannten „Stalk“-Zellen, die weniger Filopodien ausbilden, aber im Verlauf für die Entstehung eines Gefäßlumens verantwortlich sind und die sich letztendlich zur Unterstützung der wachsenden Gefäßsprosse vermehren¹. Unabhängig von der Angiogenese können Gefäße auch durch den sogenannten Prozess der „Intussusception“ wachsen^{1, 5}. Dieser Mechanismus umschreibt die Ausbildung von neuen Gefäßen durch die Aufteilung des bereits existierenden Gefäßes. Darüber hinaus kann die Expansion eines Gefäßsystems auch durch zirkulierende Vorläuferzellen entstehen, wodurch der Begriff Vaskulogenese definiert wird^{1, 5}.

Da Gefäßnetzwerke den gesamten menschlichen Organismus mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen, können pathologische Veränderungen des Gefäßsystems zu einer Vielzahl von schwerwiegenden Erkrankungen führen¹. Eine inadäquate Gefäßfunktion führt zu ischämischen Erkrankungen wie z.B. einem Herzinfarkt oder Schlaganfall⁵. Auf der anderen Seite ist ein exzessives Gefäßwachstum ein Hauptmerkmal von inflammatorischen und onkologischen Erkrankungen⁵. Im Rahmen pathologischer Prozesse kommt es zu einer massiven Veränderung der Gefäßstruktur, der Gefäßorganisation und nicht zuletzt der Gefäßentstehung⁵. Die Erforschung der Gefäßbiologie verspricht in diesem Zusammenhang viele therapeutische Ansätze. Eine Blockierung der Gefäßneubildung (Antiangiogenese) könnte zur Behandlung von Tumoren eingesetzt werden mit dem Ziel die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu unterbrechen und damit ein weiteres Wachstum zu verhindern⁵. Andererseits könnte eine Stimulation der Gefäßneubildung zur Therapie ischämischer Erkrankungen herangezogen werden⁵.

In der Neurochirurgie existieren zwei Modellkrankheiten, die durch eine massive pathologische Veränderung der Gefäßbiologie gekennzeichnet sind. Das Glioblastoma multiforme ist als hochmaligner hirneigener Tumor durch eine massiv veränderte Tumorangio-genese gekennzeichnet und stellt damit ein vielversprechendes Ziel für antiangiogene Therapiestrategien dar. Im Gegensatz dazu ist die Moyamoya Vaskulopathie durch stenookklusive Läsionen der Hirnarterien und damit durch rezidivierende zerebrale Ischämien gekennzeichnet. Andererseits ist die Ausbildung intra-intrakranieller sowie extra-intrakranieller Kollateralkreisläufe ein Zeichen einer bisher nicht verstandenen Moyamoya-spezifischen Neoangiogenese. Die Moyamoya Vaskulopathie stellt in diesem

Zusammenhang eine ideale Erkrankung für verschiedene zerebrale Revaskularisierungsstrategien dar.

Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme gehört zu den häufigsten primären Hirntumoren bei erwachsenen Patienten und zu den aggressivsten Tumoren überhaupt⁷. Es handelt sich um einen diffus wachsenden Hirntumor, der als Astrozytom WHO Grad IV klassifiziert wird⁷. Primäre Glioblastome entwickeln sich sehr schnell über einen kurzen Zeitraum von oft nur wenigen Wochen. In diesem Zusammenhang ist der Entstehungsmechanismus bislang unklar⁸. Sekundäre Glioblastome (10% der Glioblastome) bilden sich schrittweise aus einem niedriggradigen Gliom (Astrozytom Grad II oder Grad III)^{7, 8}. Während sich die primären Glioblastome vom sekundären Glioblastom histologisch nicht unterscheiden gibt es deutliche molekulargenetische Unterschiede. Alterationen des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens I und II konnten in über 80% aller sekundären Glioblastome identifiziert werden^{9, 10}. Mit Hilfe dieses molekularen Markers ist es möglich primäre von sekundären Glioblastomen zu unterscheiden¹⁰. Die jährliche Inzidenz beträgt ca. 3-5 neu diagnostizierte Patienten/100.000 Einwohner¹¹. Obwohl das Glioblastom häufiger bei alten Patienten (Durchschnittsalter 64 Jahre) vorkommt, kann es auch bei jungen Patienten und sogar bei Kindern beobachtet werden¹¹. Das Glioblastoma multiforme kann abhängig von der Genexpression verschiedener Signalwege in einzelne Subtypen eingeteilt werden: einen proneuralen, einen neuralen, einen klassischen und einen mesenchymalen Subtyp⁸. Basierend auf dieser Einteilung wird deutlich, dass trotz der sehr variablen und komplexen molekularen Pathophysiologie bestimmte Signalwege sehr häufig und schwerwiegend verändert sind⁸. Es gilt als gesichert, dass die intratumorale Hypoxie und damit die Induktion des Transkriptionsfaktors Hypoxia-Inducible-Factor-1 (HIF-1) eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Glioblastomentstehung einnimmt¹². Die intratumorale Hypoxie beim Glioblastom führt zur Aktivierung glykolytischer Signalwege und zur Induktion einer ausgeprägten Tumorigenese¹². Hierbei spielt vor allem eine verstärkte Expression angiogener Faktoren wie dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) eine relevante Rolle^{12, 13}. Darüber hinaus werden eine Vielzahl weiterer proangiogener Signalwege aktiviert¹⁴. Die Glioblastomikrozirkulation zeigt eine äußerst chaotische Gefäßstruktur und -organisation. Die

Gefäße variieren in ihrer Morphologie, Permeabilität, ihrem Durchmesser und Verzweigungsmuster sowie in ihren Blutflusseigenschaften^{15, 16}. Auf zellulärer Ebene zeigen alle Schichten der Tumorgefäßwand pathologische Veränderungen. Die Basalmembran ist äußerst irregulär in ihrer Zusammensetzung und in ihrer Breite^{15, 16}. Perizytenendothelinteraktionen variieren und sind in ihrer Gesamtzahl im Vergleich zu gesunden Gefäßen reduziert und insuffizient ausgeprägt¹⁵. Intrazelluläre Kontakte zwischen Endothelzellen existieren nur gelegentlich und es können intermittierend multiple Schichten von Endothelzellen beobachtet werden¹⁵. Diese zellulären Veränderungen führen zu schwerwiegenden funktionellen Veränderungen mit eingeschränkter Sauerstoff- und Nährstoffversorgung und einer erhöhten Gefäßpermeabilität¹⁶. Diese wiederum führt zu einem deutlich erhöhten interstitiellen Druck, wodurch die Distribution von Nährstoffen und Sauerstoff eingeschränkt wird¹⁷. Auf der anderen Seite unterstützt die Pathologie der Tumorgefäße die Invasion und Verteilung von Tumorzellen, so dass diese sich entlang von Tumorgefäßen ausbreiten und in gesunde Hirnareale vordringen können^{18, 19}. Darüber hinaus führt die insuffiziente Versorgung des Tumors mit Sauerstoff, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu einer weiteren Stimulation proangiogener Signalwege, wodurch ein pathophysiologischer Teufelskreis entsteht. Dementsprechend stellt eine antiangiogene Behandlung eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit dar, diesen Teufelskreis zu unterbrechen.

Die Verwendung von Bevacizumab, einem humanen VEGF-Antikörper, führte bei Glioblastompatienten zu einem guten Ansprechen der Therapie mit einem 6 Monate progressionsfreien Überleben von 42,6%²⁰. Basierend auf diesen Daten erfolgte die Zulassung von Bevacizumab zur Behandlung des Glioblastoms in den USA. Eine Phase III-Studie, die zur Zulassung von Bevacizumab zur Behandlung des Glioblastoms in der EU führen würde, existiert bislang nicht. Aus verschiedenen Phase-III Studien ist jedoch bekannt, dass eine Monotherapie mit einer antiangiogenen Substanz in der Behandlung von Malignomen im allgemeinen keinen Therapieerfolg zeigt, während die Applikation einer antiangiogenen Substanz in Kombination mit einem Chemotherapeutikum sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien zu einem signifikanten Therapievorteil führt²¹⁻²³. Vredenburgh et al. konnten in einer Phase-I Studie zeigen, dass die Gabe von Bevacizumab

zusätzlich zur Standardtherapie (Temozolomide und Radiatio) zu einem additiven Therapieeffekt mit einer mittleren Überlebensrate von 21,2 Monaten und einem medianen progressionsfreien Überleben von 14,2 Monaten führt²⁴. Allerdings existiert auch in diesem Zusammenhang keine Phase III-Studie, die eine Überlegenheit im Vergleich zur Standardtherapie beweist. Aus diesen Erfahrungen entstand das Konzept, dass eine antiangiogene Therapie nicht als Monotherapie, sondern vielmehr als chemosensitivierende Therapiestrategie angewendet werden soll²³. Ursprünglich war von der Hypothese ausgegangen worden, dass eine antiangiogene Therapie resistent gegenüber Resistenzentwicklungen sein würde¹⁴. Klinische Daten zeigen aber, dass diese Hypothese nicht haltbar ist, da zunehmend Resistenzentwicklungen gegen antiangiogene Substanzen beobachtet werden¹⁴. Somit sind die Ziele aktueller Forschungsanstrengungen die Optimierung von Kombinationstherapien und die Evaluation zielgerichteter Therapieverfahren. Der wissenschaftliche Fokus dieser Arbeit beinhaltet folglich die:

- Evaluation der Bedeutung des Signalweges Tank-Binding-Kinase 1 / Interferon Regulatory Factor 3 für die Tumorangienese
- Aufklärung mikrohämodynamischer Konsequenzen einer Kombinationstherapie bestehend aus einer zielgerichteten Anti-VEGF- und Anti-PDGF-Therapie und einer Chemotherapie (Doxorubicin)
- Analyse der Biodistribution des neovaskulären Antikörpers L19-SIP im Rahmen vaskulärer Targetingstrategien zur Behandlung des Glioblastoma multiforme.

Moyamoya Vaskulopathie

Anders als das Glioblastoma multiforme ist die Moyamoya Erkrankung vornehmlich durch eine zerebrovaskuläre Insuffizienz mit zerebralen, hämodynamischen Ischämien charakterisiert. Die Moyamoya Erkrankung ist eine seltene Erkrankung, die durch einen stenookklusiven Prozess im Bereich der großen basalen Hirnarterien gekennzeichnet ist^{25, 26}. Allerdings zeigen Moyamoya Patienten ein ausgeprägtes neovaskuläres, proangiogenes Potential, welches zur Ausbildung von charakteristischen intra-intrakraniellen als auch extra-intrakraniellen Kollateralkreisläufen führt²⁶. Die Definition der Erkrankung beinhaltet eine Stenose oder Okklusion des terminalen Abschnitts der Arteria carotis interna oder der

proximalen Abschnitte ihrer beiden Abgänge (Arteria cerebri media und Arteria cerebri anterior) und ein abnormales Gefäßnetzwerk im Bereich der Hirnbasis²⁵. In diesem Zusammenhang ist eine Affektion beider Hemisphären die Voraussetzung einer definitiven Moyamoya-Vaskulopathie²⁵. Die Ätiologie der Moyamoya-Vaskulopathie ist bisher vollkommen ungeklärt²⁷. Zu unterscheiden ist primär zwischen der Moyamoya-Erkrankung und dem Moyamoya-Syndrom. Das Moyamoya-Syndrom beinhaltet neben den vaskulären Veränderungen des Circulus Willisi andere Begleiterkrankungen wie z.B. Autoimmunerkrankungen, Down-Syndrom und Neurofibromatose²⁷. Der Begriff Moyamoya-Erkrankung bezeichnet im Gegensatz dazu ausschließlich die intrakraniellen zerebrovaskulären Veränderungen²⁷.

Aufgrund der ausgeprägten Seltenheit der Erkrankung existieren praktisch keine sicheren epidemiologischen Daten. In Asien wurde eine Inzidenz von 0,35 und eine Prävalenz von 3,16 pro 100 000 Einwohnern beschrieben²⁷. Eine neuere Studie aus Japan zeigt jedoch deutlich höhere Zahlen mit einer Inzidenz von 0,96 und einer Prävalenz von 10,5 pro 100 000 Einwohnern²⁷. Bezüglich europäischer Patienten existieren keine epidemiologischen Daten, allerdings ist aufgrund der erhöhten Anzahl wissenschaftlicher Publikationen zu europäischen Moyamoya Patienten davon auszugehen, dass die Inzidenz und Prävalenz höher als bislang vermutet ist²⁸. Bisher wurde angenommen, dass die Inzidenz und Prävalenz europäischer Moyamoya Patienten ca. 10% der asiatischen Zahlen beträgt²⁷.

Die Ursache der Erkrankung ist ebenfalls weitestgehend unbekannt. Histopathologische Studien zeigen in den stenookklusiven Gefäßabschnitten eine exzentrische fibromuskuläre Verdickung der Intima, proliferierende glatte Muskelzellen und eine duplizierte Elastica interna²⁷. Die typischen Moyamoya Gefäße der Hirnbasis zeigen Fibrinanlagerungen, eine fragmentierte Elastica interna sowie eine ausgedünnte Media²⁷. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist allerdings nicht bekannt. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Angiogenese-assoziierte Signalwege eine Rolle bei der Entstehung der Moyamoya Vaskulopathie spielen könnten²⁷. So konnte der Hepatozyten-assoziierte Wachstumsfaktor (Hepatocyte growth factor, HGF) in stenookklusiven Läsionen von Moyamoya Patienten nachgewiesen werden, während bei Patienten mit einer atherosklerotisch bedingten zerebrovaskulären Insuffizienz dieser Faktor nicht vorhanden war^{27, 29}. Darüberhinaus zeigen

Moyamoya Patienten eine deutlich erhöhte Anzahl CD-34 positiver und CD-133 positiver endothelialer Vorläuferzellen im Serum als Patienten mit einer Atherosklerose³⁰. Andere Arbeiten zeigen eine Beteiligung typischer proangiogener Moleküle wie z.B. VEGF und HIF-1²⁷.

Die Hauptsymptome der Moyamoya Vaskulopathie beinhalten auf der einen Seite zerebrale Ischämien und auf der anderen Seite intrazerebrale Blutungen. Während zerebrale Blutungen bei ca. 50% der adulten asiatischen Patienten vorkommen, zeigen europäische Patienten ein deutlich geringeres Risiko für zerebrale Hämorrhagien^{27, 28}. Bei europäischen Patienten steht die zerebrovaskuläre hämodynamische Insuffizienz im Vordergrund mit assoziierten zerebralen Ischämien²⁸. Obwohl bezüglich der Behandlung der Moyamoya Vaskulopathie keine randomisierte klinische Studie vorliegt, herrscht im allgemeinen wissenschaftlicher Konsens, dass eine chirurgische Revaskularisierung das hämodynamische Defizit der Patienten und das Risiko für zerebrale Ischämien am effizientesten reduziert²⁷.

Zur Revaskularisierung stehen verschiedene operative Strategien zur Verfügung³¹. Die direkte Revaskularisierung besteht aus einem arteriellen Standardbypass mittels Transposition der Arteria temporalis superficialis auf ein M4 Segment der Arteria cerebri media (STA-MCA Bypass)³¹. Indirekte Revaskularisierungsmethoden beinhalten die Platzierung von gefäßreichen Gewebe auf der Gehirnoberfläche und basieren auf der Tatsache, dass Gefäße aus dem Spendergewebe auf die Gehirnoberfläche wachsen und dann einen relevanten Kollateralfloss ermöglichen²⁷. Hierzu wurden verschiedene Gewebe bislang verwendet: der Temporalmuskel (Encephalomyosynangiose), die Dura mater (Encephalodurosynangiose), die Galea (Encaphalogaleosynangiose) oder die Arteria temporalis superficialis (Encephaloarteriosynangiose) stellen typische Beispiele dar²⁷. Kombinierte Revaskularisierungsmethoden bestehen aus einem direkten Bypass und einer indirekten Methode wie z.B. einer Encephalomyosynangiose. Die Vorteile des direkten Bypasses sind die sofortige zusätzliche Blutversorgung des Gehirns und damit die schnelle Reduktion des Schlaganfallrisikos. Die Nachteile des direkten Bypasses sind das Hyperperfusionssyndrom als auch die technisch erschwerten Bedingungen im Vergleich zu indirekten Methoden²⁷. Indirekte Revaskularisierungsverfahren sind einfacher durchzuführen, aber sie beinhalten ein postoperativ höheres Ischämierisiko, da die zusätzliche

Blutversorgung erst 3-6 Monate nach der Operation entsteht^{27, 31}. Hier zeigen kleinere Studien bei asiatischen Patienten, dass adulte Moyamoya-Patienten nur in ca. 40-50% eine suffiziente Revaskularisierung durch einen indirekten Bypass erzielen, während bei pädiatrischen Patienten indirekte Methoden deutlich bessere Revaskularisierungsergebnisse erzielen^{27, 32}. Bei europäischen Patienten liegen diesbezüglich keine systematisch erfassten Daten vor.

Im Rahmen der chirurgischen Behandlung der Moyamoya Vaskulopathie wurde deutlich, dass die Gehirnoberfläche oft intraoperativ rötlich verändert erscheint³³. Takeuchi et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass die Gehirnoberfläche von Moyamoya Patienten durch eine hohe Anzahl leptomeningealer Anastomosen und erweiterte piale Gefäße charakterisiert ist³³. Moyamoya-spezifische Veränderungen oder die klinische Relevanz dieser Beobachtungen konnten bislang allerdings nicht identifiziert werden.

Basierend auf rudimentären Kenntnissen über die Moyamoya Vaskulopathie bezüglich der vaskulären Pathophysiologie und der chirurgischen Therapie lag der wissenschaftliche Schwerpunkt dieser Arbeit auf:

- der Charakterisierung des kortikalen Gefäßsystems bei Moyamoya Patienten.
- der Charakterisierung einer kombinierten und einer indirekten Revaskularisierung bei (adulten und pädiatrischen) europäischen Moyamoya Patienten
- der Erarbeitung einer Moyamoya Klassifikation, die eine Abschätzung klinischer Symptome erlaubt.

Ziel

Das Ziel dieser Arbeit ist es anhand des Glioblastoma multiforme und der Moyamoya Vaskulopathie die pathophysiologische Bedeutung einer veränderten Neoangiogenese zu untersuchen sowie therapeutische Implikationen zu identifizieren.

Material und Methoden

Die Untersuchungstechniken, die in dieser Arbeit verwendet wurden, werden in den folgenden Abschnitten zusammengefasst dargestellt. In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass bezüglich des Glioblastoma multiforme experimentelle Untersuchungsmethoden mit einem molekularbiologischen Hintergrund verwendet wurden. Im Rahmen der Moyamoya Vaskulopathie wurden vornehmlich klinisch orientierte Untersuchungstechniken angewendet. Die spezifisch verwendeten Untersuchungsmethoden der einzelnen Studien können den entsprechenden Publikationen entnommen werden.

Glioblastoma multiforme - Experimentelle Untersuchungstechniken

Subkutane Xenografts

Sämtliche Experimente wurden an atypischen Nacktmäusen durchgeführt. Für die Analyse des Tumorwachstums wurde eine definierte Anzahl von Tumorzellen subkutan in die Hinterflanke der Nacktmäuse injiziert. Die Tumorgröße wurde durch Quantifizierung der Länge, der Breite und der Höhe des Tumors bestimmt. Hierbei wurde folgende mathematische Formel angewendet: $\text{Tumolvolumen} = (\text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe}) / 2$

Die antiangiogene Behandlung der Tumore wurde mit Sunitinib (40 mg/kg Körpergewicht) durchgeführt, welches intraperitoneal injiziert wurde in einer Lösung mit 0,9%iger Kochsalz-Lösung. Die Behandlungsdauer betrug 6 Tage. Die Kontrolltiere erhielten tägliche Applikationen einer 0,9%igen NaCl-Lösung als Placebobehandlung.

Das Rückenhautkammermodell

Für die Analyse der Tumormikrozirkulation und Mikrohämodynamik wurden Tumorzellen in Rückenhautkammern implantiert. Hierfür wurde die Rückenhautkammer an Nacktmäusen verwendet (N = 8 pro Gruppe). Die mikrochirurgische Präparationstechnik des Rückenhautkammermodells wurde bereits in verschiedenen Studien ausführlich beschrieben und stellt ein etabliertes Modell zur intravitalmikroskopischen Analyse der Mikrozirkulation dar³⁴. Kurz zusammengefasst besteht das Observationsfenster der Rückenhautkammer aus einer Schicht gestreifter Muskulatur, Subkutangewebe und Epidermis. Es erlaubt die

repetitive, in-vivo, online Darstellung der Tumormikrozirkulation und potentieller Zell-Zellinteraktionen. Um die Effekte des chirurgischen Traumas zu minimieren, wurde die Kammer zwei Tage vor der Tumorzellimplantation präpariert.

Intravitalmikroskopie

Das Gefäßsystem des Tumors wurde mittels Intravitalfluoreszenz-Videomikroskopie in Epiilluminationstechnik dargestellt. Zu diesem Zweck wurde ein modifiziertes Axio-Tec-Vario-Mikroskop (Firma Zeiss, Oberkochen/Germany) mit UV (340 - 380 nm) und Blaulicht (450 - 490 nm) - Filter verwendet. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) - konjugiertes Dextran wurde verwendet um das Gefäßsystem mittels Kontrastbildung zu visualisieren. Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen wurden mittels Rhodaminmarkierung ermöglicht. FITC-konjugiertes Dextran und Rhodamin wurden in die Schwanzvene des Versuchstieres vor der Mikroskopie injiziert. Sämtliche mikrozirkulatorischen Messungen wurden mittels eines computerassistierten Bildanalyse-Systems (CAPIMAGE-Cyntel-Software-Engineering, Heidelberg/Germany) ausgewertet. Das neu formierte Tumorgefäßsystem wurde hierfür in drei Zonen (peritumoral, marginal und zentral) eingeteilt. Jede Zone wurde separat (2-3 Observationen pro Zone) analysiert, wodurch 6-9 Messungen pro Tier durchgeführt wurden. Die quantitative Analyse beinhaltete die totale intratumorale Gefäßdichte (Total intratumoral vascular density, TVD, Einheit: cm/cm^2), welches als die Länge aller neugeformten (perfundierten und nicht-perfundierten) Mikrogefäße im Bereich des Tumorareales definiert wurde. Die funktionelle intratumorale Gefäßdichte (Functional intratumoral vascular density, FVD, Einheit: cm/cm^2) wurde als Länge aller neugeformten, perfundierten Mikrogefäße im Tumorareal definiert. Als weiterer funktioneller Parameter wurde der Perfusionsindex (PI) als das Verhältnis aus funktioneller Gefäßdichte zu totaler Gefäßdichte berechnet ($\text{PI} = \text{FVD} : \text{TVD} \times 100$). Fest adhärenente Leukozyten (sticking leukocytes) wurden als Leukozyten definiert, die keine Bewegung entlang der Gefäßwand für mindestens 30 sec zeigten. Die Anzahl der Leukozyten wurde in Relation zur Oberfläche des analysierten Gefäßsegmentes bestimmt und basierend auf dem Gefäßdurchmesser und der Länge des analysierten Gefäßsegmentes berechnet. Hierzu wurde folgende Formel verwendet: $2 \times \pi \times r \times h$, wobei r den Durchmesser des Gefäßsegmentes/2 und h die Länge des analysierten Gefäßsegmentes definiert.

Biodistributionsanalyse des Antikörpers L19-SIP

Um die mikrovaskuläre Biodistribution von L19-SIP zu charakterisieren, wurden 100 µg von Cy3-markiertem L19-SIP in die Vena jugularis der Versuchstiere injiziert. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, in welchen keine Tumorzellen in die Rückenhautkammer implantiert wurden. Durch die Analyse der Fluoreszenzintensität im Bereich der Gefäßwand (vaskuläres Kompartiment) sowie im angrenzenden Interstitium (interstitielles Kompartiment) wurden insgesamt 6-9 Tumorgefäße pro Tier analysiert. In diesem Zusammenhang wurde das vaskuläre Kompartiment als die Gefäßwand und das direkt angrenzende perivaskuläre Areal (definiert als ein Areal von 250 – 500 µm² mit einer Breite von 3 µm direkt neben dem analysierten Tumorgefäß) definiert. Das interstitielle Kompartiment wurde als ein Areal von 250 bis 500 µm² im Interstitium mit einem Mindestabstand vom analysierten Gefäß von 20 µm definiert. Vor der Injektion des Cy3-markiertem L19-SIP wurde die interstitielle Fluoreszenzintensität gemessen, um eine Verfälschung der Daten durch Autofluoreszenzeffekte zu verhindern.

Biodistributionsanalyse während antiangiogener Therapie

Um die Effekte einer antiangiogenen Therapie auf die Biodistribution des L19-SIP zu untersuchen, wurden SF126 Gliomzellen in Rückenhautkammern in Nacktmäusen (N = 4 pro Gruppe) implantiert. Als antiangiogene Substanz wurde der kleinmolekulare Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib mit einer Dosierung von 40 mg/kg/Tag über einen Zeitraum von 6 Tagen täglich intraperitoneal injiziert. Die Kontrolltiere erhielten tägliche Injektionen von 0,9%iger NaCl-Lösung als Placebobehandlung. Die Intravitalmikroskopie wurde sowohl an Tag 2 als auch an Tag 6 nach dem Beginn der antiangiogenen Therapie durchgeführt.

Analyse der Mikrohämodynamik

Um die Mikrohämodynamik zu untersuchen, wurde die Geschwindigkeit der Erythrozyten als auch der Gefäßdurchmesser computerassistent bestimmt. Hierbei wurde die Geschwindigkeit der Erythrozyten intravaskulär mittels eines Algorithmus basierend auf Grauwertverschiebungen bestimmt. Die mikrovaskuläre Blutflussrate wurde anhand folgender Formel berechnet: $Q_v = \pi \times (D : 2)^2 \times RBCV : K$.

In diesem Zusammenhang beinhaltet RBCV die Geschwindigkeit der Erythrozyten, D den Gefäßdurchmesser und K ($= 1,3$) den Baker-Wayland-Faktor, der das parabolische Geschwindigkeitsprofil von Blut in Mikrogefäßen berücksichtigt.

Um nun die mikrohämodynamischen Effekte auf die Anflutung einer Chemotherapie zu untersuchen, wurde eine Bolusinjektion des rot autofluoreszierenden Chemotherapeutikums Doxorubicin (20 mg/kg Körpergewicht) über einen Katheter in der Arteria carotis communis der Versuchstiere ($N=8$) injiziert. Hierbei wurden 4 Tiere mit Sunitinib (40 mg/kg/d) über einen Zeitraum von 6 Tagen behandelt, während 4 Kontrolltiere 0,9%ige NaCl-Lösung als Placebobehandlung erhielten. Durch die Analyse der perivaskulären Fluoreszenzintensität vor und 10 Minuten nach der Doxorubicinapplikation konnten Veränderungen der perivaskulären Fluoreszenzintensität und damit die Akkumulation des fluoreszierenden Doxorubicins quantitativ bestimmt werden. Um die mikrovaskuläre Anflutung (Microvascular Delivery = MD) zu bestimmen, wurde die Fluoreszenzintensität in sechs verschiedenen Regions of Interest (ROI) mit einer Gesamtfläche von 1000 bis 2000 μm^2 gemessen. Die ROIs waren dabei per definitionem 10-30 μm neben einem perfundierten Tumorgefäß lokalisiert. Nach Abzug des Hintergrundwertes wurde die Veränderung der perivaskulären Fluoreszenzintensität als „Microvascular Delivery“ (MD) von Doxorubicin ins Interstitium definiert. Um nun die mikrovaskuläre Anflutung von Doxorubicin in Relation zur Anzahl perfundierter Blutgefäße zu setzen, wurde MD in Abhängigkeit von der funktionellen Gefäßdichte (FVD) analysiert und dieses Verhältnis als der „Microvascular Delivery-Index“ (MDI) des Tumorgefäßsystems definiert.

Intravitale konfokale Laser-Mikroskopie

Um die Lokalisation von L19-SIP in den Rückenhautkammern auch in tieferen Strukturen des Tumors darstellen zu können, wurde die intravitale konfokale Laser-Mikroskopie durchgeführt. Fluoreszenzbilder wurden hierbei mit einem LEICA-TCPSB 2-konfokalen Laser-Mikroskop (CSLM; LEICA, Benzheim/Germany) durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln aufgenommen. Mittels intravenöser Injektion von 2%iger FITC-Dextran-Lösung (100 μl i.v.) wurden Z-stacks über eine Gesamtstrecke von 100 μm des Tumorgewebes visualisiert mit einem Z-stip-Intervall von 5 μm . Die Durchschnittsprojektion

der einzelnen Aufnahmen wurde mit einem computerunterstützten Bildverarbeitungssystem, welches vom Hersteller bereitgestellt wurde, verarbeitet.

Immunhistochemie

Die Tumore wurden exzidiert und anschließend in Aceton fixiert. Es wurden 5 µm messende Kryoschnitte hergestellt. 5 Kryoschnitte pro Tumor wurden anschließend analysiert. Die ROIs wurden als ein Areal von 91 µm² definiert und in 40facher Vergrößerung analysiert. Zur Visualisierung der Endothelzellproliferation wurden ein spezies-spezifischer anti-Ki67-Antikörper (TEC-3, DAKO, Hamburg/Germany) sowie konventionelle immunhistochemische Techniken verwendet. Die Quantifizierung erfolgte durch das Auszählen positiv gefärbter Zellkerne pro ROI. Mit dem Ziel Perizyten-Endothelzellinteraktionen darzustellen, wurde die Fraktion Perizyten-assoziiierter Gefäße gezählt. Zu diesem Zweck wurde eine Doppelfluoreszenzfärbung für den Endothelzellmarker CD31 und den Perizytenmarker Desmin durchgeführt und die Quantifizierung erfolgte durch Auszählen perizytenmarkierter Blutgefäße im Vergleich zu sämtlichen Blutgefäßen. Mit dem Ziel, die Tumorzellproliferation darzustellen, wurde ein Phosphohiston A3-Antikörper (UPSTAE-Millipore, Schwabach/Germany) verwendet. Die Quantifizierung wurde durch Auszählen der positiv markierten Zellkerne pro ROI durchgeführt.

Zur histologischen Darstellung des CY3-markierten L19 SIP erfolgte ebenfalls die Anfertigung von Kryoschnitten (4 µm) in Aceton-fixiertem Tumorgewebe. Es erfolgte daraufhin die Färbung für den Endothelzellmarker CD 31 in Kombination mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg/Germany). Die Färbung der Zellkerne wurde mittels DAPI durchgeführt. Die Kolokalisation des CY3-L19 SIP mit dem CD31-Signal wurde mittels eines Axioplan2-Imaging-Mikroskopes (ZEISS, Jena/Germany) durchgeführt und mit der vom Hersteller mitgelieferten Software ausgewertet.

Zur Visualisierung einer TBK1-Überexpression wurden in flüssigem Stickstoff gefrorene Tumore kryosektioniert und mit den entsprechenden Primär- und Sekundär-Antikörpern über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen wurde biotinyliertes Schaaf-

Anti-Rabbit-Serum hinzugefügt und anschließend erneut gewaschen. Danach wurden die Reagenzien des ABC-Kits (Vector Burlingame, CA, USA) zugeführt und anschließend fixiert.

Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse wurde durchgeführt, um die Expression VEGF in TBK1-überexprimierenden Tumoren und den entsprechenden Kontrolltumoren zu untersuchen. Hierfür wurden Tumorslysate (50 µg/ml) mit einem Proteaseninhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim/Germany) verwendet. Der Western-Blot wurde anschließend mit polyklonalem Antikörper gegen humanes VEGF (1 µg/ml, A-20, Santa-Cruz-Biotec, Heidelberg/Germany) durchgeführt. Durch die Verwendung eines AP-konjugierten Anti-Rabbit-Antikörpers (Jackson-Immuno-Dianova, Hamburg/Germany) erfolgte die Visualisierung mittels Chemolumineszenz (Lumi-Phos-Pierce, Bonn/Germany).

Moyamoya Vaskulopathie - Klinische Untersuchungsmethoden

Die ICG-Videoangiographie

Bei allen Patienten wurde die Indocyaningrün(ICG)-Videoangiographie entsprechend der chirurgischen Indikation durchgeführt. Die Platzierung eines Millimeter-Maßstabs auf der cerebralen Oberfläche vor der ICG-Videoangiographie garantierte die dimensionale Genauigkeit während der postoperativen Analyse. Während der Applikation des Indocyaningrüns erfolgte ein ausführliches Monitoring der Blutdruckwerte und der Herzfrequenz. Zur Aufzeichnung des ICG-Videoangiogramms wurde ein Bolus von etwa 20 mg (0,3 mg/kg Körpergewicht) Indocyaningrün intravenös verabreicht und die Fluoreszenz über dem Operationsfeld mit Hilfe der im Operationsmikroskop (Zeiss Pentero) integrierten Software aufgezeichnet. Die Videosequenzen wurden anschließend mit Hilfe der IC-Calc 1.1-Software (Fusion Medical Systems, München/Deutschland) ausgewertet.

Einteilung des kortikalen Gefäßsystems

Entsprechend ICG-videoangiographischer Aspekte wurde das kortikale Gefäßsystem eingeteilt: die zuerst füllende kortikale Arterie (A1) und ihre direkten Abgänge (A2) sowie die

zuletzt drainierenden Venen (V1) und ihre direkten Äste (V2) wurden als kortikale Makrovaskularisierung bezeichnet.

Alle Gefäße, die zwischen diesen Gefäßsegmenten zur Darstellung kamen wurden als kortikale Mikrovaskularisation definiert. Zur Quantifizierung der kortikalen Mikrovaskularisation wurden drei Regions of Interest (ROI) pro cerebralem Kortex ausgewertet. Hierbei wurde ein ROI als eine Fläche von 25-100 mm² definiert, ohne dass ein Gefäß der Makrovaskularisierung (A1, A2, V1 oder V2) in diesem Areal zur Darstellung kam. Die mikrovaskuläre Dichte (microvascular density = MD) wurde anschließend als die Länge aller Mikrogefäße pro analysierten ROI definiert. Der mikrovaskuläre Durchmesser als auch die mikrovaskuläre Oberfläche wurden mit Hilfe eines computerassistierten Analyse-Systems (CAPIImage-Science, Heidelberg/Germany) ausgewertet. Hierbei wurde die mikrovaskuläre Oberfläche (microvascular surface = MVS) mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$MVS = \pi \times D : 2 \times MD$$

Die mikrohämodynamische Analyse der kortikalen Mikrovaskularisierung

Mittels der ICCalc - 1.1-Software (Fusion Medical Systems, München/Germany) wurden drei verschiedene Kompartimente in einem zeitabhängigen Verfahren untersucht. Hierbei wurde das arterielle Kompartiment (A2-Gefäße), das kapilläre Kompartiment (= Mikrovaskularisierung) und das venöse Kompartiment (V2-Gefäß) unterschieden. Durch die Bestimmung der zeitlichen Latenz der höchsten Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Kompartimenten kann die Zeit erfasst werden, die der Fluoreszenzfarbstoff für die Durchströmung des kapillären Kompartiments benötigt. Diese Zeit wurde als die mikrovaskuläre Transit Time (MVTT) definiert. Darüber hinaus wurde der Unterschied in der höchsten Fluoreszenzintensität zwischen dem arteriellen und dem kapillären Kompartiment bestimmt. Diese Zeit wurde als die arterielle mikrovaskuläre Transit Time (AMVTT) definiert. Vergleichbar wurde die Latenz zwischen dem höchsten Fluoreszenzwert des kapillären und des venösen Kompartiments bestimmt und damit die venöse mikrovaskuläre Transit Time (VMVTT) definiert.

Evaluation der angiographischen Revaskularisierungsergebnisse

Um die angiographische Kollateralisierung nach cerebraler Revaskularisierung zu untersuchen, wurde eine digitale Subtraktionsangiographie postoperativ (innerhalb der ersten 7 Tage nach der Operation) als auch zu einer frühen Verlaufsuntersuchung (ca. 6 Monate nach der Operation) und zu einer späten Verlaufsuntersuchung (ca. 12 Monate nach der Operation) durchgeführt. Zusätzlich zur späten angiographischen Verlaufsuntersuchung wurde bei 20 adulten Moyamoya-Patienten eine Messung des regionalen cerebralen Blutflusses und der zerebrovaskulären Reservekapazität mittels Xenon-Computertomographie durchgeführt. Um die angiographischen Revaskularisierungsergebnisse quantifizieren zu können, wurde ein semiquantitatives Auswertungssystem verwendet. Hierbei wurde zur Klassifizierung der Funktion des STA-MCA-Bypasses folgendes System angewendet:

Grad 0	= keine Füllung des MCA-Gefäßterritoriums
Grad 1 (schwach)	= anterograde Füllung von 1 oder 2 MCA-Ästen
Grad 2 (medium)	= ante- und retrograde Füllung des MCA-Territoriums
Grad 3 (extensiv)	= Füllung des gesamten MCA-Territoriums

Vergleichbar wurde die Quantifizierung des angiographischen Revaskularisierungsergebnisses für die Encephalomyosynangiose angewendet:

Grad 0	= keine Füllung
Grad 1 (schwach)	= schwache Darstellung kortikaler Gefäße
Grad 2 (medium)	= Füllung von cerebralen Arterien über 1 oder 2 Muskeläste des Temporalmuskels
Grad 3 (extensiv)	= Füllung des gesamten MCA-Gefäß-Territoriums über 3 Muskeläste des Temporalmuskels

Klinische Evaluation des Revaskularisierungsergebnisses

Der klinische Status jedes individuellen Patienten wurde als verbessert definiert, wenn es im Verlauf des Beobachtungszeitraumes zu einer Verbesserung der neurologischen Symptome (z.B. regrediente Hemiparese, regrediente Aphasie etc.) kam. Falls die Patienten durch intermittierend auftretende transiente ischämische Attacken (TIA) auffällig wurden, so wurde ein vollständiges Verschwinden der TIAs nach Revaskularisierungsoperation als Verbesserung der Erkrankung gewertet. Eine stabile Erkrankung wurde als eine Persistenz neurologischer Defizite oder eine Persistenz der TIA-Frequenz definiert. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls eine reduzierte TIA-Frequenz als stabile Erkrankung gewertet, da die Revaskularisierung basierend auf klinischen Gesichtspunkten nicht vollständig das hämodynamische Defizit kompensieren konnte. Als progrediente Erkrankung wurde das Auftreten neuer neurologischer Defizite, ein Anstieg der TIA-Frequenz oder das Auftreten einer intrazerebralen Blutung gewertet. Soweit möglich wurden die klinischen Symptome auf eine verantwortliche Hirnhemisphäre eingegrenzt. Im Falle von Kopfschmerzen oder primär psychologischen/psychiatrischen Symptomen wurden beide Hemisphären als symptomatisch gewertet.

Beschreibung des Klassifikationssystems der Moyamoya-Vaskulopathie

Die Moyamoya-Vaskulopathie wird durch das angiographische Erscheinungsbild, das Auftreten zerebraler ischämischer Läsionen und durch eine signifikante Einschränkung der zerebrovaskulären Reservekapazität charakterisiert. Folglich orientiert sich das Klassifikationssystem der Moyamoya-Erkrankung an diesen drei Parametern. In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass die Klassifikation jeweils für eine Hirnhemisphäre gilt, wodurch es möglich ist, dass ein Patient unterschiedliche Klassifikationsgrade pro Hemisphäre zeigt. Dementsprechend werden die Einzelparameter pro Hemisphäre gewertet.

Variable 1: Digitale Subtraktionsangiographie

Die digitale Subtraktionsangiographie wurde in drei Schweregrade aufgeteilt – in Abhängigkeit von der Präsenz stenookklusiver Läsionen, intrakranieller Kollateralen sowie extra-/ intrakranieller Kollateralen.

1. Die Präsenz von stenookklusiven Läsionen in Begleitung von typischen Moyamoya-Gefäßen ohne intrakranielle oder extra-/intrakranielle Kompensationswege wurde als die leichteste angiographische Ausprägung der Erkrankung gewertet und erhielt vor diesem Hintergrund **1 Punkt**.
2. Die kombinierte Präsenz von stenookklusiven Läsionen, Moyamoya-Gefäßen und zusätzlichen rein intrakraniellen Kollateralen (wie z.B. leptomeningeale Anastomosen und/oder Balkenanastomosen) wurde als fortgeschrittene Erkrankung gewertet und erhielt dementsprechend **2 Punkte**.
3. Die Präsenz von stenookklusiven Läsionen und extra-/intrakraniellen Kollateralen wurde definiert als die schwerste angiographische Erscheinungsform und erhielt **3 Punkte**.

Die Präsenz von Moyamoya-Gefäßen war kein verpflichtender Parameter für die schwerste angiographische Erscheinungsform der Moyamoya-Erkrankung, da sich Moyamoya - Gefäße entsprechend der Erstbeschreibung von Suzuki mit zunehmendem Erkrankungsgrad zurückbilden²⁶.

Variable 2: MRT-Bildgebung zerebraler Ischämien

Um den Schweregrad der Erkrankung sowie strukturelle ischämische Läsionen und deren Bedeutung für den klinischen Verlauf der Erkrankung in das Klassifikationssystem integrieren zu können, wurde die Präsenz von ischämischen Läsionen in der MRT-Bildgebung als zweite Variable gewertet. In diesem Zusammenhang wurde eine pathologische Bildgebung als ein MRT definiert, welches den Nachweis einer ischämischen Läsion erbringt und/oder Zeichen einer Hirnatrophie als generelles Resultat einer hämodynamischen Einschränkung zeigte. Ein nicht pathologisches MRT wurde definiert als eine kraniale Bildgebung, die keine Zeichen einer Moyamoya-assoziierten Ischämie, Blutung oder Atrophie zeigt. Dementsprechend erhielt eine per definitionem pathologische MRT-Bildgebung 1 Punkt und eine per definitionem nicht pathologische MRT-Bildgebung 0 Punkte.

Variable 3: zerebrovaskuläre Reservekapazität

Der wichtigste funktionelle Parameter, der die zerebrovaskuläre Insuffizienz charakterisiert ist die zerebrovaskuläre Reservekapazität. Für eine schwer eingeschränkte zerebrovaskuläre Reservekapazität mit einem 5%igen Abfall des zerebralen Blutflusses nach Acetazolamid-Stimulation wurde ein signifikant erhöhtes Schlaganfall-Risiko beschrieben³⁵. Diese Patienten profitieren in besonderem Maße von einer zerebralen Revaskularisierung³⁶. Um diesen pathophysiologischen Zusammenhang entsprechend in das Klassifikationssystem zu integrieren, wurde eine zerebrovaskuläre Reservekapazität von -5% als eingeschränkt gewertet und erhielt dementsprechend 2 Punkte. Eine zerebrovaskuläre Reservekapazität, die größer als -5% war, wurde als nicht relevant eingeschränkt gewertet. Insgesamt wurden diesem Parameter zwei Punkte zugeordnet, da zum einen eine zerebrovaskuläre Reservekapazität von -5% und weniger für eine schwere Einschränkung der zerebralen Durchblutung steht und zum anderen dadurch das Schlaganfallsrisiko signifikant erhöht ist.

Durch Addition der einzelnen numerischen Werte jeder Variablen wurde ein Gesamtwert ermittelt. Dieser erlaubt die Einteilung der Moyamoya-Vaskulopathie in drei Schweregrade:

Die milde Form der Moyamoya-Vaskulopathie (Grad I) wurde definiert als ein Gesamtpunktwert von 1-2 Punkten, die moderate Form der Moyamoya-Vaskulopathie (Grad II) wurde definiert als ein Gesamtpunktwert von 3-4 Punkten und die schwere Form der Moyamoya-Vaskulopathie (Grad III) wurde definiert als ein Gesamtpunktwert von 5-6 Punkten.

Ergebnisse

I. Glioblastoma multiforme

Identifikation der Tank-Binding-Kinase I als antiangiogenes Zielmolekül

Die klassischen Zielmoleküle antiangiogener Therapiestrategien sind proangiogene Faktoren wie z.B. der vascular endothelial growth factor (VEGF) oder der platelet derived growth factor (PDGF)³⁷. In zunehmendem Maße wird allerdings deutlich, dass antiangiogene Therapiestrategien als Monotherapie nur einen eingeschränkten Therapieeffekt besitzen¹. Multiple Resistenzmechanismen könnten für die Insuffizienz einer antiangiogenen Monotherapie verantwortlich sein. Diese umfassen alternative Gefäßwachstumsprozesse und die Expression alternativer proangiogener Moleküle, Änderungen in der Tumorbiologie im Sinne eines proinvasiven und prometastatischen Wachstums und die Produktion unabhängiger Wachstumsfaktoren durch tumorassoziierte Fibroblasten, Makrophagen und andere Zellen³⁸.

Neue Erkenntnisse weisen darauf hin, dass es eine Interaktion zwischen dem inflammatorischen und dem angiogenen System gibt. Kürzlich konnte die Tank-Binding-Kinase I als eine neue Kinase beschrieben werden, die den inflammatorischen Nuclear Factor KappaB - Signalweg als auch den Interferon Regulatory Factor 3 - Signalweg aktiviert und damit vornehmlich eine proinflammatorische Immunantwort gegen virale Antigene vermittelt³⁹. Zusätzlich konnte ein Genomscreen für angiogene Moleküle zeigen, dass der TBK1-/IRF-3-Signalweg die Proliferation von Endothelzellen in vitro stimuliert⁴⁰. Diese Daten legen eine proangiogene Rolle für den TBK1/IRF-3-Signalweg nahe. Histologische Untersuchungen konnten darüber hinaus zeigen, dass TBK1 in verschiedenen Tumorarten (inklusive dem Glioblastoma multiforme) verstärkt exprimiert wird⁴⁰. Das Ziel dieser Arbeit war es die Beteiligung von TBK1 an der Vermittlung der Tumorangiogenese und der tumorassoziierten mikrovaskulären Inflammation in vivo zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden TBK1 überexprimierende Tumore sowie die entsprechenden Kontrollen im Rückenhautkammermodell mittels intravitalmikroskopischer Analyse untersucht. Die

Experimente wurden in Nacktmäusen (N=6 pro Gruppe) durchgeführt. Die TBK1 überexprimierenden Tumorzellen bzw. die entsprechenden Kontrollzellen wurden in die Rückenhautkammer implantiert und an den Tagen 7, 14 und 21 nach Implantation mittels Intravitalmikroskopie untersucht. Eine intravenöse Applikation von FITC-Dextran ermöglichte die Darstellung des Gefäßsystems. Die Darstellung von Leukozyten-Endothelinteraktionen erfolgte über eine intravenöse Rhodamininjektion. Die analysierten Parameter beinhalteten:

- die totale vaskuläre Dichte (TVD)
- die funktionelle tumorale vaskuläre Dichte (FVD)
- Perfusionsindex (PI)
- Leukozytenadhärenz (=Leukozytensticking)

Wir konnten zeigen, dass eine TBK1-Überexpression zu einem signifikanten Anstieg der TVD als auch der FVD führt. Neben diesem proangiogenen Effekt führt eine TBK1 Überexpression zu einer erhöhten mikrovaskulären Inflammation mit einem signifikanten Anstieg der Leukozytenadhärenz. Um potentielle Moleküle zu identifizieren, die sowohl angiogene als auch proinflammatorische Reaktionen hervorrufen, wurden die Zytokine RANTES und Interleukin 8 quantitativ mittels PCR-Analyse untersucht. Hier zeigte sich, dass in TBK1 überexprimierenden Tumoren eine signifikante Erhöhung sowohl von RANTES als auch von Interleukin 8 nachzuweisen war. Darüber hinaus konnten wir mittels Western Blot-Analyse darlegen, dass die TBK1 überexprimierenden Tumore eine signifikante Erhöhung des Wachstumsfaktors VEGF zeigen. Zusammenfassend konnten wir mit dieser Arbeit zeigen, dass TBK1 sowohl eine proangiogene, als auch eine proinflammatorische Antwort vermittelt, indem eine Hochregulation von proangiogenen als auch proinflammatorischen Molekülen induziert wird. Vor diesem Hintergrund könnte TBK1 ein potentielles neues Zielmolekül zur antiangiogenen und antiinflammatorischen Therapie des Glioblastoma multiforme darstellen.

Czabanka M, Korherr C, Brinkmann U, Vajkoczy P. Influence of TBK-1 on tumor angiogenesis and microvascular inflammation. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:7243-9.

Bedeutung mikrohämodynamischer Konsequenzen einer antiangiogenen Therapie für die kombinierte Behandlung mit Chemotherapeutika

In mehreren großen klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die kombinierte Applikation einer antiangiogenen Substanz mit einem Chemotherapeutikum zu einem signifikanten Therapievorteil im Vergleich zur Chemotherapie führt^{21, 23}. Daraufhin entstand das Konzept, dass eine antiangiogene Therapie als eine chemosensitivierende Therapiestrategie anzuwenden ist²³. Allerdings ist bislang der Mechanismus, der zu dem synergistischen Therapieeffekt führt, völlig unklar. Das Konzept der vaskulären Normalisierung postuliert, dass durch morphologische und funktionelle Gefäßveränderungen eine bessere Exposition des Chemotherapeutikums im Tumor erreicht wird³⁸. Dies soll eine schnelle Tumorzellrepopulation nach der Chemotherapie verhindern und gleichzeitig die antivaskulären Effekte einer Chemotherapie verstärken³⁸. Das Ziel unserer Studie war es daher die mikrohämodynamischen Konsequenzen einer antiangiogenen Therapie mit Sunitinib zu untersuchen und die Folgen für die mikrovaskuläre Anflutung und Extravasation des Chemotherapeutikums Doxorubicin zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden SF126-Gliomzellen in das Rückenmarkmodell implantiert und an den Tagen 7, 14 und 21 nach Implantation intravitalmikroskopisch untersucht. In der Therapiegruppe erhielten die Versuchstiere 40 mg/kg Körpergewicht Sunitinib täglich beginnend ab Tag 7 nach Tumorzellimplantation. Die Kontrolltiere erhielten eine Placebobehandlung mit 0,9% Kochsalzlösung.

Die Intravitalmikroskopie wurde an den Tagen 7, 9, 11 und 13 nach Tumorzellimplantation durchgeführt. Die folgenden Parameter wurden erfasst:

- totale vaskuläre Dichte (TVD)
- funktionelle vaskuläre Dichte (FVD)
- mikrovaskulärer Durchmesser (D)
- mikrovaskuläre Erythrozytengeschwindigkeit (V)
- mikrovaskuläre Blutflussrate (Q).

Nach sechstägiger Sunitinibtherapie erhielten die Versuchstiere eine arterielle Injektion der chemotherapeutischen Substanz Doxorubicin, die eine rote Autofluoreszenz besitzt und damit intravitalmikroskopisch dargestellt werden kann. Hier wurden der mikrovaskuläre Delivery-

Index, der die Anflutung der Chemotherapie pro Gefäß quantifiziert, als auch das mikrovaskuläre Delivery, welches die Anflutung der Chemotherapie im Interstitium definiert, bestimmt.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine antiangiogene Therapie mit Sunitinib zu einer signifikanten Reduktion der totalen und funktionellen vaskulären Gefäßdichte führt. Trotz dieser äußerst effizienten antiangiogenen Antwort waren 20-30% der Tumorgefäße therapieresistent. Diese Gefäße zeigten deutliche morphologische und funktionelle Veränderungen mit einem 60%igen Anstieg des mikrovaskulären Durchmessers sowie einer 10fach erhöhten mikrovaskulären Blutflussrate. Folglich waren diese therapieresistenten Gefäße durch eine deutlich verbesserte Perfusion gekennzeichnet. Diese mikrohämodynamischen Veränderungen führten dazu, dass der mikrovaskuläre Deliveryindex, der die Anflutung der Chemotherapie pro Gefäß quantifiziert, in therapieresistenten Tumorgefäßen signifikant höher war als in nicht-therapierten Tumorgefäßen. Dieser Effekt kompensierte die Reduktion der Gefäßdichte und der Gesamtperfusion und hielt die Anflutung der Chemotherapie im Tumorinterstitium aufrecht. Diese Daten implizieren, dass eine verbesserte Perfusion therapieresistenter Gefäße zu den synergistischen Effekten einer Kombination aus Chemotherapie und antiangiogener Therapie beitragen könnte.

Czabanka M, Vinci M, Heppner F, Ullrich A, Vajkoczy P. Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy. *Int J Cancer*. 2009 Mar 15;124(6):1293-300.

Charakterisierung der Biodistribution des antiangiogenen Antikörpers L19-SIP als Mediator gezielter neovaskulärer Therapiestrategien

Das Ziel vaskulärer Targetingstrategien ist es die Spezifität der therapeutischen Intervention auf das vaskuläre Segment des Tumors zu beschränken um die antivaskulären Therapieeffekte zu verbessern und das Nebenwirkungsspektrum zu reduzieren^{41, 42}. Die pathologische Neovaskularisation von Tumoren ist durch eine Expression spezifischer neoangiogener Marker gekennzeichnet⁴³. Einer der vielversprechendsten neovaskulären Marker in diesem Zusammenhang stellt die Extradomäne B von Fibronectin dar, die spezifisch in Tumorgefäßen verschiedener Malignome exprimiert wird⁴². Dadurch wird eine antikörpervermittelte, zielgerichtete Applikation von diagnostischen und therapeutischen Substanzen ausschließlich in das Tumorgefäßsystem möglich. Insbesondere in der Behandlung des Glioblastoma multiforme stellt dies ein interessantes Therapiekonzept dar, da das vaskuläre System des Glioblastoma multiforme ein Schlüsselfaktor in der Pathogenese der Erkrankung ist.

Das Antikörperfragment L19-SIP (SIP = small immunoprotein) wurde generiert um spezifisch die Extradomäne B von Fibronectin zu binden⁴⁴. Eine L19-vermittelte Radioimmuntherapie konnte diesbezüglich zeigen, dass Lymphompatienten mit einer deutlichen Reduktion der Tumormasse auf eine L19 gesteuerte Radiotherapie reagieren⁴³. Da jedoch die Biodistribution des Antikörpers auf mikrovaskulärer Ebene ungeklärt ist, war es das Ziel der Studie die mikrovaskuläre Biodistribution von L19-SIP zu charakterisieren. Des Weiteren wurde die Biodistribution des Antikörpers unter gleichzeitiger antiangiogener Intervention untersucht. Zu diesem Zweck wurden F9-Teratokarzinom-Zellen in C57/Bl6-Mäusen (N=6/Gruppe) und Glioblastomzellen (SF126) in Nacktmäusen (N=4/Gruppe) implantiert und mittels Intravitalmikroskopie und konfokaler 2-Photonenmikroskopie analysiert. Die Parameter beinhalteten:

- die vaskuläre Akkumulation von L19-SIP
- die interstitielle Akkumulation von L19-SIP (Extravasation)
- Gefäßpermeabilität
- Preferentielle Bindungsstellen von L19-SIP

Für die Untersuchungen unter antiangiogener Therapie erhielten die Versuchstiere 40 mg/kg Körpergewicht Sunitinib über einen Zeitraum von 5 Tagen. Auch hier wurde intravitalmikroskopisch das Fluoreszenzsignal des CY3-markierten L19-SIP quantifiziert und damit die vaskuläre und die interstitielle Akkumulation bestimmt. Darüber hinaus wurden in beiden Tumorzelllinien die Akkumulation des Antikörpers immunhistochemisch vor und nach antiangiogener Therapie verifiziert.

Die intravitalmikroskopische Analyse legte dar, dass der Antikörper spezifisch Tumorgefäße in einer zeit- und blutflussabhängigen Dynamik bindet. Die maximale Bindungsintensität des Antikörpers wurde 4 Stunden nach Injektion erreicht und persistierte über einen Zeitraum von 24 Stunden. Es kam sekundär zu einer Extravasation des Antikörpers, die jedoch deutlich geringer als die vaskuläre Akkumulation des Antikörpers ausgeprägt war. Somit entstand der beste Akkumulationskontrast zwischen der vaskulären und der interstitiellen Bindung des Antikörpers zum Zeitpunkt $t = 4$ Stunden nach Injektion. Der sekundäre Extravasationsprozess war dabei unter anderem abhängig von tumorbiologischen Eigenschaften wie der Permeabilität der Tumorgefäße. Hierbei zeigten die Tumorgefäße des Glioblastoms eine erhöhte Permeabilität im Vergleich zu den Teratokarzinomen und waren damit durch eine stärkere Extravasation des Antikörpers charakterisiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass im Bereich der angiogenen Sprossen die Bindung des Antikörpers signifikant höher war als in den bereits etablierten Tumorgefäßen.

Unter antiangiogener Therapie kam es zu einer signifikant höheren Bindung des Antikörpers an therapieresistente Gefäße im Vergleich zu placebotherapierten Gefäßen (Vaskuläre Akkumulation L19-SIP: Sunitinib-Gruppe: $92,6 \pm 2,7$; Placebo: $71,9 \pm 5,9$). Ebenso war der sekundäre Extravasationseffekt unter antiangiogener Therapie erhöht. Diese Beobachtung war vornehmlich auf eine therapieinduzierte signifikante Erhöhung der Perfusion in den therapieresistenten Gefäßen zurückzuführen (Mikrovaskuläre Blutflussrate: Sunitinib-Gruppe: $106,6 \pm 13,3$ $\mu\text{l}/\text{sec}$; Placebo: $19,7 \pm 9,1$ $\mu\text{l}/\text{sec}$).

Czabanka M, Parmaksiz G, Bayerl SH, Nieminen M, Trachsel E, Menssen HD, Erber R, Neri D, Vajkoczy P. Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies. *Eur J Cancer*. 2011 May;47(8):1276-84.

II. Moyamoya Erkrankung

Charakterisierung der kortikalen Mikrozirkulation

Die kortikale Mikrozirkulation spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der zerebralen Perfusion und des zerebralen Blutflusses⁴⁵. Mehrere wissenschaftliche Arbeiten werfen die Hypothese auf, dass die erhöhte kortikale Gefäßdichte im Rahmen der Moyamoya Vaskulopathie einen Kompensationsmechanismus für den chronisch eingeschränkten zerebralen Blutfluss sein könnte^{33, 46}. Mit dieser Hypothese wurde bei 16 Moyamoya-Patienten während einer zerebralen Revaskularisierungsoperation die kortikale ICG-Videoangiographie durchgeführt. Dieses Verfahren wird standardmäßig bei Revaskularisierungsoperationen angewendet um das geeignete Empfängergefäß zu identifizieren und nach Revaskularisation die Bypassfunktion evaluieren zu können. Als Vergleichsgruppe führten wir die ICG-Videoangiographie bei 15 Patienten, die an einer atherosklerotisch bedingten zerebrovaskulären Insuffizienz erkrankt waren, durch. Als weitere Kontrollgruppe führten wir die ICG-Videoangiographie bei 10 Patienten durch, deren kortikale Angioarchitektur und Mikrodynamik als physiologisch gewertet werden konnte. Neun dieser Patienten wurden aufgrund eines nicht rupturierten intrakraniellen Aneurysmas operiert und 1 Patient wurde aufgrund eines zerebellären Tumors über einen transtentoriellen Zugang operiert. Das kortikale Gefäßsystem wurde anhand ICG-angiographischer Aspekte definiert. Mittels eines computerunterstützten Analysesystems wurden folgende Parameter analysiert:

- Mikrovaskuläre Dichte
- Mikrovaskulärer Durchmesser
- Mikrovaskuläre Oberfläche
- Mikrovaskuläre Transit-Time
- Arterielle mikrovaskuläre Transit-Time und
- Venöse mikrovaskuläre Transit-Time

Die präoperativ durchgeführte quantitative Messung des zerebralen Blutflusses ergab sowohl bei Moyamoya-Patienten als auch bei Patienten, die aufgrund einer Atherosklerose operiert wurden, eine vergleichbare Einschränkung des regionalen zerebralen Blutflusses und der zerebrovaskulären Reservekapazität. Moyamoya-Patienten zeigten eine signifikante

Erhöhung der mikrovaskulären Dichte, des mikrovaskulären Durchmessers und der mikrovaskulären Oberfläche. Der größte Unterschied hierbei bestand in der mikrovaskulären Oberfläche mit $67 \pm 13\%$ bei Moyamoya-Patienten im Vergleich zu $47 \pm 7\%$ bei Patienten mit einer atherosklerotischen zerebrovaskulären Erkrankung und $45 \pm 6\%$ bei den Kontrollpatienten. Zwischen den Kontrollpatienten und den Patienten mit einer atherosklerotisch bedingten zerebrovaskulären Insuffizienz bestand kein Unterschied. Die mikrohämodynamischen Messungen zeigten, dass Moyamoya-Patienten durch eine signifikant erhöhte mikrovaskuläre Transit-Time (11 ± 3 sec) im Vergleich zu den anderen Patientengruppen (Atherosklerose: 8 ± 2 sec, Kontrolle: 8 ± 2 sec) charakterisiert waren. Dieser Unterschied beruhte auf einem signifikanten Unterschied im arteriellen Bereich der Mikrozirkulation mit einer deutlich erhöhten arteriellen mikrovaskulären Transit-Time bei Moyamoya-Patienten (6 ± 3 sec) im Vergleich zu Atherosklerosepatienten (4 ± 1 sec) und im Vergleich zu Kontrollpatienten (4 ± 2 sec). Bezüglich der venösen mikrovaskulären Transit-Time konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen gezeigt werden. Basierend auf den Daten dieser Studie wurde dargelegt, dass Moyamoya-Patienten durch eine deutlich erhöhte kortikale mikrovaskuläre Dichte und mikrovaskuläre Oberfläche gekennzeichnet sind und durch eine veränderte kortikale Mikrohämodynamik. Diese Effekte scheinen ein Moyamoya-spezifisches neovaskuläres Phänomen zu sein, welches nicht allein durch die zerebrovaskuläre Insuffizienz erklärt werden kann, da bei Patienten mit einer atherosklerotisch bedingten zerebrovaskulären Insuffizienz gleichwertige Veränderung nicht verifiziert werden konnten.

Czabanka M, Peña-Tapia P, Schubert GA, Woitzik J, Vajkoczy P, Schmiedek P.
Characterization of cortical microvascularization in adult moyamoya disease.
Stroke. 2008 Jun;39(6):1703-9.

Klinische Implikationen der kortikalen Mikrozirkulation

In der vorangegangenen Studie konnten wir zeigen, dass es Moyamoya-spezifische Alterationen der kortikalen Mikrozirkulation gibt. Eine signifikant erhöhte mikrovaskuläre Dichte, begleitet von einer erhöhten mikrovaskulären Transit-Time würde – basierend auf physiologischen Überlegungen – für eine reduzierte periphere vaskuläre Resistenz sprechen, die wiederum als Kompensationsmechanismus für den chronisch reduzierten zerebralen Blutfluss wirken könnte. Durch eine Korrelation der mikrovaskulären und der klinischen Parameter sollte im Rahmen dieser Studie die klinische Bedeutung der kortikalen Mikrozirkulation untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden bei 13 Moyamoya-Patienten mittels einer intraoperativen ICG-Videoangiographie die kortikale Mikrozirkulation dargestellt und analysiert. Präoperativ unterzogen sich die Patienten einer standardisierten Diagnostik bestehend aus einer digitalen Subtraktionsangiographie, einer Azetazolamid-stimulierten XENON-CT-Bildgebung sowie einer ausführlichen neurologischen Untersuchung. Mittels verschiedener Korrelationstests konnten wir zeigen, dass eine signifikante Korrelation zwischen der mikrovaskulären Oberfläche und der zerebrovaskulären Reservekapazität besteht. Patienten mit einer reduzierten zerebrovaskulären Reservekapazität zeigten eine deutlich höhere vaskuläre Oberfläche als Patienten mit einer erhaltenen zerebrovaskulären Reservekapazität. Diesbezüglich war die mikrovaskuläre Oberfläche jedoch nicht abhängig von der angiographischen Ausprägung der Moyamoya-Vaskulopathie. Korrelierend mit einer erhöhten mikrovaskulären Oberfläche zeigte sich ebenfalls eine deutliche Erhöhung der arteriellen mikrovaskulären Transit-Time. Eine positive Korrelation zwischen der arteriellen mikrovaskulären Transit-Time und der zerebrovaskulären Reservekapazität oder den angiographischen Stadien der Moyamoya-Vaskulopathie bestand nicht. Patienten, die bei Aufnahme im Krankenhaus asymptomatisch waren, zeigten eine deutlich höhere arterielle mikrovaskuläre Transit-Time und eine erhöhte mikrovaskuläre Oberfläche als Patienten, die sich bereits mit einem fixierten neurologischen Defizit in der Klinik vorstellten. Vor diesem Hintergrund legen unsere Daten nahe, dass Alterationen der kortikalen Mikrozirkulation mit Veränderungen der kortikalen Hämodynamik einhergehen und Patienten ohne neurologische Ausfälle durch hämodynamisch günstigere Veränderungen des kortikalen Gefäßsystems charakterisiert sind.

Czabanka M, Peña-Tapia P, Schubert GA, Woitzik J, Horn P, Schmiedek P, Vajkoczy P. Clinical implications of cortical microvasculature in adult Moyamoya disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009 Aug;29(8):1383-7.

Charakterisierung zerebraler Revaskularisierungsmethoden

Das pathophysiologische Hauptmerkmal von Moyamoya-Patienten in Europa ist die chronische zerebrovaskuläre Insuffizienz, die zu rezidivierenden Schlaganfällen und bei schwereren Verläufen zu bleibenden neurologischen Defiziten führt²⁸. Ziel dieser Studie war es, ein kombiniertes Revaskularisierungsverfahren, bestehend aus einem direkten STA-MCA-Bypass sowie einer Encephalomyosynangiose mit einer indirekten Revaskularisierung (nur Encephalomyosynangiose) zu charakterisieren und die therapeutischen Effekte zu vergleichen. Es wurden 30 Moyamoya-Patienten einer einzeitigen, bilateralen Revaskularisierungsoperation unterzogen, die aus einem arteriellen STA-MCA-Bypass sowie einer Encephalomyosynangiose auf der einen Hemisphäre und einer alleinigen Encephalomyosynangiose auf der anderen Seite bestand. Die Indikation hierfür wurde anhand der klinischen Symptomatik gestellt. Es bestand kein Unterschied in der zerebrovaskulären Reservekapazität zwischen symptomatischen oder asymptomatischen Hemisphären. Eine digitale Subtraktionsangiographie wurde präoperativ als auch 7 Tage, 6 Monate und 12 Monate nach der Operation durchgeführt. Basierend auf den angiographischen Ergebnissen wurde die Revaskularisierungsfunktion des STA-MCA-Bypasses und der Encephalomyosynangiose in drei Funktionsgrade eingeteilt (siehe Material und Methoden). 20 Patienten erhielten zusätzlich eine Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität prä- und postoperativ (nach 12 Monaten) mittels Xenon-CT. Eine suffiziente angiographische Kollateralisierung über den STA-MCA Bypass konnte in 94% der Patienten 12 Monate nach der Operation nachgewiesen werden. Für die Encephalomyosynangiose waren diese Werte schlechter, da 23% (bei kombinierter Revaskularisierung) bzw. 17% (bei alleiniger, indirekter Revaskularisierung) gar keine angiographische Kollateralisierung über die EMS zeigten. Wir konnten zeigen, dass 12 Monate nach der Operation nur die kombiniert revaskularisierten Hemisphären eine signifikante Restitution der zerebrovaskulären Reservekapazität erreichten, während die alleinige indirekte Revaskularisierung keine signifikante Erholung der Reservekapazität induzieren konnte. Vor diesem Hintergrund zeigen die Ergebnisse der Studie, dass ein kombiniertes Revaskularisierungsverfahren einem indirekten Verfahren bezüglich der Wiederherstellung der zerebralen Reservekapazität bei adulten Moyamoya-Patienten überlegen ist.

Czabanka M*, P. Peña-Tapia*, Scharf J, Schubert GA, Münch E, Horn P, Schmiedek P, Vajkoczy P.

Characterization of Direct and Indirect Cerebral Revascularization for the Treatment of European Patients with Moyamoya Disease. *Cerebrovasc Dis.* 2011;32(4):361-9. *Equal contribution.

Altersabhängige Revaskularisierungsergebnisse bei der Moyamoya-Erkrankung

Bei den indirekten Revaskularisierungsverfahren wird gut vaskularisiertes Gewebe (z.B. der Temporalmuskel) auf die Gehirnoberfläche gelegt und dort fixiert. Im Verlauf kommt es aufgrund bislang ungeklärter Mechanismen zum Aussprossen von Blutgefäßen über das Spendergewebe auf die Kortexoberfläche²⁷. Dieses Phänomen trifft ausschließlich auf die Moyamoya Vaskulopathie zu⁴⁷. Hypothetisch ist davon auszugehen, dass das proarteriogene bzw. neoangiogene Potential eines Moyamoya-Gehirns höher einzuschätzen ist als das eines gesunden Patienten. Allerdings hängt das Potential zur Ausbildung von Kollateralgefäßen auch im Wesentlichen von dem Alter der Patienten ab. Vor diesem Hintergrund war unsere Hypothese, dass junge Patienten (Kinder unter 18 Jahren) von einer indirekten Revaskularisierung besser profitieren als erwachsene Moyamoya-Patienten europäischen Ursprungs. Basierend auf dieser Hypothese führten wir an 39 Hemisphären eine kombinierte Revaskularisierung, bestehend aus einem STA-MCA-Bypass und einer Encephalomyosynangiose in 10 pädiatrischen und 10 adulten Patienten durch. Die Funktion der direkten als auch der indirekten Revaskularisierung wurde anhand angiographischer Gesichtspunkte in drei Grade eingeteilt: Grad I = schwach, Grad II = moderat, Grad III = gut (siehe Material und Methoden). Die Ergebnisse zeigten dass pädiatrische Patienten durch eine hochgradige Funktion der Encephalomyosynangiose sechs Monate nach der Operation gekennzeichnet sind. Alle pädiatrischen Patienten zeigten eine hoch bis mittelgradige Funktion der Encephalomyosynangiose (12 Hemisphären zeigten eine Grad II- und 8 Hemisphären eine Grad III-Funktion). Darüberhinaus konnte auch ein positives Revaskularisierungsergebnis bei der Funktion des STA-MCA Bypasses bei pädiatrischen Patienten gezeigt werden. Pädiatrische Patienten galten in diesem Zusammenhang oft als ungeeignet für die Anlage eines STA-MCA Bypasses, da die anatomischen Gegebenheiten (kleinere Gefäße) eine Bypassanlage deutlich erschweren. Erwachsene Moyamoya Patienten zeigten ebenfalls ein gutes Ergebnis für die direkte Revaskularisierung. Im Gegensatz zu pädiatrischen Patienten war die Funktion der Encephalomyosynangiose deutlich schlechter. Diese wurde als schwach in 10 Hemisphären und als moderat in 5 Hemisphären klassifiziert. Demnach ist die Encephalomyosynangiose als deutlich effizienter bei pädiatrischen Patienten einzuschätzen als bei adulten Moyamoya-Patienten.

Czabanka M, Vajkoczy P, Schmiedek P, Horn P. Age-dependent revascularization patterns in the treatment of moyamoya disease in a European patient population. *Neurosurg Focus*. 2009 Apr;26(4):E9.

Klassifikation der Moyamoya-Vaskulopathie

Die angiographische Ausprägung der Moyamoya-Vaskulopathie spiegelt nicht zwangsläufig das Ausmaß der zerebralen Ischämie wider. So liefert die angiographische Klassifikation der Moyamoya-Erkrankung auch keine Informationen über das potenzielle Risiko neuer Schlaganfälle und leistet keinen Beitrag zur individuellen Therapieentscheidung. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Studie, die Vorhersagekraft eines Klassifikationssystems zu untersuchen, welches die klinischen Hauptmerkmale der Erkrankung in einem simplen, jederzeit anwendbaren System inkorporiert. Um eine solche Klassifikation zu erarbeiten, analysierten wir die klinischen Daten von 40 Moyamoya-Patienten. Die Patienten erhielten präoperativ eine digitale Subtraktionsangiographie, eine MRT Bildgebung als auch eine Azetazolamid-stimulierte Xenon-CT-Bildgebung zur Messung des zerebralen Blutflusses und der zerebralen Reservekapazität. Sowohl die digitale Subtraktionsangiographie, die MRT-Bildgebung als auch die Bestimmung der zerebrovaskulären Reservekapazität konnten als unabhängige Faktoren identifiziert werden, die mit dem Auftreten ischämischer Symptome assoziiert waren. Die Inkorporation dieser Parameter in ein Klassifikationssystem mit drei Schweregraden der Moyamoya Vaskulopathie (Beschreibung unter Material und Methoden) zeigte, dass sich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit das Auftreten ischämischer Symptome vorhersagen lässt. Basierend auf der Klassifikation konnten 14 Hemisphären als milde Form der Moyamoya Vaskulopathie (Grad I), 35 Hemisphären als moderate Form (Grad II) und 31 Hemisphären als schwere Form (Grad III) eingeteilt werden. Dementsprechend zeigten 21% der Patienten mit einer Grad I-Klassifikation, 63% der Patienten mit einer Grad II- und 93% der Patienten mit einer Grad III-Klassifikation einen klinisch symptomatischen Krankheitsverlauf. Die Receiver Operating Characteristics - Analyse konnte darüberhinaus darlegen, dass die Risikoabschätzung für das Auftreten ischämischer Symptome mit Hilfe der Klassifikation höher ist als die Aussagekraft der einzelnen Parameter. Vor diesem Hintergrund erlaubt die Einteilung der Moyamoya-Vaskulopathie basierend auf der angiographischen Ausprägung der Erkrankung, auf Ischämiezeichen in der MRT Bildgebung sowie auf der Einschränkung der zerebrovaskulären Reservekapazität die Abschätzung eines potentiellen Ischämierisikos sowie die Einteilung der Erkrankung in drei Schweregrade.

Czabanka M, Peña-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. *Cerebrovasc
Dis.* 2011 May 11;32(1):41-50.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit analysiert verschiedene pathophysiologische und therapeutische Implikationen plastischer Gefäßsysteme anhand zweier neoangiogener Modellkrankheiten.

Im Rahmen des Glioblastoma multiforme, einem der am besten vaskularisierten humanen Malignome, wird hierbei die Tumorangiogenese als potentiellles Therapieziel identifiziert. Im Einzelnen konnten wir zeigen:

- dass die von verschiedenen humanen Tumorentitäten exprimierte Tank-Binding-Kinase 1 ein Mediator der Tumorangiogenese und der mikrovaskulären Inflammationsreaktion und damit ein potentiell neues Therapiemolekül darstellt um Tumore (wie z.B. das Glioblastoma multiforme) antiangiogen und antiinflammatorisch zu behandeln,
- dass eine antiangiogene Therapie mit einem kleinmolekularen VEGF- und PDGF-Inhibitor (Sunitinib) zu einem Anstieg des mikrovaskulären Blutflusses in therapieresistenten Mikrogefäßen führt und damit die mikrovaskuläre Anflutung der chemotherapeutischen Substanz Doxorubicin verbessert,
- dass vaskuläre Targetingstrategien gerichtet gegen die Extradomäne B (EDB) von Fibronectin, einem neovaskulären Marker der ausschließlich in Tumorgefäßen exprimiert wird, einem blutfluss- und zeitabhängigen Biodistributionsverhalten unterliegt mit präferentieller Bindung an unreife Gefäßsprossen,
- dass die mikrovaskuläre Bindung des EDB-Antikörpers F8-SIP unter antiangiogener Therapie in therapieresistenten Blutgefäßen zunimmt.

Bezüglich der Moyamoya-Erkrankung konnten wir darlegen:

- dass die kortikale Mikrovaskularisierung bei Moyamoya-Patienten spezifisch verändert ist und hierbei vornehmlich die Gefäßdichte und die Gefäßoberfläche erhöht ist,
- dass die mikrovaskuläre Oberfläche mit der hämodynamischen Durchblutungseinschränkung korreliert und Moyamoya-Patienten mit einem fixierten neurologischen Defizit durch eine reduzierte kortikale Gefäßoberfläche und

hämodynamische Alteration im arteriellen Schenkel der Mikrozirkulation charakterisiert sind,

- dass eine kombinierte Revaskularisierung (bestehend aus einem direkten arteriellen extra-intrakraniellen Standardbypass und einer Encephalomyosynangiose) einer indirekten Revaskularisierung (bestehend aus einer Encephalomyosynangiose) bezüglich der Wiederherstellung der zerebrovaskulären Reservekapazität überlegen ist,
- dass eine Encephalomyosynangiose bei pädiatrischen Moyamoya-Patienten europäischen Ursprungs bessere angiographische Kollateralisierungsergebnisse zeigt als bei adulten Patienten,
- dass eine Vorhersage klinischer Symptome und eine Abschätzung des Schweregrades der Erkrankung basierend auf einer Klassifikation, welche das angiographische Erscheinungsbild der Erkrankung, das hämodynamische Defizit und die MRT-morphologischen Ischämiezeichen beinhaltet, möglich ist.

Glioblastoma multiforme

Die Behandlung des Glioblastoma multiforme beinhaltet derzeit eine kombinierte Radio-Chemotherapie mit Temozolomide. Unter dieser Therapie ist die 2-Jahres Überlebensrate bei <25% und die 5 Jahres-Überlebensrate bei 10%⁷. Unter Berücksichtigung dieser Daten ist eine erfolgreichere Therapie des GBM derzeit nicht möglich. Basierend auf der Tatsache, dass das GBM eine der am stärksten vaskularisierten Tumorentitäten darstellt, erscheint eine antiangiogene Therapie als vielversprechende Therapieoption.

Die Verwendung von Bevacizumab, einem VEGF-Antikörper, zur Behandlung des GBM zeigte vielversprechende Ergebnisse in einer Phase II-Studie mit einer erhöhten Ansprechrate, einer verbesserten Lebensqualität und einem reduzierten Bedarf an Kortikosteroiden^{20, 48}. Dementsprechend wurde Bevacizumab bereits in den USA zur Therapie des GBM zugelassen¹⁴. Ein langfristiger Vorteil bezüglich der Überlebensrate oder gar eine Überlegenheit gegenüber der kombinierten Radiochemotherapie mit Temozolomide konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Andere antiangiogene Substanzen wie z.B. Vatalanib (Tyrosinkinaseinhibitor vs. VEGFR, c-KIT, PDGFR), Cediranib

(Tyrosinkinaseinhibitor vs. VEGFR, c-KIT, PDGFR, FGFR) oder Pazopanib (Tyrosinkinaseinhibitor vs. VEGFR, c-KIT, PDGFR) zeigten bisher in klinischen Studien keine Effizienz als Monotherapie in der Behandlung des GBM⁴⁹. Vor diesem Hintergrund erscheint die Identifikation neuer Zielmoleküle eine Möglichkeit die Effizienz einer antiangiogenen Therapie zu erhöhen. Korherr et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass die Tyrosinkinase Tank-Binding Kinase 1 (TBK1) die Proliferation von humanen Endothelzellen (HUVECs) stimuliert und darüber hinaus in humanen Glioblastomgewebe verstärkt exprimiert wird⁴⁰. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass die Tank-Binding Kinase 1 sowohl proangiogene als auch proinflammatorische Effekte in vivo besitzt.

Tank-Binding Kinase 1 als Mediator des inflammatorischen und angiogenen Systems

In unseren Experimenten führte eine TBK1-Überexpression zu einer signifikant erhöhten intratumoralen Gefäßdichte und zeigte eine signifikant erhöhte mikrovaskuläre Leukozytenadhärenz. Es ist bekannt, dass TBK1 eine wichtige Rolle in der Vermittlung antiviraler Reaktionen durch eine erhöhte Expression inflammatorischer Mediatoren spielt. Die Arbeitsgruppe um Korherr et al. konnte zeigen, dass TBK1 die Proliferation humaner Endothelzellen in vitro stimuliert⁴⁰. Vor diesem Hintergrund aktiviert TBK1 intrazelluläre Signalwege: den Nuclear-Factor-KappaB und den Interferon-Regulatory-Factor 3 Signalweg. Der Transkriptionsfaktor IRF3 ist für die Expression proinflammatorischer Chemokine nach viraler Infektion verantwortlich^{50, 51}. NF-KappaB vermittelt ebenfalls proinflammatorische Reaktionen. Allerdings wurde NF-KappaB auch als potentieller proangiogener Mediator beim kolorektalen Karzinom beschrieben⁵². Vor diesem Hintergrund könnte eine TBK1-vermittelte Aktivierung des NF-KappaB-Signalweges die von uns beobachteten proangiogenen Effekte erklären. Allerdings zeigte der funktionelle Genomscreen von Korherr et al., dass eine Aktivierung von NF-KappaB nicht zu einer vermehrten Proliferation von humanen Endothelzellen führt⁴⁰. Dementsprechend wurde NF-KappaB nicht als proangiogener Signalweg im Rahmen einer TBK1 Aktivierung gewertet⁴⁰. Es ist wahrscheinlich, dass eine TBK1 vermittelte Aktivierung des IRF3-Signalweges zu den von uns beobachteten proangiogenen Effekten führt. Wie bereits erwähnt, führt eine Aktivierung des IRF 3-Signalweges zur vermehrten Expression proinflammatorischer Chemokine⁵³.

In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass sowohl RANTES als auch Interleukin-8 (IL-8) verstärkt in unseren Tumoren exprimiert wird. Beide Chemokine könnten eine Rolle bei der Vermittlung proangiogener und proinflammatorischer Wirkungen spielen. RANTES bindet an verschiedene zelluläre Rezeptoren (wie z.B. CCR1, CCR3, CCR4 und CCR5) die auf verschiedenen proinflammatorischen Zellen (wie z.B. T-Zellen, Monozyten und Mastzellen) identifiziert werden können⁵⁴. In Tumoren wird RANTES verstärkt exprimiert und erhöhte RANTES-Werte zeigen eine direkte Korrelation mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und einer verstärkten Tumorprogression beim Mamma-Karzinom⁵⁵. Darüber hinaus führt RANTES zu einer Zunahme der Gefäßbreite von Blutgefäßen und zu einer erhöhten Anzahl von Blutgefäßen in Tumoren, wodurch ein proangiogener Effekt durch RANTES erklärt werden könnte⁵⁶.

Interleukin 8 gehört zur CXC-Chemokinfamilie und reguliert sowohl die pathologische Angiogenese als auch das Tumorwachstum in verschiedenen Tumorentitäten⁵⁷. Interleukin 8-Rezeptoren CXCA1 und CXCA2 werden auf Tumorzellen exprimiert, binden Interleukin-8 mit einer hohen Affinität und vermitteln proangiogene und proliferative Effekte^{57, 58}. Vor diesem Hintergrund kann die vermehrte Interleukin 8-Expression in unseren Experimenten ebenfalls die proangiogenen Effekte unserer Experimente erklären. Interessanterweise zeigte jedoch der funktionelle Genomscreen von Kocher et al, dass weder RANTES noch Interleukin 8 als eigenständige, TBK1 aktivierte proangiogenen Signalwege identifiziert werden konnten⁴⁰.

Vor diesem Hintergrund müssen noch weitere Moleküle zu unseren Ergebnissen beitragen. Mittels Western Blot - Analyse konnten wir darlegen, dass eine TBK1 Überexpression zu einer verstärkten Expression von VEGF führt. In Zusammenschau dieser Befunde zeigt unsere Studie, dass TBK1 nicht nur die verstärkte Expression proangiogener inflammatorischer Mediatoren vermittelt, sondern auch zu einer deutlich erhöhten Expression potenter proangiogener Moleküle wie z.B. VEGF führt.

Klinische Erfahrungen mit antiangiogenen Substanzen haben gezeigt, dass eine antiangiogene Therapie als Monosubstanz nicht zu einem verbesserten Gesamtüberleben der Patienten führt^{22, 23}. Vielmehr zeigte sich in diversen klinischen Studien, dass antiangiogene Substanzen in Kombination mit Chemotherapeutika zu einem deutlichen

Therapievorteil gegenüber der alleinigen Chemotherapie führen^{21, 38}. Basierend auf diesen Daten entstand das Konzept, dass eine antiangiogene Therapie nicht als Monotherapie, sondern vielmehr als chemosensitivierende Substanz in Kombination mit Chemotherapeutika verabreicht werden sollte²³. Diese Beobachtung führte zu dem Konzept der vaskulären Normalisierung durch eine antiangiogene Therapie³⁸. Dieses Konzept impliziert, dass synergistische Antitumoreffekte durch eine kombinierte Applikation antiangiogener und zytotoxischer Substanzen erfolgt³⁸. Vor diesem Hintergrund soll eine antiangiogene Intervention zu einer Normalisierung von Blutgefäßen führen mit erhöhten Endothelzell-Perizyten-Interaktionen im Vergleich zu Tumorgefäßen, einer verminderten Permeabilität, einer Homogenisierung der Gefäßstruktur, einer Reduktion des interstitiellen intratumoralen Druckes und damit zu einer besseren Wirkung des Chemotherapeutikums³⁸. Teicher et al. stellten bereits im Jahr 1996 die Hypothese auf, dass eine antiangiogene Therapie den intratumoralen Blutfluss erhöhen und damit z.B. in Kombination mit Chemotherapeutika einen maximalen Effekt erzielen könnte⁵⁹. Bislang fehlte jedoch jeder Beweis für diese Theorie.

Hämodynamische Konsequenzen einer antiangiogenen Therapie

Vor diesem Hintergrund führten wir eine experimentelle Studie mit der antiangiogenen Substanz Sunitinib (einem VEGFR, PDGFR, C-Kit und FLT3-Inhibitor) durch, um die mikrozirkulatorischen und mikrohemodynamischen Effekte zu charakterisieren und deren Konsequenzen für die mikrovaskuläre Anflutung chemotherapeutischer Substanzen darzulegen. In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass in therapieresistenten Blutgefäßen der mikrovaskuläre Blutfluss signifikant im Vergleich zu untherapierten Tumorgefäßen ansteigt. Dieser Anstieg kommt zum einen durch eine wesentliche Veränderung der Gefäßmorphologie mit einem signifikant erhöhten mikrovaskulären Durchmesser als auch durch eine ausgeprägte Erhöhung der intravaskulären Blutflussgeschwindigkeit zustande. Dementsprechend zeigen therapieresistente Tumorgefäße eine signifikant erhöhte mikrovaskuläre Anflutung der chemotherapeutischen Substanz Doxorubicin. Diese therapieinduzierte Erhöhung der mikrovaskulären Anflutung von Doxorubicin ist ausreichend, um die therapiebedingt reduzierte Gefäßdichte und Perfusion des Tumors zu kompensieren und die gleiche Menge der chemotherapeutischen Substanz dem Tumorinterstitium bereitzustellen. Bezüglich der verbesserten mikrovaskulären

Durchblutung nach antiangiogener Therapie stellte Folkman die Hypothese auf, dass Tumorzellen durch die antiangiogene Therapie absterben und damit eine Reduktion des interstitiellen Drucks entsteht⁶⁰. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung des interstitiellen Drucks zu einer verbesserten Infiltration chemotherapeutischer Substanzen in das Tumorerinterstitium führt^{17,61}. Allerdings zeigte sich in unseren Experimenten, dass Sunitinib keine Veränderung der mikrovaskulären Permeabilität induzierte und somit kann dieser Mechanismus nicht als primär verantwortlich für unsere Ergebnisse angesehen werden. Das Konzept der vaskulären Normalisierung postuliert, dass die Normalisierung der Tumorgefäße nur in einem engen Zeitrahmen stattfindet und dass nur innerhalb dieses Zeitrahmens eine synergistische Wirkung antiangiogener und chemotherapeutischer Substanzen stattfindet⁶¹. Im Allgemeinen wird angenommen, dass das Normalisierungsfenster 4-7 Tage nach antiangiogener Therapie existiert⁶¹. Dementsprechend führten wir die Applikation von Doxorubicin 6 Tage nach dem Beginn der Therapie in unseren Experimenten durch. Wir konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass der Perfusionsindex der therapierten Tumore auf 78% anstieg, wodurch eine Homogenisierung der Tumorperfusion erreicht wurde. In den meisten Tumoren liegt der Perfusionsindex zwischen 50 und 60% als Zeichen einer sehr heterogenen und insuffizienten Tumorperfusion³⁴. Um allerdings die mikrovaskuläre Anflutung einer chemotherapeutischen Substanz charakterisieren zu können, muss diese in Relation zur Anzahl durchbluteter Tumorgefäße gesetzt werden. Nur durch diese Relation wird die Effizienz einzelner Blutgefäße für die Anflutung chemotherapeutischer Substanzen charakterisiert. Dementsprechend konnten wir zeigen, dass Tumorgefäße, die eine Therapie mit Sunitinib überleben, morphologische und funktionelle Alterationen aufweisen, wodurch eine verbesserte Anflutung der chemotherapeutischen Substanz in diesen Gefäßen stattfindet. Dieser hämodynamische Mechanismus könnte zu dem beschriebenen Synergismus einer antiangiogenen und chemotherapeutischen Intervention beitragen.

Trotz langsamer Fortschritte in der Behandlung des Glioblastoma multiforme ist die Prognose weiterhin als schlecht einzustufen. Vor diesem Hintergrund zeigen auch zielgerichtete antiangiogene Interventionen mit verschiedenen Substanzen bisher keinen signifikanten

Therapievorteil⁴⁹. Somit ist es nicht verwunderlich, dass neue Ansätze zur Therapieoptimierung und zur Vermeidung von Nebenwirkungen gesucht werden.

Ein vielversprechendes Prinzip ist hierbei das antikörpervermittelte spezifische Targeting tumorspezifischer Moleküle⁶². Dies verspricht eine Spezifizierung der Therapie, eine erhöhte therapeutische Effizienz sowie eine Reduktion der Nebenwirkungen. Einen der vielversprechendsten vaskulären Marker stellt hierbei die Extradomäne B von Fibronectin dar⁶². Die Extradomäne B von Fibronectin wird stark in Gefäßstrukturen aggressiver Tumoren exprimiert, während es im Humanplasma und im normalen adulten Gewebe kaum exprimiert wird^{42, 62}. Das Antikörperfragment L19-SIP wurde entwickelt, um spezifisch die Extradomäne B von Fibronectin binden zu können⁴². Somit können L19-SIP-vermittelte diagnostische oder auch therapeutische Interventionen spezifisch am Tumorgefäßsystem durchgeführt werden. Mit dem Ziel eine L19-vermittelte therapeutische oder diagnostische Intervention an Glioblastompatienten durchzuführen, muss jedoch das mikrovaskuläre Biodistributionsverhalten des Antikörpers genau charakterisiert werden.

Extradomäne B von Fibronectin – Ziel vaskulärer Targetingstrategien

Vor diesem Hintergrund führten wir eine präklinische Studie durch, in welcher das Biodistributionsverhalten des Antikörperfragmentes L19-SIP nicht nur während der Gliomangiogenese, sondern auch während einer antiangiogenen Intervention aufgeklärt werden sollte. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass das Antikörperfragment L19-SIP spezifisch Tumorgefäße in einem zeit- und blutflussabhängigen Mechanismus bindet. Das Bindungsverhalten des Antikörpers folgt einer spezifischen Kinetik mit der maximalen Bindungskapazität 4 Stunden nach intravenöser Applikation des Antikörpers. Dementsprechend konnten Borsi et al. zeigen, dass L19-SIP die maximale intratumorale Akkumulation 4-6 Stunden nach intravenöser Applikation in einem F9-Teratokarzinom-Modell erreicht⁴². Sekundär kommt es zu einer Extravasation des Antikörpers, die jedoch deutlich geringer als die vaskuläre Bindung ausgeprägt ist. Unter antiangiogener Therapie nimmt die mikrovaskuläre Bindung von L19-SIP in therapieresistenten Tumorgefäßen signifikant zu, was mitunter auf eine deutliche Erhöhung der mikrovaskulären Blutflussrate in therapieresistenten Tumorgefäßen zurückzuführen ist. Somit kann unter antiangiogener Therapie das mikrovaskuläre Targetingverhalten des Antikörpers gesteigert werden. Die

Extravasation des Antikörpers könnte auf tumorspezifischen pathophysiologischen Eigenschaften beruhen. In unserer Studie zeigten F9-Teratokarzinomtumore eine geringere mikrovaskuläre Permeabilität und damit eine geringe Extravasation des Antikörpers im Vergleich zu einem humanen Glioblastom (Zelllinie SF126). Andere Mechanismen, die der Extravasation von L19-SIP zugrunde liegen sind die Expression von Fibronectin im Interstitium, Unterschiede im interstitiellen Diffusionskoeffizienten und der interstitielle Druck⁶³.

Durch eine antiangiogene Intervention mittels Sunitinib konnten wir zeigen, dass die mikrovaskuläre Akkumulation des Antikörpers L19-SIP signifikant in therapieresistenten Gefäßen zunimmt. In diesem Zusammenhang wurde die Lokalisation des Extradomäne B-Epitops durch die Therapie nicht verändert. Interessanterweise konnten wir jedoch darlegen, dass in therapieresistenten Blutgefäßen der mikrovaskuläre Blutfluss signifikant erhöht ist. Wie bereits im ersten Teil der Studie gezeigt, stellen der mikrovaskuläre Blutfluss und damit die mikrovaskuläre Anflutung einen wichtigen Faktor bei der Biodistribution des Antikörpers dar. Eine verbesserte Anflutung von L19-SIP in den therapieresistenten Tumorgefäßen könnte unsere Ergebnisse erklären. Darüber hinaus konnten wir zusätzlich zeigen, dass L19-SIP signifikant besser unreife und plastische Blutgefäße bindet. Hierbei spielen insbesondere die angiogenen Sprossen eine relevante Rolle, da hier eine erhöhte Bindung des Antikörpers dargestellt wurde. Die sprossende Angiogenese hängt von der Selektion einer Tip-Zelle ab, die die Sprosse in das Gewebe führt und mit einem anderen Gefäß anastomosiert, um eine neues Blutgefäß entstehen zu lassen⁶. In diesem Szenario stellt Fibronectin einen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des wachsenden Mikrogefäßes dar⁶⁴. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass hier auch eine verstärkte Bindung des L19-SIP-Fragmentes stattfinden könnte.

Basierend auf diesen Grundlagen könnte eine L19-vermittelte Targeting-Strategie zum einen verwendet werden, um spezifisch therapeutische Substanzen in das Glioblastom zu transportieren und damit das Nebenwirkungspotential dieser Substanzen zu reduzieren. Darüber hinaus können jedoch auch L19-vermittelt diagnostische Interventionen durchgeführt werden. So könnte z.B. mittels einer L19-vermittelten Darstellung des Gefäßsystems des Glioblastoms die Effizienz einer antiangiogenen Therapie überwacht und dargestellt werden.

Mit der Durchführung dieser Arbeiten legen wir präklinische Beweise dar, dass das plastische Gefäßsystem eines Tumors im allgemeinen und das des Glioblastoma multiforme im Besonderen sowohl für therapeutische als auch für diagnostische Zwecke verwendet werden kann. Hierbei muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die molekularbiologischen Veränderungen, die durch eine therapeutische Intervention wie z.B. eine antiangiogene Therapie mit Sunitinib induziert werden, noch nicht ausreichend geklärt sind, um Resistenzmechanismen sowie morphologische und funktionelle Veränderungen des Gefäßsystems vorhersagen zu können. Allerdings kann die Verwendung spezifischer vaskulärer Marker herangezogen werden, um tumorspezifische Targetingstrategien in der Behandlung des Glioblastoma multiforme durchzuführen mit dem Ziel den Patienten in Zukunft eine individualisierte und pathophysiologieorientierte Therapie anbieten zu können. Antiangiogene Interventionen könnten in diesem Zusammenhang einen wichtigen Teil zukünftiger individualisierter Therapiestrategien darstellen, nicht nur mit dem Ziel das Tumorwachstum zu reduzieren, sondern auch mit dem Ziel die Effizienz anderer gleichzeitig applizierter Substanzen in einem multimodalen Therapiekonzept zu verbessern.

Moyamoya Vaskulopathie

Die Moyamoya Vaskulopathie gilt als eine seltene und einzigartige zerebrovaskuläre Erkrankung, die zum einen durch eine progrediente Okklusion der basalen Hirnarterien und zum anderen durch ein ausgeprägtes Netzwerk feiner Moyamoyagefäße im Bereich der Schädelbasis charakterisiert ist²⁶. Interessanterweise vereinigt die Moyamoya Vaskulopathie in diesem Zusammenhang sowohl einen stenookklusiven als auch einen neoangiogenen Prozess. Vor diesem Hintergrund entstehen im Rahmen der Moyamoya-Vaskulopathie arterielle Kollateralkreisläufe, die potentiell dem stenookklusiven Prozess entgegenwirken und damit die Ischämie reduzieren könnten. Allerdings ist das neoangiogene Potential der Moyamoya-Erkrankung nicht ausreichend, so dass die neu gebildeten Kollateralkreisläufe nicht in der Lage sind, das hämodynamische Defizit vollständig zu kompensieren. Die kortikale Vaskularisierung spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der zerebralen

Perfusion und des zerebralen Blutflusses⁴⁵. Mehrere Arbeiten legen nahe, dass das kortikale Gefäßsystem im Rahmen der Moyamoya-Vaskulopathie verändert ist als Kompensationsmechanismus für den chronisch eingeschränkten Blutfluss³³. Allerdings existiert bisher keine klare Evidenz für diese Hypothese, so dass wir mittels Indocyaningrün-Videoangiographie die kortikale Mikrovaskularisierung bei der adulten Moyamoya-Vaskulopathie untersuchen wollten.

Kortikale Vaskularisierung bei der Moyamoya-Vaskulopathie

Wir konnten in unserer Studie darlegen, dass Patienten mit einer Moyamoya-Vaskulopathie eine signifikant erhöhte kortikale mikrovaskuläre Dichte und einen erhöhten mikrovaskulären Durchmesser besitzen, so dass die mikrovaskuläre Oberfläche signifikant erhöht ist im Vergleich zu Patienten, die kein hämodynamisches Defizit zeigen. Patienten, die aufgrund einer Atherosklerose ein vergleichbares hämodynamisches Defizit besitzen, zeigen diese Veränderungen ebenfalls nicht, so dass von Moyamoya-spezifischen Veränderungen auszugehen ist. Auf funktioneller Ebene zeigte sich, dass sich hieraus vor allem im arteriellen Bereich mikrohämodynamische Veränderungen ergeben (Verminderung der arteriellen mikrovaskulären Transit Time), die für einen reduzierten arteriellen mikrovaskulären Widerstand sprechen. Die molekularen Mechanismen, die dazu führen, dass Moyamoya Patienten ein höheres neoangiogenes Potential aufweisen als Patienten, die an einer Atherosklerose leiden, sind bisher nicht geklärt. Unsere Studie legt jedoch deutlich dar, dass die Ausbildung einer erhöhten mikrovaskulären Gefäßdichte und einer erhöhten mikrovaskulären Oberfläche nicht allein durch eine zerebrale Minderdurchblutung erklärt werden kann.

Im Vergleich zu Patienten mit einer zerebrovaskulären Atherosklerose sind die zerebralen hämodynamischen Eigenschaften im Rahmen einer Moyamoya-Vaskulopathie signifikant verändert. Zum einen zeigen Patienten, die an einer atherosklerotisch bedingten zerebralen Minderdurchblutung leiden, nicht zwangsläufig bilaterale Läsionen, sondern sind vielmehr durch unilaterale stenookklusive Läsionen gekennzeichnet⁴⁷. Zusätzlich zu der bilateralen Affektion zeigen viele Moyamoya-Patienten auch eine Beteiligung des hinteren Stromkreislaufes, so dass die Kompensation des reduzierten zerebralen Blutflusses über den Circulus Willisii deutlich limitierter ist als bei Patienten mit einem atherosklerotisch bedingten

hämodynamischen Defizit. Darüber hinaus spielen im Rahmen der Atherosklerose leptomeningeale Arterien als auch ophthalmische Kollateralen eine relevante Rolle zur Kompensation des zerebralen Blutflusses⁶⁵. Bei der Moyamoya-Vaskulopathie ist eine Kollateralisierung über die Arteria ophthalmica nicht möglich, da per definitionem die Moyamoya Vaskulopathie eine supraophthalmische Stenosierung der basalen Hirnarterien voraussetzt²⁵. Die genaue Rolle der leptomeningealen Anastomosen in der Moyamoya Vaskulopathie ist in diesem Zusammenhang noch unerforscht, wenngleich davon ausgegangen werden muss, dass leptomeningeale Anastomosen auch bei der Moyamoya Vaskulopathie eine relevante Rolle in der Kompensation des reduzierten zerebralen Blutflusses spielen. Abgesehen von Unterschieden in der zerebralen Hämodynamik zeichnet sich die Moyamoya Vaskulopathie durch ein sehr potentes neoangiogenes Potential im Vergleich zu Patienten mit einer Atherosklerose aus. So zeigen verschiedene Arbeiten, dass Moyamoyagefäße im Bereich der Schädelbasis zu einem signifikant erhöhten zerebralen Blutfluss und einer erhöhten zerebrovaskulären CO₂-Reaktivität in den Basalganglien führen, wohingegen bei Patienten mit einer Atherosklerose diese Veränderungen nicht verifiziert werden können⁶⁶. Mehr als die Hälfte der zerebrovaskulären Resistenz wird in den extraparenchymalen Gefäßsegmenten reguliert⁴⁵. In diesem Zusammenhang führt eine erhöhte Anzahl arterieller Widerstandsgefäße zu einem Anstieg der mikrovaskulären Oberfläche und damit zu einer verminderten peripheren mikrovaskulären Resistenz. Daraus resultiert eine verminderte Blutflussgeschwindigkeit in dem entsprechenden Gefäßbett, so dass durch eine Verminderung der peripheren Resistenz eine proximale Okklusion (z.B. im Rahmen der basalen Hirnarterien bei der Moyamoya Vaskulopathie) kompensiert werden kann. In unserer Arbeit konnten wir durch eine Bestimmung der mikrovaskulären Transit Time zeigen, dass diese signifikant erhöht ist im Sinne einer reduzierten peripheren mikrovaskulären Resistenz. Insbesondere im arteriellen Schenkel zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Transit Time, so dass im Zusammenhang mit unseren anatomischen Ergebnissen davon auszugehen ist, dass die Erhöhung der kortikalen mikrovaskulären Gefäßdichte und Gefäßoberfläche in Kombination mit einer Erhöhung der arteriellen mikrovaskulären Transit Time zu einer Reduktion der peripheren mikrovaskulären Resistenz führt und damit die proximale Stenookklusion der basalen Hirnarterien kompensiert wird. Die

Arbeitsgruppe von Okada et al. konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine verminderte vaskuläre Resistenz zwischen den kortikalen Gefäßabschnitten der Arteria cerebri media und den korrespondierenden Venen bei Moyamoya Patienten existiert⁶⁷. Darüber hinaus konnten experimentelle Studien darlegen, dass eine Erhöhung der extra- und intraparenchymatösen Arteriolen zu einer Reduktion des peripheren Gefäßwiderstandes und somit zu einer Erhöhung der zerebralen Durchblutung führen⁴⁶. Wir zeigen demnach mit dieser Arbeit, dass es Moyamoya-spezifische Veränderungen des kortikalen Gefäßsystems gibt, die als potentieller Kompensationsmechanismus für die chronische hämodynamische Insuffizienz dieser Patienten dienen könnten.

Kompensation der zerebralen Minderperfusion

Interessanterweise zeigen Korrelationsstudien, dass die mikrovaskuläre Oberfläche signifikant negativ mit der zerebrovaskulären Reservekapazität korreliert. Basierend auf diesen Daten zeigen Patienten mit einer hochgradig eingeschränkten zerebrovaskulären Reservekapazität eine höhere mikrovaskuläre Oberfläche als Patienten, deren Reservekapazität nur in einem geringeren Maße eingeschränkt ist. Die mikrovaskuläre Oberfläche hängt jedoch nicht mit dem angiographischen Ausprägungsgrad der Moyamoya-Vaskulopathie zusammen. Umgekehrt konnten wir ebenfalls zeigen, dass die mikrovaskuläre Oberfläche signifikant positiv mit der arteriellen mikrovaskulären Transit Time korreliert. Somit unterstützen diese Korrelationsdaten die Hypothese, dass eine erhöhte mikrovaskuläre Gefäßdichte und –oberfläche zu einer erhöhten arteriellen mikrovaskulären Transit Time und damit zu einem verminderten peripheren Gefäßwiderstand führen. Im Rahmen einer Subgruppenanalyse konnten wir zeigen, dass Moyamoya-Patienten mit einem fixierten neurologischen Defizit durch eine signifikant verminderte arterielle mikrovaskuläre Transit Time und eine verminderte mikrovaskuläre Oberfläche und damit potentiell durch einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand charakterisiert sind. Diese Patienten zeigen jedoch keinen Unterschied in der zerebrovaskulären Reservekapazität im Vergleich zu Patienten, die ohne fixiertes neurologisches Defizit einer Revaskularisierungsoperation unterzogen werden. Unsere Daten legen nahe, dass Patienten mit einem höheren neoarteriogenen Potential und einer erhöhten mikrovaskulären Gefäßoberfläche durch einen verminderten peripheren

Gefäßwiderstand gekennzeichnet sind und dadurch potentiell zerebrale Ischämien besser kompensieren können.

Die Ausbildung von zerebralen Kollateralkreisläufen ist ein altersabhängiger Prozess^{68, 69}. Vor diesem Hintergrund zeigen unsere Daten einen signifikanten Altersunterschied zwischen adulten Moyamoya-Patienten sowie Patienten mit einer zerebrovaskulären Atherosklerose. Mehrere wissenschaftliche Arbeiten legen nahe, dass zunehmendes Alter nicht nur ein Risikofaktor für ischämische Gewebsschäden darstellt, sondern dass dieses Risiko auch auf einer Rarefizierung und Insuffizienz von Gefäßkollateralkreisläufen beruht^{68, 69}. Vor diesem Hintergrund sind die molekularen Grundlagen, die diesen altersabhängigen Veränderungen zugrunde liegen, ungeklärt.

Altersabhängige Revaskularisierung

Die chirurgische Behandlung der Moyamoya-Vaskulopathie besteht aus einer zerebralen Revaskularisierung. Zu diesem Zweck stehen sowohl indirekte Revaskularisierungsprozeduren (wie z.B. die Durchführung einer Encephalomyosynangiose), direkte Revaskularisierungsverfahren (wie z.B. ein extra-intrakranieller Standardbypass mittels einer Transposition der Arteria temporalis superficialis auf ein M4-Segment der Arteria cerebri media) sowie kombinierte (direkte + indirekte) Revaskularisierungsverfahren zur Verfügung. In diesem Zusammenhang sind indirekte Revaskularisierungsverfahren auf die Ausbildung eines sekundären Kollateralkreislaufes angewiesen³¹. So wird z.B. bei der Encephalomyosynangiose der Temporalmuskel auf den zerebralen Kortex aufgelegt und fixiert. Aufgrund eines bislang ungeklärten molekularen Stimulus kommt es nach Ablauf von 3-6 Monaten bei Moyamoya-Patienten zu einem Aussprossen von Gefäßen aus dem Temporalmuskel, die in der Folge das Gehirn mit Blut zusätzlich versorgen. Dieser Effekt scheint klar altersabhängig zu sein. Wir konnten darlegen, dass nur 5% der adulten Moyamoya Patienten ein gutes angiographisches Revaskularisierungsergebnis bezüglich einer Encephalomyosynangiose zeigten, während nahezu 100% der pädiatrischen Moyamoya Patienten einen guten oder moderaten Kollateralkreislauf entwickelten. Auch hier ist der zugrundeliegende molekulare Mechanismus unbekannt. Houkin et al. konnten zeigen, dass indirekte Revaskularisierungsverfahren bei pädiatrischen Patienten einer direkten

Bypassoperation überlegen sind^{70, 71}. Im Gegensatz dazu war eine direkte Bypassoperation einer indirekten Prozedur bei adulten Moyamoya Patienten überlegen^{70, 71}. Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass die Studien von Houkin et al. auf einer geringen Patientenzahl basieren und dass sämtliche Patienten aus dem asiatischen, hämorrhagischen Formenkreis der Moyamoya Vaskulopathie stammten. Für europäische Patienten gab es diesbezüglich kaum systematisch erhobene Daten.

Zerebrale Revaskularisierung bei europäischen Moyamoya Patienten

Vor diesem Hintergrund führten wir die Charakterisierung einer direkten sowie einer indirekten zerebralen Revaskularisierung bei europäischen Moyamoya Patienten durch. Im Rahmen dieser Studie wurden 30 Patienten mit einer angiographisch verifizierten Moyamoya-Vaskulopathie eingeschlossen. Alle Patienten wurden einer einzeitigen, bilateralen Revaskularisierung unterzogen. Die klinisch führende Hemisphäre, also die Hemisphäre, die häufiger von klinisch evidenten Ischämien betroffen war, wurde mit einer kombinierten Revaskularisierung – bestehend aus einem direkten arteriellen Standardbypass (STA/MCA) und einer Encephalomyosynangiose – behandelt. Die klinisch stumme Hemisphäre, also die Hemisphäre, die seltener von klinisch evidenten Ischämien betroffen war, wurde mit einer Encephalomyosynangiose behandelt. Obwohl die Prozeduren nicht randomisiert wurden, zeigten die verschiedenen revaskularisierten Hemisphären eine vergleichbare Reduktion der zerebrovaskulären Reservekapazität und waren dadurch bzgl. des angiographischen und funktionellen Revaskularisierungsergebnisses vergleichbar. Wir konnten mit dieser Arbeit zeigen, dass das kombinierte Revaskularisierungsverfahren zu einer signifikanten Verbesserung der zerebrovaskulären Reservekapazität und zu einer klinischen Stabilisierung oder sogar zu einer Verbesserung Moyamoya-assoziiierter ischämischer Symptome führt. Diejenigen Hemisphären, die einer indirekten Revaskularisierung unterzogen wurden, zeigten keinen signifikanten Anstieg der zerebrovaskulären Reservekapazität nach der Operation. Interessanterweise zeigte sich auch hier, dass in der pädiatrischen Subpopulation die Anlage einer Encephalomyosynangiose bessere angiographische Revaskularisierungsergebnisse zeigte als in adulten Moyamoya Patienten. Wir konnten beobachten, dass im Falle einer kombinierten Revaskularisierung angiographische Kollateralen sowohl direkt über den Bypass als auch über die Encephalomyosynangiose existierten. Die höhere Effizienz in der

Wiederherstellung der zerebrovaskulären Reservekapazität könnte durch die zusätzliche Kollateralisierung erklärt werden. Derzeit existieren keine Daten zu Effizienz einer alleinigen Revaskularisierung mittels STA-MCA Bypass, so dass der Beitrag des direkten Bypasses zur Wiederherstellung der Reservekapazität nicht beurteilt werden kann. Wir gehen aber davon aus, dass der STA-MCA Bypass der entscheidende Bestandteil geworden ist. Darüber hinaus könnte auch die Fläche des revaskularisierten zerebralen Territoriums ausschlaggebend für die Überlegenheit des kombinierten Verfahrens sein, da durch eine kombinierte Strategie ein größeres Gehirnvolumen mit Gefäßkollateralen versorgt wird.

Die Moyamoya Vaskulopathie wird derzeit nach einem angiographischen Klassifikationssystem basierend auf der Beschreibung von Suzuki et al. eingeteilt. Dieses Klassifikationssystem erlaubt jedoch keine Aussagen über die chronisch hämodynamische Insuffizienz, das Auftreten klinischer Symptome und es korreliert nicht mit dem Ischämierisiko der Patienten, so dass es nur von eingeschränktem klinischen Nutzen ist.

Klassifikation der Moyamoya-Vaskulopathie

Basierend auf unseren Untersuchungen zur kortikalen Mikrovaskularisierung und zu den verschiedenen Revaskularisierungsmethoden bei Moyamoya Patienten ergab sich das Ziel, ein Klassifikationssystem für die Moyamoya-Vaskulopathie zu entwickeln, welches die speziellen Eigenschaften der chronischen zerebrovaskulären Insuffizienz und der assoziierten Kollateralkreisläufe berücksichtigt.

Zu diesem Zweck wurden in unserer Studie 40 adulte Patienten mit einer Moyamoya Erkrankung oder einem Moyamoya-Syndrom eingeschlossen. Die Patienten wurden alle einer einzeitigen, bilateralen Revaskularisierung mittels direkter und indirekter Revaskularisierung unterzogen. Alle Patienten erhielten vor der Operation eine ausführliche neurologische Untersuchung, eine MRT-Bildgebung, eine digitale Subtraktionsangiographie als auch eine Xenon-CT-gestützte Bestimmung der zerebrovaskulären Reservekapazität. Basierend auf diesen Daten konnte ein Klassifikationssystem erarbeitet werden, welches die Unterscheidung einer milden, einer moderaten und einer schweren Form der Moyamoya Erkrankung erlaubt und welches mit dem Auftreten neurologischer Symptome korreliert. In diesem Zusammenhang wurden die Ausprägung der Moyamoya Erkrankung in der digitalen

Subtraktionsangiographie, die Präsenz ischämischer Läsionen in der MRT-Bildgebung als auch die hämodynamische Einschränkung in der quantitativen Blutflussmessung als unabhängige Faktoren für die Vorhersage ischämischer Symptome identifiziert. Den einzelnen Schlüsselparametern wurden entsprechend dem Ausprägungsgrad Punkte zugeteilt, wodurch die Moyamoya Erkrankung in 3 Schweregrade entsprechend des Gesamtpunktwertes eingeteilt werden konnte (siehe Material und Methoden für die Beschreibung der einzelnen Parameter und die Verteilung der Punktwerte). Jede Hemisphäre eines Patienten wurde einzeln durch die Klassifikation bewertet und eingeteilt.

In diesem Zusammenhang wurde der Bestimmung der zerebrovaskulären Reservekapazität mittels Xenon-CT eine besondere Bedeutung beigemessen, da die Präsenz eines Stealphänomens in der Bestimmung der Reservekapazität als Prädiktor eines zukünftigen Schlaganfalles angesehen werden kann. Die statistische Aufarbeitung unserer Daten zeigte jedoch, dass die zerebrovaskuläre Reservekapazität als Einzelparameter dem Klassifikationssystem in der Vorhersage klinischer Symptome unterlegen ist. Dementsprechend konnten wir in einer unserer Vorarbeiten zeigen, dass die Reservekapazität zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten vergleichbar ist⁷² und somit die Reservekapazität nicht präzise das Auftreten klinischer Symptome vorhersagen kann. Auch im Vergleich zu dem angiographischen Ausprägungsgrad und der MRT Bildgebung war das Klassifikationssystem in der Abschätzung klinischer Symptome überlegen. Nichtsdestotrotz zeigt das Klassifikationssystem auch relevante Kritikpunkte. Die klare Zuordnung eines klinischen Symptoms zu einer spezifischen Hemisphäre ist z.B. im Falle von Kopfschmerzen oder von psychologischen Symptomen nur unzureichend möglich. Vor diesem Hintergrund beinhaltet das Klassifikationssystem den Nachteil, dass die beiden Hemisphären als separate Einheiten klassifiziert werden, obwohl sie in strengem Sinne nicht als unabhängige biologische Einheiten angesehen werden können.

Andererseits konnten wir in dieser Studie auch zeigen, dass 20 der 40 Patienten verschiedene Moyamoya-Grade pro Hemisphäre zeigten und dass insgesamt 25 Patienten an Symptomen litten, die vornehmlich einer Hemisphäre zugeordnet werden konnten. Vor diesem Hintergrund ist es sehr wohl möglich, dass die Hemisphären eines Patienten durch die Moyamoya-Vaskulopathie verschieden betroffen sind, wodurch die Spezifität der

Klassifikation für eine einzelne Hemisphäre gerechtfertigt werden kann. Darüber hinaus ist ein weiterer Kritikpunkt der Studie die Anwendung einer Xenon-gestützten Quantifizierung der zerebrovaskulären Reservekapazität. Zwar stellt diese Methode den Goldstandard zur Bestimmung der zerebrovaskulären Reservekapazität dar, jedoch ist diese Technik nicht an allen Standorten vorhanden, wodurch eine generelle Anwendung der Klassifikation eingeschränkt ist. Um diesem Kritikpunkt vorzubeugen wählten wir die Xenon-CT-gestützte Bestimmung der Reservekapazität als eine quantitative Methode, die eine definierte Grenze für die Vorhersage des Schlaganfallsrisikos besitzt³⁵. Dadurch kann dieser Parameter des Klassifikationssystems durch andere quantitative Messverfahren des zerebralen Blutflusses, die einen definierten Grenzwert für die Vorhersage des Schlaganfallsrisikos besitzen, ersetzt werden. Weitere Kritikpunkte der Studie beinhalten die geringe Fallzahl der Patienten, das monozentrische Design und die nicht randomisierte Zuordnung zur chirurgischen Revaskularisierung.

Zusammenfassung

In der Neurochirurgie steht eine pathologisch veränderte Neoangiogenese vor allem im Rahmen des Glioblastoma multiforme und der Moyamoya Erkrankung im Vordergrund. Das Ziel dieser Arbeit war es die Bedeutung der Neoangiogenese für die Pathophysiologie und Therapie dieser beiden neurochirurgischen Modellkrankheiten darzulegen.

Zu diesem Zweck wurden sowohl experimentelle als auch klinische Untersuchungsmethoden herangezogen. Während beim Glioblastoma multiforme die therapeutische Bedeutung der Tumorangiogenese durch verschiedene präklinische Experimente mit einem Schwerpunkt auf der Intravitalmikroskopie untersucht wurde, rückte bei der Moyamoya Vaskulopathie die Analyse der zerebralen Mikrozirkulation mittels intraoperativer Videoangiographie in den Vordergrund. Darüberhinaus wurden die vaskulären und klinischen Konsequenzen operativer Revaskularisierungstechniken untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Tank-binding Kinase 1 sowohl proangiogene als auch proinflammatorische Wirkungen besitzt und damit als neues Therapieziel zur Behandlung von Tumoren (wie z.B. dem Glioblastoma multiforme) herangezogen werden kann. Darüberhinaus wird verdeutlicht, dass eine antiangiogene Therapie nicht nur eine Reduktion der Gefäßdichte induziert, sondern dass therapieresistente Tumorgefäße durch Alterationen der Gefäßmorphologie und Gefäßfunktion gekennzeichnet sind, welche die vaskuläre Anflutung einer chemotherapeutischen Substanz verbessern. In diesem Zusammenhang dient das Gefäßsystem des Glioblastoma multiforme nicht nur als vielversprechendes antiangiogenes Therapieziel, sondern auch als Ziel antikörpervermittelter Therapiestrategien. Hier zeigt das Biodistributionsverhalten des neoangiogenen gefäßspezifischen Fibronektinantikörpers L19-SIP eine verstärkte Bindung an gut perfundierte und unreife Gliomgefäße mit anschließender sekundärer Extravasation. Unter einer antiangiogenen Therapie kann die Bindung des Antikörpers in therapieresistenten Gefäßen gesteigert werden, so dass der Antikörper sowohl für gezielte diagnostische als auch therapeutische Interventionen verwendet werden kann.

Bei der Moyamoya Erkrankung spielt die kortikale Mikrozirkulation eine zentrale Rolle. Eine Moyamoya spezifische Erhöhung der kortikalen Gefäßdichte führt zu einer deutlichen

Reduktion des peripheren Gefäßwiderstandes und kann als Kompensationsmechanismus für die zerebrale Minderdurchblutung angesehen werden. Dementsprechend sind Moyamoya Patienten ohne neurologisches Defizit durch eine effizientere kortikale Mikrozirkulation gekennzeichnet als Patienten, die im Verlauf ihrer Erkrankung bereits klinisch manifeste Ischämien entwickelt haben. Basierend auf diesem Wissen kann die Moyamoya Vaskulopathie anhand des angiographischen Erscheinungsbildes, der Präsenz manifester Ischämien und der zerebrovaskulären Reservekapazität in drei Erkrankungsschweregrade eingeteilt werden, die eine Vorhersage klinisch manifester Ischämien erlauben. Nicht zuletzt spielt das Moyamoya spezifische neoangiogene Potential eine wichtige Rolle bei der chirurgischen Revaskularisierung. Bei pädiatrischen Moyamoya Patienten ist die Stimulation der Gefäßneubildung aus einer Encephalomyosynangiose suffizient um eine klinisch ausreichende Revaskularisierung zu induzieren. Bei adulten Moyamoya-Patienten ist ein direkter extra-intrakranieller Bypass der Anlage einer indirekten Revaskularisierung bezüglich der Wiederherstellung der zerebralen Durchblutung überlegen. Bei diesen Patienten ist das neoangiogene Potential nicht ausreichend um eine Restitution der zerebrovaskulären Reservekapazität basierend auf einer indirekten Revaskularisierung zu erreichen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass sowohl beim Glioblastoma multiforme als auch bei der Moyamoya Vaskulopathie die Neubildung von Blutgefäßen eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Therapie spielt. Ein tieferes Verständnis der assoziierten Gefäßbiologie und der molekularen Grundlagen wird die Therapie dieser Erkrankungen in Zukunft verbessern.

Literatur

1. Carmeliet P, Jain RK: Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298-307.
2. Felix MA, Braendle C: The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 2010;20:R965-9.
3. Carmeliet P: Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653-60.
4. Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.
5. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P: Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011;146:873-87.
6. Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalen M, Gerhardt H, Betsholtz C: DLL4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 2007;445:776-80.
7. Preusser M, de Ribaupierre S, Wohrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, Stupp R: Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol* 2011;70:9-21.
8. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ: Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 2010;60:166-93.
9. Weller M, Wick W, von Deimling A: Isocitrate dehydrogenase mutations: a challenge to traditional views on the genesis and malignant progression of gliomas. *Glia* 2011;59:1200-4.
10. Combs SE, Rieken S, Wick W, Abdollahi A, von Deimling A, Debus J, Hartmann C: Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: one step forward, and one step back? *Radiat Oncol* 2011;6:115.
11. Dobes M, Khurana VG, Shadbolt B, Jain S, Smith SF, Smee R, Dexter M, Cook R: Increasing incidence of glioblastoma multiforme and meningioma, and decreasing incidence of Schwannoma (2000-2008): Findings of a multicenter Australian study. *Surg Neurol Int* 2011;2:176.
12. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG: Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 2005;7:134-53.
13. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
14. Weller M: Angiogenesis in glioblastoma: just another moving target? *Brain* 2010;133:955-6.
15. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D: Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 2005;15:297-310.
16. Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD: Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:510-20.
17. Jain RK, Baxter LT: Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res* 1988;48:7022-32.
18. Auf G, Jabouille A, Guerit S, Pineau R, Delugin M, Bouche-careilh M, Magnin N, Favereaux A, Maitre M, Gaiser T, von Deimling A, Czabanka M, Vajkoczy P, Chevet E, Bikfalvi A, Moenner M:

- Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15553-8.
19. Lamszus K, Kunkel P, Westphal M: Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta Neurochir Suppl* 2003;88:169-77.
 20. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WK, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R, Vredenburgh J, Huang J, Zheng M, Cloughesy T: Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:4733-40.
 21. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA: Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:115-24.
 22. Kerbel RS: Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039-49.
 23. Kerbel RS: Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science* 2006;312:1171-5.
 24. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Reardon DA, Peters KB, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Kirkpatrick JP, Sampson JH, Bailey L, Threath S, Friedman AH, Bigner DD, Friedman HS: The addition of bevacizumab to standard radiation therapy and temozolomide followed by bevacizumab, temozolomide, and irinotecan for newly diagnosed glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:4119-24.
 25. Fukui M: Guidelines for the diagnosis and treatment of spontaneous occlusion of the circle of Willis ('moyamoya' disease). Research Committee on Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis (Moyamoya Disease) of the Ministry of Health and Welfare, Japan. *Clin Neurol Neurosurg* 1997;99 Suppl 2:S238-40.
 26. Suzuki J, Takaku A: Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch Neurol* 1969;20:288-99.
 27. Kuroda S, Houkin K: Moyamoya disease: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol* 2008;7:1056-66.
 28. Kraemer M, Heienbrok W, Berlitz P: Moyamoya disease in Europeans. *Stroke* 2008;39:3193-200.
 29. Nanba R, Kuroda S, Ishikawa T, Houkin K, Iwasaki Y: Increased expression of hepatocyte growth factor in cerebrospinal fluid and intracranial artery in moyamoya disease. *Stroke* 2004;35:2837-42.
 30. Rafat N, Beck G, Pena-Tapia PG, Schmiedek P, Vajkoczy P: Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with Moyamoya disease. *Stroke* 2009;40:432-8.
 31. Houkin K, Ishikawa T, Yoshimoto T, Abe H: Direct and indirect revascularization for moyamoya disease surgical techniques and peri-operative complications. *Clin Neurol Neurosurg* 1997;99 Suppl 2:S142-5.
 32. Ishikawa T, Houkin K, Kamiyama H, Abe H: Effects of surgical revascularization on outcome of patients with pediatric moyamoya disease. *Stroke* 1997;28:1170-3.
 33. Takeuchi S, Ishii R, Tsuchida T, Tanaka R, Kobayashi K, Ito J: Cerebral hemodynamics in patients with moyamoya disease. A study of the epicerebral microcirculation by fluorescein angiography. *Surg Neurol* 1984;21:333-40.
 34. Vajkoczy P, Menger MD: Vascular microenvironment in gliomas. *Cancer Treat Res* 2004;117:249-62.

35. Yonas H, Smith HA, Durham SR, Pentheny SL, Johnson DW: Increased stroke risk predicted by compromised cerebral blood flow reactivity. *J Neurosurg* 1993;79:483-9.
36. Schmiedek P, Piegras A, Leinsinger G, Kirsch CM, Einhuyl K: Improvement of cerebrovascular reserve capacity by EC-IC arterial bypass surgery in patients with ICA occlusion and hemodynamic cerebral ischemia. *J Neurosurg* 1994;81:236-44.
37. Folkman J: Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am* 1996;275:150-4.
38. Carmeliet P, Jain RK: Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:417-27.
39. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T: IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:491-6.
40. Korherr C, Gille H, Schafer R, Koenig-Hoffmann K, Dixelius J, Eglund KA, Pastan I, Brinkmann U: Identification of proangiogenic genes and pathways by high-throughput functional genomics: TBK1 and the IRF3 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4240-5.
41. Borsi L, Balza E, Carnemolla B, Sassi F, Castellani P, Berndt A, Kosmehl H, Biro A, Siri A, Orecchia P, Grassi J, Neri D, Zardi L: Selective targeted delivery of TNFalpha to tumor blood vessels. *Blood* 2003;102:4384-92.
42. Borsi L, Balza E, Bestagno M, Castellani P, Carnemolla B, Biro A, Leprini A, Sepulveda J, Burrone O, Neri D, Zardi L: Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int J Cancer* 2002;102:75-85.
43. Sauer S, Erba PA, Petrini M, Menrad A, Giovannoni L, Grana C, Hirsch B, Zardi L, Paganelli G, Mariani G, Neri D, Durkop H, Menssen HD: Expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B-targeted 131I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Blood* 2009;113:2265-74.
44. Tarli L, Balza E, Viti F, Borsi L, Castellani P, Berndorff D, Dinkelborg L, Neri D, Zardi L: A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. *Blood* 1999;94:192-8.
45. Baumbach GL, Heistad DD: Regional, segmental, and temporal heterogeneity of cerebral vascular autoregulation. *Ann Biomed Eng* 1985;13:303-10.
46. Schneider UC, Schilling L, Schroeck H, Nebe CT, Vajkoczy P, Woitzik J: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced vessel growth restores cerebral blood supply after bilateral carotid artery occlusion. *Stroke* 2007;38:1320-8.
47. Komotar RJ, Starke RM, Otten ML, Merkow MB, Garrett MC, Marshall RS, Elkind MS, Connolly ES: The role of indirect extracranial-intracranial bypass in the treatment of symptomatic intracranial atheroocclusive disease. *J Neurosurg* 2009;110:896-904.
48. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS: Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2007;25:4722-9.
49. Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ: Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol Med* 2011;17:301-12.

50. Pomerantz JL, Baltimore D: NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *Embo J* 1999;18:6694-704.
51. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S: Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-KappaB and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2003;171:4304-10.
52. Yu HG, Zhong X, Yang YN, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F: Increased expression of nuclear factor-kappaB/RelA is correlated with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:18-22.
53. Lin R, Heylbroeck C, Genin P, Pitha PM, Hiscott J: Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol Cell Biol* 1999;19:959-66.
54. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV: Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990;347:669-71.
55. Niwa Y, Akamatsu H, Niwa H, Sumi H, Ozaki Y, Abe A: Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:285-9.
56. Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, Weil M, Wigler N, Keydar I, Ben-Baruch A: The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer Res* 2002;62:1093-102.
57. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992;258:1798-801.
58. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK: IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003;170:3369-76.
59. Teicher BA: A systems approach to cancer therapy. (Antioncogenics + standard cytotoxics-->mechanism(s) of interaction). *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:247-72.
60. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
61. Jain RK: Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58-62.
62. Neri D, Carnemolla B, Nissim A, Leprini A, Querze G, Balza E, Pini A, Tarli L, Halin C, Neri P, Zardi L, Winter G: Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform. *Nat Biotechnol* 1997;15:1271-5.
63. Jain RK: Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res* 1990;50:814s-819s.
64. Risau W, Lemmon V: Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol* 1988;125:441-50.
65. Yamauchi H, Kudoh T, Sugimoto K, Takahashi M, Kishibe Y, Okazawa H: Pattern of collaterals, type of infarcts, and haemodynamic impairment in carotid artery occlusion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1697-701.

66. Obara K, Fukuuchi Y, Kobari M, Watanabe S, Dembo T: Cerebral hemodynamics in patients with moyamoya disease and in patients with atherosclerotic occlusion of the major cerebral arterial trunks. *Clin Neurol Neurosurg* 1997;99 Suppl 2:S86-9.
67. Okada Y, Shima T, Nishida M, Yamane K, Yamada T, Yamanaka C: Effectiveness of superficial temporal artery-middle cerebral artery anastomosis in adult moyamoya disease: cerebral hemodynamics and clinical course in ischemic and hemorrhagic varieties. *Stroke* 1998;29:625-30.
68. Faber JE, Zhang H, Lassance-Soares RM, Prabhakar P, Najafi AH, Burnett MS, Epstein SE: Aging causes collateral rarefaction and increased severity of ischemic injury in multiple tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1748-56.
69. Wang J, Peng X, Lassance-Soares RM, Najafi AH, Alderman LO, Sood S, Xue Z, Chan R, Faber JE, Epstein SE, Burnett MS: Aging-induced collateral dysfunction: impaired responsiveness of collaterals and susceptibility to apoptosis via dysfunctional eNOS signaling. *J Cardiovasc Transl Res* 2011;4:779-89.
70. Houkin K, Kamiyama H, Abe H, Takahashi A, Kuroda S: Surgical therapy for adult moyamoya disease. Can surgical revascularization prevent the recurrence of intracerebral hemorrhage? *Stroke* 1996;27:1342-6.
71. Houkin K, Kamiyama H, Takahashi A, Kuroda S, Abe H: Combined revascularization surgery for childhood moyamoya disease: STA-MCA and encephalo-duro-arterio-myo-synangiosis. *Childs Nerv Syst* 1997;13:24-9.
72. Czabanka M, Pena-Tapia P, Schubert GA, Woitzik J, Horn P, Schmiedek P, Vajkoczy P: Clinical implications of cortical microvasculature in adult Moyamoya disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:1383-7.

Danksagung

Im Rahmen dieser Habilitationsschrift möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Peter Vajkoczy für die Unterstützung, Motivation und Förderung bedanken. Diese Arbeit wäre ohne seinen Beitrag als Mentor und Vorbild in wissenschaftlichen als auch klinischen Belangen nicht möglich gewesen. Seine Auffassung einer klinisch und experimentell tätigen akademischen Neurochirurgie stellen die Grundzüge dieser Habilitationsschrift dar.

Darüberhinaus möchte ich Herrn Prof. Peter Schmiedek für die besondere Unterstützung und Inspiration während der frühen Phase meiner neurochirurgischen Ausbildung danken. Die Vorstellungen und Philosophie der akademischen Neurochirurgie, die mir in dieser Zeit vermittelt wurden, haben diese Arbeit entscheidend geprägt.

Meinem klinischen Kollegen Dr. Pablo G. Peña-Tapia danke ich für die freundschaftlich und fachlich hervorragende Zusammenarbeit im Rahmen der Moyamoya-Erkrankung.

Ebenso möchte ich den MTA`s und medizinischen Doktoranden des Neurochirurgischen Labors für das große Engagement und die praktische Unterstützung danken. Ohne diese Hilfestellung wäre eine klinisch-experimentelle Tätigkeit für mich nicht möglich.

Meinen Kollegen PD Dr. Michael Synowitz, PD Dr. Peter Horn, Prof. Theodoros Kombos und PD Dr. Johannes Woitzik möchte ich für die hervorragende klinische Unterstützung danken.

Ein Dankeschön an Frau Marina Faust und Frau Regine Jesse für die Hilfe bei der Erstellung des Manuskriptes.

Schließlich möchte ich Franziska Köhler und meinem Sohn Luca Czabanka für eine liebevolle Familie danken, die mir das glückliche und stabile Umfeld gibt, welches ich für diese Arbeit benötige. Ohne die Geduld, das Verständnis und die konstruktive Kritik die mir entgegengebracht wird, hätte ich den Blick für die wirklich wichtigen Dinge im Leben verloren.

Erklärung

§4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

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

Datum

Unterschrift