

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

Neurologische Klinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar

**Mobilisation zirkulierender Vorläuferzellen nach zerebralem Infarkt
und die Mobilisation beeinflussende Faktoren**

Daniela Franz

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

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. J. H. Poppert

2. Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer

Die Dissertation wurde am 4.2.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 17.6.2015 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Hintergründe zum Krankheitsbild des Schlaganfalls	8
1.1.1 Epidemiologie	8
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	9
1.1.3 Volkswirtschaftliche Bedeutung	11
1.2 Pathophysiologische Reaktionen nach zerebralem Infarkt.....	12
1.3 Zirkulierende Progenitorzellen	13
1.3.1 Herkunft und Klassifikation der endothelialen Progenitorzellen	14
1.3.2 Oberflächenmarker der Vorläuferzellen	15
1.3.3 Funktion und Fähigkeiten der Progenitorzellen	17
1.3.4 Beeinflussende Faktoren und Mechanismus der Freisetzung der Progenitorzellen.....	19
1.3.5 Mechanismen des „Homings“ der Progenitorzellen	21
1.3.6 Bedeutung der Progenitorzellen beim zerebralen Infarkt	22
1.4 Einflüsse von Statinen	23
1.5 Zytokine und deren Rolle im Zusammenhang mit den Vorläuferzellen.....	24
1.5.1 Übersicht	24
1.5.2 Interleukin 1beta	25
1.5.3 Interleukin 6	25
1.5.4 Interleukin 8	26
1.5.5 Interleukin 10	26
1.5.6 Interleukin 12	27
1.5.7 Tumornekrosefaktor-alpha	27
1.6 Die Marker S-100 und NSE	27
1.6.1 S-100 und seine Rolle beim zerebralen Infarkt	28
1.6.2 NSE vor dem Hintergrund des zerebralen Infarkts.....	28
2 Material und Methodik	29
2.1.1 Patientenselektion - Einschlusskriterien für Patienten	29
2.1.2 Ausschlusskriterien für Patienten und Anamnese	29
2.2 Methodik – Studienprotokoll	30
2.2.1 Vorgang der Blutentnahme	30
2.2.2 Weiterverarbeitung der Proben	30
2.3 Messtechniken	34
2.3.1 Durchflusszytometrie	34

2.3.1.1	Allgemeine Informationen	34
2.3.1.2	Bestandteile und Aufbau des Durchflusszytometers	34
2.3.1.3	Funktionsweise.....	35
2.3.2	Analyse der Zellen	37
2.4	Messung	39
2.5	Auswertung	39
2.5.1	Bestimmung der CD133+/CD34+ Vorläuferzellen	39
2.5.2	Bestimmung der VEGFR2+/CD34+ zirkulierenden Vorläuferzellen.....	42
2.5.3	Quantitative Analyse	42
2.5.4	Bestimmung der CXCR4-Positivität der CD133+ Zellen.....	43
2.6	Immunoassays zur Bestimmung der Zytokine.....	43
2.7	Nachweis der Serummarker NSE und S-100	43
2.8	Statistik.....	44
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Klinische Daten.....	45
3.2	Anzahl der CD133+/CD34+ Progenitorzellen im peripheren Blut	47
3.3	CXCR4 exprimierende Progenitorzellen im zeitlichen Verlauf	49
3.4	Zeitlicher Verlauf der VEGFR2+/CD34+ Zellen	51
3.5	Zeitlicher Verlauf der Zytokine	53
3.6	Spiegel von NSE und S-100	53
3.7	Korrelationsanalysen.....	54
3.7.1	Korrelationen zwischen Zytokinen und dem Anstieg der CD133+ Progenitorzellen	54
3.7.2	Korrelation zwischen S-100 bzw. NSE und den Vorläuferzellen.....	55
3.7.3	Korrelation von Statineinnahme und Anstieg der Progenitorzellen	55
3.8	Multivariate Korrelation	56
4	Diskussion.....	57
4.1	Fragen der Methodik.....	57
4.1.1	Herkunft und Definition der Vorläuferzellen	57
4.1.2	Methodik der Detektion von Vorläuferzellen	58
4.2	Zirkulierende Vorläuferzellen beim zerebralen Infarkt- ihre Rolle und der zeitliche Verlauf der Mobilisation	59
4.2.1	Zeitlicher Verlauf der Mobilisation der CD133+ Vorläuferzellen	60
4.2.2	Verläufe von CXCR4 sowie VEGFR2 exprimierenden Vorläuferzellen.....	62
4.3	Der Zusammenhang zwischen Zytokinen, NSE und S-100 und der Mobilisation der Vorläuferzellen	63

4.4	Der Einfluss von Statinen auf die Mobilisation der Vorläuferzellen	65
4.5	Bedeutung der Progenitorzellen für das Krankheitsbild des zerebralen Infarkts	67
4.6	Weiterführende Fragen.....	68
4.6.1	Regenerationspotential nach zerebralem Infarkt im Zusammenhang mit der Mobilisation der Vorläuferzellen.....	68
4.6.2	Vorläuferzellen als Risikoprädiktor für Infarktereignisse	68
4.6.3	Ausblick- das mögliche therapeutische Potenzial der Vorläuferzellen	69
4.7	Studienbeschränkungen.....	69
5	Zusammenfassung.....	70
6	Literaturverzeichnis.....	71
7	Anhang.....	84
7.1	Anamnesebogen für Studienpatienten	84
8	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro-
7-AAD	7-Aminoactinomycin
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
APC	Allophycocyanin
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of differentiation
CPDA	Citrat Phosphat Dextrose Adenin
CRP	C-reaktives Protein
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FLK-1	Fetal Liver Kinase 1
FL2-H	Fluoreszenzkanal 2
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierender Faktor (colony stimulating factor)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN	Interferon
IL-	Interleukin
kD	Kilo-Dalton

LFA-1	Leukocyte function associated antigen 1
mg	Milligramm
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
mRNA	Messenger-(Boten-)Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSE	Neuronenspezifische Enolase
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll
SCF	Stem Cell Factor
SCL	Stem cell leukemia protein
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SSC	Side scatter (Seitwärtsstreulicht)
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TH2-Zellen	T-Helferzelle Typ 2
TIE-2	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor Rezeptor 2

1 Einleitung

1.1 Hintergründe zum Krankheitsbild des Schlaganfalls

Beim Schlaganfall, auch Apoplexie oder Hirninfarkt genannt, handelt es sich um ein in erster Linie klinisch definiertes Krankheitsbild. Gekennzeichnet ist der Schlaganfall durch ein unvermittelt auftretendes fokal-neurologisches Defizit¹³¹.

Bei ca. 85% aller Schlaganfälle handelt es sich um zerebrale Infarkte, also ischämisch bedingte Ereignisse. Die übrigen 15% der Schlaganfälle sind auf intrazerebrale Blutungen zurückzuführen, welche sich allerdings klinisch kaum von der ischämischen Form des Schlaganfalls unterscheiden¹³¹.

Der größte Anteil der Schlaganfälle, die zerebralen Infarkte, kann durch Embolien oder Stenosen bzw. Thrombosen der extra- oder intrakraniellen zuführenden Hirnarterien verursacht sein. Prädilektionsstellen und damit am häufigsten betroffen sind bei den extrakraniellen Arterien die A. carotis interna und intrakraniell die A. cerebri media⁷¹.

1.1.1 Epidemiologie

Jedes Jahr ereignen sich in Deutschland rund 220.000 Schlaganfälle⁶⁸. In der deutschen Todesursachenstatistik stand der Schlaganfall im Jahr 2006 an Platz drei der Todesursachenstatistik in industrialisierten Ländern und war die Hauptursache für Behinderungen und Pflegebedürftigkeit im Erwachsenenalter⁹⁴. In Deutschland starben 2008 ca. 63.000 Menschen an einem Schlaganfall (ICD-10: I60-I69 Zerebrovaskuläre Krankheiten)^{73, 184}.

Ab dem 60. Lebensjahr steigt das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden stark an⁵⁶. Die Lebenszeitprävalenz in der Bevölkerung von 18 bis 79 Jahren liegt bei Männern bei 1,55 %, bei Frauen bei 1,73%²¹³. Insgesamt liegt die Inzidenz des Schlaganfalls in den Industrieländern bei ca. 180/100.000/Jahr. Bei der Inzidenz ist das steigende Risiko im Alter deutlich ersichtlich, wenn man die Inzidenzen einzelner Lebensabschnitte miteinander vergleicht. So liegt die Inzidenz bei 55-64 Jährigen bereits bei 300/100.000/Jahr, wohingegen sie im Alter von 65-74 Jahren sogar bei 800/100.000/Jahr liegt⁷¹.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die ätiologische Einordnung der wichtigsten Gruppe der Schlaganfälle, der ischämisch bedingten Ereignisse, erfolgt meist nach den sogenannten TOAST-Kriterien¹. Diese umfassen die kardioembolische Genese, Makroangiopathien, Mikroangiopathien, andere Ursachen (z.B. Gerinnungsstörungen oder traumatische Gefäßdissektionen) und die unklare Ätiologie. Studien auf Basis der Stroke Data Bank⁵² (Abb. 1-1) sowie auf Basis der deutschen Schlaganfalldatenbank⁶¹ ergaben, dass sich die Häufigkeitsverteilung der Ursachen für die zerebralen Infarkte auf drei Hauptursachen verteilte:

- Kardioembolische Genese: Ca. 19 % der zerebralen Infarkte aus der Stroke Data Bank waren auf kardiale Embolien zurückzuführen⁵². Diese basieren meist auf Vorhofflimmern²¹⁷. Mit Hilfe der deutschen Schlaganfalldatenbank konnte ein Anteil von ca. 26 % der Schlaganfälle mit kardioembolischer Genese ermittelt werden⁶¹.
- Makroangiopathien: Aus Stenosen oder Verschlüssen der hirnversorgenden Gefäße infolge einer Atherosklerose und aus atherosklerotischen Plaques resultierende arterio-arterielle Embolien verursachten in der Stroke Data Bank ca. 9 % der zerebralen Infarkte⁵². Sie gehen häufig von Stenosen bzw. Plaques der A. carotis aus¹⁰. Auf Basis der deutschen Schlaganfalldatenbank wurde ein Anteil der makroangiopathisch bedingten ischämisch bedingten Schlaganfälle von ca. 21 % ermittelt⁶¹, wobei dieser Unterschied möglicherweise auf der Zeitspanne von 13 Jahren zwischen den Studien und den damit in der jüngeren Studie der deutschen Schlaganfalldatenbank besseren bildgebenden Verfahren und somit präziseren Diagnostik von Stenosen und Plaques basiert.
- Mikroangiopathien: Ca. 26 %⁵² bzw. 21 %⁶¹ der zerebralen Infarkte waren auf Mikroangiopathien, also eine Lipohyalinose der kleinen Arteriolen der Stammganglien und des Hirnstamms, zurückzuführen.
- Die Ursache der übrigen 45% der Schlaganfälle wurde in der Studie der Stroke Data Bank als unklar klassifiziert. In der Studie auf Basis der deutschen Schlaganfalldatenbank verteilten sich die verbleibenden 33% auf andere Ursachen wie traumatische Gefäßdissektionen, Gerinnungsstörungen oder Vaskulitiden (ca.

3%), die Ursache blieb unklar (ca. 23 %) bzw. es konnte mehr als eine mögliche Ursache gefunden werden (7 %).

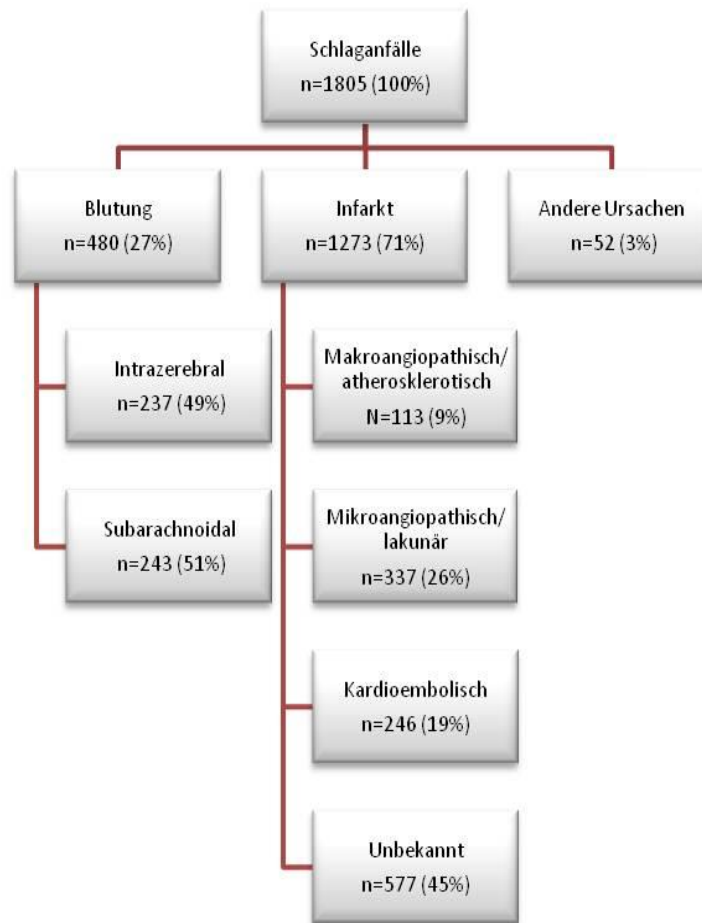


Abb. 1-1 Aufteilung der Schlaganfälle nach Ursachen (nach "The Stroke Data Bank"⁵²)

Im Hinblick auf die Pathogenese liegen dem zerebralen Infarkt also meist eine der drei Hauptursachen- kardiale Embolien, Mikroangiopathien und Makroangiopathien- zugrunde. Infarkte aufgrund von Mikroangiopathien führen im Vergleich zu makroangiopathisch und kardioembolisch bedingten Infarkten meist zu weniger neurologischen Symptomen, die sich in Störungen und Ausfällen ausdrücken, welche auch oft spontan regredient sind. Es resultieren kleine, sogenannte lakunäre Infarkte der kleinen Arterien des Gehirns, die ins Mark perforieren. Das größte Risiko für die Entstehung einer Mikroangiopathie bergen die kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie⁷¹.

Schlaganfälle mit makroangiopathischer und kardioembolischer Genese resultieren im Vergleich zu den Schlaganfällen mit mikroangiopathischer Genese in größeren

Infarktarealen¹ und zeigen eine deutlich schlechtere Prognose im Hinblick auf Mortalität, klinisches Outcome und Reinsultrate^{52, 61}.

Die klinische Symptomatik des Schlaganfalls hängt von der Lokalisation ab. Neben vegetativen Begleitsymptomen sind die typischen Symptome vor allem Sprach-, Bewusstseins- und sensorische Störungen sowie Paresen bzw. Hemiparesen⁷¹.

Die Prognose des Schlaganfalls ist durch die Schwere der Hirnschädigung bedingt. Die Letalität bei einem ersten Infarkt beträgt ca. 20%⁷¹. Genauere Zahlen berichten von ca. 20% in den ersten vier Wochen nach dem Ereignis, ca. 29% binnen drei Monaten und ca. 38% innerhalb eines Jahres⁹³. Jedoch sind rund 40% der Patienten, die einen ersten Infarkt überlebt haben, in ihrem alltäglichen Leben eingeschränkt, so dass sie auf fremde Hilfe angewiesen sind bzw. sogar zum Pflegefall werden¹⁰².

1.1.3 Volkswirtschaftliche Bedeutung

Neben den schwerwiegenden Konsequenzen für Patienten und Angehörige sind die Kosten für das Gesundheitssystem nicht zu unterschätzen. Die direkten Kosten setzen sich zusammen aus der Akutbehandlung im Krankenhaus, den anschließenden Rehabilitationsmaßnahmen und den Kosten der eventuell entstehenden Pflegebedürftigkeit. Jedoch müssen neben den direkten auch die indirekten Kosten berücksichtigt werden. Die Volkswirtschaft ist durch indirekte Kosten wie Arbeitsausfall und Frührente stark betroffen. Hochrechnungen ergaben, dass allein die direkten Kosten, die aus der Akutbehandlung, Rehabilitation und anschließenden Pflegebedürftigkeit der Patienten mit erstmals diagnostiziertem Schlaganfall resultieren, sich in der Zeit von 2006 bis 2025 deutschlandweit auf insgesamt über 100 Milliarden Euro belaufen werden⁹⁴.

1.2 Pathophysiologische Reaktionen nach zerebralem Infarkt

Die Pathophysiologie des zerebralen Infarkts ist komplex und umfasst eine Kaskade von Folgen der Minderdurchblutung- ein Energiedefizit, der Verlust der Zellhomöostase, Azidose, ein erhöhter intrazellulärer Kalziumspiegel, Folgen der Toxizität entstandener freier Radikale und freigesetzter Zytokine, die Störung der Blut-Hirn-Schranke, Aktivierung von Gliazellen und Leukozyteninfiltration^{148, 214}.

Entscheidend für den Verlauf der pathophysiologischen Reaktion nach einem zerebralen Infarkt in der Akutphase ist vor allem die Entzündungsreaktion²⁰⁸. Hierbei stellte Morioka bereits 1993 fest, dass auf eine fokale Ischämie zunächst reaktive Mikroglia, also die Makrophagen des Gehirngewebes, mit immunhistochemischen Veränderungen reagieren¹²⁸, die eine Leukozytenmigration hervorrufen. Die Mikroglia sorgen auch für den Abtransport des Zelldetritus. Neben den Mikroglia tragen auch Astrozyten zur Entzündungsreaktion bei, indem sie proinflammatorische Zytokine ebenso wie neuroprotektive Faktoren sezernieren, wie Transforming growth factor- β (TGF- β), Erythropoietin oder Metallothionein-2^{158, 199}.

Infolge des Energiedefizits aufgrund der Minderdurchblutung des Infarktgebiets tritt eine Störung der zellulären Homöostase auf. So akkumulieren in den Zellen der betroffenen Gewebsregion Ionen, insbesondere Calcium-Ionen, was zur Zellschwellung und schließlich zum Zelltod der Neuronen führt²²⁴. Kommt es zu einer Reperfusion des betroffenen Hirngewebes, durch Kollateralen oder durch therapeutische bzw. spontane Rekanalisation, so bilden sich infolge der hohen Sauerstoffspiegel reaktive Sauerstoffspezies, die zur Ausschüttung inflammatorischer Chemokine und Zytokine führen¹⁰⁴. Das betroffene Gefäßendothel exprimiert verstärkt Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, P-Selectin und E-Selectin^{80, 114, 183, 187}.

All diese Vorgänge haben ca. 4-6 Stunden nach dem ischämischen Ereignis die Einwanderung von inflammatorischen Zellen zur Folge²⁰⁸. Diese sezernieren wiederum Matrixmetalloproteinasen, Stickstoffmonoxid (NO) und weitere reaktive Sauerstoffspezies ebenso wie proinflammatorische Botenstoffe, wie Interleukin-1 (IL-1), TNF- α , Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) und TGF- β , die teilweise zytotoxische Wirkung zeigen und den Infarkt ausweiten können^{208, 221}, wobei IL-6 und IL-10 eher eine neuroprotektive Wirkung

zugeschrieben wird^{72, 138, 181}. Ein Zusammenspiel aus IL-10 sowie TGF- β soll durch ihre antiinflammatorischen Komponenten ein Überschießen der Entzündung verhindern und schließlich zur Beendigung der Entzündungsreaktion beitragen^{12, 111}.

Durch die reaktiven Sauerstoffspezies werden weitere Zellen sowie die extrazelluläre Matrix geschädigt und die Blut-Hirn-Schranke wird durchbrochen^{38, 208}, was infolge des entstehenden Ödems sowie der hämodynamischen Defizite das Hirngewebe auch außerhalb der Infarktregion sekundär schädigt¹⁵⁶. Nicht nur die lokale, auch die systemische Immunantwort ist eine Folge der Zytokinfreisetzung. IL-6 induziert die hepatische Synthese von C-reaktivem Protein (CRP)⁵⁵. Den Mediatoren IL-6 und CRP wurde ein Zusammenhang mit der Mortalität bzw. dem Outcome sowie dem Risiko zerebraler Infarkte nachgewiesen, was die klinische Bedeutung der Entzündungsreaktion hervorhebt^{81, 89, 168, 218}.

Innerhalb weniger Minuten wird das Zentrum der minderdurchbluteten Region irreversibel geschädigt und wird infolgedessen nekrotisch. Der nekrotische Kern des Infarktgebiets ist umschlossen von einer noch stoffwechselaktiven Region, die funktionell vorübergehend stillgelegt, aber noch regenerationsfähig ist. Diese Mantelzone wird als Penumbra bezeichnet. Sie stellt das Ziel von rekanalisierenden Therapien in der Akutphase dar^{22, 58}.

1.3 Zirkulierende Progenitorzellen

Embryonalen Stammzellen bilden die Grundlage der Entwicklung aller Zellarten im Körper. Im Verlauf ihrer Differenzierung verlieren die Stammzellen immer weiter ihre Fähigkeit sich in die verschiedenen Zellarten zu entwickeln, die sogenannte Pluripotenz. Die in dieser Studie untersuchten Progenitorzellen sind ein Abkömmling multipotenter adulter Stammzellen, also der Stammzellen, die das ganze Leben noch im Organismus vorhanden sind und die im Vergleich zu embryonalen Stammzellen bereits ein geringeres Differenzierungspotenzial besitzen. Das Replikations- und Differenzierungspotenzial der Progenitorzellen ist nur noch begrenzt vorhanden²¹⁵.

Zusammen repräsentieren die Stamm- und die stärker differenzierten Progenitorzellen ca. 0,1% der Zellen im Knochenmark²⁰⁰. Die adulten Stammzellen können in hämatopoietische sowie nicht-hämatopoietische bzw. mesenchymale Stammzellen eingeteilt werden. Die Unterscheidung erfolgt über bestimmte Oberflächenmarker. So weisen hämatopoietische

Zellen im Gegensatz zu mesenchymalen Stammzellen z.B. CD34 und CD45 auf¹³⁶. Sie bilden die Grundlage der Hämatopoese. Asahara konnte 1997 im Blut zirkulierende Zellen nachweisen, die CD34 exprimierten. Diese Zellen differenzierten in vitro zu Endothelzellen, wanderten im Tiermodell in Regionen der Angiogenese ein und wurden daher als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet⁷.

1.3.1 Herkunft und Klassifikation der endothelialen Progenitorzellen

Studien wiesen zunächst nach, dass Endothelzellen und Blutzellen einige gemeinsame Oberflächenmerkmale aufweisen, wie Flk-1, Tie-2 oder CD34^{54, 129, 210}, was auf einen gemeinsamen Ursprung dieser beiden Zelllinien hindeutet. Genetische Untersuchungen embryonaler Stammzellen wiesen später auch regulatorische Moleküle wie SCL nach, deren Regulation sowohl zur Entstehung hämatopoietischer als auch vaskulärer Zellen führt^{19, 163}. Folglich muss es einen Zusammenhang zwischen den hämatopoietischen und den endothelialen Zellen geben. Die tatsächliche Herkunft der endothelialen Progenitorzellen wird jedoch noch kontrovers diskutiert. Von einigen Autoren werden die zirkulierenden Zellen als Abkömmlinge hämatopoietischer Stammzellen betrachtet²⁶, während andere Autoren die endothelialen Progenitorzellen als eigenständige Population neben den hämatopoietischen Progenitorzellen sehen. Für sie gilt der Hämangioblast als gemeinsamer Vorläufer der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen und hämatopoietischen Stammzellen, wobei letztere sich wiederum in reife Blutzellen entwickeln¹²⁹. Als Argument hierfür gilt, dass sowohl hämatopoietische als auch endotheliale Zellen Antigene wie CD34 und CD133 exprimieren, welche auch Hämangioblasten aufweisen⁵⁴, was für den Hämangioblast als gemeinsamen Vorläufer spräche. Einen Überblick über diese Theorien gibt Kassmeyer (Abb. 1-2). In einer weiteren Theorie werden auch Überschneidungen mit reifen endothelialen Zellen aus der Gefäßwand diskutiert¹⁷.

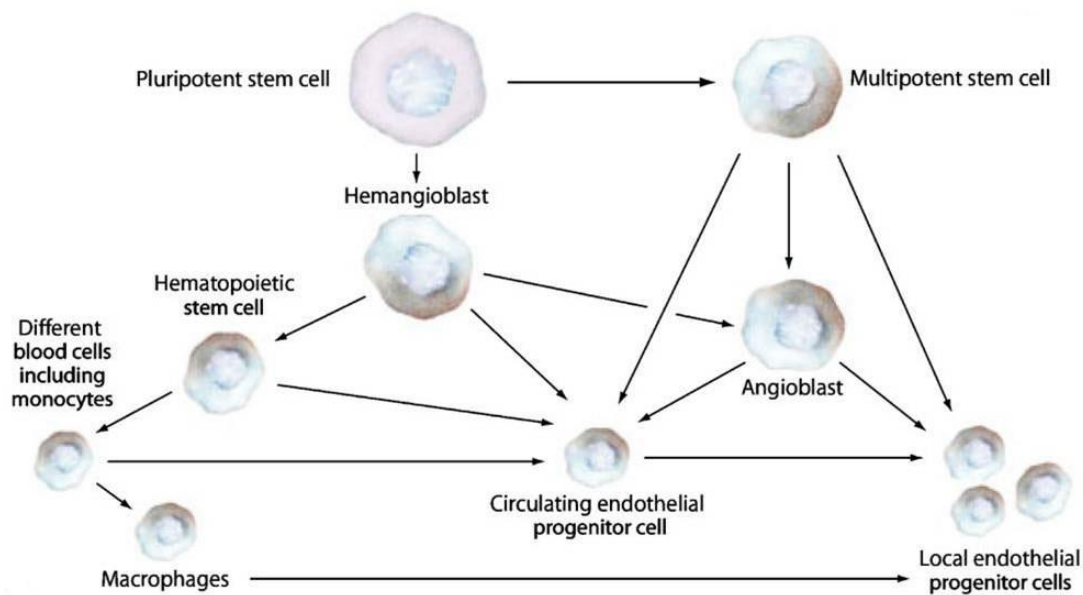


Abb. 1-2 Mögliche Ursprünge und Differenzierungswege der zirkulierenden Progenitorzellen (Kassmeyer et al., 2009).

1.3.2 Oberflächenmarker der Vorläuferzellen

Bei den endothelialen Progenitorzellen handelt es sich um Zellen im peripheren Blut, die dem Knochenmark entstammen. Sie stellen eine Vorstufe der Endothelzellen dar und besitzen Charakteristika von Stammzellen und von reifen Endothelzellen⁹¹. Eine Möglichkeit der Identifizierung der Progenitorzellen ergibt sich daher, wie oben bereits skizziert, aus ihren Oberflächenmarkern.

Asahara charakterisierte die Progenitorzellen über ihren Oberflächenmarker CD34⁷. Das CD34-Antigen, ehemals "hematopoietic progenitor cell antigen 1" genannt, wird auf hämatopoietischen Vorläuferzellen und primitiven pluripotenten Stammzellen exprimiert. Je weiter die Zelle differenziert, desto weniger CD34 wird exprimiert⁸⁵. Somit bietet es sich als Oberflächenmarker für sehr frühe hämatopoietische Stammzellstufen an. Auch auf Endothelzellen findet sich CD34^{50, 113}.

Bei CD34 handelt es sich um ein transmembranöses Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 115 kD, welches bewirkt, dass die jeweilige Zelle auf Faktoren wie den sogenannten Stammzellfaktor oder den Inhibitionsfaktor für Leukozyten reagiert. Die daraus resultierenden Effekte, die bisher nachgewiesen werden konnten, umfassen eine verstärkte Proliferation der CD34-exprimierenden Stamm- und Progenitorzellen sowie eine

Veränderung der adhäsiven und migratorischen Eigenschaften von CD34-exprimierenden Leukozyten^{125, 135, 176}.

In bestimmten pathologischen Situationen, wie dem Myokardinfarkt, können sich erhöhte Zahlen von reifen CD34+ Endothelzellen im peripheren Blut befinden¹³⁰, was zur eindeutigen Identifikation der Progenitorzellen einen weiteren Oberflächenmarker neben CD34 vonnöten macht.

Dafür bietet sich CD133 an. Das CD133 Antigen, auch AC133 oder Prominin genannt, ist charakteristisch für Stammzellen. Exprimiert wird das transmembranale Glykoprotein sowohl auf Stamm- als auch auf Progenitorzellen mit und ohne die Fähigkeit, sich zu Blut bildenden Zellen zu entwickeln^{123, 225}. Reife Blutzellen weisen jedoch kein CD133 mehr auf⁶⁵. Somit kann es als Marker verwendet werden, um unreife hämatopoietische Zellen im peripheren Blut zu identifizieren und dient als Ergänzung zu CD34, um zirkulierende Progenitorzellen zu charakterisieren und von den CD34+ reifen Endothelzellen abzugrenzen.

Als weiterer Marker insbesondere für stärker differenzierte Stufen der Progenitorzellen kann der VEGF (vascular endothelial growth factor)-Rezeptor 2 verwendet werden^{63, 144}. Bei VEGFR2, einem Membranprotein aus der Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren, handelt es sich um eine Rezeptortyrosinkinase, die sich auf reifen Endothelzellen findet. Der Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle bei der vaskulären Entwicklung, indem er die Entwicklung von Endothelzellen reguliert. Eine weitere wichtige Funktion von VEGFR2 ist die regulatorische Komponente, die er auf die vaskuläre Permeabilität sowie die Modulation der Zellmigration ausübt¹⁷¹. Gill stellte 2001 fest, dass vaskuläre Traumata zur Mobilisation VEGFR2+ Zellen führen⁵⁷.

VEGFR2+/CD34+ Zellen besitzen mit VEGFR2 einen Oberflächenmarker reifer Endothelzellen und werden daher als stärker differenziert als CD133+/CD34+ Zellen betrachtet⁶³.

Laut Peichev finden sich nur auf 0,4% der CD34+ Zellen im peripheren Blut gleichzeitig CD133 und VEGFR2¹⁴⁴. Somit ist eine getrennte Betrachtung von CD133+/CD34+ sowie VEGFR2+/CD34+ Zellen sinnvoll.

Der Chemokinrezeptor CXCR4 stellt den Rezeptor für den Stromal derived factor 1 (SDF-1) dar, der wesentlich für das Homing der zirkulierenden Progenitorzellen ist. CXCR4 wird daher

ebenso wie VEGFR2 auf stärker differenzierten zirkulierenden Progenitorzellen exprimiert¹³². Im Zuge des ischämischen Ereignisses wird initial SDF-1 ausgeschüttet²⁷, was mutmaßlich zu einer Mobilisation der Progenitorzellen führt, die den entsprechenden Rezeptor, CXCR4, exprimieren.

Trotz der diversen Studien zu Oberflächenmarkern und Charakteristika der von Asahara erstmals isolierten Zellen wird über eine eindeutige Definition der zirkulierenden Progenitorzellen weiterhin diskutiert. Jedoch zeigen sich Tendenzen. So legten nach Hristov u.a. auch Leone et al. CD34, CD133 und VEGFR2, sowie Leone zur weiteren Differenzierung auch CD45 als Marker für die zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen fest^{79, 109}.

Als weiterer Marker wurde in der vorliegenden Arbeit ein Antikörper gegen CD45 eingesetzt. CD45, eine transmembranöse Proteintyrosin-Phosphatase, von der man ausgeht, dass sie als Rezeptor an der Zelloberfläche fungiert, stellt ein Antigen dar, das in hämatopoietischen Zellen exprimiert wird, mit Ausnahme von Erythrozyten und Thrombozyten. In menschlichen Leukozyten treten fünf verschiedene Isotypen dieses Antigens auf^{59, 173}. Plasmazellen und neutrophile Granulozyten sind nicht mit CD45 Antikörpern anfärbbar, so dass sich der Antikörper als Marker für Negativkontrollen eignet.

Bei der Präparation der Zellen vor der Messung wurde in der vorliegenden Arbeit neben Antikörpern gegen die oben genannten Oberflächenmarker ein weiterer Antikörper angewendet. Um zunächst vitale Zellen von Zelldebris bzw. Fragmenten zu unterscheiden wurde die 7-AAD-Vitalitätsfärbung eingesetzt. Der 7-AAD Marker ist hilfreich, um Rückschlüsse über die Zellvitalität zu ziehen. Der Stoff interkaliert zwischen Basen der DNA, im Einzelnen handelt es sich dabei um Cytosin und Guanin. Der physiologische Zustand der Zellen kann aus ihrer Aufnahmefähigkeit für den Stoff abgeleitet werden, da 7-AAD nur in zerstörte Zellen eindringt¹⁰⁷.

1.3.3 Funktion und Fähigkeiten der Progenitorzellen

Entgegen der bis in die 1990er Jahre verbreiteten Meinung, dass im adulten Organismus keine Neovaskularisierung, also die Neuentstehung von Gefäßen, mehr stattfindet identifizierte Asahara 1997 als erster die endothelialen Progenitorzellen, die zur vaskulären Homöostase und Reparatur von Gefäßendothelien beitragen⁷. Er isolierte CD34+

mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von freiwilligen Probanden und stellte anhand seiner Ergebnisse die Hypothese auf, dass die isolierten Zellen zur Neoangiogenese bei Erwachsenen beitragen. Aufgrund der für Endothelzellen typischen Oberflächenmarker wie VEGFR wurden die im peripheren Blut zirkulierenden identifizierten Zellen als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet. Auch Shi fand 1998 Hinweise auf aus dem Knochenmark stammende, im Blut zirkulierende Zellen, die in der Lage sind, Endothel zu bilden¹⁷⁰.

Nachdem Asahara die hämatopoietischen CD34+ Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut isoliert hatte, die zur Neoangiogenese beitragen sollten, gelang es Korbling⁹⁶ und Yeh²²³, nachzuweisen, dass sich die CD34+ Zellen auch in nicht-hämatopoietische Zellpopulationen wie Kardiomyozyten, Hepatozyten oder Endothelzellen differenzieren können, was bisher nur in in-vitro Studien mit mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden konnte. Hier entwickelten sich aus mesenchymalen Progenitorzellen Adipozyten, Osteoblasten, Myozyten und Chondrozyten²⁸. Auf Asaharas Ergebnisse aufbauende Studien konnten nachweisen, dass die Transplantation von kultivierten zirkulierenden Progenitorzellen oder aus dem Knochenmark isolierten adulten Stammzellen eine verstärkte Angiogenese in ischämischen Geweben hervorruft^{87, 175, 190}. Ferner zeigte Sandri 2005, dass Organischämien eine vermehrte Freisetzung dieser zirkulierenden Progenitorzellen aus dem Knochenmark hervorrufen¹⁶⁰. Werner untersuchte 2003 die Rolle intravenös transfundierter endothelialer Progenitorzellen im Mausmodell mit arterieller Verletzung. Hier erkannte er, dass sich die transfundierten Zellen ausschließlich an der verletzten Stelle fanden und schloss daraus, dass die Transfusion zu verstärkter Reendothelialisierung führte²¹¹. Vor dem Hintergrund des akuten Myokardinfarkts analysierte Grundmann CD34+ Zellen, CD133+/CD34+ Zellen und VEGFR2+/CD34+ Zellen. Bei allen drei Populationen konnte ein Anstieg der Zellzahlen bis Tag 4 nach dem Infarkt ereignis verzeichnet werden; der stärkste Anstieg fand sich in der CD133+/CD34+ Population, was eine Assoziation insbesondere dieser Zellpopulation mit ischämischen Ereignissen vermuten lässt⁶³.

Im Zusammenhang mit zerebrovaskulären Erkrankungen demonstrierte Zhang bereits 2002, dass nach einer fokalen zerebralen Ischämie bei Mäusen zirkulierende Progenitorzellen in Regionen der Neovaskularisierung am Rande der Ischämie nachweisbar waren²³⁴.

Als zugrunde liegender Mechanismus der Wirkungsentfaltung der Progenitorzellen gilt die Sekretion von Zytokinen wie IL-8 und VEGF, welche zu einer Verstärkung der endogenen Reparaturmechanismen führt^{127, 162}.

Die vorgenannten Studien dienten konzeptionell als Grundlage der Hypothese, dass hinter der Mobilisation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark ein physiologischer Reparaturmechanismus steht. Als erste Studie am Menschen zu den Nutzen bringenden Effekten der Progenitorzellen gilt die TOPCARE-AMI, in der Patienten mit Myokardinfarkt Progenitorzellen infundiert wurden, um einen positiven Effekt auf das Remodeling nach reperfundiertem Myokardinfarkt zu untersuchen, mit dem Ergebnis, dass den infundierten Zellen auch beim Menschen potenzielle positive Effekte wie ein besseres klinisches Outcome nach Myokardinfarkt sowie eine verbesserte Herzfunktion zuzuschreiben seien^{8, 108}.

1.3.4 Beeinflussende Faktoren und Mechanismus der Freisetzung der Progenitorzellen

Nachdem die Zellpopulationen identifiziert wurden, die zu Neoangiogenese und Reendothelialisierung beitragen können stellte sich die Frage nach Faktoren, die die Mobilisation dieser Zellen beeinflussen und dem Mechanismus, der ihrer Mobilisation zugrunde liegt. Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene Faktoren identifiziert, die zur Mobilisation der zirkulierenden Progenitorzellen führen.

Das akute Koronarsyndrom gilt eine Art Trigger, der die Zellzahl der Progenitorzellen im peripheren Blut erhöht^{120, 182}. Shintani zeigte bereits 2001, dass bei Patienten mit Myokardinfarkt CD34+ mononukleäre Zellen nach dem Ereignis mobilisiert werden und wies bei Messungen an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 28 einen Peak der Zellmobilisation an Tag 7 nach¹⁷⁴. Beim akuten Myokardinfarkt spielen insbesondere die Infarktgröße sowie das Ausmaß der nekrotischen Areale eine Rolle²⁰¹. Der Anstieg der Progenitorzellen wird auf die Entzündungsreaktion infolge des Infarkts zurückgeführt. Zudem sollen Prozesse des entstandenen Traumas für den Anstieg verantwortlich sein^{105, 162}. Als Ursache für eine vermehrte Mobilisation konnten auch vaskuläre Traumen nachgewiesen werden⁵⁷, ebenso wie Scherbeanspruchung der Gefäße²¹⁹. In gesunden Probanden konnte intensive sportliche Betätigung die unter physiologischen Bedingungen geringere Freisetzung der Progenitorzellen verstärken²⁰².

Auch andere vaskuläre Erkrankungen wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) beeinflussen die Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen; allerdings wird der Effekt hier noch kontrovers diskutiert. Einige Studien konnten erhöhte Zahlen zirkulierender Progenitorzellen in pAVK-Patienten verglichen mit Gesunden nachweisen⁴¹, während andere keinen Unterschied zu Gesunden feststellen konnten¹⁶⁶.

Einen weiteren interessanten Faktor stellen HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Statine) als stimulierenden Faktor für die Progenitorzellmobilisation dar^{180, 204, 207}. Sie erhöhten die Anzahl der Progenitorzellen im Mausmodell¹¹⁵, in vitro⁴² ebenso wie in Patienten mit stabiler Koronargefäßerkrankung²⁰⁴.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden als Faktor identifiziert, der die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen negativ beeinflusst- in verschiedenen Studien korrelierte die Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren negativ mit der Anzahl zirkulierender Progenitorzellen^{201, 205}. Darauf folgend wurden auch Studien zum prognostischen Wert niedriger Werte von Progenitorzellen in Bezug auf das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse durchgeführt, die zu dem Ergebnis kamen, dass niedrige Progenitorzellzahlen als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse dienen können^{74, 161}. Bereits in sub- bzw. präklinischen Stadien atherosklerotischer Gefäßveränderungen wurden erniedrigte Zahlen zirkulierender Progenitorzellen gemessen^{33, 45}. Als Hintergrund dieser Phänomene werden eine verstärkte Apoptose, ein erhöhter Verbrauch der Progenitorzellen durch geschädigte Gefäßareale sowie eine verminderte Freisetzung der Zellen aus dem Knochenmark diskutiert^{45, 205}.

Einen Überblick über die verschiedenen Einflussfaktoren gibt Abb. 1-3.

Erhöhung der Anzahl der Vorläuferzellen im peripheren Blut	Erniedrigung der Anzahl der Vorläuferzellen im peripheren Blut
Akutes Koronarsyndrom	Kardiovaskuläre Risikofaktoren
Vaskuläre Traumen	• Diabetes
Scherbeanspruchung der Gefäße	• Rauchen
Sportliche Betätigung	• Hypercholesterinämie
HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Statine)	Atherosklerotische Gefäßveränderungen
pAVK (fraglich)	

Abb. 1-3 Einflussfaktoren der Mobilisation der Progenitorzellen

Für die Mobilisation der Progenitorzellen aus dem Knochenmark werden verschiedene Enzyme, Liganden, Wachstumsfaktoren und Oberflächenrezeptoren verantwortlich gemacht^{78, 201}. Der zugrunde liegende Mechanismus involviert die Metalloproteinase-9, die somit einen zentralen Faktor in der Mobilisation der Progenitorzellen darstellt^{69, 229}. Diese Vermutung basiert auf Studien, die nachweisen konnten, dass ischämische Ereignisse die Spiegel von VEGF und SDF-1 in der Peripherie erhöhten^{27, 174}, wobei sich die Metalloproteinase-9 und VEGF bzw. SDF-1 gegenseitig positiv in ihrer Freisetzung beeinflussen. SDF-1, VEGF und IL-8 konnten in ihrer Rolle als Chemokine als Progenitorzellen mobilisierende Faktoren nachgewiesen werden^{86, 147, 162, 196}. In mehreren Studien wurden auch Zytokine wie G-CSF und GM-CSF untersucht^{147, 149, 167, 209}, welche die Proliferation und Mobilisation der Progenitorzellen stimulieren, wohingegen TNF- α die Anzahl vermindern soll⁶². Zudem wird Erythropoietin, ein Glykoprotein-Hormon, mit der Mobilisation in Verbindung gebracht^{67, 83}, indem es zu einer Erhöhung der Progenitorzellen führen soll^{125, 126}. Die Interleukine IL-1 β und IL-6 wurden ebenfalls als die Mobilisation stimulierende Faktoren identifiziert^{3, 47, 155}.

1.3.5 Mechanismen des „Homings“ der Progenitorzellen

Die Fragen, wie die Progenitorzellen zu ihrem Bestimmungsort finden und wie sie in ihr Zielgewebe einwandern, also ihre Migration und ihr „Homing“, sind noch nicht umfassend geklärt.

Die Rekrutierung der Zellen durch das Zielorgan geschieht in erster Linie mit Hilfe von SDF-1^{175, 169}. Im Mausmodell demonstrierte Yin, dass SDF-1 und dessen Rezeptor CXCR4, welcher auch auf stärker differenzierten zirkulierenden Progenitorzellen exprimiert wird¹³², eine essentielle Rolle für die Reendothelialisierung von Gefäßschäden durch Progenitorzellen spielen²²⁶. SDF-1 wurde von Aiuti bereits 1997 in Immunoassays als Faktor nachgewiesen, der als Chemotaxis induzierender Botenstoff die Migration der Progenitorzellen stimuliert². Auch der Anstieg zirkulierender Progenitorzellen wird unter anderem SDF-1 zugeschrieben²¹. Für das Homing der Vorläuferzellen ist vermutlich die Interaktion zwischen SDF-1 und CXCR4 relevant³⁰, ebenso wie diese Faktoren während der Embryogenese für die Hämatopoese, die Kardiogenese³² sowie die Angiogenese von Bedeutung sind. Im Prozess des Homings der Progenitorzellen wird in hypoxischem Gewebe verstärkt SDF-1 exprimiert²⁷. Dieser Vorgang

führt über die Interaktion zwischen CXCR4 und SDF-1 zu einer Adhäsion der Progenitorzellen an das hypoxische, da geschädigte Gefäßendothel und schließlich zu deren Migration durch das Endothel. Shen stellte 2011 die Hypothese auf, dass der sogenannte SDF-1/CXCR4-Rac-Pfad das Homing der Progenitorzellen durch zelluläre Polarisation reguliert, wobei Rac als „Kompass“-Protein intrazelluläre Signale beeinflusst, die für Migration und Homing relevant sind¹⁶⁹.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass beim Homing transplanteder hämatopoietischer Stammzellen im Knochenmark sogenannte Integrine ebenso eine Rolle spielen wie bei der Rekrutierung von Entzündungszellen, wurden diese Adhäsionsmoleküle auch im Zusammenhang mit dem Homing der zirkulierenden Progenitorzellen untersucht. β 2-Integrin erwies sich bei in-vitro Studien zur Adhäsion und endothelialen Transmigration der Progenitorzellen als relevant²⁹.

1.3.6 Bedeutung der Progenitorzellen beim zerebralen Infarkt

Auf Basis von Asaharas Ergebnissen resultierte die Hypothese, dass die zirkulierenden Progenitorzellen einen endogenen Reparaturmechanismus darstellen könnten, indem sie Neoangiogenese und Reendothelialisierung in ischämisch geschädigten Geweben induzieren können. Die ersten Untersuchungen dazu konzentrierten sich in erster Linie auf das Krankheitsbild des Myokardinfarkts^{151, 206}. In weiteren Studien wurde eine Korrelation von niedrigeren absoluten Zahlen von CD133+/CD34+ endothelialen Progenitorzellen mit einer höheren Prävalenz von zerebralen Infarkten festgestellt¹⁸⁸ und die Zellen als unabhängiger Prädiktor für die zerebrovaskuläre Funktion diskutiert²²⁷.

Sobrinho untersuchte 2007 daraufhin den prognostischen Wert von endothelialen Progenitorzellen beim zerebralen Infarkt und stellte fest, dass die zahlenmäßige Zunahme der Zellen mit dem klinischen Outcome der Patienten nach 7 und 90 Tagen korrelierte – je stärker der Anstieg binnen der ersten Woche nach dem Infarkt ereignis, desto besser das Outcome¹⁷⁹. Weitere Studien bestätigten den prognostischen Wert der zirkulierenden Progenitorzellen, was deren klinische Bedeutung hervorhebt^{20, 227}.

Die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen liegt laut einer Studie von Balbarini bei Gesunden auf einem höheren Level als bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren¹¹.

Paczkowska verglich 2008 die Anzahl endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit zerebralem Infarkt mit denen einer gesunden altersgematchten Kontrollgruppe und stellte nach 24h, 3 Tagen und 7 Tagen bei den Infarktpatienten höhere Zellzahlen im Vergleich zu den gesunden Probanden fest¹⁴². Paczkowska zeigte damit, dass im Infarkt offenbar vermehrt Progenitorzellen mobilisiert werden. Die Zellzahl bei Infarktpatienten liegt somit höher als bei Gesunden, die wiederum höhere Level haben als Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren.

1.4 Einflüsse von Statinen

Statine sind 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A (HMG-CoA)–Reduktase Inhibitoren und wurden ursprünglich als Medikation zur Senkung des Serumcholesterolspiegels entwickelt. Jedoch wurden nach und nach weitere Effekte der Statine festgestellt, die unabhängig von der Cholesterinsenkung funktionieren- so z.B. gefäßprotektive Effekte²³. Bereits 1997 wurde ein präventives Potenzial für ischämische Hirninfarkte durch Statinbehandlung entdeckt¹⁸. Diese Hypothese wurde weiter verfolgt und konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden^{106, 191, 203}. Zudem zeigte sich, dass eine Statintherapie das Outcome nach zerebraler Ischämie verbessern kann^{4, 126, 141}. Die positiven Effekte wurden unter anderem auf die Hochregulation der NO-Synthase des Gefäßendothels zurückgeführt^{4, 44}.

Auf Basis der Erkenntnisse zu den positiven Effekten von Statinen in Bezug auf ischämische Ereignisse wurde auch ihr Einfluss auf zirkulierende Progenitorzellen untersucht. Verschiedene Studien wiesen eine Assoziation zwischen Statineinnahme und verstärkter Neoangiogenese sowie der Proliferation und Mobilisation von Progenitorzellen nach. In vitro steigerten Statine die Anzahl der Progenitorzellen ebenso wie in vivo^{42, 101, 115}. Dimmeler untersuchte den ursächlichen molekularen Mechanismus, über den Statine stimulierend auf die Mobilisation und Differenzierung der Progenitorzellen wirken und kam zu dem Schluss, dass dem Mechanismus der sogenannte PI 3-Kinase/Akt-Signalweg zugrunde liegt, dem zuvor bereits eine zentrale Rolle bei der Angiogenese nachgewiesen werden konnte⁴².

1.5 Zytokine und deren Rolle im Zusammenhang mit den Vorläuferzellen

1.5.1 Übersicht

Bei den Zytokinen handelt es sich um Peptide, die Wachstum und Differenzierung von Zellen regulieren und als Botenstoffe für die interzelluläre Kommunikation und Interaktion dienen. Sie fungieren als Hormone des hämatopoietischen Systems und vermitteln ihre teils unterschiedlichen Effekte über membranständige Rezeptoren auf den Zielzellen. Fünf Hauptgruppen von Zytokinen werden unterschieden: Interleukine (IL), Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren (CSF), Tumornekrosefaktoren (TNF) und Chemokine (CXC, CC).

Interleukine, bei denen es sich um Peptidhormone handelt, vermitteln die interzelluläre Kommunikation von Leukozyten¹⁵⁹. In der vorliegenden Studie wurden IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 untersucht.

Interferone sind Gewebshormone, die mit Hilfe antiproliferativer, antiviraler und immunmodulatorischer Wirkungen einen Schutz gegen Virusvermehrung und Tumorwachstum bieten. Sie werden entweder von Abwehrzellen, insbesondere T-Lymphozyten und Leukozyten oder von virusinfizierten Zellen, hier vor allem von Fibroblasten, gebildet¹⁴³. Man unterscheidet im Wesentlichen drei Typen von Interferonen: IFN- α , IFN- β und IFN- γ .

Die dritte Hauptgruppe stellen koloniestimulierende Faktoren (CSF) dar. Sie sind als Wachstumsfaktoren essentiell für die Entwicklung und Vermehrung hämatopoietischer Zellen¹⁵⁹. Zu den CSF zählen der Granulozyten-CSF (G-CSF), der für die Bildung von Leukozyten von Bedeutung ist, sowie das Erythropoietin, der Wachstumsfaktor für rote Blutkörperchen.

Tumor-Nekrose-Faktoren, zu denen der in der Studie gemessene TNF- α zählt, sind an Entzündungsreaktionen beteiligt. Sie spielen sowohl lokal als auch systemisch eine Rolle, indem sie Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose und die Sekretion anderer Botenstoffe regulieren.

Als fünfte Hauptgruppe sind die Chemokine zu nennen. Sie dienen als Lockstoffe, die die Wanderung der Zielzellen an den Sekretionsort der Chemokine bewirken. Sie induzieren Chemotaxis entlang eines Konzentrationsgradienten in umliegenden Zellen.

1.5.2 Interleukin 1beta

Bei Interleukin-1beta (IL-1 β) handelt es sich um ein Mitglied der Interleukin-1-Familie, die aus derzeit 11 Mitgliedern besteht, unter anderem dem Zytokin IL-1 α und dem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten IL-1-Ra⁴³. IL-1 β ist eine treibende Kraft bei der Angiogenese und stimuliert die Produktion von VEGF²⁴. Die Synthese von IL-1 β wird durch sogenannte Toll-like Rezeptor-Agonisten stimuliert. IL-1 β wird neben Monozyten auch von Endothelzellen sezerniert, wobei Scherspannung die Sekretion verstärken kann¹⁸⁶. Bei IL-1 β handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, das infolge verschiedener inflammatorischer Reaktionen, so auch beim ischämischen Hirninfarkt, vermehrt ausgeschüttet wird. So wurden erhöhte Serumspiegel von IL-1 β nach Schlaganfall und nach Gehirnkontusionen nachgewiesen^{77, 121}. In-vitro Versuche konnten nachweisen, dass IL-1 β in der Lage ist, die Angiogenese durch zirkulierende Vorläuferzellen zu verstärken¹⁵⁵, womit ein Zusammenhang mit der Mobilisation der Progenitorzellen wahrscheinlich wird.

1.5.3 Interleukin 6

Bei Interleukin-6 (IL-6) handelt es sich um ein sowohl pro- als auch antiinflammatorisches Zytokin der akute-Phase-Reaktion. Neben T-Zellen und Makrophagen sind auch Myozyten und Osteoblasten in der Lage, IL-6 zu sezernieren, ebenso wie Endothelzellen und Fibroblasten^{88, 116}. Im zentralen Nervensystem wird IL-6 von Gliazellen synthetisiert. In Mikroglia wird die Ausschüttung von IL-6 durch SDF-1/CXCR4-Interaktion stimuliert¹¹⁷. Auch Astrozyten sind in der Lage, IL-6 zu sezernieren^{164, 172}. Wichtige Stimulationsfaktoren sind Antigene wie Lipopolysaccharide⁴⁹, Viren, Tumornekrosefaktor oder IL-1⁸⁸, aber auch hier stellt Scherspannung einen Faktor dar, der die Sekretion aus Endothelzellen stimuliert¹⁸⁶. IL-6 induziert die Synthese von C-reaktivem Protein (CRP) in Hepatozyten⁵⁵. Letzteres wird mit der Mortalität bzw. dem Outcome nach zerebraler Infarkt assoziiert und als Prädiktor für das Risiko zerebraler Ischämien diskutiert^{81, 89, 168, 218}, was IL-6 in seiner Rolle als Induktor der

CRP-Synthese wiederum als beeinflussenden Faktor des Outcomes nach zerebralem Infarkt interessant macht.

1.5.4 Interleukin 8

Interleukin-8 (IL-8) aktiviert inflammatorische Prozesse und wirkt als Chemokin auf neutrophile Granulozyten, die den IL-8-Rezeptor exprimieren^{34, 220}. Auch pro-angiogenetisches Potenzial konnte IL-8 nachgewiesen werden¹¹⁰. Gebildet wird es, ähnlich wie IL-6, von Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, aber auch von Hepatozyten und Melanozyten^{112, 195}. Nach ischämischen Hirninfarkten konnten erhöhte Serumspiegel an IL-8 nachgewiesen werden⁶⁰. Es wird vermutet, dass IL-8 in der Lage ist, Stammzellen über einen Signalweg via Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) und Lymphozyten Funktion assoziiertem Antigen 1 (LFA-1) zu mobilisieren. Nach Myokardinfarkt konnte eine Assoziation zwischen IL-8 und der Mobilisation zirkulierender Progenitorzellen nachgewiesen werden, was auch einen möglichen Zusammenhang mit der Progenitorzell-Mobilisation nach zerebralem Infarkt nahelegt^{150, 162}.

1.5.5 Interleukin 10

Das Zytokin Interleukin 10 (IL-10) wirkt antiinflammatorisch auf das Ausmaß und die Dauer von Entzündungsreaktionen. Es wird von verschiedenen Zellen wie Makrophagen, NK-Zellen und TH2-Zellen sezerniert; die Zielzellen stellen in erster Linie neutrophile Granulozyten dar^{12, 66}. IL-10 antagonisiert durch negative Rückkopplungsmechanismen die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , und wohl auch IL-12^{35, 51}. In einer Studie mit Ratten war IL-10 in der Lage, die Infarktgröße nach fokaler zerebraler Ischämie zu reduzieren¹⁸¹, was mutmaßlich in Zusammenhang mit seiner Rolle bei der Entzündungsreaktion steht. Des Weiteren wurde ein Anstieg von IL-10 nach zerebraler Ischämie beobachtet und es wird als prognostischer Faktor beim Schlaganfall diskutiert¹³³.

1.5.6 Interleukin 12

Bei Interleukin 12 (IL-12) handelt es sich um ein Zytokin, dessen Rezeptor auf aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden kann. Seine biologische Funktion besteht darin, NK-Zellen zu stimulieren und die Reifung zytotoxischer Lymphozyten zu unterstützen^{13, 239}. IL-12 führt zu einer Hochregulierung der IFN- γ Ausschüttung nach Organischämie bzw. Reperfusion³⁶. In der Akutphase zerebraler Infarkte wurde eine Erhöhung der Serumspiegel von IL-12 beobachtet^{97, 232}. Auch ein therapeutischer Effekt bei zerebralem Infarkt wurde durch die Blockade des IL-12/23 Signalwegs erzielt⁹⁵, was auf einer Hemmung der inflammatorischen Reaktion beruhen könnte. Somit ist auch IL-12 im Hinblick auf die Prozesse rund um die Progenitorzellen interessant, wenn man den Zusammenhang der Mobilisation der Progenitorzellen mit der einer Ischämie folgenden inflammatorischen Reaktion untersucht. Spielt IL-12 in der inflammatorischen Reaktion eine Rolle, gilt es also, auch einen möglichen Einfluss auf die Mobilisation der Progenitorzellen zu untersuchen.

1.5.7 Tumornekrosefaktor-alpha

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) ist ein proinflammatorisches Zytokin. Die zugehörigen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 findet man in löslicher Form und ubiquitär auf Zelloberflächen. TNF- α kommt membrangebunden auf Makrophagen, NK-Zellen, aktivierten T- und B-Lymphozyten, aber auch löslich im Blut vor. Es ist in der Lage, die Expression wichtiger Adhäsionsmoleküle der Entzündungsreaktion zu induzieren²³³. Bei der zerebralen Ischämie fand sich eine Erhöhung seiner Serumspiegel sowie eine Korrelation der Serumspiegel mit der klinischen Ausprägung der Ischämie²³¹. Ein Zusammenhang mit der Suszeptibilität für Schlaganfälle wird diskutiert¹⁵⁷.

1.6 Die Marker S-100 und NSE

Seit einigen Jahren wird die Bestimmung der S-100B-Protein-Konzentration als Marker für das Ausmaß von Hirnschädigungen herangezogen. Auch die neuronenspezifische Enolase (NSE) wird als Marker diskutiert. Hierbei liegt die Annahme zugrunde, dass bei einer Gewebsschädigung des Gehirns das S-100B-Protein und NSE aus den geschädigten Gliazellen freigesetzt werden und im Blut nachzuweisen sind. Normwerte von S-100 werden meist mit

einem oberen Referenzwert von 0,15 µg/L angegeben¹⁶, während bei NSE ebenfalls ein oberer Referenzwert von ca. 10-15 µg/l verwendet wird- dies differiert jedoch von Labor zu Labor⁸⁴.

1.6.1 S-100 und seine Rolle beim zerebralen Infarkt

Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass der Spiegel von S-100 mit dem Infarktvolumen korreliert^{124, 146}. In der vorliegenden Studie wurde S-100 daher als Surrogatmarker für das Infarktvolumen verwendet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Infarktgröße und dem Ausmaß der Mobilisation der Progenitorzellen zu überprüfen.

1.6.2 NSE vor dem Hintergrund des zerebralen Infarkts

Für die neuronenspezifische Enolase (NSE) gilt ähnliches wie für S-100. Auch NSE wird als Marker für die Identifikation, das Ausmaß und die Prognose von zerebralen ischämischen Ereignissen diskutiert¹⁴⁶. Es wird aus geschädigten Neuronen freigesetzt und kann so mit der tatsächlichen Infarktgröße korreliert werden. Ebenso wie S-100 diene NSE daher in der vorliegenden Arbeit als Surrogatmarker für das Infarktvolumen, um zu überprüfen, ob die Infarktgröße mit der Mobilisation der Progenitorzellen assoziiert ist.

2 Material und Methodik

2.1.1 Patientenselektion - Einschlusskriterien für Patienten

Es wurden 50 Patienten in die Studie eingeschlossen, die auf die Stroke Unit des Neuro-Kopf-Zentrums des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität eingewiesen wurden. Die Rekrutierung der Patienten erstreckte sich auf den Zeitraum von Januar bis November 2008.

Es wurden Patienten mit klinisch und radiologisch nachgewiesenem akutem zerebralen Infarkt eingeschlossen. Der Symptombeginn durfte keinesfalls länger als 24 Stunden zurückliegen.

2.1.2 Ausschlusskriterien für Patienten und Anamnese

Ausschlusskriterien waren chronisch inflammatorische, infektiöse, maligne sowie schwerwiegende systemische Erkrankungen.

Ebenfalls als Ausschlusskriterium wurde ein durch Patienten- oder Angehörigenaussagen gesicherter oder vermutlicher Symptombeginn mehr als 24 Stunden vor einer möglichen ersten Blutentnahme festgelegt.

Alle Patienten wurden eingehend über die Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München genehmigt.

Eine Anamnese der Vorerkrankungen, der aktuellen Medikation sowie der Rauchgewohnheiten wurde erhoben. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden ebenfalls bei allen Patienten erfragt bzw. die Patienten daraufhin untersucht.

Die klinische Untersuchung der Patienten umfasste eine Erfassung des Allgemeinzustandes des Patienten, den Blutdruck, Labortests sowie ein 12-Kanal-EKG.

Als kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden die folgenden definiert:

- Diabetes mellitus bei einem Nüchternblutglukosespiegel von >125 mg/dl oder einem Blutglukosespiegel von >200mg/dl nach Mahlzeiten oder einem bereits zuvor ärztlich diagnostizierten Diabetes mellitus
- Arterielle Hypertonie bei einem systolischen Blutdruck von >140 mmHg oder diastolisch >90 mmHg oder bei Einnahme blutdrucksenkender Medikamente
- Hyperlipidämie bei einem Gesamtcholesterinspiegel von >240mg/dl, LDL Cholesterin von >190mg/dl, einem LDL/HDL-Quotienten von >4,0 oder einem zuvor ärztlich diagnostizierten erhöhten Cholesterinspiegel.

2.2 Methodik – Studienprotokoll

2.2.1 Vorgang der Blutentnahme

Innerhalb von 24 Stunden nach dem Beginn der Infarktsymptome wurde Blut aus einer peripheren Vene oder, sofern vorhanden, aus einem arteriellen Katheter entnommen. Zwei weitere Blutentnahmen fanden fünf und sieben Tage nach Symptombeginn statt.

Um die Analysen ohne Verzögerung beginnen zu können wurden die Blutproben nach der Entnahme unverzüglich ins Labor transportiert und innerhalb von 2 Stunden weiterverarbeitet.

Für die FICOLL-Fällung wurde das Blut mit Hilfe einer CPDA-Monovette entnommen, das Vollblut wurde in einer heparinisierten Blutgasmonovette gesammelt.

2.2.2 Weiterverarbeitung der Proben

Für weitere Untersuchungen wurde Vollblut in einer EDTA-, einer Citrat- und einer Serum-Monovette gesammelt, abzentrifugiert, und das jeweilige Serum bei -27°C tiefgefroren.

Zudem wurde Vollblut mit Hilfe eines PAXgene™ Blood RNA Systems (Becton, Dickinson, NJ, USA) asserviert.

Die weitere Probenverarbeitung und Auswertung folgte einem bereits in der Forschungsgruppe etablierten Schema^{162, 165}.

Zur Anreicherung mononukleärer Zellen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficollreagenz (Ficoll-Paque PLUS, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Dazu wurden 20ml CPDA-Vollblut auf 20ml Ficollreagenz geschichtet und 20min bei 1900 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Dieser Vorgang führte aufgrund des Dichtegradienten im Ficoll-Reagenz zu einer Trennung in einzelne Schichten bestehend aus mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) und Thrombozyten bzw. Erythrozyten und Granulozyten. Die Schichten waren durch das Ficollreagenz zuverlässig voneinander abgetrennt (Abb. 2-1).

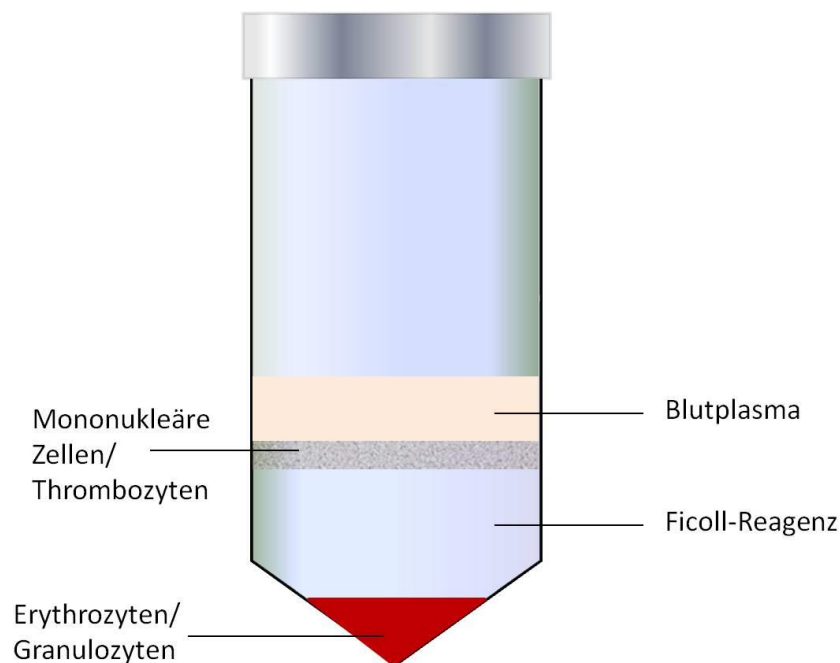


Abb. 2-1 Schema der Schichtenbildung nach Ficoll-Fällung

Die Schicht aus mononukleären Zellen und Thrombozyten wurde abpipettiert, zweimal mit Phosphatase Buffered Saline (PBS) (GIBCO, Paisley, UK) gewaschen und jeweils bei 1700 U/min zentrifugiert. Der letzte Überstand wurde wiederum abpipettiert und verworfen. Das Zentrifugat wurde mit 1000µl PBS aufgeschwemmt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß

gegeben. Im Anschluss wurde die Zellzahl im Zentrifugat-Gemisch mit dem Blutanalysegerät Sysmex (Sysmex KX 21, Gerätenummer A4325) bestimmt.

Für das Anfärben der Zellen aus der Ficoll-Fällung wurden die Zellen mit verschiedenen Antikörpern (AK) inkubiert. Zum Nachweis vitaler CD133+ Progenitorzellen wurden im ersten Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,25µl eines Allophycocyanin (APC)-konjugierten anti-CD45-AK (Klon 2D1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 5µl eines Phycoerythrin (PE)-konjugierten anti-CD133-AK (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), 5µl eines Fluoreszein-Isothiozyanin (FITC)-konjugierten anti-CD34-AK (Klon 8G12, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) hinzugegeben, des weiteren 2,5µl eines 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD)-Antikörpers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) als Vitalitätsfärbung, um die vitalen Zellen von Zelldebris bzw. Fragmenten zu unterscheiden. Das Eppendorf-Gefäß mit dem Antikörper-Gemisch wurde mit Ficoll-Zentrifugat aufgefüllt. Die benötigte Menge wurde mit Hilfe der gemessenen Zellzahl des Ficoll-Zentrifugats berechnet. Die Mischung wurde für 30 Minuten in Dunkelheit auf Eis inkubiert. Um die Erythrozyten, die zu einem geringen Anteil noch in den Proben enthalten waren, zu entfernen, wurde der Probenansatz bei Raumtemperatur 10 Minuten lang im Dunkeln lysiert. Dieser Schritt geschah mit Hilfe von 200µl der FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), welche im Verhältnis 1:10 mit Aqua destillata verdünnt wurde.

Um die Lyse zu stoppen wurde Dulbecco's PBS-Buffer (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) hinzugefügt und die Proben wurden 5 Minuten bei 4°C bei 1700 U zentrifugiert, um abschließend den Überstand zu verwerfen.

Der zweite Probenansatz wurde zum Nachweis vitaler VEGFR2+/CD34+ Progenitorzellen mit 1,25µl eines APC-konjugierten anti-CD45-AK (Klon 2D1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 5µl eines FITC-konjugierten anti-CD34-AK (Klon 8G12, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 5µl eines PE-konjugierten anti-VEGFR2-AK (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) sowie 2,5µl eines 7-AAD-Antikörpers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) angesetzt und wie oben beschrieben mit dem Ficoll-Zentrifugat aufgefüllt und weiterverarbeitet.

Der dritte Probenansatz, das sogenannte „iso“-Röhrchen, stellte die Kontrolle für die CD133+ und die VEGFR2+/CD34+ Zellen dar. Dazu wurden im dritten Röhrchen lediglich 1,25µl des

APC-konjugierten anti-CD45-AK wie oben beschrieben mit Ficoll-Zellen aufgefüllt weiterverarbeitet.

In einem vierten Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde eine Antikörper-Färbung des heparinisierten Vollblutes vorgenommen. Zur Untersuchung der Expression von CXCR4 an der Zelloberfläche der Progenitorzellen wurde auf eine Ficoll-Zentrifugation verzichtet. 5µl eines FITC-konjugierten anti-CXCR4-AK (R&D Systems, Minneapolis, USA), 5µl eines PE-konjugierten anti-CD133-AK (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), 1,25µl eines APC-konjugierten anti-CD45-AK (Klon 2D1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) und 2,5µl eines 7-AAD-Antikörpers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) wurden auf 50µl mit dem heparinisierten Vollblut aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten in Dunkelheit auf Eis. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Probenansatz mit Hilfe von 500µl der FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), wiederum 1:10 mit Aqua destillata verdünnt, bei Raumtemperatur 10 Minuten lang im Dunkeln lysiert. Der lysierte Probenansatz wurde im Anschluss mit dem PBS-Puffer (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) gewaschen und 5 Minuten bei 1700 U/min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

In einem weiteren Probenansatz wurde das heparinisierte Vollblut mit 1,25µl Allophycocyanin (APC)-konjugiertem anti-CD45-AK (Klon 2D1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) versetzt, darüber hinaus mit 5µl eines PE-konjugierten Anti-CD133 Antikörpers (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) und mit 5µl eines FITC-konjugierten Anti-CD34-Antikörpers (Clone 8G12, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Die Antikörper-Mischung wurde mit dem Vollblut auf 50µl aufgefüllt und analog zu den Ficoll-Proben weiterverarbeitet und abzentrifugiert. Der Probenansatz wurde anschließend in ein TruCOUNT-Röhrchen (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) überführt.

Als Vollblut-Isotyp-Kontrolle diente ein Ansatz mit nur 1,25µl des oben genannten Anti-CD45 AP-konjugierten Antikörpers, der ebenfalls mit Vollblut ad 50µl aufgefüllt und wie oben beschrieben weiterverarbeitet wurde.

Die vorbereiteten Proben wurden entweder sofort im Anschluss am Durchflusszytometer analysiert oder die Probenansätze wurden mit 150µl Paraformaldehydlösung (1%) asserviert. Im letzteren Fall wurden die Proben spätestens am folgenden Tag analysiert.

2.3 Messtechniken

2.3.1 Durchflusszytometrie

2.3.1.1 Allgemeine Informationen

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um Zellen in einem Flusssystem zu zählen. Die gängige Bezeichnung für den Durchflusszytometer ist FACS, das Akronym für „fluorescent activated cell sorter“.

Bei der durchflusszytometrischen Messung trifft ein Laserstrahl auf eine Messkapillare, in der sich die zu analysierende Zellsuspension im Fluss befindet. Jede Störung, in Form von Streuung oder Änderung der Wellenlänge des linearen Laserlichts wird von Photometerzellen registriert. Diese Störungen werden als „Events“ bezeichnet. Event deshalb, weil das FACS nicht zwischen vitalen Zellen, Zelltrümmern und verunreinigenden Partikeln unterscheiden kann. Erst die Auswertung erlaubt eine solche Differenzierung.

Im Wesentlichen stützt sich der Mechanismus auf ein optisches System. Es werden Signale gemessen, die einerseits entstehen, indem die Lasersignale beim Auftreffen auf die Zellen gestreut werden, andererseits emittieren die Zellen je nach Probenansatz mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen selbst unterschiedliche Wellenlängen. Die Kombination aus solchen Signalen kann Aufschluss über die Zelltypen, deren Beschaffenheit und ähnliches geben.

In der Regel wird die Lichtstreuung aus zwei verschiedenen Winkeln gemessen und unterschiedliche Fluoreszenzen bzw. Wellenlängen werden kombiniert.

Das optische Signal wird in digitale Signale umgewandelt, welche auf einem Computer aufgezeichnet werden. Schließlich können die gewünschten Parameter visualisiert und interpretiert werden.

2.3.1.2 Bestandteile und Aufbau des Durchflusszytometers

Mit Hilfe eines Flüssigkeitsstroms werden die suspendierten Zellen transportiert und für die Passage des Lasers linear justiert. Voraussetzung für die Messung ist, dass die zu messenden Zellen als Einzelzellsuspension vorliegen, was durch eine entsprechende Vorbereitung der Proben erreicht wird.

Das Messsystem verfügt über einen Laser und einen Detektor sowie ein „Analogue-to-Digital Conversion (ADC)“-System, welches die optischen Signale digitalisiert.

2.3.1.3 Funktionsweise

Die Zellen, die sich im Probenansatz in Suspension befinden, werden durch Überdruck aus dem Probengefäß in die Messkapillare transferiert. Die daraus resultierende Beschleunigung führt zur Auflösung von Zellaggregaten. Verklebte Zellen werden allerdings nicht getrennt. Auf diese Weise passieren die Zellen das Detektionssystem eine nach der anderen in einer Reihe (Abb. 2-2).

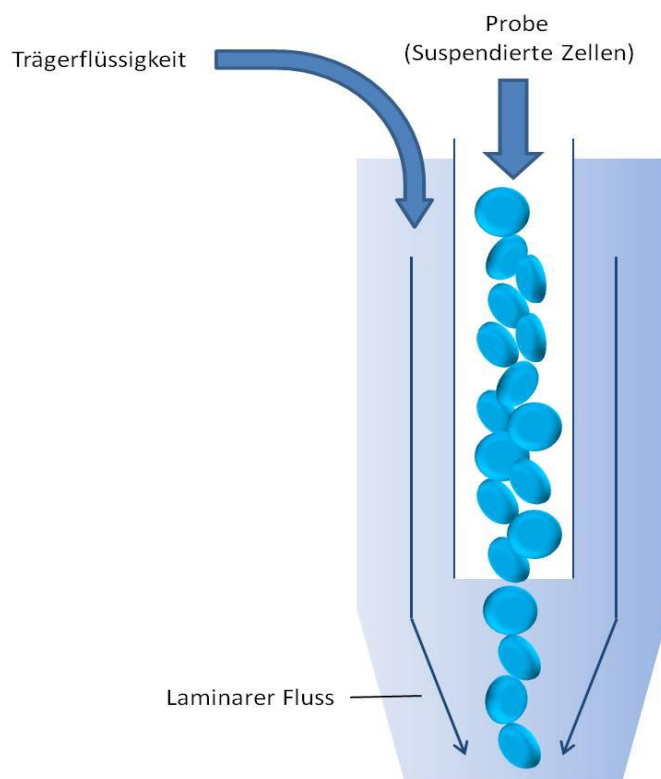


Abb. 2-2 Aufbau eines Durchflusszytometers - Teil 1

Innerhalb des Messsystems entstehen zwei Flüssigkeitsströme: die Probe selbst und ein Mantel- oder Hüllstrom, der durch Zugabe einer partikelfreien Trägerflüssigkeit zustande kommt. Der Druck der zu messenden Probensuspension und des Mantelstroms unterscheiden sich. Der Druck der Probe ist permanent höher als der der Trägerflüssigkeit. Eine Erhöhung der Druckdifferenz zwischen Probenstrom und Mantelstrom beeinflusst den Durchmesser des Probenstroms und somit die Varianz der später gemessenen Werte, da die

Zellen bei der Laserpassage eine höhere Signalvarianz erzeugen, je breiter sie im Mantelstrom verteilt sind. Indem sowohl die laminare Probe als auch der Hüllstrom in ihrem Durchmesser verringert werden, resultiert eine Beschleunigung- auf diese Weise entsteht im Flüssigkeitsstrom eine sogenannte hydrodynamische Fokussierung, welche die Zellen in der Mitte der Kapillare zentriert.

Basierend auf den Prinzipien der laminaren Strömung bleiben die Zellen in der Probensuspension somit getrennt, zentriert- die beiden Flüssigkeitsströme vermischen sich nicht- und in einer Reihe.

Der Abstand der aufeinanderfolgenden Zellen wird in diesem System allmählich vergrößert, womit die Messung der einzelnen Zellen gewährleistet wird, da die Zellen den Laser einzeln passieren können.

Mit Hilfe des Laser- und Detektionssystems kann nun sowohl die relative Größe als auch die relative Granularität bestimmt werden. Diese Parameter korrelieren mit dem Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und dem Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC). FSC, welches entlang der Achse des einfallenden Lichts gemessen wird, ist proportional zur Zelloberfläche, korreliert also mit dem Zellvolumen. SSC, welches durch Lichtbrechung und Reflexion entsteht, ist mit der inneren Komplexität der Partikel assoziiert. Im Gegensatz zum FSC wird das SSC orthogonal zum einfallenden Licht gemessen, ebenso die Fluoreszenzen.

Im Messsystem existieren zwei verschiedene Laser. Der primäre Laser emittiert eine Wellenlänge von 488nm. Beim zweiten Laser handelt es sich um einen roten Diodenlaser, der als sekundärer Laser dient und dessen Wellenlänge auf 635nm festgelegt ist. Das gestreute Licht wird von zwei Detektoren erfasst.

Durch den Laserstrahl werden die an die zu messenden Partikel angebundenen Fluorochrome angeregt. Das Fluorochrom gibt die absorbierte Energie wieder frei, was als Fluoreszenz von den Detektoren registriert wird. Die Fluoreszenzeigenschaften der untersuchten Partikel werden von vier weiteren Detektoren gemessen.

Das Detektionssystem wird komplettiert durch eine Abfolge optischer Komponenten und Filter, um die gemessenen Signale an die entsprechenden Detektoren weiterzuleiten.

2.3.2 Analyse der Zellen

Vor der durchflusszytometrischen Messung der entnommenen Blutproben wurden diese wie oben beschrieben mit Antikörpern angefärbt. Diese Antikörper haben 2 Bindungsstellen, eine für die Oberflächenantigene der anzufärbenden Zellen, die zweite ist mit einem Fluorochrom verbunden.

Die Fluorochrome, die an die Antikörper gebunden sind, sind unter anderem Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phyco-Erythrin (PE), Peridin Chlorophyll (PerCP) oder Allophycocyanine (APC).

Als Zielstrukturen der untersuchten Progenitorzellen wurden spezifische Oberflächenantigene benutzt. Dabei handelte es sich um CD34, CD133, VEGFR2 und CXCR4. Um die Progenitorzellen von anderen Blutzellen unterscheiden zu können wurde CD45 als ISO Marker für Negativkontrollen verwendet.

Mit Hilfe des optischen Systems und dem Detektionssystem können wie bereits erwähnt die einzelnen Emissionen der markierten Zellen gemessen und in digitale Signale übersetzt werden. Auf diese Weise können unterschiedliche Eigenschaften der Zellen eruiert werden, wie zum Beispiel der zellspezifische FSC und SSC oder aber der FSC und die Fluoreszenz, die aufgrund der markierten Antigene emittiert wird (Abb. 2-3).

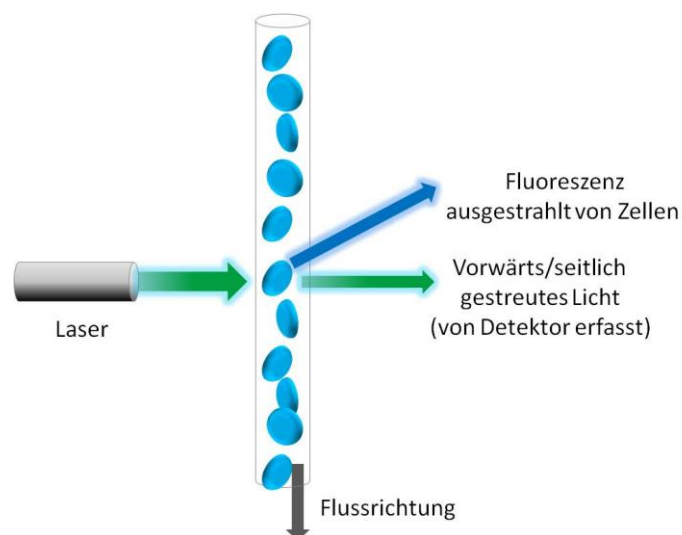


Abb. 2-3 Aufbau eines Durchflusszytometers - Teil 2

Die Wellenlängen, die von den Fluorochromen ausgestrahlt werden, sind festgelegt. Diejenige von FITC liegt bei 519nm, bei PE sind es 578nm, 675nm bei PerCP und 660nm bei APC.

Die verschiedenen Fluorochrome können innerhalb eines Probenansatzes auch kombiniert werden; auf diese Art können die zu untersuchenden Zellen noch präziser charakterisiert werden. Abhängig von der Menge der angedockten Fluorochrom Moleküle variiert die relative Fluoreszenzintensität, wobei die beiden Parameter proportional zueinander sind.

Um die Zellen genauer zu charakterisieren werden die ausgestrahlten Wellenlängen jedes verwendeten Antikörpers sowie die Granularität und die Größe der Zellen ermittelt.

Der FACS Calibur Durchflusszytometer, der für die Studie verwendet wurde, ist in der Lage, neben der Granularität und der Größe der Zellen auch bis zu vier verschiedene Fluoreszenzen zu messen.

Allerdings müssen bei jeder Messung einige Schwierigkeiten und Komplexitäten beachtet werden. Es müssen daher bestimmte Einstellungen vorgenommen werden, bevor die Proben untersucht werden können. Diese Modifikationen betreffen den Detektor, den Schwellwert (Threshold) und die Kompensation.

Die Kalibrierung des Detektors erfolgt mit Hilfe einer Kontrolllösung. Dies hat zum Ziel, den Detektor so einzustellen, dass er das elektronische Signal in idealer Weise verstärkt.

Der nächste Schritt es, den Threshold einzustellen, bei dem es sich um ein Triggersignal handelt. Dieses Triggersignal filtert Störsignale, wie sie beispielsweise von Zelldebris emittiert werden, um diese nicht in die Messung mit einzuschließen.

Wenn Probenansätze mit verschiedenen Fluoreszenzen gemessen werden, tendieren die Emissionen oft zur Überlagerung. Dies rührt daher, dass jeder Fluoreszenz-Farbstoff nicht nur eine Farbe, sondern ein ganzes Farbspektrum emittiert. Daher muss vor der Messung mit mehreren Farbstoffen die Kompensation angepasst werden, bei der es sich um ein Instrument handelt, welches zur rechnerischen Korrektur der spektralen Überlappung in Abhängigkeit von Anzahl und Art der verwendeten Färbungen dient.

2.4 Messung

Ein FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) stand für die zytometrischen Messungen zur Verfügung. TruCOUNT Röhren (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) wurden für die quantitative Analyse verwendet. Die Analyse der Messung am Computer erfolgte mit CellQuest Software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA); eine Mindestanzahl von 100 000 Events wurde im Hinblick auf ihre Fluoreszenzintensität, Größe und Granularität gemessen.

2.5 Auswertung

Mit der CellQuest Software wurden zunächst die Parameter festgelegt, die gemessen wurden und grafisch dargestellt werden sollen. Letzteres kann entweder in einem Dot Plot oder einem Histogramm geschehen.

Innerhalb dieser Histogramme lassen sich Zellpopulationen abgrenzen. Dies geschieht mit Hilfe des sogenannten „Gatings“. Hierbei legt man Bereiche innerhalb der Grafiken fest, die analysiert werden sollen. So können die Zellen, die innerhalb der gesetzten Grenzen liegen, im Hinblick auf weitere Auswertungen von den übrigen Zellen abgegrenzt werden.

Neben der Untersuchung der gewünschten Zelleigenschaften können auch wiederum Gates innerhalb der Gates gesetzt werden, um eine zunehmende Verfeinerung der Abgrenzung von Zellpopulationen unter Betrachtung eines weiteren Parameters vorzunehmen.

Nachdem die gewünschte Zellpopulation nun in einem Gate von den übrigen Zellen abgegrenzt wurde, können statistische Auswertungen mit genau diesen Zellen vorgenommen werden und deren genaue Anzahl bestimmt werden.

2.5.1 Bestimmung der CD133+/CD34+ Vorläuferzellen

Mit Hilfe der CellQuest Software wurden die Daten der Messungen auf die Zelleigenschaften hin untersucht. Die Bestimmung der CD133+/CD34+ Vorläuferzellen im Probenblut erfolgte auf Basis bereits etablierter Protokolle^{162, 165} in Anlehnung an das ISHAGE-Protokoll⁹⁰.

Dementsprechend folgte die Auswertung der Daten dem nachfolgend beschriebenen Schema.

Das Schema nach ISHAGE zielt u.a. darauf ab, die gewünschte Zellpopulation für die weitere Analyse auszuwählen und zugleich die durch Zelldebris und unerwünschten Zellarten, an die die Antikörper gebunden sein können, ausgesandten Störsignale zu minimieren. Für die einzelnen Gating-Schritte wurden jeweils Punktdiagramme verwendet.

Zur Qualitätssicherung wurde eine Negativkontrolle mit Proben durchgeführt, für die in der Probenvorbereitung ausschließlich APC-konjugierter anti-CD45-Antikörper verwendet wurde. Dies zielt auf unspezifische Bindungen des APC-konjugierten anti-CD45-Antikörpers ab.

Mit Hilfe der folgenden Art und Weise des Gatings konnte die absolute Zahl der gemessenen CD133+/CD34+ Zellen bestimmt werden.

Zunächst wurden mittels Gating der Zelldebris und die 7-AAD+, also avitalen Zellen aus der weiteren Auswertung abgetrennt (Abb. 2-4; Gate R1). Dann wurde die Fluoreszenz des APC-konjugierten CD45 gegen SSC Eigenschaften abgetragen. Mit diesen Gatings können also die Leukozyten, die im Zentrum des Interesses stehen, von Erythrozyten, Thrombozyten und Zelldebris unterschieden werden.

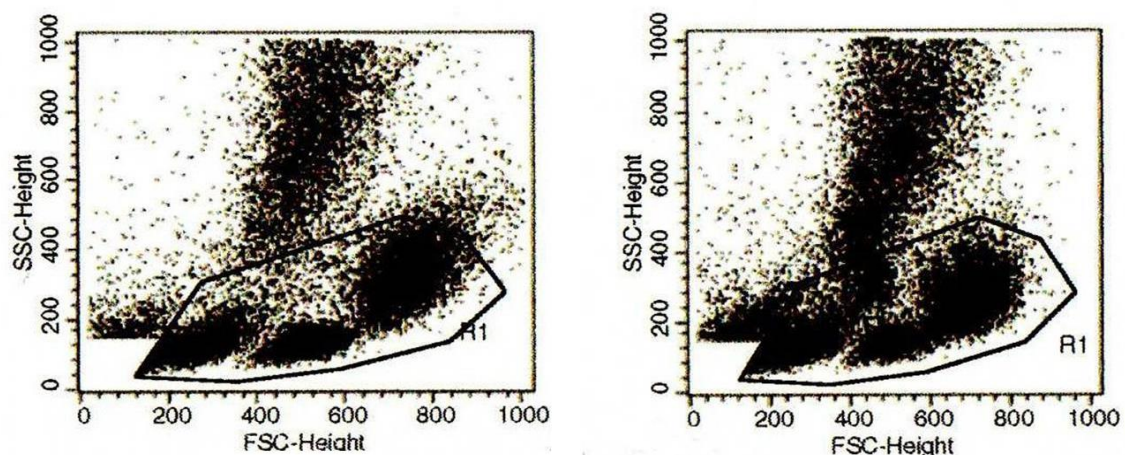


Abb. 2-4

Gate R1 – mononukleäre Zellen. Links (in allen folgenden Punktdiagrammen gleich): Negativkontrolle; rechts (in allen folgenden Punktdiagrammen gleich): Mehrfachfärbung (CD45 APC, CD34 FITC, AC133 PE, 7-AAD)

Das festgelegte Gate R1 abzüglich des Zelldebris-Gates wurde nun im zweiten Schritt weiter untersucht. Die im ersten Gate ausgewählten Zellen wurden nach Ihrer Fluoreszenz des APC-konjugierten anti-CD45-Antikörpers gegen die Fluoreszenz des PE-konjugierten anti-CD133-Antikörpers dargestellt. Es wurden jene Zellen ausgewählt, die eine geringe CD45-Positivität aufwiesen (Abb. 2-5; Gate R4). Um lediglich SSC-kleingranulierte Zellen herauszufiltern wurde ein weiteres Gate angelegt (Abb. 2-5; Gate R16). Die Negativkontrolle bestand wieder aus dem oben beschriebenen „Iso“-Röhrchen.

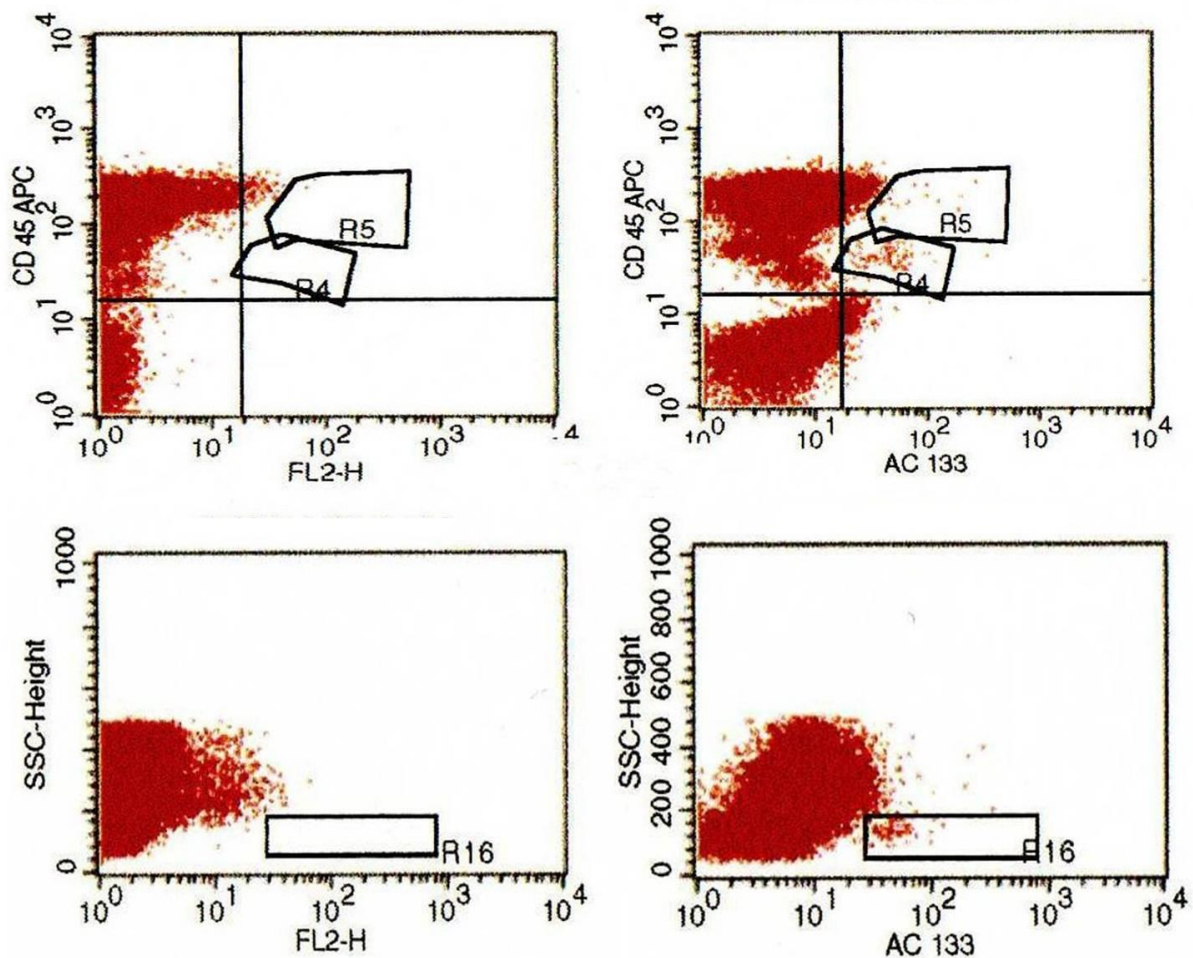


Abb. 2-5

Oben: Gate R4 – CD133-positive Zellen mit geringer CD45-Positivität

Unten: Gate R16 – CD133-positive Zellen mit geringer SSC-Granularität

Im Anschluss wurden die CD133+ Zellen aus R4 und R16 in ein SSC/FSC-Feld übertragen und ein weiteres Gate angelegt, das erneut mit Hilfe der Eigenschaft der Granularität die kleingranulierten CD133+ Zellen enthalten sollte. Abschließend wurden die daraus resultierenden Zellen zur Kontrolle gegen CD34 aufgetragen.

2.5.2 Bestimmung der VEGFR2+/CD34+ zirkulierenden Vorläuferzellen

Nachdem ebenso wie bei der Analyse der CD133+/CD34+ Zellen die avitalen (7-AAD+) Zellen bzw. der Zelldebris durch Gates entfernt wurde, wurden die CD34+ Zellen in einem Gate R10 ausgewählt. Dieses wurde wiederum nach Kleingranularität gegatet. Die resultierenden kleingranulierten Zellen wurden dann in ein Gate nach VEGFR2/CD34-Positivität übertragen und daraus die doppelt positiven Zellen ausgewählt.

2.5.3 Quantitative Analyse

Für die quantitative Analyse, der Bestimmung der CD133+/CD34+ Zellen bzw. der VEGFR2+/CD34+ Zellen pro μl Serum, wurde die Möglichkeit genutzt, über synthetische fluoreszierende Mikrokügelchen (Beads), deren Zahl pro Volumeneinheit bekannt ist und die vom Zytometer parallel registriert werden, relevante immunmarkierte Zellen zu quantifizieren.

Die auf Basis des zuvor erläuterten Protokolls verarbeiteten Proben wurden dazu in TruCOUNT Röhren (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) umpipettiert.

Die Beads lösen sich in der jeweiligen Probe und können so vom Zytometer registriert werden.

Die Beads wurden gemessen und, wie die zu messenden Zellen, in einem Punktdiagramm dargestellt. Dabei wurden die Fluoreszenzen FL1 und FL2 gegeneinander aufgetragen. Aufgrund der sehr ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften der Beads konnten diese einfach in einem Gate zusammengefasst werden und somit deren Anzahl bestimmt werden.

Zur Berechnung der Anzahl der CD133+/CD34+ Zellen pro μl Blut wurde die folgende Formel verwendet. In diese flossen die Anzahl der gemessenen Beads, die Anzahl der zytometrisch

im Vollblut bestimmten CD133+/CD34+ bzw. VEGFR2+/CD34+ Zellen sowie die Anzahl der Beads pro TruCOUNT-Röhrchen, wie sie auf der Packung angegeben war, ein:

$$\text{Zellen}/\mu\text{l Blut} = \frac{\text{i. d. Probe gemessene Zellen} \times \text{„Beads“/TruCOUNT-Röhrchen}}{\text{gemessene „Beads“} \times 50}$$

2.5.4 Bestimmung der CXCR4-Positivität der CD133+ Zellen

Zur Bestimmung der CXCR4-Expression an der Oberfläche der CD133+ Zellen wurden wie bei der Analyse der vorgenannten Zellen in einem ersten Schritt der Zelldebris bzw. avitale 7AAD+ Zellen ausgeschlossen. Im zweiten Schritt wurden die CD133+ Zellen ausgewählt. Diese wurden in einem Histogramm auf ihre Expression an CXCR4 untersucht, welche über die Fluoreszenzintensität des entsprechenden Markers messbar war.

2.6 Immunoassays zur Bestimmung der Zytokine

Um die Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 zu bestimmen wurden im Labor des Neuro-Kopf-Zentrums des Klinikums Rechts der Isar Immunoassays durchgeführt (CBA Human Inflammation Kit, BD Biosciences, San Diego, USA). Die Serumspiegel der Zytokine wurden in Blutproben von Tag 1 und 5 gemessen.

Als Nachweisgrenzen wurden 7,2 pg/mL für IL-1 β , 3,7 pg/mL für TNF- α , 2,5 pg/mL für IL-6, 3,6 pg/mL für IL-8, 3,3 pg/mL für IL-10 und 1,9 pg/mL für IL-12 festgelegt. Die Intraassay-Variabilität der niedrigeren Spanne des Assays lag bei 10%.

2.7 Nachweis der Serummarker NSE und S-100

Die Messung der Serummarker NSE und S-100 erfolgte anhand der eingefrorenen Serumproben der Studienpatienten im Zentrallabor der Klinischen Chemie des Klinikums Rechts der Isar nach dem Wiederauftauen. Für die Messung der Konzentrationen von S-100 und NSE wurden ebenfalls Immunoassays angewandt (Elecsys 2010, Roche, Mannheim). Die Serumspiegel wurden in Proben von Tag 5 gemessen.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit SPSS 19.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

Differenzen zwischen zwei Abnahmen (Tag 1-5, Tag 1-7, Tag 5-7) wurde mittels Wilcoxon Test bestimmt.

Der Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde bei kategorialen Werten mittels T-Test durchgeführt, bei kontinuierlichen Werten mittels Mann-Whitney-U- (Wilcoxon) Test. Korrelationen zwischen den Parametern wurden mittels uni- bzw. multivariater Regression untersucht. Alle Tests wurden zweiseitig ausgeführt. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant erachtet. Soweit nicht anders gekennzeichnet wird der Median gemeinsam mit den 25. und 75. Perzentilen sowie dem Maximum angegeben.

Die Grafiken wurden ebenfalls mit SPSS erstellt. Die Box-and-Whisker-Plots zeigen den jeweiligen Median sowie die 25.-75.-Perzentile (Box). Die Länge der Whisker ist auf maximal das 1,5-Fache des Interquartilsabstands beschränkt. Dabei endet der Whisker bei dem Wert aus den Daten, der noch innerhalb dieser Grenze liegt. Sogenannte Ausreißer und Extremwerte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in den Grafiken ausgeblendet.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

50 Patienten mit klinisch diagnostiziertem zerebralem Infarkt wurden in die Studie eingeschlossen. 12 Patienten davon unterzogen sich einer Thrombolyse.

Das Alter der Patienten erstreckte sich von 31 bis 94 Jahren. Unter den 50 Patienten waren 34 männlich.

Das kardiovaskuläre Risikoprofil der Patienten präsentierte sich wie in Tabelle 3-1 ersichtlich.

Neben den genannten Laborwerten wurden auch das CRP und die Leukozytenzahl am Aufnahmetag bestimmt, sowie, wie oben beschrieben, an eingefrorenen Serumproben von Tag 5 auch NSE.

Patientendaten:	N=50
Alter in Jahren, Spanne (Median)	31-94 (70)
Geschlecht, männlich, Anzahl. (%)	34 (68)
Risikofaktoren, Anzahl (%)	
Hypertonie	36 (72)
Vorhofflimmern	13 (26)
Raucher oder Ex-Raucher	22 (44)
Hypercholesterinämie	18 (36)
Diabetes Typ II	12 (24)
Thrombolyse	12 (24)
Vorbestehende Medikation, Anzahl (%)	
ASS	26 (52)
Statine	12 (24)
Laborwerte, Median [25.-75. Perzentile]	
CRP (mg/dl; innerhalb der ersten 24h)	0,45 [0,2 – 1,5]
Leukozyten ($10^3/\mu\text{l}$; innerhalb der ersten 24h)	8.1 [6,4 – 10,5]
NSE ($\mu\text{g/l}$; an Tag 5)	13.2 [9.3 – 20.5]

Tabelle 3-1 Klinische Daten

3.2 Anzahl der CD133+/CD34+ Progenitorzellen im peripheren Blut

Die Auswirkungen des zerebralen Infarkts auf die zirkulierenden CD133+/CD34+ Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Der Verlauf der Zellzahlen ist in den folgenden Tabellen (Tab. 3-2, Tab. 3-3) dargestellt.

Beim Vergleich der Anzahl der CD133+/CD34+ Progenitorzellen im peripheren Blut an Tag 1 mit denen an Tag 5 wurde ein signifikanter Anstieg der Zellzahlen deutlich ($p=0,001$).

Im Anschluss wurden die Zellzahlen an Tag 1 und Tag 5 mit den Zellzahlen an Tag 7 verglichen. Hier konnten lediglich 43 der Patienten untersucht werden, von den übrigen 7 Patienten war einer verstorben, 6 waren in andere Kliniken verlegt worden. Im Vergleich zu Tag 5 war die Zellzahl an Tag 7 leicht zurückgegangen. Allerdings war die Zahl an Tag 7 nach wie vor erhöht im Vergleich zu Tag 1 ($p=0,11$). Auch bei $N=43$ zeigte sich der deutliche Anstieg der Zellzahlen zwischen Tag 1 und Tag 5 mit $p=0,001$. Abbildung 3-1 zeigt den entsprechenden zeitlichen Verlauf der Zellzahlen mit $N=43$.

CD 133+/CD34+ an Tag 1,5			
N=50			
	Median	[25.-75. Perzentile]	Max.
Tag 1	0,115	0,044 - 0,395	3,89
Tag 5	0,329	0,177 – 0,516	1,69

Tabelle 3-2 Zellzahlen der CD133+/CD34+ Zellen an Tag 1,5

CD 133+/CD34+ an Tag 1,5,7			
N=43			
	Median	[25.-75. Perzentile]	Max.
Tag 1	0,114	0,026 – 0,464	3,89
Tag 5	0,334	0,191 – 0,513	1,69
Tag 7	0,287	0,100 – 0,512	1,56

Tabelle 3-3 Zellzahlen der CD133+/CD34+ Zellen an Tag 1,5,7

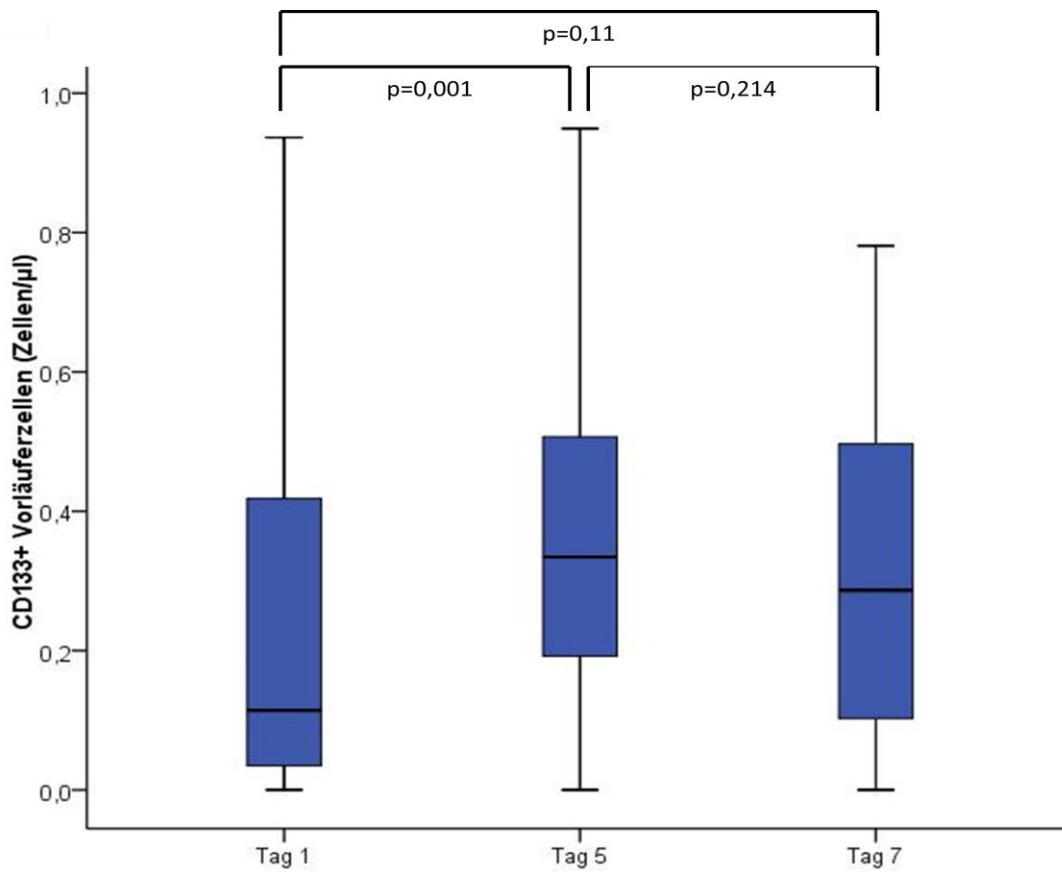


Abbildung 3-1 Verlauf der CD133+/CD34+ Zellen an Tag 1,5,7

3.3 CXCR4 exprimierende Progenitorzellen im zeitlichen Verlauf

Bei der Analyse der CXCR4-Expression zeigt sich eine sinkende Tendenz der CXCR4-Expression der CD133+ Progenitorzellen an Tag 7 im Vergleich zu Tag 1 ($p=0,089$) (vgl. Tab. 3-5). Die Grafik in Abb. 3-2 stellt den Verlauf dar.

CXCR4 Expression an Tag 1,5			
N=50			
	Median	[25.-75. Perzentile]	Max.
Tag 1	29,9	7,7 – 81,4	1018
Tag 5	26,4	10,9 – 59,0	478

Tabelle 3-4 CXCR4 Expression an Tag 1,5

CXCR4 Expression an Tag 1,5,7			
N=43			
	Median	[25.-75. Perzentile]	Max.
Tag 1	29,7	7,9 – 80,6	1018
Tag 5	26,1	9,5 – 56,4	478
Tag 7	24,1	8,4 – 44,0	343

Tabelle 3-5 CXCR4 Expression an Tag 1,5,7

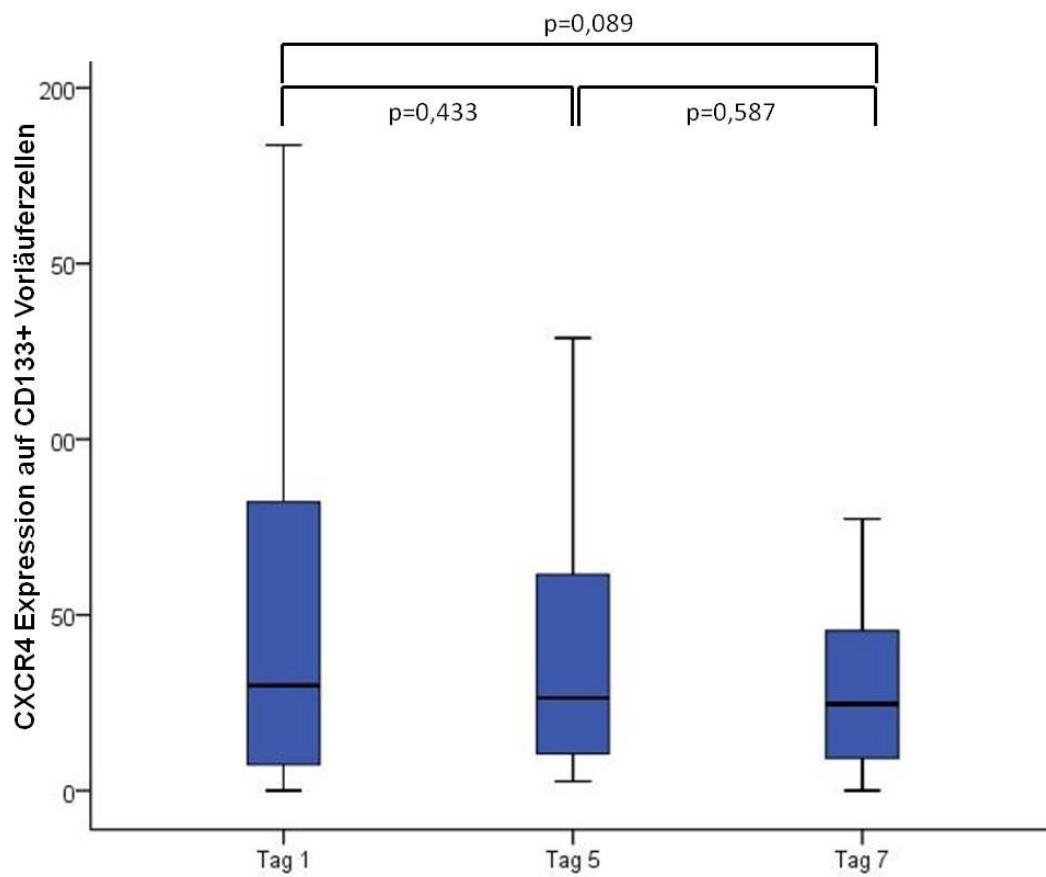


Abb. 3-2 Zeitlicher Verlauf der Expression von CXCR4 auf CD133+ Vorläuferzellen

3.4 Zeitlicher Verlauf der VEGFR2+/CD34+ Zellen

Der Verlauf der VEGFR2+/CD34+ Vorläuferzellen (vgl. Abb. 3-3) zeigt eine steigende Tendenz der VEGFR2-positiven Vorläuferzellen von Tag 1 bis Tag 5 ($p=0,057$).

VEGFR2+/CD34+ Zellen an Tag 1,5			
N=48			
	Median	[25.-75. Perzentile]	Max.
Tag 1	0,03	0– 0,09	7,55
Tag 5	0,05	0,02 – 0,13	3,96

Tabelle 3-6 Verlauf der VEGFR2+/CD34+ an Tag 1,5

VEGFR2+/CD34+ Zellen an Tag 1,5,7			
N=42			
	Median	[25.-75. Perzentile]	Max.
Tag 1	0,03	0 – 0,08	7,55
Tag 5	0,05	0,02 – 0,12	3,96
Tag 7	0,04	0 – 0,13	2,77

Tabelle 3-7 Verlauf der VEGFR2+/CD34+ an Tag 1,5,7

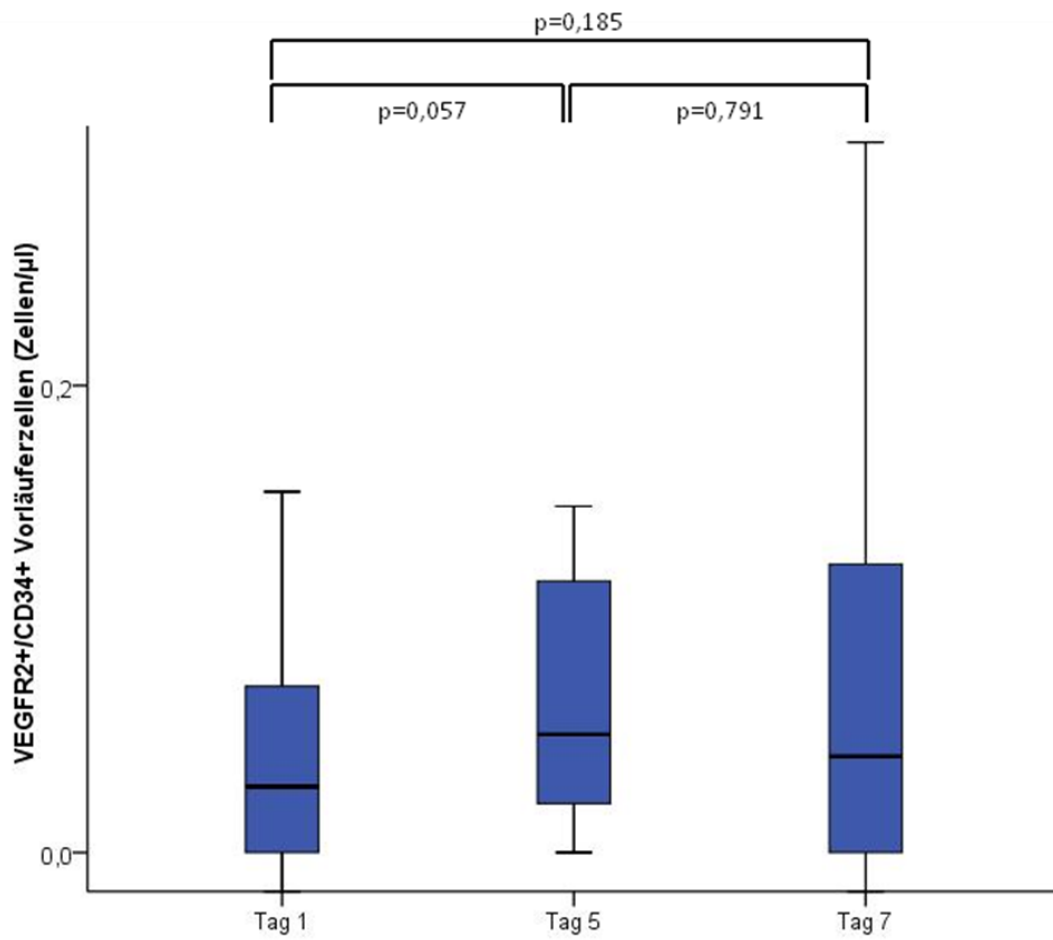


Abb. 3-3 Verlauf der VEGFR2+/CD34+ Vorläuferzellen an Tag 1,5,7

3.5 Zeitlicher Verlauf der Zytokine

Der zeitliche Verlauf der Spiegel der unterschiedlichen Zytokine zeigt einen sehr heterogenen Verlauf. IL-12 sowie IL-1 β zeigen einen statistisch signifikanten Anstieg von Tag 1 bis Tag 5 ($p=0,018$ bzw. $p=0,024$). Die übrigen Verläufe der Zytokine weisen außer eventuellen Tendenzen keine statistisch signifikanten An- oder Abstiege auf (Tabelle 3-8).

Zytokine an Tag 1 und 5 N=47; Einheit pg/mL							
	Tag 1			Tag 5			Signifikanz
	Median	[25.-75. Perzentile]	Max	Median	[25.-75. Perzentile]	Max	p-Wert
IL-1 β	1,3	0 – 1,6	10,3	1,4	1,2 – 1,7	11,9	$p = 0,02$
IL-6	7,9	3,7 – 19,3	621	7,4	3,7 – 13,2	129	$p = 0,06$
IL-8	14,9	7,6 – 22,3	145	13,0	9,0 – 19,3	91	$p = 0,31$
IL-10	2,0	1,6 – 2,5	26,3	1,8	1,5 – 2,4	9,4	$p = 0,32$
IL-12	1,7	0 – 2,2	5,3	1,9	1,3 – 2,3	5,3	$p = 0,02$
TNF- α	2,2	0 – 23,9	3,3	2,9	0 – 31,6	3,2	$p = 0,19$

Tabelle 3-8 Im Serum gemessene Zytokine an Tag 1 und 5

3.6 Spiegel von NSE und S-100

Spiegel von neuronenspezifischer Enolase (NSE) und S-100 wurden an Tag 5 nach dem Infarkt ereignis erhoben. Verglichen mit dem für Erwachsene verwendeten Referenzwert von 15 $\mu\text{g/l}$ befand sich der Median von NSE im oberen Referenzbereich. Der S-100-Wert lag deutlich über dem oberen Referenzwert von 0,15 $\mu\text{g/l}$ (vgl. Tabelle 3-9).

NSE und S-100 an Tag 5, in $\mu\text{g/l}$				
	N	Median	[25.-75.Perzentile]	Max
NSE	45	13,2	9,3 – 20,5	62,3
S-100	34	78,1	60,0 – 151	703

Tabelle 3-9 Serumspiegel von NSE und S-100 an Tag 5

3.7 Korrelationsanalysen

3.7.1 Korrelationen zwischen Zytokinen und dem Anstieg der CD133+ Progenitorzellen

Es wurden Korrelationsanalysen zwischen den Spiegeln der Zytokine IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 an Tag 1 und 5 mit dem relativen Anstieg der Progenitorzellen (von Tag 1 bis Tag 5) durchgeführt.

Hierbei konnten keine Zusammenhänge zwischen dem relativen Anstieg der CD133+ Progenitorzellen einerseits und den oben genannten Zytokinen andererseits festgestellt werden. So ergaben sich bei den durchgeführten Korrelationsanalysen nach der Korrektur für multiples Testen allenfalls schwache, nicht signifikante Korrelationen von $|r| < 0,35$ (s. Tab. 3-10).

Korrelationen der Zytokine an Tag 1 und 5 mit dem relativen Anstieg der CD133+/CD34+ Zellen N=47; Korrelationskoeffizient r, Signifikanz p			
		r	p-Wert
IL-12	Tag 1	-0,155	0,31
	Tag 5	-0,015	0,93
TNF- α	Tag 1	-0,086	0,57
	Tag 5	0,032	0,84
IL-10	Tag 1	0,273	0,07
	Tag 5	0,052	0,74
IL-6	Tag 1	0,336	0,02
	Tag 5	0,341	0,03
IL-1 β	Tag 1	-0,023	0,88
	Tag 5	0,162	0,31
IL-8	Tag 1	0,319	0,03
	Tag 5	0,123	0,44

Tabelle 3-10 Korrelationen der Zytokine mit dem relativen Anstieg der CD133+/CD34+ Zellen an Tag 1,5

3.7.2 Korrelation zwischen S-100 bzw. NSE und den Vorläuferzellen

Bei der Korrelationsanalyse von S-100, welches am 5. Tag bestimmt wurde, mit den Verlauf der Vorläuferzellen sowie den Zytokinen ergab sich keine relevante Korrelation. Eine Korrelation von NSE an Tag 5 und dem Anstieg der Vorläuferzellen oder der Zytokine konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

3.7.3 Korrelation von Statineinnahme und Anstieg der Progenitorzellen

Wie in Kapitel 1.4 erwähnt ergaben verschiedene Studien einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Statinen und der Mobilisation von Progenitorzellen^{9, 42, 115}. Auf Basis dieser Studien wurden in der vorliegenden Arbeit die Patienten hinsichtlich einer vorbestehenden Statintherapie evaluiert. 12 Patienten standen bereits vor ihrem Infarkt ereignis unter Statintherapie, die übrigen 38 Patienten hatten zuvor keine Statine erhalten.

Korreliert man die Statintherapie mit dem relativen Anstieg der CD133+/CD34+ Progenitorzellen, so zeigt sich, dass der Gebrauch von Statinen eine Korrelation mit dem relativen Anstieg der Progenitorzellen von Tag 1 bis Tag 5 aufweist ($p=0,003$). Bezüglich der Daten siehe Tabelle 3-11. In Abb. 3-4 ist dieser Zusammenhang veranschaulicht.

Korrelation vorbestehende Statintherapie mit relativem Anstieg der Progenitorzellen Tag 1 – Tag 5	Gruppe 1 (mit Statinen) N=12	Gruppe 2 (ohne Statine) N=38
Median [25. – 75. Perzentile] Max.	1,81 [1,57 – 7,65] 26,6	0,26 [-0,23 – 2,81] 5,84

Tabelle 3-11 Korrelation der Statintherapie mit dem relativen Anstieg der CD133+/CD34+ Progenitorzellen

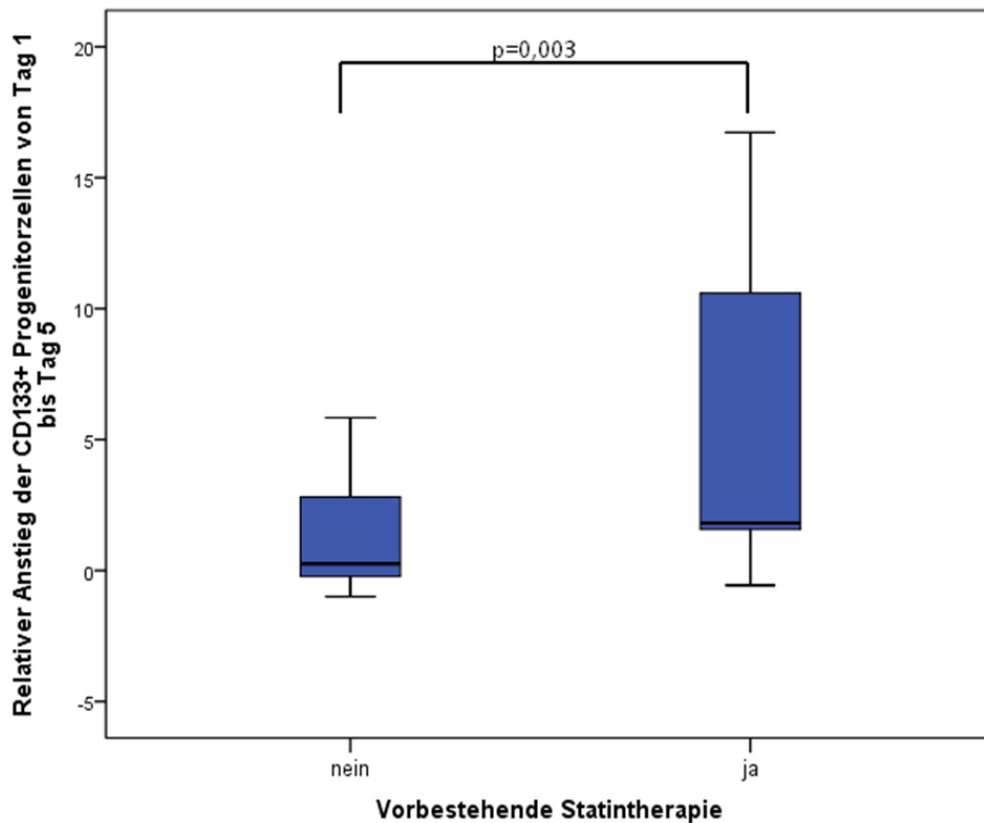


Abb. 3-4 Korrelation der vorbestehenden Statineinnahme mit dem relativen Anstieg der CD133+/CD34+ Progenitorzellen von Tag 1 bis Tag 5

3.8 Multivariate Korrelation

Um zu analysieren, ob eine Statintherapie ein unabhängiger Prädiktor für den Anstieg der CD133+/CD34+ Progenitorzellen ist, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt. Diese umfasste neben der Statintherapie die folgenden Parameter: die Spiegel von IL-6 sowie von CRP an Tag 1 als Marker für die initiale Entzündungsreaktion, den NSE-Spiegel an Tag 5 als Surrogatmarker des Infarktolumens und die Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren.

Auch die multivariate Analyse zeigte eine signifikante Korrelation zwischen Statineinnahme und dem relativen Anstieg der CD133+/CD34+ Progenitorzellen (p [Mean Difference] \pm Standardfehler = 0,008 [5,1] \pm 1,8)

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass CD133+/CD34+ Vorläuferzellen nach einem zerebralen Infarktereignis ins periphere Blut mobilisiert werden. Bei Messungen an Tag 1, 5 und 7 nach dem Infarktereignis zeigte sich das Maximum an Tag 5, an Tag 7 zeigte sich bereits wieder ein leichter Abfall der Werte verglichen mit Tag 5. Somit ist anzunehmen, dass die Mobilisation in der Zeit zwischen dem 1. und dem 6. Tag ein Maximum erreicht. Korrelationen der Mobilisation mit den untersuchten Gewebsmediatoren konnten nicht nachgewiesen werden. Jedoch besteht eine statistisch signifikante Korrelation des Anstiegs der Progenitorzellen mit der Einnahme von Statinen vor dem Infarktereignis. Im Folgenden werden die Methoden sowie die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert.

4.1 Fragen der Methodik

4.1.1 Herkunft und Definition der Vorläuferzellen

Progenitorzellen, die Vorläuferzellen von somatischen Zellen, sind Abkömmlinge multipotenter adulter Stammzellen. Die Ausreifung der Progenitorzellen erfolgt unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren. Sie werden entsprechend ihres Differenzierungsgrades in Richtung einer bestimmten ausgereiften Zellart oder ihrer Lokalisation in peripheren Organen eingeteilt. So gibt es z.B. hämatopoietische Progenitorzellen und mesenchymale Progenitorzellen wie die von glatten Myozyten, Kardiomyozyten oder Hepatozyten.

Asahara isolierte 1997 Zellen, die bei einem Infarktereignis- in seiner Studie bei einer Extremitätenischämie- in das geschädigte Gewebe einwandern und hier zu Neoangiogenese und Reendothelialisierung beitragen⁷. Daraufhin wurde postuliert, dass diese Zellen zu einem endogenen Reparaturmechanismus beitragen. Es lag daher nahe, weitere Infarktereignisse auf das Auftreten dieser Zellen zu untersuchen. So folgten Studien im Hinblick auf die Rolle der endothelialen Progenitorzellen beim Myokardinfarkt und schließlich auch beim Schlaganfall^{5, 174, 234}. Die Unterscheidung der verschiedenen Progenitorzelltypen erfolgt über bestimmte Oberflächenmarker.

Asahara nannte CD34 als den relevanten Oberflächenmarker⁷. Die vorliegende Studie verwendet neben CD34 jedoch auch weitere Oberflächenmarker. Dies hat den Grund, dass CD34 von verschiedenen Zelllinien exprimiert wird, was folglich zu Verwechslungen und Überschneidungen bei dem Versuch führen kann, die Progenitorzellen zu identifizieren²⁰⁶. So tragen nicht nur die zirkulierenden Progenitorzellen, die aus dem Knochenmark mobilisiert wurden, sondern auch ausdifferenzierte Endothelzellen, die von Gefäßwänden abstammen, das Oberflächenantigen CD34¹³⁴. Würde folglich die Identifikation über CD34 erfolgen, könnten gerade bei Infarktereignissen im Körper, wo auch das Endothel der Gefäße in der betroffenen Region Schaden nimmt, Verwechslungen der beiden Zellarten auftreten.

Die vorliegende Studie verwendete CD133 als weiteren, und letztendlich ausschlaggebenden Marker. Bei CD133 handelt es sich um ein Oberflächenantigen von frühen endothelialen Progenitorzellen, welches mit zunehmender Differenzierung der Zellen zunehmend weniger an deren Zelloberfläche exprimiert wird⁵⁴. Somit können frühe Formen der endothelialen Progenitorzellen durch CD133 identifiziert werden¹⁴⁴, die die Fähigkeit haben, zu Endothelzellen auszureifen, sich jedoch von ausgereiften Zellen, die dem Gefäßendothel abstammen, unterscheiden. Da bereits gute Ergebnisse mit CD133 erzielt wurden und die Ergebnisse verschiedener Studien dafür sprachen, dass damit eine suffiziente Identifizierung der gesuchten Zellen erfolgen kann^{25, 119, 162}, wurden für die vorliegende Studie diejenigen Zellen untersucht, die sich als positiv für CD133 erwiesen.

4.1.2 Methodik der Detektion von Vorläuferzellen

Im Hinblick auf die verwendete Methodik der Identifizierung der gesuchten Zellen gibt es ebenfalls unterschiedliche Auffassungen²²⁸. In der vorliegenden Studie wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Dabei handelt es sich um eine Methode, in der Zellen in einem Flusssystem gezählt werden, nachdem sie mit verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern angefärbt wurden und in eine Suspension überführt wurden. Andere Studien bevorzugen es, mononukleäre Zellen aus dem Blut zu isolieren und daraufhin in vitro zu kultivieren^{82, 177, 205}. Dabei wurden in der Zellkultur diejenigen Zellen als Progenitorzellen betrachtet, die sich als adhärent erwiesen und die sowohl positiv auf die Bindung von Lectin als auch auf die Aufnahme von 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin gelabeltes azetyliertes LDL (DiLDL) getestet wurden. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass es

sich bei den in der Kultur angezüchteten Zellen eigentlich um Zellen der Monozyten bzw. Makrophagenreihe handelt¹⁵³. Aus diesem Grund wählte die vorliegende Studie die häufig verwendete Methode der Identifizierung der Progenitorzellen mittels Durchflusszytometrie.

4.2 Zirkulierende Vorläuferzellen beim zerebralen Infarkt- ihre Rolle und der zeitliche Verlauf der Mobilisation

Verschiedene Studien konnten belegen, dass im Falle eines Verschlusses bzw. einer Verlegung einer zerebralen Arterie infolge des Zelluntergangs von zerebralem Gewebe- Neuronen und Gliazellen- physiologische Reparaturmechanismen in Gang gesetzt werden^{194, 230}. Einige dieser Studien beschreiben die Wanderung von Neuroblasten, also Zellen, die zur Regeneration des geschädigten Hirngewebes beitragen können, in die geschädigten Hirnareale¹³⁷. Jedoch betonen diese Studien, dass auch die Vaskularisation der Areale eine entscheidende Rolle bei der Regeneration spielt^{92, 194}.

Die neu entstehenden Kapillaren erleichtern die Einwanderung von z.B. Makrophagen in das geschädigte Gewebe, was zu einer schnelleren Elimination des Zelldebris in den nekrotischen Arealen führt und somit wiederum zur Regeneration des geschädigten, aber nicht nekrotischen Gewebes, wie der Penumbra, beiträgt²³⁰. Eine weitere Erkenntnis in Bezug auf die Neovaskularisation ist, dass die oben erwähnten Neuroblasten entlang der neu entstandenen Gefäße in die geschädigten Areale wandern und sowohl in ihrem Überleben als auch in ihrer weiteren Differenzierung von den Gefäßen abhängig sind^{6, 194, 222}. Somit kommt der Aussprossung neuer Gefäße- der Neovaskularisation an sich- eine bedeutende Rolle in der Regeneration von ischämischem Hirngewebe zu. Das Faktum, dass in ischämischen Hirnarealen eine verstärkte Neovaskularisation stattfindet, konnte bereits früh nachgewiesen werden^{99, 235}. Weitere Studien hatten u.a. das Ziel, die Mechanismen, die diesen Vorgängen zugrunde liegen, zu verstehen. Ebenso sollten die fördernden bzw. hemmenden Faktoren dieser Vorgänge identifiziert werden^{21, 142, 152}.

In der vorliegenden Studie wurden die CD133+ endothelialen Progenitorzellen untersucht. Diesen wird bei den oben beschriebenen Vorgängen eine zentrale Rolle zugeschrieben. Asahara et al. hatten die Hypothese aufgestellt, dass eine Zelllinie existiert, die zu Reendothelialisierung und Neovaskularisation führt. Grund für diese Annahme war, dass sie

die besagten Zellen in den Bereichen ischämischer Extremitäten bei Mäusen gefunden hatten⁷. In darauf folgenden Studien konnte der direkte Zusammenhang zwischen der vaskulären Regeneration ischämischer Areale und der Einwanderung endothelialer Progenitorzellen nachgewiesen werden¹⁷⁴. Insbesondere im Zusammenhang mit zerebraler Ischämie fand man die Zellen im Mausversuch in den Arealen verstärkter Neovaskularisation²³⁴. Als Ursprung der endothelialen Progenitorzellen wird das Knochenmark vermutet, wobei nach dem ischämischen Ereignis eine Mobilisation der dortigen Pools ins periphere Blut postuliert wird^{151, 182}.

4.2.1 Zeitlicher Verlauf der Mobilisation der CD133+ Vorläuferzellen

Nachdem Asahara 1997 die Mobilisation der Vorläuferzellen in Extremitätenischämien an Ratten nachweisen konnte⁷, woraufhin Untersuchungen bei Myokardinfarkt und bei zerebralem Infarkt folgten^{70, 118, 174, 216}, stellte sich die Frage nach dem genauen Mechanismus und Ablauf der Mobilisation.

In der vorliegenden Studie konnte an Infarktpatienten die Mobilisation von Progenitorzellen nach einem zerebralen Infarkt ins periphere Blut nachgewiesen werden. Dabei wurde insbesondere der zeitliche Verlauf dieser Mobilisation untersucht. Dies ermöglicht, eine detailliertere Verbindung mit Umgebungsfaktoren herzustellen und so ein besseres Verständnis der Abläufe der Mobilisation zu erlangen. Neben dem erwarteten Anstieg der Vorläuferzellen vom Zeitpunkt des ischämischen Ereignisses bis Tag 7, wie ihn andere Studien zuvor nachweisen konnte^{70, 118, 201}, untersuchte die vorliegende Studie den Verlauf auch zu weiteren Zeitpunkten. Die gesetzten Zeitpunkte lagen bei Tag 1, also am Tag des Infarkts, sowie nach 5 und nach 7 Tagen. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, da aus anderen Studien, u.a. mit Myokardinfarktpatienten die Hypothese abgeleitet werden konnte, dass sich der zeitliche Verlauf gut mit Probenentnahmen binnen 24 Stunden, sowie nach fünf und nach sieben Tagen nach dem Infarkt ereignis verfolgen ließe^{142, 162, 185}. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass G-CSF als ein die Mobilisation der Progenitorzellen beeinflussender Faktor frühestens an Tag drei nach einem Infarkt ereignis eine vermehrte Mobilisation induziert, mit einem Peak an Tag 5²³⁸.

Von Tag 1 bis Tag 7 konnte ein Anstieg der Zellzahlen nachgewiesen werden, dieser erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant ($p=0,11$). Die höchsten Zellzahlen fanden sich bereits etwas früher, an Tag 5. Der Anstieg der Zellzahlen von Tag 1 bis Tag 5 erwies sich als hochsignifikant ($p=0,001$). Dies lässt vermuten, dass die Prozesse, die zur Mobilisation der Vorläuferzellen führen, binnen der ersten Tage nach dem Ereignis stattfinden.

Der hier zu erkennende zeitliche Verlauf entspricht den Ergebnissen, die sich auch bei Myokardischämien fanden^{174, 185}. Jedoch gibt es auch Gegenstimmen- so konnten Hochsmann et al. in ihrer Studie mit Schlaganfallpatienten eine solche verstärkte Mobilisation nicht nachweisen⁷⁶. Für die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise verschiedene Faktoren verantwortlich. In erster Linie sind sicherlich die Zeitpunkte der Blutentnahme von entscheidender Bedeutung. Die von Hochsmann et al. gesetzten Zeitpunkte liegen bei 0, 12, 24, 72 und 168 h. Neben der ersten Entnahme am Tag des Ereignisses liegen also nur Daten zu den Zeitpunkten nach 3 Tagen sowie nach 7 Tagen vor. In der vorliegenden Studie konnte ein signifikanter Anstieg von Tag 1 zu Tag 5 festgestellt werden. Dieser Zeitraum wird von Hochsmann et al. nicht erfasst. Am 7 Tag konnte auch in der vorliegenden Studie kein signifikanter Anstieg im Vergleich zum ersten Tag nachgewiesen werden, wie bei Hochsmann. Der Zeitpunkt an Tag 3 ist möglicherweise zu früh gewählt, so dass Hochsmann hier noch keinen signifikanten Anstieg nachweisen konnte.

Ein weiterer Faktor für die unterschiedlichen Resultate könnte sein, dass Hochsmann lediglich CD34+ Zellen untersuchte. In der vorliegenden Studie ist jedoch CD133 der relevante Marker, was bedeutet, dass Hochsmann eventuell eine andere Zellpopulation untersucht haben könnte. Weitere Ursachen könnten natürlich auch in einer andersartigen Studienpopulation und einer insgesamt kleineren Population (28 Patienten bei Hochsmann vs. 50 in der vorliegenden Studie) liegen.

Nichtsdestotrotz stützen die diversen Berichte über nachgewiesene Anstiege der Progenitorzellspiegel nach ischämischen Ereignissen die Hypothese eines zugrunde liegenden Mechanismus des Organismus zur Regeneration und Reparatur. Die oft übereinstimmenden Ergebnisse der Studien lassen zudem vermuten, dass all den humoralen bzw. zellulären Reaktionen auf die untersuchten Ischämieformen ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt^{7, 103, 142, 174, 216}.

4.2.2 Verläufe von CXCR4 sowie VEGFR2 exprimierenden Vorläuferzellen

In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Anstiege im Verlauf der VEGFR2 exprimierenden Progenitorzellen bzw. der Expression von CXCR4 nachgewiesen werden. Stattdessen zeigte sich bei der CXCR4-Expression sogar eine sinkende Tendenz, was zunächst unerwartet erscheint. Worauf könnte das unerwartete Ergebnis basieren?

Gill stellte 2001 fest, dass vaskuläre Traumata zur Mobilisation VEGFR2+ Zellen führen⁵⁷, was auch vermuten lässt, dass die durch die Ischämie verursachten Schädigungen der Gefäßwände zu einer solchen Mobilisation führen. Gill verwendete jedoch die Kombination aus VEGFR2 und CD133 als Marker. VEGFR2 stellt einen Oberflächenmarker reifer Endothelzellen dar. Somit exprimieren mutmaßlich erst stärker differenzierte Zellen VEGFR2^{63, 236}. Nun findet man in der vorliegenden Studie den Peak der Mobilisation von weniger differenzierten CD133+ Zellen um den 5. Tag nach dem Infarktereignis. Eine mögliche Erklärung für den nicht vorhandenen Anstieg der VEGFR2 exprimierenden Vorläuferzellen ist daher die, dass der zerebrale Infarkt zur Ausschüttung von unreiferen Stufen von endothelialen Vorläuferzellen führt und der Reifungsprozess in dem in der Studie gewählten Beobachtungszeitraum von 7 Tagen die Stufe der VEGFR2-Expression nicht erfasst. Verglichen mit der Studie von Gill fällt auch die anders gewählte Kombination der Oberflächenmarker auf- in der vorliegenden Studie VEGFR2+/CD34+, bei Gill et al. CD133+/VEGFR2. Schließlich konnte in der vorliegenden Studie auch ein Anstieg von CD133+ Zellen nachgewiesen werden, was mutmaßen lässt, dass der ausschlaggebende Marker für den nachgewiesenen Anstieg bei Gill CD133 war.

Die Ergebnisse stimmen mit einer weiteren Studie überein. So konnte auch Grundmann keine statistisch signifikante Veränderung der VEGFR2+/CD34+ Zellfraktion in der CD34+ Zellpopulation nach einem myokardialen Infarktereignis nachweisen⁶³.

Betrachtet man zudem die Werte der VEGFR2-Zellen in der vorliegenden Studie, so lassen die sehr geringen Werte auch an mögliche Messungenauigkeiten als Erklärung denken.

CXCR4 wird als wesentlich für das Homing der zirkulierenden Progenitorzellen betrachtet und wird auf stärker differenzierten zirkulierenden Progenitorzellen exprimiert¹³². In seiner Eigenschaft als Ligand für SDF-1 wird CXCR4 von den exprimierenden Zellen nach Bindung des Liganden internalisiert¹⁹⁷. Dies könnte bei erhöhter Expression von SDF-1 im Zuge eines

ischämischen Ereignisses^{27, 40, 75} eine verminderte bzw. im Verlauf sogar regrediente Oberflächenexpression trotz Hochregulation des Rezeptors, worauf eine erhöhte CXCR4 mRNA Expression hinweist³⁷, erklären.

Alternativ ließe sich der in der vorliegenden Studie erkennbare tendenzielle Abfall der CXCR4 Expression von Tag 1 bis 7 durch einen erhöhten Verbrauch der stärker CXCR4 exprimierenden Progenitorzellen erklären. CXCR4 ist zusammen mit SDF-1 ein wichtiger Faktor für das Homing der Progenitorzellen, so dass die CXCR4 exprimierenden Zellen nach dem ischämischen Ereignis in das ischämische Areal rekrutiert werden²²⁶. Möglicherweise werden die stärker CXCR4 exprimierenden Progenitorzellen also früh- im Falle der vorliegenden Studie innerhalb der ersten 7 Tage nach dem Infarkt- in das ischämische Gewebe rekrutiert und finden sich somit nicht mehr im peripheren Blut.

4.3 Der Zusammenhang zwischen Zytokinen, NSE und S-100 und der Mobilisation der Vorläuferzellen

Um die Prozesse, die zur Mobilisation der Progenitorzellen führen, besser zu verstehen, untersuchte die vorliegende Studie auch die Spiegel verschiedener humoraler Faktoren zu den genannten Zeitpunkten am Tag der Infarktereignisses, bzw. nach 5 und/oder nach 7 Tagen. Die Annahme besteht, dass bestimmte humorale Faktoren wie IL-8 die Mobilisation von Progenitorzellen stimulieren, was bedeuten würde, dass erhöhte Zahlen von Progenitorzellen positiv mit erhöhten Spiegeln der humoralen Faktoren korreliert sind. Umgekehrt wird den Vorläuferzellen ein parakriner Effekt zugeschrieben, indem sie wiederum Zytokine wie IL-8 oder VEGF freisetzen^{98, 229}, die sich positiv auf die postischämischen Vorgänge auswirken können. Folglich ergibt sich hier eine gegenseitige Verstärkung.

Die physiologischerweise nach einem Infarktereignis stattfindende Entzündungsreaktion scheint positive Effekte auf die Regeneration nach Infarktereignissen zu haben. Diese Annahme resultiert aus einer klinischen Studie, die Roberts et al. 1976 an Myokardinfarktpatienten durchführten¹⁵⁴. Zur Hemmung der Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt wurden die Patienten mit Methylprednisolon behandelt- mit katastrophalen Konsequenzen in Form einer Steigerung der Infarktgröße und gehäuften Komplikationen.

Daraufhin wurde das Phänomen in weiteren Studien näher untersucht und konnte bestätigt werden^{48, 53}.

Interleukin 8 (IL-8) stellt einen zentralen Faktor in Entzündungsreaktionen dar. Bereits 2001 konnte gezeigt werden, dass IL-8 zur Mobilisation von Stammzellen beiträgt¹⁷⁴. Durch Schömig et al. konnte 2006 bei Myokardinfarktpatienten eine Korrelation zwischen den Serumspiegeln von IL-8 und der Plasmakonzentration der CD133+ Vorläuferzellen nachgewiesen werden¹⁶². Dies könnte also bedeuten, dass die Mobilisation der Progenitorzellen im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion auch nach einer zerebralen Ischämie durchaus positiv zur Genesung bzw. Regeneration der geschädigten Areale beiträgt.

Diesen Zusammenhängen wurde auch in der vorliegenden Studie nachgegangen, da Interleukine bekanntermaßen auf die Regulation von inflammatorischen Prozessen wirken. Es ist anzunehmen, dass eine spezifische Kombination von Mediatoren, zu denen auch IL-8 gehört, die Differenzierung und Mobilisation von Progenitorzellen ins periphere Blut beeinflusst. Diese Annahme beruht auf den Ergebnissen vorheriger Studien. So konnte nachgewiesen werden, dass IL-8 über einen Mechanismus, der auch MMP-9 einbezieht, zur Mobilisation von Stammzellen beiträgt¹⁵⁰. Im Myokardinfarkt wurden außerdem erhöhte IL-8 Spiegel festgestellt und eine positive Korrelation zwischen CD133+ Progenitorzellen und IL-8 konnte festgestellt werden^{100, 162}. Da auch in der vorliegenden Studie von Mechanismen wie denen im Myokardinfarkt auszugehen ist und dieselbe Zellpopulation, nämlich CD133+ Progenitorzellen, untersucht wurden, wurden auch hier Korrelationen erwartet. Es zeigte sich jedoch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der Progenitorzellen bzw. dem relativen oder absoluten Anstieg der Progenitorzellen und den Serumspiegeln der Zytokine. Das vorliegende Ergebnis ist möglicherweise auf die Variabilität der Reaktionen bzw. Interaktionen zwischen Zytokinen und Progenitorzellen zurückzuführen.

Die Interaktionen zwischen den Progenitorzellen und deren beeinflussenden Faktoren sind komplex, da sie verschiedene Mechanismen beinhalten, die noch nicht vollkommen verstanden sind. Aufgrund der Ergebnisse vieler anderer Studien zu den Hintergründen der Progenitorzellmobilisation ist anzunehmen, dass im Zuge der Vorgänge der Mobilisation und Differenzierung der Progenitorzellen noch weitere Faktoren eine Rolle spielen, wie

Erythropoietin, stromal derived cell factor-1 (SDF-1), stem cell factor (SCF) oder platelet derived growth factor (PDGF), um nur einige Beispiele anzuführen¹⁷⁸.

Das Thema der Progenitorzellen ist nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Regelmäßig werden neue Einflussfaktoren, Signalpfade, Rezeptoren und Interaktionen aufgedeckt, die den zugrunde liegenden komplexen Prozess weiter beleuchten. Somit ist die Frage der Beeinflussung der Mobilisation, des Homings und der endgültigen Bestimmung der Zellen noch nicht abschließend geklärt. Es gilt, in weiteren Studien die Progenitorzellen und deren Umfeld weiter zu untersuchen, um sich ein besseres Bild der vielschichtigen Vorgänge machen zu können.

Für NSE und S-100 konnte in Studien eine Korrelation mit dem Infarktvolumen bei zerebralem Infarkt nachgewiesen werden^{124, 146}. Da gezeigt werden konnte, dass beide Marker gut mit dem Infarktvolumen korrelieren^{39, 124} wurden sie in der vorliegenden Studie als Surrogatmarker für das Infarktvolumen verwendet, wobei eine Korrelation mit der Mobilisation der Vorläuferzellen denkbar wäre. Jedoch konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen NSE bzw. S-100 und der Anzahl oder dem Anstieg der Progenitorzellen nachgewiesen werden. Dies mag wie bei den Zytokinen am Abnahmezeitpunkt der Marker liegen. Sowohl NSE als auch S-100 wurden am 5. Tag nach dem Infarktereignis bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt war zu erwarten, dass der Infarkt seine endgültige Größe erreicht hatte. Da jedoch insbesondere S-100 eine relativ kurze Halbwertszeit besitzt¹⁹⁸, könnte dessen relevanter Anstieg zu einem Zeitpunkt stattgefunden haben, der durch den gewählten Untersuchungszeitpunkt an Tag 5 nicht erfasst wurde.

Eine weitere Erklärung für den negativen Ausfall der vorliegenden Korrelationsanalysen stellt möglicherweise auch die geringe Probengröße dar, die in dieser Studie verwendet wurde. So würden sich Signifikanzen erst bei einer größeren Zahl von Probanden zeigen.

4.4 Der Einfluss von Statinen auf die Mobilisation der Vorläuferzellen

In der vorliegenden Studie wurden die Daten erhoben, ob die Patienten vor Klinikeinweisung aufgrund des Infarkts bereits unter Statintherapie standen, um ggf. positive Effekte der Statineinnahme auf die Mobilisation von Progenitorzellen beim zerebralen Infarkt nachzuweisen. Dem liegt zugrunde, dass in zahlreichen Studien seit den Neunzigerjahren

Zusammenhänge zwischen der Einnahme von HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren, den so genannten Statinen, und deren Einfluss auf Infarktereignisse untersucht wurden. Bei den Statinen handelt es sich zwar um Cholesterinsenker, jedoch konnten verschiedene Studien einen positiven Effekt auf das Auftreten und die Folgen von Infarktereignissen nachweisen. Blauw kam 1997 in einer Meta-Analyse zu dem Ergebnis, dass eine Behandlung mit Statinen das Risiko einer zerebralen Ischämie um rund 30% verringert¹⁸, und somit einen präventiven Effekt hat. Dieser lässt sich u.a. mit der Plaque-Stabilisierung erklären, die ebenfalls eine Folge der Statineinnahme darstellt, wie Bustos 1998 herausfand²³.

Im Zuge der Erforschung der Progenitorzellen im Rahmen von Infarktereignissen stellte sich bald auch die Frage nach einer Verbindung zwischen Progenitorzellen und Statinen. Hier kam Assmus zum dem Ergebnis, dass die Einnahme von Statinen sowohl die Alterung von CD34+ endothelialen Progenitorzellen hemmt als auch deren Proliferation positiv beeinflusst⁹. Speziell im Zusammenhang von zerebralen Infarkten und Statineinnahme konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere eine dem Infarktereignis vorausgegangene Einnahme von Statinen das Outcome bei Schlaganfallpatienten signifikant verbessert¹²⁶.

Hinsichtlich der Effekte der Statintherapie auf die Progenitorzellen machte Vasa 2001 den Vorstoß, bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit nachzuweisen, dass die Einnahme von Statinen neben der bis dahin bekannten Mechanismen auch über die Erhöhung der Level der zirkulierenden Progenitorzellen über einen Mechanismus verfügt, der für Patienten mit koronarer Herzkrankheit von Nutzen ist. In einer darauf folgenden Studie konnte auch der molekulare Mechanismus untersucht werden, der auf einer statinbedingten Induktion der Differenzierung der Progenitorzellen über den PI 3-Kinase/Akt Signalweg beruht⁴².

Tatsächlich konnte die vorliegende Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Mobilisation der Progenitorzellen nach zerebralem Infarkt und einer Statintherapie vor dem Infarktereignis nachweisen. Somit kann der Rückschluss gezogen werden, dass beim zerebralen Infarkt, ähnlich wie beim Myokardinfarkt, Statine die Differenzierung bzw. Mobilisation von Progenitorzellen ins periphere Blut fördern und somit einen Beitrag zu den Reparaturmechanismen des Organismus nach dem Infarktereignis leisten.

4.5 Bedeutung der Progenitorzellen für das Krankheitsbild des zerebralen Infarkts

Was aber bedeutet nun die Erforschung der Progenitorzellen im Hinblick auf das Krankheitsbild des Schlaganfalls? Zirkulierende Progenitorzellen tragen zur Reparatur von ischämisch geschädigten Organen bei, indem sie Neovaskularisierung und Reendothelialisierung der durch die Ischämie verletzten Blutgefäße induzieren bzw. unterstützen^{7, 211}. Ob die Mobilisation der Progenitorzellen beim zerebralen Infarkt jedoch einen für die Regeneration obligaten Mechanismus darstellt bleibt weiter fraglich. Somit ist auch der potentielle klinische Nutzen nicht abschließend geklärt. Beim Myokardinfarkt wiesen Studien darauf hin, dass die Infusion von Progenitorzellen, die dem Knochenmark abstammen, im Mausversuch zu einer besseren Regeneration nach dem Infarkt ereignis führen kann, was jedoch widerlegt werden konnte^{139, 140, 145}. Als erste Studie am Menschen zu den Nutzen bringenden Effekten der Progenitorzellen bei ischämischen Ereignissen gilt die TOPCARE-AMI, in der Patienten mit Myokardinfarkt Progenitorzellen infundiert wurden. Sie ergab, dass den transplantierten Zellen potenzielle positive Effekte auf die Regeneration des ischämischen Myokards zuzuschreiben seien⁸ und wies bei einem Follow Up nach fünf Jahren auch gute Langzeitergebnisse auf¹⁰⁸. Neben der TOPCARE-Studie konnten positive Effekte auf die Regeneration nach Myokardinfarkt auch in weiteren Studien nachgewiesen werden^{15, 193}. Vergleichbare Studien zum zerebralen Infarkt liegen bis heute nicht vor. Hier gilt es, die zahlreichen vorliegenden Ergebnisse aus in-vitro Studien und Studien am Mausmodell auf einen klinischen Hintergrund zu übertragen. Mit der vorliegenden Studie konnte der oft beschriebene zeitliche Verlauf der Progenitorzellen an Menschen mit Zustand nach zerebralem Infarkt nachgewiesen werden. Untersuchungen zu den direkten nutzbringenden Effekten der exogenen Zugabe der Vorläuferzellen oder ihrer medikamentös unterstützten Mobilisation im Schlaganfall, vergleichbar mit den Studien zum Myokardinfarkt^{8, 237}, stehen aus.

Schlussendlich werfen die vorliegenden Ergebnisse und die bisherige Forschung zum Thema Vorläuferzellen bei zerebralem Infarkt zahlreiche neue Fragen auf. Im Vergleich zum vorhandenen Studienmaterial beim Myokardinfarkt gilt es beim zerebralen Infarkt noch vieles zu untersuchen.

4.6 Weiterführende Fragen

4.6.1 Regenerationspotential nach zerebralem Infarkt im Zusammenhang mit der Mobilisation der Vorläuferzellen

Eine der interessanten Fragestellungen beschäftigt sich mit der in Form der Infarktgröße auch in dieser Studie untersuchten Korrelation des Regenerationspotenzials des geschädigten Gewebes mit den Vorläuferzellen. Wie zuvor bereits beschrieben konnte gezeigt werden, dass die mit Hilfe der Vorläuferzellen neu entstehenden Kapillaren die Einwanderung von z.B. Makrophagen in das geschädigte Gewebe erleichtern, was zu einer schnelleren Elimination des Zelldebris in den nekrotischen Arealen führt. Dies trägt wiederum zur Regeneration des geschädigten, aber nicht nekrotischen Gewebes, wie der Penumbra, also dem Areal der Minderdurchblutung, welches das eigentliche, bereits nekrotische und somit kaum regenerierbare Infarktareal umgibt, bei²³⁰. Je schlechter die Reparatur bzw. Regeneration der Penumbra vonstattengeht, desto eher wird auch diese nekrotisch, womit das Infarktareal weiter wächst. Und je kleiner die initiale Infarktgröße und vor allem je geringer das weitere Wachstum des Infarktareals, desto höher die Spiegel der Vorläuferzellen²⁰. Dies unterstützt die Theorie, dass hohe Spiegel an Vorläuferzellen die Penumbra „vitalisieren“ und somit das Wachstum der nekrotischen Infarktzone vermindern. Jedoch arbeitete die hier angeführte Studie von Bogoslowsky lediglich mit einer sehr kleinen Studienpopulation, weshalb hier für sichere Aussagen größere Studien mit besserer Repräsentativität abzuwarten sind.

4.6.2 Vorläuferzellen als Risikoprädiktor für Infarktereignisse

Auch das Risiko für Infarktereignisse wurde mit der Anzahl der Vorläuferzellen korreliert. Hier ergaben verschiedene Studie, dass die Anzahl der Vorläuferzellen eine negative Korrelation mit dem Risiko für ein Infarktereignis aufweist^{46, 161, 205, 212}. Die Studien bezogen sich in erster Linie auf das Risiko für Myokardinfarkte bzw. kardiovaskuläre Ereignisse allgemein, im Hinblick auf zerebrale Infarktereignisse im Speziellen stehen noch Studien aus.

4.6.3 Ausblick- das mögliche therapeutische Potenzial der Vorläuferzellen

Nachdem im Verlauf der letzten Jahre viele Studien das therapeutische Potenzial der Vorläuferzellen im Hinblick auf verschiedene Krankheitsbilder untersuchten, kann zusammenfassend gesagt werden, dass es viele Ergebnisse gab, die hoffen lassen, dass Vorläuferzellen in Zukunft als mögliches Therapeutikum eingesetzt werden können. Mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark stellen eine Quelle für die Vorläuferzellen dar und wurden im Hinblick auf ihr therapeutisches Potenzial untersucht. Und tatsächlich- vor dem Hintergrund von Extremitätenischämie und Myokardischämie konnten Studien gute Ergebnisse mit ihnen erzielen^{64, 108, 192}.

Bei Nervengewebe bestand lange Zeit das Dogma, dass es bei Säugetieren in keiner Weise zur Regeneration oder Reparatur fähig sei. Viele experimentelle Studien beschäftigten sich jedoch auch mit dem therapeutischen Potenzial der Vorläuferzellen beim zerebralen Infarkt- wie vermutet ergaben sich auch hier Hinweise, dass die Vorläuferzellen in Zukunft einen möglichen Therapieansatz beim Schlaganfall darstellen könnten^{14, 31, 122, 189, 234}. Es besteht also die realistische Möglichkeit, dass Patienten mit ischämischen Ereignissen von einer Vorläuferzell-Transplantation profitieren; insbesondere da die Neoangiogenese einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellt, der durch die Vorläuferzellen unterstützt werden kann.

4.7 Studienbeschränkungen

Abschließend muss angemerkt werden, dass die Bestimmung der Zytokine mit den Untersuchungen an Tag 1 und Tag 5 nicht engmaschig genug gewesen sein könnten. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Anzahl der Vorläuferzellen von Tag 1 bis Tag 5 signifikant angestiegen war, ist anzunehmen, dass die Zytokine in der Zeit vor dem ersten oder zwischen den beiden Abnahmezeitpunkten den Höhepunkt ihrer Effektivität zeigten. Somit könnten sich die Spitzen und somit signifikante Anstiege der Zytokinspiegel eben in den nicht abgebildeten Zeitpunkten vor der ersten oder zwischen der ersten und zweiten Abnahme finden. Weiterhin können fehlende Signifikanzen auf die relativ geringe Probengröße zurückzuführen sein und Signifikanzen eventuelle erst bei einer höheren Probandenzahl auftreten.

5 Zusammenfassung

Vorläuferzellen stammen von adulten Stammzellen ab und werden im Falle eines zerebralen Infarkts aus dem Knochenmark mobilisiert und ins periphere Blut ausgeschwemmt. Höchstwahrscheinlich stellen sie einen wichtigen körpereigenen Reparaturmechanismus dar und tragen somit zur Regeneration der den nekrotischen Infarkt umgebenden, noch vitalen Zone, der Penumbra, nach einem Schlaganfall bei. Die Mechanismen dahinter stellen insbesondere die Neoangiogenese und Reendothelialisierung dar, die von Vorläuferzellen induziert bzw. gefördert werden. In der vorliegenden Studie wurden der zeitliche Verlauf der Mobilisation von zirkulierenden CD133+ Vorläuferzellen nach zerebralem Infarkt und ihre Korrelation zur postinfarziellen Entzündungsreaktion sowie zu einer Statintherapie untersucht.

Es wurden 50 Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall in die Studie eingeschlossen. Mittels Durchflusszytometrie wurde anhand verschiedener Oberflächenmarker (CD34, CD133, CD45) die Anzahl der zirkulierenden CD133+ Vorläuferzellen peripheren Blut ermittelt. Ebenso wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 sowie TNF- α bestimmt, hierzu wurden Cytometric Bead Arrays (CBA) angewandt. NSE sowie S-100 wurden mit Immunoassays quantitativ bestimmt.

Die Studie zeigt, dass CD133+ Vorläuferzellen nach einem zerebralen Infarkt ereignis ins periphere Blut mobilisiert werden und diese Mobilisation bei Messungen an Tag 1, 5 und 7 ein Maximum am 5. Tag nach dem Infarkt ereignis findet. Korrelationen der Mobilisation mit den untersuchten Zytokinen oder NSE bzw. S-100 konnten nicht nachgewiesen werden. Jedoch besteht eine statistisch signifikante Korrelation des Anstiegs der Progenitorzellen mit der Einnahme von Statinen vor dem Infarkt ereignis.

Sollte die durch CD133+ Vorläuferzellen unterstützte Reendothelialisierung und Neoangiogenese einen positiven Effekt auf die Regeneration nach zerebralem Infarkt haben, bergen CD133+ Vorläuferzellen möglicherweise ein großes therapeutisches Potenzial, da die Reparatur bzw. Regeneration der Penumbra eines der Therapieziele beim Schlaganfall darstellt und das Outcome nach einem Schlaganfall wesentlich beeinflusst.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. Toast. Trial of org 10172 in acute stroke treatment. *Stroke*. 1993;24:35-41
2. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine sdf-1 is a chemoattractant for human cd34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of cd34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* 1997;185:111-120
3. Amano K, Okigaki M, Adachi Y, Fujiyama S, Mori Y, Kosaki A, et al. Mechanism for il-1 beta-mediated neovascularization unmasked by il-1 beta knock-out mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004;36:469-480
4. Amin-Hanjani S, Stagliano NE, Yamada M, Huang PL, Liao JK, Moskowitz MA. Mevastatin, an hmg-coa reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke*. 2001;32:980-986
5. Arenillas JF, Sobrino T, Castillo J, Davalos A. The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* 2007;9:205-212
6. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* 2002;8:963-970
7. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967
8. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (topcare-ami). *Circulation*. 2002;106:3009-3017
9. Assmus B, Urbich C, Aicher A, Hofmann WK, Haendeler J, Rossig L, et al. Hmg-coa reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ. Res.* 2003;92:1049-1055
10. Autret A, Pourcelot L, Saudeau D, Marchal C, Bertrand P, de Boisvilliers S. Stroke risk in patients with carotid stenosis. *Lancet*. 1987;1:888-890
11. Balbarini A, Barsotti MC, Di Stefano R, Leone A, Santoni T. Circulating endothelial progenitor cells characterization, function and relationship with cardiovascular risk factors. *Curr. Pharm. Des.* 2007;13:1699-1713
12. Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted il-10-mediated anti-inflammatory response: Lessons from neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 2010;40:2360-2368
13. Beadling C, Slifka MK. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines il-12, il-23, and il-27. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 2006;54:15-24
14. Beck H, Voswinckel R, Wagner S, Ziegelhoeffer T, Heil M, Helisch A, et al. Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003;23:709-717
15. Beitnes JO, Hopp E, Lunde K, Solheim S, Arnesen H, Brinchmann JE, et al. Long-term results after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: The astami randomised, controlled study. *Heart*. 2009;95:1983-1989
16. Ben Abdesselam O, Vally J, Adem C, Foglietti MJ, Beaudoux JL. Reference values for serum s-100b protein depend on the race of individuals. *Clin. Chem.* 2003;49:836-837
17. Blann AD, Pretorius A. Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells: Two sides of the same coin, or two different coins? *Atherosclerosis*. 2006;188:12-18
18. Blauw GJ, Lagaay AM, Smelt AH, Westendorp RG. Stroke, statins, and cholesterol. A meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials with hmg-coa reductase inhibitors. *Stroke*. 1997;28:946-950

19. Bloor AJ, Sanchez MJ, Green AR, Gottgens B. The role of the stem cell leukemia (scl) gene in hematopoietic and endothelial lineage specification. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2002;11:195-206
20. Bogoslovsky T, Chaudhry A, Latour L, Maric D, Luby M, Spatz M, et al. Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke. *Neurology.* 2010;75:2059-2062
21. Bogoslovsky T, Spatz M, Chaudhry A, Maric D, Luby M, Frank J, et al. Stromal-derived factor-1{alpha} correlates with circulating endothelial progenitor cells and with acute lesion volume in stroke patients. *Stroke.* 2011
22. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 2009;40:e331-339
23. Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Ortega L, Perez F, et al. Hmg-coa reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998;32:2057-2064
24. Carmi Y, Voronov E, Dotan S, Lahat N, Rahat MA, Fogel M, et al. The role of macrophage-derived il-1 in induction and maintenance of angiogenesis. *J. Immunol.* 2009;183:4705-4714
25. Casamassimi A, Balestrieri ML, Fiorito C, Schiano C, Maione C, Rossiello R, et al. Comparison between total endothelial progenitor cell isolation versus enriched cd133+ culture. *J. Biochem.* 2007;141:503-511
26. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzadeh MR, et al. Human cd34+ac133+vegfr-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* 2007;35:1109-1118
27. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through hif-1 induction of sdf-1. *Nat. Med.* 2004;10:858-864
28. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25:2739-2749
29. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J. Exp. Med.* 2005;201:63-72
30. Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2008;45:514-522
31. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke.* 2001;32:2682-2688
32. Chiriac A, Terzic A, Park S, Ikeda Y, Faustino R, Nelson TJ. Sdf-1-enhanced cardiogenesis requires cxcr4 induction in pluripotent stem cells. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2010;3:674-682
33. Chironi G, Walch L, Pernollet MG, Garipey J, Levenson J, Rendu F, et al. Decreased number of circulating cd34+kdr+ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007;191:115-120
34. Chuntharapai A, Lee J, Hebert CA, Kim KJ. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of il-8 receptor a and il-8 receptor b on human peripheral blood leukocytes. *J. Immunol.* 1994;153:5682-5688
35. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (il-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/il-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* 1993;178:1041-1048
36. Daemen MA, van't Veer C, Wolfs TG, Buurman WA. Ischemia/reperfusion-induced ifn-gamma up-regulation: Involvement of il-12 and il-18. *J. Immunol.* 1999;162:5506-5510
37. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Ueland T, Muller F, Eiken HG, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha in unstable angina: Potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects. *Circulation.* 2002;106:36-42

38. Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003;62:127-136
39. Dassan P, Keir G, Brown MM. Criteria for a clinically informative serum biomarker in acute ischaemic stroke: A review of s100b. *Cerebrovasc. Dis.* 2009;27:295-302
40. De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, et al. Sdf-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood.* 2004;104:3472-3482
41. Delva P, De Marchi S, Prior M, Degan M, Lechi A, Trettene M, et al. Endothelial progenitor cells in patients with severe peripheral arterial disease. *Endothelium.* 2008;15:246-253
42. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. Hmg-coa reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the pi 3-kinase/akt pathway. *J Clin Invest.* 2001;108:391-397
43. Dinarello CA. Il-1: Discoveries, controversies and future directions. *Eur. J. Immunol.* 2010;40:599-606
44. Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, et al. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (hmg)-coa reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95:8880-8885
45. Fadini GP, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A, et al. Peripheral blood cd34+kdr+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke.* 2006;37:2277-2282
46. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Agostini C, Boscaro E, Tiengo A, Dimmeler S, et al. Low cd34+ cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis.* 2009;207:213-219
47. Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, et al. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008;28:90-98
48. Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F, Investigators H-M. The effect of blockade of the cd11/cd18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: The results of the halt-mi study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002;40:1199-1204
49. Ferrarese C, Mascarucci P, Zoia C, Cavarretta R, Frigo M, Begni B, et al. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999;19:1004-1009
50. Ferreira LS, Gerecht S, Shieh HF, Watson N, Rupnick MA, Dallabrida SM, et al. Vascular progenitor cells isolated from human embryonic stem cells give rise to endothelial and smooth muscle like cells and form vascular networks in vivo. *Circ. Res.* 2007;101:286-294
51. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. Il-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 1991;147:3815-3822
52. Foulkes MA, Wolf PA, Price TR, Mohr JP, Hier DB. The stroke data bank: Design, methods, and baseline characteristics. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 1988;19:547-554
53. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol. Res.* 2008;58:88-111
54. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from ac133-positive progenitor cells. *Blood.* 2000;95:3106-3112
55. Genest J. C-reactive protein: Risk factor, biomarker and/or therapeutic target? *Can. J. Cardiol.* 2010;26 Suppl A:41A-44A
56. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gesundheit in Deutschland. Schlaganfall, Kapitel 1.2.2.2. 2006
57. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of vegfr2(+)ac133(+) endothelial precursor cells. *Circ. Res.* 2001;88:167-174

58. Ginsberg MD. The new language of cerebral ischemia. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 1997;18:1435-1445
59. Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, et al. Flow cytometric enumeration of cd34+ hematopoietic stem and progenitor cells. European working group on clinical cell analysis. *Cytometry.* 1998;34:128-142
60. Grau AJ, Reis A, Bugge F, Al-Khalaf A, Werle E, Valois N, et al. Monocyte function and plasma levels of interleukin-8 in acute ischemic stroke. *J. Neurol. Sci.* 2001;192:41-47
61. Grau AJ, Weimar C, Bugge F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, et al. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: The german stroke data bank. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2001;32:2559-2566
62. Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, Kapral T, Steiner S, Saemann M, et al. Endothelial progenitor cells in active rheumatoid arthritis: Effects of tumour necrosis factor and glucocorticoid therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 2007;66:1284-1288
63. Grundmann F, Scheid C, Braun D, Zobel C, Reuter H, Schwinger RH, et al. Differential increase of cd34, kdr/cd34, cd133/cd34 and cd117/cd34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction. *Clin. Res. Cardiol.* 2007;96:621-627
64. Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: Clinical trial and preliminary results. *Jpn. Circ. J.* 2001;65:845-847
65. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, et al. Biology and plasticity of cd133+ hematopoietic stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;996:141-151
66. Hedrich CM, Bream JH. Cell type-specific regulation of il-10 expression in inflammation and disease. *Immunol. Res.* 2010;47:185-206
67. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood.* 2003;102:1340-1346
68. Heinemann LA, Barth W, Garbe E, Willich SN, Kunze K. [epidemiologic data of stroke. Data of the who-monica project in germany]. *Nervenarzt.* 1998;69:1091-1099
69. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires mmp-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 2002;109:625-637
70. Hennemann B, Ickenstein G, Sauerbruch S, Luecke K, Haas S, Horn M, et al. Mobilization of cd34+ hematopoietic cells, colony-forming cells and long-term culture-initiating cells into the peripheral blood of patients with an acute cerebral ischemic insult. *Cytotherapy.* 2008;10:303-311
71. Herold G. *Innere medizin.* Köln: G. Herold; 2009.
72. Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, Attigah N, Coserea I, Schneider A, et al. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003;23:406-415
73. Heuschmann PU, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, et al. Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol.* 2010:333-340
74. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600
75. Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, et al. Sdf-1 (cxcl12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: Association with bone marrow cell homing to injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004;63:84-96
76. Hochsmann B, Huber R, Schauwecker P, Schrezenmeier H, Wiesneth M, Storch A. Hemispheric stroke does not mobilize cd34+ hematopoietic stem cells into the peripheral blood. *Neurology.* 2009;72:1277-1278

77. Holmin S, Hojeberg B. In situ detection of intracerebral cytokine expression after human brain contusion. *Neurosci. Lett.* 2004;369:108-114
78. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: Mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23:1185-1189
79. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: Characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J. Cell. Mol. Med.* 2004;8:498-508
80. Huang J, Choudhri TF, Winfree CJ, McTaggart RA, Kiss S, Mocco J, et al. Postischemic cerebrovascular e-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke. *Stroke.* 2000;31:3047-3053
81. Idicula TT, Brogger J, Naess H, Waje-Andreassen U, Thomassen L. Admission c-reactive protein after acute ischemic stroke is associated with stroke severity and mortality: The 'bergen stroke study'. *BMC Neurol.* 2009;9:18
82. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, et al. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: Subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells.* 2008;26:2408-2418
83. Jie KE, van der Putten K, Bergevoet MW, Doevendans PA, Gaillard CA, Braam B, et al. Short- and long-term effects of erythropoietin treatment on endothelial progenitor cell levels in patients with cardiorenal syndrome. *Heart.* 2011;97:60-65
84. Jorgensen LG, Lober J, Carlsen NL, Momsen G, Hirsch FR. Serum neuron specific enolase (s-nse) reference interval evaluation by time-resolved immunofluorometry compared with a radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta.* 1996;249:77-91
85. Junqueira LC. *Histologie.* Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2005.
86. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravelleaux E, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ. Res.* 2000;86:1198-1202
87. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:3422-3427
88. Kaplanski G, Teyssie N, Farnarier C, Kaplanski S, Lissitzky JC, Durand JM, et al. Il-6 and il-8 production from cultured human endothelial cells stimulated by infection with rickettsia conorii via a cell-associated il-1 alpha-dependent pathway. *J. Clin. Invest.* 1995;96:2839-2844
89. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: An individual participant meta-analysis. *Lancet.* 2010;375:132-140
90. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute cd34+ cell counts based on the ishage guidelines. International society of hematotherapy and graft engineering. *Cytometry.* 1998;34:61-70
91. Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu. Rev. Med.* 2005;56:79-101
92. Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H, et al. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells.* 2010;28:545-554
93. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU. [incidence, etiology and long-term prognosis of stroke]. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 2002;70:657-662
94. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundorfer B, et al. Lifetime cost of ischemic stroke in germany: Results and national projections from a population-based stroke registry: The erlangen stroke project. *Stroke.* 2006;37:1179-1183
95. Konoeda F, Shichita T, Yoshida H, Sugiyama Y, Muto G, Hasegawa E, et al. Therapeutic effect of il-12/23 and their signaling pathway blockade on brain ischemia model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;402:500-506
96. Korblyng M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:738-746

97. Kouwenhoven M, Carlstrom C, Ozenci V, Link H. Matrix metalloproteinase and cytokine profiles in monocytes over the course of stroke. *J. Clin. Immunol.* 2001;21:365-375
98. Krenning G, van der Strate BW, Schipper M, Brouwer LA, Fernandes BC, van Luyn MJ, et al. Combined implantation of cd34(+) and cd14(+) cells increases neovascularization through amplified paracrine signalling. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2011
99. Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Wang M, Kumar S. Prognostic value of blood vessel density in ischaemic stroke. *Lancet.* 1993;342:742
100. Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, et al. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J. Clin. Invest.* 1995;95:89-103
101. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The hmg-coa reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat. Med.* 2000;6:1004-1010
102. Kwakkel G, Wagenaar RC, Kollen BJ, Lankhorst GJ. Predicting disability in stroke--a critical review of the literature. *Age Ageing.* 1996;25:479-489
103. Kwon O, Miller S, Li N, Khan A, Kadry Z, Uemura T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells and endothelial cells may contribute to endothelial repair in the kidney immediately after ischemia-reperfusion. *J. Histochem. Cytochem.* 2010;58:687-694
104. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: Therapeutic approaches. *J. Transl. Med.* 2009;7:97
105. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp. Hematol.* 2002;30:973-981
106. Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M. Rosuvastatin, a new hmg-coa reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res.* 2002;942:23-30
107. Lecoer H, de Oliveira-Pinto LM, Gougeon ML. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin d assay. *J. Immunol. Methods.* 2002;265:81-96
108. Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Schachinger V, Lehmann R, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (topcare-ami): Final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin. Res. Cardiol.* 2011;100:925-934
109. Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, Zaccone V, Perfetti M, D'Amario D, et al. From bone marrow to the arterial wall: The ongoing tale of endothelial progenitor cells. *Eur. Heart J.* 2009;30:890-899
110. Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and mmp-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis.* 2005;8:63-71
111. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: A duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity.* 2008;28:468-476
112. Li YL, Yu CL, Yu HS. Igg anti-melanocyte antibodies purified from patients with active vitiligo induce hla-dr and intercellular adhesion molecule-1 expression and an increase in interleukin-8 release by melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2000;115:969-973
113. Lin G, Finger E, Gutierrez-Ramos JC. Expression of cd34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur. J. Immunol.* 1995;25:1508-1516
114. Lindsberg PJ, Carpen O, Paetau A, Karjalainen-Lindsberg ML, Kaste M. Endothelial icam-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation.* 1996;94:939-945

115. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, et al. Hmg-coa reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J. Clin. Invest.* 2001;108:399-405
116. Lonnemann G, Engler-Blum G, Muller GA, Koch KM, Dinarello CA. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. II. Intrinsic interleukin (il)-1 synthesis and il-1-dependent production of il-6 and il-8 by cultured kidney fibroblasts. *Kidney Int.* 1995;47:845-854
117. Lu DY, Tang CH, Yeh WL, Wong KL, Lin CP, Chen YH, et al. Sdf-1alpha up-regulates interleukin-6 through cxcr4, pi3k/akt, erk, and nf-kappab-dependent pathway in microglia. *Eur. J. Pharmacol.* 2009;613:146-154
118. Machalinski B, Paczkowska E, Koziarska D, Ratajczak MZ. Mobilization of human hematopoietic stem/progenitor-enriched cd34+ cells into peripheral blood during stress related to ischemic stroke. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2006;44:97-101
119. Mansour S, Roy DC, Bouchard V, Nguyen BK, Stevens LM, Gobeil F, et al. Compare-ami trial: Comparison of intracoronary injection of cd133+ bone marrow stem cells to placebo in patients after acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: Study rationale and design. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2010;3:153-159
120. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood.* 2005;105:199-206
121. Mazzotta G, Sarchielli P, Caso V, Paciaroni M, Floridi A, Gallai V. Different cytokine levels in thrombolysis patients as predictors for clinical outcome. *Eur. J. Neurol.* 2004;11:377-381
122. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:1364-1369
123. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: Isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood.* 1997;90:5013-5021
124. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke.* 1997;28:1956-1960
125. Mohty M, Ho AD. In and out of the niche: Perspectives in mobilization of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 2011;39:723-729
126. Moonis M, Kane K, Schwiderski U, Sandage BW, Fisher M. Hmg-coa reductase inhibitors improve acute ischemic stroke outcome. *Stroke.* 2005;36:1298-1300
127. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, et al. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of sdf-1, vegf, and angiopoietin-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;938:36-45; discussion 45-37
128. Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ. Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1993;327:123-132
129. Murohara T. Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors. *Trends Cardiovasc. Med.* 2001;11:303-307
130. Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood.* 1999;93:2951-2958
131. Nabavi DGR, E. Bernd. Zertifizierte medizinische fortbildung: Initialdiagnostik beim akuten ischämischen hirninsult. *Dtsch Arztebl.* 2005;102:A-3111 / B-2628 / C-2468
132. Napoli C, Hayashi T, Cacciatore F, Casamassimi A, Casini C, Al-Omran M, et al. Endothelial progenitor cells as therapeutic agents in the microcirculation: An update. *Atherosclerosis.* 2010
133. Nayak AR, Kashyap RS, Purohit HJ, Kabra D, Taori GM, Dagainawala HF. Evaluation of the inflammatory response in sera from acute ischemic stroke patients by measurement of il-2 and il-10. *Inflamm. Res.* 2009;58:687-691

134. Nielsen JS, McNagny KM. Cd34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation*. 2009;16:487-496
135. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the cd34 family. *J. Cell Sci*. 2008;121:3683-3692
136. Ogata K, Satoh C, Tachibana M, Hyodo H, Tamura H, Dan K, et al. Identification and hematopoietic potential of cd45- clonal cells with very immature phenotype (cd45-cd34-cd38-lin-) in patients with myelodysplastic syndromes. *Stem Cells*. 2005;23:619-630
137. Ohab JJ, Carmichael ST. Poststroke neurogenesis: Emerging principles of migration and localization of immature neurons. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2008;14:369-380
138. Ooboshi H, Ibayashi S, Shichita T, Kumai Y, Takada J, Ago T, et al. Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. *Circulation*. 2005;111:913-919
139. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2001;938:221-229; discussion 229-230
140. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705
141. Ovbiagele B. Hmg-coa reductase inhibitors improve acute ischemic stroke outcome. *Stroke*. 2005;36:2344; author reply 2344
142. Paczkowska E, Kucia M, Koziarska D, Halasa M, Safranow K, Masiuk M, et al. Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke. *Stroke*. 2009;40:1237-1244
143. Parmar S, Plataniias LC. Interferons: Mechanisms of action and clinical applications. *Curr. Opin. Oncol*. 2003;15:431-439
144. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of vegfr-2 and ac133 by circulating human cd34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952-958
145. Perry TE, Song M, Despres DJ, Kim SM, San H, Yu ZX, et al. Bone marrow-derived cells do not repair endothelium in a mouse model of chronic endothelial cell dysfunction. *Cardiovasc. Res*. 2009;84:317-325
146. Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: Markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke*. 1987;18:911-918
147. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, et al. G-csf induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow sdf-1 and up-regulating cxcr4. *Nat. Immunol*. 2002;3:687-694
148. Planas AM, Gorina R, Chamorro A. Signalling pathways mediating inflammatory responses in brain ischaemia. *Biochem. Soc. Trans*. 2006;34:1267-1270
149. Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005;25:296-301
150. Pruijt JF, Willemze R, Fibbe WE. Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the cxc chemokine interleukin-8. *Curr. Opin. Hematol*. 1999;6:152-158
151. Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, et al. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2002;13:61-67
152. Ratajczak J, Zuba-Surma E, Paczkowska E, Kucia M, Nowacki P, Ratajczak MZ. Stem cells for neural regeneration--a potential application of very small embryonic-like stem cells. *J. Physiol. Pharmacol*. 2011;62:3-12

153. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003;107:1164-1169
154. Roberts R, DeMello V, Sobel BE. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation*. 1976;53:1204-206
155. Rosell A, Arai K, Lok J, He T, Guo S, Navarro M, et al. Interleukin-1beta augments angiogenic responses of murine endothelial progenitor cells in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2009;29:933-943
156. Rosenberg GA. Ischemic brain edema. *Prog. Cardiovasc. Dis*. 1999;42:209-216
157. Rubattu S, Speranza R, Ferrari M, Evangelista A, Beccia M, Stanzione R, et al. A role of tnf-alpha gene variant on juvenile ischemic stroke: A case-control study. *Eur. J. Neurol*. 2005;12:989-993
158. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: Evidence from an in vitro model. *J. Neurosci*. 2002;22:10291-10301
159. Sahai J, Louie SG. Overview of the immune and hematopoietic systems. *Am. J. Hosp. Pharm*. 1993;50:S4-9
160. Sandri M, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Krankel N, et al. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: Results of 3 randomized studies. *Circulation*. 2005;111:3391-3399
161. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: Proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005;111:2981-2987
162. Schomig K, Busch G, Steppich B, Sepp D, Kaufmann J, Stein A, et al. Interleukin-8 is associated with circulating cd133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *Eur. Heart J*. 2006;27:1032-1037
163. Schuh AC, Faloon P, Hu QL, Bhimani M, Choi K. In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(-/-) embryonic stem cells and embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1999;96:2159-2164
164. Schwaninger M, Sallmann S, Petersen N, Schneider A, Prinz S, Libermann TA, et al. Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. *J. Neurochem*. 1999;73:1461-1466
165. Sepp D, Esposito L, Zepper P, Ott I, Feuerer R, Sadikovic S, et al. Surface expression of cxcr4 on circulating cd133progenitor cells is associated with plaque instability in subjects with carotid artery stenosis. *J. Angiogenes. Res*. 2009;1:10
166. Shaffer RG, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS, et al. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: The effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry B Clin. Cytom*. 2006;70:56-62
167. Shaked Y, Tang T, Woloszynek J, Daenen LG, Man S, Xu P, et al. Contribution of granulocyte colony-stimulating factor to the acute mobilization of endothelial precursor cells by vascular disrupting agents. *Cancer Res*. 2009;69:7524-7528
168. Shantikumar S, Grant PJ, Catto AJ, Bamford JM, Carter AM. Elevated c-reactive protein and long-term mortality after ischaemic stroke: Relationship with markers of endothelial cell and platelet activation. *Stroke*. 2009;40:977-979
169. Shen L, Gao Y, Qian J, Sun A, Ge J. A novel mechanism for endothelial progenitor cells homing: The sdf-1/cxcr4-rac pathway may regulate endothelial progenitor cells homing through cellular polarization. *Med. Hypotheses*. 2011;76:256-258
170. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92:362-367

171. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vegf receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 2006;312:549-560
172. Shie FS, Neely MD, Maezawa I, Wu H, Olson SJ, Jurgens G, et al. Oxidized low-density lipoprotein is present in astrocytes surrounding cerebral infarcts and stimulates astrocyte interleukin-6 secretion. *Am. J. Pathol.* 2004;164:1173-1181
173. Shin HM, Cho WD, Lee GK, Lee SH, Lee KM, Ji GY, et al. Characterization of monoclonal antibodies against human leukocyte common antigen (cd45). *Immune Netw.* 2011;11:114-122
174. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;103:2776-2779
175. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation.* 2001;103:897-903
176. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding cd34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J. Immunol.* 1992;148:267-271
177. Smadja DM, Duong-van-Huyen JP, Dal Cortivo L, Blanchard A, Bruneval P, Emmerich J, et al. Early endothelial progenitor cells in bone marrow are a biomarker of cell therapy success in patients with critical limb ischemia. *Cytotherapy.* 2011
178. Smart N, Riley PR. The stem cell movement. *Circ. Res.* 2008;102:1155-1168
179. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodriguez-Yanez M, Castellanos M, Brea D, et al. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke.* 2007;38:2759-2764
180. Spadaccio C, Pollari F, Casacalenda A, Alfano G, Genovese J, Covino E, et al. Atorvastatin increases the number of endothelial progenitor cells after cardiac surgery: A randomized control study. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2010;55:30-38
181. Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. Il-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci. Lett.* 1998;251:189-192
182. Spevack DM, Cavaleri S, Zolotarev A, Liebes L, Inghirami G, Tunick PA, et al. Increase in circulating bone marrow progenitor cells after myocardial infarction. *Coron. Artery Dis.* 2006;17:345-349
183. Stanimirovic DB, Wong J, Shapiro A, Durkin JP. Increase in surface expression of icam-1, vcam-1 and e-selectin in human cerebrovascular endothelial cells subjected to ischemia-like insults. *Acta Neurochir. Suppl.* 1997;70:12-16
184. Statistisches Bundesamt Deutschland. Todesursachen in Deutschland. 2008:6
185. Stein A, Zohnhofer D, Pogatsa-Murray G, von Wedel J, Steppich BA, Schomig A, et al. Expression of cxcr4, vla-1, lfa-3 and transducer of erb in g-csf-mobilised progenitor cells in acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 2010;103:638-643
186. Sterpetti AV, Cucina A, Morena AR, Di Donna S, D'Angelo LS, Cavalirro A, et al. Shear stress increases the release of interleukin-1 and interleukin-6 by aortic endothelial cells. *Surgery.* 1993;114:911-914
187. Suzuki H, Abe K, Tojo S, Morooka S, Kimura K, Mizugaki M, et al. Postischemic expression of p-selectin immunoreactivity in rat brain. *Neurosci. Lett.* 1997;228:151-154
188. Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, et al. Circulating cd34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation.* 2004;109:2972-2975
189. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, et al. Administration of cd34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* 2004;114:330-338
190. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5:434-438

191. Tanaka N, Katayama Y, Katsumata T, Otori T, Nishiyama Y. Effects of long-term administration of hmg-coa reductase inhibitor, atorvastatin, on stroke events and local cerebral blood flow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 2007;1169:125-132
192. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002;360:427-435
193. Tendera M, Wojakowski W. Clinical trials using autologous bone marrow and peripheral blood-derived progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2005;43:233-235
194. Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke.* 2007;38:3032-3039
195. Thornton AJ, Ham J, Kunkel SL. Kupffer cell-derived cytokines induce the synthesis of a leukocyte chemotactic peptide, interleukin-8, in human hepatoma and primary hepatocyte cultures. *Hepatology.* 1991;14:1112-1122
196. Tilling L, Chowienczyk P, Clapp B. Progenitors in motion: Mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2009;68:484-492
197. Tilton B, Ho L, Oberlin E, Loetscher P, Baleux F, Clark-Lewis I, et al. Signal transduction by cxc chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase b and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in t lymphocytes. *The Journal of experimental medicine.* 2000;192:313-324
198. Townend W, Dibble C, Abid K, Vail A, Sherwood R, Lecky F. Rapid elimination of protein s-100b from serum after minor head trauma. *J. Neurotrauma.* 2006;23:149-155
199. Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, et al. Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-ii as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 2002;22:5879-5888
200. Tsai S, Butler J, Rafii S, Liu B, Kent KC. The role of progenitor cells in the development of intimal hyperplasia. *J. Vasc. Surg.* 2009;49:502-510
201. Turan RG, Brehm M, Koestering M, Tobias Z, Bartsch T, Steiner S, et al. Factors influencing spontaneous mobilization of cd34+ and cd133+ progenitor cells after myocardial infarction. *Eur. J. Clin. Invest.* 2007;37:842-851
202. Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, et al. A maximal exercise bout increases the number of circulating cd34+/kdr+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *J. Appl. Physiol.* 2008;104:1006-1013
203. van Mil AH, Westendorp RG, Bollen EL, Lagaay AM, Blauw GJ. Hmg-coa reductase inhibitors in the prevention of stroke. *Drugs.* 2000;59:1-6
204. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103:2885-2890
205. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:E1-7
206. Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: Regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz.* 2002;27:579-588
207. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: A novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2002;105:3017-3024
208. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol.* 2007;184:53-68

209. Wang QR, Wang F, Zhu WB, Lei J, Huang YH, Wang BH, et al. Gm-csf accelerates proliferation of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells in vitro. *Cytokine*. 2009;45:174-178
210. Weiss MJ, Orkin SH. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. *J. Clin. Invest.* 1996;97:591-595
211. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ. Res.* 2003;93:e17-24
212. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N. Engl. J. Med.* 2005;353:999-1007
213. Wiesner G, Grimm J, Bittner E. [stroke: Prevalence, incidence, trends, east-west comparison. Initial results of the 1998 federal health survey]. *Gesundheitswesen*. 1999;61 Spec No:S79-84
214. Winter R, Hacke W. [ischemic stroke]. *Internist (Berl.)*. 1998;39:623-643
215. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: Prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* 2005;85:635-678
216. Wojakowski W, Tendera M. Mobilization of bone marrow-derived progenitor cells in acute coronary syndromes. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2005;43:229-232
217. Wolff PA, Dawber TR, Thomas HE, Jr., Kannel WB. Epidemiologic assessment of chronic atrial fibrillation and risk of stroke: The framingham study. *Neurology*. 1978;28:973-977
218. Worthmann H, Tryc AB, Goldbecker A, Ma YT, Tountopoulou A, Hahn A, et al. The temporal profile of inflammatory markers and mediators in blood after acute ischemic stroke differs depending on stroke outcome. *Cerebrovasc. Dis.* 2010;30:85-92
219. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J. Appl. Physiol.* 2003;95:2081-2088
220. Yamasaki Y, Matsuo Y, Matsuura N, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke*. 1995;26:318-322; discussion 322-313
221. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*. 1995;26:676-680; discussion 681
222. Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J. Neurosci.* 2006;26:6627-6636
223. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood cd34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. 2003;108:2070-2073
224. Yenari MA. Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Cleve. Clin. J. Med.* 2004;71 Suppl 1:S25-27
225. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. Ac133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90:5002-5012
226. Yin Y, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J, Song M, et al. Sdf-1alpha involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice. *Cardiovasc. Pathol.* 2010;19:218-227
227. Yip HK, Chang LT, Chang WN, Lu CH, Liou CW, Lan MY, et al. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke*. 2008;39:69-74
228. Yoder MC. Defining human endothelial progenitor cells. *J. Thromb. Haemost.* 2009;7 Suppl 1:49-52
229. Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: The role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2005;112:1618-1627

230. Yu SW, Friedman B, Cheng Q, Lyden PD. Stroke-evoked angiogenesis results in a transient population of microvessels. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007;27:755-763
231. Zaremba J, Losy J. Early tnf-alpha levels correlate with ischaemic stroke severity. *Acta Neurol. Scand.* 2001;104:288-295
232. Zaremba J, Losy J. Interleukin-12 in acute ischemic stroke patients. *Folia Neuropathol.* 2006;44:59-66
233. Zhang F, Yu W, Hargrove JL, Greenspan P, Dean RG, Taylor EW, et al. Inhibition of tnf-alpha induced icam-1, vcam-1 and e-selectin expression by selenium. *Atherosclerosis.* 2002;161:381-386
234. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ. Res.* 2002;90:284-288
235. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, et al. Vegf enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 2000;106:829-838
236. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, et al. Kdr receptor: A key marker defining hematopoietic stem cells. *Science.* 1999;285:1553-1558
237. Zimmet H, Porapakham P, Sata Y, Haas SJ, Itescu S, Forbes A, et al. Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of st-segment elevation myocardial infarction: A meta-analysis of randomized control trials. *Eur. J. Heart Fail.* 2011
238. Zohnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: A randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2006;295:1003-1010
239. Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors.* 2010;36:274-288

7 Anhang

7.1 Anamnesebogen für Studienpatienten

Studien-ID	
Name	
Geburtsdatum	
Geschlecht	
Adresse	
Tel-Nr.	
Untersuchungsdatum + -uhrzeit	
Zeitpunkt des Ereignisses	
Lokalisation	
<u>Vitalwerte/Maße:</u>	
Hüftumfang	
Bauchumfang	
Waist-Hip-Ratio	
Gewicht	
Größe	
BMI	
RR (mmHg) zum Untersuchungszeitpunkt	

Puls zum Untersuchungszeitpunkt	
<u>Vorerkrankungen</u>	
Wenn ja, ggf. Datum der Erstdiagnose	
KHK	
Myokardinfarkt	
Diabetes	
VHF	
pAVK	
Hypertonus	
Alkohol	
Nikotin	
Pack Years	
Dyslipidämie	
TVT	
Herzklappenerkrankung	
Migräne	
Früherer Infarkt (auch TIA); Zeitpunkt?	
<u>Medikamente</u>	
Statine	
B-Blocker	
ACE-Hemmer	

Diuretika	
Heparin	
Thrombozytenaggregationshemmer	
Sartane	
Sonst.	
<u>Näheres zum Infarktereignis</u>	
Früherer Schlaganfall/ TIA	
Datum letzter Schlaganfall/ TIA	
Lokalisation aktueller Infarkt	
TOAST	
NIH bei Aufnahme	
Symptome am Aufnahmetag	
Zeit Symptombeginn bis Abnahme	

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Holger Poppert für die Überlassung des Themas und die Förderung und Begleitung während der Arbeit danken. Mein Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Bernhard Hemmer für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit in der Neurologischen Klinik der Technischen Universität München.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Betreuern Herrn Dr. Dominik Sepp und Herrn Dr. Peter Zepper für ihre Hilfsbereitschaft, die Unterstützung und Betreuung bei allen Fragen und während der praktischen und theoretischen Arbeiten.

Des Weiteren gilt mein Dank auch Frau Annette Stobbe und Frau Birgit Campbell des experimentellen Labors für Kardiologie des Deutschen Herzzentrums München für deren Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten im Labor.

Ich möchte mich auch bei all jenen Bedanken, die mich während der letzten Jahre jeder auf seine Weise unterstützt haben mit einem offenen Ohr, mit kritischem Hinterfragen, mit Aufmunterungen und Durchhalteparolen!

Zuletzt gilt mein größter Dank meinen Eltern, ohne die ich niemals an diesen Punkt gekommen wäre und die mir mein Medizinstudium erst ermöglicht haben, meinem Opa, für seinen Glauben an mich und dass die Arbeit eines Tages doch noch fertig wird und natürlich Martin einfach für alles was er für mich ist und tut!