

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen, Immunzellen und Interleukine
bei Patienten mit einem zerebralem Infarkt, einer intrazerebralen
Blutung und einer Subarachnoidalblutung**

Natalie Lucia Anita Sonntag

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Jan Holger Poppert
2. Prof. Dr. Claus Zimmer

Die Dissertation wurde am 23.08.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.04.2019 angenommen.

für meinen verstorbenen Vater

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 6

1. Einleitung 9

1.1. Schlaganfall..... 9

1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren..... 9

1.1.2. ischämischer Schlaganfall10

1.1.3. hämorrhagischer Schlaganfall11

1.2. Vorläuferzellen12

1.2.1. Grundlagen.....12

1.2.2. Klassifikationssysteme.....12

1.2.3. spezifische Marker endothelialer Vorläuferzellen13

1.2.4. Mobilisierung und Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen.....14

1.2.5. physiologische Aufgaben endothelialer Vorläuferzellen16

1.3. Veränderungen des Immunsystems nach einem Schlaganfall.....18

1.3.1. Grundlagen des Immunsystems18

1.3.2. Veränderung der Zellfunktion.....18

1.3.3. Veränderung bei Hormonen und Zytokinen20

1.4. Grundlagen der Durchflusszytometrie22

1.4.1. Prinzipien.....22

1.4.2. Technischer Aufbau.....22

1.5. Zielsetzung25

2. Material und Methodik..... 26

2.1. Ablauf der Studie26

2.2. Laborprotokolle.....27

2.2.1. CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen27

2.2.2. Einfrieren des Ficoll-Zentrifugats29

2.2.3. Immunzellen30

2.3. Durchflusszytometrie32

2.3.1. Identifizierung der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen	32
2.3.2. Identifizierung der Immunzellen	35
2.4. Bestimmung der Interleukine	37
2.5. Statistische Auswertung	37
3. Ergebnisse	38
3.1. Basischarakteristika	38
3.2. CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen	40
3.2.1. zerebrale Infarkte.....	40
3.2.2. intrazerebrale Blutungen.....	41
3.2.3. Subarachnoidalblutungen	42
3.2.4. Vergleich der Subgruppen	44
3.3. Interleukine.....	46
3.3.1. zerebrale Infarkte.....	46
3.3.2. intrazerebrale Blutungen.....	46
3.3.3. Subarachnoidalblutungen	47
3.3.4. Vergleich der Subgruppen	50
3.4. Immunzellen	53
3.4.1. zerebrale Infarkte.....	53
3.4.2. intrazerebrale Blutungen.....	54
3.4.3. Subarachnoidalblutungen	55
3.4.4. Vergleich der Subgruppen	60
3.4.4.1. CD4 ⁺ T-Zellen, CD8 ⁺ T-Zellen und B-Zellen	60
3.4.4.2. weitere Immunzellen.....	61
4. Diskussion	63
4.1. CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen.....	63
4.2. Interleukine.....	68
4.3. Immunzellen	70
4.4. Limitationen der Studie	72
5. Zusammenfassung	73

6. Anhang	74
6.1. Abbildungsverzeichnis	74
6.2. Tabellenverzeichnis	75
6.3. Literaturverzeichnis	77
Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Amino-Actinomycin-D
Abb.	Abbildung
acLDL	azetyliertes Low-Density Lipoprotein
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin mit Tandemkonjugat Cy7
bzw.	beziehungsweise
CBA	Cytometric bead array
CD	Cluster of Differentiation
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Arginin
CRP	C-reaktives Protein
CXCR₄	C-X-C-motiv-rezeptor-4
ECD	energy coupled dye (deutsch: Phycoerythrin – Texas Red, PE-TR)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	Endotheliale Vorläuferzellen (englisch: endothelial progenitor cells)
EPO	Erythropoetin
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum (englisch: fetal calf serum)
FITC	Floureszeinisothiozyanit
FL	Floueszenz
FSC	Forward Scatter
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor

HLA-DR	Human Leukocyte Antigen Typ DR
HIF-1	Hypoxia-inducible factor - 1
HSC	Hämatopoetische Stammzellen (englisch: haematopoetic stem cells)
ICB	Intrazerebrale Blutung
IL	Interleukin
KDR	Kinase insert domain receptor (auch: Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor-2, VEGFR ₂)
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzellen (englisch: mesenchymal stem cells)
NIHSS	Nation Institute of Health Stroke Scale
NK-Zellen	„natürliche Killerzellen“
PBS	Phosphatase Bufferd Saline
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin mit Tandemkonjugat Cy7
PerCP	Peridinin Chlorophyll-A Protein
PE-TR	Phycoerythrin – Texas Red (englisch: energy coupled dye, ECD)
PFA	Paraformaldehyd
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor-γ
RPMI-1640	„Roswell Park Memorial Institute“ – Zellkulturmedium – 1640
s.	siehe
SAB	Subarachnoidalblutung
SDF-1	Stroma Cell Derived Factor-1
SSC	Side Scatter

Tab.	Tabelle
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
Treg	Regulatorische T-Zellen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR₂	Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor-2 (auch: kinase insert domain receptor, KDR)
VM	Fluoreszenzfarbstoff V450
vWF	Von-Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Schlaganfall

Ein Schlaganfall wird als ein plötzlich eintretendes neurologisches Defizit definiert, welches von Symptomen wie Bewusstseinsverlust oder Schmerzen begleitet werden kann. Insgesamt gehören Schlaganfälle zu den weltweit führenden Ursachen für Mortalität und Behinderung. Man kann dieses Krankheitsbild in eine ischämische und hämorrhagische Form unterteilen.

1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

In Deutschland nehmen zerebrovaskuläre Erkrankungen bei Männern den siebten und bei Frauen sogar den fünften Platz in der offiziellen Todesursachen-Statistik für 2008 ein (Bundesamt, 2012). In den Vereinigten Staaten von Amerika sind diese sogar noch höher positioniert und sind auf dem vierten Platz angelangt (Roger et al., 2012). Weltweit gesehen ist die Rate in Afrika, China und Südamerika am höchsten (Kim and Johnston, 2011). Gerade die Positionierung unter den häufigsten Todesursachen sollte dafür sorgen, dass pathophysiologische Veränderungen, die nach einem Schlaganfall auftreten, sehr gründlich untersucht werden

Doch auch andere Forschungsergebnisse deuten an, welche große gesellschaftliche Bedeutung diese Erkrankung hat. So konnte in einer Studie aus dem Jahr 2012 gezeigt werden, dass die Inzidenz von ischämischen Schlaganfällen sich in den letzten Jahren deutlich verändert hat (Kissela et al., 2012). Zwar nahm die Wahrscheinlichkeit des Auftretens bei älteren Personen ab, was eine wünschenswerte Entwicklung darstellt, doch parallel kam es zu einem Anstieg bei den Jüngeren.

Parallel wurden in großen Studien auch typische vaskuläre Risikofaktoren und deren Zusammenhang mit dem Auftreten von Schlaganfällen untersucht. Besonders Faktoren wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Vorhofflimmern oder Nikotinkonsum spielen eine große Rolle bei der Entstehung. Passend dazu konnte nachgewiesen werden, dass eine entsprechende Optimierung dieser Faktoren einen positiven Einfluss hat (Goldstein et al., 2011; O'Donnell et al., 2010). Weitere Punkte, zu denen auch Übergewicht, Alkoholkonsum oder mangelnde körperliche Aktivität gehören, sind ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für Schlaganfälle assoziiert (Goldstein et al., 2011).

Die meisten Daten beziehen sich auf den häufigeren ischämischen Schlaganfall. Doch Faktoren wie Bluthochdruck, Alkohol- bzw. Nikotinkonsum, Fettstoffwechselstörungen oder

Diabetes mellitus spielen auch bei einem hämorrhagischen Schlaganfall eine wichtige Rolle (O'Donnell et al., 2010; Zia et al., 2006).

1.1.2. ischämischer Schlaganfall

Der ischämische Schlaganfall, der durch eine Durchblutungsstörung im Gehirn entsteht, macht mit ca. 80% den größten Anteil aller Schlaganfälle aus. Es gibt mikroangiopathische, makroangiopathische, kardio-embolische und weitere Ursachen. Bei der Regeneration der entstandenen Schäden könnten endotheliale Vorläuferzellen eine Rolle spielen.

Pathophysiologisch gesehen folgt auf diese Durchblutungsstörung eine Reihe von Veränderungen, die alle mit dem Abfall der lokalen Sauerstoffkonzentration auf Grund des Sistierens der Blutversorgung zusammenhängen. So nimmt der Energiegehalt der Zellen rapide ab, daraus folgend gerät die Regulation des Elektrolythaushaltes außer Kontrolle und letztendlich sammeln sich freie Radikale und Apoptose fördernde Zytokine an. Die Zellen sterben ab. Diese Vorgänge betreffen sowohl Neurone als auch Endothelzellen der zerebralen Blutgefäße, weswegen auch die Bluthirnschranke beschädigt wird.

Auf diese Weise entstehen im betroffenen Teil des Gehirns zwei Bereiche. Zum einen der Infarktkern - ischämisches Gewebe - in dem die Zellen unwiderruflich geschädigt sind; zum anderen die Penumbra - hypoxisches Gewebe - welches noch gerettet werden kann. Viele Möglichkeiten zum Eindämmen der Schwere eines ischämischen Schlaganfalles zielen darauf ab, genau dieses hypoxische jedoch prinzipiell noch funktionsfähige Gewebe der Penumbra zu retten. Die therapeutischen Möglichkeiten versuchen dies durch eine schnelle Verbesserung der Sauerstoffversorgung, einerseits durch intraarterielle bzw. intravenöse Fibrinolyse, andererseits mit Hilfe von mechanischen Methoden zur Entfernung des Thrombus.

Weiterhin wird physiologischerweise im Bereich der Penumbra die Neubildung von Gefäßen angeregt (Krupinski et al., 1994) und gerade für diesen Prozess können endotheliale Vorläuferzellen eine wichtige Rolle spielen.

1.1.3. hämorrhagischer Schlaganfall

Die hämorrhagischen Formen des Schlaganfalles sind insgesamt seltener als die ischämische Form. Die hämorrhagischen Formen des Schlaganfalles sind die Subarachnoidalblutung (SAB) und die intrazerebrale Blutung (ICB). Insgesamt kommt dabei die ICB ungefähr doppelt so häufig wie die SAB vor (Broderick et al., 1993).

Beiden Erkrankungen gemeinsam ist die Ruptur von zerebralen Blutgefäßen mit anschließendem Eindringen von Blut in die umgebenden Strukturen. Auf die daraus resultierende notwendige Reparatur der geschädigten Gefäße könnten endotheliale Vorläuferzellen einen Einfluss haben.

Ungefähr 15% aller Patienten mit einem Schlaganfall erleiden eine intrazerebrale Blutung (Foerch et al., 2008). Gerade diese Form eines Schlaganfalles ist mit einer hohen Mortalität assoziiert. So sterben bis zu 50% aller betroffenen Patienten innerhalb von drei Monaten nach dem Ereignis, innerhalb eines Jahres sogar bis zu 60% (Sacco et al., 2009).

Man unterscheidet zwei Untergruppen der ICB. Als spontane intrazerebrale Blutung werden alle Fälle bezeichnet, bei denen es auf Grund von hypertonieassoziierten Schäden an den intrazerebralen Gefäßwänden zu einer Einblutung in das Hirnparenchym kommt. Nach Ruptur des Gefäßes sickert dann Blut in das umliegende Gewebe, häufig im Bereich der Basalganglien, und schädigt auf diese Weise die Zellen. Im Gegensatz dazu werden die Fälle als sekundäre intrazerebrale Blutung bezeichnet, bei denen eine andere Grunderkrankung als die Hypertonie nachgewiesen werden kann. Beispielsweise kommen dafür zerebrale Vaskulitiden, Gefäßmissbildungen, Sinusvenenthrombosen oder Tumore in Frage.

Eine spontane nicht traumatische Subarachnoidalblutung liegt bei ca. 5% aller Schlaganfälle vor. Die Mehrzahl (ca. 85%) aller Fälle beruht dabei auf einer Ruptur eines intrakraniellen arteriellen Aneurysmas und dem daraus resultierenden Eindringen von Blut in den Liquorraum. Typischerweise sind betroffene Patienten im Vergleich zu den anderen Schlaganfalltypen mit einem mittleren Lebensalter von 50 Jahren relativ jung. Die Letalität beträgt bis zu 35% innerhalb des ersten Monats nach dem Ereignis (Feigin et al., 2009).

1.2. Vorläuferzellen

1.2.1. Grundlagen

Als Stammzellen wird eine Gruppe von Zellen bezeichnet, die die Möglichkeit zur Ausdifferenzierung in verschiedene Gewebetypen hat. Vorläuferzellen sind eine Subgruppe dieser Zellen mit einem sehr beschränkten Differenzierungspotential. Im Rahmen von Schlaganfällen können diese Zellen möglicherweise einen wichtigen Beitrag zur physiologischen Reparatur leisten.

Während in der Embryonalzeit noch eine Pluripotenz, die Fähigkeit der Ausdifferenzierung in einige Zelltypen, besteht, wird diese Fähigkeit im Zuge der Entwicklung immer weiter eingeschränkt. Bereits adulte Stammzellen können nur noch in ein relativ eingeschränktes Spektrum von Zellen ausdifferenzieren. Vorläuferzellen, die einen weiteren Schritt in der Entwicklung darstellen, besitzen folglich ein noch beschränkteres Differenzierungspotential. 1997 wurden von Asahara erstmals zirkulierende Vorläuferzellen beschrieben, die unter experimentellen Bedingungen in der Lage waren neue Blutgefäße zu bilden (Asahara, 1997). Des Weiteren waren diese Zellen in der Lage die Angiogenese bzw. Vaskulogenese zu beeinflussen und die Erneuerung des verletzten Endothels von Blutgefäßen anzuregen (Hristov et al., 2003). In diesem Zusammenhang stellen Vorläuferzellen möglicherweise einen physiologischen Reparaturmechanismus dar.

1.2.2. Klassifikationssysteme

Adulte Stammzellen konnten bis jetzt in verschiedensten Gewebetypen des Menschen nachgewiesen werden, so zum Beispiel im Blut und Knochenmark. Dabei beträgt der Anteil im Knochenmark nur 0,1% aller vorhandenen Zellen (Tsai et al., 2009). Eine grobe Aufteilung der adulten Stammzellen erfolgt in die Kategorien hämatopoetische und nicht-hämatopoetische, sogenannte mesenchymale Stammzellen.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind typischerweise negativ für die Oberflächenmarker Cluster of differentiation (CD) 34 und 45. In vitro zeigte sich, dass diese Zellen die Fähigkeit besitzen zu proliferieren und sich in Adipozyten, Chondrozyten, Fibrozyten, Myozyten oder Osteozyten zu differenzieren. Folglich stellen sie einen Weg des körpereigenen Reparaturmechanismus nach Gewebeverletzungen dar (Chamberlain et al., 2007).

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSC) können sich in alle Zellen, der hämatopoetischen Linie differenzieren. Da sie positiv für den Oberflächenmarker CD34 sind,

kann dieser zur Unterscheidung von MSC heran gezogen werden. CD34 ist ein membranständiges Molekül, welches aber auch bei Endothelzellen vorkommt (Brown et al., 1991; Fina et al., 1990).

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass sich hämatopoetische Vorläuferzellen auch in nicht-hämatopoetisches Gewebe, wie Muskulatur und Endothelien, entwickeln können (Camargo et al., 2003; Yeh et al., 2003). Experimentell wurde dies 1997 von Asahara beschrieben (Asahara, 1997), als es erstmalig gelang, bestimmte zirkulierende Vorläuferzellen zu isolieren. Diese Zellen trugen den Oberflächenmarker CD34, welcher auf HSC jedoch nicht auf MSC nachweisbar ist. Dennoch waren diese Zellen in vitro in der Lage sich in Endothelzellen zu differenzieren und neue Gefäßstrukturen zu bilden.

Ein weiterer Marker, zur Differenzierung von Vorläuferzellen, die das Potential haben sich in Endothelzellen zu entwickeln, ist CD133. Dieses transmembranale Glykoprotein ist sowohl auf Stammzellen als auch auf Vorläuferzellen vorhanden, wird jedoch nicht auf Endothelzellen exprimiert (Handgretinger et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass CD133⁺ Zellen sich in reife Endothelzellen differenzieren können und bei diesem Prozess den Oberflächenmarker CD133 verlieren (Gehling et al., 2000). Auf diese Weise ist es wiederum möglich im Blut zirkulierende Vorläuferzellen von reifen Endothelzellen zu unterscheiden.

1.2.3. spezifische Marker endothelialer Vorläuferzellen

Wie bereits oben beschrieben ist CD34 ein Oberflächenmarker, der sowohl auf hämatopoetischen Stammzellen als auch auf Endothelzellen exprimiert wird (Brown et al., 1991; Fina et al., 1990). Obwohl dieser Marker im Zuge der Ausreifung der Zellen abnimmt, kann es zu einer Verfälschung von Messergebnissen kommen. Mit Hilfe von CD133, welches nicht auf reifen Endothelzellen exprimiert wird, ist es möglich, die gesuchten Zellen genauer einzugrenzen (Handgretinger et al., 2003). Als dritter Marker zur Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen ist der vascular endothelial growth factor - Rezeptor-2 (VEGFR₂). Dieser Rezeptor wird auf reifen Endothelzellen ausgebildet (Karkkainen and Petrova, 2000; Urbich and Dimmeler, 2004).

Als endotheliale Vorläuferzellen (EPC) werden Zellen bezeichnet, die positiv für CD34 bzw. CD133 sind, also noch Eigenschaften von Stammzellen besitzen, und gleichzeitig VEGFR₂ exprimieren, welches sich auf reifen Endothelzellen nachweisen lässt (Urbich and Dimmeler, 2004). Diese Zellen haben folglich die Möglichkeit zu Endothelzellen heranzureifen, tragen aber charakteristische Oberflächenmarker sowohl von Stamm- als auch von Endothelzellen.

Dabei unterscheidet man noch zwei Unterformen. Als frühe endotheliale Vorläuferzellen werden CD34⁺/CD133⁺ Zellen bezeichnet, während das Auftreten des Endothelmarkers VEGFR₂ bereits für eine deutlichere Differenzierung spricht (Grundmann et al., 2007). Der Anteil der Zellen, die alle drei Marker besitzen - CD34⁺/CD133⁺/VEGFR₂⁺ - ist sehr gering. In der Literatur werden nur 0,002% aller zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen als dreifach positiv eingeschätzt (Peichev et al., 2000) (Tab. 1).

Tabelle 1: typische Marker endothelialer Vorläuferzellen und Darstellung des Differenzierungsgrades von endothelialen Vorläuferzellen abhängig von den Oberflächenmarkern

	Vorkommen	Differenzierungsgrad	
CD34	hämatopoetische Stamm- / Vorläuferzellen Endothelzellen	frühe EPC	späte EPC
CD133	hämatopoetische Stamm- / Vorläuferzellen		
VEGFR₂	Endothelzellen		

1.2.4. Mobilisierung und Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen

Die Freisetzung (Mobilisierung) und Hinführung zum Zielort (Rekrutierung) der endothelialen Vorläuferzellen kann von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst werden.

So werden bei Patienten mit ischämischen Ereignissen, wie Myokardinfarkt oder Extremitätenischämie, erhöhte Konzentrationen gefunden (Shintani et al., 2001; Takahashi et al., 1999). Dies wurde sowohl für CD34⁺/CD133⁺, als auch für CD34⁺/VEGFR₂⁺ Vorläuferzellen bestätigt (Grundmann et al., 2007). Zusätzlich kommt es auch bei Gefäßverletzungen zu einem Anstieg (Shintani et al., 2001; Takahashi et al., 1999). Als Ursache für den Anstieg kommt einerseits die Ischämie bzw. das Trauma an sich, andererseits die sich anschließende Entzündungsreaktion in Frage (Schomig et al., 2006). Auch verschiedene Medikamente besitzen einen positiven Einfluss auf die zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen. So fördert zum Beispiel die Gabe von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern (Statine) deren Mobilisierung (Vasa et al., 2001a). Ähnliches ist auch von den Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) - γ -Agonisten (Insulin-Sensitizer) bekannt,

die auch die Reendothelialisierung nach Gefäßinterventionen fördern (Wang et al., 2004). Auch bestimmte Wachstumsfaktoren, wie Erythropoetin (EPO) (Bahlmann et al., 2004), Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (Takahashi et al., 1999) oder Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Kalka et al., 2000) können die Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen fördern. Dies ist auch für das Chemokin stromal cell derived factor - 1 (SDF-1) bekannt, welches zusätzlich bei der Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen mitwirkt (Yamaguchi, 2003).

Ein Anstieg von endothelialen Vorläuferzellen wurde ebenfalls bei körperlicher Aktivität eines Patienten beobachtet (Laufs et al., 2004) (Tab. 2).

Im Gegensatz zu den oben genannten Einflussfaktoren nimmt die Zahl der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder atherosklerotischen Gefäßveränderungen ab (Hill et al., 2003; Vasa et al., 2001b). So ist eine hohe Punktzahl im „Framingham Risk Factor Score“, mit dem sich das Risiko für einen zerebralen Infarkt mit Hilfe von Faktoren wie Alter, Nikotinkonsum oder arterieller Hypertonie einschätzen lässt, mit einer erniedrigten Zahl von endothelialen Vorläuferzellen im Blut assoziiert (Hill et al., 2003).

Als Ursache für diesen Effekt kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. So könnte die Lebenszeit der Vorläuferzellen reduziert oder die Mobilisierung aus dem Knochenmark vermindert sein. Zusätzlich wäre auch ein erhöhter Verbrauch bei der Regeneration beschädigter Gefäße denkbar (Shintani et al., 2001) (Tab. 2).

Tabelle 2: Beispiele für Einflussfaktoren auf die Mobilisation von endothelialen Vorläuferzellen

Zunahme	Abnahme
<u>pathologische / physiologische Faktoren</u> Ischämien, Trauma, körperliche Aktivität	<u>pathologische Faktoren</u> kardiovaskuläre Risikofaktoren (z.B. Nikotinkonsum, Diabetes mellitus, Übergewicht, Hypercholesterinämie, Alter)
<u>Hormone / Medikamente</u> Statine, PPAR- γ -Agonisten	
<u>Chemokine / Wachstumsfaktoren</u> EPO, HIF-1, SDF-1, VEGF, G-CSF	

Neben der Mobilisierung zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen spielt auch die Rekrutierung, was auch als Homing bezeichnet wird, eine entscheidende Rolle.

Zuerst müssen die Zellen zum Ort der Schädigung gelenkt werden. In diesem Zusammenhang spielt Chemokin stromal cell derived factor - 1 (SDF-1) eine entscheidende Rolle (Ceradini et al., 2004). Im Normalzustand ist der Spiegel in Blut, Knochenmark oder anderen Geweben nur gering (Lapidot et al., 2005; Tilling et al., 2009). Nach Hypoxie wird SDF-1, genauso wie VEGF, mit Hilfe des hypoxia-inducible factor (HIF) - 1 in den betroffenen Arealen hochreguliert (Ceradini et al., 2004; Kelly et al., 2003). Somit ist es den aus dem Knochenmark freigesetzten endothelialen Vorläuferzellen möglich, dem Konzentrationsgradienten zum Zielort zu folgen.

Der bis jetzt einzig bekannte Rezeptor für SDF-1 ist der C-X-C-motiv-rezeptor-4 (CXCR₄) (Yamaguchi, 2003). Dieser Oberflächenmarker wird wiederum verstärkt auf zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen exprimiert und kann auf diese Weise das Homing beeinflussen (Stellos et al., 2008). Es wurde herausgefunden, dass die Anzahl der CXCR₄⁺ endothelialen Vorläuferzellen, indirekt proportional mit dem Sauerstoffpartialdruck im geschädigten Gewebe korreliert (Ceradini et al., 2004). Das Zusammenspiel von CXCR₄ und SDF-1 spielt bereits in der Embryogenese für die Entwicklung der Blutgefäße eine Rolle (Tachibana et al., 1998). Aus allen diesen Gründen nimmt man an, dass die Interaktion von CXCR₄/SDF-1 wesentlich zum Homing der endothelialen Vorläuferzellen beiträgt (Hill et al., 2004; Yamaguchi, 2003).

Auf diese Weise stellt das Ausmaß der Expression von CXCR₄ einen Aktivitätsmarker für endotheliale Vorläuferzellen dar.

Die eigentliche Anheftung an die Gefäßwand (Adhäsion) und die sich anschließende Durchwanderung (Transmigration) werden durch Integrine, wie zum Beispiel mit Hilfe des β_2 -Integrins, gesteuert (Chavakis et al., 2005).

1.2.5. physiologische Aufgaben endothelialer Vorläuferzellen

Bisher wurde angenommen, dass bei der Reparatur von ischämischen Gewebeanteilen nur Angiogenese stattfindet. Darunter versteht man das Aussprosseln neuer Verzweigungen aus bereits vorhandenen Kapillaren mittels Migration bzw. Proliferation reifer Endothelzellen. Bisher vermutete man, dass eine Vaskulogenese - Neubildung von Gefäßen - nur in der Embryonalperiode möglich wäre. Es wurde jedoch bewiesen, dass in vivo auch postnatal zirkulierende Vorläuferzellen in der Lage sind die Bildung neuer Gefäße anzustoßen (Asahara, 1997).

Vorläuferzellen stellen folglich eine physiologische Möglichkeit des Körpers zur Revaskularisierung dar. Sie ermöglichen die Neubildung von Gefäßen und beeinflussen möglicherweise die Angiogenese. Zusätzlich können diese Zellen Zytokine ausschütten, die Reparaturmechanismen beschleunigen. Bis jetzt wurde dies in vitro für Interleukin 8 und VEGF nachgewiesen, die beide die Gefäßneubildung fördern (Schomig et al., 2006; Yoon et al., 2005).

Auf diese Weise wäre eine schnelle Reparatur von geschädigten Endothelabschnitten möglich, so dass das Endothel wieder seinen physiologischen Aufgaben nachkommen kann. Nur intaktes Endothel ist in der Lage, die Anhaftung von Leukozyten bzw. Thrombozyten zu verhindern und gleichzeitig eine optimale Sauerstoffversorgung zu ermöglichen (Cines et al., 1998).

Im Gehirn sind die endothelialen Vorläuferzellen noch an weiteren Reparaturmechanismen beteiligt. So werden neuronale Stammzellen auch mit Hilfe von SDF-1/CXCR₄ und VEGF zur Migration in geschädigtes Gewebe angeregt (Imitola et al., 2004; Schanzer et al., 2004). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass neuronale Stammzellen bevorzugt entlang von neuen Blutgefäßen in das geschädigte Gewebe einwandern (Ohab et al., 2006; Thored et al., 2007). Das Zusammenspiel von SDF-1/CXCR₄ und VEGF zusammen mit dem Einwandern von neuronalen Stammzellen und endothelialen Vorläuferzellen sorgt für ein optimales Umfeld für die Regeneration von Blutgefäßen und Parenchym.

1.3. Veränderungen des Immunsystems nach einem Schlaganfall

Mit die häufigsten Komplikationen nach einem Schlaganfall sind Infektionen, insbesondere Pneumonien und Harnwegsinfekte (Chamorro et al., 2012; Westendorp et al., 2011). Doch gerade solche Komplikationen verschlechtern das klinische Outcome von Schlaganfallpatienten (Finlayson et al., 2011; Popovic et al., 2013).

Zum genaueren Verständnis der erhöhten Infektionsrate nach einem Schlaganfall ist es wichtig, die Veränderungen bei Interleukinen und Immunzellen zu verstehen.

1.3.1. Grundlagen des Immunsystems

Das Immunsystem wird in das angeborene und das adaptive Immunsystem aufgeteilt.

Als angeborenes bzw. unspezifisches Immunsystem werden alle seit der Geburt bestehenden Möglichkeiten zur sofortigen Abwehr von Pathogenen zusammengefasst. Dazu gehört beispielsweise eine schützende Hornhautschicht des Körpers oder die vorsorgliche Freisetzung von bakteriziden Substanzen. Auch bestimmte Immunzellen werden diesem Abwehrsystem zugeordnet, wie die Makrophagen bzw. Monozyten oder die „natürlichen Killerzellen“ (NK-Zellen).

Das adaptive bzw. spezifische Immunsystem dagegen reagiert erst mit einer Verzögerung auf das Eindringen von Pathogenen. Dies beruht darauf, dass die beteiligten Immunzellen, insbesondere B- und T-Zellen, erst über ein komplexes System aktiviert werden müssen. Nach der Aktivierung werden dann von den in Plasmazellen umgewandelten B-Zellen gegen das Pathogen spezifische Antikörper gebildet.

1.3.2. Veränderung der Zellfunktion

Auch bei anderen schwerwiegenden Erkrankungen wie zum Beispiel nach einem Herzinfarkt, einem Polytrauma oder nach einer größeren Operation wurde bereits vor einigen Jahren eine Immunsuppression beschrieben (Docke et al., 1997; Livingston et al., 1988; Woiciechowsky et al., 1998). Dies führte jeweils zu einem erhöhten Risiko für Komplikationen auf Grund von Infektionen.

Ähnliches wurde auch bei Patienten, die einen Schlaganfall erlitten haben, nachgewiesen. So treten bei diesen Patienten vermehrt Infektionen, vor allem Pneumonien oder

Harnwegsinfekte, auf (Stott et al., 2009). Diese Erkrankungen, insbesondere Pneumonien, verschlechtern das klinische Outcome und führen zu einer erhöhten Sterblichkeit (Katzan et al., 2003; Vermeij et al., 2009). Aus klinischer Sicht erscheint zwar eine erhöhte Infektionsrate logisch, da Schlaganfallpatienten in der akuten Phase häufig bettlägrig sind, mit Kathetern versorgt werden oder an Dysphagie leiden. Dennoch kann beispielsweise eine Aspiration allein nicht die hohe Rate an Pneumonien erklären (Perry and Love, 2001). So treten auch bei Gesunden in der Nacht häufig Aspirationen auf, die aber nicht zu Pneumonien führen (Marik, 2001).

Als mögliche Erklärung der erhöhten Infektionsrate wurde bereits 1979 in einer Studie das Auftreten einer Lymphozytopenie nach Schlaganfällen gesehen (Czlonkowska et al., 1979). Erst zwei Jahrzehnte später wurden dann im Tiermodell eine mögliche Erklärung genauere Beweise für diesen Zusammenhang gefunden: Bei Mäusen wurde eine zerebrale Ischämie mit Hilfe eines artifiziellen Verschlusses der A. cerebri media hervorgerufen. Diese Mäuse erkrankten häufiger an pulmonalen Infektionen, die von einer massiven lymphozytären Apoptose in Milz und Thymus begleitet wurden (Prass et al., 2003).

Die nach einem Schlaganfall eintretende Immunsuppression beinhaltet mehrere Komponenten. So steigt zwar die Zahl der Monozyten an, aber die Zellaktivität, gemessen an der Expression von Human Leukocyte Antigen Typ DR (HLA-DR), sinkt deutlich ab (Urta et al., 2009a). Zusätzlich kommt es zu einer Lymphozytopenie mit Abnahme der Zahl an T-Lymphozyten (T-Zellen) (Urta et al., 2009b). Der klinische Effekt dieser Abnahme ist noch unklar.

Eine Arbeitsgruppe zeigte, dass nach einer gezielten Zerstörung dieser Zellen das Volumen des geschädigten Hirngewebes nach einer experimentell ausgelösten Ischämie im Tierversuch vergrößert ist. Außerdem wird durch das Fehlen von regulatorischen T-Zellen (Treg) die Immunantwort gehemmt, was eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen nach einem Schlaganfall verursacht. (Liesz et al., 2009)

Dagegen zeigte eine andere Arbeit anhand eines Mausmodells, dass eine selektive Zerstörung von Treg das Infarktvolumen deutlich reduzierte und zusätzlich das klinische Outcome nach 24 Stunden erheblich verbesserte (Kleinschnitz et al., 2012).

Auf Grund dieser Veränderungen nach einem Schlaganfall und der daraus resultierenden Anfälligkeit für Infektionen, wurde eine präventive Gabe von Antibiotika diskutiert. Man konnte zwar eine geringere Rate von Infektionen nachweisen, jedoch fand sich kein Effekt auf das klinische Outcome, das Gesamtüberleben oder die Dauer des Klinikaufenthaltes (Harms et al., 2008; Westendorp et al., 2015). Klinisch scheint nicht das Ausmaß an Immunsuppression entscheidend zu sein, sondern die Fähigkeit sich innerhalb von 24 Stunden wieder davon zu erholen. Diese Fähigkeit bestimmt das Risiko für die Entwicklung

von schwerwiegenden Infektionen (Vogelgesang et al., 2008). Möglicherweise spielt neben den zellulären Veränderungen auch die Ausschüttung von Hormonen und Zytokinen eine wichtige Rolle dabei.

1.3.3. Veränderung bei Hormonen und Zytokinen

Nach einem Schlaganfall kommt es neben der Beeinflussung der Zellfunktion noch zu einigen anderen Prozessen, die Veränderungen im Immunsystem bewirken.

So finden sich kurz nach einem Schlaganfall deutlich erhöhte Werte von Cortison und Katecholaminen (Klehm et al., 2009; Urra et al., 2009b; Vogelgesang et al., 2008). Auf Grund dieser erhöhten Hormonausschüttung könnten die oben beschriebenen Veränderungen der zellulären Immunantwort hervorgerufen werden. Dies wird dadurch bestätigt, dass bei Patienten mit erhöhten Werten für TNF α auch die Rate von Infektionen zunimmt (Haeusler et al., 2008). Somit könnte eine Blockierung der übermäßigen Hormonausschüttung das klinische Outcome positiv beeinflussen. Eine mögliche Umsetzung einer Blockade der übermäßigen Hormonausschüttung wurde mit Hilfe eines Mausmodells demonstriert (Prass et al., 2006). Die Behandlung mit Propranolol, einem Inhibitor β -adrenerger Rezeptoren, senkte interessanterweise die Infektionsrate und das Blocken der Steroidwirkung reduzierte die Apoptoserate von Lymphozyten.

Die Zytokine Interleukin – 6 (IL-6) und IL-8 werden beide von Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildet. Das entzündungsfördernde IL-6 gehört zu der „Akute Phase Reaktion“ und dessen Freisetzung wird durch Antigene oder auch durch IL-1 stimuliert. Nach einem Schlaganfall steigen die Serumspiegel von IL-6 an (Klehm et al., 2009; Vogelgesang et al., 2010). Dies konnte auch bei einem Myokardinfarkt oder bei einer instabilen Angina Pectoris beobachtet. Ein Anstieg war jedoch mit einer schlechteren klinischen Prognose verbunden (Biasucci et al., 1996; Kosmala et al., 2005). Andererseits konnten IL-6 über verschiedene komplexe Signalwege auch neuroprotektive Funktionen zugeordnet werden (Suzuki et al., 2009) (Tab. 3).

Eine weitere wichtige Rolle spielt IL-8. Dieses ist ebenfalls entzündungsfördernd und hat zusätzlich Angiogenese-fördernde Eigenschaften (Lapidot and Petit, 2002). Weiterhin ist für IL-8 bekannt, dass es die Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen fördert (Fibbe et al., 2000; Laterveer et al., 1995). So konnte in einer Studie eine positive Korrelation zwischen der Anzahl endothelialer Vorläuferzellen und den Serumspiegeln von IL-8 gezeigt werden (Schomig et al., 2006) (Tab. 3).

Weiterhin können nach einem zerebralen Infarkt erhöhte Spiegel von IL-10, welches meist entzündungshemmend wirkt, gemessen werden (Klehmet et al., 2009; Vogelgesang et al., 2008). Die Werte für den multifunktionalen Entzündungsmediator Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α), welcher normalerweise von aktivierten Monozyten freigesetzt wird, sinken nach einem Schlaganfall ab (Haeusler et al., 2008; Prass et al., 2006).

Diese Veränderungen bei den Zytokinen führen möglicherweise zu einer Störung der Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen des Immunsystems. Dies könnte wiederum die Anfälligkeit für Infektionen erhöhen.

Tabelle 3: Funktionen und Wirkungen von Interleukin 6 bzw. Interleukin 8 nach einem Schlaganfall

Interleukin 6	Interleukin 8
aus Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen freigesetzt	
entzündungsfördernd	
erhöhte Serumspiegel mit schlechterem klinisches Outcome assoziiert	erhöhte Serumspiegel mit erhöhter Anzahl zirkulierender Endothelialer Vorläuferzellen korreliert
neuroprotektive Funktionen	angiogenetische Funktionen

1.4. Grundlagen der Durchflusszytometrie

1.4.1. Prinzipien

Die Grundlage der Messung an einem Durchflusszytometer besteht in der Möglichkeit bestimmte optische Signale, wie Fluoreszenz und Lichtstreuung, einer Zelle beim Durchtritt durch einen Laserstrahl zu messen. Um dies zu erreichen sind vor allem die Expressierung von spezifischen Oberflächenmarkern auf Zellen und die Möglichkeit der Anregung von Fluoreszenz notwendig.

Alle Zellen besitzen die Eigenschaft bestimmte Oberflächenmarker zu exprimieren, die abhängig von Entwicklungsstufe und Art der Zellen sind. Um bestimmte Zellen unterscheiden zu können, werden bestimmte Oberflächenmarker ausgewählt und mit spezifischen Antikörpern markiert. Diese Oberflächenmarker werden als Cluster of Differentiation (CD) und einer entsprechender Zahl oder nach einem spezifischen Eigennamen bezeichnet. Die Größe einer Zelle und die Oberflächenstruktur beeinflussen die Lichtstreuung beim Durchtritt durch einen Laserstrahl.

Als Fluoreszenz bezeichnet man die chemische Eigenschaft bestimmter Moleküle, der Flurochrome, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren. Diese zusätzliche Energie ermöglicht es Elektronen kurzzeitig ein höheres, aber instabiles Energieniveau zu erreichen. Beim Verlassen dieses Energieniveaus wird die davor aufgenommene Energie in Form von Photonen mit einer bestimmten Energie wieder abgegeben. Das emittierte Licht kann mit Hilfe von Detektoren gemessen werden.

1.4.2. Technischer Aufbau

Ein Durchflusszytometer besteht aus mehreren Komponenten. Die wichtigsten sind das Flüssigkeitssystem, die Optik und die Signalverarbeitung (Abb. 1).

Im Flüssigkeitssystem wird die zu messende Zellsuspension mit Überdruck aus dem Probenröhrchen angesaugt und mit einer Trägerflüssigkeit verdünnt. Gleichzeitig vermindert sich der Querschnitt der Messküvette. Das Zusammenspiel beider Faktoren ermöglicht zum einen eine Trennung von Zellaggregaten, zum anderen wird auch der Abstand zwischen den einzelnen Zellen vergrößert. Dieses Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung ermöglicht eine getrennte Messung einzelner Zellen.

Die Optik setzt sich aus einem Anregungs- und einem Detektionsteil zusammen.

Der Anregungsteil besteht zum einen aus einem luftgekühlten Argonlaser (Wellenlänge $\lambda = 488\text{nm}$), einem Diodenlaser (Wellenlänge $\lambda = 635\text{nm}$) zur Fluoreszenzanregung und zum anderen aus Prismen zur Fokussierung.

Der Detektionsteil misst einmal axial zum anregenden Lichtstrahl das Vorwärtsstreulicht. Der zweite Messbereich ist senkrecht zum Lichtstrahl angeordnet und ermöglicht, über ein System aus Spiegeln und Filtern, die Messung von Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenz. Als Detektoren werden Photomultiplier zur Verstärkung des Signals verwendet.

Mit Hilfe dieses Aufbaues können folgende Parameter einer Zelle gemessen werden:

- Relative Größe (Vorwärtsstreulicht / Forward scatter – FSC)
- Relative Granularität (Seitwärtsstreulicht / Side scatter – SSC)
- Spezifische Fluoreszenz der mit Hilfe eines fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpers markierten Zelle. Die Standardfluoreszenzfarbstoffe sind, in alphabetischer Reihenfolge, APC (Allophycocyanin), APC-Cy7 (APC mit Tandemkonjugat Cy7), FITC (Fluoresceinisothiozyanat), PE (Phycoerythrin), PE-Cy7 (PE mit Tandemkonjugat Cy7), PerCP (Peridin-Chlorophyll-A Protein), PE-TR (Phycoerythrin – Texas Red; auch energy coupled dye, ECD), VM (V450).

Abschließend ermöglicht die Signalverarbeitung die Umwandlung von optischen Signalen in Spannungsimpulse, die der eingestrahlten Intensität entsprechen. Danach erfolgt die Digitalisierung der Daten und Übermittlung an den Computer.

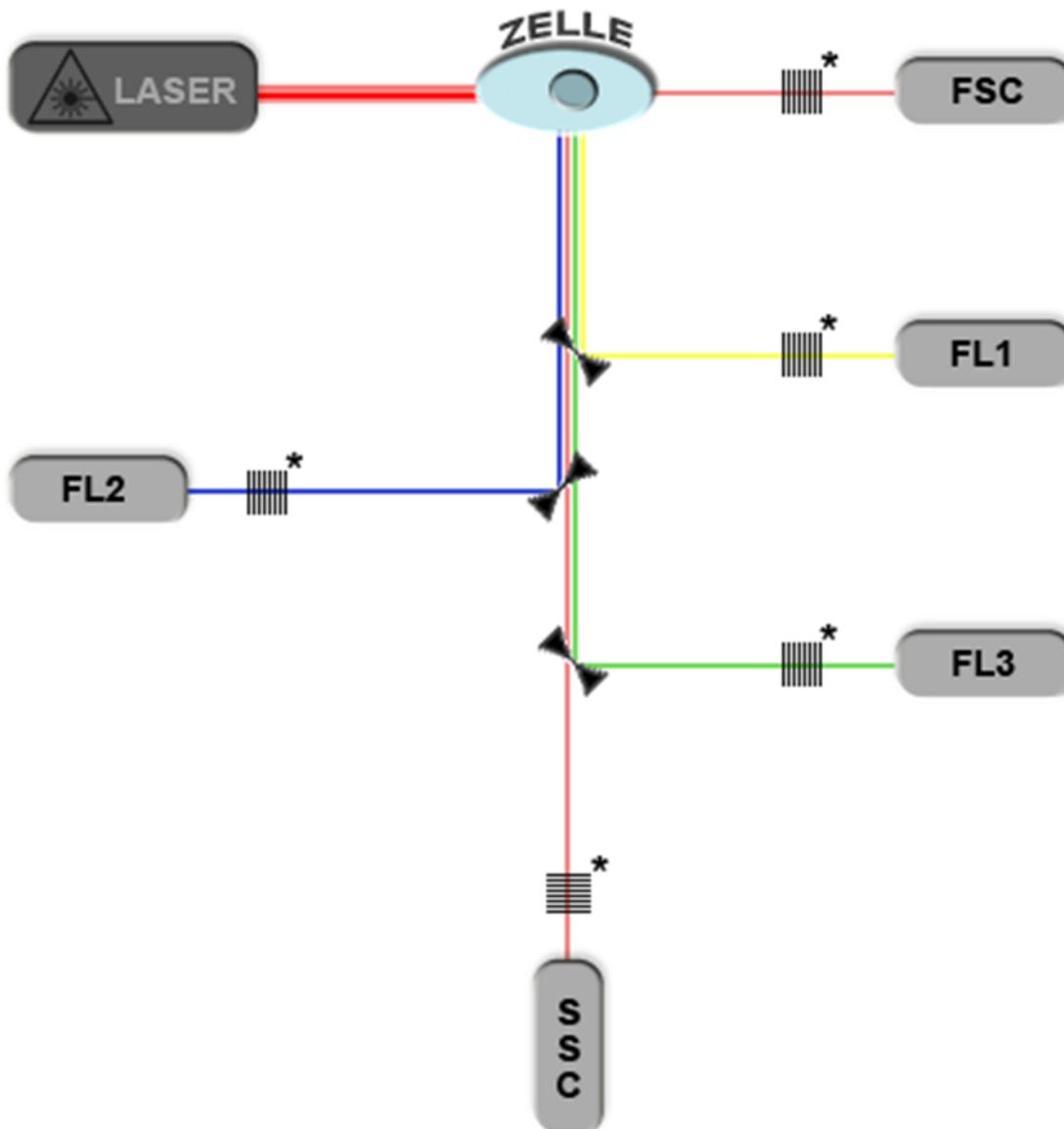


Abbildung 1: schematischer Aufbau des optischen Systems eines Durchflusszytometers

Die Fluoreszenzanregung erfolgt mittels eines Lasers.

Axial zum anregenden Lichtstrahl erfolgt die Messung des **Vorwärtsstreulichts (FSC)**. Senkrecht zum anregenden Lichtstrahl erfolgt einerseits die Messung der **Seitwärtsstreulichts (SSC)** und andererseits der unterschiedlichen **Fluoreszenz-Kanäle (FL1, FL2, FL3)**. Der Lichtstrahl wird durch semitransparente Spiegel abgelenkt.

(* Filter)

1.5. Zielsetzung

Das primäre Ziel dieser Studie war der Nachweis eines Anstieges der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt nach dem akuten Ereignis. Weiterhin sollte gezeigt werden, dass es auch bei Patienten mit einer intrazerebralen Blutung oder einer Subarachnoidalblutung zu einem Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen kommt.

Als weitere Ziele sollten folgende Aspekte untersucht werden:

- Der initiale Serumspiegel von Interleukin 6 und Interleukin 8 korreliert mit der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung.
- Der initiale Anteil von CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺) und B-Zellen (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁺) korreliert mit der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung.
- Die Veränderungen bei Monozyten (CD45⁺/CD14⁺), NK-Zellen (CD45⁺/CD56⁺) und Plasmazell-Blasten (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁺) sollten bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung deskriptiv beschrieben werden.

2. Material und Methodik

2.1. Ablauf der Studie

In diese Studie wurden Patienten eingeschlossen, die entweder einen zerebralen Infarkt, eine Subarachnoidalblutung oder eine intrazerebrale Blutung erlitten hatten und in der Neurologischen Klinik oder Neurochirurgischen Klinik der Technischen Universität München im Zeitraum von August 2009 bis März 2012 behandelt wurden.

Eingeschlossen wurden Patienten nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung, deren Symptome vor maximal 24 Stunden begonnen hatten. Patienten mit chronisch-entzündlichen, infektiösen, malignen oder schweren systemischen Erkrankungen wurden ausgeschlossen.

Allen eingeschlossenen Patienten wurde zum Nachweis von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen, von Immunzellen und von IL-6 bzw. IL-8 innerhalb der ersten 24 Stunden (entspricht dem 1. Tag) nach Symptombeginn, am 5. Tag und am 7. Tag nach Symptombeginn Blut entnommen.

Dabei wurden jeweils ein Ethylendiamintetraessigsäure- (EDTA), ein Citrat-, ein Serum- und zwei Citrat-Phosphat-Dextrose-Arginin (CPDA) – Blutentnahmeröhrchen (Monovetten, Sarstedt AG & Co., Numbrecht, Deutschland) vollständig gefüllt abgenommen.

Der Überstand der EDTA-, Citrat- und Serum-Röhrchen wurde nach erfolgter Zentrifugation eingefroren. Der Inhalt der CDPA-Röhrchen wurde umgehend weiterverarbeitet.

2.2. Laborprotokolle

2.2.1. CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen

Zum Nachweis der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen wurde der Inhalt der zwei CPDA-Röhrchen innerhalb von zwei Stunden im Labor nach folgendem Schema weiterverarbeitet.

Als erster Schritt wurde zur Anreicherung mononukleärer Zellen eine Fällung mit Ficollreagenz (Ficoll Paque PLUS, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) durchgeführt. Die in diesem Schritt isolierten Zellen werden im folgenden Laborprotokoll als **Ficoll-Zentrifugat** bezeichnet.

Dafür wurden 10 ml Ficollreagenz mit einer 1:1 Mischung aus 15ml Vollblut und 15ml Phosphatase Bufferd Saline (PBS) (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) überschichtet und anschließend bei Raumtemperatur 35 min mit 1500 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Mit diesem Verfahren gelang es die Mono-, Lympho- und Thrombozyten von den restlichen Erythro- und Granulozyten abzutrennen und in einer schmalen Schicht oberhalb des Ficollreagenzes zu sammeln. Die schmale Schicht mit Mono-, Lympho- und Thrombozyten konnte anschließend abpipettiert werden. Danach wurde das abpipettierte Ficoll-Zentrifugat zweimal mit PBS gewaschen und jeweils bei 4°C 10min mit 1200 U/min zentrifugiert.

Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das Ficoll-Zentrifugat mit 1000µl PBS aufgeschwemmt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt. Danach erfolgte mit dem Blutanalysegerät Sysmex eine Bestimmung der Zellzahl in dem Ficoll-Zentrifugat.

Anschließend erfolgte die Färbung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen des Ficoll-Zentrifugats:

Diese Methode wurde bereits in Studien der Neurologie des Klinikums Rechts der Isar verwendet (Sepp et al., 2014).

Im **ersten Röhrchen** wurden zum Nachweis von vitalen CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen

- 5µl eines Fluoreszein Isothiocyanit (FITC) - konjugierten anti-CD34-AK (Klon 8G12, BD Biosciences, San Jose, CA, USA),
- 1,25µl eines Allophycocyanin (APC) - konjugierten anti-CD45-AK (Klon 2D1, BD Bioscience, Bedfordt, MA, USA),
- 5µl eines Phycoerythrin (PE) - konjugierten anti-CD133-AK (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)

- und, zum Ausschluss avitaler Zellen, 2,5µl eines Peridinin Chlorophyll-A Protein (PerCP) - konjugierten 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD) - AK (BD Bioscience, Bedfordt, MA, USA)

mit, je nach gemessener Zellzahl (Abb. 2) unterschiedlicher Menge an Ficoll-Zentrifugat vermischt und mit PBS auf 50µl aufgefüllt.

$$\text{benötigte Menge Ficoll-Zentrifugat} = \frac{300}{\text{gemessene Zellzahl des Ficoll-Zentrifugats}}$$

Abbildung 2: Formeln zur Berechnung der benötigten Menge des Ficoll-Zentrifugat für die Färbung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen aus der am Blutanalysegerät gemessener Zellzahl des Ficoll-Zentrifugats

Der Probenansatz wurde danach auf Eis 30 min in Dunkelheit inkubiert.

Anschließend wurde die Probe mit 200µl FACS Lysing-Solution (BD Bioscience, Bedfordt, MA, USA), welche 1:10 mit Aqua destillata verdünnt war, bei Raumtemperatur 10min in Dunkelheit lysiert. Zum Schluss wurde der Probenansatz mit PBS gewaschen und bei 4°C 5min mit 1700 U/min zentrifugiert.

Als Negativkontrolle für die CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen wurden im **zweiten Röhrchen**

- 1,25µl des APC-konjugierten anti-CD45-AK

mit Ficoll-Zentrifugat aufgefüllt und wie oben beschreiben weiterverarbeitet.

Zur quantitativen Analyse der gemessenen Zellen wurden zwei weitere Probenansätze mit Vollblut durchgeführt:

Im **dritten Röhrchen** wurde eine Färbung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen, Antikörper analog wie beim ersten Röhrchen, auf 50µl mit heparinisierten venösem Vollblut aufgefüllt und auf Eis 30min in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 500µl FACS Lysing-Solution, welche 1:10 mit Aqua destillata verdünnt war, bei Raumtemperatur 10min in Dunkelheit lysiert. Zum Schluss wurde der Probenansatz mit PBS gewaschen und bei 4°C 5min mit 1700 U/min zentrifugiert.

Im **vierten Röhrchen** wurde als Negativkontrolle, Antikörper analog wie beim zweiten Röhrchen, auf 50µl mit heparinisierten venösem Vollblut aufgefüllt und wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

Nach der letzten Zentrifugation wurden **alle vier Röhrchen** identisch weiterverarbeitet.

Der Überstand wurde abgenommen. Anschließend erfolgte entweder die sofortige durchflusszytometrische Messung oder eine Fixierung der Probe mit 150µl 1%iger Paraformaldehyd (PFA) – Lösung. Nach Fixierung erfolgte die Messung spätestens am nächsten Tag.

Die Messung wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) durchgeführt. Vor der Messung des dritten Röhrchens wurde die Probe in ein TruCOUNT-Röhrchen (BD Bioscience, Bedfordt, MA, USA) überführt. Es wurde jeweils die Fluoreszenzintensität von mindestens 100.000 Ereignissen gemessen und mit Hilfe der Software CellQuest (CellQuest Pro Version 4.0, BD Biosciences, Bedfordt, MA, USA) ausgewertet (s. Kapitel 2.3.1.).

2.2.2. Einfrieren des Ficoll-Zentrifugats

Die restliche Menge Ficoll-Zentrifugat wurde für weitere Untersuchungen konserviert.

Zuerst wurde ein **Medium für B-Zellen** hergestellt. Dafür wurden

- 500ml „Roswell Park Memorial Institute“ - Zellkulturmedium - 1640 (RPMI-1640) (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) verwendet und über einen Filter
- 5ml Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep) (GIBCO, Carlsbad, CA, USA),
- 5ml L-Glutamin 200mM (100x) (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) und
- 50ml Fetales Kälberserum (FCS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) hinzugefügt.

Für das **Einfriermedium** wurden

- 30ml des davor hergestellten Medium für B-Zellen verwendet und über einen Filter
- 10ml FCS und
- 10ml Dimethyl Sulfoxid \geq 99,5% (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hinzugefügt.

Für jede Probe wurde dann 750µl Medium für B-Zellen mit dem Ficoll-Zentrifugat vermischt und zusammen mit 750µl Einfriermedium in ein Kryotube (Cryo.S, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gefüllt. Danach wurden die Proben zuerst für 24h bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff bei -198°C überführt.

2.2.3. Immunzellen

Die immunhistochemische Färbung der Immunzellen erfolgte aus dem wiederaufgetautem Ficoll-Zentrifugat und wurde von allen Proben innerhalb weniger Tage durchgeführt.

Zum Auftauen wurden die Proben einzeln langsam auf 37°C erwärmt, in 10ml 10%iges FCS übertragen und auf Eis gelagert. Als nächster Schritt wurden die Proben bei 4°C für 10min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet mit 1ml 2%igem FCS resuspendiert.

Anschließend erfolgte eine Zählung der enthaltenen Zellen in der Probe. Dafür wurde 10µl Zellgemisch mit 190µl Trypan Blue Stain (0,4%) (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) vermischt und mit Hilfe einer Wellplatte ausgezählt. Dieses Ergebnis ermöglichte dann die Bestimmung der benötigten Menge Zellgemisch für die folgende Färbung der Immunzellen (Abb. 3).

$$\mathbf{A} \quad \text{enthaltene Zellen / } \mu\text{l} = \text{gezählte Zellen} \times 50$$

$$\mathbf{B} \quad \text{Menge an Zellgemisch} = \frac{2000}{\text{enthaltene Zellen / } \mu\text{l}}$$

Abbildung 3: Formeln zur Berechnung der benötigten Menge des Zellgemisches für die Färbung der Immunzellen aus den gezählten Zellen

A: Berechnung der enthaltenen Zellen / µl aus den aus der Wellplatte gezählten Zellen

B: Berechnung der benötigten Menge Zellgemisch aus den enthaltenen Zellen

Als nächstes erfolgte die Färbung der Immunzellen aus den aufgetauten Zellen des Ficoll-Zentrifugats:

Diese Methode wurde bereits in Studien der Neurologie des Klinikums Rechts der Isar verwendet (Kowarik et al., 2014).

Dafür wurde **für jede Probe**

- 1µl eines APC mit Tandemkonjugat Cy7 (APC-Cy7) – konjugierten anti-CD3-AK (BD Bioscience, Bedfordt, MA, USA),
- 2µl eines PerCP-konjugierten anti-CD4-AK (BD Bioscience, Bedfordt, MA, USA),
- 0,5µl eines PE mit Tandemkonjugat Cy7 (PE-Cy7) – konjugierten anti-CD8-AK (Beckmann Coulter, Brea, CA, USA),
- 1,5µl eines FITC-konjugierten anti-CD14-AK (Beckmann Coulter, Brea, CA, USA),

- 1,5µl eines Phycoerythrin – Texas Red (PE-TR; auch energy coupled dye, ECD) – konjugierten anti-CD19-AK (Beckmann Coulter, Brea, CA, USA),
- 1,5µl eines V450 Mouse-Anti-Human (VM) – konjugierten anti-CD45-AK (BD Bioscience, Bedfordt, MA, USA),
- 1,5µl eines APC-konjugierten anti-CD56-AK (Beckmann Coulter, Brea, CA, USA) und
- 1,5µl eines PE-konjugierten anti-CD138-AK (Beckmann Coulter, Brea, CA, USA) vermischt, mit
- 4µl PBS auf 15µl aufgefüllt

und anschließend mit der benötigten Menge Zellgemisch vermischt.

Mit Hilfe dieser Antikörpermischung war es möglich CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺), Monozyten (CD45⁺/CD14⁺), NK-Zellen (CD45⁺/CD56⁺), B-Zellen (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁻) und Plasmazell-Blasten (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁺) zu identifizieren.

Die Mischung wurde dann für 20min im Dunklen inkubiert. Zum Schluss wurde der Probenansatz mit 180µl 2%igem FCS gewaschen und bei 4°C für 4min bei 1200 U/min zentrifugiert. Zuletzt wurde nach Verwerfen des Überstandes nochmals 180µl PBS hinzugefügt.

Die Messung wurde am Durchflusszytometer Cyan (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) durchgeführt und danach mit der Software Summit 4.3. (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) ausgewertet (s. Kapitel 2.3.2).

2.3. Durchflusszytometrie

2.3.1. Identifizierung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen

Diese Methode wurde bereits in Studien der Neurologie des Klinikums Rechts der Isar verwendet (Sepp et al., 2014).

Zur Bestimmung der relativen Anzahl von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im Ficoll-Zentrifugat wurden die gemessenen FACS-Daten nach folgendem Schema mit der Software CellQuest ausgewertet. Die entsprechende Negativkontrolle, welche ausschließlich mit APC-konjugierten anti-CD45-AK gefärbt wurde, wurde jeweils zur Qualitätssicherung gemessen. Auf diese Weise sollte eine unspezifische Bindung des Antikörpers überprüft werden.

Als erster Schritt wurden die gemessenen Zellen in einem Punktdiagramm mit Vorwärtsstreulicht (FSC) zu Seitwärtsstreulicht (SSC) dargestellt und mittels eines Gates (Funktion der FACS-Auswertungssoftware, mit dem die gewünschte Zellpopulation ausgewählt wird) alle mononukleären Zellen eingeschlossen. Zusätzlich erfolgte mit Hilfe eines weiteren Gates der Ausschluss der avitalen 7-AAD⁺ Zellen.

Anschließend wurde jeweils ein Gate um die CD133⁺ Population der CD45^{low+} Zellen (R4) (Abb. 4-A) und der im SSC nur klein granulierten Zellen (R16) (Abb. 4-B) gelegt. Als nächstes wurden die CD133⁺ Zellen (R4 und R16) zusammen in neues Feld aus FSC zu SSC übertragen und in diesem nochmals die klein granulierten Zellen mit einem Gate umgeben. Der Inhalt dieser Gates wurde wiederum in ein Feld überführt, welches CD133 zu CD34 darstellte und damit die Bestimmung der relativen Anzahl von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen ermöglichte (Abb. 4-C).

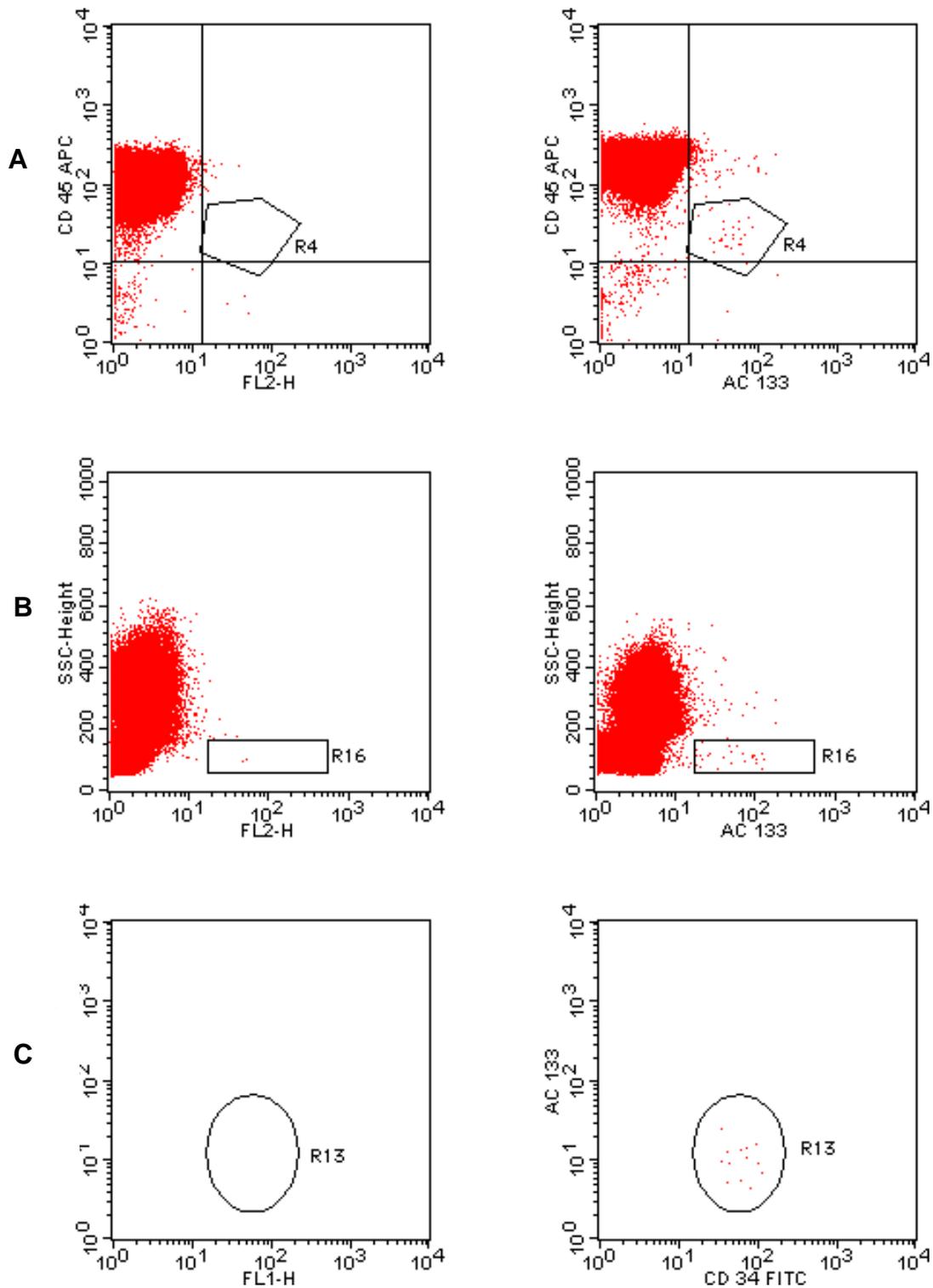


Abbildung 4: Darstellung der Durchflusszytometrie bei der Färbung der $CD34^+/CD133^+$ Vorläuferzellen
rechts: Färbung; links: Negativkontrolle

A: Darstellung der $CD133^+$ und $CD45^{low+}$ Zellen (R4)

(x-Achse: CD133 bzw. 2. Fluoreszenzkanal; y-Achse: CD45)

B: Darstellung der $CD133^+$ und kleingranulierten Zellen (R16)

(x-Achse: CD133 bzw. 2. Fluoreszenzkanal; y-Achse: SCC)

C: Darstellung der $CD34^+/CD133^+$ Vorläuferzellen

(x-Achse: CD34 bzw. 1. Fluoreszenzkanal; y-Achse: CD133 bzw. 2. Fluoreszenzkanal)

Für die anschließende Berechnung der absoluten Anzahl von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut wurden mehrere Informationen benötigt.

Zum einen die Anzahl der im TruCOUNT-Röhrchen gemessenen Beads (fluoreszierenden Mikropartikeln, die sich in der Probe lösen, und durchflusszytometrisch gemessen werden können). Diese Beads wurden in einem Punktdiagramm dargestellt, mittels eines Gates ausgewählt und anschließend gezählt.

Zusätzlich wurden noch die im Vollblut gemessenen prozentualen Anteile von Lymphozyten und Monozyten benötigt (Abb. 5).

CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut

$$= \frac{\text{Gemessene Zellen} \times \text{Beads Total} \times \left(\frac{\% \text{ Lymphozyten} + \% \text{ Monozyten}}{100} \right)}{\text{Beads Gemessen} \times 36,25}$$

Gemessene Zellen	im Probenröhrchen gemessene Zellzahl
Beads Total	Anzahl der im TruCOUNT - Röhrchen enthaltenen Beads
Beads Gemessen	Anzahl der gemessenen Beads
% Lymphozyten + % Monozyten	im Vollblut gemessene prozentualen Anteile
36,25	für die Färbung verwendete Menge Vollblut in Mikroliter

Abbildung 5: Formel zur Berechnung der absoluten Anzahl CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut

2.3.2. Identifizierung der Immunzellen

Diese Methode wurde bereits in Studien der Neurologie des Klinikums Rechts der Isar verwendet (Kowarik et al., 2014).

Als erster Schritt zur Bestimmung der Immunzellen wurden alle gemessenen Zellen im Punktdiagramm mit FSC zu SSC dargestellt. Mittels Gating erfolgte die Auswahl aller mononukleären Zellen (Abb. 6.1-A). Aus diesen wiederum wurden alle CD45⁺ Zellen ausgewählt (Abb. 6.1-B).

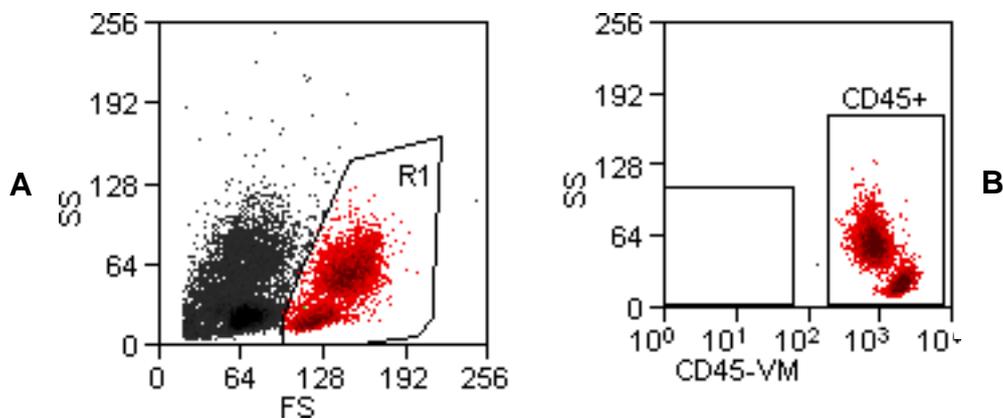


Abbildung 6.1: Darstellung der Durchflusszytometrie bei der Färbung der Immunzellen

A: Darstellung der mononukleären Zellen (R1) (x-Achse: FSC; y-Achse: SSC)

B: Darstellung der CD45⁺ Zellen (x-Achse: CD45; y-Achse: SSC)

Anschließend erfolgte aus dieser im ersten Schritt identifizierten Zellpopulation die Bestimmung der einzelnen Subgruppen der Immunzellen.

Mit Hilfe eines Gates um CD3⁺ und zusätzlich CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen wurden die CD4⁺ (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺) (Abb. 6.2-A) bzw. CD8⁺ (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺) (Abb. 6.2-B) T-Zellen identifiziert. Die Monozyten (CD45⁺/CD14⁺) wurden mittels eines Gates um CD14⁺ und CD19⁻ Zellen identifiziert (Abb. 6.2-C). Die B-Zellen (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁻) konnten mittels Gating von CD19⁺ und CD14⁻ Zellen bestimmt werden (Abb. 6.2-C). Die Identifikation der Plasmazell-Blasten (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁺) erfolgte mittels eines Gates um CD19⁺ und CD138⁺ Zellen (Abb. 6.2-D). Mit Hilfe des Gatings von CD56⁺ und CD3⁻ Zellen konnten die NK-Zellen (CD45⁺/CD56⁺) bestimmt werden (Abb. 6.2-E).

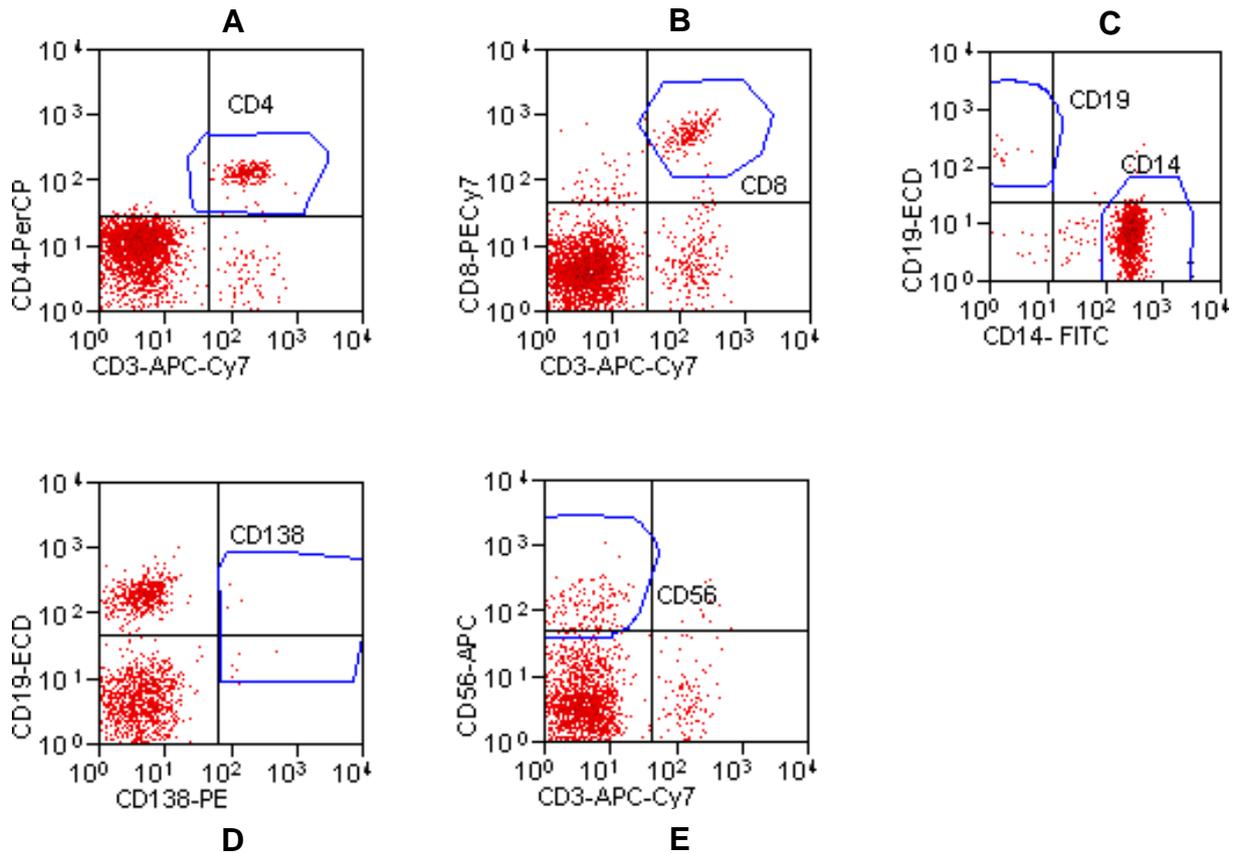


Abbildung 6.2: Darstellung der Durchflusszytometrie bei der Färbung der Immunzellen

A: Darstellung der CD4⁺ T-Zellen (x-Achse: CD3; y-Achse: CD4)

B: Darstellung der CD8⁺ T-Zellen (x-Achse: CD3; y-Achse: CD8)

C: Darstellung der CD14⁺ Monozyten und der CD19⁺ B-Zellen (x-Achse: CD14; y-Achse: CD19)

D: Darstellung der CD138⁺ Plasmazell-Blasten (x-Achse: CD138; y-Achse: CD19)

E: Darstellung der CD56⁺ NK-Zellen (x-Achse: CD3; y-Achse: CD56)

2.4. Bestimmung der Interleukine

Für die Bestimmung der Zytokine IL-6 und IL-8 wurde in den wiederaufgetauten Serumproben der Patienten das Cytometric Bead Array (CBA) „Human Inflammation Kit“ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) verwendet.

Dafür wurden als erster Schritt der zu untersuchenden Probe mit Antikörper beschichtete Mikropartikel (capture beads), die in der Lage waren Zytokine zu binden, hinzugefügt. Da Mikropartikel mit einer unterschiedlichen Fluoreszenzintensität existieren, war es möglich in Kombination mit unterschiedlichen gebundenen Antikörpern mehrere Zytokine gleichzeitig zu messen. Im zweiten Schritt wurden weitere Antikörper für die unterschiedlichen Zytokine hinzugegeben, die diesmal mit dem Standardfluoreszenzfarbstoff PE gekoppelt sind. Mit Hilfe dieser Antikörper war eine Bestimmung der Konzentration der Zytokine möglich.

Anschließend wurden die Proben am Durchflusszytometer FACS Calibur gemessen. Mit Hilfe der PE-Fluoreszenzintensität und der gemessenen Fluoreszenz der Mikropartikel wurde mittels Standardkurven und einer Auswertungssoftware (BD CBA Analysis Software, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) die Konzentration der einzelnen Zytokine in pg / ml berechnet.

2.5. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde SPSS 24.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet.

Die Vergleiche von kontinuierlichen Werten zweier abhängiger Stichproben wurden mittels des Wilcoxon-Tests berechnet. Bei zwei unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test und bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Das Signifikanzniveau bei diesen Tests betrug $p = 0,05$. Als eine Tendenz wurde ein p -Wert $> 0,05$ bis einschließlich $0,10$ definiert.

Für die Korrelationsanalyse wurde eine bivariate lineare Korrelation durchgeführt. Als schwach Korrelation wurde ein Korrelationskoeffizient ($|r|$) von $0,1$ bis $< 0,5$ definiert. Als mittlere Korrelation wurde ein $|r|$ von $0,5$ bis einschließlich $0,8$ und als starke Korrelation ein $|r| > 0,8$ bis einschließlich 1 definiert. Als signifikant wurde eine starke Korrelation und als Tendenz eine mittlere Korrelation gewertet.

Soweit nicht anders aufgeführt wird der Median mit dem Interquartilsabstand (IQR) angegeben (Median, IQR) Wenn angebracht wird zusätzlich der Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwerts angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung).

3. Ergebnisse

3.1. Basischarakteristika

Insgesamt nahmen 66 Patienten (40 Männer) im medianen Alter von 72 Jahren (IQR 18,26) an der Studie teil (Tab. 4).

Bei Auswertung der Basischarakteristika zeigte sich, dass die Patienten mit einer Subarachnoidalblutung (SAB-Gruppe) mit 56,5 Jahren (IQR 17,25) jünger waren als Patienten mit einem zerebralen Infarkt (Infarkt-Gruppe) mit 72,5 Jahren (IQR 16,5) oder einer intrazerebralen Blutung (ICB-Gruppe) mit 78,5 Jahren (IQR 11,5) ($p=0,005$).

In der Infarkt-Gruppe litten 56,8% der Patienten an einer arteriellen Hypertonie und 66,7% der Patienten in der ICB-Gruppe. In der SAB-Gruppe fand sich kein Patient mit einer arteriellen Hypertonie ($p=0,02$).

Table 4: Basischarakteristika der Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung bzw. einer Subarachnoidalblutung und total
Alter: Median und IQR (Mittelwert \pm Standardabweichung); ansonsten: Anzahl (%)

	Infarkt-Gruppe	ICB-Gruppe	SAB-Gruppe	total	p-Werte
Anzahl	44	12	10	66	-
Alter	72,5 IQR 16,5 (70,7 \pm 13,3)	78,5 IQR 11,5 (74,1 \pm 11,7)	56,5 IQR 17,25 (56,6 \pm 12,5)	72 IQR 18,25 (69,2 \pm 13,8)	0,005
Männer (%)	28 (63,6)	8 (66,7)	4 (40)	40 (60,6)	0,350
Hypertonie (%)	25 (56,8)	8 (66,7)	0 (0)	33 (50,0)	0,020
Vorhofflimmern (%)	9 (20,5)	2 (16,7)	0 (0)	11 (16,7)	0,262
Diabetes mellitus (%)	12 (27,3)	0 (0)	0 (0)	12 (18,2)	0,540
Hypercholesterinämie (%)	10 (22,7)	2 (16,7)	1 (10)	13 (19,7)	0,651
Nikotinabusus (%)	7 (15,9)	0 (0)	3 (30)	10 (15,2)	0,235

Da die Studie im Rahmen der Regelversorgung im Krankenhaus durchgeführt wurde, konnten bei einigen Patienten nicht alle Blutentnahmen erfolgen, zudem wurden einige Patienten aus medizinischen Gründen vor Ablauf des Untersuchungszeitraumes in andere Krankenhäuser verlegt. Aufgrund dessen wird in den nachfolgenden Auswertungen immer die Anzahl, der für die Analyse zur Verfügung stehenden Proben angegeben.

3.2. CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen

3.2.1. zerebrale Infarkte

Bei der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem zerebralen Infarkt (≤ 24 Stunden) (37 auswertbare Proben) fanden sich im Median 0,10 (IQR 0,26) CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μl Blut, bei der Messung am 5. Tag (25 auswertbare Proben) 0,22 (IQR 0,31) CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μl Blut und bei der Messung am 7. Tag (21 auswertbare Proben) 0,30 (IQR 0,61) CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μl Blut.

Es zeigte sich in dieser Subgruppe ein Anstieg der medianen Anzahl von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen sowohl im Zeitraum von ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag (**≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag:** $\Delta +0,12$ CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μl Blut, $p=0,013$) als auch im Zeitraum vom 5. bis zum 7. Tag (**5. bis zum 7. Tag:** $\Delta +0,08$ CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μl Blut, $p=0,042$). Bezogen auf den gesamten Untersuchungszeitraum zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der medianen Anzahl von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen (**≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag:** $\Delta +0,20$ CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μl Blut, $p=0,079$) (Abb. 7; Tab. 5 und 6).

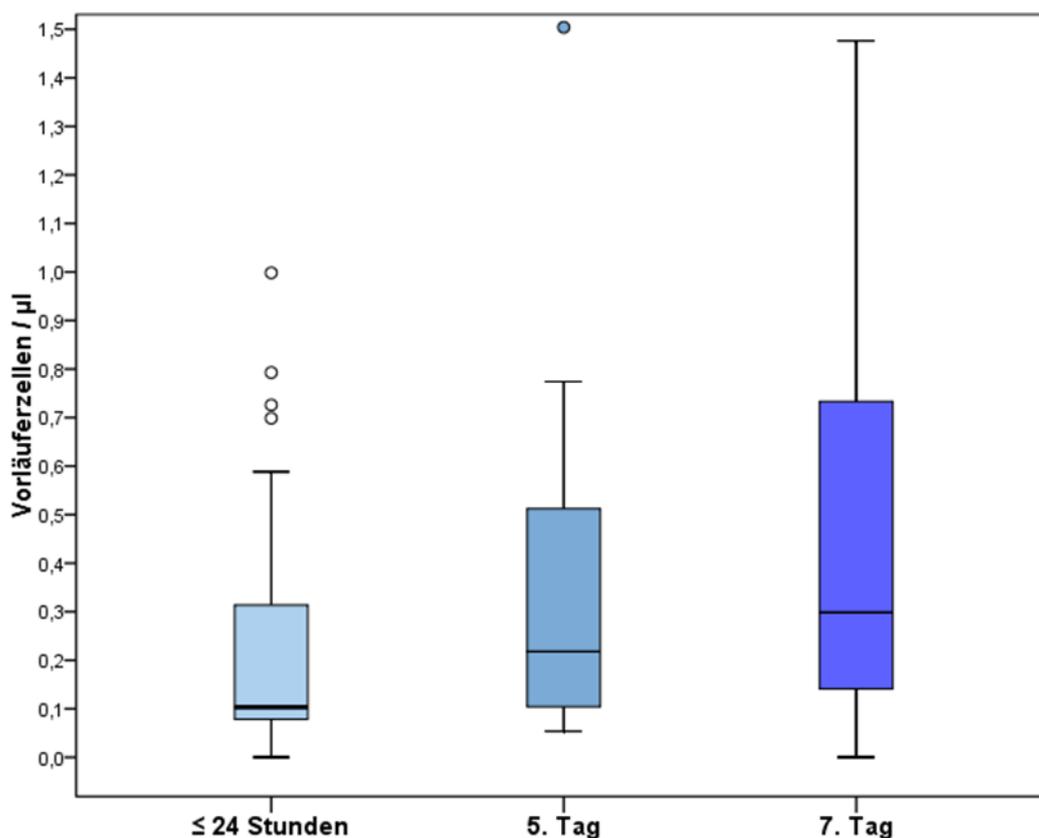


Abbildung 7: Verlauf der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt
x-Achse: Zeitpunkt; y-Achse: CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μl Blut

3.2.2. intrazerebrale Blutungen

Bei der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden nach der intrazerebralen Blutung (10 auswertbare Proben) fanden sich im Median 0,04 (IQR 0,08) CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut, bei der Messung am 5. Tag (8 auswertbare Proben) 0,10 (IQR 0,09) CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut und bei der Messung am 7. Tag (8 auswertbare Proben) 0,07 (IQR 0,50) CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut.

In dieser Subgruppe zeigte sich kein relevanter Anstieg der medianen Anzahl von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen in allen untersuchten Zeitabschnitten (**≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag:** $\Delta +0,06$ CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut, $p=0,123$; **5. bis zum 7. Tag:** $\Delta -0,03$ CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut, $p=0,449$; **$24 \leq$ Stunden bis zum 7. Tag:** $\Delta +0,03$ CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut, $p=0,327$) (Abb. 8; Tab. 5 und 6).

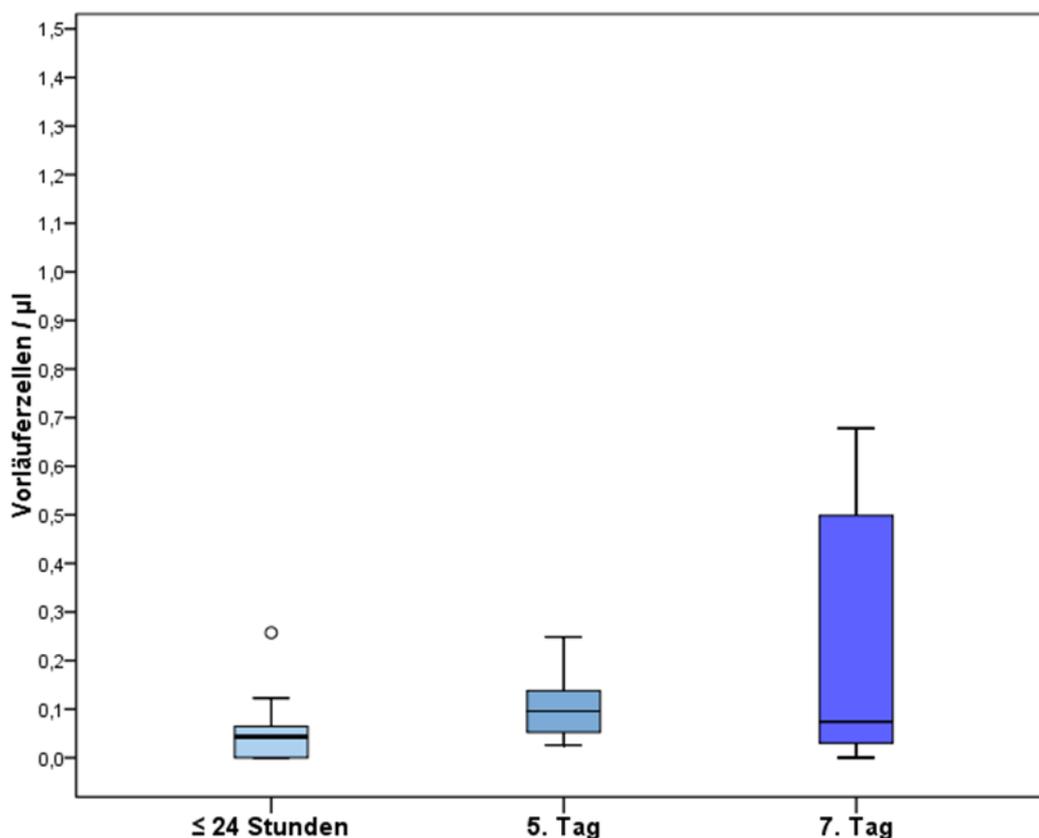


Abbildung 8: Verlauf der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einer intrazerebralen Blutung

x-Achse: Zeitpunkt; y-Achse: CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut

3.2.3. Subarachnoidalblutungen

Bei der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Subarachnoidalblutung (10 auswertbare Proben) fanden sich im Median 0,07 (IQR 0,22) CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut, bei der Messung am 5. Tag (9 auswertbare Proben) 0,32 (IQR 0,34) CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut und bei der Messung am 7. Tag (6 auswertbare Proben) 0,20 (IQR 0,33) CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut.

In dieser Subgruppe zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der medianen Anzahl von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im gesamten Beobachtungszeitraum (**24 \leq Stunden bis zum 7. Tag: Δ +0,13 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut, $p=0,075$). Zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten fand sich kein relevanter Anstieg der medianen Anzahl der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen (**\leq 24 Stunden bis zum 5. Tag: Δ +0,25 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut, $p=0,173$; **5. bis zum 7. Tag: Δ -0,12 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut, $p=0,225$**) (Abb. 9; Tab. 5 und 6).****

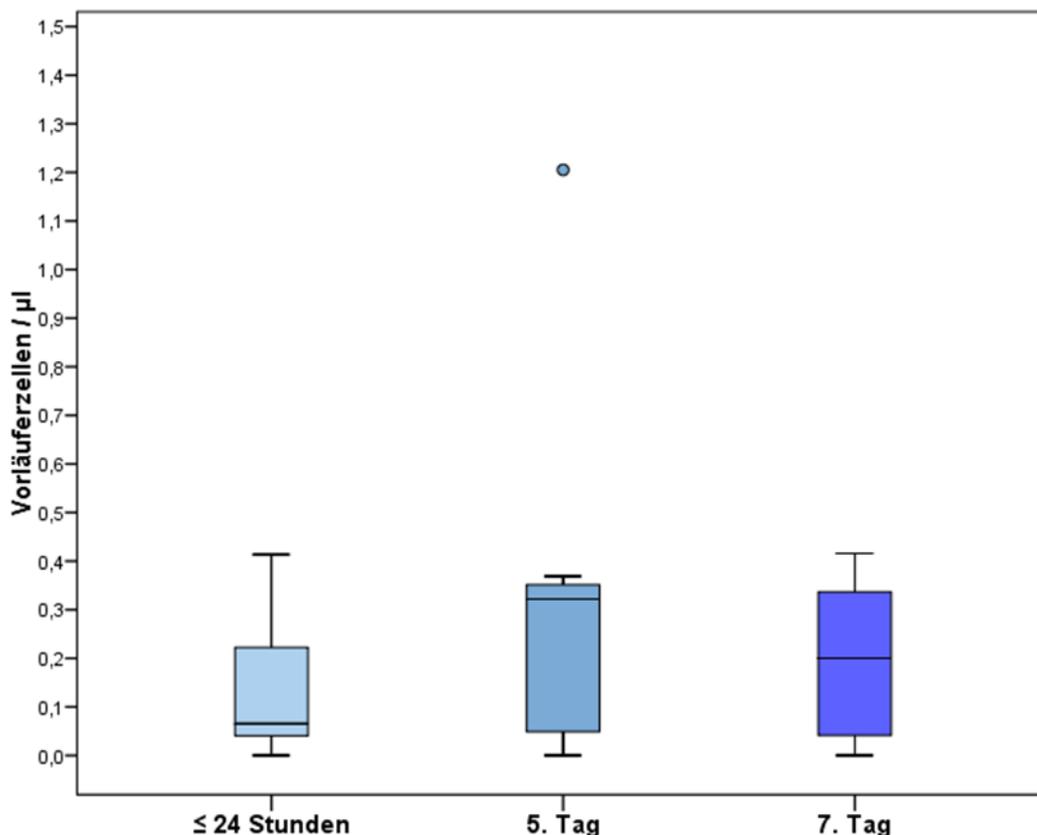


Abbildung 9: Verlauf der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einer Subarachnoidalblutung

x-Achse: Zeitpunkt; y-Achse: CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut

Tabelle 5: CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung in CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / μ l Blut; Median mit IQR (Mittelwert \pm Standardabweichung); Anzahl der ausgewerteten Proben

		Infarkt-Gruppe	ICB-Gruppe	SAB-Gruppe
CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen/ μ l	\leq 24 Stunden	0,10 IQR 0,26 (0,23 \pm 0,25) 37 Proben	0,04 IQR 0,08 (0,06 \pm 0,08) 10 Proben	0,07 IQR 0,22 (0,13 \pm 0,15) 10 Proben
		0,22 IQR 0,31 (0,33 \pm 0,32) 25 Proben	0,10 IQR 0,09 (0,11 \pm 0,07) 8 Proben	0,32 IQR 0,34 (0,32 \pm 0,37) 9 Proben
	5. Tag	0,30 IQR 0,61 (0,43 \pm 0,38) 21 Proben	0,07 IQR 0,50 (0,24 \pm 0,28) 8 Proben	0,20 IQR 0,33 (0,20 \pm 0,16) 6 Proben
		0,30 IQR 0,61 (0,43 \pm 0,38) 21 Proben	0,07 IQR 0,50 (0,24 \pm 0,28) 8 Proben	0,20 IQR 0,33 (0,20 \pm 0,16) 6 Proben
	7. Tag	0,30 IQR 0,61 (0,43 \pm 0,38) 21 Proben	0,07 IQR 0,50 (0,24 \pm 0,28) 8 Proben	0,20 IQR 0,33 (0,20 \pm 0,16) 6 Proben
		0,30 IQR 0,61 (0,43 \pm 0,38) 21 Proben	0,07 IQR 0,50 (0,24 \pm 0,28) 8 Proben	0,20 IQR 0,33 (0,20 \pm 0,16) 6 Proben

Tabelle 6: Übersicht der Veränderungen der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung
Angabe der p-Werte

	\leq 24 Stunden zu 5. Tag	5. zu 7. Tag	\leq 24 Stunden zu 7. Tag
Infarkt-Gruppe	0,013	0,042	<u>0,079</u>
ICB-Gruppe	0,123	0,499	0,327
SAB-Gruppe	0,173	0,225	<u>0,075</u>

3.2.4. Vergleich der Subgruppen

Im direkten Vergleich war die mediane Anzahl an CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten der Infarkt- und SAB-Gruppe innerhalb der ersten 24 Stunden höher als bei Patienten der ICB-Gruppe (**≤ 24 Stunden:** Infarkt-Gruppe 0,10 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut, ICB-Gruppe 0,04 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut, SAB-Gruppe 0,07 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut, p=0,017).

In der Messung am 5. Tag war die mediane Anzahl der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen in der Infarkt- und der SAB-Gruppe tendenziell erhöht (**5. Tag:** Infarkt-Gruppe 0,22 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut, ICB-Gruppe 0,10 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut, SAB-Gruppe 0,32 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut, p=0,068).

In der Messung am 7. Tag fand sich kein relevanter Unterschied hinsichtlich der medianen Anzahl der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen in den einzelnen Gruppen (**7. Tag:** Infarkt-Gruppe 0,30 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut, ICB-Gruppe 0,07 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut, SAB-Gruppe 0,20 CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut, p=0,185) (Abb. 10; Tab. 7).

Tabelle 7: Übersicht des Subgruppenvergleichs der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen
Angabe der p-Werte

	≤ 24 Stunden	5. Tag	7. Tag
p-Werte	0,017	<u>0,068</u>	0,185

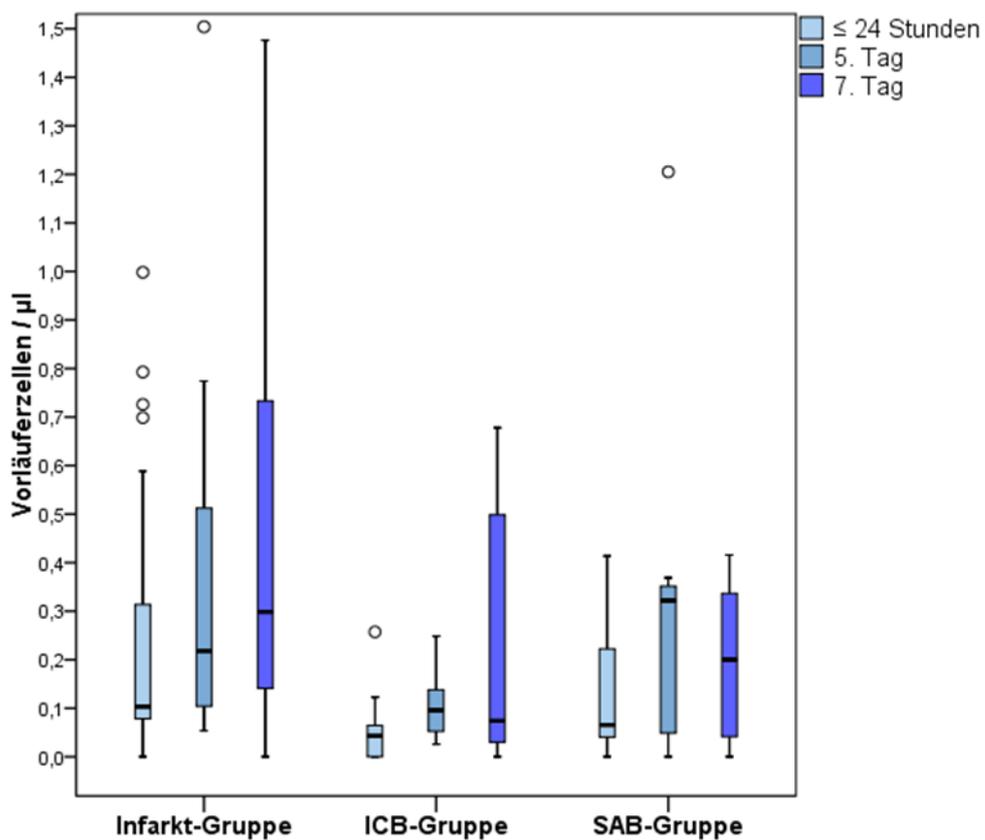


Abbildung 10: Vergleich der Freisetzung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung
x-Achse: Beobachtungszeitraum, für zerebralen Infarkt, ICB und SAB;
y-Achse: CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen / µl Blut

3.3. Interleukine

3.3.1. zerebrale Infarkte

Der median Serumspiegel von Interleukin 6 (IL-6) betrug innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem zerebralen Infarkt (35 auswertbare Proben) 5,85 (IQR 7,64) pg / ml, in der Messung am 5. Tag (28 auswertbare Proben) 4,96 (IQR 5,38) pg / ml und in der Messung am 7. Tag (24 auswertbare Proben) 3,83 (IQR 10,50) pg / ml.

Der mediane Serumspiegel von Interleukin 8 (IL-8) betrug innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem zerebralen Infarkt (35 auswertbare Proben) im Median 12,53 (IQR 13,10) pg / ml, in der Messung am 5. Tag (28 auswertbare Proben) 12,01 (IQR 10,33) pg / ml und in der Messung am 7. Tag (24 auswertbare Proben) 12,14 (IQR 13,10) pg / ml.

Für IL-6 und IL-8 zeigten sich innerhalb der Infarkt-Gruppe keine relevanten Veränderungen der medianen Serumspiegel im gesamten Untersuchungszeitraum (**IL-6: \leq 24 Stunden bis zum 5. Tag: Δ -0,89 pg / ml, $p=0,770$; 5. bis zum 7. Tag: Δ -1,13 pg / ml, $p=0,638$; \leq 24 Stunden bis zum 7. Tag: Δ -2,02 pg / ml, $p=0,987$) (**IL-8: \leq 24 Stunden bis zum 5. Tag: Δ -0,52 pg / ml, $p=0,576$; 5. bis zum 7. Tag: Δ +0,13 pg / ml, $p=0,661$; \leq 24 Stunden bis zum 7. Tag: Δ -0,39 pg / ml, $p=0,741$) (Tab. 8 und 9).****

Es fand sich eine schwache Korrelation zwischen der Höhe des initialen Serumspiegels von IL-6 und der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum (Messung \leq 24 Stunden bis zur Messung am 7. Tag) (**Korrelation IL-6: $r=+0,220$**). Für IL-8 bestand keine Korrelation (**Korrelation IL-8: $r=-0,060$**) (Tab. 10).

3.3.2. intrazerebrale Blutungen

Der median Serumspiegel von IL-6 betrug innerhalb der ersten 24 Stunden nach der intrazerebralen Blutung (11 auswertbare Proben) 7,24 (IQR 13,58) pg /ml, in der Messung am 5. Tag (10 auswertbare Proben) 9,82 (IQR 64,74) pg /ml und in der Messung am 7. Tag (9 auswertbare Proben) 1,01 (IQR 35,44) pg / ml.

Der mediane Serumspiegel von IL-8 betrug innerhalb der ersten 24 Stunden (11 auswertbare Proben) 10,08 (IQR 11,59) pg / ml, in der Messung am 5. Tag (10 auswertbare Proben) 8,76 (IQR 7,62) pg / ml und in der Messung am 7. Tag (9 auswertbare Proben) 5,85 (IQR 11,88) pg / ml.

Für IL-6 und IL-8 zeigte sich innerhalb der ICB-Gruppe im gesamten Untersuchungszeitraum keine relevante Veränderung der medianen Serumspiegel (**IL-6: ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag:** $\Delta +2,58$ pg / ml, $p=0,508$; **5. bis zum 7. Tag:** $\Delta -8,81$ pg / ml, $p=0,263$; **≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag:** $\Delta -6,23$ pg / ml, $p=0,859$) (**IL-8: ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag:** $\Delta -1,32$ pg / ml, $p=0,721$; **5. bis zum 7. Tag:** $\Delta -2,91$ pg / ml, $p=0,953$; **≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag:** $\Delta -4,32$ pg / ml, $p=0,767$) (Tab. 8 und 9).

Es zeigten sich jeweils schwache negative Korrelationen zwischen der Höhe des initialen Serumspiegels von IL-6 und IL-8 und der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum (Messung ≤ 24 Stunden bis zur Messung am 7. Tag) (**Korrelation IL-6:** $r=-0,275$; **Korrelation IL-8:** $r=-0,273$) (Tab. 10).

3.3.3. Subarachnoidalblutungen

Der mediane Serumspiegel von IL-6 betrug innerhalb der ersten 24 Stunden (10 auswertbare Proben) 3,85 (IQR 19,80) pg / ml, in der Messung am 5. Tag (9 auswertbare Proben) 3,19 (IQR 15,72) pg / ml und in der Messung am 7. Tag (7 auswertbare Proben) 5,31 (IQR 11,01) pg / ml.

Der mediane Serumspiegel von IL-8 betrug innerhalb der ersten 24 Stunden (10 auswertbare Proben) 6,12 pg (IQR 5,48), in der Messung am 5. Tag (9 auswertbare Proben) 6,44 (IQR 3,84) pg / ml und in der Messung am 7. Tag (7 auswertbare Proben) 5,25 (IQR 12,36) pg / ml.

Für IL-6 und IL-8 zeigte sich innerhalb der SAB-Gruppe im gesamten Untersuchungszeitraum keine relevante Veränderung der medianen Serumspiegel (**IL-6: ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag:** $\Delta -0,66$ pg / ml, $p=0,263$; **5. bis zum 7. Tag:** $\Delta +2,12$ pg / ml, $p=0,600$; **≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag:** $\Delta +1,46$ pg / ml, $p=0,128$) (**IL-8: ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag:** $\Delta +0,32$ pg / ml, $p=0,314$; **5. bis zum 7. Tag:** $\Delta -1,19$ pg / ml, $p=0,345$; **≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag:** $\Delta -0,87$ pg / ml, $p=0,310$) (Tab. 8 und 9).

Es fanden sich mittlere positive Korrelationen zwischen der Höhe des initialen Serumspiegels von IL-6 und von IL-8 und der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum (Messung ≤ 24 Stunden bis zur Messung am 7. Tag) (**Korrelation IL-6:** $r=+0,681$; **Korrelation IL-8:** $r=+0,705$) (Tab. 10).

Tabelle 8: Übersicht der Serumspiegel von Interleukin 6 und 8 bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung für den gesamten Beobachtungszeitraum
in pg / ml; Median und IQR (Mittelwert \pm Standardabweichung); Anzahl der ausgewerteten Proben

		Infarkt-Gruppe	ICB-Gruppe	SAB-Gruppe
IL-6	≤ 24 Stunden	5,95 IQR 7,64 (11,39 \pm 20,40) 35 Proben	7,24 IQR 13,58 (30,86 \pm 77,85) 11 Proben	3,85 IQR 19,80 (10,33 \pm 12,20) 10 Proben
	5. Tag	4,96 IQR 5,38 (12,19 \pm 22,03) 28 Proben	9,82 IQR 64,74 (51,86 \pm 93,82) 10 Proben	3,19 IQR 15,72 (7,49 \pm 8,83) 9 Proben
	7. Tag	3,83 IQR 10,90 (13,68 \pm 22,81) 24 Proben	1,01 IQR 35,44 (29,02 \pm 61,16) 9 Proben	5,31 IQR 11,01 (7,33 \pm 8,05) 7 Proben
IL-8	≤ 24 Stunden	12,53 IQR 13,10 (15,61 \pm 13,18) 35 Proben	10,08 IQR 11,59 (12,56 \pm 11,32) 11 Proben	6,12 IQR 5,48 (7,69 \pm 4,54) 10 Proben
	5. Tag	12,01 IQR 10,33 (15,72 \pm 12,29) 28 Proben	8,76 IQR 7,62 (10,84 \pm 8,86) 10 Proben	6,44 IQR 3,84 (7,49 \pm 3,97) 9 Proben
	7. Tag	12,14 IQR 13,10 (14,90 \pm 12,74) 24 Proben	5,85 IQR 11,88 (9,27 \pm 7,05) 9 Proben	5,25 IQR 12,36 (8,47 \pm 6,99) 7 Proben

Tabelle 9: Übersicht der Veränderungen der Interleukine (IL-6 und IL-8) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung
Angabe der p-Werte

		≤ 24 Stunden zu 5. Tag	5. zu 7. Tag	≤ 24 Stunden zu 7. Tag
Infarkt-Gruppe	IL-6	0,770	0,638	0,987
	IL-8	0,576	0,661	0,741
ICB-Gruppe	IL-6	0,508	0,263	0,859
	IL-8	0,721	0,953	0,767
SAB-Gruppe	IL-6	0,263	0,600	0,128
	IL-8	0,314	0,345	0,310

Tabelle 10: Übersicht der Korrelation zwischen dem initialen Interleukinspiegel (IL-6 oder IL-8) und der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum (Messung ≤ 24 Stunden zu Messung 7. Tag) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung
Angabe der Korrelationskoeffizienten

		Veränderung der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum
Infarkt-Gruppe	IL-6	+ 0,220
	IL-8	- 0,060
ICB-Gruppe	IL-6	- 0,275
	IL-8	- 0,273
SAB-Gruppe	IL-6	<u>+ 0,681</u>
	IL-8	<u>+ 0,705</u>

3.3.4. Vergleich der Subgruppen

Im direkten Vergleich der Subgruppen zeigte sich ein niedrigerer medianer Serumspiegel von IL-8 in der Messung am 5. Tag in der SAB-Gruppe gegenüber der Infarkt- und ICB-Gruppe (**IL-8: 5. Tag:** SAB-Gruppe 6,44 pg / ml, Infarkt-Gruppe 12,01 pg / ml, ICB-Gruppe 8,76 pg / ml, $p=0,025$). Weiterhin fand sich in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden ein tendenziell niedrigerer medianer Serumspiegel von IL-8 in der SAB-Gruppe gegenüber der Infarkt- und ICB-Gruppe (**≤ 24 Stunden:** SAB-Gruppe 6,12 pg / ml, Infarkt-Gruppe 12,53 pg / ml, ICB-Gruppe 10,08 pg / ml, $p=0,071$). Ein relevanter Unterschied der medianen Serumspiegel in der Messung am 7. Tag bestand für IL-8 nicht (**7. Tag:** Infarkt-Gruppe 12,14 pg / ml, ICB-Gruppe 5,85 pg / ml, SAB-Gruppe 5,25 pg / ml, $p=0,318$).

Beim Vergleich der Serumspiegel von IL-6 fand sich kein relevanter Unterschied der medianen Serumspiegel zwischen den einzelnen Subgruppen (**IL-6: ≤ 24 Stunden:** Infarkt-Gruppe 5,95 pg / ml, ICB-Gruppe 7,24 pg / ml, SAB-Gruppe 3,85 pg / ml, $p=0,795$; **5. Tag:** Infarkt-Gruppe 4,96 pg / ml, ICB-Gruppe 9,82 pg / ml, SAB-Gruppe 3,19 pg / ml, $p=0,432$; **7. Tag:** Infarkt-Gruppe 3,83 pg / ml, ICB-Gruppe 1,01 pg / ml, SAB-Gruppe 5,31 pg / ml, $p=0,519$) (Abb. 11 und 12; Tab. 11).

Tabelle 11: Übersicht des Subgruppenvergleichs der Interleukine (IL-6 und IL-8)
Angabe der p -Werte

		≤ 24 Stunden	5. Tag	7. Tag
p-Werte	IL-6	0,795	0,432	0,519
	IL-8	<u>0,071</u>	0,025	0,318

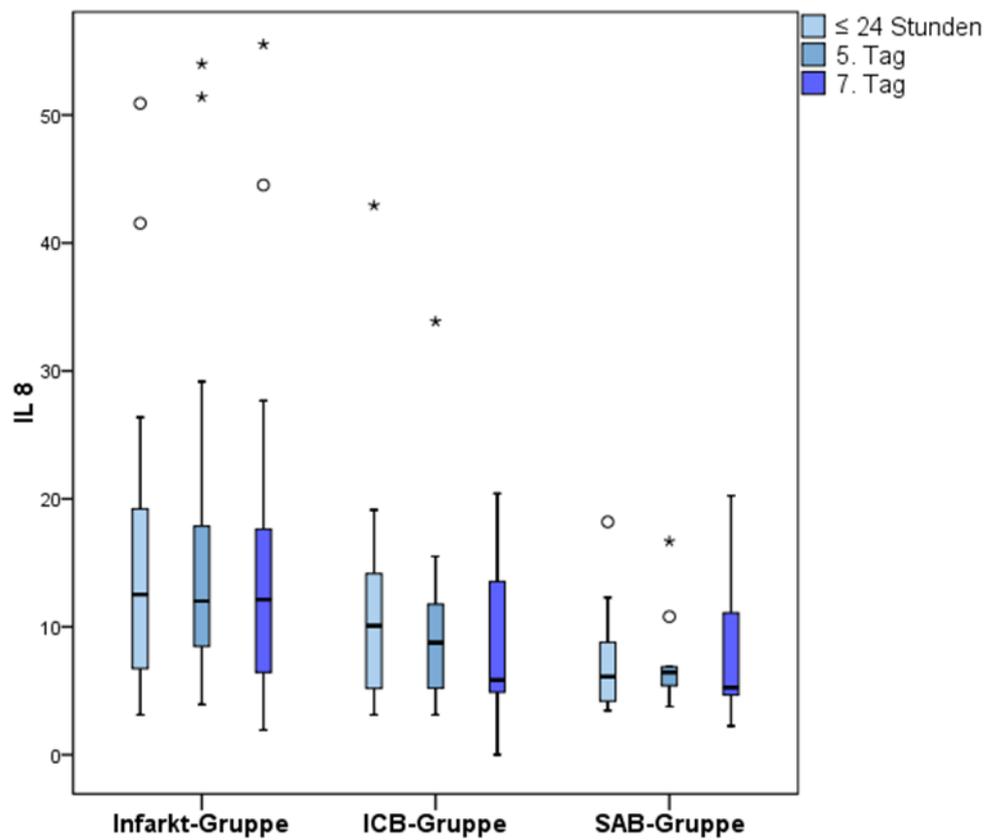


Abbildung 11: Vergleich der Serumspiegel von Interleukin 8 bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung
x-Achse: Beobachtungszeitraum, für zerebralen Infarkt, ICB und SAB; y-Achse: Interleukin 8 in pg / ml

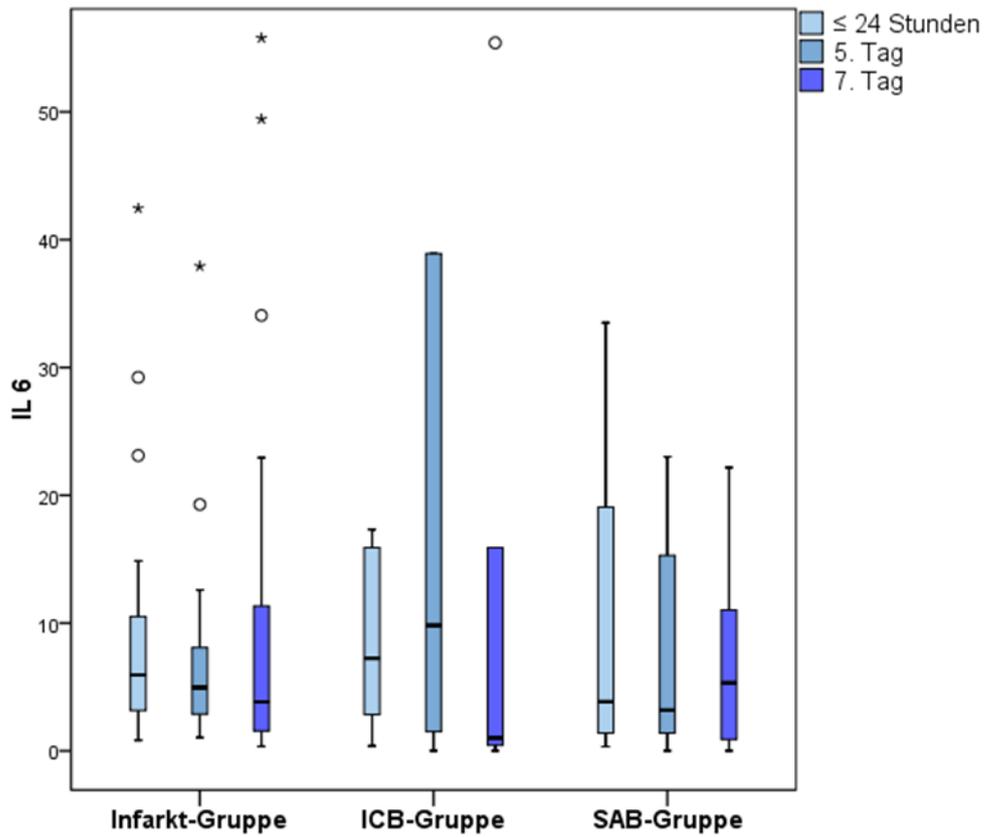


Abbildung 12: Vergleich der Serumspiegel von Interleukin 6 bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung
x-Achse: Beobachtungszeitraum, für zerebralen Infarkt, ICB und SAB; y-Achse: Interleukin 6 in pg / ml

3.4. Immunzellen

3.4.1. zerebrale Infarkte

Der mediane Anteil der CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺) betrug in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden (36 auswertbare Proben) 21,26 (IQR 14,06) %, in der Messung am 5. Tag (29 auswertbare Proben) 20,85 (IQR 15,09) % und in der Messung am 7. Tag (26 auswertbare Proben) 23,34 (IQR 18,41) %. Im gesamten Untersuchungszeitraum fand sich kein relevanter Unterschied der medianen Anteile (**CD4⁺ T-Zellen: ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag: Δ -0,41 %, p=0,854; 5. bis zum 7. Tag: Δ +2,49 %, p=0,328; ≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag: Δ +2,08 %, p=0,124**).

Der Anteil der CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺) betrug in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden (36 auswertbare Proben) im Median 12,46 (IQR 10,45) %, in der Messung am 5. Tag (29 auswertbare Proben) 11,15 (IQR 8,34) % und in der Messung am 7. Tag (26 auswertbare Proben) 12,28 (IQR 7,69) %. Auch hier zeigte sich im gesamten Untersuchungszeitraum kein relevanter Unterschied der medianen Anteile (**CD8⁺ T-Zellen: ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag: Δ -1,31 %, p=0,469; 5. bis zum 7. Tag: Δ +1,13 %, p=0,517; ≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag: Δ -0,18 %, p=0,675**).

Der mediane Anteil der B-Zellen (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁻) betrug in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden (36 auswertbare Proben) 7,06 (IQR 8,76) %, in der Messung am 5. Tag (29 auswertbare Proben) 9,18 (IQR 7,55) % und in der Messung am 7. Tag (26 auswertbare Proben) 8,50 (IQR 6,38) %. Tendenziell fand sich in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden ein geringerer medianer Anteil von B-Zellen als in der Messung am 5. und am 7. Tag (**B-Zellen: ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag: Δ +2,12 %, p=0,094; ≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag: Δ +1,44 %, p=0,096**). Zwischen den medianen Anteilen von B-Zellen vom 5. bis zum 7. Tag bestand kein relevanter Unterschied (**5. bis zum 7. Tag: Δ +0,68 %, p=0,469**) (Tab. 12.1, 12.2 und 13).

Es fand sich eine schwache negative Korrelation zwischen dem medianen Anteil der CD8⁺ T-Zellen und eine schwache positive Korrelation zwischen dem medianen Anteil der B-Zellen in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem zerebralen Infarkt und der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum (≤ 24 Stunden bis zur Messung am 7. Tag) (**Korrelation CD8⁺ T-Zellen: r=-0,295; Korrelation B-Zellen: r=+0,355**). Für die CD4⁺ T-Zellen bestand keine Korrelation (**Korrelation CD4⁺ T-Zellen: r=+0,001**) (Tab. 14).

3.4.2. intrazerebrale Blutungen

Der mediane Anteil der CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺) betrug in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden (10 auswertbare Proben) im 23,23 (IQR 14,13) %, in der Messung am 5. Tag (10 auswertbare Proben) 15,85 (IQR 9,24) % und in der Messung am 7. Tag (8 auswertbare Proben) 20,83 (IQR 8,14) %. Im Vergleich fanden sich tendenziell weniger CD4⁺ T-Zellen in der Messung am 5. Tag als am 7. Tag (**CD4⁺ T-Zellen: 5. bis zum 7. Tag: Δ +4,98 %**, $p=0,093$). Hinsichtlich der medianen Anteile der CD4⁺ T-Zellen zeigte sich keine weitere relevante Änderung im Untersuchungszeitraum (**\leq 24 Stunden bis zum 5. Tag: Δ -7,38 %**, $p=0,173$; **\leq 24 Stunden bis zum 7. Tag: Δ -2,40 %**, $p=0,889$).

Der Anteil der CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺) betrug in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden (10 auswertbare Proben) im Median 12,92 (IQR 5,43) %, in der Messung am 5. Tag (10 auswertbare Proben) 12,11 (IQR 8,14) % und in der Messung am 7. Tag (8 auswertbare Proben) 15,11 (IQR 9,61) %. Hier zeigte sich im gesamten Untersuchungszeitraum kein relevanter Unterschied der medianen Anteile (**CD8⁺ T-Zellen: \leq 24 Stunden bis zum 5. Tag: Δ -0,81 %**, $p=0,953$; **5. bis zum 7. Tag: Δ 3,00 %**, $p=0,263$; **\leq 24 Stunden bis zum 7. Tag: Δ +2,19 %**, $p=0,575$).

Der mediane Anteil der B-Zellen (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁻) betrug in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden (10 auswertbare Proben) 7,91 (IQR 5,68) %, in der Messung am 5. Tag (10 auswertbare Proben) 5,68 (IQR 5,40) % und in der Messung am 7. Tag (8 auswertbare Proben) 5,75 (IQR 6,23) %. Insgesamt fand sich keine relevante Änderung der medianen Anteile im Untersuchungszeitraum (**B-Zellen: \leq 24 Stunden bis zum 5. Tag: Δ -2,23 %**, $p=0,594$; **5. bis zum 7. Tag: Δ +0,07 %**, $p=0,779$; **\leq 24 Stunden bis zum 7. Tag: Δ -2,16 %**, $p=0,401$) (Tab. 12.1, 12.2 und 13).

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem medianen Anteil der CD4⁺ T-Zellen und der CD8⁺ T-Zellen in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden nach der intrazerebralen Blutung und der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum (Messung \leq 24 Stunden zu Messung 7. Tag) (**Korrelation CD4⁺ T-Zellen: $r=+0,067$** ; **Korrelation CD8⁺ T-Zellen: $r=-0,096$**). Für die B-Zellen fand sich eine schwache negative Korrelation (**Korrelation B-Zellen: $r=-0,330$**) (Tab. 14).

3.4.3. Subarachnoidalblutungen

Der mediane Anteil der CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺) betrug in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden (10 auswertbare Proben) 21,26 (IQR 21,69) %, in der Messung am 5. Tag (9 auswertbare Proben) 21,69 (IQR 16,97) % und in der Messung am 7. Tag (6 auswertbare Proben) 27,35 (IQR 12,90) %. Insgesamt zeigte sich keine relevante Änderung der medianen Anteile im Untersuchungszeitraum (**CD4⁺ T-Zellen: ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag:** $\Delta +0,43$ %, $p=0,110$; **5. bis zum 7. Tag:** $\Delta +5,66$ %, $p=0,249$; **≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag:** $\Delta +6,09$ %, $p=0,116$).

Der Anteil der CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺) betrug in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden (10 auswertbare Proben) im Median 10,64 (IQR 9,97) %, in der Messung am 5. Tag (9 auswertbare Proben) 11,45 (IQR 9,01) % und in der Messung am 7. Tag (6 auswertbare Proben) 8,58 (IQR 13,26) %. Hinsichtlich der medianen Anteile zeigte sich keine relevante Änderung im Untersuchungszeitraum (**CD8⁺ T-Zellen: ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag:** $\Delta +0,81$ %, $p=0,594$; **5. bis zum 7. Tag:** $\Delta -2,87$ %, $p=0,753$; **≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag:** $\Delta -2,06$ %, $p=0,345$).

Der mediane Anteil der B-Zellen (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁻) betrug in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden (10 auswertbare Proben) 15,71 (IQR 11,32) %, in der Messung am 5. Tag (9 auswertbare Proben) 16,78 (IQR 7,71) % und in der Messung am 7. Tag (6 auswertbare Proben) 15,02 (IQR 7,08) %. Insgesamt zeigte sich keine relevante Änderung der medianen Anteile im Untersuchungszeitraum (**B-Zellen: ≤ 24 Stunden bis zum 5. Tag:** $\Delta +1,07$ %, $p=0,594$; **5. bis zum 7. Tag:** $\Delta -1,76$ %, $p=0,345$; **≤ 24 Stunden bis zum 7. Tag:** $\Delta -0,69$ %, $p=0,116$) (Tab. 12.1, 12.2 und 13).

Es bestand zwischen dem Anteil der CD8⁺ T-Zellen in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Subarachnoidalblutung und der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum (Messung ≤ 24 Stunden zu Messung 7. Tag) eine mittlere negative Korrelation (**Korrelation CD8⁺ T-Zellen:** $r=-0,561$). Für die B-Zellen zeigte sich eine mittlere positive Korrelation (**Korrelation B-Zellen:** $r=+0,718$) und für die CD4⁺ T-Zellen keine Korrelation (**Korrelation CD4⁺ T-Zellen:** $r=-0,075$) (Tab. 14).

Tabelle 12.1: Übersicht der CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺) und B-Zellen (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁺) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung für den gesamten Beobachtungszeitraum in %; Median und IQR (Mittelwert ± Standardabweichung); Anzahl der ausgewerteten Proben

		Infarkt-Gruppe	ICB-Gruppe	SAB-Gruppe
CD4⁺ T-Zellen (CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD4 ⁺)	≤ 24 Stunden	21,26 IQR 14,06 (21,54 ± 10,10)	23,23 IQR 14,13 (20,88 ± 8,19)	21,26 IQR 12,84 (20,14 ± 8,40)
		36 Proben	10 Proben	10 Proben
		20,84 IQR 15,09 (22,38 ± 10,80)	15,85 IQR 9,24 (18,05 ± 6,05)	21,69 IQR 16,97 (21,86 ± 9,95)
	5. Tag	29 Proben	10 Proben	9 Proben
		23,34 IQR 18,41 (23,69 ± 10,23)	20,83 IQR 8,14 (20,58 ± 5,27)	27,35 IQR 12,90 (29,51 ± 10,60)
		26 Proben	8 Proben	6 Proben
CD8⁺ T-Zellen (CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD8 ⁺)	≤ 24 Stunden	12,46 IQR 10,45 (13,40 ± 7,16)	12,92 IQR 5,43 (12,75 ± 3,37)	10,64 IQR 9,97 (11,63 ± 4,90)
		36 Proben	10 Proben	10 Proben
		11,15 IQR 8,34 (12,43 ± 6,90)	12,11 IQR 8,14 (14,35 ± 7,09)	11,45 IQR 9,01 (12,24 ± 4,89)
	5. Tag	29 Proben	10 Proben	9 Proben
		12,28 IQR 7,69 (12,80 ± 5,47)	15,11 IQR 9,61 (14,25 ± 5,88)	8,58 IQR 13,26 (12,03 ± 8,90)
		26 Proben	8 Proben	6 Proben
B-Zellen (CD45 ⁺ /CD19 ⁺ /CD138 ⁺)	≤ 24 Stunden	7,06 IQR 8,76 (8,42 ± 5,56)	7,91 IQR 8,98 (9,16 ± 5,72)	15,71 IQR 11,32 (15,49 ± 5,85)
		36 Proben	10 Proben	10 Proben
		9,18 IQR 7,55 (9,10 ± 4,75)	5,68 IQR 5,40 (6,24 ± 3,50)	16,78 IQR 7,71 (17,03 ± 6,71)
	5. Tag	29 Proben	10 Proben	9 Proben
		8,50 IQR 6,38 (9,11 ± 5,12)	5,75 IQR 6,23 (6,98 ± 3,63)	15,02 IQR 7,08 (14,03 ± 3,50)
		26 Proben	8 Proben	6 Proben

Tabelle 12.2: Übersicht der Monozyten (CD45⁺/CD14⁺), NK-Zellen (CD45⁺/CD56⁺) und Plasmazell-Blasten (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁺) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung für den gesamten Beobachtungszeitraum in %; Median und IQR (Mittelwert ± Standardabweichung); Anzahl der ausgewerteten Proben

		Infarkt-Gruppe	ICB-Gruppe	SAB-Gruppe		
Monozyten (CD45 ⁺ /CD14 ⁺)	≤ 24 Stunden	23,79 IQR 21,60 (27,97 ± 14,85) 36 Proben	31,56 IQR 14,08 (34,47 ± 12,03) 10 Proben	32,36 IQR 12,74 (32,32 ± 7,59) 10 Proben		
		5. Tag	26,98 IQR 28,34 (29,77 ± 16,54) 29 Proben	42,37 IQR 11,25 (39,24 ± 9,00) 10 Proben	34,48 IQR 18,29 (31,19 ± 9,55) 9 Proben	
			7. Tag	23,63 IQR 22,67 (27,49 ± 15,60) 26 Proben	33,54 IQR 18,14 (34,70 ± 10,70) 8 Proben	28,77 IQR 27,58 (29,33 ± 15,96) 6 Proben
	NK-Zellen (CD45 ⁺ /CD56 ⁺)	≤ 24 Stunden	11,08 IQR 11,98 (13,94 ± 8,19) 36 Proben	14,78 IQR 11,51 (14,07 ± 6,59) 10 Proben	9,80 IQR 8,97 (10,81 ± 7,12) 10 Proben	
			5. Tag	10,37 IQR 10,70 (13,28 ± 7,27) 29 Proben	13,75 IQR 14,56 (13,88 ± 6,81) 10 Proben	7,77 IQR 8,74 (8,56 ± 5,63) 9 Proben
				7. Tag	11,96 IQR 9,71 (13,15 ± 7,25) 26 Proben	14,93 IQR 13,32 (13,45 ± 6,42) 8 Proben
Plasmazell-Blasten (CD45 ⁺ /CD19 ⁺ /CD138 ⁺)		≤ 24 Stunden	0,18 IQR 0,18 (0,24 ± 0,29) 36 Proben	0,11 IQR 0,18 (0,33 ± 0,61) 10 Proben	0,19 IQR 0,33 (0,24 ± 0,17) 10 Proben	
			5. Tag	0,22 IQR 0,17 (0,22 ± 0,12) 29 Proben	0,08 IQR 0,06 (0,10 ± 0,03) 10 Proben	0,22 IQR 0,22 (0,22 ± 0,13) 9 Proben
				7. Tag	0,22 IQR 0,18 (0,38 ± 0,92) 26 Proben	0,12 IQR 0,10 (0,26 ± 0,43) 8 Proben

Tabelle 13: Übersicht der Veränderungen der CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺) und B-Zellen (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁺) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung
Angabe der p-Werte

		≤ 24 Stunden zu 5. Tag	5. zu 7. Tag	≤ 24 Stunden zu 7. Tag
Infarkt-Gruppe	CD4 ⁺ T-Zellen	0,854	0,328	0,124
	CD8 ⁺ T-Zellen	0,469	0,517	0,675
	B-Zellen	<u>0,094</u>	0,469	<u>0,096</u>
ICB-Gruppe	CD4 ⁺ T-Zellen	0,173	<u>0,093</u>	0,889
	CD8 ⁺ T-Zellen	0,953	0,263	0,575
	B-Zellen	0,594	0,779	0,401
SAB-Gruppe	CD4 ⁺ T-Zellen	0,110	0,249	0,116
	CD8 ⁺ T-Zellen	0,594	0,753	0,345
	B-Zellen	0,594	0,345	0,116

Tabelle 14: Übersicht der Korrelation zwischen dem initialen Spiegel der CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺) oder B-Zellen (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁺) und der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum (Messung ≤ 24 Stunden zu Messung 7. Tag)

Angabe des Korrelationskoeffizienten

		Veränderung der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum
Infarkt-Gruppe	CD4 ⁺ T-Zellen	+ 0,001
	CD8 ⁺ T-Zellen	- 0,295
	B-Zellen	+ 0,355
ICB-Gruppe	CD4 ⁺ T-Zellen	+ 0,067
	CD8 ⁺ T-Zellen	- 0,096
	B-Zellen	- 0,330
SAB-Gruppe	CD4 ⁺ T-Zellen	- 0,075
	CD8 ⁺ T-Zellen	<u>- 0,561</u>
	B-Zellen	<u>+ 0,718</u>

3.4.4. Vergleich der Subgruppen

3.4.4.1. CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen und B-Zellen

Im direkten Vergleich fanden sich in allen drei Messungen höhere mediane Anteile der B-Zellen ($CD45^+/CD19^+/CD138^-$) in der SAB-Gruppe gegenüber der Infarkt- und ICB-Gruppe (**B-Zellen: ≤ 24 Stunden:** SAB-Gruppe 15,71 %, Infarkt-Gruppe 7,06 %, ICB-Gruppe 7,91 %, $p=0,009$; **5. Tag:** SAB-Gruppe 16,78 %, Infarkt-Gruppe 9,18 %, ICB-Gruppe 5,68 %, $p=0,001$; **7. Tag:** SAB-Gruppe 15,02 %, Infarkt-Gruppe 8,50 %, ICB-Gruppe 5,75 %, $p=0,026$) (Abb. 13; Tab. 12.1 und 15).

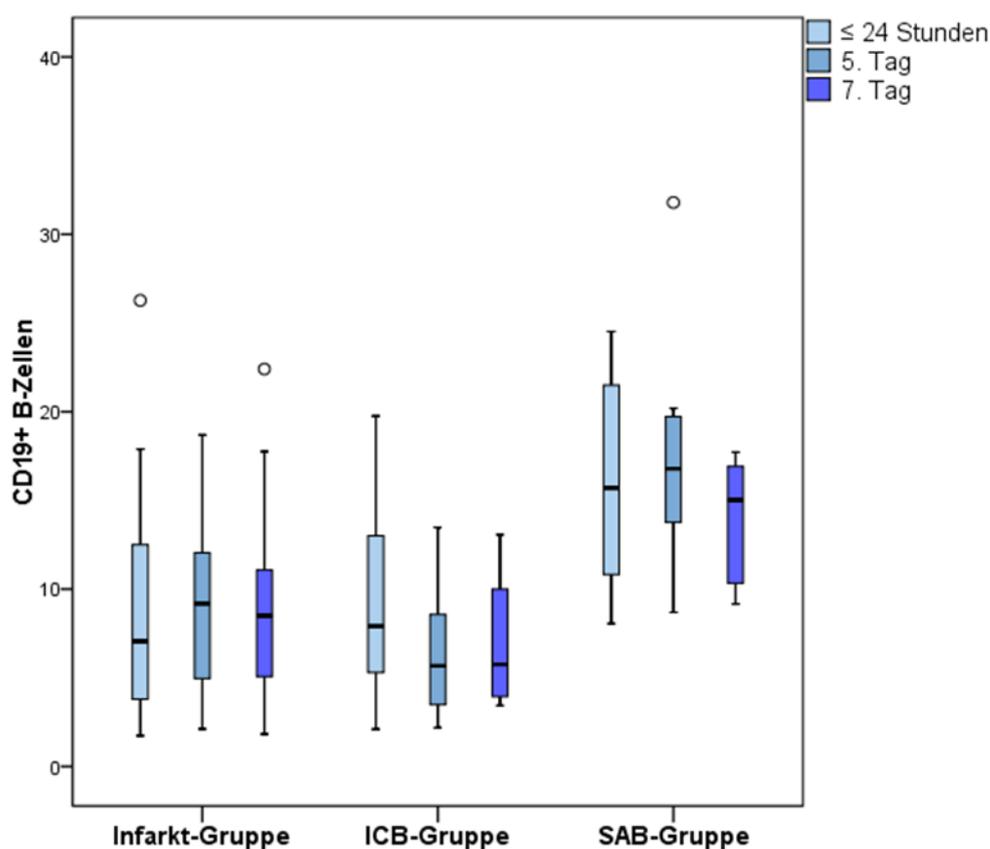


Abbildung 13: Vergleich der Freisetzung der B-Zellen ($CD45^+/CD19^+/CD138^-$) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung
 x-Achse: Beobachtungszeitraum, für zerebralen Infarkt, ICB und SAB; y-Achse: B-Zellen in %

Im direkten Vergleich der Subgruppen fand sich bei den medianen Anteilen der CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺) in allen Untersuchungen kein relevanter Unterschied (**CD4⁺ T-Zellen: ≤ 24 Stunden:** Infarkt-Gruppe 21,26 %, ICB-Gruppe 23,23 %, SAB-Gruppe 21,26 %, p=0,992; **5. Tag:** Infarkt-Gruppe 20,84 %, ICB-Gruppe 15,85 %, SAB-Gruppe 21,69 %, p=0,445; **7.Tag:** Infarkt-Gruppe 23,34 %, ICB-Gruppe 20,83 %, SAB-Gruppe 27,35 %, p=0,239) (Tab. 12.1 und 15).

Bei den medianen Anteilen der CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺) bestand im direkten Vergleich der Subgruppen in allen Untersuchungen kein relevanter Unterschied (**CD8⁺ T-Zellen: ≤ 24 Stunden:** Infarkt-Gruppe 12,46 %, ICB-Gruppe 12,92 %, SAB-Gruppe 10,64 %, p=0,799; **5. Tag:** Infarkt-Gruppe 11,15 %, ICB-Gruppe 12,11 %, SAB-Gruppe 11,45 %, p=0,687; **7.Tag:** Infarkt-Gruppe 12,28 %, ICB-Gruppe 15,11 %, SAB-Gruppe 8,58 %, p=0,587) (Tab. 12.1 und 15).

3.4.4.2. weitere Immunzellen

Es fand sich in der Messung am 5. Tag ein niedrigerer medianer Anteil von Plasmazell-Blasten (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁺) in der ICB-Gruppe gegenüber der Infarkt- und SAB-Gruppe (**Plasmazell-Blasten: 5. Tag:** ICB-Gruppe 0,08 %, Infarkt-Gruppe 0,22 %, SAB-Gruppe 0,22%, p=0,003). In der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden und am 7. Tag fand sich kein relevanter Unterschied des medianen Anteils der Plasmazell-Blasten (CD45⁺/CD19⁺/CD138⁺) zwischen den einzelnen Gruppen (**≤ 24 Stunden:** Infarkt-Gruppe 0,18 %, ICB-Gruppe 0,11 %, SAB-Gruppe 0,19 %, p=0,538; **7. Tag:** Infarkt-Gruppe 0,22 %, ICB-Gruppe 0,12 %, SAB-Gruppe 0,14 %, p=0,326) (Abb. 14; Tab. 12.2 und 15).

Im direkten Vergleich der Subgruppen fand sich bei den medianen Anteilen der Monozyten (CD45⁺/CD14⁺) in allen Untersuchungen kein relevanter Unterschied (**Monozyten: ≤ 24 Stunden:** Infarkt-Gruppe 23,79 %, ICB-Gruppe 31,56 %, SAB-Gruppe 32,36 %, p=0,105; **5. Tag:** Infarkt-Gruppe 26,98 %, ICB-Gruppe 42,37 %, SAB-Gruppe 34,48 %, p=0,118; **7. Tag:** Infarkt-Gruppe 23,63 %, ICB-Gruppe 33,54 %, SAB-Gruppe 28,77 %, p=0,335) (Tab. 12.2 und 15).

Bei den medianen Anteilen der NK-Zellen (CD45⁺/CD56⁺) bestand im direkten Vergleich der Subgruppen in allen Untersuchungen kein relevanter Unterschied (**NK-Zellen: ≤ 24 Stunden:** Infarkt-Gruppe 11,08 %, ICB-Gruppe 14,78 %, SAB-Gruppe 9,80 %, p=0,405; **5. Tag:** Infarkt-Gruppe 10,37 %, ICB-Gruppe 13,75 %, SAB-Gruppe 7,77 %, p=0,183; **7.Tag:** Infarkt-Gruppe 11,96 %, ICB-Gruppe 14,93 %, SAB-Gruppe 5,43 %, p=0,203) (Tab. 12.2 und 15).

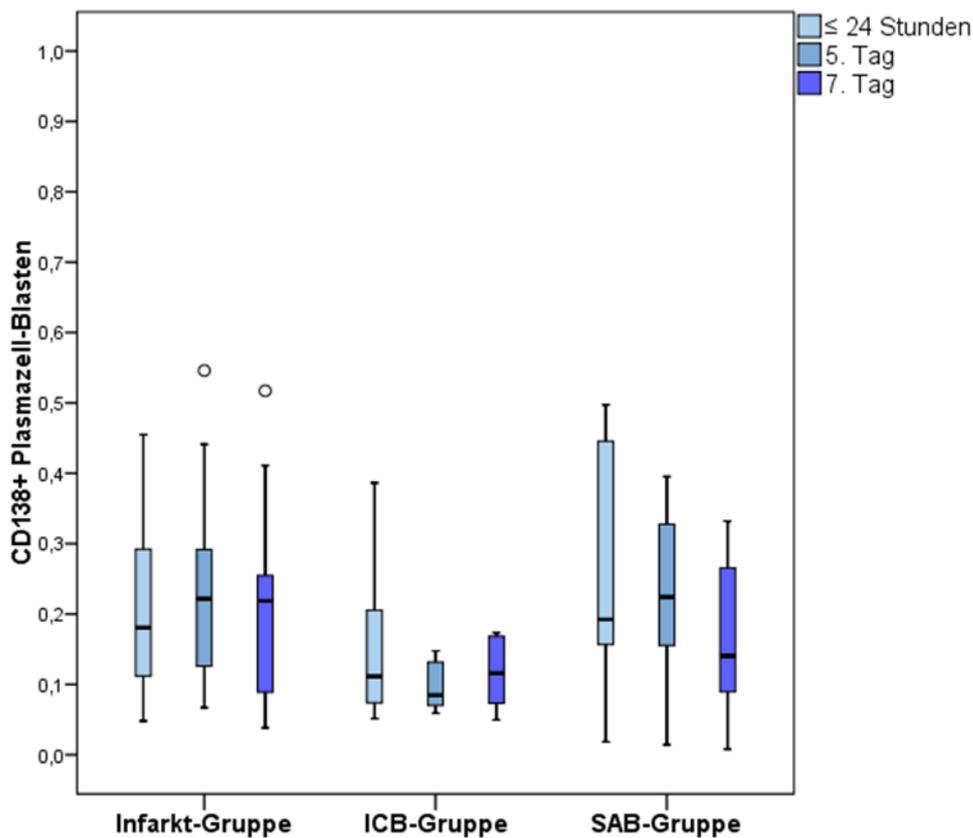


Abbildung 14: Vergleich der Freisetzung der Plasmazell-Blasten ($CD45^+/CD19^+/CD138^+$) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung
x-Achse: Beobachtungszeitraum für zerebralen Infarkt, ICB und SAB; y-Achse: Plasmazell-Blasten in %

Tabelle 15: Übersicht des Subgruppenvergleichs der $CD4^+$ T-Zellen ($CD45^+/CD3^+/CD4^+$), $CD8^+$ T-Zellen ($CD45^+/CD3^+/CD8^+$), B-Zellen ($CD45^+/CD19^+/CD138^+$), der Monozyten ($CD45^+/CD14^+$), NK-Zellen ($CD45^+/CD56^+$) und Plasmazell-Blasten ($CD45^+/CD19^+/CD138^+$)
Angabe des p-Wertes

		≤ 24 Stunden	5. Tag	7. Tag
p-Werte	CD4 ⁺ T-Zellen	0,992	0,445	0,239
	CD8 ⁺ T-Zellen	0,799	0,697	0,587
	B-Zellen	0,009	0,001	0,026
	Monozyten	0,105	0,118	0,335
	NK-Zellen	0,405	0,183	0,203
	Plasmazell-Blasten	0,538	0,003	0,326

4. Diskussion

4.1. CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen

In der vorliegenden Arbeit sollte als primäres Ziel nachgewiesen werden, dass es bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt zu einem Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen nach dem akuten Ereignis kommt. Bei Patienten mit einer intrazerebralen Blutung oder einer Subarachnoidalblutung sollte gezeigt werden, dass es ebenfalls zu einem Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen nach dem akuten Ereignis kommt. Diese Hypothesen konnten nur teilweise bestätigt werden.

In der Infarkt-Gruppe zeigte sich ein relevanter Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen zwischen dem Messpunkt innerhalb von 24 Stunden nach dem Ereignis bis zum 5. Tag ($p=0,013$) und zwischen dem 5. und 7. Tag ($p=0,042$). Insgesamt kam es bezogen auf den gesamten Untersuchungszeitraum zu einem Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen um 220 %, wobei dieser Gesamtanstieg das vorgegebene Signifikanzniveau knapp nicht erreichte ($p=0,079$).

In der SAB-Gruppe fand sich ebenfalls ein tendenzieller Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bezogen auf den gesamten Untersuchungszeitraum, jedoch wurde das vorgegebene Signifikanzniveau knapp nicht erreicht ($p=0,075$). In der ICB-Gruppe ergab sich kein relevanter Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im Gesamtzeitraum von sieben Tagen.

Im direkten Vergleich zeigte sich in der Infarkt- und der SAB-Gruppe ein höherer Anteil an CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen gegenüber der ICB-Gruppe in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden ($p=0,017$) und tendenziell auch in der Messung am 5. Tag nach dem Ereignis, wobei das vorgegebene Signifikanzniveau knapp nicht erreicht wurde ($p=0,068$).

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die bei einem zerebralen Infarkt akut vorliegende Hypoxie des Gewebes einen Einfluss auf die Freisetzung von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen hat.

So konnte bereits früher nachgewiesen werden, dass ein zuvor erlittenes ischämisches Ereignis, wie z.B. ein Myokardinfarkt oder eine Extremitätenischämie, die Freisetzungsrate von Vorläuferzellen erhöht (Schomig et al., 2006; Shintani et al., 2001; Takahashi et al., 1999).

Zusätzlich konnte in der Grundlagenforschung ein Zusammenhang zwischen einer Hypoxie des Gewebes und dem Homing von Vorläuferzellen nachgewiesen werden. So bewirkt eine Hypoxie im Gewebe über das Chemokin HIF-1 eine vermehrte Freisetzung von VEGF und insbesondere SDF-1 in das Blut (Ceradini et al., 2004; Kelly et al., 2003). SDF-1 wiederum

wird an den Oberflächenmarker CXCR₄ der endothelialen Vorläuferzellen gebunden, was das Homing ermöglicht (Yamaguchi, 2003).

Während der Einfluss endothelialer Vorläuferzellen für andere Krankheitsbilder bereits untersucht wurde, ist die klinische Datenlage und Wertigkeit endothelialer Vorläuferzellen bei akuten zerebralen Ereignissen insgesamt uneinheitlich.

In einer Studie wurde bei 138 Patienten mit einem zerebralen Infarkt die Anzahl CD34⁺/VEGFR₂⁺ Vorläuferzellen mittels Durchflusszytometrie gemessen (Yip et al., 2008). Hier zeigte sich in der Messung 48 Stunden nach dem Ereignis eine höhere Anzahl endothelialer Vorläuferzellen bei Patienten mit einem leichten bis mittelschweren zerebralen Infarkt als bei Patienten der nach Alter und Grunderkrankungen vergleichbaren Risiko-Gruppe. Dagegen fand sich eine verminderte Anzahl von endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit einem schweren zerebralen Infarkt, definiert als ein Wert auf der National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) von ≥ 12 Punkten.

Eine andere Studie zeigte eine Assoziation von niedrigeren Serumspiegeln endothelialer Vorläuferzellen (CD34⁺/CD133⁺, CD133⁺/VEGFR₂⁺ und CD34⁺/CD133⁺/VEGFR₂⁺; mittels Durchflusszytometrie gemessen) und einem großem zerebralen Infarkt in der Bildgebung (Bogoslovsky et al., 2010).

In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass ein Anstieg der endothelialen Vorläuferzellen innerhalb von sieben Tagen nach einem zerebralen Infarkt mit einem besseren klinischen Outcome nach drei Monaten assoziiert ist (Sobrinho et al., 2007). Jedoch verwendete diese spanische Arbeitsgruppe die Nachweismethode mittels Zellkultur.

Im Gegensatz dazu konnte in einer neueren Arbeit kein Zusammenhang zwischen einem guten klinischen Outcome bzw. der Schwere eines zerebralen Infarktes und einem erhöhten Spiegel an endothelialen Vorläuferzellen gezeigt werden (Marti-Fabregas et al., 2013). Hier wurden endotheliale Vorläuferzellen als CD34⁺/CD133⁺/VEGFR₂⁺ Zellen definiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Diese Ergebnisse wurden in einer Studie aus dem Jahr 2015 bestätigt. In dieser wurden ebenfalls CD34⁺/CD133⁺/VEGFR₂⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Es bestand keine Korrelation zwischen der Größe bzw. der Schwere eines Schlaganfalls und der Menge an endothelialen Vorläuferzellen (Regueiro et al., 2015). Jedoch fanden sich bei Patienten mit zerebralem Infarkt oder TIA innerhalb der ersten 24 Stunden mehr endotheliale Vorläuferzellen als bei einer nicht gematchten Kontrollgruppe.

Insgesamt zeigen die meisten Studien, dass es nach einem zerebralen Infarkt zu einem Anstieg der endothelialen Vorläuferzellen kommt. Dies zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit in der Subgruppe der zerebralen Infarkte.

Über die Freisetzung von endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit einer intrazerebralen Blutung existieren aktuell nur wenige Daten.

Eine Studie mit 32 Patienten mit einer intrazerebralen Blutung zeigte einen signifikanten Anstieg von CD34⁺ Zellen in der Durchflusszytometrie innerhalb von sechs bis acht Tagen nach dem Ereignis bei Patienten mit gutem klinischem Outcome definiert als ein Wert der „modified Rankin Scale“ von ≤ 2 Punkten nach drei Monaten. Bei Patienten mit einem schlechten Outcome kam es zu keinem Anstieg (Sobrino et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein relevanter Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen innerhalb des Beobachtungszeitraumes von sieben Tagen nach dem Ereignis nachgewiesen werden. Da das klinische Outcome nach drei Monaten nicht erfasst wurde, kann leider nicht beurteilt werden, in wie weit die vorliegenden Ergebnisse auf eine Patientengruppe mit ungünstigem Risikoprofil zurückzuführen sind.

Auch über die Freisetzung von endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit einer Subarachnoidalblutung existieren nur wenige Daten.

Eine Studie, die die Veränderungen bei der Freisetzung von endothelialen Vorläuferzellen nach einer akuten Hirnschädigung, definiert als Subarachnoidalblutung oder Schädelhirntrauma, untersuchte, zeigte, dass für insgesamt 12 Tage nach einer akuten Hirnschädigung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant weniger endotheliale Vorläuferzellen nachweisbar waren (van Ierssel et al., 2015). Im direkten Vergleich wurden bei Patienten mit einer Subarachnoidalblutung signifikant weniger endotheliale Vorläuferzellen als bei Patienten mit einem Schädelhirntrauma gemessen. Hier wurden mittels Durchflusszytometrie gemessene CD34⁺/VEGFR₂⁺ Zellen als endotheliale Vorläuferzellen gewertet.

Weiterhin wurden von einer anderen Arbeitsgruppe die Veränderungen bei der Freisetzung von endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit zerebralen Aneurysmen untersucht. Dabei wurden zwei Gruppen unterschieden: Patienten mit einem rupturierten Aneurysma, die folglich eine Subarachnoidalblutung erlitten hatten, und Patienten mit einem intakten Aneurysma. Es fanden sich signifikant weniger mittels Durchflusszytometrie gemessene endotheliale Vorläuferzellen (CD34⁺/CD133⁺ und CD34⁺/VEGFR₂⁺) bei Patienten mit einem zerebralen Aneurysma im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (Wei et al., 2011). Ein Unterschied zwischen Patienten mit einer Subarachnoidalblutung und Patienten mit einem intakten Aneurysma fand sich nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein tendenzieller Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einer Subarachnoidalblutung innerhalb des Beobachtungszeitraumes von sieben Tagen nach dem Ereignis beobachtet.

Auch hier gibt es mehrere Erklärungen für die Diskrepanz der Ergebnisse. So ist die Fallzahl in der vorliegenden Studie für die SAB-Gruppe sehr gering. Weiterhin wurden in den anderen

Studien auch Patienten mit Schädelhirntrauma oder ähnlichen Krankheitsbildern eingeschlossen, was die Vergleichbarkeit deutlich einschränkt.

Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde die Freisetzung von endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt (18 Patienten) bzw. einer intrazerebralen Blutung (16 Patienten) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht (Paczkowska et al., 2013). Dabei wurden sowohl CD34⁺/CD133⁺/VEGFR₂⁺ Zellen als auch CD34⁺/VEGFR₂⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie innerhalb von 24 Stunden, an Tag 3 und an Tag 7 nach dem Ereignis gemessen. Bei der Bestimmung der CD34⁺/VEGFR₂⁺ Zellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Zellzahl bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt bzw. einer intrazerebralen Blutung. Bei der Bestimmung der CD34⁺/CD133⁺/VEGFR₂⁺ Zellen fand sich nur bei Patienten mit einer intrazerebralen Blutung eine signifikante Erhöhung.

Die vorliegende Arbeit zeigte dagegen in der Infarkt-Gruppe einen höheren Anteil an CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen in der Messung \leq 24 Stunden und tendenziell auch in der Messung am 5. Tag als in der ICB-Gruppe. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen der oben genannten Studie ist in diesem Fall teilweise auch mit der schlechten Vergleichbarkeit bei Verwendung unterschiedlicher Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie zu erklären.

In aktuellen Studien (Marti-Fabregas et al., 2013; Paczkowska et al., 2013; Regueiro et al., 2015; Sobrino et al., 2011; van Ierssel et al., 2015; Wei et al., 2011; Yip et al., 2008) wird meist die Durchflusszytometrie verwendet, da es mit Hilfe dieser Methode möglich ist die Expression von bestimmten Oberflächenmarkern durch Bindung entsprechender Antikörper genau zu messen und so unterschiedliche Zellpopulationen sicherer zu identifizieren, wie beispielsweise CD34⁺/CD133⁺ Zellen. Weiterhin ist die Methode schnell und mit relativ wenig personellem bzw. technischem Aufwand durchzuführen. Aus diesen Gründen wurde die Durchflusszytometrie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Auswahl der verwendeten Oberflächenmarker ist jedoch entscheidend für die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. So wird beispielsweise CD34 nicht nur von endothelialen Vorläuferzellen und reifen Endothelzellen sondern auch von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (Asahara, 1997; Brown et al., 1991; Fina et al., 1990). CD133 kommt bei Stamm- und Vorläuferzellen, nicht jedoch auf reifen Endothelzellen vor. Nach Verlust von CD133 können sich Vorläuferzellen in reife Endothelzellen differenzieren (Gehling et al., 2000). VEGFR₂ kommt dagegen sowohl auf reifen Endothelzellen als auch auf endothelialen Vorläuferzellen vor (Karkkainen and Petrova, 2000; Urbich and Dimmeler, 2004). Grundsätzlich kann man daher zwei Untergruppen endothelialer Vorläuferzellen unterscheiden: CD34⁺/CD133⁺ Zellen, welche man als frühe endotheliale Vorläuferzellen, und die dreifachpositiven CD34⁺/CD133⁺/VEGFR₂⁺ Zellen, welche man als späte endotheliale Vorläuferzellen bezeichnen kann.

Das Problem der dreifachpositiven Zellen ist ihr sehr geringer Anteil (ca. 0,002% bzw. 0,01 – 0,0001%) an den zirkulierenden mononukleären Zellen und die daraus resultierende Messungenauigkeit (Khan et al., 2005; Peichev et al., 2000). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit nur CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Zusammenfassend ergänzen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die bereits publizierten Daten, die einen Anstieg der endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt nachgewiesen haben (Paczkowska et al., 2013; Regueiro et al., 2015; Yip et al., 2008). Die wahrscheinlichste Erklärung für den beobachteten Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen ist, wie oben erwähnt, die bei einem zerebralen Infarkt vorliegende Hypoxie des Gewebes.

So zeigte sich in der SAB-Gruppe tendenziell ein geringerer Anstieg der Vorläuferzellen und in der ICB-Gruppe kein wertbarer Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen. Prinzipiell fehlt bei diesen Krankheitsbildern eine ausgeprägte Gewebeischämie. Der Reiz für die Freisetzung von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen ist daher möglicherweise abgeschwächt. Zwar kommt es bei diesen Krankheitsbildern auch zu einer Schädigung von Blutgefäßen, jedoch bleibt die Blutversorgung in den betroffenen Arealen meist erhalten. Folglich wäre es interessant, zum Beispiel die Freisetzung von endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit zerebralen Infarkten als Komplikation eines Vasokonstriktionssyndroms bei einer Subarachnoidalblutung zu untersuchen. Gerade die Untersuchung von Mischformen der hier untersuchten Krankheitsbilder könnte weitere Erkenntnisse über den Einfluss der Gewebehypoxie als Ursache für den Anstieg von endothelialen Vorläuferzellen bringen.

Eine andere Erklärung für die Beobachtungen könnte an den gewählten Messzeitpunkten (\leq 24 Stunden, 5. Tag und 7. Tag) liegen. So ist es durchaus möglich, dass es auch bei Patienten mit einer intrazerebralen Blutung zu einem vergleichbaren Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen wie bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt kommt, dieser jedoch aufgrund der gewählten Zeitpunkte der Messungen nicht erfasst werden konnte. Gerade wenn die Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen über Hormone wie G-CSF oder VEGF (Kalka et al., 2000; Takahashi et al., 1999) stimuliert wird, kann die Signalkaskade eine längere Zeit in Anspruch nehmen und somit ein Anstieg erst verspätet eintreten.

4.2. Interleukine

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung der Hypothese, dass der initiale Serumspiegel von Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 8 (IL-8) mit der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen über den Beobachtungszeitraum bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung korreliert. Die oben genannte Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht sicher bestätigt werden.

Eine signifikante Korrelation der IL-6 oder IL-8 Konzentrationen in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden nach einem Ereignis mit den CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen zeigte sich in keiner der drei untersuchten Gruppen. Es fand sich jedoch in der SAB-Gruppe eine mittlere positive Korrelation der Konzentrationen von IL-6 ($r=+0,681$) und IL-8 ($r=+0,705$), welche jedoch jeweils das vorgegebene Signifikanzniveau nicht erreichten.

Weiterhin fand sich im Subgruppenvergleich in der SAB-Gruppe in der Messung am 5. Tag ein niedrigerer IL-8 Serumspiegel als in der Infarkt- und der ICB-Gruppe ($p=0,025$). In der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden war der IL-8 Serumspiegel in der SAB-Gruppe tendenziell ebenfalls im Vergleich zu der Infarkt- und der ICB-Gruppe erniedrigt, jedoch wurde das vorgegebene Signifikanzniveau knapp nicht erreicht ($p=0,071$). Innerhalb der einzelnen Subgruppen kam es bezogen auf den gesamten Untersuchungszeitraum zu keiner relevanten Veränderung der Serumspiegel von IL-6 oder IL-8.

Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie unserer Arbeitsgruppe überein, in der sich ebenfalls keine Korrelation der Freisetzung von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen und IL-8 bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt fand (Sepp et al., 2014).

Im Gegensatz dazu wurde im Tiermodell gezeigt, dass die Mobilisation endothelialer Vorläuferzelle durch IL-8 gefördert werden kann (Fibbe et al., 2000; Laterveer et al., 1995). Weiterhin korrelierte bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt ein erhöhter Serumspiegel von IL-8 mit einer erhöhten Zahl von endothelialen Vorläuferzellen (Schomig et al., 2006).

Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist die eingeschränkte Übertragbarkeit eines Tiermodells auf den Menschen. Zudem erscheint es möglich, dass auch der Ort der akuten Schädigung eine Rolle spielt, da das Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke vom restlichen Körper abgeschottet ist.

In anderen Arbeiten wurde beschrieben, dass IL-8 die Angiogenese fördert (Lapidot and Petit, 2002).

Bei einer Subarachnoidalblutung kommt es im Gegensatz zu einem zerebralen Infarkt oder einer intrazerebralen Blutung zu einer vergleichsweise geringen direkten Schädigung des Hirnparenchyms, da die Hauptmenge an Blut in den Liquorraum und nicht direkt in das

Hirnparenchym eindringt. Nach einer Schädigung des Hirnparenchyms wird vermutlich über eine Signalkaskade, unter anderem auch mittels IL-8, eine Revaskularisierung angeregt. Daher erscheint es möglich, dass die im Subgruppenvergleich niedrigeren Serumspiegel von IL-8 in der SAB-Gruppe mit einer fehlenden Aktivierung der Signalkaskade zu erklären sind. Der Grund für die beobachtete Korrelation von IL-8 mit der Freisetzung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen, bei im Vergleich niedrigeren IL-8 Ausgangswerten in der SAB-Gruppe, lässt sich mit Blick auf die bereits vorhandenen Daten noch nicht klären. Bei kleiner Studienpopulation kann hier ein Zufallseffekt nicht ausgeschlossen werden.

Neben IL-8 ist auch IL-6 ein wichtiger Botenstoff bei vaskulären Ereignissen. Aus bereits veröffentlichten Studien kann entnommen werden, dass die Serumspiegel für IL-6 nach einem Schlaganfall, einem Myokardinfarkt oder bei einer instabilen Angina pectoris ansteigen (Biasucci et al., 1996; Klehmet et al., 2009; Kosmala et al., 2005; Vogelgesang et al., 2008). Weiterhin wurden neuroprotektive Effekte für IL-6 beschrieben (Suzuki et al., 2009). In einer Auswertung der Daten der „Northern Manhattan Study“ in einem großen Patientenkollektiv (1656 Patienten) wurde IL-6 als Entzündungsparameter in Verbindung mit dem Risiko für einen zerebralen Infarkt untersucht (Luna et al., 2014). Dort zeigte sich bei Patienten mit einem initial erhöhten Serumspiegel für IL-6 ein im Beobachtungszeitraum erniedrigtes Risiko für einen zerebralen Infarkt im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein relevanter Anstieg von IL-6 in den untersuchten Subgruppen im Verlauf des Beobachtungszeitraumes nachgewiesen werden. Es zeigte sich lediglich in der SAB-Gruppe eine mittlere Korrelation des IL-6 Ausgangswertes mit der Freisetzung der endothelialen Vorläuferzellen. Ohne Vergleich mit einer Kontrollgruppe konnte jedoch ein möglicherweise bereits initial erhöhter Serumspiegel von IL-6 nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin ist IL-6 relativ unspezifisch und kann sehr kurzfristig, zum Beispiel bei akuten Infekten, freigesetzt werden, was sicher die Bewertung dieses Markers im Zusammenhang mit der Freisetzung von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen erschwert.

4.3. Immunzellen

Als letztes Ziel dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der initiale Anteil von CD4⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺) und B-Zellen (CD45⁺/CD19⁺/CD138) mit der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen über den gesamten Beobachtungszeitraum bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung korreliert. Diese Hypothese konnte nicht sicher bestätigt werden.

Es bestand in den einzelnen Subgruppen keine signifikante Korrelation zwischen CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen oder B-Zellen zwischen der initialen Messung und der Veränderung der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen im ganzen Beobachtungszeitraum. In der SAB-Gruppe zeigte sich jedoch eine positive mittlere Korrelation zwischen den B-Zellen und den CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen ($r=+0,718$) und eine negative mittlere Korrelation zwischen den CD8⁺ T-Zellen und den CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen ($r=-0,561$), wobei jedoch jeweils das vorgegebene Signifikanzniveau nicht erreicht wurde.

Im Subgruppenvergleich fanden sich in der SAB-Gruppe in allen drei Messungen höhere Anteile an B-Zellen als in der Infarkt- und ICB-Gruppe ($p=0,009$; $p=0,001$; $p=0,026$). Innerhalb der einzelnen Gruppen kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Immunzellen. Auch wenn das vorgegebene Signifikanzniveau jeweils nicht erreicht wurde, kam es tendenziell in der Infarkt-Gruppe zu einem Anstieg der B-Zellen bezogen auf den gesamten Untersuchungszeitraum ($p=0,096$) und in der ICB-Gruppe zu einem Anstieg der CD4⁺ T-Zellen zwischen dem 5. bis zum 7. Tag ($p=0,093$).

Die Verteilung der Subtypen von Immunzellen im Liquor und im Blut wurde kürzlich von einer Arbeitsgruppe unserer Klinik bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen untersucht. In dieser Studie zeigte sich im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, bestehend aus klinisch unauffälligen Patienten mit Kopfschmerzen, bei Schlaganfallpatienten, definiert als zerebraler Infarkt oder intrazerebrale Blutung, kein Unterschied in der Verteilung der Subgruppen der Immunzellen. Insbesondere zeigte sich kein Unterschied bei den CD19⁺ B-Zellen (Kowarik et al., 2014).

In einer anderen Studie (Mantani et al., 2014) wurden mittels Durchflusszytometrie neben CD19⁺ B-Zellen auch die Untergruppen CD19⁺/CD40⁺ und CD19⁺/CD86⁺ B-Zellen bei Patienten mit einem Schlaganfall, definiert als zerebraler Infarkt oder intrazerebrale Blutung, untersucht. Die Blutproben wurden im Rahmen dieser prospektiven Kohortenstudie allen Studienteilnehmern zu Beginn entnommen. In der Auswertung dieser Studie fand sich ebenfalls kein Unterschied hinsichtlich der CD19⁺ B-Zellen bei Schlaganfall Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Jedoch konnte gezeigt werden, dass nach Adjustierung

für Risikofaktoren eine initial erhöhtes Vorkommen von CD19⁺/CD40⁺ B-Zellen im Blut mit einem signifikant geringeren Risiko für einen Schlaganfall assoziiert war. Im Gegensatz dazu waren erhöhte Spiegel von CD19⁺/CD86⁺ B-Zellen in dieser Studie signifikant mit einem erhöhten Risiko für einen Schlaganfall und erhöhten Serumspiegeln für entzündungsfördernde Zytokine wie IL-6 oder IL-8 assoziiert.

Mit den speziellen Veränderungen der Subtypen der Immunzellen bei Patienten mit einer Subarachnoidalblutung befasste sich 1999 eine Forschungsgruppe (Chrapusta et al., 2000). Dabei konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede der einzelnen Subgruppen der Immunzellen zwischen der Kontrollgruppe und Patienten mit einer Subarachnoidalblutung gab. Insbesondere die CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen waren bei Patienten mit einer Subarachnoidalblutung im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Allerdings erhielten alle Patienten in dieser Studie Dexamethason zur Prävention sekundärer Komplikationen, so dass diese Ergebnisse nur eingeschränkt zu beurteilen sind.

Zusammenfassend ist ein Vergleich bei insgesamt nur wenigen Studien und unterschiedlichen Messzeitpunkten schwierig. Außerdem wurden zerebrale Infarkte und intrazerebrale Blutungen meist gemeinsam und nicht getrennt untersucht. Es liegen auch nur wenige Daten über den Vergleich der Subgruppen der Immunzellen bei den einzelnen Erkrankungen vor.

Insgesamt deuten die wenigen bisher publizierten Daten daraufhin, dass es wohl bei zerebralen Infarkten und bei intrazerebralen Blutungen keine wesentlichen Veränderungen bei den Subgruppen der Immunzellen gibt (Kowarik et al., 2014; Mantani et al., 2014). Eine mögliche Erklärung für die in diese Arbeit beobachteten signifikanten Erhöhung von B-Zellen und der tendenziell positiven Korrelation zwischen den B-Zellen und den CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einer Subarachnoidalblutung könnte in dem starken Entzündungsreiz liegen, der durch den Eintritt von Blut in den Liquorraum ausgelöst wird. Aufgrund der geringen Fallzahl kann ein Zufallseffekt jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dies sollte in weiteren Studien geprüft werden.

4.4. Limitationen der Studie

Limitiert werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vor allem durch die geringen Größen der ICB- bzw. SAB-Gruppe und der damit verbundenen großen Streubreite der Werte, sowie dem Fehlen einer gesunden Kontrollgruppe. Zusätzlich kam es in allen drei Gruppen zu relativ vielen Drop-Outs.

Weiterhin wurden die CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen nur zu drei Zeitpunkten gemessen. Diese Zeitpunkte waren zwar anhand von Vorstudien (Sepp et al., 2014) ausgewählt worden, jedoch könnte dennoch der Zeitpunkt der maximalen Freisetzung nicht erfasst worden sein. Die Messungen der Interleukine und der Immunzellen erfolgt ebenfalls nur zu den drei Zeitpunkten, welche für die CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen ausgewählt wurden, weswegen die Veränderungen der Interleukine und der Immunzellen potentiell nicht vollständig erfasst wurden.

Insbesondere bei den endothelialen Vorläuferzellen ist die Vergleichbarkeit dieser Arbeit zu bereits veröffentlichten Studien aufgrund der fehlenden einheitlichen Definition von endothelialen Vorläuferzellen und den unterschiedlichen Nachweismethoden erschwert.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Zerebrovaskuläre Ereignisse gehören zu den weltweit führenden Ursachen für langfristige Morbidität und Mortalität. Dabei kommt es in unterschiedlicher Form zu Schäden an den zerebralen Blutgefäßen. In den letzten Jahren fanden sich Hinweise darauf, dass endotheliale Vorläuferzellen (z.B. CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen) nach Verletzung eines Blutgefäßes Einfluss auf physiologische Reparaturmechanismen haben. Weiterhin ist unklar in wie weit Interleukine und Immunzellen dabei mitwirken.

Methodik: Das primäre Untersuchungsziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis eines Anstieges von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt (Infarkt-Gruppe), einer intrazerebralen Blutung (ICB-Gruppe) oder einer Subarachnoidalblutung (SAB-Gruppe). Weiterhin wurde untersucht, ob der initiale Interleukinspiegel (IL-6 und IL-8) bzw. der initiale Anteil von Immunzellen (CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen) mit der Veränderung von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebrovaskulären Ereignis korreliert. Insgesamt wurden 66 Patienten (44 Infarkt-Gruppe, 12 ICB-Gruppe und 10 SAB-Gruppe) in die Arbeit eingeschlossen. Innerhalb der ersten 24 Stunden, am 5. Tag und am 7. Tag nach dem Ereignis wurden die CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen, die Immunzellen (CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen) und die Interleukine (IL-6 und IL-8) bestimmt.

Ergebnisse: In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Infarkt-Gruppe ein signifikanter Anstieg der CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen innerhalb der ersten 24 Stunden bis zum 5. Tag ($p=0,013$) und vom 5. bis zum 7. Tag ($p=0,042$). Im direkten Vergleich zeigte sich in der Infarkt- und der SAB-Gruppe ein höherer Anteil an CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen gegenüber der ICB-Gruppe in der Messung innerhalb der ersten 24 Stunden ($p=0,017$). In der Auswertung der Immunzellen fand sich in der SAB-Gruppe im direkten Vergleich zu der Infarkt- und ICB-Gruppe eine erhöhter Anteil von B-Zellen in allen drei Messungen ($p=0,009$; $p=0,001$; $p=0,026$). Die weiteren Auswertungen der Infarkt-, ICB- und SAB-Gruppe für CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen, Interleukine und Immunzellen erreichten nicht das vorgegebene Signifikanzniveau. Die Korrelationsanalyse ergab in allen drei Subgruppen zwischen dem initialen Interleukinspiegel bzw. dem initialen Anteil der Immunzellen und der Veränderung von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen keinen Zusammenhang, der das vorgegebene Signifikanzniveau erreichte.

Schlussfolgerung: Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass insbesondere die auftretende Gewebehypoxie nach einem zerebralen Infarkt zu einer Freisetzung von CD34⁺/CD133⁺ Vorläuferzellen führt. Der durch das Eindringen von Blut in den Liquorraum ausgelöste starke Entzündungsreiz führt möglicherweise zu der Erhöhung von B-Zellen bei Patienten mit einer Subarachnoidalblutung.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	schematischer Aufbau des optischen Systems eines Durchflusszytometers	24
Abb. 2	Formeln zur Berechnung der benötigten Menge des Ficoll-Zentrifugat für die Färbung der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen aus der am Blutanalysegerät gemessener Zellzahl des Ficoll-Zentrifugats	28
Abb. 3	Formeln zur Berechnung der benötigten Menge des Zellgemisches für die Färbung der Immunzellen aus den gezählten Zellen	30
Abb. 4	Darstellung der Durchflusszytometrie bei der Färbung der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen	33
Abb. 5	Formel zur Berechnung der absoluten Anzahl CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen / µl Blut	34
Abb. 6.1	Darstellung der Durchflusszytometrie bei der Färbung der Immunzellen	35
Abb. 6.2	Darstellung der Durchflusszytometrie bei der Färbung der Immunzellen	36
Abb. 7	Verlauf der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt	40
Abb. 8	Verlauf der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einer intrazerebralen Blutung	41
Abb. 9	Verlauf der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einer Subarachnoidalblutung	42
Abb. 10	Vergleich der Freisetzung der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung	45
Abb. 11	Vergleich der Serumspiegel von Interleukin 8 bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung	51
Abb. 12:	Vergleich der Serumspiegel von Interleukin 6 bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung	52
Abb. 13	Vergleich der Freisetzung der B-Zellen (CD45 ⁺ /CD19 ⁺ /CD138 ⁻) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung	60
Abb. 14	Vergleich der Freisetzung der Plasmazell-Blasten (CD45 ⁺ /CD19 ⁺ /CD138 ⁺) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung	62

6.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	typische Marker endothelialer Vorläuferzellen und Darstellung des Differenzierungsgrades von endothelialen Vorläuferzellen abhängig von den Oberflächenmarkern	14
Tab. 2	Beispiele für Einflussfaktoren auf die Mobilisation von endothelialen Vorläuferzellen	15
Tab. 3	Funktionen und Wirkungen von Interleukin 6 bzw. Interleukin 8 nach einem Schlaganfall	21
Tab. 4	Basischarakteristika der Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung bzw. einer Subarachnoidalblutung und total	38
Tab. 5	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung	43
Tab. 6	Übersicht der Veränderungen der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung	43
Tab. 7	Übersicht des Subgruppenvergleichs der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen	44
Tab. 8	Übersicht der Serumspiegel von Interleukin 6 und 8 bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung für den gesamten Beobachtungszeitraum	48
Tab. 9	Übersicht der Veränderungen der Interleukine (IL-6 und IL-8) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung	49
Tab. 10	Übersicht der Korrelation zwischen dem initialen Interleukinspiegel (IL-6 oder IL-8) und der Veränderung der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum (Messung ≤ 24 Stunden zu Messung 7. Tag) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung	49
Tab. 11	Übersicht des Subgruppenvergleichs der Interleukine (IL-6 und IL-8)	50
Tab. 12.1	Übersicht der CD4 ⁺ T-Zellen (CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD4 ⁺), CD8 ⁺ T-Zellen (CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD8 ⁺) und B-Zellen (CD45 ⁺ /CD19 ⁺ /CD138 ⁺) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung für den gesamten Beobachtungszeitraum	56
Tab. 12.2	Übersicht der Monozyten (CD45 ⁺ /CD14 ⁺), NK-Zellen (CD45 ⁺ /CD56 ⁺) und Plasmazell-Blasten (CD45 ⁺ /CD19 ⁺ /CD138 ⁺) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung für den gesamten Beobachtungszeitraum	57
Tab. 13	Übersicht der Veränderungen der CD4 ⁺ T-Zellen (CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD4 ⁺), CD8 ⁺ T-Zellen (CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD8 ⁺) und B-Zellen (CD45 ⁺ /CD19 ⁺ /CD138 ⁺) bei Patienten mit einem zerebralen Infarkt, einer intrazerebralen Blutung und einer Subarachnoidalblutung	58

Tab. 14	Übersicht der Korrelation zwischen dem initialen Spiegel der CD4 ⁺ T-Zellen (CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD4 ⁺), CD8 ⁺ T-Zellen (CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD8 ⁺) oder B-Zellen (CD45 ⁺ /CD19 ⁺ /CD138 ⁻) und der Veränderung der CD34 ⁺ /CD133 ⁺ Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum (Messung ≤ 24 Stunden zu Messung 7. Tag)	59
Tab. 15	Übersicht des Subgruppenvergleichs der CD4 ⁺ T-Zellen (CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD4 ⁺), CD8 ⁺ T-Zellen (CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD8 ⁺), B-Zellen (CD45 ⁺ /CD19 ⁺ /CD138 ⁻), der Monozyten (CD45 ⁺ /CD14 ⁺), NK-Zellen (CD45 ⁺ /CD56 ⁺) und Plasmazell-Blasten (CD45 ⁺ /CD19 ⁺ /CD138 ⁺)	62

6.3. Literaturverzeichnis

Asahara, T. (1997). Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 275, 964-966.

Bahlmann, F.H., De Groot, K., Spandau, J.M., Landry, A.L., Hertel, B., Duckert, T., Boehm, S.M., Menne, J., Haller, H., and Fliser, D. (2004). Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 103, 921-926.

Biasucci, L.M., Vitelli, A., Liuzzo, G., Altamura, S., Caligiuri, G., Monaco, C., Rebuzzi, A.G., Ciliberto, G., and Maseri, A. (1996). Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 94, 874-877.

Bogoslovsky, T., Chaudhry, A., Latour, L., Maric, D., Luby, M., Spatz, M., Frank, J., and Warach, S. (2010). Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke. *Neurology* 75, 2059-2062.

Broderick, J.P., Brott, T., Tomsick, T., Miller, R., and Huster, G. (1993). Intracerebral hemorrhage more than twice as common as subarachnoid hemorrhage. *Journal of neurosurgery* 78, 188-191.

Brown, J., Greaves, M.F., and Molgaard, H.V. (1991). The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *International immunology* 3, 175-184.

Bundesamt, S. (2012). Statistisches Jahrbuch 2012.

Camargo, F.D., Green, R., Capetanaki, Y., Jackson, K.A., and Goodell, M.A. (2003). Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nature medicine* 9, 1520-1527.

Ceradini, D.J., Kulkarni, A.R., Callaghan, M.J., Tepper, O.M., Bastidas, N., Kleinman, M.E., Capla, J.M., Galiano, R.D., Levine, J.P., and Gurtner, G.C. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine* 10, 858-864.

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 2739-2749.

Chamorro, A., Meisel, A., Planas, A.M., Urra, X., van de Beek, D., and Veltkamp, R. (2012). The immunology of acute stroke. *Nature reviews Neurology* 8, 401-410.

Chavakis, E., Aicher, A., Heeschen, C., Sasaki, K., Kaiser, R., El Makhfi, N., Urbich, C., Peters, T., Scharffetter-Kochanek, K., Zeiher, A.M., *et al.* (2005). Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *The Journal of experimental medicine* 201, 63-72.

Chrapusta, S.J., Gorski, A., Mrowiec, T., Grieb, P., Andrychowski, J., and Ryba, M.S. (2000). Immune abnormalities in aneurysmal subarachnoid haemorrhage patients: relation to delayed cerebral vasospasm. *Scandinavian journal of immunology* 51, 400-407.

Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., *et al.* (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527-3561.

Czlonkowska, A., Cyrta, B., and Korlak, J. (1979). Immunological observations on patients with acute cerebral vascular disease. *Journal of the neurological sciences* 43, 455-464.

Docke, W.D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., Volk, H.D., and Kox, W. (1997). Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nature medicine* 3, 678-681.

Feigin, V.L., Lawes, C.M., Bennett, D.A., Barker-Collo, S.L., and Parag, V. (2009). Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet neurology* 8, 355-369.

Fibbe, W.E., Pruijt, J.F., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., Opdenakker, G., and Willemze, R. (2000). The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8-induced stem-cell mobilization. *Seminars in hematology* 37, 19-24.

Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A., and Greaves, M.F. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426.

Finlayson, O., Kapral, M., Hall, R., Asllani, E., Selchen, D., and Saposnik, G. (2011). Risk factors, inpatient care, and outcomes of pneumonia after ischemic stroke. *Neurology* 77, 1338-1345.

Foerch, C., Misselwitz, B., Sitzer, M., Steinmetz, H., and Neumann-Haefelin, T. (2008). The projected burden of stroke in the German federal state of Hesse up to the year 2050. *Deutsches Arzteblatt international* 105, 467-473.

Gehling, U.M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., *et al.* (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106-3112.

Goldstein, L.B., Bushnell, C.D., Adams, R.J., Appel, L.J., Braun, L.T., Chaturvedi, S., Creager, M.A., Culebras, A., Eckel, R.H., Hart, R.G., *et al.* (2011). Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 42, 517-584.

Grundmann, F., Scheid, C., Braun, D., Zobel, C., Reuter, H., Schwinger, R.H., and Muller-Ehmsen, J. (2007). Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 96, 621-627.

Haeusler, K.G., Schmidt, W.U., Fohring, F., Meisel, C., Helms, T., Jungehulsing, G.J., Nolte, C.H., Schmolke, K., Wegner, B., Meisel, A., *et al.* (2008). Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans. *Cerebrovascular diseases* 25, 50-58.

Handgretinger, R., Gordon, P.R., Leimig, T., Chen, X., Bühring, H.J., Niethammer, D., and Kuci, S. (2003). Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 996, 141-151.

Harms, H., Prass, K., Meisel, C., Klehmet, J., Rogge, W., Drenckhahn, C., Gohler, J., Bereswill, S., Gobel, U., Wernecke, K.D., *et al.* (2008). Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *PLoS one* 3, e2158.

Hill, J.M., Zalos, G., Halcox, J.P., Schenke, W.H., Waclawiw, M.A., Quyyumi, A.A., and Finkel, T. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine* 348, 593-600.

Hill, W.D., Hess, D.C., Martin-Studdard, A., Carothers, J.J., Zheng, J., Hale, D., Maeda, M., Fagan, S.C., Carroll, J.E., and Conway, S.J. (2004). SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63, 84-96.

Hristov, M., Erl, W., and Weber, P.C. (2003). Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 1185-1189.

Imitola, J., Raddassi, K., Park, K.I., Mueller, F.J., Nieto, M., Teng, Y.D., Frenkel, D., Li, J., Sidman, R.L., Walsh, C.A., *et al.* (2004). Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 18117-18122.

Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravereaux, E., Pieczek, A., Iwaguro, H., Hayashi, S.I., Isner, J.M., *et al.* (2000). Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res* 86, 1198-1202.

Karkkainen, M.J., and Petrova, T.V. (2000). Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 19, 5598-5605.

Katzan, I.L., Cebul, R.D., Husak, S.H., Dawson, N.V., and Baker, D.W. (2003). The effect of pneumonia on mortality among patients hospitalized for acute stroke. *Neurology* 60, 620-625.

Kelly, B.D., Hackett, S.F., Hirota, K., Oshima, Y., Cai, Z., Berg-Dixon, S., Rowan, A., Yan, Z., Campochiaro, P.A., and Semenza, G.L. (2003). Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res* 93, 1074-1081.

Khan, S.S., Solomon, M.A., and McCoy, J.P., Jr. (2005). Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 64, 1-8.

Kim, A.S., and Johnston, S.C. (2011). Global variation in the relative burden of stroke and ischemic heart disease. *Circulation* 124, 314-323.

Kissela, B.M., Khoury, J.C., Alwell, K., Moomaw, C.J., Woo, D., Adeoye, O., Flaherty, M.L., Khatri, P., Ferioli, S., De Los Rios La Rosa, F., *et al.* (2012). Age at stroke: temporal trends in stroke incidence in a large, biracial population. *Neurology* 79, 1781-1787.

Klehmet, J., Harms, H., Richter, M., Prass, K., Volk, H.D., Dirnagl, U., Meisel, A., and Meisel, C. (2009). Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* 158, 1184-1193.

Kleinschnitz, C., Kraft, P., Dreykluft, A., Hagedorn, I., Gobel, K., Schuhmann, M.K., Langhauser, F., Helluy, X., Schwarz, T., Bittner, S., *et al.* (2012). Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood*.

Kosmala, W., Przewlocka-Kosmala, M., and Mazurek, W. (2005). Proinflammatory cytokines and myocardial viability in patients after acute myocardial infarction. *International journal of cardiology* 101, 449-456.

Kowarik, M.C., Grummel, V., Wemlinger, S., Buck, D., Weber, M.S., Berthele, A., and Hemmer, B. (2014). Immune cell subtyping in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *Journal of neurology* 261, 130-143.

Krupinski, J., Kaluza, J., Kumar, P., Kumar, S., and Wang, J.M. (1994). Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 25, 1794-1798.

Lapidot, T., Dar, A., and Kollet, O. (2005). How do stem cells find their way home? *Blood* 106, 1901-1910.

Lapidot, T., and Petit, I. (2002). Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Experimental hematology* 30, 973-981.

Laterveer, L., Lindley, I.J., Hamilton, M.S., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (1995). Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* 85, 2269-2275.

Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jurgens, K., Miche, E., Bohm, M., and Nickenig, G. (2004). Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109, 220-226.

Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T., and Veltkamp, R. (2009). Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nature medicine* 15, 192-199.

Livingston, D.H., Appel, S.H., Wellhausen, S.R., Sonnenfeld, G., and Polk, H.C., Jr. (1988). Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 123, 1309-1312.

Luna, J.M., Moon, Y.P., Liu, K.M., Spitalnik, S., Paik, M.C., Cheung, K., Sacco, R.L., and Elkind, M.S. (2014). High-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6-dominant inflammation and ischemic stroke risk: the northern Manhattan study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 45, 979-987.

Mantani, P.T., Ljungcrantz, I., Andersson, L., Alm, R., Hedblad, B., Bjorkbacka, H., Nilsson, J., and Fredrikson, G.N. (2014). Circulating CD40+ and CD86+ B cell subsets demonstrate opposing associations with risk of stroke. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 211-218.

Marik, P.E. (2001). Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. *The New England journal of medicine* 344, 665-671.

Marti-Fabregas, J., Crespo, J., Delgado-Mederos, R., Martinez-Ramirez, S., Pena, E., Marin, R., Dinia, L., Jimenez-Xarrie, E., Fernandez-Arcos, A., Perez-Perez, J., *et al.* (2013). Endothelial progenitor cells in acute ischemic stroke. *Brain and behavior* 3, 649-655.

O'Donnell, M.J., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Chin, S.L., Rao-Melacini, P., Rangarajan, S., Islam, S., Pais, P., McQueen, M.J., *et al.* (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* 376, 112-123.

Ohab, J.J., Fleming, S., Blesch, A., and Carmichael, S.T. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 13007-13016.

Paczkowska, E., Golab-Janowska, M., Bajer-Czajkowska, A., Machalinska, A., Ustianowski, P., Rybicka, M., Klos, P., Dzieziejko, V., Safranow, K., Nowacki, P., *et al.* (2013). Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with haemorrhagic and ischaemic stroke: the role of endothelin-1. *Journal of the neurological sciences* 325, 90-99.

Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A., *et al.* (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958.

Perry, L., and Love, C.P. (2001). Screening for dysphagia and aspiration in acute stroke: a systematic review. *Dysphagia* 16, 7-18.

Popovic, N., Stefanovic-Budimkic, M., Mitrovic, N., Urosevic, A., Milosevic, B., Pelemis, M., Jevtovic, D., Beslac-Bumbasirevic, L., and Jovanovic, D. (2013). The frequency of poststroke infections and their impact on early stroke outcome. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 22, 424-429.

Prass, K., Braun, J.S., Dirnagl, U., Meisel, C., and Meisel, A. (2006). Stroke propagates bacterial aspiration to pneumonia in a model of cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 37, 2607-2612.

Prass, K., Meisel, C., Hoflich, C., Braun, J., Halle, E., Wolf, T., Ruscher, K., Victorov, I.V., Priller, J., Dirnagl, U., *et al.* (2003). Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *The Journal of experimental medicine* 198, 725-736.

Regueiro, A., Cuadrado-Godia, E., Bueno-Beti, C., Diaz-Ricart, M., Oliveras, A., Novella, S., Gene, G.G., Jung, C., Subirana, I., Ortiz-Perez, J.T., *et al.* (2015). Mobilization of endothelial progenitor cells in acute cardiovascular events in the PROCELL study: Time-course after acute myocardial infarction and stroke. *Journal of molecular and cellular cardiology* 80, 146-155.

Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., *et al.* (2012). Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 125, e2-e220.

Sacco, S., Marini, C., Toni, D., Olivieri, L., and Carolei, A. (2009). Incidence and 10-year survival of intracerebral hemorrhage in a population-based registry. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40, 394-399.

Schanzer, A., Wachs, F.P., Wilhelm, D., Acker, T., Cooper-Kuhn, C., Beck, H., Winkler, J., Aigner, L., Plate, K.H., and Kuhn, H.G. (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 14, 237-248.

Schomig, K., Busch, G., Steppich, B., Sepp, D., Kaufmann, J., Stein, A., Schomig, A., and Ott, I. (2006). Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *European heart journal* 27, 1032-1037.

Sepp, D., Franz, D., Triftshaeuser, N., Ott, I., Esposito-Bauer, L., Feurer, R., Seifert, C.L., Thaler, M., Hemmer, B., and Poppert, H. (2014). Mobilization of CD133+ progenitor cells in patients with acute cerebral infarction. *PloS one* 9, e70796.

Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y., and Imaizumi, T. (2001). Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103, 2776-2779.

Sobrinho, T., Arias, S., Perez-Mato, M., Agulla, J., Brea, D., Rodriguez-Yanez, M., and Castillo, J. (2011). Cd34+ progenitor cells likely are involved in the good functional recovery after intracerebral hemorrhage in humans. *Journal of neuroscience research* 89, 979-985.

Sobrinho, T., Hurtado, O., Moro, M.A., Rodriguez-Yanez, M., Castellanos, M., Brea, D., Moldes, O., Blanco, M., Arenillas, J.F., Leira, R., *et al.* (2007). The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38, 2759-2764.

Stellos, K., Langer, H., Daub, K., Schoenberger, T., Gauss, A., Geisler, T., Bigalke, B., Mueller, I., Schumm, M., Schaefer, I., *et al.* (2008). Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation* 117, 206-215.

Stott, D.J., Falconer, A., Miller, H., Tilston, J.C., and Langhorne, P. (2009). Urinary tract infection after stroke. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 102, 243-249.

Suzuki, S., Tanaka, K., and Suzuki, N. (2009). Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29, 464-479.

Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., *et al.* (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.

Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., and Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature medicine* 5, 434-438.

Thored, P., Wood, J., Arvidsson, A., Cammenga, J., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2007). Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38, 3032-3039.

Tilling, L., Chowieńczyk, P., and Clapp, B. (2009). Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *British journal of clinical pharmacology* 68, 484-492.

Tsai, S., Butler, J., Rafii, S., Liu, B., and Kent, K.C. (2009). The role of progenitor cells in the development of intimal hyperplasia. *Journal of vascular surgery* 49, 502-510.

Urbich, C., and Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95, 343-353.

Urra, X., Cervera, A., Obach, V., Climent, N., Planas, A.M., and Chamorro, A. (2009a). Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40, 1262-1268.

Urra, X., Cervera, A., Villamor, N., Planas, A.M., and Chamorro, A. (2009b). Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. *Neuroscience* 158, 1174-1183.

van Ierssel, S.H., Conraads, V.M., Van Craenenbroeck, E.M., Liu, Y., Maas, A.I., Parizel, P.M., Hoymans, V.Y., Vrints, C.J., and Jorens, P.G. (2015). Endothelial dysfunction in acute brain injury and the development of cerebral ischemia. *Journal of neuroscience research*.

Vasa, M., Fichtlscherer, S., Adler, K., Aicher, A., Martin, H., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2001a). Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103, 2885-2890.

Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2001b). Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89, E1-7.

Vermeij, F.H., Scholte op Reimer, W.J., de Man, P., van Oostenbrugge, R.J., Franke, C.L., de Jong, G., de Kort, P.L., and Dippel, D.W. (2009). Stroke-associated infection is an independent risk factor for poor outcome after acute ischemic stroke: data from the Netherlands Stroke Survey. *Cerebrovascular diseases* 27, 465-471.

Vogelgesang, A., Grunwald, U., Langner, S., Jack, R., Broker, B.M., Kessler, C., and Dressel, A. (2008). Analysis of lymphocyte subsets in patients with stroke and their influence on infection after stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39, 237-241.

Vogelgesang, A., May, V.E., Grunwald, U., Bakkeboe, M., Langner, S., Wallaschofski, H., Kessler, C., Broker, B.M., and Dressel, A. (2010). Functional status of peripheral blood T-cells in ischemic stroke patients. *PloS one* 5, e8718.

Wang, C.H., Ciliberti, N., Li, S.H., Szmitko, P.E., Weisel, R.D., Fedak, P.W., Al-Omran, M., Cherng, W.J., Li, R.K., Stanford, W.L., *et al.* (2004). Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy. *Circulation* 109, 1392-1400.

Wei, H., Mao, Q., Liu, L., Xu, Y., Chen, J., Jiang, R., Yin, L., Fan, Y., Chopp, M., Dong, J., *et al.* (2011). Changes and function of circulating endothelial progenitor cells in patients with cerebral aneurysm. *Journal of neuroscience research* 89, 1822-1828.

Westendorp, W.F., Nederkoorn, P.J., Vermeij, J.D., Dijkgraaf, M.G., and van de Beek, D. (2011). Post-stroke infection: a systematic review and meta-analysis. *BMC neurology* 11, 110.

Westendorp, W.F., Vermeij, J.D., Zock, E., Hooijenga, I.J., Kruyt, N.D., Bosboom, H.J., Kwa, V.I., Weisfelt, M., Remmers, M.J., Ten Houten, R., *et al.* (2015). The Preventive Antibiotics in Stroke Study (PASS): a pragmatic randomised open-label masked endpoint clinical trial. *Lancet*.

Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Eberhardt, B., Platzer, C., Schoning, B., Glockner, F., Lanksch, W.R., Volk, H.D., and Docke, W.D. (1998). Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nature medicine* 4, 808-813.

Yamaguchi, J.i. (2003). Stromal Cell-Derived Factor-1 Effects on Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cell Recruitment for Ischemic Neovascularization. *Circulation* 107, 1322-1328.

Yeh, E.T., Zhang, S., Wu, H.D., Korbling, M., Willerson, J.T., and Estrov, Z. (2003). Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* 108, 2070-2073.

Yip, H.K., Chang, L.T., Chang, W.N., Lu, C.H., Liou, C.W., Lan, M.Y., Liu, J.S., Youssef, A.A., and Chang, H.W. (2008). Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39, 69-74.

Yoon, C.H., Hur, J., Park, K.W., Kim, J.H., Lee, C.S., Oh, I.Y., Kim, T.Y., Cho, H.J., Kang, H.J., Chae, I.H., *et al.* (2005). Synergistic neovascularization by mixed transplantation of

early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 112, 1618-1627.

Zia, E., Pessah-Rasmussen, H., Khan, F.A., Norrving, B., Janzon, L., Berglund, G., and Engstrom, G. (2006). Risk factors for primary intracerebral hemorrhage: a population-based nested case-control study. *Cerebrovascular diseases* 21, 18-25.

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn apl. Prof. Dr. Jan Holger Poppert für seine Unterstützung und die großzügige Bereitstellung meines Themas. Ebenso möchte ich mich bei meinem ehemaligen akademischen Betreuer Herrn Dr. Dominik Sepp für die Betreuung meiner Dissertation bedanken. Mein weiterer Dank gilt den MTAs der Neurologie am Klinikum rechts der Isar, insbesondere Frau Verena Grummel, und den MTAs des Deutschen Herzzentrums München, die mich während der Laborarbeiten unterstützt und angelernt haben, sowie den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe.