



Philipps-Universität Marburg

Aus der Klinik für Neurochirurgie der Philipps-Universität Marburg,
Direktor: Prof. Helmut Bertalanffy.

„ANGIONEGENESE IN CEREBRALEN ARTERIOVENÖSEN MALFORMATIONEN“

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Medizin dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg vorgelegt von Elmar Battenberg
aus Herne. Marburg 2004.

ANGENOMMEN VOM FACHBEREICH HUMANMEDIZIN AM 02.12.2004,

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG DES FACHBEREICHES

DEKAN :

PROF. DR. MED. BERNHARD MAISCH

REFERENT :

PD DR. MED. ULRICH SURE

CORREFERENT :

PROF. DR. W. H. OERTEL

1 Widmung

Diese Doktorarbeit ist meiner Familie und meiner Freundin Johanna gewidmet.

„Manche Menschen sehen Dinge so, wie sie sind und fragen: ‚Warum ?‘

Ich träume nie da gewesene Träume und frage: ‚Warum nicht ?‘“

(Bernhard Shaw)

2 Inhaltsverzeichnis

1 Widmung	1
2 Inhaltsverzeichnis	2
3 Einleitung	4
3.1 Ziel und Motivation der Arbeit	4
3.1.1 Experimenteller Teil.....	6
3.1.2 Retrospektiver Teil.....	6
3.2 Theoretische Grundlagen	9
3.2.1 Vaskuläre Malformationen	9
3.2.1.1 AVMen	10
3.2.1.2 Sonstige vaskuläre Malformationen	17
3.2.2 Antikörper.....	19
3.2.2.1 PCNA.....	19
3.2.2.2 MIB-1.....	20
3.2.2.3 bFGF	21
3.2.2.4 TGF- α	22
3.2.2.5 FLK-1.....	22
3.2.2.6 VEGF.....	23
3.2.2.7 Endoglin.....	24
3.2.2.8 HIF-1 α	26
3.2.2.9 Positivkontrollen.....	26
4 Material und Methoden	27
4.1 Auswahl der Präparate.....	27
4.1.1 Patientenkollektiv, Vorbereitung	27
4.1.2 Retrospektive Erhebung	27
4.2 Immunhistochemie	29
4.2.1 Allgemeines Prinzip.....	29
4.2.2 Vorgehensweisen	31
4.2.2.1 PCNA.....	33
4.2.2.2 MIB-1.....	33
4.2.2.3 bFGF	33

4.2.2.4 TGF- α	33
4.2.2.5 FLK-1.....	33
4.2.2.6 VEGF.....	34
4.2.2.7 Endoglin.....	34
4.2.2.8 HIF – 1 α	34
4.3 Statistische Methoden.....	35
5 Resultate.....	36
5.1 Epidemiologie und Klinik.....	36
5.2 Immunhistochemie.....	41
6 Illustrationen.....	48
6.1 Klinik.....	48
6.2 Immunhistochemie.....	49
7 Diskussion.....	54
7.1 Epidemiologie und Klinik.....	54
7.2 Immunhistochemie.....	60
7.3 Präoperative Embolisation.....	66
7.4 Ausblick und Rückschlüsse für die AVM-Therapie.....	69
8 Zusammenfassung.....	71
9 Literaturverzeichnis.....	72
10 Lebenslauf.....	83
11 Abkürzungsverzeichnis.....	84
12 Akademische Lehrer.....	85
13 Danksagung.....	86
14 Ehrenwörtliche Erklärung.....	87

3 Einleitung

3.1 Ziel und Motivation der Arbeit

Hintergrund und Ziel

In der vorliegenden Dissertation werden bestimmte cerebrale (auf das ZNS beschränkte) Gefäßmissbildungen immunhistochemisch untersucht, im Speziellen sind dies so genannte Arteriovenöse Malformationen (AVM), deren Morphologie und Physiologie weiter unten ausführlich erläutert wird. Nicht nur aufgrund der eindrucksvollen, oft auch lebensbedrohlichen Klinik^{2,24,38,59,147} solcher Läsionen, sondern auch aus wissenschaftlichen Gründen ist eine genauere Untersuchung dieser Missbildungen nach neuesten Labormethoden interessant, da sich in letzter Zeit Hinweise darauf ergeben haben, dass die bisherige Lehrmeinung^{129,154}, solche Malformationen seien ausschließlich angeborene und statische Läsionen, nicht korrekt ist und überarbeitet werden muss: AVMen besitzen Wachstumspotential^{26,39,58,78,122,142}, können de-novo^{14,37} und nach bereits erfolgter Resektion^{36,40} oder Bestrahlung^{81,121,126} wieder auftreten^{80,131}. Studien in letzter Zeit gaben Hinweise darauf, dass in AVMen Proliferations- und Angiogenesefaktoren vermehrt exprimiert werden^{58,73,75,98,128,148}, im Besonderen auch nach vorausgegangener Embolisationsbehandlung^{144,145}. Die vorliegende Arbeit untersucht die Expression verschiedener Gefäßwachstumsfaktoren (PCNA, MIB-1, Flk-1, VEGF, bFGF, TGF- α) an einem größeren Kollektiv als die Vorgängerstudie¹⁴⁵. Insbesondere sollten die Resultate in Bezug auf eine präoperative Embolisation untersucht werden, da nach den Ergebnissen der Vorgängerstudie angenommen wurde, dass eine solche Behandlung durch eine lokale Hypoxie zu einer vermehrten Produktion von Proliferations- und Gefäßwachstumsfaktoren führt. Daher wurde erstmals die Expression sowohl von HIF-1 α als auch von Endoglin untersucht, die neben VEGF^{13,29,64,105,135} eine Rolle bei der Angiogenese^{4,69,123}, insbesondere bei bestehender Hypoxie^{67,96,152}, spielen. Die Ergebnisse werden mit den klinischen Daten wie z.B. Alter des Patienten, Vorbehandlung oder auch Lokalisation der AVM korreliert.

Verfahren

Mittels laborchemischer Methoden soll versucht werden, genauere Informationen über die Pathophysiologie, die funktionelle Dynamik sowie den Entstehungsmechanismus der AVMen herauszufinden. Diese Ergebnisse werden in Bezug gesetzt zu klinischen Daten des untersuchten Patientengutes sowie zu bereits erlangten wissenschaftlichen Erkenntnissen. Schließlich sollen Schlussfolgerungen für das diagnostische und therapeutische Vorgehen gefunden und auf dem Boden der durch uns gewonnenen neuen Erkenntnisse auch Forderungen an weitere wissenschaftliche Untersuchungen gestellt werden.

Nutzen für die Klinik

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mögen durchaus auch von übergeordnetem Interesse sein, da z.B. Wachstumsfaktoren und Angiogenese auch für die Proliferation anderer Neoplasien eine große Rolle spielen, wie von Folkman vor bereits 15 Jahren postuliert wurde³⁴ - eine Beobachtung, die indes nicht bei allen Neoplasien zuzutreffen scheint¹⁵⁰.

Besonderes Interesse an diesen Fragestellungen, besonders an den Konsequenzen für die Therapie, besteht an der hiesigen Klinik für Neurochirurgie in Marburg, da hier ein Schwerpunkt auf vaskuläre Mikrochirurgie gesetzt wird : Im Jahre 1997 wurde eine neurovaskuläre Arbeitsgruppe gegründet, der Neurochirurgen, Neuroradiologen, Strahlentherapeuten und Neuropathologen angehören, erste wissenschaftliche Untersuchungen wurden bereits vorgenommen und veröffentlicht^{144,145}. Aufgrund der überregionalen Zuweisungen zur Behandlung in der Universitätsklinik in Marburg verfügt die Klinik über eine überdurchschnittliche hohe Anzahl an Patienten mit AVMen.

Im folgenden wird genauer auf den Hintergrund der immunhistochemischen Arbeitsweise, die theoretischen Grundlagen der angesprochenen Malformationen sowie ihre Behandlung, die untersuchten Marker und die für die Auswertung der Daten entscheidenden Parameter näher eingegangen.

3.1.1 Experimenteller Teil

In der vorliegenden Arbeit werden in Paraffin eingebettete Operations- sowie Sektionspräparate mit der Technik der Immunhistochemie untersucht. Mittels dieser Technik lässt sich feststellen, ob bestimmte Marker (Transmembranproteine, intrazelluläre Rezeptoren und weitere Proteine) auf oder in einer Zelle vorhanden sind. Hier wird im Besonderen die Häufigkeit und das Verteilungsmuster in verschiedenen Zellschichten bestimmter - die Genese, das Wachstum, die Dynamik des Zellzyklus und die Differenzierung solcher Gewebe beeinflussenden - Faktoren, untersucht. In der vorliegenden Dissertation werden sowohl bewährte Marker, jedoch an einer größeren Fallzahl, als auch neue Marker, die bereits bei ähnlichen Fragestellungen interessante Ergebnisse ergaben, erprobt. Die Beschreibung der untersuchten Zellmarker sowie der zugehörigen Antikörper erfolgt weiter unten. Das Ergebnis des praktischen Teils, wird in Zusammenhang gesetzt zu den Daten des jeweiligen Patienten, wie sie im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

Letztendlich sollen auch in Hinblick auf eventuell folgende Dissertationen der Ablauf der immunhistochemischen Versuchsreihen, die notwendigen Chemikalien in ihrer Konzentration, Zusammensetzung sowie Einwirkdauer, die zugehörigen Prozeduren und die Auswertungsmethoden optimiert werden. Besonderer Wert wurde dabei auf die Optimierung des Ablaufes der Färbeprotokolle für jeden einzelnen Antikörper gelegt, wozu aufwändige Vorarbeit mit immer neuen Abstimmungen und Vorbehandlungen nötig war.

3.1.2 Retrospektiver Teil

Wie schon im vorhergehenden Teil erwähnt, wurden die einzelnen Gewebeschnitte nicht isoliert betrachtet, sondern in Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen der operierten Patienten, ihrer persönlichen Daten wie Alter, Symptomen, bisheriger erfolgter Behandlung, Lokalisation und klinischem Erscheinungsbild der Läsion. Allein die Kenntnis des Patienten, an einer AVM zu leiden, führt zu deutlich verminderter Lebensqualität¹⁴⁹. Auch wenn versucht wurde, die Krankheit des Patienten in Zahlen und Worte zu fassen, so soll doch nicht vergessen werden, dass im Schatten dieser Daten meistens einschneidende, oft beeindruckende oder beängstigende Änderungen für das tägliche Leben des Patienten im Vordergrund stehen. Von der akuten

Lebensbedrohung z.B. bei einer Gehirnblutung bis zu den Folgeschäden einer Behandlung, auch im sozialen Bereich z.B. bei Sprachstörungen oder durch Krampfanfälle⁴⁵ und neurologische Defizite¹⁰⁸, reicht hier die Spannweite, weshalb auf die soziale Betreuung der betroffenen Patienten, auch nach dem Klinikaufenthalt, sehr viel Wert gelegt wird.

Aus den Arztbriefen und OP-Berichten (siehe Abschnitt *Material und Methoden*) wurden verschiedene Daten exzerpiert, die hier nun kurz aufgeführt werden:

Name und Vorname des Patienten

Aus Gründen der Anonymität sind in der unten abgedruckten Tabelle nur die Initialen des Patienten aufgeführt.

Geschlecht des Patienten

In der vorliegenden Arbeit wird u.a. untersucht, ob sich die gefundenen Ergebnisse für Männer und Frauen signifikant unterscheiden und ob sich daraus Folgerungen für die Ätiologie der Läsionen ergeben.

Symptome

Gefäßmalformationen des Gehirns können sich in vielfältigsten Krankheitssymptomen äußern, was die Diagnose durch den Hausarzt verständlicherweise erschwert - oftmals wird die Krankheit erst nach ernsthaften Blutungen oder Kopfschmerzattacken gestellt, wenn die Läsion im durchgeführten CT oder MRT des Kopfes entdeckt wird³⁰. In Einzelfällen wird die Läsion auch zufällig entdeckt, z.B. im Rahmen einer craniellen Bildgebung vor dem Hintergrund einer anderen Krankheit. Zu den Symptomen^{2,24,38,59,147}, die auftreten können, zählen vor allen Dingen: Krampfanfälle^{45,60}, Seh-, Sprach- und Hörstörungen, Parästhesien, stärkste Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindel, neurologische Ausfälle¹⁰⁸, komatöse Zustände bei z.n. Hirnmassenblutung, psychische Veränderungen. Die Häufigkeitsverteilung der Symptome bei den beiden hier untersuchten Malformationen wird weiter unten noch genauer dargestellt.

Alter des Patienten am Tage der Operation

Die Altersverteilung der Patienten in der vorliegenden Arbeit wird untersucht und mit den Ergebnissen früherer Studien^{24,38,59,114} verglichen.

Lokalisation der Läsion

Es wird angegeben, in welchem Teil des Gehirns (Lappen des Großhirns, Marklager, Kleinhirn, Basalganglien, Thalamus) und auf welcher Seite sich die Malformation bei Diagnosestellung lokalisieren ließ.

Anzahl der Embolisationen

Bei der Art der untersuchten Malformationen, nämlich bei den AVMen, wird meist einige Wochen bis Monate präoperativ versucht, den Fluss im arteriovenösen Kurzschluss durch die Vorbehandlung mittels Embolisation zu reduzieren^{66,85,97}. Dazu wird mittels eines sehr dünnen Katheters in den zuführenden Teil des Angioms (Feeder) ein Agens (Histoacryl) eingespritzt, welches optimalerweise vor dem Austritt aus dem Angiom aushärtet und die Gefäßwände miteinander „verklebt“. Bei dieser Vorbehandlung sollte die AVM möglichst vollständig verschlossen werden, da bei unvollständiger Okklusion eine schlechtere Prognose für den Patienten resultiert¹⁵³. Sollte das Embolisationsmaterial zu spät aushärten, so besteht die Gefahr, dass es in den zuführenden Gefäßen aufgrund einer plötzlichen Druckerhöhung durch die venöse Stauung zu einer Gefäßwannerreißung und somit zu einer Blutung kommt. Eine weitere Gefahr besteht darin, dass das Embolisat nicht ausschließlich in die zum Angiom gehörigen Gefäße injiziert wird, wodurch auch gesundes Hirngewebe iatrogen embolisiert und somit gegebenenfalls infarziert werden kann. Diese Art der Vorbehandlung ist folglich durchaus nicht risikolos für den Patienten⁹⁷. Untersucht wird in der folgenden Arbeit, ob die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung in Zusammenhang mit der Häufigkeit dieser beschriebenen Vorbehandlung und ihrem zeitlichen Abstand zur Operation stehen.

Es wurden auch die Unterlagen über die poliklinischen Wiedervorstellungen der behandelten Patienten ausgewertet, in denen sich wichtige Informationen über postoperative Schäden sowie die sozialen und persönlichen Folgen für den Operierten finden.

3.2 Theoretische Grundlagen

3.2.1 Vaskuläre Malformationen

Unter den zahlreichen Tumoren des Zentralen Nervensystems finden sich auch solche, in denen pathologische Gefäßformationen eine Rolle spielen, z.B. die Vaskulären Malformationen (VM). Nach dem Vorschlag von McCormick aus dem Jahre 1966¹⁰¹ werden VMen gewöhnlicherweise in vier Gruppen unterteilt: Teleangiektasien, kavernöse Angiome (Kavernome), AVMen sowie venöse Angiome. Im Speziellen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit jedoch mit AVMen, deren Pathologie und Klinik im folgenden Abschnitt ausführlich erläutert wird. Sofern nicht anders angegeben, sind die Informationen den Büchern von Wilkins / Rengachery¹⁵⁴ sowie von Russell / Rubinstein¹²⁹ entnommen.

Die vorliegende Dissertation ist eine aus einer Reihe von Doktorarbeiten, die sich mittels ähnlicher Methoden mit anderen Gefäßmalformationen beschäftigen. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit auch auf die Pathogenese und Morphologie der anderen Malformationen kurz eingegangen.

3.2.1.1 AVMen

Pathogenese und Wachstumsdynamik der AVM

Diese Gefäßläsionen sind seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt und wurden erstmals im Jahre 1890 von Giordano chirurgisch behandelt. Es wird angenommen, dass die Pathogenese bereits in der vierten Woche der Embryonalentwicklung beginnt¹⁰⁷, d.h. dass solche Malformationen ausschließlich angeboren sind. Allerdings wird trotz dieser Hypothese nur etwa jede fünfte AVM im Kinder- und Jugendalter²⁸, meist mit einer Hirnblutung als Erstsymptom, diagnostiziert. Dieser Sachverhalt weist bereits darauf hin, dass die Läsionen nicht statisch sind, sondern im Laufe der Zeit erheblich an Größe zunehmen können^{26,39,58,78,122,142}. Auch bereits chirurgisch^{36,131} oder radiochirurgisch¹²⁶ behandelte Malformationen können sich wieder zeigen⁸⁴; weiterhin ist auch ein erstmaliges Auftreten im Erwachsenenalter beschrieben^{14,37}, auch nach unspezifischer Hirnmassenblutung³⁹. Ein Wiederauftauchen nach bereits erfolgter Resektion ist im Übrigen sowohl bei Erwachsenen^{40,80,131} als auch bei Kindern⁷⁶ zu beobachten. Bei pädiatrischen Fällen ist zwar eine bedrohlichere Initialsymptomatik, jedoch auch ein besseres Operationsergebnis, eine Bevorzugung von Knaben und oberflächlicherer Hirnregionen zu beobachten²⁵. Besonders ein venöser Hochdruck in der Malformation scheint ein starkes Agens für Angiogenese zumindest bei duralen AVMen zu sein, wie Lawton et al. an präparierten Mäusen zeigten⁸². In einer Zusammenfassung über das klinische Bild, die Morphologie und die Behandlungsmöglichkeiten einer AVM wurde 1999 im New England Journal of Medicine¹⁴⁷ berichtet.

Pathologisches Prinzip

Das pathologische Grundmuster einer AVM besteht in arterio-venösen Kurzschlüssen ohne ein dazwischen liegendes Kapillarnetz. Sie können im gesamten ZNS auftreten, bevorzugen jedoch die cerebralen Hemisphären, wobei hier wiederum das Stromgebiet der Arteria cerebri media am häufigsten betroffen ist - eine Beteiligung des Kleinhirns oder des Rückenmarks ist selten.

Makroskopie und Mikroskopie

Das makroskopische Erscheinungsbild einer AVM besteht in einem Knäuel unterschiedlich großer Gefäße mit Hämosiderinablagerungen nach stattgehabten

Blutungen und oftmals mit einer grau-milchig erscheinenden Pia mater über der Läsion (siehe Abb. 12 und 13). Sekundär ist zu beobachten, dass sowohl die die AVM speisenden Arterien als auch die drainierenden Venen durch den hohen Druck stark erweitert sind. Auffällig ist weiterhin, dass man auf der arteriellen Seite in 10-15 % aller Fälle sackförmige Aneurysmen findet, welche die Gefahr einer Blutung aus der AVM in bestimmten Fällen deutlich erhöhen^{49,124} und gesonderter endovaskulärer Behandlung bedürfen¹¹⁶. Bei älteren Patienten sind auch Atrophien des umgebenden Bindegewebes vorhanden, auch in den Gefäßen des Angioms selbst finden sich degenerative Erscheinungen wie Fibrose der Media, Thrombosen und auch Stenosen. Das mikroskopische Bild bestätigt diesen Eindruck: starke Kaliberschwankungen der Gefäße, pathologische Veränderungen in der Lamina elastica interna und der Lamina muscularis. Eine Verdickung der Venenwände hat ihren Ursprung in der Vermehrung der kollagenen Fasern. Im angrenzenden Hirngewebe findet man eine Gliose, die Zahl der physiologischen Neurone hingegen ist herabgesetzt. Elektronenmikroskopisch¹⁵⁶ findet sich bei einigen Endothelzellen, abgesehen von den bereits genannten Veränderungen, eine Fensterung oder, insbesondere nach vorangegangener Embolisation, totale Zerstörung derselben, die auf die Scherkräfte innerhalb der Malformation zurückgeführt wird. In der Wand der nidalen Gefäße finden sich, abweichend von der normalen Physiologie, unorganisierte Kollagenbündel.

Epidemiologie und Klinik

Die Häufigkeit dieser intracraniellen Malformationen ist nicht mit letzter Sicherheit abzuschätzen, man geht von etwa 0,14 % Anteil an der Gesamtbevölkerung aus^{129,154}. In einer neueren Übersichtsstudie hingegen werden andere Zahlen genannt: Mit einer Prävalenz von ca. 18 auf 100.000 Personen (unselektierte Bevölkerung) und einer Inzidenz von 1 auf 100.000 wird die Häufigkeit geringer eingeschätzt². Nichtsdestotrotz bedürfen sie der Beachtung, da sie z.B. Grund von rund einem Drittel aller primären Hirnblutungen bei jungen Erwachsenen sind. Nach größeren Studien scheinen Männer etwas häufiger betroffen^{24,38,114}, genetische Dispositionen können wohl in Verbindung mit neurokutanen Dysplasien (z.B. Sturge-Weber-Syndrom)¹⁰⁶ sowie familiärer Häufung^{3,11,136} postuliert werden. Das Durchschnittsalter liegt in einer großen Multizenterstudie⁵⁹ bei 31 Jahren, der Anteil der Frauen liegt bei knapp der Hälfte, und als Symptome wurden in absteigender Reihenfolge Hirnblutung (53 %), Krampfanfälle^{45,60} (30 %) und Kopfschmerz (10 %) beschrieben⁵⁹. Jeder zwanzigste

Patient trug progressive neurologische Schäden davon, die, auch nach erfolgter Resektion⁵³, andauern können¹⁰⁸. Die klinische Manifestation von AVMen besteht entweder in einem hirnganischen Anfall oder einer Blutung mit den dazugehörigen Symptomen wie Kopfschmerzen, Übelkeit, neurologische Ausfälle. Die AVM macht sich klinisch erstmals durchschnittlich gegen Ende des dritten Lebensjahrzehnts bemerkbar, gewöhnlich werden sie spätestens bis zum 50. Lebensjahr auffällig. Krampfanfälle sind bei großen Läsionen häufiger, Kinder²⁵ und Träger kleiner Läsionen hingegen zeigen sehr oft eine Hirnblutung als primäres Krankheitsphänomen. Auch der Sitz der AVM beeinflusst die Klinik : oberflächliche, im Kortex liegende Läsionen, rufen bevorzugt hirnganische Anfälle, je nach Lokalisation partieller oder generalisierter Art⁴⁵, tief sitzende eher Blutungen hervor. Blutungen sind zudem häufiger zu beobachten, wenn Gefäßverengungen auf dem venösen Schenkel der AVM nachweisbar sind⁹⁵. Neurologische Ausfälle treten entweder als Folge einer intraparenchymalen Blutung oder, insbesondere bei älteren Patienten, aufgrund einer lang andauernden Ischämie des restlichen Gewebes im Sinne eines Steal-Phänomens¹⁰⁸ auf.

Blutungsrisiken

Die Wahrscheinlichkeit einer Blutung aus einer AVM beträgt 1 bis 1,5 % pro Jahr und Patient. Das Risiko, an einer Blutung zu versterben, nimmt mit der Zahl der Blutungen von etwa 10% beim ersten Ereignis bis auf über 20 % bei der dritten Blutung zu². Das Risiko einer Blutung ist bei Patienten, deren Erstsymptom ebenfalls eine Blutung war, gegenüber denen, die sich mit Krampfanfällen vorstellten, deutlich erhöht – eine Regel, der jedoch von einer Langzeitstudie von 1990 widersprochen wird¹¹⁴. Das kumulierte Risiko einer Blutung ist für betroffene Patienten mit etwa 25 % in 4 Jahren abzuschätzen, wobei alte Menschen häufiger betroffen sind. Etwa ein Drittel aller Patienten versterben an dieser Krankheit nach der Analyse von Crawford et al.²⁴, die Mitte der Achtziger betonten, dass eine Schwangerschaft evtl. negative Auswirkungen auf das Blutungsrisiko haben könnte, jedoch konnte in anderen Untersuchungen kein derartiger Zusammenhang gefunden werden³⁸.

Diagnostik

Die Diagnose einer AVM wird durch bildgebende Verfahren erstellt³⁰, neben der obligaten Angiographie²⁰ haben sich CT (iso- bis hyperdens und mit Kalzifikationen ohne Kontrastmittel, hyperdenser Herd nach Kontrastmittelgabe) und MRT (signalarme Herde, Thrombosen sichtbar) etabliert. So „occulte“⁸⁶ oder „kryptische“ vaskuläre Fehlbildungen, bei denen es sich um thrombosierte AVMs³¹ handelt, lassen sich nicht mit einer Angiographie darstellen. Eher klinisch orientiert ist das international anerkannte Spetzler-Martin-Grading¹⁴¹, das aufgrund der Kriterien Größe, Art der venösen Drainage und Eloquenz des benachbarten Hirngewebes eine Voraussage für die Operabilität der Läsion sowie das Risiko für den Patienten zu stellen versucht. In Hinblick auf eine Radiotherapie ist diese Einteilung nicht geeignet – hier werden andere Kriterien für die Voraussage des Behandlungserfolges postuliert¹¹⁸.

Entscheidung zur Operation

Die Entscheidung zur chirurgischen Behandlung einer AVM muss nach sorgfältiger Überprüfung des Operationsrisikos des Patienten sowie in Anbetracht möglicher Folgeschäden⁵³ gefällt werden. Zu diesem Zweck werden sämtliche Patienten in einer interdisziplinären Konferenz besprochen, der Neurochirurgen, Neuroradiologen und Strahlentherapeuten angehören. Bei älteren Patienten, die ausschließlich hirnorganische Anfälle zeigen, ist eine konservative Therapie vorzuziehen, während bei jungen Patienten, vor allem bei jenen, welche bereits ein Blutungsereignis hatten, der operative Ansatz Erfolg versprechender ist. Bei dieser Patientengruppe verringert sich auch das Risiko, eine Therapierefraktärität der Krampfanfälle zu erlangen. Die Operation birgt nicht zu vernachlässigende Risiken, die perioperative Mortalität liegt bei etwa 3,3%, die permanente postoperative Morbidität bei 8,6 %¹⁵. Die Quote andauernder postoperativer neurologischer Defizite steigt mit dem Spetzler-Martin-Grad, weitere Risikofaktoren sind weibliches Geschlecht, die Größe der Läsion sowie die Art der venösen Drainage⁵³.

Präoperative Vorbehandlung

Im Vorfeld der operativen Behandlung steht oftmals die bereits beschriebene Embolisationstherapie, wodurch im günstigsten Fall eine deutliche Flußverminderung^{66,85,97} in der Läsion und somit bessere Operationsbedingungen geschaffen werden. Risiken dieser Technik sind, wie bereits aufgezeigt, neben allgemeinen, durch das Embolisat hervorgerufenen Entzündungserscheinungen⁴⁴, der Verschluss normaler Gefäße sowie spontane Rupturen einzelner Gefäße der AVM

aufgrund des plötzlichen Druckanstiegs, wenn das Polymerisat erst auf dem venösen Schenkel aushärtet, weshalb man eine Embolisation nicht immer als Standardvorbehandlung betrachten sollte⁹⁷. Ist eine Embolisation im therapeutischen Plan festgelegt, sollte ein möglichst vollständiger Verschluss der AVM erzielt werden, da ansonsten der klinische Verlauf negativ beeinflusst werden kann¹⁵³. Auch wird nach einer Behandlung in Einzelfällen eine verzögerte Blutungsneigung festgestellt, die man mit dem vaskulären Organisationsprozess nach dem (partiellen) Verschluss der AVM in Verbindung bringt. Spontanverschlüsse von arteriovenösen Malformationen sind ebenfalls beobachtet worden. Einen Bericht über 30 solcher Fälle, teilweise nach vorangegangener, jedoch nicht suffizienter chirurgischer Therapie, geben Abdulrauf et al.¹: in ihrer Theorie führt der Verschluss einer drainierenden Vene oder Änderungen der Hämodynamik der Läsion zur Thrombosierung und zum Verschluss des gesamten Angioms. Risiken dieser Vorbehandlung bestehen vor allem im Neuaufreten oder in der Verschlimmerung neurologischer Defizite, wie sie bei etwa jedem siebten Patienten auftreten⁵⁴. Der unvollständige Verschluss einer AVM durch Embolisation führt zu vermehrter Expression des Gefäßwachstumsfaktors VEGF¹⁴⁵. Mit neuen Embolisatmaterialien^{66,85} soll eine bessere Verschlussrate und weniger Nebenwirkungen erreicht werden.

Operationstechnik

Patienten, denen eine Operation, in der Regel nach Abschluss einer Embolisationsbehandlung oder nach nur zum Teil erfolgreicher Radiochirurgie, empfohlen wurde, werden ausführlich über die Risiken der Operation aufgeklärt. Die Terminierung des elektiven Operationstermins erfolgt meist während des stationären Aufenthaltes zur letzten Embolisation. Zur mikrochirurgischen⁵⁵ Operation werden in der Regel sämtliche zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten genutzt, bei der Planung und Durchführung der Trepanation wird die Neuronavigation eingesetzt. Zur Darstellung funktioneller Hirnareale dient das intraoperative elektrophysiologische Monitoring. Die Untersuchung des Blutflusses geschieht durch intraoperativen Ultraschall bzw. Mikrodoppler, während die Neuronavigation schließlich erneut hilfreich bei der Resektionskontrolle eingesetzt wird. Die Operationstechnik und die sonstige Behandlungsplanung an sich ist nicht Gegenstand dieser Dissertation, jedoch wird hier hingewiesen auf neue mikrochirurgische Ansätze zur Vermeidung intraoperativer Blutungen⁵⁵ und weiterführende Literatur, die einen Überblick über den

momentanen Standard für die Behandlung dieser Malformationen bietet¹¹³.

Prämedikation und Nachbehandlung

Direkt präoperativ wird der Patient je nach Lokalisation der Malformation mit antiepileptischen Medikamenten und / oder mit Cortison behandelt, um die Häufigkeit postoperativer Krampfanfälle sowie lokaler Gewebsschäden zu verringern. Postoperativ wird der Patient, eventuell nach neuerdings empfohlener Kontrollangiographie¹³⁸, auf einer neurochirurgischen Intensivstation behandelt, bei kontrolliertem Blutdruck und hoch gelagertem Kopf überwacht.

Bestrahlung als Behandlungsalternative

Neben der mikrochirurgischen Operation gibt es auch die Möglichkeit einer Behandlung mit einer Radiotherapie, insbesondere bei solchen Angiomen, die als inoperabel galten, entweder aufgrund der Lage (in der Nähe von funktionell wichtigen Gebieten) oder aufgrund ihrer Größe. So berichten Lunsford et al.⁸⁷ über 227 (davon 36 pädiatrisch) mit dieser Methode behandelte Patienten, mit einer Verschlussrate der AVM durch Wandverdickungen und Zellproliferation zwischen 58 und 100 Prozent, abhängig von der Größe der Läsion. Nur 10 der 227 Patienten zeigten nach der Behandlung eine Symptomatik, die sich als Spätfolge der Bestrahlung deuten ließ. Hirnblutungen im Anschluss an eine Radiotherapie treten gehäuft bei älteren Menschen, großen Läsionen sowie bei zu geringer Strahlendosis auf⁷¹. Mögliche Komplikation einer Strahlenbehandlung von AVMen ist das Auftreten von Krampfanfällen, die auch nicht immer erfolgreich behandelt werden können⁶³. Yamamoto und Mitarbeiter geben Hinweise darauf, dass die Verschlussrate nach Radiotherapie nicht nur von der Strahlendosis, Läsionsgröße und Behandlungszeit¹⁵⁷, sondern eventuell auch von hormonellen Faktoren, nicht jedoch von kardiovaskulären Risikofaktoren abhängig ist⁹. Colombo et al. berichten über eine bessere Bestrahlungsplanung und Dosisanpassung durch vorhergehende dreidimensionale Angiographie²⁰. Einen Überblick über die Möglichkeiten der wiederholten Radiotherapie schließlich geben Maesawa et al.⁹⁰.

Spontanverschuß der AVM

In Einzelfällen konnte auch ein spontaner Verschluss der Läsion nachgewiesen werden⁷⁷. In einer anderen Studie wurde die spontane Thrombosierung mit der geringen Größe einer Läsion, singulärer Vene und einer Blutung als Erstsymptom in Verbindung gebracht¹.

3.2.1.2 Sonstige vaskuläre Malformationen

Kavernome

Die wichtigste Differentialdiagnose der AVM ist das angiographisch nicht nachweisbare Kavernom, das im Folgenden ebenfalls beschrieben wird. Beim Kavernom sind die Kapillaren sinusoidartig erweitert und liegen dicht aneinander, ohne dazwischen liegendes Hirngewebe. Die zu- und abführenden Gefäße sind gewöhnlich nicht pathologisch verändert, der langsame Blutfluss macht nicht nur eine Entdeckung in der angiographischen Untersuchung unmöglich, sondern führt auch häufig zur sekundären Thrombose, Kalzifizierung und Ossifikation¹²⁷ der Läsion. Kavernome kommen im gesamten ZNS vor, wobei Rückenmark und Kleinhirn selten betroffen sind. Genetische Prädisposition^{47,48}, familiär gehäufte und pädiatrische^{41,99} Fälle sind bekannt. Einige Autoren nehmen eine ätiologische Verbindung zu den Teleangiektasien an¹²⁵. Das makroskopische Erscheinungsbild lässt, auch aufgrund der dunkelroten Farbe, an eine Beere erinnern. Unter dem Mikroskop zeigt sich neben der deutlichen Septierung durch die Kapillarwände auch eine scharfe, kapsellose Abgrenzung zur Umgegend. Die Kapillaren selbst bestehen nur aus einer einzigen Schicht Endothel sowie kollagenem Bindegewebe - Muskel- und elastische Fasern finden sich nur im Randbereich des Kavernoms. Im umgebenden Hirngewebe finden sich neben einer Gliose auch eine hämosiderininduzierte Gelbfärbung und Ablagerungen von Eisensalzen, die für die Häufigkeit von hirnrorganischen Anfällen bei dieser Krankheit verantwortlich gemacht werden. Ähnlich wie bei den AVMen können sich Kavernome im klinischen Alltag vielfältig äußern: bevorzugt durch Krampfanfälle, durch Hirnblutungen, starke Kopfschmerzen oder auch Verdrängungseffekte, bei ungünstiger Lage entwickelt sich ein Hydrozephalus; klinisch stumme Kavernome sind ebenfalls zahlreich bekannt. Die Diagnose eines Kavernoms wird vorwiegend durch die bildgebenden Verfahren der CT und des MRT gestellt. Im MRT erscheinen sie als meistens rundliche, heterogene (Blutbestandteile und Ablagerungen reflektierende) Herde, die von einem hypodensen Saum umgeben sind, was von den Hämosiderinablagerungen um die Läsion herrührt. Die Blutungsrate bei tiefen und infratentoriell gelegenen Kavernomen scheint höher zu sein¹¹⁹. Weniger die Blutungsgefahr, die deutlich geringer als bei AVMen ist, sondern die oft rezidivierenden und therapieresistenten Krampfanfälle der Patienten stellen ein

medizinisches Problem dar. Nach präoperativer Befundung von Lage und Größe der Läsion kann das Kavernom mikrochirurgisch in toto entfernt werden, wobei asymptomatische Kavernome nicht entfernt werden müssen⁸, auch in Betracht auf das neurochirurgische Operationsrisiko⁷. Auch Kavernome sind keinesfalls statische Läsionen, sondern zeigen größtenteils ein ausgesprochen dynamisches Verhalten¹⁹. Auch immunhistochemisch sind – mittels des unten beschriebenen Faktors PCNA – bereits deutliche Endothelzellproliferationen bei Kavernomen beschrieben worden, die unter anderem auf die Organisation von Mikroblutungen aus der Läsion zurückgeführt wird^{112,122}. Risikofaktoren für aggressives Wachstum scheinen hormonelle Einflüsse, Bestrahlung, der Ort der Läsion sowie eine Assoziation mit einer venösen Malformation zu sein^{18,120}. Ein de-novo-Auftauchen wurde mehrfach beschrieben, sowohl im Kindes-⁸¹ als auch im Erwachsenenalter¹²¹. Auch nach operativer Entfernung eines anderen Kavernoms¹²⁷ bzw. eines Akustikusneurinoms²⁷ wurden neu entdeckte Kavernome beobachtet.

Kapilläre Teleangiektasien

Bei den kapillären Teleangiektasien handelt es sich um Gefäßfehlbildungen, die aus sackförmig oder fusiform erweiterten Kapillaren bestehen, denen die typische Muscularisschicht ebenso wie elastische Fasern fehlen¹⁰¹. Vereinzelt werden sie von einer größeren Zentralvene drainiert. Zwischen den Gefäßen findet sich normales Nervengewebe, was als deutlichstes Abgrenzungskriterium zu den Kavernomen dienen mag (da jedoch auch schon Übergangsformen beobachtet wurden, wird eine Verbindung zwischen den beiden Typen angenommen, eventuell handelt es sich hierbei auch nur um zwei Erscheinungsformen oder Entwicklungsstufen). Sie sind meist klein in ihrer Größe, makroskopisch wie petechiale Blutungen erscheinend und vorwiegend solitär im Hirnstamm lokalisiert. Blutungen und reaktive Gliose sind selten, was auch ihre geringe klinische Relevanz erklärt, weshalb sie meist zufällig bei Autopsien gefunden werden. Ätiologische Ähnlichkeiten zu den Kavernomen werden angenommen¹²⁵.

Venöse Angiome (entwicklungsbedingte venöse Dysplasien)

Ein Venöses Angiom ist durch eine kompliziert erscheinende, jedoch physiologisch und suffizient drainierende venöse Konstellation gekennzeichnet, meist in der tiefen weißen Substanz, bei der viele feine Venen in ein zentrales, vergrößertes venöses Gefäß

münden, welches wiederum das Blut in ein weiteres Venensystem - oberflächlich oder tief - weiterleitet. Das angiographische Erscheinungsbild wird mit dem Begriff „Caput medusae“ belegt. Mikroskopisch finden sich erweiterte, mäßig verdickte oder hyalinisierte Gefäße, jedoch meistens ohne Zeichen der Hämorrhagie, Thrombose oder Kalzifizierung. Klinisch meist stumm, verursachen am ehesten in der hinteren Schädelgrube gelegene Läsionen Symptome wie z.B. Sehstörungen, werden ansonsten jedoch auch wie die Teleangiektasien oftmals erst bei der Autopsie entdeckt. Da gesundes Hirngewebe von der Malformation drainiert wird, ist ein chirurgisches Vorgehen in Hinblick auf das Risiko einer venösen Infarzierung umstritten. Nach der international inzwischen anerkannten Nomenklatur werden venöse Angiome auch als „entwicklungsbedingte venöse Dysplasien“ (developmental venous anomaly) bezeichnet^{129,154}.

Kombinationen

Zu erwähnen wäre, dass die auch weiter unten beschriebenen Malformationen keineswegs ausschließlich auftreten müssen. So beschreiben z.B. Meyer et al.¹⁰³ den Fall einer 32-j. Patientin mit einer Kombination aus einer AVM und einem venösen Angiom. Diese Autoren folgern, dass das von Ihnen beschriebene „arterialisierte venöse Angiom“ ätiologisch die Vorstufe aller AVMen sein könnte und favorisieren für venöse Angiome zudem ein rein konservatives Vorgehen. Auch Yanaka et al. weisen in einem Fallreport auf das gleichzeitige Auftreten einer AVM und eines venösen Angioms hin¹⁵⁸. Das gemeinsame Auftreten einer AVM mit Aneurysmen^{49,116} ist ebenso beschrieben.

3.2.2 Antikörper

Die nachfolgenden Informationen zu Genetik, Physiologie und bisherigen Forschungsergebnissen über die vorgestellten Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Rezeptoren sind, soweit nicht anders angegeben, einer Wissensdatenbank aus dem Internet entnommen⁶².

3.2.2.1 PCNA

Das „Proliferating Cell Nuclear Antigen“, abgekürzt PCNA, befindet sich auf dem Genlocus 20p12 und ist sowohl mit der Synthese als auch mit der Reparatur von DNA als Cofaktor von der DNA-Polymerase Delta assoziiert, wo es für die Nukleotidexcision

aus DNA erforderlich ist. Neuere Erkenntnisse über die genauen Zusammenhänge von PCNA und weiteren Faktoren in der DNA-Replikation wurden von Jonsson et al. dargestellt⁷⁰. Starke Homologie findet sich zwischen dem entsprechenden Faktor beim Mensch und der der Ratte: nur vier der 261 Aminosäuren unterscheiden sich. Hochgeregelte PCNA-Expression findet sich z.B. nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie PDGF (Platelet derived Growth Factor) oder nach UV-Bestrahlung der Haut. Allgemein ist es besonders gut bei mitotischen Zellen nachweisbar, weshalb es als Nachweis für Zellproliferation genutzt werden kann, wie ja schon der Name nahe legt. Einen Überblick über die Physiologie von PCNA und die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen mit entsprechenden Antikörpern bei verschiedenen Tumorgeweben geben die Veröffentlichungen von Hall et al.⁵¹, welche die Nutzung von PCNA als Proliferationsmarker nicht bei allen Tumoren bestätigen, jedoch als möglichen Grund die lange Halbwertszeit von PCNA ansehen⁵¹. Der Grad an PCNA-Expression in Gehirntumoren scheint zu korrelieren mit einer verkürzten Überlebenszeit, was von Kirkegaard et al. als hilfreicher Marker für die Prognose solcher Erkrankungen angesehen wird⁷⁴.

3.2.2.2 MIB-1

MIB-1 ist ein Antikörper, der ebenfalls gut als Nachweis für Zellproliferation geeignet ist, da dieser Antikörper das Ki-67-Antigen nachweist, das während allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird und dort auch nachweisbar ist. In der G₀-Phase ist es somit nicht vorhanden⁴³; die Halbwertszeit des für die Aufrechterhaltung eines ungestörten Zellzyklus unerlässlichen Proteins beträgt nur etwa 1 Stunde. Morphologisch ist es ein eng mit Chromatin assoziiertes, von der Genstruktur hoch repetitives Doppelprotein¹³² und wird in der Tumordiagnostik an Gewebefehnschnitten eingesetzt, um mitotische Zellen aufzufinden. Die gute Eignung des MIB-1-Antikörpers zur Detektion des Ki-67-Antigens beschrieb bereits Cattoretti et al.¹⁶ in seiner Studie an mikrowellenbehandelten Paraffinschnitten. Die gute Eignung von MIB-1 für die Beurteilung und Prognose des Wachstums von Tumoren wurde ebenfalls bereits vor rund 10 Jahren beschrieben⁴². Genauso wie PCNA scheint eine erhöhte MIB-1-Expression eine schlechte Prognose für Gehirntumore zu bedeuten⁷⁴. Mittels dieses Antikörpers wurde bereits herausgefunden, dass in AVMen des ZNS eine erhöhte Proliferationsrate vorliegt, aufgrund von Angiogenese und / oder

Remodellierungsprozessen⁵⁸.

3.2.2.3 bFGF

Das aus 155 Aminosäuren bestehende (Varianten sind beschrieben), nicht glykolisierte Protein „basic Fibroblast Growth Factor“, hat ein Molekulargewicht von 18 kDa, das zugehörige Gen findet sich auf Chromosom 4q25 und ist etwa 38 Kilobasenpaare lang⁶². bFGF wird von fast allen Geweben der meso- und neuroektodermalen Zelllinien produziert, oftmals als biologisch inaktive Form intrazellulär gespeichert und bei Bedarf freigesetzt, wobei der genaue Mechanismus unbekannt ist. Die physiologische Wirkung besteht in der Stimulation des Wachstums, der Migration sowie der Differenzierung von Fibroblasten, Keratinozyten, cholinergen Neuronen sowie vielen weiteren Zellen, darunter insbesondere auch Endothelzellen (autokrine Sekretion), was bFGF eine Rolle bei der Angiogenese zuweist. Als starker Inhibitor dieser Funktion ist TGF- β erforscht worden⁶². In großem Ausmaße wird bFGF - physiologisch - während der Organogenese (Differenzierung ektodermalen Gewebes), bei entzündlichen Prozessen sowie bei der Wundheilung¹¹¹ freigesetzt.

Die Rolle von bFGF bei der Angiogenese spiegelt sich zum Beispiel wieder beim Gefäßwachstum des Trophoblasten⁵², bei Reparationsvorgängen an Wunden¹¹¹, als Zytokin im Liquor bei zerebralen Gefäßkrankheiten und Tumoren⁹¹, auch an Hornhäuten von Mäusen⁷² und an der verletzten Rattenaorta¹⁵¹ konnte ein Gefäß-induzierender Effekt von bFGF beobachtet werden. Bei chronischer Ischämie von Hirngewebe helfen erhöhte Dosen von bFGF am Tiermodell, die Vaskularisation zu verstärken⁸⁸, erhöhte Dosen finden sich auch nach vermehrter Scherkraftbelastung der Gefäße⁹². bFGF scheint indes mit VEGF bei der Angiogenese als notwendiger Cofaktor zu interagieren⁹⁴, was auf eine enge Verknüpfung der Funktion verschiedenster Wachstumsfaktoren hinweist. Die genaue Rolle von bFGF bei der Neoangiogenese ist nicht völlig geklärt, neue Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass es als chemotaktischer Faktor bei der Migration von Zellen zur Bildung von Gefäßen fungiert¹⁰⁹. Die therapeutische Anwendung von bFGF bei AVMen wurde bereits erprobt: Nishi et al.¹¹⁰ fanden heraus, dass mit bFGF versetztes Embolisatmaterial das Gewebe der AVM schneller regenerieren lässt und eine unerwünschte Rekanalisation zu verhindern hilft.

3.2.2.4 TGF- α

TGF- α (Tumor growth factor α), ein aus 50 Aminosäuren bestehendes Protein, wird in verschiedensten Zelltypen des menschlichen Körpers synthetisiert, als Beispiele seien Keratinozyten, Makrophagen, Hepatocyten sowie verschiedenste Tumorzellen genannt. Der codierende Genabschnitt befindet sich auf Chromosom 2p11-p13 und hat eine Länge von etwa 100 kb⁶². Der Rezeptor für TGF- α ist mit dem für EGF (Epidermal Growth Factor) identisch, weshalb diese beiden Zytokine auch sehr ähnliche Funktionen besitzen. Als physiologische Aufgaben von TGF- α werden der Entwicklung der Epidermis sowie die Regeneration bei Leberzellschäden angenommen⁶².

Die mögliche Rolle von TGF- α bei der Angiogenese wurde schon an Brustkrebspräparaten gezeigt wo sich eine positive Korrelation zwischen der TGF- α -Expression und dem Grad der Angiogenese im Tumorgewebe ergab¹³⁷. TGF- α scheint nach neueren Studien auch die Expression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und somit die Gefäßproliferation steigern zu können⁴⁶.

3.2.2.5 FLK-1

Fetal-liver-kinase 1, abgekürzt FLK-1, ist ein membranständiges Enzym, das in das Wachstum von Endothelzellen der Gefäße involviert ist, wo es u.a. auch als Rezeptor für das nachfolgend beschriebene VEGF (siehe Abbildung 1) erkannt wurde¹⁰⁴. FLK-1 ist das Mausanalogon zum menschlichen KDR (Kinase Insert Domain Receptor). In vielen physiologischen Angiogeneseprozessen, z.B. beim Wachstum des fetalen Gehirns, wird FLK-1 exprimiert und leitet als Rezeptorstruktur Signalprozesse ein, während es im adulten Gehirn herunterreguliert ist. Die wichtige Rolle von FLK-1 beim frühen Gefäßwachstum wurde bereits bei Embryos von Mäusen gezeigt¹³⁴, inwieweit FLK-1 jedoch in die Pathophysiologie von menschlichen AVMen eingeschlossen ist, bleibt umstritten : während die Studie von Uranishi et al.¹⁴⁸ eine deutliche Hochregulierung dieses Rezeptors im Vergleich zum Kontrollgewebe angibt, zeigt die immunhistochemische Untersuchung von Hashimoto et al.⁵⁶ das Gegenteil : in jenen Untersuchungen war die Expression deutlich geringer als in den Kontrollpräparaten.

3.2.2.6 VEGF

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ist ein glykolisiertes Homodimer mit einem Molekulargewicht von ca. 48 kDa, aus zwei per Disulfidbrücken verbundenen Subunits mit je 24 kDa bestehend⁶². Der Genort ist 6p12-p21, das Gen hat eine Länge von etwa 12 kb und beinhaltet 8 Exons. Durch alternatives Splicing der zugrunde liegenden messenger-RNA entstehen verschiedene Formen des VEGF, mit 121 bis 206 Aminosäuren; weitere Varianten sind in der Literatur beschrieben¹². Sehr interessant ist die Fähigkeit der Zelle, die Bioverfügbarkeit und somit auch die Wirkung von VEGF zu regulieren, indem entweder lösliche oder an Proteoglykane gebundene Formen von VEGF synthetisiert werden. Unter den Rezeptoren für VEGF finden sich z.B. FLT-1 sowie FLK-1¹⁰⁴ (siehe Abbildung 1).

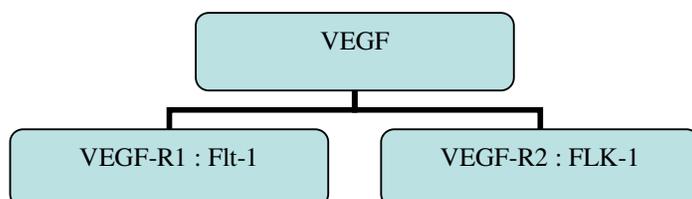


Abbildung 1 : VEGF und zwei seiner Rezeptoren

Um effektiv an seinen Rezeptor gebunden zu werden, ist eine Interaktion mit der Extrazellulärmatrix vonnöten. Ist VEGF an α 2-Makroglobulin gebunden, so ist keine Bindung an den Rezeptor möglich, sodass man dieser Substanz eine VEGF-Inaktivierungsfunktion zuschreibt. Im Signalweg zwischen VEGF-Rezeptor und dementsprechend vermittelter Angiogenese scheint Proteinkinase C (PKC) zu liegen¹⁵⁹.

Die biologische Funktion liegt hauptsächlich, wie der Name bereits andeutet, in der Rolle als Mitogen für Gefäßendothelzellen, wobei auch die Permeabilität der Gefäße durch VEGF erhöht wird¹³. Dies wird eindrucksvoll durch die erhöhte Expression von VEGF in proliferativen Geweben wie fetaler Niere und Hirn¹², Corpus Luteum, Phäochromozytom sowie weiteren Krebsarten dargestellt, insbesondere auch bei Neoplasien des ZNS⁶. In Tierversuchen wurden Hinweise auf die Rolle von VEGF bei der Neovaskularisation von Tumorgewebe¹¹⁷ festgestellt sowie bei der de-novo-

Vasculogenese in Embryos²⁹; weiterhin wurde gezeigt, dass durch Hypoxie die Synthese von VEGF gesteigert wird^{64,67,105,135}, insbesondere auch nach Hypoxie durch vorangegangene Embolisation einer AVM¹⁴⁵. Reguliert wird die Expression von VEGF auch in Abhängigkeit vom Blutfluss im Gefäß⁹³. Des Weiteren spielt VEGF eine Rolle als chemotaktische Substanz für Monozyten sowie im Gerinnungssystem, so zum Beispiel, indem es die Synthese des von-Willebrandt-Faktors stimuliert. Bei Gewebsverletzungen stimuliert VEGF die Neoangiogenese sowie die Endotheldifferenzierung¹¹⁵. Pathologisch erhöhte Mengen findet man z.B. bei Hämangioblastomen, auch solchen, die mit der von-Hippel-Lindau-Krankheit assoziiert sind¹⁵⁵. Dass die Rezeptordichte von VEGF in AVMen signifikant erhöht ist, zeigen mehrere Studien^{144,148}. Besonders bei AVMen, die wiederholt auftauchen, scheint eine (astrozytische) VEGF-Expression eine Rolle bei der Pathogenese zu spielen¹³⁹.

Verbindungen zu weiteren angiogenetischen Stoffen bestehen in großem Ausmaß: zu seinem Rezeptor FLK-1¹⁰⁴ genauso wie zu bFGF, das eine notwendige Rolle bei der VEGF-vermittelten Angiogenese zu spielen scheint⁹⁴, welche in Abwesenheit von HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor, siehe unten) wohl auch nicht zustande kommt³⁵. Eine Übersicht über den aktuellen Stand der Forschung, die physiologischen Rollen, die VEGF zugewiesen werden, sowie therapeutische Ansätze, zeigte Ferrara in 1999³³.

3.2.2.7 Endoglin

Endoglin, auch als CD 105 bezeichnet, ist Teil des TGF- β -Rezeptorkomplexes¹⁷ und besitzt vorwiegend modulierende Funktion. Es ist ein transmembranöses Protein, strukturell ein durch Sulfidbrücken verbundenes Homodimer mit einem Molekulargewicht von 95 kDa. Der für das Protein codierende Genlocus ist 9q3³²; neuere Forschungsergebnisse legen nahe, dass Mutationen im Genom die autosomal dominant vererbte HHT-1 verursachen¹⁰⁰ - im Gegensatz zu HHT-2, hervorgerufen durch eine Mutation im Genlocus von ALK-1 (Activin receptor-like kinase)⁶⁸, ebenfalls einem Teil des TGF- β -Rezeptorkomplexes, der nachfolgend noch genauer beschrieben wird. Der Mechanismus, der zu dieser Gefäßfehlbildung führt, ist vermutlich mehrschichtig, die größte Rolle dürfte die mangelnde Expression von CD 105 an die Zelloberfläche aufgrund falscher Proteinstruktur spielen. Endoglin wird vorwiegend auf den Zellmembranen von Endothelzellen (EC) gefunden, weiterhin bei Gewebsmakrophagen, in Monozyten, im Synzytiotrophoblast und in Blutzellen

gewisser Leukämie-Vorstufen. Die Aufgabe, die Endoglin zukommt, ist noch nicht vollkommen verstanden, wahrscheinlich besitzt das Protein eine herausragende Bedeutung bei der nachgeburtlichen Angiogenese, der Ausreifung von Gefäßen⁸³ und der Herzentwicklung⁴, auch in der Angiogenese des Hühnchens¹²³. Auch bei Mäusen soll Endoglin neueren Forschungen zufolge eine differenzierte Rolle bei der stufenweisen embryonalen Angiogenese zu spielen, wobei Verbindungen zu ALK-1 wahrscheinlich erscheinen⁶⁹. Neueste Forschungen schlagen neue Möglichkeiten in Diagnose und Therapiemöglichkeiten mit Endoglin-Antikörpern für stark durchblutete Karzinome vor¹⁰. Bei Brustkrebs wurde eine Korrelation zwischen der Endoglin-Expression und der klinischen Prognose gefunden⁷⁹. Weiter wird berichtet, dass Endoglin mit der Metastasierungsgefahr bei soliden Karzinomen in Zusammenhang zu stehen scheint¹⁴⁶.

Die Funktion von Endoglin bei der Neoangiogenese besteht darin, dass es die Signaltransduktion nach der Bindung von Tumor Growth Factor- β , eine Familie von bisher 26 Proteinen mit vielfältigen Funktionen in der Proliferation und Transformation von Zellen, moduliert⁶². Die nachfolgende Signalkaskade führt zu einer erhöhten Transkription von Genloci, die für Angiogenese-assoziierte Proteine kodieren. Der TGF- β -Rezeptorkomplex setzt sich aus drei Typen von Rezeptoren zusammen, die miteinander durch sogenannte SMAD-Proteine kommunizieren. Typ I des Rezeptorkomplexes sind die bereits oben erwähnten ALKs⁶⁹, Endoglin selbst wird zum Typ III (Betaglykan), da es eben zu jenem eine hohe Homologie aufweist. Endoglin selbst besitzt vorwiegend eine bedeutsame modulierende Funktion (an anderer Stelle wird beschrieben, dass Endoglin selbst auch die Isoformen 1 und 3 von TGF- β binden kann) und interagiert intensiv mit dem Typ II des Rezeptorkomplexes, u.a. insofern, als dass die Bindung von TGF- β an den Subtyp II des Rezeptors durch seine Anwesenheit beschleunigt wird¹⁷. Ist Endoglin an den Subtyp II gebunden, wird darauf folgend ALK phosphoryliert, was zur Aktivierung und nachfolgender Dissoziation verschiedener SMAD-Proteine führt, die letztendlich in den Nukleus gelangen und dort über Bindung an Promotorregionen die Transkription von verschiedenen Proteinen modulieren, die insbesondere für die Angiogenese wichtig sind.

Inwieweit Endoglin für der Entstehung von AVMen von Bedeutung ist, erscheint unklar: Matsubara et al. erklärten in ihrer Studie, dass Endoglin nicht an der Pathogenese, aber an dynamischen Umformungen der Gefäße – durch Beeinflussung

glatter Muskelzellen - aufgrund erhöhten Blutflusses und Scherkräfte beteiligt ist⁹⁸ - eine Vermutung, die durch die Untersuchungen von Conley et al.²¹ sowie Ma et al.⁸⁹ an atheromatösen Plaques und verletzten Gefäßen untermauert wird. In Tierversuchen wurde herausgefunden, dass fehlendes Endoglin eine ungenügende Ausreifung vaskulärer Strukturen zufolge hat⁸³.

3.2.2.8 HIF-1 α

HIF-1, hypoxia inducible factor-1, ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, aus HIF-1 α - und HIF-1 β -Untereinheiten zusammengesetzt, wird bei sinkendem zellulärem Sauerstoff-Partialdruck vermehrt exprimiert¹⁵² und ist ein Hauptregulator der Sauerstoffhomöostase¹³³. HIF-1 α wird an Promotorregionen von Genen gebunden, deren Produkte eine metabolische Anpassung vornehmen oder die Sauerstoffverfügbarkeit erhöhen, wie z.B. Erythropoietin oder VEGF³⁵. Bei Gehirntumoren konnte eine stark vermehrte Expressionen in Gebieten von Gefäßneubildungen, z.B. in der Nähe von tumorbedingten Nekrosen, gefunden werden¹⁶⁰. Marti et al.⁹⁶ fanden heraus, dass nach induzierter cerebraler Hypoxie eine vermehrte, durch HIF-1 α induzierte, VEGF-Expression der Neovaskularisation vorangeht. Auch im ischämischen Rattenhirn werden Hif-1 α und VEGF vermehrt exprimiert⁶⁷.

3.2.2.9 Positivkontrollen

Bei der Färbung jedes Antikörpers wurde auch Gewebe einer „Positivkontrolle“ gefärbt, die das gesuchte Antigen sicher exprimiert.

<i>Antikörper</i>	<i>Positivkontrolle</i>
PCNA	Glioblastoma multiforme u. Adenokarzinom-Metastase
MIB-1	Glioblastoma multiforme u. Adenokarzinom-Metastase
bFGF	Arteriovenöse Malformation
TGF- α	Arteriovenöse Malformation
FLK-1	Fetale Niere
VEGF	Glioblastoma multiforme u. humane Plazenta
Endoglin	Arteriovenöse Malformation
HIF-1 α	Glioblastoma multiforme

Tabelle 1: Positivkontrollen der Antikörper

4 Material und Methoden

4.1 Auswahl der Präparate

4.1.1 Patientenkollektiv, Vorbereitung

Patientenkollektiv und Kontrollen

In diese Studie gingen die Operationspräparate von insgesamt 56 Patienten mit einer AVM ein. Von einzelnen Sektionen war kein oder ungenügendes eingebettetes Material vorhanden, so dass wir nicht alle Färbungen durchführen konnten. Die Operationspräparate stammen allesamt aus Eingriffen der Klinik für Neurochirurgie, die im Zeitraum von 1996 bis Mai 2000 durchgeführt wurden. Die Katalogisierung der Präparate sowie der Ergebnisse wurde derart gewählt, dass man den Umfang in Zukunft einfach erweitern kann.

Des Weiteren wurden 14 Präparate als Kontrolle in die Studie aufgenommen, die aus Obduktionspräparaten stammten; bei einem Kontrollpräparat wurde post mortem zufällig das Vorhandensein einer AVM diagnostiziert. Dabei wurden 7 der 14 Kontrollpräparate ausgewählt, weil vor dem Tod eine Hirnblutung stattfand.

Vorbereitung der Präparate

Die postoperativ in Paraffin eingebetteten Operationspräparate wurden auf Objektträger gezogen, die Schnittdicke betrug 3-5 μm . Als geeignetste Beschichtung erwies sich die Silanisierung, eine Vorbehandlung der Objektträger durch ein je 5-minütiges Bad in Aceton sowie einer 2 %-igen APES-Lösung (Aminopropyltriethoxysilane[Sigma]) in Aceton, wodurch eine bessere Haftung des Schnittes bei der unten beschriebenen Mikrowellenbehandlung erzielt wurde. Die zunächst durchgeführte Beschichtung mit Poly-L-Lysine erwies sich als unzureichend, weil sich bei der Behandlung mit der Mikrowelle eine Lösung des Präparates vom Objektträger ergab.

4.1.2 Retrospektive Erhebung

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Dokumente stammen größtenteils aus den Patientenakten der Uniklinik Marburg, welche im ansässigen Archiv ausgeliehen und auf relevante Informationen durchgesehen wurden. Im Einzelnen wurden für die

Zusammentragung der benötigten Informationen folgende Dokumente durchgearbeitet:

Arztbriefe über den stationären Aufenthalt

Neben den persönlichen Daten des Patienten fanden sich ausführliche Informationen über die Anamnese, mit den stattgehabten Blutungsereignissen, den Symptomen des Patienten sowie der Vorbehandlung. Auch über den vorläufig beurteilbaren Ausgang der Krankheit wird berichtet.

Operationsberichte

Angaben über den Sitz der Läsion sowie makroskopisches Bild im Operationsgebiet.

Weitere Arztbriefe

Berichte über Behandlungen mit der Methode der endovaskulären Embolisation.

4.2 Immunhistochemie

4.2.1 Allgemeines Prinzip

Prinzip

Wie bereits oben erwähnt, beruht der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation auf der Bearbeitung der vorliegenden Präparate mit den Methoden der Immunhistochemie. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, mit dessen Hilfe man in Geweben lokalisierte Antigene sichtbar machen kann. Das Grundprinzip beruht darauf, dass man nach entsprechender Vorbehandlung die Gewebeschnitte mit spezifischen Antikörpern behandelt (inkubiert), die an die nachzuweisenden Antigene binden. An die Antikörper wiederum werden - nach entsprechender Verstärkung der Primärreaktion - Enzymkomplexe gebunden, die ihrerseits nach Zugabe entsprechenden Substrats jene Farbreaktion katalysieren, die der Visualisierung dient.

Bei dieser Vorgehensweise sind diverse Hilfsreagenzien erforderlich, die zum Teil der Verstärkung der Reaktion als auch der Vermeidung von unerwünschter, weil unspezifischer Hintergrundfärbung dienen. Im Einzelnen wurden eingesetzt:

Hintergrundblockierung

Als effektive Methode wurde eine 20-minütige Beschichtung der Präparate mit einer 20%-igen Rinderserumeiweißlösung verwendet, die eine unspezifische Bindung des Antikörpers an Proteine des Präparates reduzierte. Die endogene Peroxidaseaktivität wird mit Hilfe einer Wasserstoffperoxidlösung in Methanol maskiert. Im Verlaufe der Versuche stellte sich heraus, dass ein optimales Ergebnis zu erzielen war, wenn die Wasserstoffperoxidkonzentration mit 0,75 % gewählt wurde. Die Inkubationszeit betrug 20 min. Die Färbung mit den Antikörpern für Endoglin sowie Hif-1 α wurde mit einem neuartigen, hoch spezialisierten System, dem so genannten Dako-CSA-System durchgeführt (CSA = Catalysed signal amplification). Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Tests wurde zusätzlich ein Biotinblock (siehe unten) sowie eine spezielle, Hintergrund reduzierende Verdünnungssubstanz für den Antikörper verwendet.

Verstärkungsreagenzien und Färbereaktion

In dieser Studie wurde durchgehend die Strept-Avidin-Biotin-Methode (Strept-ABC-Methode) angewandt [DAKO® Strept-AB-Komplex / HRP-Duett (Maus/Kaninchen)]. Der Sekundärantikörper ist mit Biotin konjugiert und bindet den Fc-Teil des Primärantikörpers. Daraufhin wird ein peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex hinzu gegeben, wobei von der möglichen vier Bindungsstellen des Avidins für das Biotin nur drei besetzt sind, so dass der Komplex an das Biotin des zuvor eingesetzten Sekundärantikörpers binden kann. Die eigentliche Färbereaktion wird durch die Peroxidase des Avidin-Biotin-Komplexes hervorgerufen. Als Ausgangssubstanz dient DAB-Lösung (3,3 Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid in PBS-Puffer + Wasserstoffperoxid). Die Färbung dauert bis zur gewünschten Färbeintensität, jeweils etwa 5 bis 10 Minuten.

Aufbewahrung der Schnitte

Während der Inkubationszeiten wurden die Gewebeschnitte nicht an freier Luft, sondern in einer so genannten feuchten Kammer aufbewahrt, die ein Austrocknen der Schnitte verhindert. Waren zwischen zwei Schritten aus organisatorischen Gründen längere Pausen nötig, wurden die Schnitte in ein Bad aus Waschpuffer (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) gelegt.

4.2.2 Vorgehensweisen

Es folgt das für alle Antikörper gültige prinzipielle Protokoll einer Färbung, danach folgen die Antikörper-spezifischen Abweichungen und Konzentrationen. Sofern nicht anders erwähnt, erfolgt zwischen den einzelnen Schritten – soweit erforderlich – ein Spülen der Schnitte in Puffersubstanz (Abspülen der Schnitte und anschließendes 5-minütiges Bad in Puffer), um überschüssiges Substrat abzuwaschen. Als Lösungsmittel und Puffersubstanz wurde in dieser Studie frisch angesetzter PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) mit einem pH-Wert von 7.4 genommen. Während der Inkubationszeiten wurden Reagenzien aufbereitet und Puffer angesetzt.

Vorbereitung und Vorbehandlung der Schnitte

Am Anfang steht die Auswahl der Gewebeschnitte und Einsortieren in Glasküvetten. Darauf Deparaffinisierung der Gewebeschnitte in der absteigenden Alkoholreihe (10 min in 100 % Xylol, dann je 5 min in 100 %-igem, 96%-igem, 70%-igem Alkohol sowie in destilliertem Wasser). Im Anschluss ist noch eine Vorbehandlung der Schnitte zur Demaskierung der Antigene, die durch die Formalinfixation nicht mehr der Immunhistochemie zugänglich sind, nötig. In der Regel erfolgte dies durch eine Mikrowellenbehandlung mit Citratpuffer (pH 6.0), mit 3 Zyklen á 4 min Erhitzen (bei 600 Watt) und 3 min Abkühlen. Die Anregung sowie die genaue Vorgehensweise erfolgten u.a. unter Zuhilfenahme der Darstellung von R. Baumann⁵.

Blockierung der Peroxidase und unspezifischer Proteine

Nach der Blockierung der endogenen Peroxidase durch 20-minütige Inkubation der Schnitte in 0,75%-iger Wasserstoffperoxidlösung (in Methanol) folgt die Blockierung der unspezifischen Hintergrundfärbung durch 20-minütige Inkubation mit 20%-iger Rinderserumlösung, wodurch unspezifische Bindungen des Primärantikörpers an Gewebseiweiße, z.B. durch elektrostatische Kräfte, weitgehend vermieden werden. Nach diesem Schritt erfolgt keine Spülung mit PBS-Puffer, sondern nur ein gründliches Abtropfen des überschüssigen Rinderserums.

Bindung der spezifischen Antikörper und Enzym-Immunkomplexe

Beschichten der Gewebeschnitte mit dem spezifischen Antikörper - dazu wurde eine Lösung in des jeweiligen Antikörpers in spezifischer Konzentration in 1,5%-igem Rinderserum hergestellt (Ausnahme Endoglin und HIF-1 α : hier wurde ein spezielles Verdünnungsmedium genutzt). Pro Objektträger wurde eine Menge von 100 μ l aufgetragen. Anschließend erfolgt die Inkubation in einer so genannten feuchten Kammer, je nach Antikörper über Nacht im Kühlschrank oder über eine festgelegte Zeit bei Raumtemperatur. Danach Auftragen des ersten Sekundärantikörpers. Je 100 μ l des Reagenz wurden pro Schnitt aufgetropft und für mindestens 30 min inkubiert. Im Anschluss Auftragen des Avidin-Biotin-Komplexes. Wiederum je 100 μ l wurden pro Schnitt aufgetropft und für mindestens 30 min inkubiert. Bei der Verwendung des CSA-Systems wird nun noch mit einer Verstärkungsreagenz (biotinmarkiertes Tyramin) inkubiert.

Färbereaktion

Durchführung der Färbereaktion durch Auftragen von je 200 μ l der DAB-Lösung und Inkubation unter dem Abzug bis zur gewünschten Färbeintensität (etwa 5 bis 10 Minuten). Entsorgen der ausgewaschenen DAB-Lösung im vorgesehenen Behälter.

Gegenfärbung und Konservierung

Zunächst Gegenfärbung mit Hämaun (5-minütiges Eintauchen in Hämaunlösung sowie 10-minütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser), danach Entwässern der Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe (in umgekehrter Reihenfolge der Deparaffinisierung). Im Anschluss erfolgt das Eindecken der Präparate mit Corbit-Balsam und geeigneten Deckgläsern.

4.2.2.1 PCNA

Als Antikörper wurde der Dako "Mouse Anti-PCNA" (Klon PC 10, CodeNo. M0879, Lot 039(101), Dako Hamburg, Deutschland) in der Verdünnung 1:100 verwendet. Die Inkubationszeit betrug 45 min bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden bei der Färbung einer Vorbehandlung in der Mikrowelle unterzogen.

4.2.2.2 MIB-1

Als Antikörper wurde der MIB-1 : Dianova ("MIB-1 monoclonal", Cat# DIA505, Lot 02/98, Dianova GmbH Hamburg, Deutschland (jetzt : Dako M-7240, Dako Hamburg, Deutschland)) in der Verdünnung 1:100 verwendet. Die Inkubationszeit betrug 45 min bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden bei der Färbung einer Vorbehandlung in der Mikrowelle unterzogen.

4.2.2.3 bFGF

Als Antikörper wurde Oncogene Science "bFGF (Ab-3) monoclonal" (Cat# GF22, Lot D12732-1, Oncogene Science Cambridge, USA) in der Verdünnung 1:100 verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 Grad Celsius im Kühlschrank. Die Präparate wurden bei der Färbung einer Vorbehandlung in der Mikrowelle unterzogen.

4.2.2.4 TGF- α

Als Antikörper wurde Oncogene Science "TGF- α (Ab-2) monoclonal" (Cat# GF10, Lot 409401-8, Oncogene Science Cambridge, USA) in der Verdünnung 1:100 verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 Grad Celsius im Kühlschrank. Die Präparate wurden bei der Färbung einer Vorbehandlung in einem mit Bad mit 0,05 % Saponin (Detergens, Sigma S-4521, Sigma-Aldrich München, Deutschland) unterzogen.

4.2.2.5 FLK-1

Als Antikörper wurde Santa Cruz Biotechnology "FLK-1 (A-3) monoclonal" (Cat# sc-6251, Lot A060, Santa Cruz Biotechnology Heidelberg, Deutschland) in der Verdünnung 1:40 verwendet. Die Inkubationszeit betrug 45 min bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden bei der Färbung einer verkürzten Vorbehandlung in der Mikrowelle unterzogen.

4.2.2.6 VEGF

Als Antikörper wurde Upstate Biotechnology "Anti-VEGF (human)" (clone JH 121, Cat#05-443, Upstate Biotechnology Waltham, USA) in der Verdünnung 1:100 verwendet. Die Inkubationszeit des Primärantikörpers betrug entweder 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 Grad Celsius im Kühlschrank. Die Präparate wurden bei der Färbung einer verkürzten Vorbehandlung in der Mikrowelle unterzogen.

4.2.2.7 Endoglin

Als Antikörper wurde Dako "Anti CD-105, Endoglin" (Klon SN6h, CodeNo. M3527, Lot 0026F, Dako Hamburg, Deutschland) in der Verdünnung 1:1000 verwendet. Die Färbung mit diesem Antikörper erfolgte mit den Substanzen und Vorgaben des Dako CSA (Catalysed Signal Amplification) Systems. Zusätzlich wurden die Präparate einer Vorbehandlung mit einem Biotinblock (Dako Biotin Blocking System, CodeNo. X0590, Lot 00070) unterzogen. Als spezielle Reagenzien wurde ein eigener Waschpuffer (TBST-Puffer) sowie spezielle Antikörperverdünnungsreagenz (Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components, CodeNo. S3022, Lot 090-1) verwendet.

4.2.2.8 HIF – 1 α

Als Antikörper wurde Abcam Ltd. Cambridge HIF-1 α , (Abcam Ltd. Cambridge, UK) in der Verdünnung 1:1000 verwendet. Die Färbung mit diesem Antikörper erfolgte mit den Substanzen und Vorgaben des Dako CSA (Catalysed Signal Amplification) Systems. Zusätzlich wurden die Präparate einer Vorbehandlung mit einem Biotinblock (Dako Biotin Blocking System, CodeNo. X0590, Lot 00070) unterzogen. Des Weiteren wurde eine verkürzte Behandlung in der Mikrowelle durchgeführt.

4.3 Statistische Methoden

Statistische Hypothese und Methode

Die statistische Auswertung wurde im Hinblick auf mögliche Unterschiede in der Expression bestimmter Antikörper bei verschiedenen Patientengruppen vorgenommen. Hierzu wurde Fishers exakter Test verwendet, der die statistische Unabhängigkeit von Zeilen und Spalten einer Kontingenztafel untersucht¹³⁰. Statistische Unabhängigkeit bedeutet in diesem Fall, dass der Anteil an positiv gemessenen Patienten (für einen bestimmten Faktor) z. B. unter den Embolisierten und nicht Embolisierten (in der Grundgesamtheit - nicht notwendig in der Stichprobe) gleich ist. Als Nullhypothese wird somit angenommen, dass der Anteil der Expression eines bestimmten Antikörpers in beiden Patientengruppen gleich ist. Die Alternativhypothese ist, dass der Anteil unterschiedlich ist, wobei zweiseitig getestet wird, somit also Unterschiede in beide Richtungen möglich sind.

Strenges Signifikanzniveau

Da am gleichen Patientenkollektiv bei mehreren Antikörpern getestet wird, müssen die auf diese Weise errechneten nominalen p-Werte unter strengen statistischen Kriterien noch wegen des multiplen Testens korrigiert werden. Hierfür wurde das Bonferroni-Verfahren gewählt¹³⁰. Dazu teilt man das gewünschte globale Signifikanzniveau ($\alpha=0,05$) durch die Anzahl der durchgeführten Tests (in diesem Fall 16 Tests [8 Antikörper, von denen 2 für jeweils 5 Gefäßschichten getestet wurden]), sodass sich als "strenges" Signifikanzniveau also $\alpha = 0,05/16 = 0,003125$ ergibt. Mit diesem korrigierten Signifikanzniveau müssen die nominalen p-Werte verglichen werden.

5 Resultate

5.1 Epidemiologie und Klinik

Im Folgenden sind alle erlangten klinischen Daten tabellarisch aufgeführt (siehe Tabelle 2), die wichtigsten Daten auch grafisch dargestellt.

Zu den untersuchten Daten gehören unter anderem die Geschlechterverteilung, die unterschiedlichen Symptome der Patienten, die Häufigkeit einer AVM in verschiedenen Altersgruppen, der Sitz der Läsion, das Spetzler-Martin-Grading¹⁴¹ sowie die Häufigkeit der Embolisation sowie deren Abstand zur Operation.

Die Geschlechterverteilung ist in etwa ausgeglichen mit einem leichten Überhang an Männern. Unter den 56 Patienten finden sich 31 Männer und 25 Frauen (siehe Abbildung 2 sowie Tabelle 2):

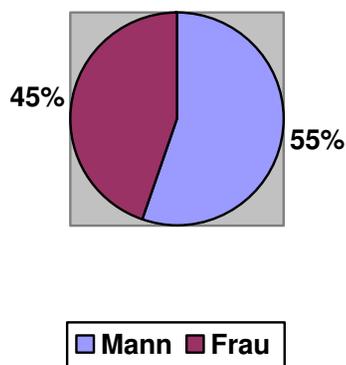


Abbildung 2 : Geschlechterverteilung im Patientengut

Bei den klinischen Symptomen der Patienten war der (blutungsbedingte) akute und heftige Kopfschmerz in 30 der 56 Fälle vorherrschend. In abnehmender Reihenfolge wurden als Beschwerden auch neurologische Beschwerden (22 von 56), Sehstörungen (16), Krampfanfälle und Schwindel (je 15), tiefe Bewusstlosigkeit (10), Sprachstörungen (8), Parästhesien und Hörstörungen (je 3) angegeben (siehe Abbildung 3). Bei einem – beschwerdefreien – Patienten war die AVM ein Zufallsbefund.

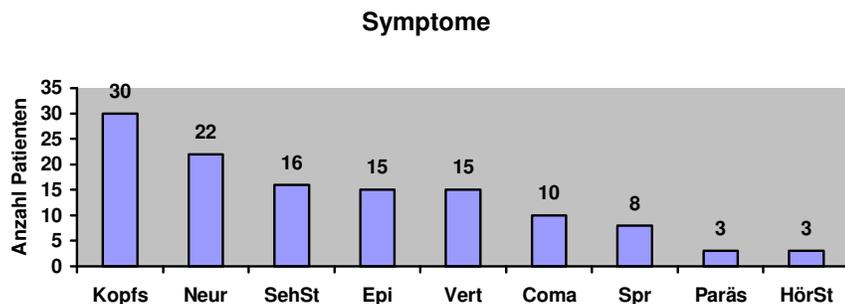


Abbildung 3 : Klinische Symptome der Patienten (Mehrfachnennung möglich)

Das Durchschnittsalter der Patienten bei der OP betrug 40,1 Jahre. Die Altersverteilung ist im folgenden Diagramm graphisch dargestellt, es zeigt sich eine deutliche Bevorzugung des mittleren Altersbereichs zwischen 30 und 60 Jahren (s. Abbildung 4):

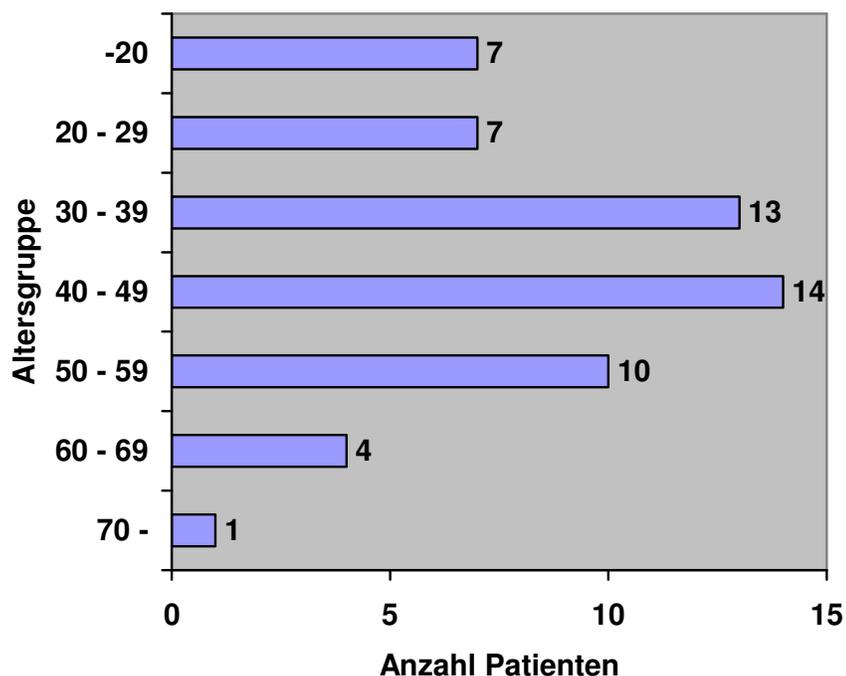


Abbildung 4 : Altersverteilung des untersuchten Patientenguts

Die Lokalisation der Läsion lässt sich ebenfalls in Zahlen fassen. 5 der 56 AVMen fanden sich im Kleinhirn (Cerebellum), eine im Thalamus (Tief). Der Rest war den Lappen des Großhirns zuzuordnen (siehe Abbildung 5):

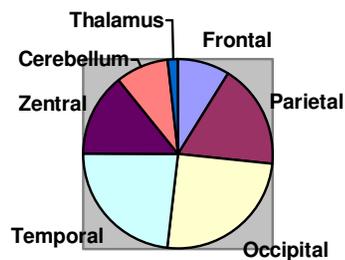


Abbildung 5 : Verteilung des Sitzes der Läsionen

Eine präoperative Embolisation wurde in 34 der 56 Fälle durchgeführt (siehe Abbildung 6). Die Verteilung der Abstände zwischen letzter Embolisation und OP wird in Abbildung 7 dargestellt. Zu sehr geringen Abständen, z.B. von einem Tag, kam es, wenn während der Embolisation Zwischenfälle eintraten und eine Notoperation durchgeführt werden musste.

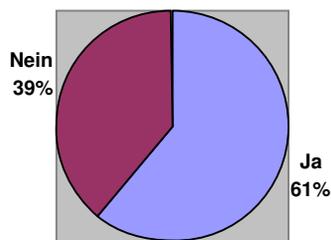


Abbildung 6 : Häufigkeit der präoperativen Embolisation

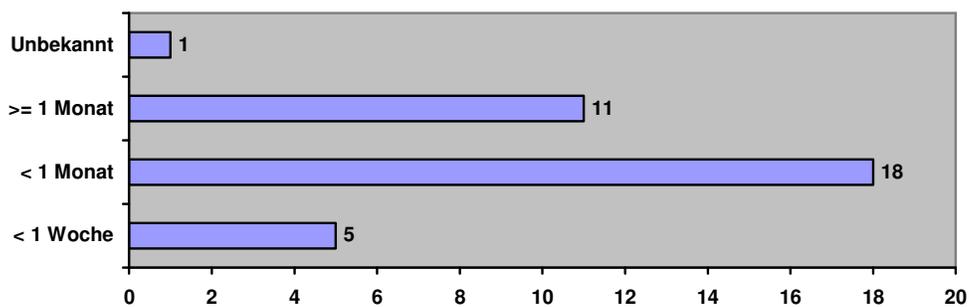


Abbildung 7 : Zeitlicher Abstand der Embolisation zur OP

Im Spetzler-Martin-Grading¹⁴¹ war am häufigsten Grad 3 zu verzeichnen (siehe Abbildung 8). In einigen Fällen war keine Klassifizierung möglich, da die OP notfallmäßig erfolgte und keine präoperative Angiographie stattfand.

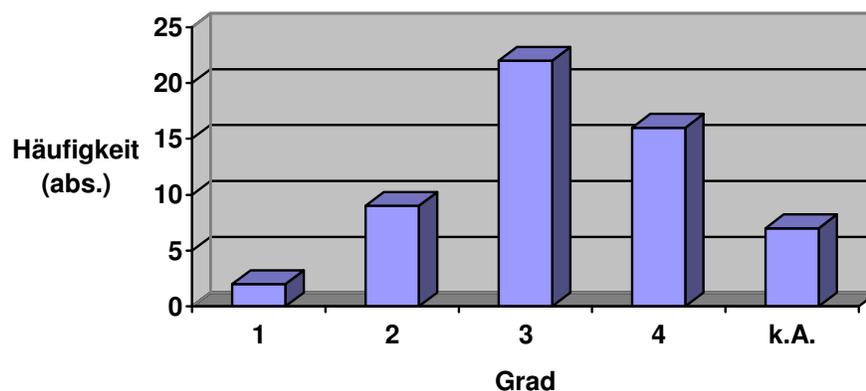


Abbildung 8 : Häufigkeitsverteilung des Spetzler-Martin-Grading

Legende zur Tabelle 2

NR : Kennzeichnet die fortlaufende Nummer des Patienten, NAME : Namensinitialen des Patienten, NE : Registriernummer der Präparates in der Pathologie (Blocknummer), W/M : Geschlecht des Patienten (W = Weiblich, M = Männlich), SYMP: Klinische Symptome des Patienten (K = akuter Kopfschmerz, C = Coma / tiefe Bewusstlosigkeit, E = epileptische Krampfanfälle, N = Neurologische und / oder psychische Symptome wie z.B. Ataxie, Verwirrtheit und pathologische Reflexe, L = Sprachstörungen, V = Vertigo, P = Parästhesien als spezielles neurologisches Syndrom, O = Sehstörungen, A = Hörstörungen, Z = Zufallsbefund), ALTER: Alter des Patienten am Tage der Operation in Jahren, ORT : Lokalisation der Läsion im Gehirn (Li = Links, Re = Rechts, P = Parietal, T = Temporal, F = Frontal, O = Occipital, Z = Zentral, C = Cerebellär, Th = Thalamus), EMBO : Häufigkeit einer präoperativen Embolisation (- = keine Embolisation präoperativ) und Zwischenraum zwischen letzter Behandlung und stattgefundener Operation (J = Jahre, M = Monate, W = Wochen, T = Tage, S = Stunden), S+M : Spetzler-und-Martin-Grading¹⁴¹

Nr	Nam	NE	W/M	Symp	Alter	Ort	Embo	S+M
1	AM	326/99	W	K, C	65	Re O	-	k.A.
2	AE	260/00	W	E	29	Re Z	2x, 3 M	4
3	AC	825/97	M	V	31	Re F	5x, 4 T	3
4	BD	873/98	M	N, O	59	Li P	-	3
5	BB	1029/98	W	K, C	19	Re F	-	k.A.
6	BA	945/97	M	K, E	49	Re T	-	2
7	BD	1069/99	M	L, N	55	Li T	3x, 1 S	4
8	CR	905/98	M	N, C	11	Re Z	5x, k.A.	4
9	DA	983/99	M	K, O, A	43	Re O	4x, 1 W	3
10	DM	248/00	M	E	39	Re P	5x, 1 T	3
11	DH	680/99	M	N, C	60	Li O	-	k.A.
12	DF	649/98	M	C, E	8	Re Th	-	4
13	DR	600/99	M	K, O, V	34	Re O	9x, 2 M	4
14	DA	431/97	W	A, V, N	39	Re C	5x, 1 W	4
15	FA	851/97	W	E	46	Re Z	6x, 1 W	3
16	FG	581/97	M	E, N, V	37	Re T	5x, 1 W	4
17	FR	603/97	M	K, V, N	33	Re C	2x, 1 M	3
18	GH	543/97	M	E, O	43	Li O	5x, 3 M	4
19	HJ	410/99	M	V, N, O	46	Li O	-	2
20	HF	963/97	W	K, V, L, N	67	C	-	2
21	HM	140/98	M	K, O, P, N	37	Li T	4x, 5 W	3
22	HW	781/99	M	E, N	49	Re T	-	3
23	HN	716/97	W	K, O, N, L	19	Li O	3x, 1 W	3
24	IN	461/00	M	K, C	7	Li Z	-	3
25	JA	634/98	M	K	51	Re P	3x, 1 W	3
26	JO	913/98	M	K, V	41	Re O	5x, 1 W	3
27	JH	923/97	W	K, V, P	56	Li Z	5x, 1 T	4
28	KB	593/99	M	K, O, V	17	Li O	4x, 1 W	3
29	KW	629/99	M	P, O, K, V	27	Li T	6x, 9 M	4
30	KM	717/99	W	K, V, N	76	Re F	-	k.A.
31	KM	219/99	W	K, C	56	Li O	-	2
32	KK	387/97	W	L, O, N	32	Li T	6x, 6 M	3
33	KM	594/98	W	K, V, N	33	Li C	3x, 1 M	3
34	LM	033/00	M	E	25	Li T	-	2
35	LW	254/00	M	E, C	54	Li T	2x, 1 W	3
36	LM	1162/99	M	Z	11	Re P	-	4
37	LB	689/99	W	K, O, V	27	Re P	11x, 1 W	4
38	LV	948/99	W	K, L, V, N	40	Re P	6x, 1 W	3
39	OW	1161/99	M	L, N	59	Li P	-	k.A.
40	PM	477/98	W	E	39	Li F	2x, 15 M	3
41	RJ	612/98	M	V, O	42	Li O	3x, 1 S	4
42	RW	793/97	M	K, C	69	Li C	-	k.A.
43	RJ	328/97	M	L, N, K	42	Li P	-	3
44	RS	872/99	W	K	49	Li Z	7x, 1 W	2
45	SG	130/98	W	E, K, N	40	Li T	4x, 1 W	4
46	SC	318/97	M	K, N, E	47	Li T	3x, 1 W	2
47	SM	170/99	W	O	43	Re P	4x, 6 W	2
48	SM	157/98	W	O	33	Re O	3x, 1 W	3
49	SM	382/97	M	K, O	23	Re O	6x, 1 W	4
50	SE	1087/99	W	K, A	37	Li T	6x, 4 W	4
51	TM	779/98	W	K, O	55	Li O	-	1
52	TH	771/99	M	L, N	59	Li F	-	1
53	UG	235/00	W	K, C	31	Li P	-	k.A.
54	WM	362/97	W	K, P, N	59	Re Z	-	2
55	WM	260/98	W	E	27	Re T	2x, 1 W	3
56	WI	83/99	W	E	20	Re Z	6x, 2 M	3

Tabelle 2: Klinische Daten des Patientenguts

5.2 Immunhistochemie

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Färbungen für jeden Antikörper sowohl in Textform als auch grafisch dargestellt. Bei den Präparaten der in dieser Studie untersuchten Patienten erfolgt bei einigen Antikörpern zusätzlich eine Aufschlüsselung der Anfärbbarkeit nach Gewebsschichten. Zunächst erfolgt ein kurzer Überblick über die Ergebnisse der Kontrollpräparate. Eine tabellarische Übersicht der gesamten Färbeergebnisse findet sich am Ende des Abschnitts.

Färbungen der Kontrollpräparate

Nur das Präparat, bei dem postmortal eine AVM diagnostiziert wurde, wies eine Positivität für die Antikörper PCNA, FLK-1 sowie HIF-1 α auf.

Kein Präparat der Kontrollgruppe zeigte eine Anfärbbarkeit für VEGF sowie MIB-1. Auch bei den Färbungen für bFGF und TGF- α fand sich bei keinem der untersuchten Präparate eine positive Färbung in einer der 5 betrachteten Gewebsschichten (nicht gesondert differenziert).

Die Färbung für den Antikörper gegen Endoglin war in 8 der 14 Fälle positiv.

In 7 der 14 Fälle fand sich eine Blutung im Sektionspräparat.

Färbeergebnisse der Patientenpräparate

Zunächst werden zusammen die Häufigkeiten für PCNA, MIB-1, FLK-1, VEGF und HIF-1 α gezeigt. Diese Ergebnisse beziehen sich auf anfärbbare Zellen in der Endothelschicht (siehe Abb. 20). Während sich bei PCNA spezifisch die Zellkerne anfärben lassen (nukleäres Expressionsmuster, siehe Abbildungen 16 und 17), färbt sich beim VEGF-Antikörper das Zytoplasma braun an (zytoplasmatisches Expressionsmuster, siehe Abbildung 19).

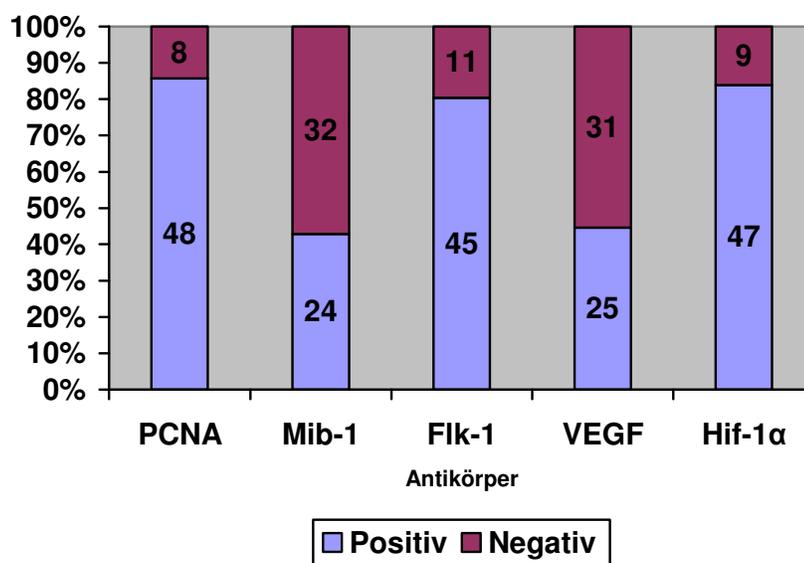


Abbildung 9 : Absolute Anfärbarkeit für sechs Antikörper

Am häufigsten wurden die Antigene PCNA (85,7 %, siehe Abb. 16 und 17), Flk-1 (80,4 %, Abb. 18) und HIF-1 α (83,9 %, Abb. 22) exprimiert. Bei nur zwei Fünftel der Präparate ließ sich eine Anfärbung für Ki-67 (42,9 %) und VEGF (44,6 %, Abb. 19) nachweisen.

Bei den Antikörpern bFGF (siehe Abbildung 14) und TGF- α (siehe Abbildung 15) wurde die Beurteilung der Anfärbarkeit, analog der Studie von Kilic et al.⁷³, getrennt nach Gewebsschichten vorgenommen. Während bFGF fast ausschließlich im Endothel exprimiert wird, ist die Verteilung von TGF- α gleichmäßiger. Im perivaskulären Gewebe werden sowohl bFGF als auch TGF- α verstärkt von den dort anzutreffenden Zellen, z.B. Fibroblasten, exprimiert (Abb. 15).

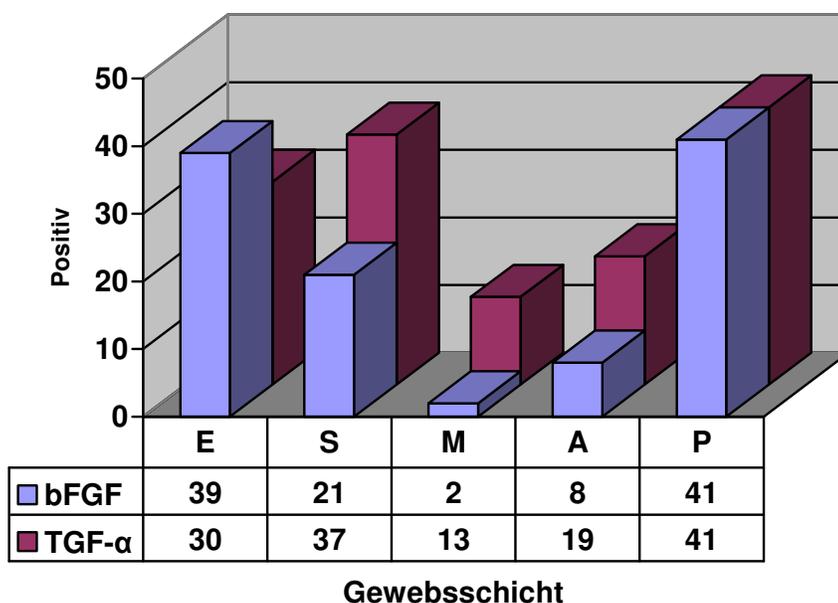


Abbildung 10 : Schichtenbezogene Anfärbarkeit für TGF- α und bFGF.

Legende : E = Endothel, S = Subendothel, M = Media, A = Adventitia, P = Perivaskuläres Gewebe

Im Endothel wurde bFGF von 39 der 56 (69,6 %) Präparate exprimiert, bei TGF- α war dies bei 30 der 56 (53,6 %) Patienten der Fall. Im Subendothel wurde TGF- α (66,1 %) vermehrt exprimiert im Vergleich zu bFGF (37,5 %). Die Zellen der Adventitia zeigten für beide Antikörper in 41 der 56 Fälle (73,2 %) eine positive Anfärbung.

Einfluss der Embolisation auf die Expression

Bereits in einer präliminären Serie¹⁴⁵ ist berichtet worden, dass die Embolisationen einen erheblichen Einfluss auf die Expression von angiogenetischen Faktoren in AVMen haben können. Es war daher nahe liegend, die 35 Patienten der vorliegenden Serie, die präoperativ embolisiert wurden, mit den 21 Patienten ohne Embolisation zu vergleichen. Es zeigte sich, dass für beinahe alle Antigene ein prozentualer Anstieg der Expression in embolisierten Präparaten besteht. Dabei wurde in 71% der Präparate ohne vorherige Embolisation eine positive Immunreaktion für PCNA nachgewiesen, während

bei vorher embolisierten AVMen in 94% der Fälle eine Positivität in den Endothelzellen bestand. Analog stieg die Expression von Flk-1 von 67% auf 89%, für VEGF von 14 auf 63%, für HIF-1 α von 67% auf 94% und für Endoglin 95% auf 97% (siehe Abbildung 11).

Testung auf Signifikanz

Es wurde weiter geprüft, ob die in der Stichprobe beobachteten Unterschiede statistisch signifikant sind. Hierzu wurde Fishers exakter Test verwendet. Die Signifikanzniveaus wurden mit 0,05 bzw. nach strengeren Kriterien wegen multiplen Testens mit $\alpha=0,003125$ angenommen (s. hierzu auch Material und Methoden). Als nach strengeren Kriterien einziger statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich, dass VEGF signifikant häufiger in embolisierten als in nicht embolisierten AVMen exprimiert wurde ($p=0,0007$). Zum Niveau 0,05 sind auch die Unterschiede in der Expression von PCNA und HIF-1 α signifikant.

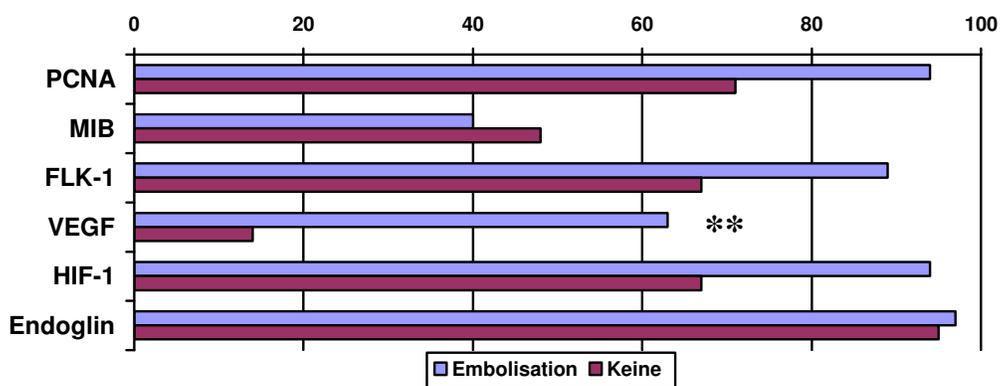


Abbildung 11 : Abhängigkeit der prozentualen Antigenexpression in Bezug auf vorangegangene Embolisation. Legende: * signifikanter Unterschied, ** signifikanter Unterschied, auch nach Reduktion des Signifikanzniveaus wegen multiplen Testens

Eine entsprechende Steigerung der prozentualen Expression der Antikörper tritt auch bei der genaueren Untersuchung von bFGF (siehe Abb. 14) und TGF- α (siehe Abb. 15) auf. Dabei ist besonders die Expression dieser Antigene im Bereich des Endothels bzw. Subendothels und im Fall von TGF- α auch im perivaskulären Gewebe auffällig.

Eine signifikante Zunahme der Expression von bFGF zeigte sich jedoch nur im Endothel ($p= 0,039$), während es für TGF- α eine signifikante Zunahme der Expression im Endothel ($p = 0,0272$, Subendothel ($p = 0,0403$) und im perivaskulären Gewebe ($p= 0,0258$) gab.

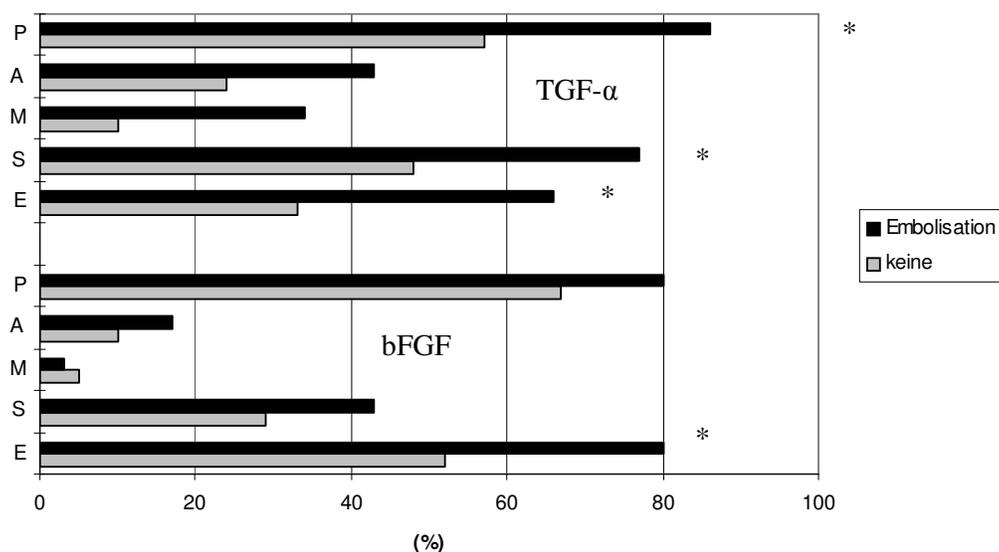


Abbildung 11: Abhängigkeit der Antigenexpression bei TGF- und bFGF, in Abhängigkeit von den Gewebsschichten und vorausgegangener Embolisation (* signifikanter Unterschied)

Zudem nimmt auch die Häufigkeit der Embolisationen auf die Expression der untersuchten Faktoren Einfluss. Von 18 Patienten mit 5 oder mehr Embolisationsbehandlungen zeigten alle (100%) eine positive Immunreaktionen für PCNA und HIF-1 α (siehe Abb. 22), während sich nur bei 8 Patienten (44%) auf MIB-1 und 15 Patienten (83%) für VEGF eine entsprechende Reaktion zeigte. Bei den drei Präparaten, bei denen keine Immunreaktion gegen VEGF nachgewiesen werden konnte, handelte es sich um AVMen, die mehr als vier Wochen vor der Operation embolisiert worden waren.

Nr	PCNA	Mib-1	Fik-1	VEGF	Endo	Hif-1 α	bFGF					TGF-a				
	E	E	E	E	E	E	E	S	M	A	P	E	S	M	A	P
1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
2	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
3	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
4	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1
5	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
13	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
14	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
15	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
16	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
17	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
18	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
19	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
20	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
21	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
22	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
23	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
24	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
25	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
26	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
27	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
28	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1
29	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
30	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
31	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
33	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1
34	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
35	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
36	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
37	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
38	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
39	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
41	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
42	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
44	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
45	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
46	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
47	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
48	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
49	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
50	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
51	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
52	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
53	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
55	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
56	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1

Tabelle 3: Färbeergebnisse der Operationspräparate

Nr.	Ort	Blut.	NE	AVM	PCNA	MIB-1	Flk-1	VEGF	Endo	HIF-1 α	bFGF	TGF- α
1	ST	ja	221/99		0	0	0	0	1	0	0	0
2	ST	nein	224/99		0	0	0	0	1	nu	Nu	0
3	ST	ja	200/99		0	0	0	0	1	0	0	0
4	ST	nein	218/99		0	0	0	0	1	0	0	0
5	ST	ja	200/99		0	0	0	0	0	0	0	0
6	ST	ja	191/99		0	0	0	0	0	0	0	0
7	ST	ja	186/99		0	0	0	0	1	0	0	0
8	ST	nein	74/00		0	0	0	0	0	0	0	0
9	ST	ja	78/00-1		0	0	0	0	1	nu	nu	0
10	ST	nein	78/00-2		0	0	0	0	0	nu	0	0
11	ST	ja	87/00	Ja	1	0	1	0	1	1	0	0
12	ST	nein	207/99		0	0	0	0	1	nu	nu	0
13	ST	nein	215/99		0	0	0	0	0	0	0	0
14	IT	nein	189/99		0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 4: Färbeergebnisse der Kontrollpräparate

Legende zu Tabelle 3 und 4

NR = Fortlaufende Nummer wie in Tabelle 1

PCNA, MIB-1, FLK-1, VEGF, HIF-1 α , bFGF, TGF- α : Jeweilige Antikörper

ENDO = Endoglin

ABKÜRZUNGEN FÜR GEWEBSSCHICHTEN : E = Endothel, S = Subendothel, M = Media, A = Adventitia, P = Perivaskuläres Gewebe

FÄRBEINDEX : 0 = keine Färbung in der jeweiligen Gewebsschicht, 1 = Färbung in der Schicht vorhanden

ORT : Herkunft des Sektionspräparates (ST = Supratentoriell, IT = Infratentoriell)

BLUT. : Prämortal stattgefundenene Hirnblutung

AVM : Postmortal fand sich eine AVM

6 Illustrationen

6.1 Klinik

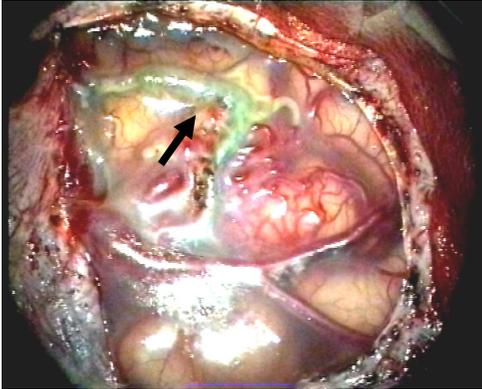


Abbildung 12: zeigt oben links den Situs nach Freilegung einer in der Zentralregion gelegenen AVM, die zum Teil embolisiert wurde (s. Pfeil auf thrombosiertem Gefäß).

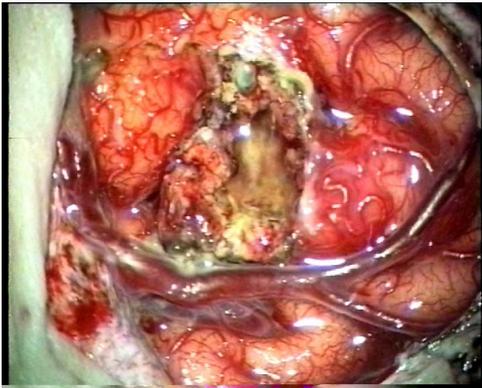


Abbildung 13: Das Bild zeigt die Resektionshöhle nach kompletter Entfernung (in der Mitte dargestellt) der AVM.

6.2 Immunhistochemie

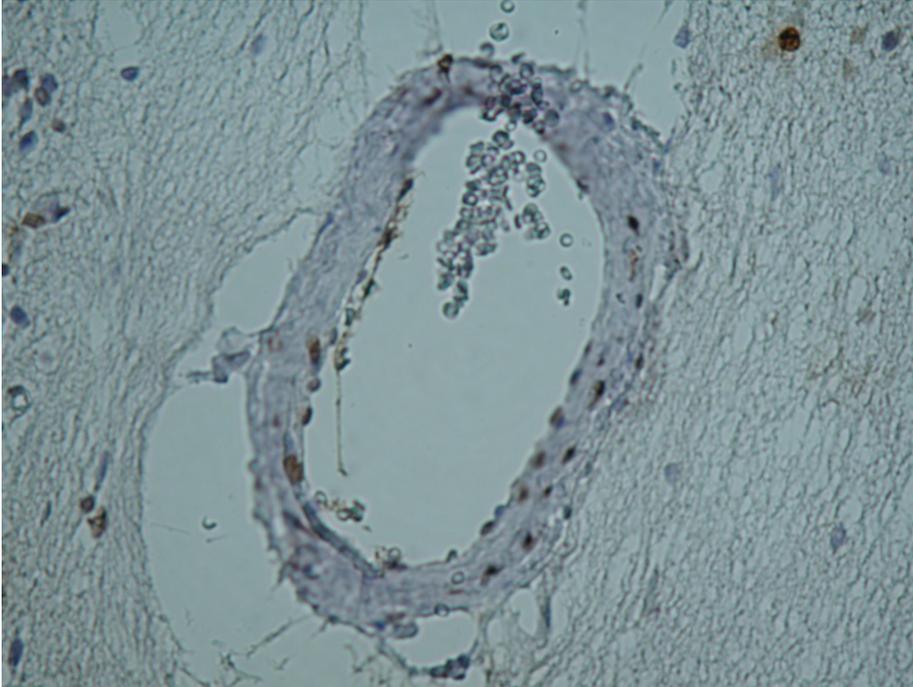


Abbildung 14: Präparat Nr. 254/00 in der bFGF-Färbung. Es finden sich positiv gefärbte Zellen sowohl im Endothel als auch im Subendothel und der Adventitia des Gefäßes.

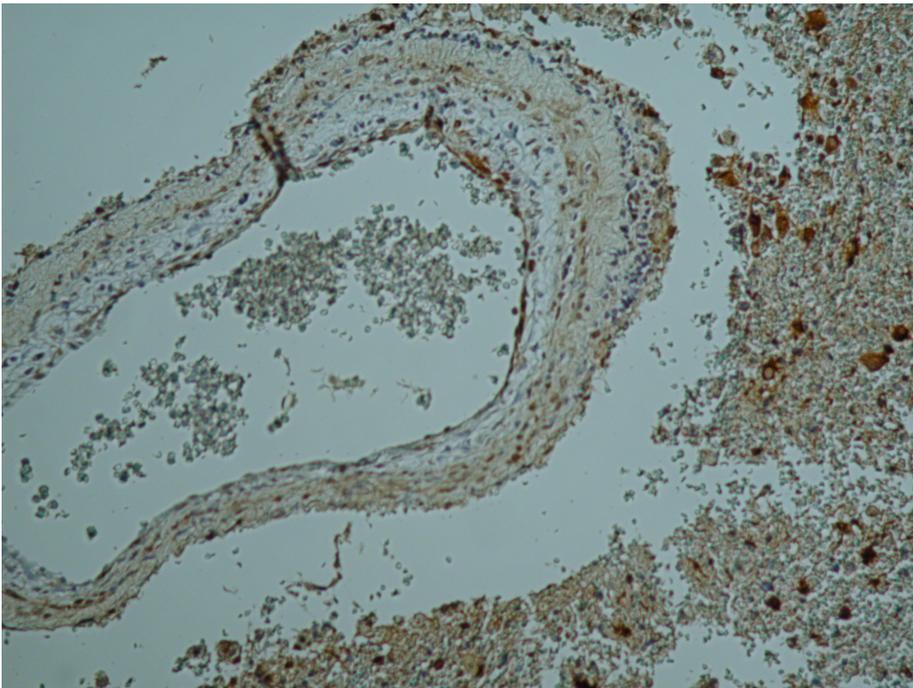


Abbildung 15: Beim Präparat 905/98 sind in der TGF- α -Färbung alle Schichten positiv.

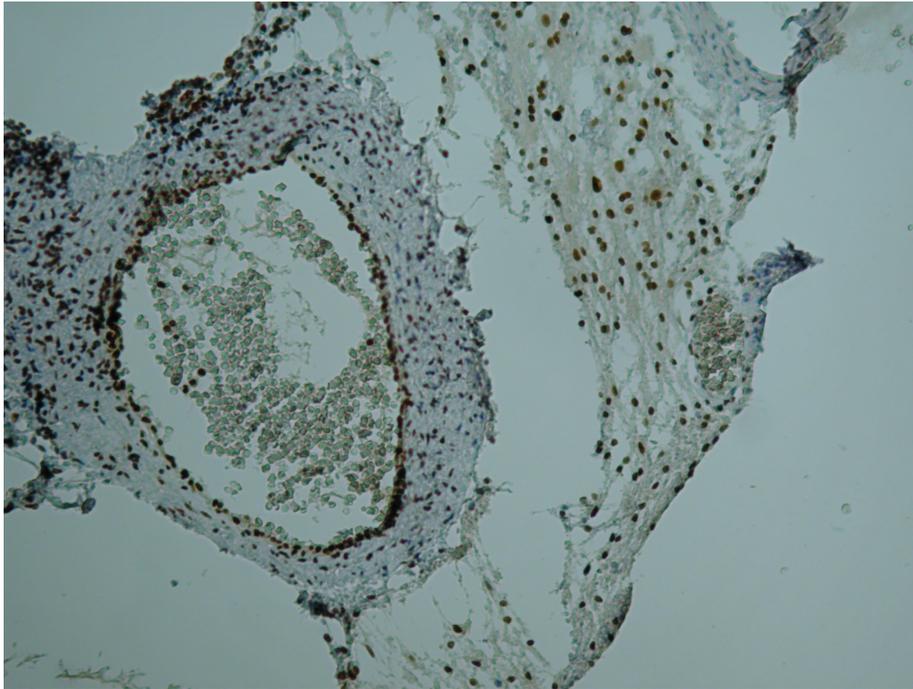


Abbildung 16: Präparat 83/99 in PCNA-Färbung - Deutliche nukleäre Positivfärbung der Endothelzellen

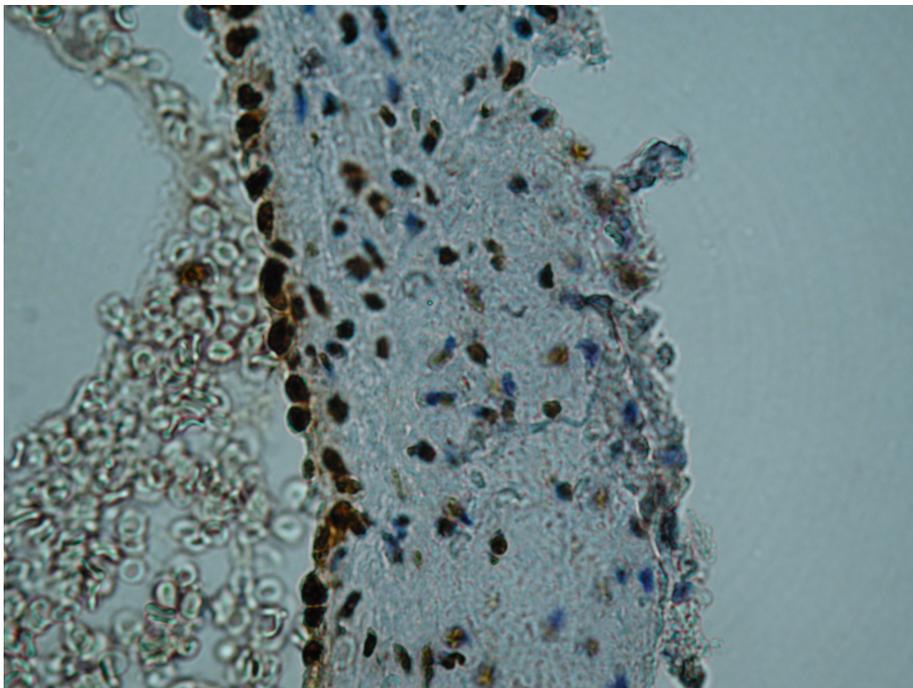


Abbildung 17: Vergrößerung des Bildes zuvor: hier ist sehr deutlich die spezifische (braune) Anfärbung der Endothelzellkerne zu sehen

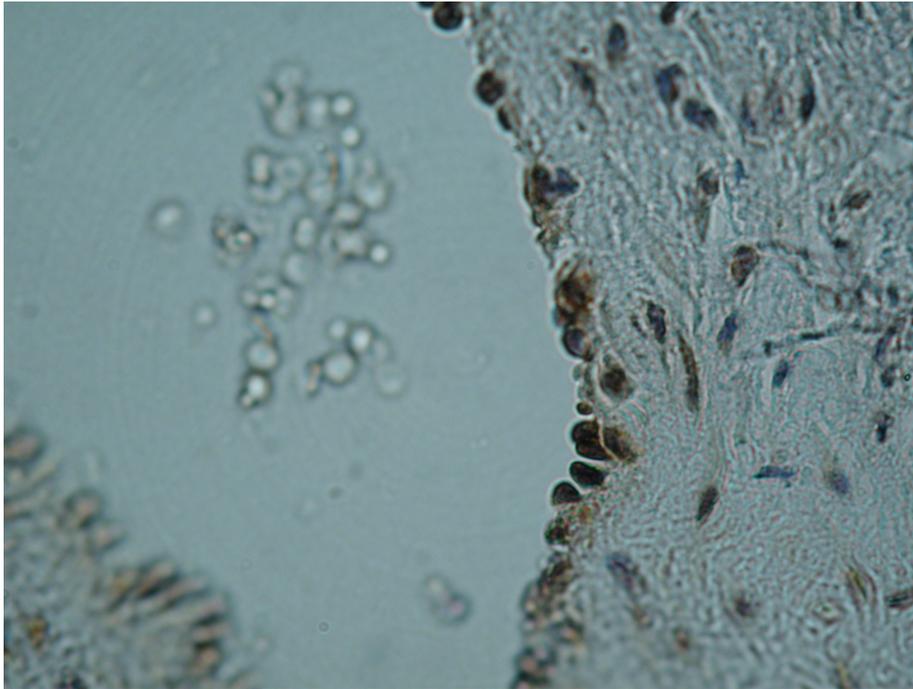


Abbildung 18: Positive FLK-1-Färbung für das Präparat 83/99, deutliche Abgrenzung gegen andere Zellschichten.

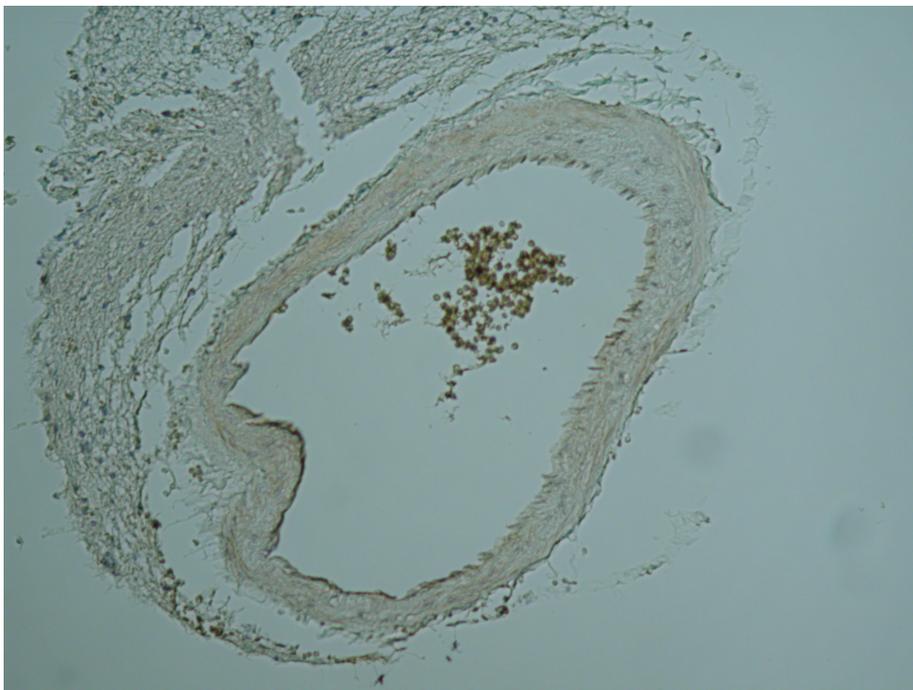


Abbildung 19: Färbung des Antikörpers VEGF beim Präparat 260/98. Auch hier sieht man exakt, wie sich ganz spezifisch das Zytoplasma des Endothels anfärbt.

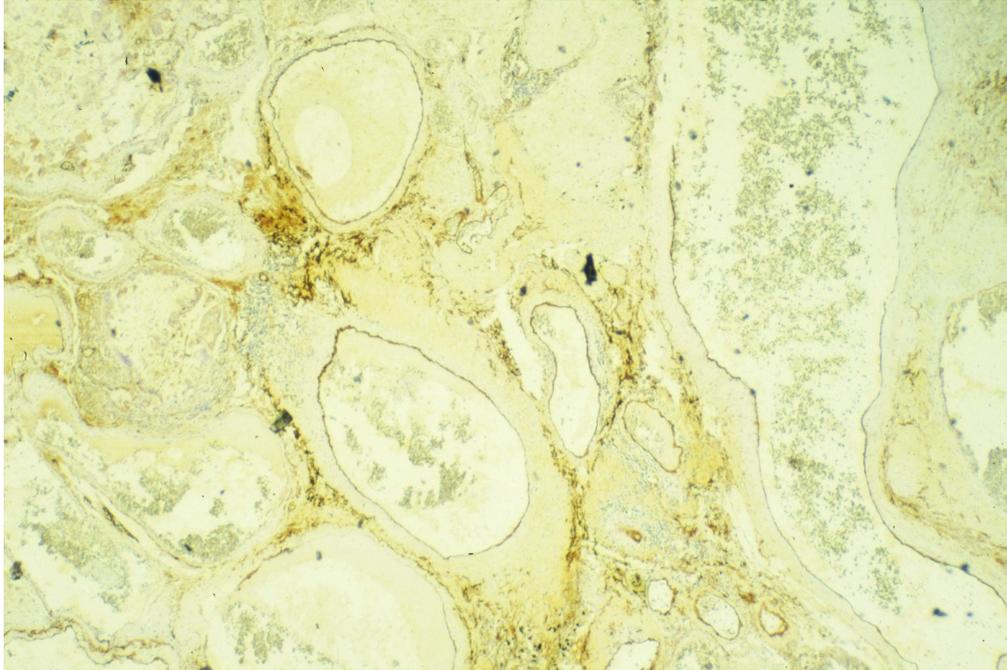


Abbildung 20: Endoglinfärbung des Präparates 248/00. Streng auf das Endothel limitierte Anfärbung des Gefäßknäuels. Artefakte im dazwischen liegenden Bindegewebe.

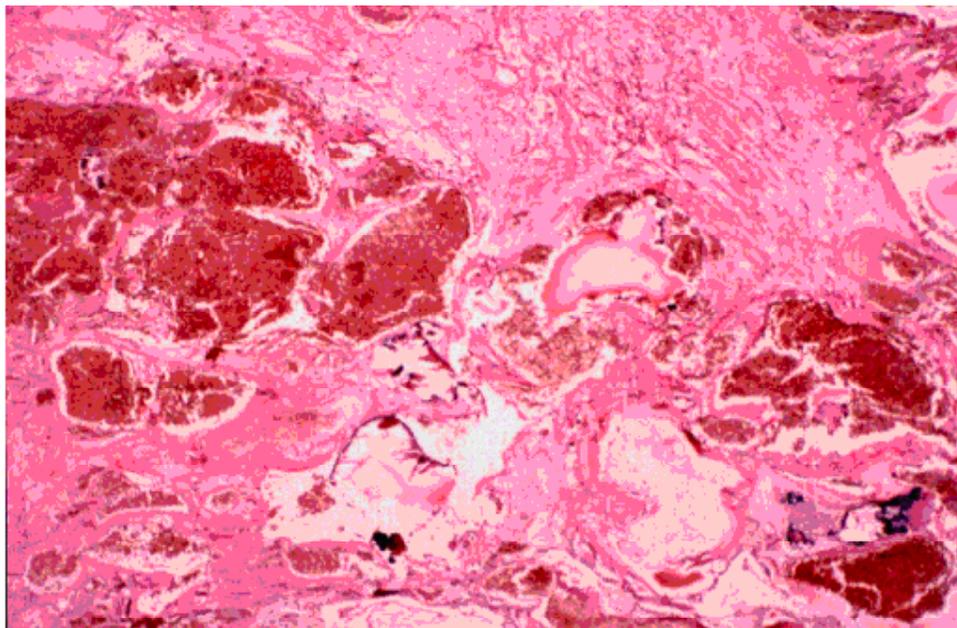


Abbildung 21: In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer AVM sieht man Hirngewebe zwischen den Gefäßanschnitten. Viele Erythrozyten in den pathologischen Gefäßen.

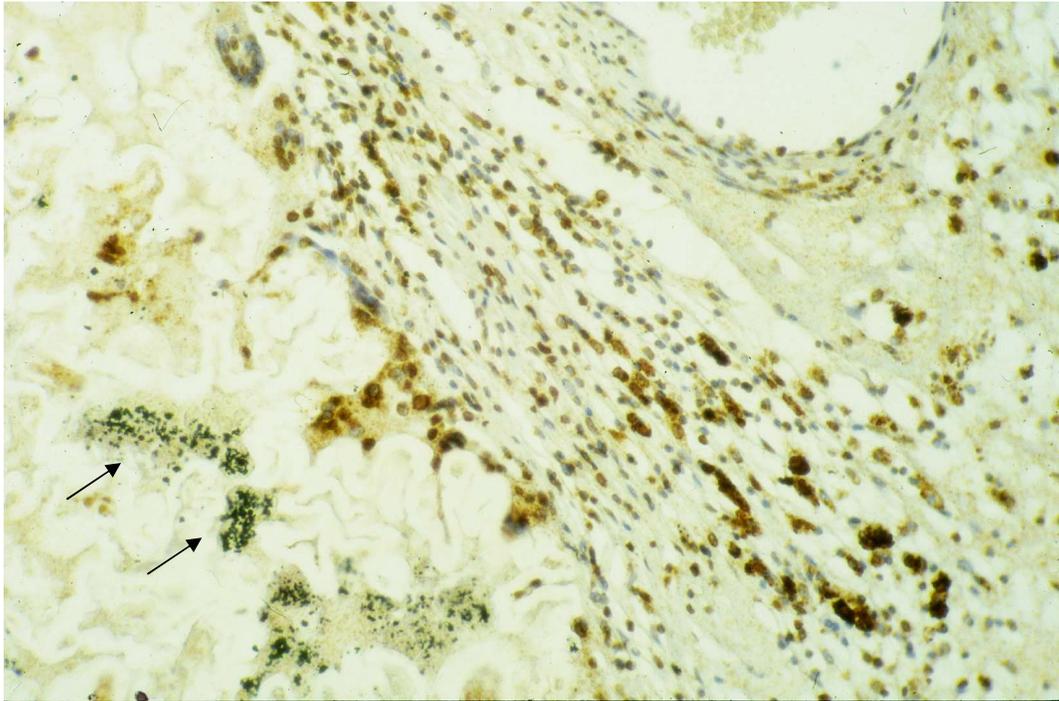


Abbildung 22: Bei Präparat 830/99 findet man eine Anfärbung für HIF-1 α in unmittelbarer Nachbarschaft zum Embolisat (Pfeile). Vorwiegend (Sub-)endotheliale Expression.

7 Diskussion

7.1 Epidemiologie und Klinik

Vergleichsgrundlagen in der Literatur

Zunächst werden einige klinische Merkmale unseres Patientenguts diskutiert, bevor auf die spezifische Antigenexpression näher eingegangen wird. Zu Vergleichen hinzugezogen wurden die Veröffentlichungen von Fults et al.³⁸, Crawford et al.²⁴, Hofmeister et al.⁵⁹ sowie Ondra et al.¹¹⁴. Die in jenen sowie unserer Studie ermittelten wichtigsten klinischen Daten (Blutung und Epilepsie, Geschlechterverteilung sowie Alter der Patienten) im tabellarischen Überblick :

	<i>Hofmeister et al.⁵⁹</i>	<i>Fults et al.³⁸</i>	<i>Crawford et al.²⁴</i>	<i>Ondra et al.¹¹⁴</i>	<i>Eigene Studie</i>
<i>Blutung</i>	53 %	51,9 %	72 %	71 %	53,5 %
<i>Epilepsie</i>	30 %	27,5 %	18 %	24 %	26,8 %
<i>Frauen</i>	45 %	44,3 %	45 %	40 %	45 %
<i>Alter</i>	31,2 J.	36 J.	?	33,7 J.	40,1 J.
<i>Supratentoriell</i>	?	67,2 %	75,8 %	90 %	89,3 %

Tabelle 5: Klinische Daten der Studien um Vergleich

Klinische Symptomatik

Die Symptomatik zu Beginn der Krankheit lässt sich nur eingeschränkt auf die Beobachtungen anderer Studien übertragen, da in der vorliegenden Dissertation eine klinische, am subjektiven Beschwerdebild des Patienten orientierte Einteilung vorgenommen wurde. Wenn man jedoch annimmt, dass jedem starken und akuten Kopfschmerzereignis eines AVM-Patienten eine stattgehabte Blutung vorausgegangen sein muss, dann ist die Häufigkeit der Blutung als Erstsymptom 53,5 % (absolut: 30 von 56). Jedoch mögen auch Patienten mit rein neurologischen Symptomen ein Blutungsereignis hinter sich haben, z.B. vergleichbar eines cerebralen Insultes, so dass

aufgrund der nicht stattgefundenen Analyse der radiologischen Aufzeichnungen keine eindeutige Zuordnung zum Ereignis „Blutung“ gegeben werden kann. Die Rate in den anderen Untersuchungen schwankt zwischen 51 % bei Fults et al.³⁸ und 72 % bei Crawford et al.²⁴. Letztgenannte Studie unterteilt das Patientenkollektiv in mehrere Gruppen mit mehreren Symptomen, eine strikte Trennung zwischen einer Blutung oder einem Krampfanfall als Erstsymptom findet nicht statt.

Eindeutiger lässt sich ein Vergleich für das Symptom „Krampfanfall“ geben. Exakt 26,8% (15 absolut) der Patienten aus der vorliegenden Studie zeigten diese Symptomatik mindestens einmal während des Krankheitsverlaufs. In den übrigen Studien wird ein prozentualer Anteil von 18%²⁴ bis 30 %⁵⁹ angegeben. Kritisch anzumerken ist wiederum die Einteilung bei Crawford²⁴, dort werden Krampfanfälle mit und ohne Blutungsereignis zwei unterschiedlichen Symptomgruppen zugeteilt, so dass die exakte Quote an Patienten mit einem Krampfanfall nicht zu eruieren ist. Lässt man aus den eben genannten methodischen Gründen die Studie von Crawford außen vor, ergibt sich aus den übrigen Studien eine Wahrscheinlichkeit für einen hirnrorganischen Anfall zwischen 24%¹¹⁴ und 30%⁵⁹, was sich mit den Ergebnissen unserer Studie deckt. Eine Aufschlüsselung des Symptoms „Krampfanfall“ nach Sitz der Läsion fand in der vorliegenden Arbeit nicht statt. Ghossoub et al.⁴⁵, welche die Epilepsierate in ihrer Studie mit 30% bezifferten, zeigten jedoch auf, dass besonders im Temporallappen sitzende AVMen partielle Krampfanfälle hervorrufen, während generalisierte Anfälle eher ihren Ursprung in AVMen im Frontallappen haben. Die Wahrscheinlichkeit, als AVM-Patient einen hirnrorganischen Anfall zu erleiden, scheint jedoch nicht nur mit der Lokalisation der Läsion, sondern auch mit deren Größe und dem Patientengeschlecht zusammenzuhängen⁶⁰. Eine sichere Erklärung für das Auftreten eines hirnrorganischen Anfalls gibt es letztendlich nicht. Verdrängungseffekte und lokales Ödem können eine Rolle spielen oder durch Hämosiderinablagerungen rund um die Läsion entstehen, wie dies auch für Kavernome beschrieben wurde¹⁵⁴.

Über Sehstörungen klagten 16 von 56 der Patienten (28,6 %), jedoch nicht beschränkt auf Patienten mit AVMen im Okzipitallappen. Aus den Akten war leider nicht einwandfrei ersichtlich, ob einzelne Patienten unspezifische Symptome wie Flimmern oder Verschwommensehen beklagten oder umschriebene Gesichtsfeldausfälle. Crawford et al.²⁴ Berichten über Gesichtsfeldausfälle bei 7 von 343 Patienten, eine genauere Aufschlüsselung der Symptomatik findet hier, genau wie bei den anderen

zitierten Studien^{38,59,114}, nicht statt.

Als vierthäufigstes Symptom wurde neben Krampfanfällen auch Schwindel angegeben (15 von 56 Patienten). In den Vergleichsstudien wurden keine vergleichbaren Zahlen angegeben. Die Gründe für Schwindel bei einer AVM könne wiederum Verdrängungseffekte oder, wie schon als Ursache für neurologische Defizite aufgeführt¹⁰⁸, Unterversorgung bestimmter Hirnregionen durch den Shunt in der AVM sein (Steal-Phänomen)

Neurologische Ausfälle

Während drei der vier zuvor zitierten Studien neurologische Ausfälle zusammenfassen²⁴, aufteilen in persistierende und voranschreitende Schädigungen⁵⁹ oder als „andere Symptome“¹¹⁴ bezeichnen, wird bei Fults et al.³⁸ sowie in der vorliegenden Studie der Symptomenkomplex genauer aufgetrennt in unspezifische neurologische Symptome wie Verwirrtheit und Ataxie als auch in spezifischere Schädigungen wie Sprach- und Hörstörungen oder Parästhesien. Am Häufigsten sind neurologische Symptome, die nicht notwendigerweise kausal mit einem akuten Blutungsereignis zusammen hängen (Verwirrtheit, Ataxie und pathologische Reflexe). Vergleichbare Daten sind bei keiner der Vergleichsstudien zu finden. Fults et al.³⁸ geben für Parästhesien eine Wahrscheinlichkeit von 2,3 % an, von den Patienten unserer Studie klagten 3 von 56 (5,4 %) über Missempfindungen und Kribbelgefühle. Crawford et al.²⁴ geben die Häufigkeit neurologischer Ausfälle mit 7% an, statistische Schwierigkeiten ergeben sich jedoch dadurch, da in jener Studie sämtliche Patienten, die neben neurologischen Ausfällen auch Krampfanfälle und Blutungen hatten, einer anderen Gruppe zugeordnet und nicht näher aufgeschlüsselt wurden.

Nervenheilkundliche Beschwerden können sich bei einer AVM auf vielen Wegen ergeben. Zunächst spielt die massenhafte Zerstörung von Nervenzellen nach einer Massenblutung aus der AVM eine große Rolle. Als weitere Gründe denkbar sind persistierende Mikroblutungen wie bei Kavernomen¹²², die zu Hämosiderinablagerungen und disseminierten Zelluntergängen der Neuronen rund um die Läsion führen^{129,154}. Auch ischämischer Untergang von benachbarten Nervenfasern durch Steal-Effekt¹⁰⁸ oder Irritationen durch Entzündungsvorgänge⁴⁴ in und rund um die AVM, auch nach erfolgter Embolisation, mögen auch eine prolongierte¹⁰⁸ Symptomatik hervorrufen.

Altersverteilung

Das Durchschnittsalter unserer Patienten (40,1 Jahre) ist höher als das in anderen Studien ermittelte (zwischen 31,2 Jahren⁵⁹ und 36 Jahren³⁸), jedoch ist zu berücksichtigen, dass in den Vergleichsstudien das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung angegeben wurde, während in unserer Studie das Alter zum Zeitpunkt der Operation berücksichtigt wurde. Dies erklärt den Altersunterschied, da aus verschiedenen Gründen zwischen Diagnosestellung und (operativer) Therapie oftmals mehrere Monate oder Jahre vergehen. Eine Möglichkeit ist, dass initial keine Notwendigkeit einer operativen Intervention gesehen wurde, z.B. aufgrund der perioperativen Morbidität⁵³ und Mortalität¹⁵, oder der Patient lehnte zunächst die Operation ab. Zu den möglichen Ursachen zählen auch Verzögerungen, weil die Diagnostik (Bildgebung³⁰, Angiographie²⁰) sowie Vorbehandlung (Embolisation^{44,66,85}, Bestrahlungen⁸⁷) noch nicht abgeschlossen waren oder Komplikationen mit sich brachten⁹⁷, andere Eingriffe vordringlicher erschienen oder der Patient aus anderen, z.B. internistischen Gründen, nicht operationsfähig war.

Neben dem Durchschnittsalter sollte auch die Altersverteilung betrachtet werden, diese repräsentiert das Alter des Patientenkollektivs besser und gibt Hinweise auf eventuell unterschiedliche Ätiologie der Läsionen. Die meisten Patienten, nämlich 37 von 56 (66,1 %) wurden zwischen 30 und 60 Jahren operiert, nur 7 von 56 (12,5 %) aller Patienten waren jünger als 20 Jahre und sind als pädiatrische Fälle zu werten. Crawford et al.²⁴ geben an, über 50% ihrer Patienten sein zum Diagnosezeitpunkt jünger als 30 Jahre – in der vorliegenden Studie trifft das nur auf 14 von 56 (25 %) aller Patienten zu, jedoch lassen sich die Altersangaben aus den o.a. Gründen nicht vergleichen. Nach Lehrbuchmeinung^{129,154} sind AVMen ausschließlich angeboren und die Entstehung somit in der Embryonalzeit angesiedelt¹⁰⁷, jedoch ist das Manifestationsalter je nach Patient sehr unterschiedlich. Die Gründe für diesen Sachverhalt sind vielfältig – intraindividuelle Faktoren wie langsames Wachstum^{26,142} der Läsion, klinisch stumme Varianten, Beschwerdefreiheit oder Verleugnung von Beschwerden, ungenaues Beschreiben der Symptomatik besonders bei Kindern und Jugendlichen^{28,78}. Eine weitere Möglichkeit ist, dass ein Teil der Malformationen nicht angeboren ist, sondern im Kindes- oder Erwachsenenalter¹⁴ „de novo“ entstehen oder mehrfach auftauchen¹³¹. Auf der anderen Seite kann sich die Zeitspanne zwischen Beginn der Beschwerden und richtiger Diagnose verzögern wegen ungenügender Bildgebung³⁰, Verharmlosung der

Beschwerden oder das Nichterkennen der Krankheit durch die oftmals unspezifischen Befunde. Obwohl in der vorliegenden Studie kein derartiger Fall gesehen wurde, sind diagnostische Probleme denkbar bei den so genannten „okkulten“^{18,39,86,121} vaskulären Malformationen, die oft thrombosiert sind³¹ und sich einer differenzierten Bildgebung via Angiographie entziehen..

Geschlechterverteilung

Das Geschlechterverhältnis in der vorliegenden Studie entspricht den bisherigen Beobachtungen: weniger als die Hälfte, nämlich 25 von 56 (45 %) der behandelten Patienten waren weiblich, in der Vergleichsliteratur werden hier Zahlen von 40 %¹¹⁴ bis 45 %^{24,59} angegeben. Eine anerkannte Begründung für die Dominanz des männlichen Geschlechtes gibt es nicht. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt wäre ein protektiver Effekt weiblicher Hormone auf die Wandstabilität der Läsion oder Entzündungsvorgänge innerhalb der AVM, ähnlich den Beobachtungen bei AVM-Radiotherapie von Bhatnagar et al.⁹. Die Studie von Crawford et al.²⁴ ergab einen besonders hohen Anteil betroffener Frauen in der Schwangerschaft, das Blutungsrisiko sei während dieser Zeit erhöht. Die Arbeit von Fults et al.³⁸ ergab ein umgekehrtes Ergebnis – keine Patientin war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schwanger.

Topographie

Betrachtet man die topographische Verteilung der Läsionen, so fällt auf, dass die meisten AVMen (50 von 56 = 89,3%) supratentoriell liegen, also in einem der Lappen des Großhirns. Hauptsächlich waren die Läsionen im Parietal-, Temporal- und Okzipitalappen gelegen, eine eindeutige Korrelation zwischen Sitz der Läsion und klinischer Symptomatik ergab sich nicht. Der Anteil von supratentoriell gelegenen Läsionen betrug in den anderen Studien zwischen 67,2 %³⁸ und 90 %¹¹⁴, ein direkter Vergleich fällt jedoch schwer, da die Autoren teilweise zusätzlich zwischen oberflächlich und tief gelegenen Läsionen unterscheiden^{38,114} oder bei einem Teil der Patienten der genaue Lokalisation der AVM nicht bekannt²⁴ war.

Präoperative Embolisation

In etwa 60 % der Fälle (34 von 56 Patienten) wurde eine präoperative Embolisation durchgeführt, um den Blutfluss in der Läsion zu verringern^{66,85,97} und somit den chirurgischen Eingriff zu vereinfachen bzw. das Risiko intraoperativer Blutungen zu

verringern. Die Embolisation wird in der Regel mehrfach durchgeführt, um einen möglichst hochgradigen Verschluss zu erreichen¹⁵³. Nicht bei allen Patienten wird eine solche Vorbehandlung durchgeführt – entweder ist die Embolisation nicht im Therapieplan vorgesehen, z.B. aus anatomisch-technischen Gründen, weil die Operation unaufschiebbar ist, nach ärztlicher Erfahrung andere Behandlungsmethoden, z.B. eine präoperative Bestrahlung^{87,90}, größere Heilungsaussichten und (aufgrund des Patientenalters oder Sitz der Läsion^{129,154}) eine geringere Morbidität und Mortalität¹⁵ aufweisen. In den übrigen Studien^{24,38,59,114} waren keine vergleichbaren Daten zur präoperativen Embolisationstherapie zu finden.

Zeitlicher Abstand zur Operation

Der operative Eingriff erfolgt nicht sofort im Anschluss an die Embolisation, sondern in einem variablen zeitlichen Abstand, welcher in der vorliegenden Studie zwischen einer Stunde (Notfalloperation) und 9 Monaten betrug. Akute Eingriffe direkt im Anschluss an eine Embolisationsbehandlung sind notwendig, wenn eine Hirnmassenblutung oder ein Verschluss von anderen Gefäßen durch einen falsch liegenden Katheter eingetreten sind (Embolisatverschleppung^{54,97}). Auch bei komplikationsloser Vorbehandlung lautet das Ziel, den operativen Eingriff möglichst bald nach der Embolisation durchzuführen. Verzögerungen treten auf, wenn der Patient persönliche Gründe hat, den Eingriff nicht durchführen zu lassen oder weil aus anderen medizinischen Gründen eine Operabilität nicht gegeben ist und die perioperative Mortalität¹⁵ zu hoch erscheint.

7.2 Immunhistochemie

Umfang unserer Studie im Vergleich

In der jüngeren Vergangenheit wurden immunhistochemische Studien an AVMen durchgeführt. Marker waren Gefäßwachstums- und Differenzierungsfaktoren. In der nachfolgenden Tabelle ein Vergleich zwischen den untersuchten Antigenen in unserer und den entsprechenden Vergleichsstudien:

Rothbart et al. ¹²⁸	Uranishi et al. ¹⁴⁸	Hashimoto et al. ⁵⁸	Hashimoto et al. ⁵⁶	Kilic et al. ⁷³	Matsubara et al. ⁹⁸	Koizumi et al. ⁷⁵	Sure et al. ¹⁴⁵	Unsere Studie
VEGF bFGF Laminin Fibronectin Collagen-Typ 4 SMA	FLK-1 Flt-1 Tie-1 Tie-2	MIB-1 (Ki-67)	FLK-1 Tie-2	VEGF bFGF TGF-α Fibronectin Laminin SMA Collagen	Endoglin	VEGF FLK-1 Flt-1 Flt-4	PCNA MIB-1 FLK-1 VEGF	PCNA MIB-1 FLK-1 VEGF Endoglin HIF-1 α bFGF TGF- α

Tabelle 6: Die untersuchten Antigene der Studien im Vergleich

In unserer Studie fand die bisher umfassendste Analyse von möglichen Angiogenesefaktoren in cerebralen AVMen statt.

PCNA

Die Färbung für PCNA war bei 48 von 56 Präparaten (85,6 %) positiv. Wurde die Läsion zuvor embolisiert, war die relative Zahl der Läsionen, welche eine Positivität für PCNA aufweisen, signifikant höher (97,1 % zu 68,2 %). In der Vorgängerstudie^{144,145}, die jedoch an einer geringeren Anzahl an Patienten (30) durchgeführt wurde, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von PCNA mit oder ohne Embolisation gesehen werden. Die relative Anzahl an PCNA-positiven Präparaten ist mir der vorliegenden Arbeit vergleichbar (85,6 % zu 87 %). Bei den Kontrollpräparaten war nur das Exemplar mit der postmortal gefundenen AVM PCNA-positiv. Die Rolle von PCNA als Marker sowohl für Proliferation als auch für die Gewebsdifferenzierung und Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten wurde bereits an cerebralen Neoplasien (Astrozytome, Glioblastome) gezeigt⁷⁴. Auch in normalem Gewebe gilt vermehrte Expression von PCNA als Zeichen verstärkter Proliferation⁵⁰. In der

vorliegenden Studie zeigt sich, dass ein Großteil der AVMen PCNA-positiv ist, folglich die meisten Malformationen nicht statisch sind, sondern aktiv proliferieren. Eine präoperative Embolisationsbehandlung scheint die Proliferationsrate zu erhöhen, wie schon Hashimoto⁵⁸ vermutete.

MIB-1

Das Protein MIB-1 wurde seltener exprimiert: nur in 24 der 56 Fälle (42,9 %) wurde eine Anfärbung registriert, sämtliche Kontrollpräparate waren negativ. Auch fand sich eine niedrigere MIB-1-Positivität bei Patienten, die sich eine Embolisationstherapie unterworfen hatten (41,2 % zu 45,5 %). In der Vorgängerstudie waren nur 20 % aller Präparate MIB-1-positiv, dort war jedoch die Fallzahl bedeutend kleiner (30 statt wie in dieser Studie 56 Fälle). In der Gruppe der Kontrollpräparate waren alle Präparate in der MIB-1-Färbung negativ. Die Arbeit von Hashimoto et al.⁵⁸ erbrachte ähnliche Ergebnisse, dort war die Quote der Ki-67-positiven Zellen etwa sieben Mal höher als in den Kontrollpräparaten. Diese Ergebnisse lassen sich mit denen unserer Studie jedoch aus methodischen Gründen nicht vergleichen: Hashimotos Gruppe zählte alle Endothelzellen (maschinell) einzeln aus und erstellte einen Ki-67-Index, während wir einen anderen Ansatz wählten und die Präparate nur auf das absolute Vorhandensein positiver Zellen durchsuchten.

Eigentlich ist ein zu der PCNA-Färbung analoges Ergebnis zu erwarten, da in normalem Gewebe die Expression von PCNA und MIB-1 korrelieren⁵⁰. Laborchemische Gründe können für diesen Widerspruch verantwortlich sein, denn die Halbwertszeit des MIB-1-Proteins beträgt nur 1 h. Zeitverzögerungen bei der Operation, der Präparatentnahme und Präparatkonservierung können das Protein zerstören und somit dem Nachweis in der Immunhistochemie entziehen. Weiterhin ist anzumerken, dass MIB-1, im Gegensatz zu PCNA, nur in den aktiven Phasen des Zellzyklus nachzuweisen ist, nicht jedoch in der G₀-Phase⁴³. Somit lässt sich Hashimotos Vermutung, eine Embolisationsbehandlung würde sich in einer gesteigerten Proliferationsrate niederschlagen, durch unsere Ergebnisse in der PCNA-Färbung, nicht jedoch durch jene der MIB-1-Färbung bekräftigen.

FLK-1

Das Protein FLK-1, einer der beiden Rezeptoren für VEGF¹⁰⁴, findet sich bei 45 der 56 Endothelzellen (80,4 %), dabei wiederum deutlich öfters bei jenen, denen eine

Vorbehandlung durch Embolisation vorangegangen war (88,2 % vs. 68,2 %). In der Vorgängerstudie^{144,145} wurden ähnliche Ergebnisse gefunden – insgesamt war bei 80 % aller Präparate die Flk-1-Färbung positiv, häufiger bei jenen, die präoperativ embolisiert wurden (86 %) als bei denen ohne Vorbehandlung (75 %). Bei den Kontrollpräparaten war wiederum, wie bei PCNA, nur das Präparat mit der AVM FLK-1-positiv. Die Beobachtung, dass die Expression des VEGF-Rezeptors bei AVMen deutlich erhöht ist, deckt sich nicht mit den Ergebnissen der Studie von Koizumi et al.⁷⁵: nur 19,4 % ihrer Präparate exprimierten FLK-1, jedoch wird nicht erwähnt, ob vor der Excision der Präparate eine Embolisation durchgeführt wurde, weiterhin ist die Fallzahl der Koizumi-Studie mit 31 Patienten geringer. Die Ergebnisse der Färbungen für den anderen VEGF-Rezeptor, Flt-1, sind eher mit der vorliegenden Arbeit vereinbar, 61,3 % der Präparate waren Flt-1 positiv. Auch zwei weitere Vergleichsstudien ergeben kein einheitliches Bild – während die Arbeit von Uranishi et al.¹⁴⁸ eine erhöhte Expression von VEGF-Rezeptoren in AVMen und Kavernomen fand, berichten Hashimoto et al.⁵⁷ sogar von einer verringerten Nachweisbarkeit von Flk-1 in Arteriovenösen Malformationen. In der Zusammenschau der Befunde aus unserer sowie der Vergleichsstudien lässt sich keine eindeutige Rolle von Flk-1 in AVMen beschreiben.

VEGF

Eine Anfärbbarkeit für VEGF findet sich in unserer Studie in 24 von 56 Fällen (42,9 %), weiterhin findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und nicht vorbehandelten Angiomen: zwar zeigen nur 18,2 % der konservativ behandelten AVMen eine positive Anfärbung für VEGF, nach Embolisation jedoch 61,8 %. Die Vorgängerstudie^{144,145} fand ähnliche Ergebnisse : 77% der embolisierten AVMen exprimierten VEGF, jedoch nur 25 % der nicht vorbehandelten Angiome. Die Kontrollpräparate waren sämtlich negativ. Kilic et al.⁷³ untersuchte die VEGF-Expression an 34 AVM-Präparaten, von denen 30 VEGF exprimierten (88,2 %). Im Gegensatz zu unserer Studie wurden AVMen, die präoperativ embolisiert wurden, ausgeschlossen, und die Auswertung der Färbung bezog sich auf alle Gewebsschichten des Gefäßes, während sich die vorliegende Arbeit auf die VEGF-Färbung der Gefäßendothelzellen konzentrierte. Rothbart et al.¹²⁸ untersuchten die VEGF-Expression an 7 AVM-Präparaten, welche sämtlich VEGF-positiv waren, ohne Unterschiede in der Färbeintensität für embolisierte und unbehandelte AVMen. Bekanntermaßen ist VEGF ein Angiogenesefaktor^{13,33}, der als Mitogen und

Differenzierungsreiz^{29,115} für Gefäßendothelzellen während der (Neo-)Angiogenese wirkt und in proliferativen Geweben und Neoplasien, auch des ZNS^{6,117,155}, vermehrt exprimiert wird. Zu anderen Wachstumsfaktoren bestehen Verbindungen, so z.B. zu Proteinkinase C¹⁵⁹, bFGF⁹⁴, TGF- α ⁴⁶ und HIF-1 α ^{35,67}. Die Dichte von VEGF-Rezeptoren scheint bei AVMen deutlich erhöht¹⁴⁸, genauso die Expression von VEGF selbst^{73,128,144,145} durch die Endothelzellen der Malformation und durch Astrozyten¹³⁹. Wie schon in der Vorgängerstudie^{144,145} beschrieben, ist die VEGF-Expression nach Embolisation signifikant vermehrt. Eine Erklärung besteht darin, dass durch die Vorbehandlung der Embolisation neben einer lokalen Entzündung auch eine Hypoxie entsteht, die bekanntermaßen^{64,67,96,105,135} die Expression von VEGF, wohl in Verbindung mit HIF-1 α ^{35,67}, erhöht und somit zur Angioproliferation führt. Ein weiterer Grund für die vermehrte VEGF-Expression in AVMen mögen die vermehrten Scherkräfte sowie der erhöhte Blutfluss durch den funktionellen Shunt der Läsion sein, da die Synthese von VEGF, bei Scherkräften via bFGF⁹², bei hohen Blutflüssen gesteigert ist⁹³. VEGF scheint durch seine multiplen Verbindungen^{35,46,67,94,156} zu anderen Faktoren der Angiogenese und Gewebsdifferenzierung eine zentrale Rolle in diesem Algorithmus zu spielen.

HIF-1 α

Ein weiteres durch Hypoxie induzierbares^{67,96,152,160} Protein, HIF-1 α , zeigt ein ähnliches Färbeverhalten. In 47 der 56 Angiome (89,3 %) ist es in den Endothelien nachweisbar, was schon einen Hinweis auf die übergeordnete Bedeutung dieses Proteins für eine AVM gibt. Zwar gibt es Hinweise, dass eine AVM als funktioneller Shunt im Sinne eines „arterial steal“¹⁰⁸ zu einer relativen Hypoxie des umgebenden Gewebes mit konsekutiven neurologischen Ausfällen führt, jedoch scheint eine Embolisation mit der nachfolgenden Verminderung des Blutflusses in der AVM zu einer erhöhten Hypoxie zu führen: mit Embolisation vorbehandelte AVMen zeigten in 97,1 % der Fälle eine Anfärbbarkeit für HIF-1 α , was nur bei 63,6 % der Präparate ohne endovaskuläre Vorbehandlung der Fall war. Der Grund für eine vermehrte Hif-1 α -Expression mag sein, dass wegen der Hypoxie das Gewebe versucht, über Hif-1 α die Sauerstoffhomöostase¹³³ wieder herzustellen. Es ist anzunehmen, dass dies u.a. über eine HIF-1 α -vermittelte^{35,67,96} Hochregulierung der VEGF-Expression mit nachfolgender Neoangiogenese geschieht. Die Tatsache, dass HIF-1 α auch in den Gefäßwänden von Malformationen exprimiert wird, die keiner Embolisation zugeführt

wurden, weist vielleicht auf eine übergeordnete Rolle dieses Proteins hin, die bisher noch nicht erkannt ist.

bFGF

Die Expression von bFGF wurde in allen fünf Schichten der Gefäße untersucht. Vorwiegend wurde bFGF von Zellen der Endothelzellschicht, des Subendothels sowie im perivaskulären Gewebe synthetisiert. Im Endothel fand sich eine positive Reaktion in 39 von 56 (69,6 %) Fällen, im Subendothel bei 21 von 56 (37,5 %) und im umgebenden Gewebe in 41 von 56 (73,2 %). Bis auf die Muscularis exprimierten alle Schichten tendenziell mehr bFGF nach Embolisation, ein statistisch signifikanter Unterschied besteht nur für das Gefäß umgebende Gewebe. Bei den Kontrollpräparaten war keine Expression von bFGF zu finden. Die Studie von Rothbart et al.¹²⁸ untersuchte die bFGF-Expression an sieben AVMen, von denen vier eine Anfärbarkeit für bFGF zeigten, vorwiegend in der Muscularis. Unterschiede in der Anfärbarkeit durch vorangegangene Embolisation oder Blutung wurden nicht angegeben. Die Arbeitsgruppe um Kilic⁷³ führten die bFGF-Färbung an insgesamt 34 AVMen durch, von denen 25 (73,5 %) eine Positivität zeigten, vorwiegend im perivaskulären Gewebe. Expression von bFGF durch Endothelzellen wurden für Kavernome beschrieben. Bereits embolisierte AVMen wurden aus der Studie ausgeschlossen, weshalb die Daten aus der Kilic-Studie⁷³, genau wie jene aus der Arbeit von Rothbart et al.¹²⁸ wegen der geringen Fallzahl, nicht exakt mit unseren Daten vergleichbar sind.

Für bFGF wurde herausgefunden, dass es als angiogenetischer Faktor wirkt¹¹¹, auch und besonders nach Ischämie⁸⁸ und Hypoxie¹⁴³, wohl indem es VEGF-vermittelte Angiogenese reguliert^{94,143}. Bei der Formung neuer Gefäße scheint bFGF die Migration von Endothelien zu beeinflussen¹⁰⁹. Auch durch Scherkräfte an Gefäßen, wie er durch den hohen Blutfluss in der AVM möglich ist, soll bFGF vermehrt exprimiert werden⁹². Bei den von uns untersuchten Präparaten war die Expression von bFGF hauptsächlich auf das Endothel sowie das gefäßumgebende Gewebe beschränkt (wie schon von anderen Gruppen beobachtet⁷³), was sowohl bei vorbehandelten als auch bei nicht-embolisierten Läsionen zu beobachten war. Zumindest ist anzunehmen, dass bFGF, wohl im Zusammenspiel mit weiteren Angiogenese-Faktoren, in der Dynamik der AVMen eine Rolle spielt. Dass die Expression von bFGF nach vorangegangener Embolisation gesteigert wird, ist ein weiterer Hinweis für den in der Vorgängerstudie^{144,145} geäußerten

Verdacht, dass eine derartige endovaskuläre Vorbehandlung einen massiven angiogenetischen Reiz darstellt. Als Folge davon könnte eine vermehrte bFGF-Synthese zur Steigerung der VEGF-Expression beitragen^{94,143} und bei der Auswanderung und Sprossung neuer Endothelzellen¹⁰⁹ (Neo-Angiogenese) beteiligt sein. An diesem Vorgang scheinen nicht nur die Zellen der Gefäße selbst, sondern auch, eventuell über parakrine Sekretion und Wirkung, das Binde- und Nervengewebe um die fehlgebildeten Gefäße herum beteiligt zu sein.

TGF- α

TGF- α , über dessen Potential zum Anstoß von Angiogenese, ebenfalls in Verbindung mit VEGF⁴⁶, bereits berichtet wurde¹³⁷, besitzt ein etwas anderes Verteilungsmuster. Zwar findet sich auch hier bei einer großen Anzahl der Läsion eine Expression von TGF- α im perivaskulären Gewebe (41 von 56 positiv), jedoch ist neben dem Endothel (30 von 56) vorwiegend das Subendothel (37 von 56) immunoreaktiv. In allen drei genannten Schichten war die Expression nach Embolisation signifikant gesteigert. Die Kontrollpräparate zeigten keine Anfärbbarkeit für TGF- α . Ähnliche Ergebnisse ergab die Studie von Kilic et al.⁷³, die 34 AVM untersuchten. Nach deren Daten wird TGF- α ebenfalls vorwiegend im Endothel und im perivaskulären Gewebe exprimiert, in der Hälfte der Fälle zeigte auch das zwischen den Gefäßschlingen liegende neurale Gewebe eine positive Reaktion. Ähnlich wie bei bFGF ist anzunehmen, dass TGF- α eine Rolle in der Pathophysiologie einer AVM spielt und als angiogenetischer Faktor¹³⁷ im Verbund mit VEGF⁴⁶ wirkt, auch hier scheint nicht nur das Gefäß selbst, sondern auch das umgebende Binde- und Nervengewebe beteiligt. Eine Embolisationsbehandlung steigert die Expression von TGF- α , ist also auch nach den Ergebnissen dieser Färbung als neoangiogenetischer Reiz zu sehen.

Endoglin

Endoglin-Expression war positiv in 54 der 56 untersuchten Präparate (96,4 %), während nur 8 der 14 Kontrollen (57,1 %) eine positive Reaktion bei der Endoglinfärbung zeigten. Matsubara et al.⁹⁸ untersuchte die Endoglin-Expression an 20 AVMen und stellte zwar eine absolut erhöhte Anzahl an Endoglin-positiven Zellen in AVM fest, jedoch keinen Unterschied in der Dichte der positiven Zellen im Vergleich zu normalem Hirngewebe. Aufgrund der vermehrten Expression dieses Proteins durch Fibroblasten im Stroma der Läsion postulierte er eine Rolle von Endoglin im Gefäßumbau als

Antwort auf Scherkräfte und vermehrten Blutfluß.

Nach den Daten unserer Studie steht eine vermehrte Endoglynsynthese durchaus in Zusammenhang mit einer AVM. Endoglin ist ein anerkannter Co-Faktor der Angio- und Vasculogenese^{4,69,123}. Ein Mangel an Endoglin führt im Tierversuch zum Tod durch mangelhafte Gefäßausbildung⁸³, während bei Tumoren gezeigt wurde, dass eine gesteigerte Neoangiogenese mit einer Überproduktion von Endoglin einhergeht¹⁰. Unsere Daten legen nahe, dass die meisten AVMen keine statischen Läsionen sind, sondern permanent, wenn auch langsam, angiogenetisch aktiv sind, wohl auch durch eine vermehrte Expression von Endoglin. Ob die erhöhte Synthese eine Eigenschaft der AVM an sich ist oder eine reaktive Anpassung, ist unklar. Eine weitere Erklärung geben die Beobachtungen, dass Endoglin in arteriosklerotischen Plaques vermehrt exprimiert wird²¹, wofür die Verletzung der Gefäßwand verantwortlich gemacht wird. Ähnliche Ergebnisse zeigten Ma et al.⁸⁹ auf, die erhöhte Endoglin-Expression in durch Ballondilatation verletzten Gefäßen nachwies. Bekanntermaßen ist auch bei AVMen die Integrität der Gefäßwände verletzt¹⁵⁶, auch Scherkräfte^{92,128} im funktionellen Shunt der Läsion könnten eine vermehrte Endoglynsynthese initiieren.

7.3 Präoperative Embolisation

Probleme der präoperativen Embolisation

Eine Embolisation zur Vorbehandlung vor der Operation hat den Zweck, den Blutfluss durch die AVM signifikant und relevant zu verringern^{129,154}. Da ein unvollständiger Verschluss der Läsion mit einem schlechteren klinischen Verlauf einher geht¹⁵³, wird versucht, möglichst das gesamte Angiom zu verkleben, was aus mehreren technischen Gründen kaum möglich ist. Ein Grund für eine unvollständige Embolisation kann sein, dass der Katheter nicht selektiv in die feinen zuführenden Gefäße (Feeder) eingeführt werden kann – iatrogene Embolien von regulär versorgtem und funktionell wichtigem Hirngewebe wären zu befürchten. Neurologische Schäden sind durch die Vorbehandlung sind bei etwa jedem siebten Patienten zu erwarten (Hartmann et al.⁵⁴), mit steigender Häufigkeit bei höherem Patientenalter und mehrmaligen Embolisationen. Selbst bei erfolgreicher Sondierung des Feedergefäßes füllt das ausgehärtete Embolisatmaterial oft das Gefäßlumen nicht komplett aus, was nach einer Studie von

Wikholm et al.¹⁵³ den klinischen Verlauf verschlechtert. In unserer Studie traten bei 4 von 34 Embolisationen (11,8 %) Komplikationen auf, so dass innerhalb von 24 Stunden der operative Eingriff nötig wurde. Nach den Beobachtungen von Sorimachi et al.¹⁴⁰ ist ein vollständiger Verschluss des Angioms nur in einem kleinen Teil der Patienten möglich, bereits embolisierte Angiome können weiter wachsen und rekanalisiert werden.

Zellschädigung durch Embolisat

Neben der gewollten Verklebung der malformierten Gefäße führt eine Embolisation auch zu vielen sekundären, unerwünschten Effekten, im Einzelnen sind dies die auch elektronenmikroskopisch sichtbare Zerstörung und Ablation von Endothelzellen mit Verletzung der Gefäßintegrität¹⁵⁶ sowie ausgeprägte Entzündungsreaktionen⁴⁴: intraluminal finden sich schon nach sehr kurzer Zeit mononukleäre Abwehrzellen, je länger der Abstand zwischen Embolisation und OP, desto häufiger ist auch das Auftreten von Riesenzellen. Bereits 3 Tage nach der Embolisation findet sich auch in der Gefäßwand eine ausgeprägte Entzündungsreaktion, teilweise mit örtlicher Gefäßnekrose, besonders in direkter Umgebung der eingeschleppten Partikel des Embolisats. Dies mag ein Reiz für das nach Embolisation beobachtete Wachstum¹⁴⁰ von AVMen sein – Zerstörung von Endothelzellen führt zur vermehrten Synthese von Endoglin^{21,89} und somit zur weiteren (Neo-)Angiogenese.

Angiogenese nach Embolisation

Wie schon in der Vorgängerstudie^{144,145} vermutet, scheint eine vorausgehende Embolisation einen starken angiogenetischen Reiz darzustellen, Wachstum von AVM nach endovaskulärer Vorbehandlung wurde bereits angiographisch nachgewiesen¹⁴⁰. Die vorliegende Arbeit bietet als Erklärung für diesen Sachverhalt mehrere Ansätze. Die Embolisation führt durch den eintretenden Gefäßverschluss zu einer akuten lokalen Hypoxie^{144,145} in der AVM. Um das Sauerstoffdefizit auszugleichen¹³³, werden HIF-1 α und Gefäßwachstumsfaktoren, vor allem VEGF^{35,64,67,96,135}, sowie dessen Rezeptoren¹⁰⁴ vermehrt exprimiert. Dies geschieht nicht nur durch die Endothelzellen selber, sondern auch im umliegenden Binde- und Nervengewebe^{73,139}. Das Embolisatmaterial führt zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion⁴⁴, die eine vermehrte Angiogenese bewirkt^{23,65}. Durch das eingeschwemmte Material werden Endothelzellen und Gefäßwände verletzt¹⁵⁶, was ebenfalls zur Expression von Angiogenesefaktoren führt^{21,89}. Einen

weiteren angiogenetischen Trigger mag nach Lawton et al.⁸² der durch die Embolisation entstandene plötzliche venöse Hochdruck in der Läsion sein. Denkbar ist auch eine vermehrte Sekretion von bFGF⁹² und VEGF⁹³ nach Embolisation durch veränderte Flussverhältnisse und Scherkräfte.

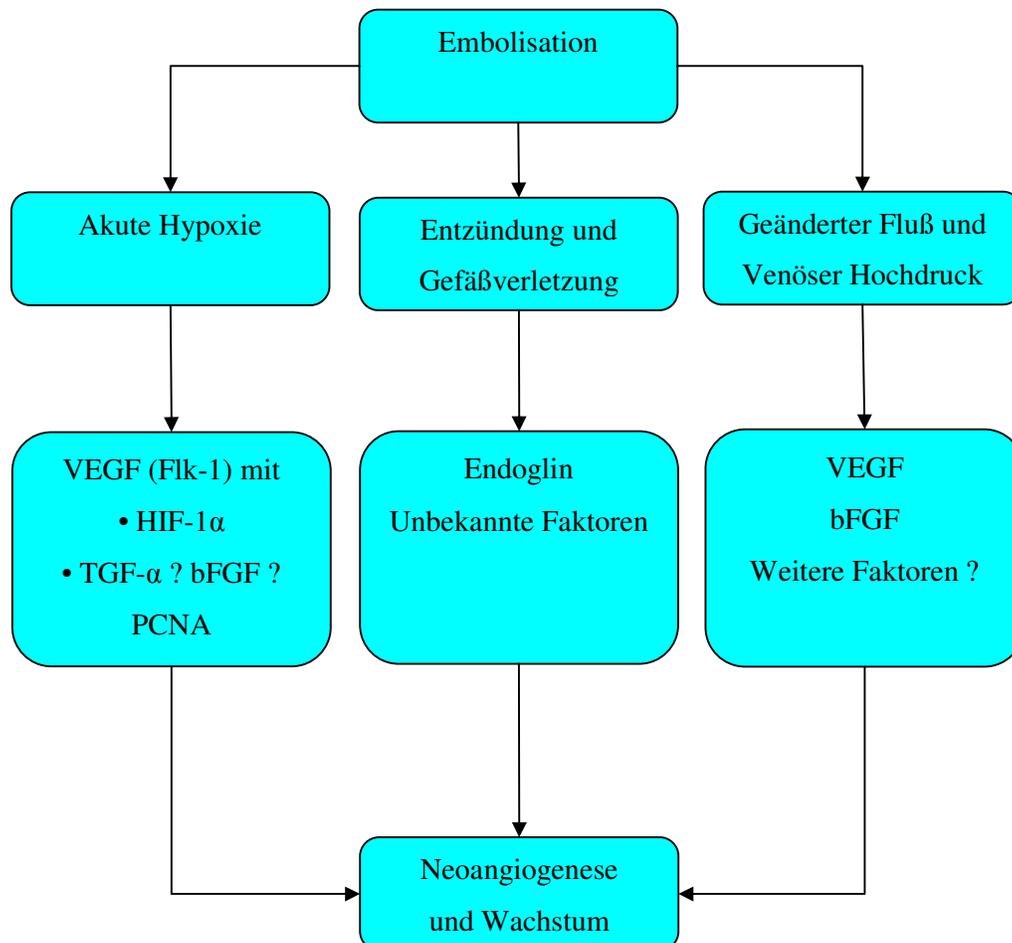


Abbildung 23: Mögliche Auswirkungen der Embolisation auf die Dynamik der AVM

Neue Wege in der Embolisation

Wie bereits geschrieben, bestehen die Hauptprobleme der Embolisation in der Gefahr von neurologischen Ausfällen⁵⁴, der Schwierigkeit des vollständigen Verschlusses (was aber wünschenswert wäre¹⁴⁰), der daraus folgenden Gefäßverletzung¹⁵⁶ und Entzündung⁴⁴ sowie durch die mögliche Rekanalisation mit nachfolgendem Wachstum der AVM¹⁴⁰ mit Neoangiogenese¹⁴⁵, weshalb sie nicht ohne Reflektion als Standardbehandlung durchgeführt werden sollte⁹⁷.

Neue Embolisatmaterialien wie ONYX zeigen nach einer ersten Studie von Jahan et al.⁶⁶ vielfältige Vorteile: als nicht-adhäsives Embolisatmaterial ist die technische Handhabung einfacher und ein vollständiger Verschluss der Läsion leicht zu erreichen. Nebenwirkungen und neurologische Ausfälle treten seltener auf, die verminderte Entzündungsreaktion und die Intaktheit der Gefäßwände lassen auf eine bessere Biokompatibilität schließen. Ähnliche Ergebnisse, ebenfalls mit weniger Nebenwirkungen, einer höheren Okklusionsrate sowie verbesserter Verträglichkeit mit verringerter Entzündung, erbrachte die Arbeit von Liu et al.⁸⁵ mit NBCA als Gefäßkleber. Eine Möglichkeit, die unerwünschte Rekanalisation zu verhindern, scheint die Imprägnierung der Embolisatpartikel mit bFGF zu sein, wie Nishi et al.¹¹⁰ herausfanden.

7.4 Ausblick und Rückschlüsse für die AVM-Therapie

Nach den vorliegenden Daten besitzt eine AVM Wachstumspotential, exprimiert Gefäßwachstums- und Gewebisdifferenzierungsfaktoren in vermehrtem Umfang als normales Hirngewebe. Eine präoperative Embolisation wirkt über verschiedene Mechanismen als angiogenetischer Reiz. Eine übergeordnete Rolle scheint dabei, durch seine Verbindungen zu anderen Wachstumsfaktoren^{35,46,67,94,159}, VEGF zu spielen. Die Studie gibt Hinweise darauf, dass eine nach endovaskulärer Vorbehandlung entstehende Hypoxie¹⁴⁵ eine Kaskade in Gang bringt, die zu weiterem Wachstum der AVM führen kann. Ziel weiterführender Studien sollte es sein, die Verknüpfungen der Angiogenesefaktoren untereinander genauer zu definieren. Neue Einsichten in die Pathophysiologie von AVMen ist durch immunhistochemische Studien mit neuen Antikörpern zu erwarten, wie dies für Tie-2 und Angiopoetin bereits durch die Gruppen von Uranishi et al.¹⁴⁸ sowie Hashimoto et al.^{56,57} geschehen ist.

Nach den Daten der vorliegenden Studie ist zu beachten, dass eine Embolisation meist nicht zum vollständigen Verschluss der Läsion und zu einem Wachstumsstillstand führt. Angesichts des Wachstumspotentials¹⁴⁰ und der vermehrten Expression von Angiogenesefaktoren nach endovaskulärer Vorbehandlung¹⁴⁵ sollte die Indikation für eine Embolisation, auch angesichts der Nebenwirkungen⁵⁴, streng erfolgen⁹⁷. Aufgrund der besseren Handhabung und geringerer Nebenwirkungen sind gegebenenfalls auch neue biokompatible Klebematerialien^{66,85} zu berücksichtigen. Um ein Wachstum der Läsion nach Vorbehandlung zu verhindern, sollte die Operation möglichst zeitnah zur

letzten Vorbehandlung gewählt werden. Ist die Embolisation als alleinige Therapiemaßnahme gedacht, ist ein möglichst vollständiger Verschluss der Läsion anzustreben¹⁵³. Als Therapiealternative sollte immer an die Möglichkeit der Bestrahlung gedacht werden^{87,90,157}.

Die Bedeutung der Angiogenesefaktoren mag in Zukunft auch auf therapeutischer Seite liegen. In Zellkulturen wurde bereits gezeigt, dass Tamoxifen die VEGF-vermittelte Angiogenese unterdrücken kann¹⁰². Cooke et al.²² befürworten einen spezifischeren Weg und schlagen die Verwendung von VEGF-Antikörpern vor, um das Wachstum von soliden Tumoren in vivo zu unterdrücken. Auch durch Verwendung von PKC-Inhibitoren wurde von Yoshiji et al.¹⁵⁹ ein signifikanter Rückgang der VEGF-vermittelten Neovaskularisation beobachtet, mit erhöhter Apoptoserate in der Tumormasse. Die Arbeitsgruppe von Holmgren et al.⁶¹ machten ähnliche Beobachtungen: zwar beeinflusste die blockierte Angiogenese nicht das Wachstum von neuen Tumorzellen, jedoch stieg die Apoptoserate rapide an, und der Tumor verhielt sich klinisch weniger aggressiv. Zu beachten ist, dass es auch eine Studie gibt, die zwischen Gefäßdichte und Wachstum des Tumors keine Korrelation sieht¹⁵⁰.

In abgewandelter Form lassen sich diese Erkenntnisse durchaus auf AVMen übertragen: es erscheint nicht unwahrscheinlich, dass in Zukunft zu den Therapieoptionen der Embolisation, der Bestrahlung und nicht zuletzt des chirurgischen Eingriffes eine weitere Möglichkeit hinzukommt, den klinischen Verlauf und das Wachstum der Läsion mittels genetisch hergestellter Antikörper oder Zytokine zu beeinflussen. Spezifisch auf die Angiogenese innerhalb der AVM wirkende Antikörper, z.B. Anti-VEGF, könnten das Gefäßwachstum im Frühstadium stoppen, die Gefahr einer Blutung vermindern sowie eine chirurgische Resektion vereinfachen. Radioaktiv markierte spezifische Antikörper könnten in Zukunft das Auffinden einer angiographisch okkulten derartigen Läsion deutlich vereinfachen.

8 Zusammenfassung

Arteriovenöse Malformationen werden in der Literatur meistens als angeborene und statische Gefäßmissbildungen beschrieben. Neuere Arbeiten und Erkenntnisse legen jedoch eine dynamische Biologie dieser Malformationen nahe.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Immunhistochemie insgesamt 56 Operationspräparate von AVMen auf verschiedene Angiogenese- bzw. Proliferations-assoziierte Proteine untersucht. Zu den untersuchten Antigenen gehörten PCNA, MIB-1, FLK-1, VEGF, Endoglin, bFGF, TGF- α sowie HIF-1 α .

Eine positive Färbung wurde für PCNA in 48 Fällen (85,7 %) beobachtet, bei MIB-1 in 24 Fällen (42,9 %), bei FLK-1 in 45 Fällen (80,4 %), für VEGF bei 25 Präparaten (44,6 %), bei HIF-1 α in 47 Fällen (83,9 %), für bFGF bei 39 Präparaten (69,6 %) und bei TGF- α in 30 Fällen (53,6 %).

Einen statistisch signifikanten Unterschied in der Anfärbbarkeit der Endothelzellen in Abhängigkeit von einer präoperativen Embolisation konnten wir bei drei Proteinen feststellen. Wurde eine derartige endovaskuläre Vorbehandlung durchgeführt, stieg der Anteil positiver Zellen bei der Färbung für PCNA (94 % zu 71 %), HIF-1 α (94 % zu 67 %) und VEGF (63 % zu 14 %). Statistisch nicht signifikant war der Unterschied bei FLK-1 (89 % zu 67 %).

In der vorliegenden Arbeit wurden bei einem Großteil der AVMs Angiogenese und Endothelzellproliferation nachgewiesen. Diese Entdeckung legt nahe, dass es sich bei AVMen nicht um statische Läsionen handelt. Nach unseren Ergebnissen scheint es, dass eine präoperative Embolisationsbehandlung die Prozesse der Proliferation und des Gefäßwachstums in einer AVM beschleunigt.

Eine zentrale Rolle in diesem Mechanismus scheint die lokale Hypoxie zu spielen, die durch eine inkomplette Embolisation entsteht. Weitere mögliche Faktoren stellen die durch das Embolisat ausgelösten Entzündungsprozesse in der Gefäßwand sowie ein durch den Prozess der Embolisation ausgelöster venöser Hochdruck in der Läsion dar.

9 Literaturverzeichnis

- ¹ Abdulrauf SI, Malik GM, Awad IA : Spontaneous Angiographic obliteration of cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery* 44 : 280 – 8, 1999.
- ² Al-Shahi R, Warlow C : A systematic review of the frequency and prognosis of arteriovenous malformations of the brain in adults. *Brain* 124 : 1900 – 26, 2001.
- ³ Amin-Hanjani S, Robertson R, Arginteanu MS, Scott RM : Familial intracranial arteriovenous malformations. Case report and review of the literature. *Pediatr Neurosurg* 29 : 208 - 13, 1998.
- ⁴ Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG : Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 217 : 42 – 53, 2000.
- ⁵ Baumann R : Mikrowelle im Bereich der Immunhistologie. *MTA Dialog* 10 1 : 546 – 52, 2000.
- ⁶ Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH : Expression of the vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor gene in central nervous systems neoplasms. *J Clin Invest* 91 : 153 – 9, 1993.
- ⁷ Bertalanffy H, Gilsbach JM, Eggert HR, Seeger W : Microsurgery of deep-Seated Cavernous Angiomas: Report of 26 Cases. *Acta Neurochir* 108 : 91 - 9, 1991.
- ⁸ Bertalanffy H, Kuhn G, Scheremet R, Seeger W : Indications for Surgery and Prognosis in Patients with Cerebral Cavernous Angiomas. *Neurol Med Chir* 32 : 659 - 66, 1992.
- ⁹ Bhatnagar A, Flickinger JC, Kondziolka D, Niranjana A, Lunsford LD : An analysis of the effects of smoking and other cardiovascular risk factors on obliteration rates after arteriovenous malformation radiosurgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51 : 969 – 73, 2001.
- ¹⁰ Bodey B, Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE : Over-expression of endoglin (CD 105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization. *Anticancer Res* 18 : 3621 – 8, 1998.
- ¹¹ Boyd MC, Steinbok P, Paty DW : Familial arteriovenous malformations. Report of four cases in one family. *J Neurosurg* 62 : 597 - 9, 1985.
- ¹² Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W : Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114 : 521 – 32, 1992.
- ¹³ Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF : Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor : a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 79 : 233 – 69, 1997.
- ¹⁴ Bulsara KR, Alexander MJ, Villavicencio AT, Graffagnino C : De novo cerebral arteriovenous malformation: Case report. *Neurosurgery* 50 : 1137 - 41, 2002.
- ¹⁵ Castel JP, Kantor G : Postoperative morbidity and mortality after microsurgical exclusion of cerebral arteriovenous malformations – current data and analysis of recent literature. *Neurochirurgie* 47 : 369 – 83, 2001.
- ¹⁶ Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J : Monoclonal antibodies against recombinant parts of the ki-67 Antigen (MIB-1 and MIB-3) detect

- proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *Journal of Pathology* 168 : 357 - 63, 1992.
- ¹⁷ Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M : Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267 : 19027 – 30, 1992.
- ¹⁸ Ciricillo SF, Dillon WP, Fink ME, Edwards MS : Progression of multiple cryptic vascular malformations associated with anomalous venous drainage. Case report.. *J Neurosurg* 81 : 477 - 81, 1994.
- ¹⁹ Clatterbuck RE, Moriarity JL, Elmaci I, Lee RR, Breiter SN, Rigamonti D : Dynamic nature of cavernous malformations: a prospective magnetic resonance imaging study with volumetric analysis. *J Neurosurg* 93 : 981 - 6, 2000.
- ²⁰ Colombo F, Cavedon C, Francescon P, Casentini L, Fornezza U, Castellan L, Causin F, Perini S: Three-dimensional angiography for radiosurgical treatment planning for arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 98 : 536 - 43, 2003.
- ²¹ Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP : Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153 : 323 – 35, 2000.
- ²² Cooke SP, Boxer GM, Lawrence L, Pedley RB, Spencer DI, Begent RH, Chester KA : A strategy for antitumor vascular therapy by targeting the vascular endothelial growth factor: receptor complex. *Cancer Res* 61 : 3653 – 9, 2001.
- ²³ Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D : Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13 : 1382 - 97, 1999.
- ²⁴ Crawford PM, West CR, Chadwick DW, Shaw MD : Arteriovenous malformations of the brain : natural history in unoperated patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49 : 1 - 10, 1986.
- ²⁵ D'Aliberti G, Talamonti G, Versari PP, Todaro C, Bizzozero L, Arena O, Collice M : Comparison of pediatric and adult cerebral arteriovenous malformations. *J Neurosurg Sci* 41 : 331 – 6, 1997.
- ²⁶ Delitala A, Delfini R, Vagnozzi R, Esposito S : Increase in size of cerebral angiomas. Case report. *J Neurosurg* 57 : 556 - 8, 1982.
- ²⁷ Detwiler PW, Porter RW, Zabramski JM, Spetzler RF : De novo formation of a central nervous system cavernous malformation: implications for predicting risk of hemorrhage. Case report and review of the literature. *J Neurosurg* 87 : 629 - 32, 1997.
- ²⁸ Di Rocco C, Tamburrini G, Rollo M : Cerebral arteriovenous malformations in children. *Acta Neurochir* 142 : 145 – 58, 2000.
- ²⁹ Drake CJ, La Rue A, Ferrara N, Little CD : VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. *Dev Biol* 224 : 178 – 88, 2000.
- ³⁰ Ducreux D, Trystam D, Oppenheim C, Godon-Hardy S, Missir O, Meder JF : Diagnostic imaging of brain arteriovenous malformations. *Neurochirurgie* 47 : 190 – 200, 2001.
- ³¹ Ebeling JD, Tranmer BI, Davis KA, Kindt GW, DeMasters BK : Thrombosed Arteriovenous

- Malformations – a type of occult vascular malformation. *Neurosurgery* 23 : 605 – 10, 1988.
- ³² Fernandez-Ruiz E, St-Jacques S, Bellon T, Letarte M, Bernabeu C : Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34 -> qter. *Cytogenet Cell Genet* 64 : 204 – 7, 1993.
- ³³ Ferrara N : Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77 : 527 – 43, 1999.
- ³⁴ Folkman J : How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res* 46 : 467 - 73, 1986.
- ³⁵ Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL : Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16 : 4604 – 13, 1996.
- ³⁶ Freudenstein D, Duffner F, Ernemann U, Rachinger J, Grote E : Recurrence of a cerebral arteriovenous malformation after surgical excision. *Cerebrovasc Dis* 11 : 59 - 64, 2001.
- ³⁷ Friedman J, Pollock B, Nichols D : Development of a cerebral arteriovenous malformation documented in an adult by serial angiography. *J Neurosurg* 93 : 1058 - 61, 2000.
- ³⁸ Fults D, Kelly DL : Natural History of Arteriovenous Malformations of the Brain : A Clinical Study. *Neurosurgery* 15 : 658 - 62, 1984.
- ³⁹ Fuse T, Niwa Y, Umezu M, Yamada K : Growth of occult arteriovenous malformation after cerebral hemorrhage demonstrated by serial magnetic resonance imaging – case report. *Neurol Med Chir* 41 : 83 – 6, 2001.
- ⁴⁰ Gabriel EM, Sampson JH, Wilkins RH : Recurrence of a cerebral arteriovenous malformation after surgical excision: case report. *J Neurosurg* 84 : 879 - 82, 1996.
- ⁴¹ Gangemi M, Longatti P, Maiuri F, Cinalli G, Carteri A : Cerebral Cavernous Angiomas in the First Year of Life. *Neurosurgery* 25 : 465 – 9, 1989.
- ⁴² Gerdes J : Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biology* 1: 199 - 206 , 1990.
- ⁴³ Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H : Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133 : 1710 - 5, 1984.
- ⁴⁴ Germano IM, Davis RL, Wilson CB, Hieshima GB : Histopathological follow-up study of 66 cerebral arteriovenous malformations after therapeutic embolization with polyvinyl alcohol. *J Neurosurg* 76 : 607 – 14, 1992.
- ⁴⁵ Ghossoub M, Nataf F, Merienne L, Devaux B, Turak B, Roux FX : Characteristics of epileptic seizures associated with cerebral arteriovenous malformations. *Neurochirurgie* 47 : 168 – 76, 2001.
- ⁴⁶ Gille J, Swerlick RA, Caughman SW : Transforming growth factor- α -induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J* 16 : 750 – 9, 1997.
- ⁴⁷ Gunel M, Awad IA, Anson J, Lifton RP : Mapping a gene causing cerebral cavernous malformation to 7q11.2-q21. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 6620 - 4, 1995.
- ⁴⁸ Gunel M, Awad IA, Finberg K, Steinberg GK, Craig HD, Cepeda O, Nelson-Williams C, Lifton

- RP : Genetic Heterogeneity of Inherited Cerebral Cavernous Malformation. *Neurosurgery* 38 : 1265 - 71, 1996.
- ⁴⁹ Halim AX, Singh V, Johnston SC, Higashida RT, Dowd CF, Halbach VV, Lawton MT, Gress DR, McCulloch CE, Young WL : Characteristics of brain arteriovenous malformations with coexisting aneurysms: a comparison of two referral centers. *Stroke* 33 : 675 – 9, 2002.
- ⁵⁰ Hall PA, Levison DA, Woods AL, YU C, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP : Proliferating cell Nuclear Antigen (PCNA) Immunolocalization in paraffin sections: an Index Of Cell Proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *Journal of Pathology* 162 : 285 - 94, 1990.
- ⁵¹ Hall PA, Woods AL : Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. *Cell Tissue Kinet* 23 : 505 - 22, 1990.
- ⁵² Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y : Evidence for basic fibroblast growth factor as a crucial angiogenic growth factor, released from human trophoblast during early gestation. *Placenta* 19 : 149 – 55, 1998.
- ⁵³ Hartmann A, Stapf C, Hofmeister C, Mohr JP, Sciacca RR, Stein BM, Faulstich A, Mast H : Determinants of neurological outcome after surgery for brain arteriovenous malformations. *Stroke* 31 : 2361 – 4, 2000.
- ⁵⁴ Hartmann A, Pile-Spellman J, Stapf C, Sciacca RR, Faulstich A, Mohr JP, Schumacher HC, Mast H: Risk of endovascular treatment of brain arteriovenous malformations. *Stroke* 33 : 1816-20, 2002.
- ⁵⁵ Hashimoto N : Microsurgery for cerebral arteriovenous malformations : a dissection technique and its theoretical implications. *Neurosurgery* 48 : 1278 – 81, 2001.
- ⁵⁶ Hashimoto T, Emala CW, Joshi S, Mesa-Tejada R, Quick CM, Feng L, Libow A, Marchuk DA, Young WL : Abnormal pattern of tie-2 and vascular endothelial growth factor receptor expression in human cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery* 47 : 910 – 9, 2000.
- ⁵⁷ Hashimoto T, Lam T, Boudreau NJ, Bollen AW, Lawton MT, Young WL: Abnormal balance in the angiopoietin-tie2 system in human brain arteriovenous mal formations. *Circ Res* 89 : 111-3, 2001.
- ⁵⁸ Hashimoto T, Mesa-Tejada R, Quick CM, Bollen AW, Joshi S, Pile-Spellman J, Lawton MT, Young WL : Evidence of increased endothelial cell turnover in brain Arteriovenous malformations. *Neurosurgery* 49 : 124 - 32, 2001.
- ⁵⁹ Hofmeister C, Stapf C, Hartmann A, Sciacca RR, Mansmann U, terBruggge K, Lasjaunias P, Mohr JP, Mast H, Meisel J : Demographic, morphological, and clinical characteristics of 1289 patients with brain arteriovenous malformation. *Stroke* 31 : 1307 – 10, 2000.
- ⁶⁰ Hoh BL, Chapman PH, Loeffler JS, Carter BS, Ogilvy CS: Results of multimodality treatment for 141 patients with brain arteriovenous malformations and seizures: factors associated with seizure incidence and seizure outcomes. *Neurosurgery* 51 : 309 - 11, 2002.
- ⁶¹ Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J : Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1 : 149 – 53, 1995.
- ⁶² Horst Ibelgaut : www.copewithcytokines.de – Cytokines Onle Pathfinder Encyclopedia.

- ⁶³ Husain AM, Mendez M, Friedman AH : Intractable epilepsy following radiosurgery for arteriovenous malformation. *J Neurosurg* 95 : 888 – 92, 2001.
- ⁶⁴ Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W : Hypoxia induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 270 : 19761 - 6, 1995.
- ⁶⁵ Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD : The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 11 : 457 - 65 , 1997.
- ⁶⁶ Jahan R, Murayama Y, Gobin YP, Duckwiler GR, Vinters HV, Vinuela F : Embolization of arteriovenous malformations with onyx: Clinicopathological experience in 23 patients. *Neurosurgery* 48 : 984 – 97, 2001.
- ⁶⁷ Jin KL, Mao XL, Nagayama T, Goldsmith PC, Greenberg DA : Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha by global ischemia in rat brain. *Neuroscience* 99: 577 - 85, 2000.
- ⁶⁸ Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Gutmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME, Marchuk DA : Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic teleangiectasia type 2. *Nat Genet* 13 : 189 – 95, 1996.
- ⁶⁹ Jonker L, Arthur HM : Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech Dev* 110 : 193 – 6, 2002.
- ⁷⁰ Jonsson Z, Hindges R, Hubscher U : Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *EMBO* 17 : 2412 – 25, 1998.
- ⁷¹ Karlsson B, Lax I, Soderman M : Risk for hemorrhage during the 2-year latency period following gamma knife radiosurgery for arteriovenous malformations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49 : 1045 – 51, 2001.
- ⁷² Kenyon BM, Voest EE, Chen CC, Flynn E, Folkman J, D'Amato RJ : A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1625 – 32, 1996.
- ⁷³ Kilic T, Pamir MN, Küllü S, Eren F, Ozek MM, Black PM : Expression of structural proteins and angiogenic factors in cerebrovascular anomalies. *Neurosurgery* 46 : 1179 – 92, 2000.
- ⁷⁴ Kirkegaard LJ, DeRose PB, Yao B, Cohen C : Image Cytometric measurement of nuclear proliferation markers (MIB-1, PCNA) in astrocytomas. Prognostic significance. *Am J Clin Pathol* 109 : 69 – 74, 1998.
- ⁷⁵ Koizumi T, Shirashi T, Hagihara N, Tabuchi K, Hayashi T, Kawano T : Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors in and around intracranial arteriovenous malformations. *Neurosurgery* 50 : 117 – 26, 2002.
- ⁷⁶ Kondziolka D, Humphreys RP, Hoffman HJ, Hendrick EB, Drake JM : Arteriovenous malformations in the brain in children: a forty year experience. *Can J Neurol Sci* 19 : 40 - 5, 1992.
- ⁷⁷ Krapf H, Siekmann R, Freudenstein D, Kuker W, Skalej M : Spontaneous occlusion of a cerebral arteriovenous malformation : angiography and MR imaging follow-up and review of the literature. *Am J Neuroradiol* 22 : 1556 – 60, 2001.

- ⁷⁸ Krayenbühl HA : Angiographic contribution to the problem of enlargement of cerebral arteriovenous malformations. *Acta Neurochir* 36 : 215 - 42, 1977.
- ⁷⁹ Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N : Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 59 : 856 - 61, 1999.
- ⁸⁰ Lanzino G, Fergus A, Jensen ME, Kassell NF : Recurrence of arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 85 : 1196 - 7, 1996.
- ⁸¹ Larson JJ, Ball WS, Bove KE, Crone KR, Tew JM : Formation of intracerebral cavernous malformations after radiation treatment for central nervous system neoplasia in children. *J Neurosurg* 88 : 51 - 6, 1998.
- ⁸² Lawton MT, Jacobowitz R, Spetzler RF : Redefined role of angiogenesis in the pathogenesis of dural arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 87 : 267 - 74, 1997.
- ⁸³ Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP : Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284 : 1534 - 7, 1999.
- ⁸⁴ Lindqvist M, Karlsson B, Guo W, Kihlström L, Lippitz B, Yamamoto M : Angiographic Long-Term Follow-Up Data for Arteriovenous malformations previously proven to be obliterated after gamma knife radiosurgery. *Neurosurgery* 46 : 803 - 10, 2000.
- ⁸⁵ Liu HM, Huang YC, Wang YH : Embolization of cerebral arteriovenous malformations with n-butyl-2-cyanoacrylate. *J Formos Med Assoc* 99 : 906 - 13, 2000.
- ⁸⁶ Lobato RD, Perez C, Rivas JJ, Cordobes F : Clinical, radiological and pathological spectrum of angiographically occult intracranial vascular malformations. Analysis of 21 cases and review of the literature. *J Neurosurg* 68 : 518 - 31, 1988.
- ⁸⁷ Lunsford LD, Kondziolka D, Flickinger JC, Bissonette DJ, Jungreis CA, Maitz AH, Horton JA, Coffey RJ : Stereotactic radiosurgery for arteriovenous malformations of the brain. *J Neurosurg* 75 : 512 - 24, 1991.
- ⁸⁸ Lyons MK, Anderson RE, Meyer FB : Basic fibroblast growth factor promotes in vivo cerebral angiogenesis in chronic forebrain ischemia. *Brain Res* 558 : 315 - 20, 1991.
- ⁸⁹ Ma X, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M, O'Brien E : Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 2546 - 52, 2000.
- ⁹⁰ Maesawa S, Flickinger JC, Kondziolka D, Lunsford LD : Repeated radiosurgery for incompletely obliterated arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 92 : 961 - 70, 2000.
- ⁹¹ Malek AM, Connors S, Robertson RL, Folkman J, Scott RM : Elevation of cerebrospinal fluid levels of basic fibroblast growth factor in moyamoya and central nervous system disorders. *Pediatr Neurosurg* 27 : 182 - 9, 1997.
- ⁹² Malek AM, Gibbons GH, Dzau VJ, Izumo S : Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium. *J Clin Invest* 92 : 2013 - 21, 1993.
- ⁹³ Malek AM, Lee I, Izumo S, Alper S : Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF)

- as a flow-regulated mediator of angiogenesis. *Neurosurgery* 47 : 499 - 500A, 2000 (abstr).
- ⁹⁴ Mandriota SJ, Pepper MS : Vascular endothelial growth factor-induces in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* 110 : 2293 – 302, 1997.
- ⁹⁵ Mansmann U, Meisel J, Brock M, Rodesch G, Alvarez H, Lasjaunias P : Factors associated with intracranial hemorrhage in cases of cerebral arteriovenous malformation. *Neurosurgery* 46 : 272 – 81, 2000.
- ⁹⁶ Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W : Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 156 : 965 – 76, 2000.
- ⁹⁷ Martin NA, Khanna R, Doberstein C, Bentson J : Therapeutic embolization of arteriovenous malformations : the case for and against. *Clin Neurosurg* 46 : 295 – 318, 2000.
- ⁹⁸ Matsubara S, Bourdeau A, terBrugge KG, Wallace C, Letarte M : Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. *Stroke* 31 : 2653 – 60, 2000.
- ⁹⁹ Mazza C, Scienza R, Beltramello A, Da Pian R : Cerebral cavernous malformations (Cavernomas) in the pediatric age-group. *Childs Nerv Syst* 7 : 139 - 46, 1991.
- ¹⁰⁰ Mcallister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CW, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon DC, Murrell J, McCormick MK, Pericak-Vance MA, Heutink P, Oostra BA, Haitjema T, Westerman CJJ, Porteous ME, Guttmacher AE, Letarte M, Marchuk DA : Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic teleangiectasia type 1. *Nat Genet* 8 : 345 – 51, 1994.
- ¹⁰¹ McCormick : The pathology of vascular („arteriovenous“) malformations. *J Neurosurg* 24 : 807 – 16, 1966.
- ¹⁰² McNamara DA, Harmey J, Wang JH, Kay E, Walsh TN, Bouchier-Hayes DJ : Tamoxifen inhibits endothelial cell proliferation and attenuates VEGF-mediated angiogenesis and migration in vivo. *Eur J Surg Oncol* 27 : 714 – 8, 2001.
- ¹⁰³ Meyer B, Stangl AP, Schramm J : Association of venous and true arteriovenous malformation: a rare entity among mixed vascular malformations of the brain. Case report. *J Neurosurg* 83 : 141 - 4, 1995.
- ¹⁰⁴ Millauer B, Witzmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Möller NP, Risau W, Ullrich A : High Affinity VEGF binding and developmental expression suggest FLK-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72 : 835 – 46, 1993.
- ¹⁰⁵ Minchenko A, Bauer T, Salceda S : Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 71 : 374 - 9, 1994.
- ¹⁰⁶ Moussa RF, Wong JH, Awad IA : Genetic factors related to intracranial arteriovenous malformations. *Neurochirurgie* 47 : 154 – 7, 2001.
- ¹⁰⁷ Mullan S, Mojtahedi S, Johnson DL, Macdonald RL : Embryological basis of some aspects of cerebral vascular fistulas and malformations. *J Neurosurg* 85 : 1 – 8, 1996.
- ¹⁰⁸ Nataf F, Ghossoub M, Merienne L, Meder JF : Progressive neurological deficits in cerebral

- arteriovenous malformations. *Neurochirurgie* 47 : 184 – 7, 2001.
- ¹⁰⁹ Nehls V, Herrmann R, Hühnken M : Guided migration as a novel mechanism of capillary network remodeling is regulated by basic fibroblast growth factor. *Histochem Cell Biol* 109 : 319 – 29, 1998.
- ¹¹⁰ Nishi S, Nakamaya Y, Hashimoto N, Matsuda T : Basic fibroblast growth factor impregnated hydrogel microspheres for embolization of cerebral arteriovenous malformations. *ASAIO J* 44 : 405 – 10, 1998.
- ¹¹¹ Nissen NN, Polverini PJ, Gamelli RL, Di Pietro LA : Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgery* 119 : 457 – 65, 1996.
- ¹¹² Notelet L, Houtteville JP, Khoury S, Lechevalier B, Chapon F : Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in cerebral Cavemomas: an immunocytochemical study of 42 cases. *Surg Neurol* 47 : 364 - 70, 1997.
- ¹¹³ Ogilvy CS, Stieg PE, Awad I, Brown RD, Kondziolka D, Rosenwasser R, Young WL, Hademenos G : Recommendations for the management of intracranial arteriovenous malformations : a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Stroke Association. *Circulation* 103 : 2644 – 57, 2001.
- ¹¹⁴ Ondra SL, Troupp H, George ED, Schwab K : The natural history of symptomatic arteriovenous malformations of the brain : a 24-year follow-up assessment. *J Neurosurg* 73 : 387 – 91, 1990.
- ¹¹⁵ Peters KG, De Vries C, Williams LT : Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 8915 - 9, 1993.
- ¹¹⁶ Piotin M, Ross IB, Weill A, Kothimbakam R, Moret J : Intracranial arterial aneurysms associated with arteriovenous malformations : endovascular treatment. *Radiology* 220 : 506 – 13, 2001.
- ¹¹⁷ Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W : Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 53 : 5822 – 7, 1993.
- ¹¹⁸ Pollock BE, Flickinger JC : A proposed radiosurgery-based grading system for arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 96 : 79 – 85, 2002.
- ¹¹⁹ Porter PJ, Willinsky RA, Harper W, Wallace MC : Cerebral cavernous malformations : natural history and prognosis after clinical deterioration with or without hemorrhage. *J Neurosurg* 87: 190 - 7, 1997.
- ¹²⁰ Pozzati E, Acciarri N, Tognetti F, Marliani F, Giangaspero F : Growth, subsequent Bleeding, and De Novo Appearance of Cerebral Cavernous Angiomas. *Neurosurgery* 38 : 662 - 70, 1996.
- ¹²¹ Pozzati E, Giangaspero F, Marliani F, Acciarri N : Occult Cerebrovascular Malformations after Irradiation. *Neurosurgery* 39 : 677 - 84, 1996.
- ¹²² Pozzati E, Giuliani G, Nuzzo G, Poppi M : The Growth of Cerebral Cavernous Angiomas. *Neurosurgery* 25 : 92 - 7, 1989.
- ¹²³ Raab U, Lastres P, Arevalo MA, Lopez-Novoa JM, Cabanas C, de la Rosa EJ, Bernabeu C : Endoglin is expressed in the chicken vasculature and is involved in angiogenesis. *FEBS Lett*

- 459 : 249 – 54, 1999.
- ¹²⁴ Redekop G, Ter Brugge K, Montanera W, Willinsky R : Arterial Aneurysms associated with cerebral arteriovenous malformations: classification, incidence, and risk of hemorrhage. *J Neurosurg* 89 : 539 - 46, 1998.
- ¹²⁵ Rigamonti D, Johnson PC, Spetzler RF, Hadley MN, Drayer BP : Cavernous Malformations and Capillary Teleangiectasia : A Spectrum within a Single Pathological Entity. *Neurosurgery* 28 : 60 - 4, 1991.
- ¹²⁶ Rodriguez-Arias C, Martinez R, Rey G, Bravo G : Recurrence in adifferent location of a cerebral arteriovenous malformation in a child after radiosurgery. *Childs Nerv Syst* 16 : 363 - 5, 2000.
- ¹²⁷ Rosahl SK, Vorkapic P, Eghbal R, Ostertag H, Samii M : Ossified and de novo cavernous malformations in the same patient. *Clin Neurol Neurosurg* 100 : 138 - 43, 1998.
- ¹²⁸ Rothbart D, Awad I, Lee J, Kim J, Harbaugh R, Criscuolo GR : Expression of angiogenic factors and structural proteins in central nervous system vascular malformations. *Neurosurgery* 38 : 915 – 25, 1996.
- ¹²⁹ Russell, Rubinstein : *Pathology of tumors of the nervous system* 6th edition Vol II, 239 – 82, 1998.
- ¹³⁰ Sachs L : *Angewandte Statistik*. Springer Verlag Berlin, 8. Auflage, 1997.
- ¹³¹ Santoro A, Giuliani S, Paolini S : Recurrent arteriovenous malformation in an adult. Case illustration. *J Neurosurg* 93 : 1082, 2000.
- ¹³² Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker M, Key G, Flad HD, Gerdes J : The Cell Proliferation-associated antigen of antibody Ki-67 : a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell-cycle-maintaining proteins. *Journal of Cell Biology* 123 : 513 – 22, 1993.
- ¹³³ Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: a master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8 : 588 - 94, 1998.
- ¹³⁴ Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC : Failure of blood-island formation and vasculogenesis in FLK-1-deficient mice. *Nature* 376 : 62 – 6, 1995.
- ¹³⁵ Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E : Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359 : 843 - 5, 1992.
- ¹³⁶ Snead OC 3rd, Acker JD, Morawetz R : Familial arteriovenous malformation. *Ann Neurol* 5 : 585 - 7, 1979.
- ¹³⁷ Soares R, Pereira MB, Silva C, Amendeira I, Wagner R, Ferro J, Schmitt FC : Expression of TGF- α and EGFR in breast cancer and its relation to angiogenesis. *Breast J* 6 : 171 – 7, 2000.
- ¹³⁸ Solomon RA, Connolly ES, Prestigiacomo CJ, Khandji AG, Pile-Spellman J : Management of residual dysplastic vessels after cerebral arteriovenous malformation resection – implications for postoperative angiography. *Neurosurgery* 46 : 1052 – 62, 2000.
- ¹³⁹ Sonstein WJ, Kader A, Michelsen WJ, Llana JF, Hirano A, Casper D : Expression of vascular endothelial growth factor in pediatric and adult cerebral arteriovenous malformations : an

- immunocytochemical study. *J Neurosurg* 85 : 838 – 45, 1996.
- ¹⁴⁰ Sorimachi T, Koike T, Takeuchi S, Minakawa T, Abe H, Nishimaki K, Ito Y, Tanaka R: Embolization of cerebral arteriovenous malformations achieved with polyvinyl alcohol particles: angiographic reappearance and complications. *Am J Neuroradiol* 20: 323 – 8, 1999.
- ¹⁴¹ Spetzler R, Martin N : A proposed grading system for arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 65 : 476 – 83, 1986.
- ¹⁴² Spetzler RF, Willson CW. Enlargement of an arteriovenous malformation documented by angiography. Case report. *J Neurosurg* 43 : 767 - 9, 1975.
- ¹⁴³ Stavry GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD : Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells : synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 92 : 11 – 4, 1995.
- ¹⁴⁴ Sure U, Butz N, Schlegel J, Siegel A, Wakat J, Mennel H, Bien S, Bertalanffy H : Endothelial proliferation, neoangiogenesis, and potential de novo generation of cerebrovascular malformations. *J Neurosurg* 94 : 972 - 7, 2001.
- ¹⁴⁵ Sure U, Butz N, Siegel A, Mennel H, Bien S, Bertalanffy H : Treatment-induced neoangiogenesis in cerebral arteriovenous malformations. *Clin Neurol Neurosurg* 103 : 29 - 31, 2001.
- ¹⁴⁶ Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, Seon BK : Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* 7 : 524 - 32, 2001.
- ¹⁴⁷ The Arteriovenous Malformations Study Group, Arteriovenous Malformations of the Brain in Adults, *N Engl J Med* 340 : 1812 -8, 1999.
- ¹⁴⁸ Uranishi R, Baev NI, Ng PY, Kim JH, Awad IA : Expression of endothelial cell angiogenesis receptors in human cerebrovascular malformations. *Neurosurgery* 48 : 359 – 68, 2001.
- ¹⁴⁹ Van der Schaaf IC, Brilstra EH, Rinkel GJ, Bossuyt PM, van Gijn J : Quality of life, anxiety, and depression in patients with an untreated intracranial aneurysm or arteriovenous malformation. *Stroke* 33 : 440 – 3, 2002.
- ¹⁵⁰ Vartanian RK, Weidner N: Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 144 : 1188 – 94, 1994.
- ¹⁵¹ Villaschi S, Nicosia RF : Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury. *Am J Pathol* 143 : 181 – 90, 1993.
- ¹⁵² Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL : Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 5510 – 4, 1995.
- ¹⁵³ Wikholm G, Lundqvist C, Svendsen P : The Goteborg cohort of embolized cerebral arteriovenous malformations: a 6-year follow-up. *Neurosurgery* 49 : 799 - 806, 2001.
- ¹⁵⁴ Wilkins R, Rengachary S : *Neurosurgery Second Edition Vol II*, 2433 – 513, 1996.
- ¹⁵⁵ Wizigmann-Voos S, Breier G, Risau W, Plate KH : Up-Regulation of Vascular Endothelial

- Growth Factor and its Receptors in von Hippel-Landau Disease-related und Sporadic Hemangioblastomas. *Cancer Res* 55 : 1358 - 64, 1995.
- ¹⁵⁶ Wong JH, Awad IA, Kim JH : Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations – a preliminary report. *Neurosurgery* 46 : 1454 – 9, 2000.
- ¹⁵⁷ Yamamoto Y, Coffey RJ, Nichols DA, Shaw EG : Interim report on the radiosurgical treatment of cerebral arteriovenous malformations – the influence of size, dose, time, and technical factors on obliteration rate. *J Neurosurg* 83 : 832 – 7, 1995.
- ¹⁵⁸ Yanaka K, Hyodo A, Nose T : Venous malformation serving as the draining vein of an adjoining arteriovenous malformation, case report and review of the literature. *Surg Neurol* 56 : 170 – 4, 2001.
- ¹⁵⁹ Yoshiji H, Kuriyama S, Ways DK, Yoshii J, Miyamoto Y, Kawata M, Ikenaka Y, Tsujinoue H, Nakatani T, Shibuya M, Fukui H : Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Res* 59 : 4413 – 8, 1999.
- ¹⁶⁰ Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL : Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion and progression. *Cancer* 88 : 2606 – 18, 2000.

10 Lebenslauf

Name : Battenberg, Elmar

Geboren : 05. Juni 1977 in Herne / NRW

Eltern : Astrid Battenberg, geb. Greiling
Dr. Ewald Battenberg

Anschrift : Schöne Aussicht 23
36280 Oberaula – Olberode

Ausbildung : 1983 – 87 Grundschule Oberaula
1987 – 96 Melanchthonschule Steinatal
1996 Abitur
7/96 – 4/97 Grundwehrdienst
seit 4/97 Medizinstudium Universität Marburg
Frühjahr 1999 Ärztliche Vorprüfung
Frühjahr 2000 1. Staatsexamen
Herbst 2002 2. Staatsexamen
12/03 3. Staatsexamen
seit 12/03 AiP im Krankenhaus Lauterbach
10/04 Approbation als Arzt

Hobbies : Sport, EDV, Internet, Journalismus, Musik

11 Abkürzungsverzeichnis

ALK	anaplastic lymphoma kinase
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
AVM	Arteriovenöse Malformation
bFGF	(basic) Fibroblast Growth Factor
CSA	Catalysed Signal Amplification
CT	Computer-Tomographie
Da	Dalton
DAB	3,3-Diaminobenzidin
EGF	Epidermal Growth Factor
FLK	Fetal Liver Kinase
FLT	Fms-like tyrosine kinase
HHT	hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie
HIF	Hypoxia Inducible Factor
KDR	Kinase Insert Domain Receptor
Ki-67	Kiel-67 (Proliferationsmarker)
MIB	Molecular Immunology Borstel number 1
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
NBCA	n-butyl-cyanoacrylate
ONYX	Micro Therapeutics Inc. Embolisationskleber
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PKC	Proteinkinase C
SMAD	Kunstwort aus “Small” / “mothers against decapentaplegic”
TGF	Tumor Growth Factor
Tie-2	tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VM	Vaskuläre Malformation
ZNS	Zentrales Nervensystem

12 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren Damen und Herren Arnold, Arps, Aumüller, Baeblich, Barth, Basler, Baum, Begenat, Bertalanffy, Bonzel, Christiansen, Daut, Doss, Eilers, Geus, Gotzen, Griss, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jaspersen, Jungclas, Kern, Klenk, Krieg, Lammel, Lang, Lennartz, Löffler, Mennel, Moll, Müller, Mutters, Neubert, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Repp, Rumpf, Schäfer, Schmidt, Stegmann, Sure, Vohland, Weihe, Werner und Wörsdorfer.

13 Danksagung

Bedanken für die freundliche Überlassung des interessanten Themas möchte ich mich bei Herrn Prof. Helmut Bertalanffy, Direktor der Neurochirurgischen Klinik an der Philipps-Universität in Marburg.

Für die sehr motivierte und konstruktive Unterstützung gebührt Herrn PD Dr. Ulrich Sure mein tiefster Dank.

Ein großes Dankeschön auch an Frau Tanja Greif, Herrn Matthias Bleistein und Herrn Uli Barcik für die immer verfügbare Unterstützung.

Für die Unterstützung bei meiner Laborarbeit danke ich recht herzlich Herrn Prof. H. D. Mennel sowie Frau Heike Geißel, Ruth Waßmuth, Verena Dippel sowie den weiteren MTA der Neurochirurgie und der Neuropathologie an der Universität Marburg.

Zum Gelingen der Arbeit trugen nicht zuletzt die Ratschläge von Herrn Nick Butz bei, dem ich hiermit abschließend meinen Dank ausspreche.

Für die finanzielle Unterstützung spreche ich der Kempkes Stiftung Marburg (Nr. 14/2000) meinen Dank aus.

14 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Angiogeneese in cerebralen Arteriovenösen Malformationen*“ in der Klinik für Neurochirurgie unter Leitung von Prof. Dr. Helmut Bertalanffy mit Unterstützung durch PD Dr. Ulrich Sure ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit ist in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht worden:

Neurosurgery, Volume 55, Number 3, Seiten 663 – 670, September 2004

„Hypoxia-inducible factor and Vascular Endothelial growth factor are expressed more frequently in embolized than in nonembolized cerebral arteriovenous malformations“

Marburg, den 02.12.2004