



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Neurologische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar

Direktor: Prof. Dr. Bernhard Hemmer

**Pathohistologische Charakterisierung von Thromben aus
mechanischen kathetergestützten Rekanalisationen bei
akutem ischämischem Schlaganfall**

Michael Georg Christian Mehr

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Jan Holger Poppert
2. Prof. Dr. Thomas R. Töle

Die Dissertation wurde am 20.09.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 20.02.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einführung	1
1.1 Der Schlaganfall	1
1.2 Anatomie	2
1.3 Physiologie und Pathophysiologie der Thrombose	2
1.4 Ätiologie.....	5
1.5 Symptomatik.....	7
1.6 Radiologische Diagnostik.....	10
1.7 Therapie	10
1.7.1 Lysetherapie	11
1.7.2 Mechanische Rekanalisationen	13
1.8 Histologie.....	13
1.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	13
1.8.2 Immunhistochemische Färbung	14
2 Fragestellung & Prüfplan	18
3 Material und Methodik	19
3.1 Patientenkollektiv	19
3.2 Aufbereitung der Thromben	19
3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	20
3.4 Immunhistochemie	20
3.4.1 Antikörper.....	20
3.4.2 Färbeprotokoll.....	21
3.5 Auswertung.....	25
3.6 Qualitative Histologie	27
3.7 Beispielfall	28
3.8 Neurologische und Neuroradiologische Datenerhebung	29
3.9 Statistische Tests	30
3.10 Liste der verwendeten Geräte, Materialien, Software und Chemikalien.....	32

4	Ergebnisse	34
4.1	Basischarakteristika	34
4.2	Qualitative Histologie	36
4.2.1	Endothelialisierung & Gefäßneubildung.....	36
4.2.2	Kalzifizierung	38
4.2.3	Plaque.....	39
4.2.4	Sinusvenenthrombose.....	40
4.3	Quantitative Histologie	41
4.3.1	Validierung der Methode	41
4.3.2	Färbungen.....	42
4.3.3	Verschluss-Lokalisation.....	44
4.3.4	Hirnfarkt-Ätiologie	46
4.3.5	Klinische Symptomatik	50
4.3.6	Explorative weitere Untersuchungen	51
5	Diskussion	52
5.1	Färbungen & qualitative Histologie	52
5.2	Verschluss-Lokalisation	54
5.3	Hirnfarkt-Ätiologie	55
5.4	Klinische Symptomatik	60
5.5	Explorative weitere Untersuchungen	61
6	Zusammenfassung.....	63
7	Anhang	VII
7.1	Abbildungsverzeichnis	VII
7.2	Diagrammverzeichnis.....	VII
7.3	Tabellenverzeichnis.....	VII
7.4	Übersicht über die Analysen der Stichprobe	IX
7.5	Literaturverzeichnis	X
7.6	Danksagung	XX

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen in Plural-Form sind eckig umklammert

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
A. [Aa.]	Arteria (lat.), Arterie
ABC	Avidin-Biotin-Complex Methode
ACA	<i>Anterior cerebral artery</i> (engl.), Arteria cerebri anterior (lat.), vordere Hirnarterie
ACI	Arteria carotis interna (lat.), innere Halsschlagader
ADP	Adenosindiphosphat
AHRE	<i>Atrial high rate episode</i> (engl.), atriale Hochfrequenzepisode
aPTT	Aktivierete partielle Thromboplastinzeit
Art.-Nr.	Artikelnummer
BA	<i>Basilar artery</i> (engl.), Arteria basilaris (lat.), Basilararterie
bzw.	beziehungsweise
CD45	<i>Cluster of Differentiation 45</i> (engl.)
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAMP	<i>Damage associated molecular patterns</i> (engl.)
dl	Deziliter
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (engl.), Desoxyribonukleinsäure
engl.	englisch
ESUS	<i>Embolic stroke of undetermined source</i> (engl.), embolischer Schlaganfall ungeklärter Quelle
et al.	et alii (lat.), und andere
F _{ab}	variable Antigen bindende Region eines Antikörpers
F _c	konstante Region eines Antikörpers
ggf.	gegebenenfalls

h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IAT	Intraarterielle Thrombolyse
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (engl.)
ICD	Implantierter Cardioverter-Defibrillator
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
INR	<i>International Normalized Ratio</i> (engl.)
lat.	lateinisch
MCA	<i>Middle cerebral artery</i> (engl.), <i>Arteria cerebri media</i> (lat.), mittlere Hirnarterie
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRS	<i>modified Rankin-Scale</i> (engl., Klassifikation)
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
n	Anzahl
NE	Neutrophilen Elastase
NE-FDP	<i>Neutrophil Elastase-specific Fibrin Degradation Product</i> (engl.)
NET [NETs]	<i>Neutrophil extracellular trap</i> (engl.)
NIHSS	<i>National Institute of Health Stroke Scale</i> (engl., Klassifikation)
NNT	<i>Number needed to treat</i> (engl.)
p	Signifikanz
PAMP	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> (engl.)
PBS	Phosphate buffered saline (engl.), phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	<i>Posterior cerebral artery</i> (engl.), <i>Arteria cerebri posterior</i> (lat.), hintere Hirnarterie
PET-CT	Positronen-Emission-Tomographie mit Computer-Tomographie
r	Effektstärke nach Cohen
RBC	<i>Red-Blood-Cell-Count</i> (engl.), Anteil an Erythrozyten in der HE-Färbung

RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (engl.), Ribonukleinsäure
R_s	Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho
rt-PA	<i>recombinant tissue-type plasminogene activators</i> (engl.), rekombinante gewebsspezifische Plasminogen-Aktivatoren,
sog.	so genannt
TF	<i>Tissue Factor</i> (engl.)
TFPI	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i> (engl.)
TIA [TIAs]	Transitorische ischämische Attacke
TICI	<i>Trombolysis in cerebral infarction</i> (engl., Klassifikation)
TIMI	<i>Thrombolysis in myocardial infarction</i> (engl., Klassifikation)
TOAST	<i>Trial of Org 10172 in acute Stroke Treatment</i> (engl., Klassifikation)
u. a.	unter anderem
WBC	<i>White-Blood-Cell-Count</i> (engl.), Anteil an Leukozyten in der HE-Färbung
z	Teststatistik
Z. n.	Zustand nach

1 Einführung

1.1 Der Schlaganfall

Schlaganfälle forderten im Jahr 2010 in Deutschland 23.675 Todesopfer und bildeten damit eine der häufigsten direkten Todesursachen (Bundesgesundheitsberichterstattung, 2011). Ein Jahr nach einem Schlaganfall sind etwa 37% der Patienten verstorben (Kolominsky-Rabas et al., 1998; Kulesh et al., 2011). Darüber hinaus führen Schlaganfälle jedoch, auch wenn sie überlebt werden, oft zu gravierenden Lebenseinschränkungen, Behinderung und Pflegebedürftigkeit (Grau et al., 2001).

Pathophysiologisch lassen sich Schlaganfälle in Infarkte und Blutungen unterteilen. In etwa 80% der Fälle verlegen Blutgerinnsel große Arterien, unterbrechen damit die Oxygenierung des Gehirns und führen zum ischämischen Schlaganfall. Die übrigen 20% sind hämorrhagische Schlaganfälle: Hier wird durch Blutungen, deren raumfordernde Wirkung und komplexe, teils auch entzündliche Begleitprozesse die zerebrale Funktion beeinträchtigt (Kolominsky-Rabas et al., 1998). In welche von beiden Kategorien ein Fall einzuordnen ist, lässt sich bei mitunter identischer klinischer Symptomatik jedoch erst durch Bildgebung feststellen.

Ischämische Schlaganfälle werden häufig mit rekombinanten gewebspezifischen Plasminogen-Aktivatoren (*recombinant tissue-type plasminogen activators*, rt-PA) behandelt, entweder systemisch (NINDS-Study-Group, 1995; Rha et al., 2007) oder lokal (Arnold et al., 2002). Zusätzlich dazu haben sich in den vergangenen Jahren mechanische Rekanalisationsverfahren als zusätzliche oder in bestimmten Fällen alternative Therapieoptionen etabliert (Gralla et al., 2012).

Die Aggregation von Thrombozyten und die Koagulation des Plasmas führen zur Bildung von Thromben (French, 1965). Die mechanisch geborgenen Thromben beim ischämischen Schlaganfall können auf ihre Zusammensetzung hin histologisch untersucht werden, wobei Leukozyten, Fibrin, Thrombozyten und Erythrozyten als Hauptkomponenten identifiziert wurden (Liebeskind et al., 2011; Marder et al., 2006). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen histologischen Kenngrößen dieser Thromben und klinischen, diagnostischen und therapeutischen Parametern zu untersuchen.

1.2 Anatomie

Die arterielle Blutversorgung des Gehirns gliedert sich in ein vorderes und ein hinteres Stromgebiet. Grundsätzlich sind sowohl vorderes als auch hinteres Stromgebiet paarig angelegt sind. Die A. carotis interna (ACI) versorgt das *vordere Stromgebiet* und teilt sich nach im Karotis-T in die A. cerebri anterior (ACA) und A. cerebri media (MCA). Die MCA wird von proximal nach distal in vier Segmente M1-M4 eingeteilt. Das *hintere Stromgebiet* wird gebildet aus den beiden Wirbelarterien. Die linke und rechte A. vertebralis vereinigen sich als eine anatomische Besonderheit zu einer gemeinsamen, unpaarigen A. basilaris, aus welcher wiederum unter anderem die paarige A. cerebri posterior (PCA) entspringt. Beide Stromgebiete sind außerdem in der Regel im Circulus arteriosus Willisi über die vordere bzw. die hinteren Communicans-Arterien verbunden, sodass eine gewisse Kollateralisierung besteht. Insgesamt bestehen jedoch in Bezug auf die Gefäßanatomie zahlreiche Normvarianten.

1.3 Physiologie und Pathophysiologie der Thrombose

Die Rudolf Virchow zugeschriebene Trias der Blutgerinnung besteht aus den drei Faktoren (i) Gefäßverletzung, (ii) Stase und (iii) Hyperkoagulabilität (Bagot et al., 2008). Grundsätzlich ist diese pathophysiologische Einteilung bis heute gültig, auch wenn sie nicht komplett ist und nicht alle für eine Thrombose entscheidenden Prozesse abdeckt.

- (i) Gefäßverletzungen führen zur Freilegung von subendothelialen Molekülen wie Kollagen. Kollagen ist ein wesentlicher Trigger zur Aktivierung und Rekrutierung des primären Akteurs der zellulären Hämostase, der Thrombozyten (Furie et al., 2008). Thrombozyten setzen ihrerseits thrombogene Substanzen wie Adenosindiphosphat (ADP), Fibrinogen (Kattula et al., 2017) und Thromboxan A₂ frei, sodass sich eine kaskadenartige Verstärkung der Thrombostriker vollzieht. Darüber hinaus wird parallel die zweite Säule der Blutgerinnung aktiviert, die plasmatische Hämostase. Der *Tissue Factor* (TF), der sowohl von Thrombozyten als auch von der Adventitia der Gefäße exprimiert wird, initiiert dabei eine Kaskade sich selbst verstärkender Gerinnungsproteine, die in der Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin mündet, welches netzartig mit den dazwischen gefangenen Blutzellen einen Thrombus bildet und das Gefäß dauerhaft verschließt (Speckmann et al., 2004). Je nach Anteil der zugrunde liegenden Mechanismen entstehen hierbei phänotypisch unterschiedliche Thromben. Der primär an der Gefäßverletzung durch Thrombozyten und Fibrin produzierte Thrombus erscheint dabei makroskopisch weißlich. Je höher der Anteil der zwischen den Fibrinnetzen verankerten Erythrozyten, desto röter imponiert der Thrombus (Mackman, 2008).

- (ii) Neben Gefäßalterationen ist auch die Veränderung der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes für die Thrombusbildung entscheidend. Unter arteriellen Bedingungen tritt die Stase unmittelbar nach Verschluss des Gefäßes durch den Primärthrombus ein. So kann durch eine Gefäßverletzung ein primär weißer Thrombus entstehen und sich durch die Stase ein roter, so genannter Appositionsthrombus anschließen (Mackman, 2008). In Venen sind die Strömungsgeschwindigkeiten von vornherein niedriger. So entstehen tiefe Beinvenenthrombosen nicht auf dem Boden von Gefäßverletzungen, sondern im Rahmen der Stase, zum Beispiel bei Immobilität nach Operationen oder Flugreisen (Furie et al., 2008). Eine im Rahmen von ischämischen Schlaganfällen sehr relevante Thrombusquelle ist das linke Herzohr, in dem Thromben bei Vorhofflimmern ebenfalls unter Stase-Bedingungen entstehen (Stoddard et al., 1995). Gefäßspasmen oder Vaskulitiden können Gefäße ebenfalls funktionell verschließen und so zur Stase führen.

- (iii) Eine Hyperkoagulabilität kann ebenfalls eine Thrombose initiieren oder fördern. Im Rahmen von akuten Leukämien kann es zu Leukozytenthromben kommen (Gong et al., 2014). Immunologische Prozesse wie die Heparin-induzierte Thrombozytopenie, thrombotische Mikroangiopathien oder die disseminierte intravasale Gerinnung bei einer Sepsis führen zu mikrovaskulären Thrombosen (Bick, 2003). Außerdem besteht eine Hyperkoagulabilität auch, wenn Blut auf durch medizinische Eingriffe implantierte Fremdkörper trifft, wie bei Stents oder künstlichen Herzklappen.

Klassischerweise wird zwischen der arteriellen und venösen Thrombose unterschieden, wobei rote Thromben eher low-flow-Bedingungen und damit Venen zugeschrieben und weiße Thromben zur arteriellen Thrombose attribuiert werden (Mackman, 2008). Jedoch haben sich auch hier in der wissenschaftlichen Diskussion deutliche Überschneidungen gefunden, sodass das Konzept der strikten Trennung von venöser und arterieller Thrombose als zu vereinfacht gilt (Prandoni, 2009).

Darüber hinaus haben aktuelle Studienergebnisse gezeigt, dass neben den klassischen, oben erwähnten Wegen auch Zellen des Immunsystems essentiell und aktiv an Gerinnungsprozessen beteiligt sind (Engelmann et al., 2012). So können einerseits *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), andererseits aber auch von Mikroorganismen wie Bakterien hervorgerufene *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) Monozyten anregen, die wiederum TF exprimieren und so die Gerinnungskaskade aktivieren.

Neben Monozyten sind auch neutrophile Granulozyten an der Thrombose beteiligt. Sie bilden mithilfe ihrer Neutrophilen Elastase (NE) sowie Cathepsin G, langen chromosomalen DNA-Segmenten und Histonen so genannte *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) (Brinkmann et al., 2004). Primär werden NETs als eine immunologische Abwehrreaktion auf Pathogene gedeutet. Pathogene werden innerhalb der NETs gebunden und von den Neutrophilenproteasen zerstört (Urban et al., 2006). Allerdings besteht auch eine klare prokoagulatorische Funktion (Fuchs et al., 2010). So regt die Elastase von neutrophilen Granulozyten per se Koagulation an, indem sie den *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) inaktiviert und so direkt die Gerinnungskaskade steuert (Massberg et al., 2010).

Leukozyten werden nach Gefäßverletzungen aktiv rekrutiert (Palabrica et al., 1992). Neutrophile Granulozyten binden an das verletzte Endothel mittels einer Interaktion mit dem *Leukocyte-Function-Associated-Antigen* und dem *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1). Dies unterstützt die Akkumulation von Thrombozyten an der Gefäßverletzung (Ruhnau et al., 2017). Die Perfusion von NETs führt ebenfalls zur Rekrutierung von Thrombozyten und Erythrozyten in der Thrombogenese (Fuchs et al., 2010). In der aktuellen Literatur wurde aufgrund all dieser Erkenntnisse der Begriff der *Immunothrombose* geprägt (Engelmann et al., 2012).

Im weiteren Verlauf reagiert der Organismus auf eine Thrombenbildung auf komplexe Art und Weise. So kann im Rahmen einer Thrombusorganisation (French, 1965; Sherry et al., 1969) zunächst eine Endothelialisierung, also eine durch Fibroblasten gesteuerte Bildung einer neuen Gefäßwand, erfolgen, die dann durch die Bildung von zunächst kleineren, dann größeren Spalten eine Art neues Gefäß im Gefäß formen und die Zirkulation des Blutes wieder ermöglichen. Hierbei handelt es sich also um eine spontane Rekanalisation. Außerdem werden durch das Endothel prokoagulatorische Faktoren wie Fibrin und Thrombozyten im Thrombus vom Blutfluss abgetrennt, wodurch ein weiteres Thrombuswachstum begrenzt wird (Sherry et al., 1969). Weiterhin kann eine Lyse durch Plasminogen oder eine durch Granulozyten vermittelte puriforme Erweichung erfolgen, bei der das Thrombusgewebe, schrittweise abgetragen wird. Auch eine Extravasation des Thrombus ist möglich (Lam et al., 2010).

1.4 Ätiologie

Ischämische Schlaganfälle können ätiologisch verschiedene Ursprünge haben. Prinzipiell lassen diese sich nach den für die TOAST-Studie (Adams et al., 1993) entwickelten Kriterien in 5 Kategorien einteilen. Die erste Kategorie bilden die arterioarteriell-embolischen Infarkte. Diesen zugrunde liegen zumeist Stenosen der A. carotis interna oder der A. vertebralis. Dabei führen artherosklerotische Plaques zu einer Thrombusbildung an der Stenose. Jedoch resultiert daraus aufgrund des großen Gefäßdurchmessers in der Regel kein lokaler Verschluss. Stattdessen werden Thrombuspartikel durch den Blutstrom in weiter distal gelegene und damit kleinkalibrigere Gefäßabschnitte transportiert, wo sie embolisch einen Gefäßverschluss und damit einen Schlaganfall verursachen. Schlaganfälle gelten als arterioarteriell-embolisch bedingt, wenn in der Sonographie der hirnversorgenden Gefäße Stenosen von über 50% vorhanden sind sowie ein klinisches und radiologisches Korrelat besteht. Vorangegangene transitorische ischämische Attacken (TIA) im selben Versorgungsgebiet können die These einer arterioarteriell-embolischen Ätiologie untermauern.

Die zweite Kategorie bilden kardioembolische Infarkte. Herzrhythmusstörungen, strukturelle Herzerkrankungen oder implantierte Fremdkörper wie künstliche Herzklappen führen hierbei zu einer lokalen Thrombusbildung. Die Thromben werden dann analog zu den arterioarteriell-embolischen Infarkten fortgespült und münden in einem Verschluss distaler Gefäße. Da die Hauptstämme der hirnversorgenden Gefäße in einem weitgehend geraden Winkel aus dem linksventrikulären Ausflusstrakt entspringen, werden die Thromben vorzugsweise in zerebrale Gebiete befördert. Schlaganfälle werden nach den Original-TOAST-Kriterien als wahrscheinlich kardioembolisch klassifiziert, wenn eines der in **Tabelle 1** aufgeführten Hoch-Risiko-Kriterien erfüllt ist, bzw. als möglicherweise kardioembolisch klassifiziert wenn ein Mittel-Risiko-Kriterium erfüllt ist und es keinerlei andere Hinweise auf die Ätiologie gibt (Adams et al., 1993). Ein Korrelat in Klinik und Bildgebung ist üblicherweise vorhanden. Vorherige TIAs in anderen bzw. mehreren Versorgungsgebieten stützen die These einer kardioembolischen Genese. Das Persistierende Foramen Ovale aus **Tabelle 1** hat sich zwischenzeitlich nicht als Risikofaktor bestätigt, sodass die Original-TOAST-Einteilung definitiv Schwächen aufweist (Feurer et al., 2010).

In die dritte Gruppe der lakunären Infarkte fallen solche, die nicht durch großkalibrige Verschlüsse, sondern durch Verschlüsse in bestimmten Regionen wie weißer Substanz oder Basalganglien bedingt sind (Simons et al., 2014). Die Läsion sollte computertomographisch kleiner als 1,5 cm im Diameter sein. Sie verursachen typischerweise lakunäre Krankheitssyndrome, die in **Tabelle 2** zusammengefasst sind und per se schon eine

Unterscheidung zu Schlaganfällen der ersten beiden Kategorien vereinfachen (Fisher, 1982). Des Weiteren gelten Bluthochdruck und Diabetes mellitus als wichtige Risikofaktoren. Gesichtsfeldausfälle, höhere zerebrale Dysfunktionen sowie Ausfälle, die auf einen Infarkt im hinteren Stromgebiet schließen lassen, schließen ein lakunäres Syndrom aus (Bamford et al., 1987). Häufig sind der Thalamus, Basalganglien, die Capsula interna oder die Corona radiata betroffen (Chamorro et al., 1991). Kardiale Ursachen und signifikante Karotis-Stenosen sollten ausgeschlossen sein. Lakunäre Infarkte sind in dieser Arbeit von untergeordneter Bedeutung, da sie für Thrombektomien nicht zugänglich sind.

Tabelle 1: Kriterien für kardioembolische Schlaganfälle (Adams et al., 1993)

<i>Hohes Risiko</i>	<i>Mittleres Risiko</i>
Mitralstenose mit Vorhofflimmern	Biologischer Klappenersatz
Vorhofflimmern (außer einmaliges Vorhofflimmern)	Mitralklappenprolaps
Thrombus in Vorhof oder linkem Ventrikel	Mitralring-Kalzifizierung
Dilatative Kardiomyopathie	Mitralstenose ohne Vorhofflimmern
Infektiöse Endokarditis	Vorhof-Septum Aneurysma
Sick Sinus Syndrom	Persistierendes Foramen Ovale
Kürzlicher Myokardinfarkt (< 4 Wochen)	Vorhofflattern
Akinetisches Segment des linken Ventrikels	Einmaliges Vorhofflimmern
Atriales Myxom	Nichtbakterielle thrombotische Endokarditis
	Angeborener Herzfehler
	Kürzlicher Myokardinfarkt (> 4 Wochen, < 6 Monate)
	Hypokinetisches Segment des linken Ventrikels

Tabelle 2: Lakunäre Syndrome (Bamford et al., 1987; Chamorro et al., 1991)

<i>Name (Häufigkeit)</i>	<i>Symptomatik</i>
Rein motorische Hemisymptomatik (57%)	Unilaterales motorisches Defizit in mindestens 2 von 3 Bereichen (Gesicht, Arm, Bein)
Rein sensorische Hemisymptomatik (7%)	Unilaterales sensorisches Defizit einer oder mehrerer Qualitäten in mindestens 2 von 3 Bereichen (Gesicht, Arm, Bein). Keine isolierten propriozeptiven Ausfälle
Ataktische Hemiparese (16%)	Mischform aus ipsilateraler corticospinaler und zerebellärer Symptomatik, ohne andere Hinweise auf das hintere Stromgebiet. Ebenfalls Fälle mit Dysarthrie und ungeschickter Hand
Gemischt sensomotorische Hemisymptomatik (20%)	Ipsilaterales sensomotorisches Defizit in mindestens 2 von 3 Bereichen (Gesicht, Arm, Bein)

Die vierte Kategorie fasst Schlaganfälle zusammen, die pathophysiologisch nicht in eine der drei vorigen Kategorien passen, deren Ursache aber bekannt ist. Dazu zählen beispielsweise Vaskulopathien wie Dissektionen und Vaskulitiden sowie hämatologische Veränderungen, die eine Hyperkoagulabilität des Blutes bewirken.

Schlaganfälle unbekannter Ursache werden in Kategorie fünf klassifiziert. Ebenfalls in diese Kategorie fallen Infarkte mit konkurrierenden Befunden, wie beispielsweise Fälle, in denen sowohl Vorhofflimmern als auch eine ACI-Stenose über 50% detektiert wird. Allerdings haben natürlich auch Infarkte unbekannter Ätiologie eine Ursache, die mutmaßlich häufig embolischer Natur ist (Hart et al., 2014). Eine Übersicht der TOAST-Kriterien findet sich in **Tabelle 3**.

Tabelle 3: Übersicht über die TOAST-Kriterien (Adams et al., 1993)

<i>Genese (Häufigkeit)</i>	<i>Kriterien</i>
Arterioarteriell-embolisch, Makroangiopathie (21%)	Kortikaler, subkortikaler, cerebellärer oder Hirnstamm-Infarkt Stenose eines hirnversorgenden Gefäßes > 50%
Kardioembolisch (26%)	Kortikaler, subkortikaler, cerebellärer oder Hirnstamm-Infarkt Herzrhythmusstörungen, Klappenveränderungen, Z. n. Klappenersatz, kardiale Thromben, Endokarditis, dilatative Kardiomyopathie, Myokardinfarkt oder angeborene Herzfehler Infarktgröße > 1,5 cm
Lakunär, Mikroangiopathie (21%)	Lakunäres Syndrom, Subkortikaler Infarkt Infarktgröße < 1,5 cm
Andere Ursache (4%)	z.B. Vaskulopathien (Dissektionen), hämatologische Ursachen
Unbekannte Ursache (30%)	Keine oder konkurrierende erklärende klinische Befunde

1.5 Symptomatik

Zerebrale Infarkte sind in Lokalisation, Größe und Ausprägung äußerst heterogen. Aus diesem Grund variiert auch die Symptomatik eines ischämischen Schlaganfalls deutlich. Prinzipiell unterscheiden lassen sich Infarkte im vorderen und hinteren Stromgebiet. Infarkte im vorderen Stromgebiet können zu motorischen oder sensiblen Hemiparesen führen, die bedingt durch die Kreuzung der neuronalen Axone in der Pyramidenbahn kontralateral ausfallen. Darüber hinaus können Neglectsyndrome, Hemi- oder Quadrantenanopsien, Störungen der Okkulomotorik, Dysphagien und Apraxien auftreten.

Das hintere Stromgebiet umfasst Hirnstamm, Kleinhirn sowie die okzipitalen Anteile der Großhirnrinde. Entsprechend liegt der Symptombereich zum einen auf zerebellären Symptomen wie Ataxie, Tremor, Nystagmus und Schwindel zum anderen auf klassischen, zum Teil alternierenden Hirnstamm-Syndromen. Dazu zählen beispielsweise das Weber- und das Wallenberg-Syndrom. Bedingt durch Ausfälle der okzipitalen Großhirnrinde kann es unter anderem zur kortikalen Blindheit kommen.

Zur Bewertung der Schwere der Symptomatik eines Schlaganfalls sind in der Vergangenheit mehrere Punktesysteme, sog. *Impairment*-Skalen, entwickelt worden, so beispielsweise die *Los Angeles Motor Scale* (Llanes et al., 2004), die *European Stroke Scale* (Hantson et al., 1994) und *Scandinavian Stroke Scale* (Christensen et al., 2005). Die zurzeit jedoch in internationalen klinischen Studien sowie auch im klinischen Alltag meist genutzte und deswegen auch hier vorgestellte Skala ist die *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) (Goldstein et al., 1997). Sie besteht aus elf Kategorien, in denen jeweils null bis maximal zwei, drei oder vier Punkte vergeben werden können. Je mehr Punkte ein Patient in der neurologischen Untersuchung nach NIHSS erzielt, desto schwerwiegender ist die Symptomatik des Schlaganfalls. **Tabelle 4** gibt einen Überblick über Kategorien und Punktevergabe. Routinemäßig wird die Symptomatik durch eine neurologische Untersuchung sowohl bei Erstaufnahme in der Notfall-Ambulanz als auch bei Entlassung des Patienten aus der klinisch-stationären Versorgung durch einen Neurologen erhoben und im Anschluss im NIHSS bewertet.

Darüber hinaus beleuchten sog. Behinderungsskalen die Beeinträchtigung des Patienten im Alltag. Hierfür hat sich die modifizierte Rankin-Skala (mRS) etabliert, die zwischen 7 verschiedenen Niveaus unterscheidet (van Swieten et al., 1988). Es handelt sich um eine relativ grobe Einschätzung, die nicht unbedingt nur unmittelbare Folgen des Schlaganfalls erfasst. Auch ist nicht davon auszugehen, dass alle Patienten vor einem Schlaganfall im Sinne der mRS beschwerdefrei waren. Dennoch handelt es sich um eine etablierte Methode, um das Outcome eines Patienten im Verlauf zu evaluieren. Die verschiedenen Stufen zeigt **Tabelle 5**.

Tabelle 4: Neurologische Befundung nach NIHSS (Goldstein et al., 1997)

<i>Kategorie</i>	<i>Punkte</i>
1a Vigilanz	0 Wach 1 Benommen 2 Somnolent 3 Koma
1b Orientierung (Frage nach Monat und Alter)	0 Beide Fragen richtig 1 Eine Frage richtig 2 Keine Frage richtig
1c Befolgung von Aufforderungen	0 Beide Aufforderungen befolgt 1 Eine Aufforderung befolgt 2 Keine Aufforderung befolgt
2 Okkulomotorik	0 Normal 1 Partielle Blickparese 2 Forcierte Blickdeviation oder komplette Blickparese
3 Gesichtsfeld	0 Normal 1 Partielle Hemianopsie 2 Komplette Hemianopsie 3 Blindheit
4 Facialispause	0 Normal 1 Gering 2 Partiiell 3 Vollständig (ein- oder beidseits)
5+6 Halteversuche Arme (re+li) und Beine (re+li)	0 Kein Absinken 1 Absinken 2 Aktive Bewegung gegen die Schwerkraft 3 Kein Anheben gegen die Schwerkraft 4 Keine Bewegung
7 Extremitätenataxie	0 Fehlend 1 In einer Extremität 2 In zwei Extremitäten
8 Sensibilität	0 Normal 1 Leichter bis mittlerer Sensibilitätsverlust 2 Schwerer bis vollständiger Sensibilitätsverlust
9 Aphasie	0 Keine 1 Leichte bis mittelschwere Aphasie 2 Schwere Aphasie 3 Globale Aphasie
10 Dysarthrie	0 Keine 1 Leichte bis mittelschwere Dysarthrie 2 Schwere Dysarthrie, Anarthrie
11 Neglect	0 Kein Neglect 1 Halbseiten-Wahrnehmungsstörung bei beidseitiger Stimulation in mindestens einer sensiblen Qualität 2 Schwere Halbseiten-Wahrnehmungsstörung in mehreren sensiblen Qualitäten

Tabelle 5: Modifizierte Rankin-Skala (van Swieten et al., 1988)

Wert	Beschreibung
0	Beschwerdefreiheit
1	Keine maßgebliche Behinderung, alle Alltagsaufgaben durchführbar
2	Leichte Behinderung, nicht alle Alltagsaufgaben durchführbar, aber keine Unterstützung nötig
3	Moderate Behinderung, Unterstützung notwendig, aber Laufen alleine möglich
4	Mittelschwere Behinderung, Laufen und eigene Körperpflege nur mit Unterstützung möglich
5	Schwere Behinderung, bettlägerig, inkontinent und pflegebedürftig
6	Tod

1.6 Radiologische Diagnostik

Bei einem akuten thrombembolischen Verschluss eines hirnersorgenden Gefäßes kann es in der computertomographischen Nativbildgebung zu sog. hyperdensen Arterienzeichen kommen, was in zahlreichen Studien sowohl für Infarkte des vorderen als auch des hinteren Stromgebietes gezeigt wurde (Gacs et al., 1983; Pressman et al., 1987; Tomsick et al., 1989). Es handelt sich dabei um hyperdense Strukturen, die anders als das sich erst später demaskierende hypodense Infarktareal, den Verschluss der betroffenen Arterie selbst repräsentieren (Houser et al., 1982). Ein positives Arterienzeichen korreliert dabei mit dem angiographischen Befund (Bastianello et al., 1991; Leys et al., 1992), allerdings schließt das Fehlen des Zeichens den Infarkt nicht aus (Tomsick et al., 1990). Hyperdense Mediazeichen treten etwa in 40-50% der Mediaverschlüsse auf (Bastianello et al., 1991; Leys et al., 1992; von Kummer et al., 1994). Die meisten Studien assoziieren ein solches Arterienzeichen als schlechten prognostischen Faktor (Bastianello et al., 1991; von Kummer et al., 1994). So gibt es außerdem Hinweise dafür, dass eine intravenöse Lysetherapie bei Patienten mit positivem Arterienzeichen schlechtere Erfolgsaussichten hat als bei Patienten ohne positives Arterienzeichen (Agarwal et al., 2004; Molina, 2005). Auch in T2-gewichteten Magnet-Resonanz-Tomographien (MRT) können entsprechende Hinweise als „blooming artifact“ beobachtet werden (Assouline et al., 2005; Cho et al., 2005).

1.7 Therapie

Das Gehirn benötigt im Vergleich zu anderen Organen konstant sehr hohe Mengen an Sauerstoff und Glucose, um zu überleben. Es beansprucht etwa 20% des Herzzeitvolumens und damit des verfügbaren Sauerstoff- und Nährstoffangebots, wobei es nur etwa 2% der Körpermasse ausmacht (Eschenfelder et al., 2006). Bei einem durchschnittlichen territorialen Infarkt sterben pro Minute etwa 1,9 Millionen Neuronen und bewirken den Untergang von 14 Milliarden Synapsen (Levine, 2006). Daraus resultiert ein großer Zeitdruck bei der Behandlung

von Schlaganfällen, den der von J. L. Saver geprägte Aphorismus „Time is brain“ zusammenfasst (Saver, 2006).

Problematisch dabei ist u. a., dass mit der Behandlung eines Schlaganfalls erst nach der Bildgebung im Krankenhaus begonnen werden kann, da Blutungen und Infarkte klinisch nicht zu differenzieren sind, aber unterschiedliche Therapieregimes erfordern. Klassischerweise werden ischämische Schlaganfälle mit rt-PA als lysierendes Medikament behandelt (NINDS-Study-Group, 1995). Zusätzlich dazu wurden in den vergangenen Jahren auch interventionelle mechanische Verfahren entwickelt (Gralla et al., 2012). In den folgenden Unterkapiteln werden beide Therapiekonzepte erläutert.

1.7.1 Lysetherapie

Seit der Entwicklung von rekombinanten gewebspezifischen Plasminogenaktivatoren (rt-PA) und deren klinischer Erprobung in den 1990er Jahren, haben viele klinische Studien demonstriert, dass eine intravenöse bzw. lokale intraarterielle Gabe von rt-PA das klinische Outcome der Patienten verbessern kann (del Zoppo et al., 1992; Mori et al., 1992; NINDS-Study-Group, 1995). Gerade für die großen ACI- und MCA-Infarkte scheint die Effektivität der Lysetherapie allerdings begrenzt (Riedel et al., 2011; Saqqur et al., 2007). Auch wenn gezeigt wurde, dass die Thrombolyse nicht nur wie zuvor 3 Stunden, sondern bis zu 4,5 Stunden nach Symptombeginn mit signifikantem Erfolg angewendet werden kann (Hacke et al., 2004; Hacke et al., 2008; Wahlgren et al., 2008), ist ein zu spätes Eintreffen in der Klinik in vielen Fällen nach wie vor ein entscheidendes Hindernis. Eine frühere Therapie ist auch mit einem deutlich positiveren Effekt assoziiert. Die Number Needed to Treat (NNT) für ein weitgehend behinderungsfreies Leben (definiert als mRS \leq 2) beträgt für das Zeitfenster von 0-1,5 Stunden nach Symptombeginn 4, für das Zeitfenster von 4,5-6 Stunden aber bereits 45 (Hacke et al., 2004).

Darüber hinaus existiert eine Reihe von Kontraindikationen, die dem Patienten die Therapie aufgrund eines zu großen Risikos für eine symptomatische intrakranielle Hämorrhagie vorenthalten (NINDS-Study-Group, 1997). Diese werden in **Tabelle 6** dargestellt, wobei in der täglichen Praxis einige Ausschlusskriterien wie beispielsweise Diabetes mellitus, vorangegangene Schlaganfälle sowie auch das Alter nur relativ sind und im Rahmen eines individuellen Heilversuchs zum Teil umgangen werden.

Wie oben bereits angedeutet, ist des Weiteren zwischen einer systemischen intravenösen Gabe von rt-PA (IV t-PA) und einer kathetergestützten lokalen intraarteriellen Thrombolyse (IAT) zu unterscheiden. Letztere ist wiederum nicht mit einer mechanischen Rekanalisation zu

verwechseln, da der Thrombus selbst nicht berührt wird. Um angiographisch die Effektivität einer Therapie zu beurteilen wurde basierend auf dem aus der Inneren Medizin bekannten *Thrombolysis in Myocardial Infarction Score* (TIMI-Score) ein *Thrombolysis in Cerebral Infarction Score* (TICI-Score) entwickelt (Noser et al., 2005). Diesen stellt **Tabelle 7** dar. Im Unterschied zur TIMI-Klassifikation unterscheidet die TICI-Klassifikation noch zwischen den Graden 2a und 2b, wobei hier mehr oder weniger als 50% des Versorgungsgebietes durchblutet werden. Hiervon hängt auch die Wahrscheinlichkeit eines guten Outcomes ab. Die PROACT-II-Studie hat gezeigt, dass die lokale Applikation von Pro-Urokinase eine Rekanalisation (definiert als TIMI 2 oder 3) in 66% der Fälle (Kontrollgruppe 25%) erreicht und auch ein verbessertes Outcome bewirkt (mRS ≤ 2 bei 40%, Kontrolle 25%) (Furlan et al., 1999).

Tabelle 6: Ausschlusskriterien einer Lysetherapie (NINDS-Study-Group, 1997)

<u>Anamnestisch:</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Alter <18 oder >80 Jahre - Unbekannter Symptombeginn - Schlaganfall oder schwere Kopfverletzung in den letzten 3 Monaten - Große Operation oder schwere Verletzung in den letzten 3 Monaten - Früherer Schlaganfall und Diabetes mellitus - Epileptischer Anfall bei Symptombeginn - Hämorrhagische Diathese
<u>Klinisch:</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Schnelle Besserung oder nur geringfügige Symptome - Sehr schwere Symptomatik (NIHSS > 25) - Symptome einer Subarachnoidalblutung, auch wenn CT negativ - Arterieller Blutdruck > 185/110 mm Hg oder intravenöse Therapie, um diese Grenzen einzuhalten
<u>Labor:</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombozytenzahl <100.000 / ml - Blutglucose < 50 mg/dl bzw. > 400 mg/dl - aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit)-wirksame Heparinisierung in den letzten 48h - INR (Internationale normalisierte Ratio)-wirksame Antikoagulation
<u>Bildgebung:</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Intracraniale Blutung - Großer Mediainfarkt (> 1/3 des MCA-Versorgungsgebietes)

Tabelle 7: Thrombolysis in Cerebral Infarction Score (Noser et al., 2005)

Wert	Beschreibung
0	Keine Penetration oder Perfusion nach Verschluss
1	Penetration, aber keine Perfusion des Versorgungsgebietes
2a	Inkomplette Perfusion des Versorgungsgebietes < 50%
2b	Inkomplette Perfusion des Versorgungsgebietes ≥ 50 -99%
3	Komplette Perfusion des Versorgungsgebietes

1.7.2 Mechanische Rekanalisationen

Über die rein medikamentöse Therapie hinaus, haben sich in den letzten Jahren auch mechanische Verfahren etabliert, deren Ziel es ist den Thrombus zu entfernen, eine sog. Thrombektomie. Proximal ansetzende Verfahren funktionieren über einen Aspirationskatheter, welcher den Thrombus unter Sog hinauszieht (Penumbra-Pivotal-Stroke-Trial-Investigators, 2009). Bei distal ansetzenden Verfahren wird der Thrombus mit einem Mikrokatheter durchstoßen und anschließend mit Korb-ähnlichen oder Spulen-ähnlichen Devices geborgen, wobei sich hier initial insbesondere das *MERCI*[®]-Device bewährt hatte (Smith et al., 2008).

Die aktuell neueste und wohl erfolgreichste Entwicklung stellen die so genannten *Stent-Retriever* dar. Hierbei wird ein selbst-expandierender Stent in der Verschlussregion positioniert und dann – eventuell unter Zuhilfenahme eines oben beschriebenen Aspirationskatheters – unter langsamem Rückzug geborgen.

Derzeit sind unter anderem der *Solitaire FR*[®] (Roth et al., 2010) und der *Trevo Retriever*[®] (Jansen et al., 2013) auf dem Markt, die auch im direkten Vergleich gegenüber dem *MERCI*-System signifikant bessere Ergebnisse erzielen (Nogueira et al., 2012; Saver et al., 2012). Roth et al. erreichten in ihrer Erstbeschreibung des *Solitaire-FR*-Systems eine Rekanalisationsrate (TICI 2b oder 3) von über 90%. Die Ergebnisse wurden mehrfach bestätigt (Castano et al., 2010; Costalat et al., 2011). Eine Metaanalyse ergab eine relative Gleichwertigkeit der beiden *Stent-Retriever*-Systeme (Walcott et al., 2013). Alle in dieser Arbeit untersuchten Thromben wurden mit *Stent-Retrievern* geborgen.

Mehrere multizentrische, prospektive, randomisierte Studien, die die *Stent-Retriever*-Thrombektomie mit einer alleinigen intravenösen rt-PA-Therapie verglichen, zeigten zwischenzeitlich eine Überlegenheit für die *Stent-Retriever* hinsichtlich einer funktionellen Unabhängigkeit definiert als mRS ≤ 2 90 Tage nach dem zerebralen Infarkt (Saver et al., 2015).

1.8 Histologie

Die mikroskopische Auswertung von Geweben ist ein in der Medizin breit angewendetes Verfahren zur Diagnostik und Prognosestellung. Schlaganfallthromben waren der Histologie allerdings bisher nicht zugänglich und sind daher noch nicht im Detail erforscht. Grundsätzlich lassen sich Standardfärbungen von immunhistochemischen Färbungen unterscheiden.

1.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zu den Standardfärbungen gehört unter anderem die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), welche einen grundsätzlichen Überblick über die Morphologie des Präparates verschafft. Sie stellt eine Kombinationsfärbung aus einem roten und einem blauen Farbstoff dar. Das rote Eosin färbt dabei in erster Linie azidophile, also eher basische Stoffe an, das

blaue Hämatoxylin hingegen eher basophile, saure Stoffe. Dies führt dazu, dass Zellkerne aufgrund ihrer dichten Füllung mit Nukleinsäuren (DNA und RNA) tiefblau, Zellplasma aufgrund der Mischung aus saurem endoplasmatischem Retikulum und einer Vielzahl von eher basischen Proteinen eher rosa und die kernlosen Erythrozyten tiefrot erscheinen. Im Rahmen von Thromben lassen sich hierbei insbesondere Leukozyten, Erythrozyten und Fibrin/Thrombozyten unterscheiden (Marder et al., 2006).

1.8.2 Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemische Färbungen (IHC) sind dagegen antikörperbasiert. Mit kommerziell verfügbaren, im Tier hergestellten Antikörpern können dabei ausgesuchte Zellstrukturen selektiv markiert werden. Die Technik ist grundsätzlich bereits seit Mitte des 20. Jahrhunderts bekannt (Coons et al., 1941).

Antikörper sind durch B-Zellen und Plasmazellen als Teil der erworbenen Immunität gebildete Immunglobuline und bestehen aus jeweils zwei identischen schweren und leichten Ketten. Hierbei lassen sich wiederum ein variabler Antigen-bindender Teil (F_{ab}) und ein konstanter Teil (F_c) unterscheiden (Ramos-Vara, 2005). Der F_{ab} -Teil ist gegen die entsprechende Zielstruktur gerichtet, der F_c -Teil hingegen ist unveränderlich, allerdings von Spezies zu Spezies unterschiedlich. Eine schematische Darstellung eines Immunglobulins der Klasse G (IgG) zeigt

Abbildung 1.

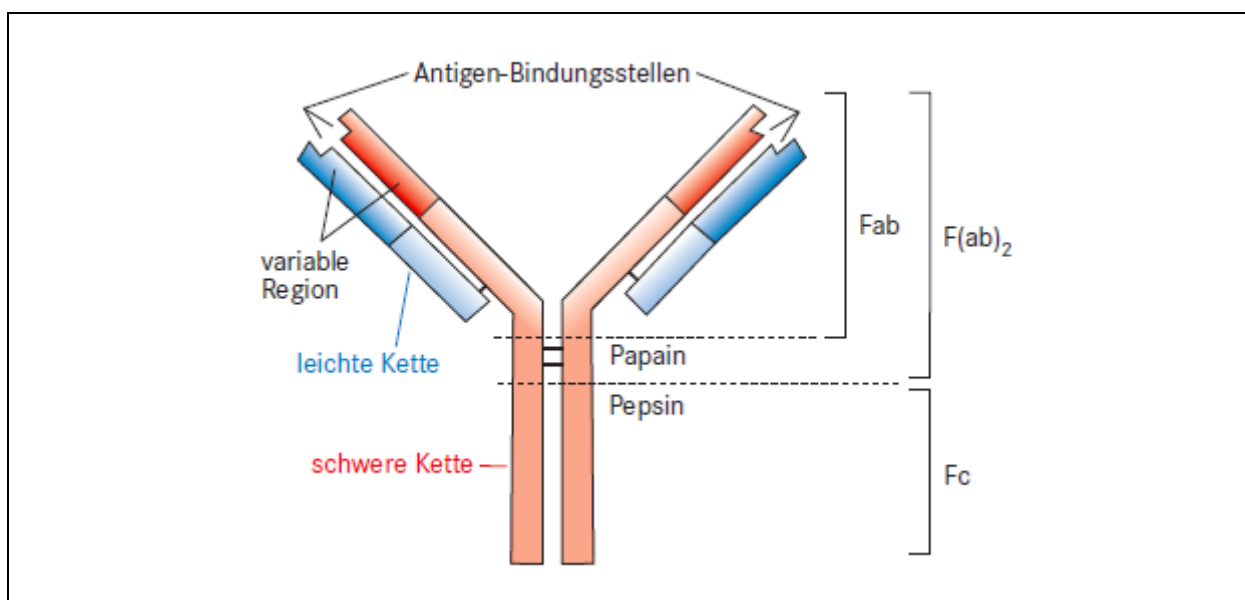


Abbildung 1: Darstellung eines Immunglobulin G (Mulisch et al., 2010)

Die kommerziell hergestellten, spezifischen Antikörper, die für Immunhistochemien verwendet werden, stammen zumeist aus Mäusen, Ratten oder Kaninchen. Die Tiere werden dabei mehrmals mit dem Protein geimpft, das später nachweisbar sein soll. Durch das tierische Immunsystem werden Antikörper gebildet, die gegen das Protein gerichtet sind. Teilweise kommt es zur Entwicklung von einer Reihe verschiedener Antikörper gegen das Protein. Es entstehen sog. polyklonale Antikörper von verschiedenen B-Zell-/Plasmazell-Klonen. Es ist allerdings auch möglich Antikörper von nur einem Zellklon, also monoklonale Antikörper zu gewinnen. Dazu werden Zellen aus der Milz des Tieres mit Tumorzellen verschmolzen, sodass teilungsfähige Hybridzellen entstehen (Kohler et al., 1976). Diese wiederum können kultiviert oder einem zweiten Tier injiziert werden, sodass monoklonale Antikörper produziert werden. Polyklonale Antikörper haben den Vorteil, dass sie auch bei leicht veränderten Zielepitopen in der Regel noch gut färben. Monoklonale Antikörper sind hingegen spezifischer und färben dadurch meist weniger Hintergrund an (Hayat, 2002). In der direkten Immunhistochemie sind diese Antikörper per se mit einem Chromogen verbunden und so mikroskopisch sichtbar. Sind zwischen Antikörper und Chromogen noch weitere verstärkende Substanzen zwischengeschaltet, spricht man von indirekter Immunhistochemie (Ramos-Vara, 2005).

1.8.2.1 ABC-Methode und Färbereparierungen

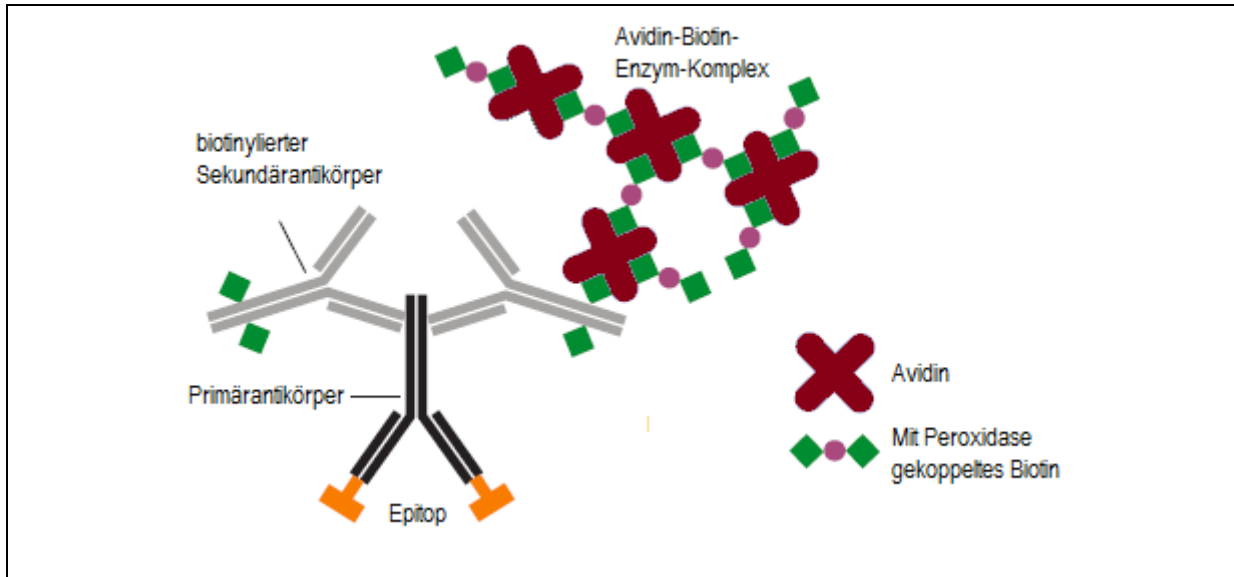


Abbildung 2: Darstellung der ABC-Methode (Mulisch et al., 2010)

Eine Methode der indirekten Immunhistochemie ist die Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) (Guesdon et al., 1979). Dabei werden die jeweiligen Zielproteine einer Färbung mit einem Primärantikörper markiert. Dieser wird wiederum mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Brückenantikörper) gekoppelt. Je nach dem, in welchem Tier der Primärantikörper hergestellt worden ist, muss ein spezifischer, an dieses Tier angepasster Sekundärantikörper verwendet werden. Biotin kommt in vielen menschlichen Geweben vor

und reagiert mit sehr hoher Spezifität mit dem aus Hühnereiweiß gewonnenen Glykoprotein Avidin, welches insgesamt 4 Biotine binden kann. Die ABC-Methode bedient sich dieser Tatsache und erlaubt so einen enormen Verstärkereffekt, indem zu dem biotinylierten Antikörper eine Mischung aus Biotin und mit einer Peroxidase gekoppeltem Avidin gegeben wird. Auf diese Weise bildet sich eine Vielzahl von Avidin-Biotin-Komplexen und der Antikörper wird konsekutiv mit ebenso vielen Peroxidasen gekoppelt. Diese wiederum setzen im nächsten Färbeschritt ein Chromogen um und erlauben so eine lichtmikroskopisch auswertbare, zellspezifische Anfärbung. **Abbildung 2** zeigt eine Grafik dieses Prinzips.

Dem eigentlichen Prozess der Antigenmarkierung mit Antikörpern, der Amplifikation mittels der ABC-Reaktion sowie der Farbreaktion sind jedoch einige vorbereitende Maßnahmen vorangestellt. So werden Gewebe häufig in Formalin fixiert und damit die Oberflächenproteine quervernetzt, um das Gewebe haltbar zu machen und vor Autolyse zu schützen (Dapson, 1993). Um eine immunhistochemische Reaktion möglich zu machen, müssen die Antigene zuvor wieder demaskiert werden. Hierzu sind entweder Verfahren mittels Hitze (Shi et al., 1991) oder Enzymen (Huang et al., 1976) etabliert.

Weiterhin müssen zur Reduktion der Hintergrund-Anfärbung einige Zielstrukturen blockiert werden. Wie bereits ausgeführt, kommt Biotin in vielen Geweben vor und reagiert mit extrem hoher Spezifität mit Avidin. Um die ABC-Reaktion auf den biotinylierten Sekundärantikörper zu begrenzen, muss das endogene Biotin blockiert werden (Horling et al., 2012). Da der eigentliche Farbumschlag außerdem durch eine Peroxidase hervorgerufen wird, ist es weiterhin notwendig, endogene Peroxidasen zu blockieren (Streefkerk, 1972). Eine Fehlreaktion durch den Sekundärantikörper mit bereits zuvor im Gewebe vorhandenen Immunglobulinen kann durch die Applikation von Normalserum verhindert werden. Bei Normalserum handelt es sich um ein genormtes Serum des Tiers, in dem der Sekundärantikörper hergestellt wurde (Fritschy, 2008).

1.8.2.2 Auswahl der immunhistochemischen Zielmoleküle

Mit der Methodik der Immunhistochemie lässt sich eine Vielzahl von Zielproteinen analysieren. Innerhalb dieser Arbeit wurde ein zweizeitiges Vorgehen definiert: Zunächst wurden alle Thromben mittels der zuvor vorgestellten Hämatoxylin-Eosin-Färbung bearbeitet und die klinischen Fragestellungen anhand dessen getestet. Wie unter der 1.8.1 beschrieben lassen sich im Thrombus-Material vorwiegend Leukozyten, Erythrozyten und Fibrin/Thrombozyten als separate Fraktionen differenzieren.

Aufgrund der im Verlauf entwickelten Ergebnisse diente die Immunhistochemie als Bestätigungstest innerhalb der gleichen Arbeit. Es wurde daher ein Antikörper gegen

Leukozyten (*Cluster of differentiation 45*, CD45) gewählt. Angesichts der bereits erwähnten Hinweise aus der Grundlagenforschung (Engelmann et al., 2012; Fuchs et al., 2010; Massberg et al., 2010) im Hinblick auf eine Thrombogenität der Elastase von neutrophilen Granulozyten wurde eine Spezialfärbung gegen Neutrophilen Elastase (NE) ergänzt. Um die Fraktion von Fibrin/Thrombozyten weiter zu differenzieren, erfolgte außerdem eine Färbung gegen Fibrinogen.

2 Fragestellung & Prüfplan

1. Entwicklung und Etablierung einer Methodik zur histologischen Aufarbeitung und Charakterisierung der Zusammensetzung von Thromben im ischämischen Schlaganfall im Rahmen der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.
2. Vertiefende Charakterisierung der histologischen Zusammensetzung in der Immunhistochemie.
3. Statistische Testung einer Assoziation der Thrombus-Zusammensetzung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit folgenden klinischen Variablen:
 - a. Verschluss-Lokalisation
 - b. Hirninfarkt-Ätiologie (definiert nach TOAST-Kriterien)
 - c. Klinische Symptomatik (definiert nach NIHSS)
 - d. Weitere explorative Tests: Hyperdenses Mediazeichen in der Computertomographie, Erfolg der Prozedur (definiert nach TICl), Vorangegangene Lysetherapie
4. Bestätigung und vertiefende Charakterisierung der zuvor in 3 statistisch signifikant getesteten Assoziationen in der Immunhistochemie.

3 Material und Methodik

3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 56 Thromben von 55 Patienten untersucht, die im Zeitraum von Oktober 2010 bis August 2011 in der Abteilung für Neuroradiologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München notfallmäßig mit einer mechanischen Rekanalisation behandelt wurden. Sie wurden anschließend entweder auf der interdisziplinären Intensivstation und / oder in der neurologischen Klinik auf der *Stroke Unit* weiter behandelt.

3.2 Aufbereitung der Thromben

Postinterventionell wurden die Thromben in einer Formaldehydlösung (3,5%-3,7%, Fischer, Saarbrücken, Deutschland) fixiert. Nach 24h-48h wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung in eine 70%-Ethanol-Lösung überführt und in Paraffin gebettet. Zunächst wurde dafür dem Gewebe mit einer aufsteigenden Xylol-Alkoholreihe das Wasser entzogen, um es dem Paraffin zugänglich zu machen. Anschließend wurde heißes Paraffin auf das Gewebe gegossen, wobei vorher darauf geachtet wurde, die Thromben der Länge nach zu positionieren, um eine möglichst große Schnittfläche zu erhalten. Dies war aufgrund der teils kleinteilig fragmentierten Thromben jedoch nur bedingt möglich. Die Paraffin-Blöcke wurden anschließend mit weiterem Paraffin in eine Schnitt-Kassette geklebt. Die Einbettungsarbeiten wurden durch Renate Hegenloh, eine Technische Assistentin aus der Abteilung für Gefäßchirurgie des Klinikums rechts der Isar mithilfe des *Shandon Excelsior ES* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) sowie des *Tissue Block System TBS 88* (Medite, Burgdorf, Deutschland) durchgeführt.

Mit einem manuellen Rotationsmicrotom (HM 335 E, Microm, Walldorf, Deutschland) wurden von den Paraffinblöcken 2 µm dünne Schichten geschnitten. Da Paraffin relativ weich und nur in einem engen Temperaturfenster schnittfähig ist, mussten die Schnitte vor und zwischen den Schnitten immer wieder zur Aushärtung auf einer Kühlplatte (COP30, Medite, Burgdorf, Deutschland) bei -15°C gekühlt werden. Die geschnittenen Präparate wurden dann in ein 39°C warmes Wasserbad (TFB35, Medite, Burgdorf, Deutschland) zur faltenfreien Entfaltung überführt und schließlich auf gläserne Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) fixiert. Diese wurden anschließend über Nacht in einem Wärmeschrank (Modell 400, Memmert, Schwabach, Deutschland) bei 50°C getrocknet. Von jedem Thrombus wurden 12 Präparate hergestellt.

3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung wurde im Institut für Pathologie innerhalb der täglichen Routine durch die jeweils zuständigen technischen Assistenten vollautomatisiert durchgeführt (TST44, Medite, Burgdorf, Deutschland). Dabei wurde zunächst eine absteigende Xylol-Alkoholreihe durchlaufen, die das Paraffin entfernte und das Gewebe wasserzugänglich machte, dann die beiden Farbstoffe appliziert und abschließend die Xylol-Alkoholreihe wieder rückwärts durchlaufen, um dem Gewebe das Wasser wieder zu entziehen. Die Objektträger wurden anschließend ebenfalls automatisiert mit Eindeckmedium und Deckgläsern versehen (Promounter RCM 2000, Medite, Burgdorf, Deutschland).

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Antikörper

Zur weiteren Differenzierung der Zellzusammensetzung in den Thromben wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Im Unterschied zur HE-Färbung werden hierbei zellspezifische Moleküle mit einem eigens dafür hergestellten Antikörper markiert. Wir etablierten Färbungen gegen CD45, ein Oberflächenmolekül, das allen Leukozyten gemein ist, gegen die Neutrophilen Elastase, die durch neutrophile Granulozyten exprimiert wird, und gegen Fibrinogen. Details der verwendeten Antikörper zeigt **Tabelle 8**.

Tabelle 8: Details der verwendeten Antikörper¹

	<i>CD45</i>	<i>Neutrophilen Elastase</i>	<i>Fibrinogen</i>
Hergestellt in:	Kaninchen	Maus	Kaninchen
Spezifität:	anti-human	anti-human	anti-human
Klonalität:	Polyklonal IgG	Monoklonal IgG1, kappa, Klon NP57	Polyklonal IgG
Reagiert mit:	allen Leukozyten	Neutrophilen Granulozyten, Vorläufer von neutrophilen Granulozyten sowie einer Subpopulation von Monozyten	Fibrinogen, sowie Fibrinogenfragmente D und E
Verdünnung:	1:200	1:200	1:200
Antigendemaskierung:	Hitze	Keine	Proteinkinase K
Hersteller:	abd Serotec (Kidlington, Großbritannien)	Dako (Glostrup, Dänemark)	Dako (Glostrup, Dänemark)

¹ Angaben laut Datenblättern der Hersteller, Verdünnung in Probefärbungen ermittelt

3.4.2 Färbeprotokoll

Im Folgenden werden nun die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Färbung im Detail beschrieben.

3.4.2.1 Alkoholreihe

Analog zu den Vorgängen bei der automatisierten HE-Färbung, musste auch bei der manuell durchgeführten immunhistochemischen Färbung zunächst eine Reihe absteigend konzentrierter Alkohole durchlaufen werden, um das in der lipophilen Substanz Paraffin gebettete Gewebe wasserzugänglich zu machen. Begonnen wurde dabei mit 100% Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland), dann einer Mischung aus jeweils 50% Xylol und Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie in der Folge 100%, 96%, 70% und 50% Ethanol, das jeweils mit Wasser verdünnt wurde. Es ergaben sich so sechs Küvetten mit unterschiedlichen Chemikalien, wobei die Objektträger in der Xylol-Küvette 10 Minuten, in den anderen jeweils 5 Minuten verblieben. Aufgrund der gesundheitsgefährdenden Eigenschaften von Xylol fand diese Prozedur unter einem Abzug statt.

Anschließend wurden die Objektträger in eine Küvette mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, von engl. *phosphate buffered saline*, Dulbecco's PBS 1x, PAA, Pasching, Österreich) überführt. Es handelt es sich hierbei um eine Pufferlösung aus Wasser, Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Phosphatsalzen, die bei einem leicht alkalischen, konstanten pH von 7,4 einen dem menschlichen Blut entsprechenden osmotischen Druck besitzt. In der Folge wurden die meisten färberlevanten Chemikalien in PBS verdünnt, um die relevanten Proteine im Thrombusgewebe zu erhalten. Des Weiteren wurde zwischen den einzelnen Schritten jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen.

3.4.2.2 Antigendemaskierung

Im nächsten Schritt folgte die Antigendemaskierung. Hierfür wurden im Rahmen der Arbeit zwei verschiedene Verfahren verwendet. Zunächst beschrieben wird die Antigendemaskierung mittels Heißdampf. Dabei wurde eine Küvette, in der sich die Objektträger befanden, mit einem selbst hergestellten Citratpuffer (siehe **Tabelle 9**) gefüllt. Diese wiederum wurde dann in einem handelsüblichen Heißdampfgerät (DG 2423, Severin, Sundern, Deutschland) über 30 Minuten schonend erhitzt, was die zuvor erwünschten Proteinquerverbindungen wieder löste. Das zweite Verfahren verlief enzymatisch. Dabei wurden die Peptidbindungen mit der unspezifischen Proteinase Proteinkinase K (Merck Milipore, Billerica, Massachusetts, USA) gespalten. In einer Testreihe hatte sich dabei eine Inkubationszeit von 5 Minuten ergeben.

In den Datenblättern der Antikörper, die wir für unsere Färbungen von Fremdfirmen erwarben, war jeweils angegeben, welche Art der Antigendemaskierung sich für den entsprechenden Antikörper am ehesten eignet. So funktionierte die CD45-Färbung am besten mit einer Antigendemaskierung mittels Heißdampf und der Fibrinogen-Antikörper benötigte eine Vorbehandlung mit Proteinkinase K. Zur Anfärbung der Neutrophilen Elastase wurde keines der beiden Verfahren benötigt.

Tabelle 9: Citratpufferherstellung

1.	1000 ml Aqua dest
2.	2,9 g Trisodium Citrat (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) hinzufügen
3.	mit Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf pH 6,0 titrieren.
4.	0,5 ml Tween 20 (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) hinzufügen.

Bis hierhin wurden alle Schritte in Glasküvetten durchgeführt. Um in der Folge die teils sehr teuren Chemikalien sparsam einsetzen zu können, wurden alle Präparate mit einem hydrophoben Stift (Mini Pap Pen, Invitrogen, *Carlsbad, Kalifornien, USA*) umrandet, was es ermöglichte, nur mit wenigen Tropfen das Gewebe zu benetzen.

3.4.2.3 Blockierungsschritte

Es folgten nun mehrere Blockierungsschritte, deren Ziel es war, Proteine und Enzyme im Gewebe zu binden, die nicht dem eigentlichen Ziel der Färbung entsprechen. Zunächst zu erwähnen ist der Block der endogenen Peroxidase. Dies geschah durch Auftragen einer 0,1%-Wasserstoffperoxid-Lösung (Merck, *Darmstadt, Deutschland*) für 10 Minuten.

Anschließend erfolgte das Blockieren endogenen Biotins (**Abbildung 3**, Schritt 1). Dazu wurde das Gewebe mit einer Avidinlösung (Vector, *Burlingame, Kalifornien, USA*) für 15 Minuten benetzt (**Abbildung 3**, Schritt 2). Nachfolgend neutralisierte eine Biotinlösung (Vector, *Burlingame, Kalifornien, USA*) für weitere 15 Minuten die übrigen Avidinbindungsstellen (**Abbildung 3**, Schritt 3).

Als dritten und letzten Block pipettierten wir Normalserum auf die Objektträger, in unserem Fall je nach Antikörper Pferde- oder Ziegenserum. Dieses inkubierte in einer Verdünnung von 1:10 30 Minuten auf dem Gewebe. Nach diesen drei Schritten mit dem Ziel die Hintergrundanfärbung zu reduzieren begann nun der eigentlich spezifische Teil des Protokolls.

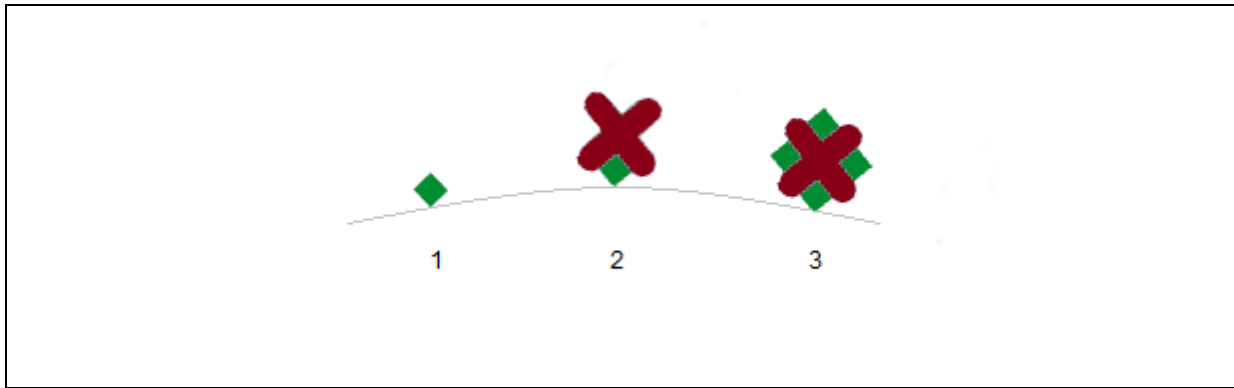


Abbildung 3: Avidin-Biotin-Block (nach Mulisch et al., 2010)

Endogenes Biotin (grün, 1) wird mit Avidin (rot, 2) blockiert. Anschließend Blockierung der freien Bindungsstellen des Avidins mit Biotin (3)

3.4.2.4 Applikation der Antikörper und ABC-Reaktion

Der an die Zielepitope bindende Primärantikörper wurde appliziert und dort über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Die Primärantikörper wurden nicht wie sonst in PBS, sondern in einer Mischung aus PBS und Tween 20 (Sigma, *St. Louis, Missouri, USA*), einem Detergenz, verdünnt. Dies erwirkte zum einen eine bessere Verteilung auf dem Objektträger und zum anderen aber auch ein leichteres Passieren der lipophilen Zellmembranen. Bei allen Antikörpern wurden verschiedene Konzentrationen ausgetestet, in allen drei Fällen erwies sich eine Verdünnung von 1:200 als am besten wirksam.

Am nächsten Tag folgte dann der Sekundärantikörper, der sich gegen den F_c -Teil des Primärantikörpers richtete. In unserem Fall handelte es sich um Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Antikörper. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden und die Konzentration ebenfalls 1:200.

Das durch die beiden Antikörper hervorgerufene Signal wurde nun mittels der oben erläuterten Avidin-Biotin-Complex-Methode verstärkt. Das nun durch zwei Antikörper hervorgerufene Signal am Epitop musste weiter verstärkt werden. Dafür musste zunächst Avidin und das mit der Peroxidase gekoppelte Biotin gemischt und dann 15 Minuten präinkubiert werden. Hierbei bildeten sich bereits erste Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe. Anschließend wurde das Gemisch für 45 Minuten auf den Objektträger gegeben, wodurch die Komplexe an den Sekundärantikörper banden und der angesprochene Verstärkungseffekt einsetzte.

3.4.2.5 Färbung und Gegenfärbung

Um diesen nutzen zu können, kombinierten wir den Avidin-Biotin-Complex mit einem Farbstoff. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Dako, *Glostrup, Dänemark*) wurde als chromogenes Substrat in

einen Puffer aus Imidazol-Salzsäure und Wasserstoffperoxid gelöst. Wenn man hiermit das Präparat benetzte, wurde DAB durch die am Antigen lokalisierten Peroxidasen enzymatisch oxidiert und bildete ein unlösliches braunes Endprodukt. Dieser Prozess war hoch zeitsensibel und führte bei zu langer Einwirkung zu starker unspezifischer Hintergrundanfärbung, weshalb er unter lichtmikroskopischer Kontrolle stattfand. Leitungswasser unterbrach die Reaktion.

Anschließend wurden die Präparate für 5 Minuten in Hämatoxylin (Invitrogen, *Carlsbad, Kalifornien, USA*) getaucht und gegengefärbt. Ziel dieser Gegenfärbung war es, diejenigen Zellen und Strukturen sichtbar zu machen, die nicht bereits durch die spezifische Färbung dargestellt wurden, um letztere besser einordnen zu können.

3.4.2.6 Alkoholreihe und Eindeckelung

Abschließend mussten die fertig gefärbten Präparate noch haltbar gemacht werden. Dies geschah mittels eines hydrophoben Mediums, auf das anschließend Deckgläschen luftblasenfrei gegeben werden. Um dieses Medium anwenden zu können, musste zuvor dem Präparat Wasser entzogen werden, indem die zu Beginn durchgeführte Alkoholreihe rückwärts durchlaufen wurde.

3.5 Auswertung

Zur Auswertung der histologischen Färbungen wurden verschiedene Verfahren angewandt. Zellgebundene Färbungen wie die CD45 und NE wurden manuell lichtmikroskopisch ausgezählt. Dies war mit den HE- und Fibrinogen-Färbungen allerdings nicht möglich, da hier Flächenberechnungen relevant waren. In diesen Fällen digitalisierten wir alle Objektträger und konnten die Parameter anschließend mittels Farbsegmentation und Grauwertbestimmung quantifizieren. Die manuelle lichtmikroskopische Auszählung kam bei der Pan-Leukozyten-Färbung (CD45) sowie bei der Anfärbung der Neutrophilen Elastase zum Einsatz. Dabei wurden pro Präparat 5 subjektiv repräsentative Gesichtsfelder bei einem 40-fach vergrößernden Objektiv sowie einem 10-fach vergrößernden Okular, insgesamt also einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt und anschließend ein Mittelwert gebildet. Es wurde darauf geachtet, bei ggf. heterogenen Thromben Areale besonders hoher oder niedriger Zellzahl möglichst adäquat auszugleichen.

Für flächige Färbungen bedurfte es jedoch einer anderen Auswertungsmethodik. Daher wurden die Präparate eingescannt und mittels der Software Photoshop CS4 (Adobe, San Jose, Kalifornien, USA) aufbereitet. Wir markierten zunächst mittels der Funktion „Farbbereich“ alle diejenigen Farbwerte, die wir einer bestimmten Gruppe zuordneten. Dies führten wir im Falle der HE-Färbung für die Bereiche rot (Erythrozyten), rosa (Fibrin/Thrombozyten) und blau (Zellen) durch, im Falle der Fibrinogen-Färbung für den Bereich dunkelbraun. Ein automatisches Makro wurde hier händisch für jeden Thrombus angepasst und eine doppelte Zuordnung auf zwei Farbbereiche unterlassen. Anschließend kopierten wir die jeweiligen Bereiche in eine neue Ebene und setzten den Farbwert aller Pixel mit der Funktion „Farbe ersetzen“ auf weiß, sodass eine Ebene mit ausschließlich weißen Pixeln entstand.

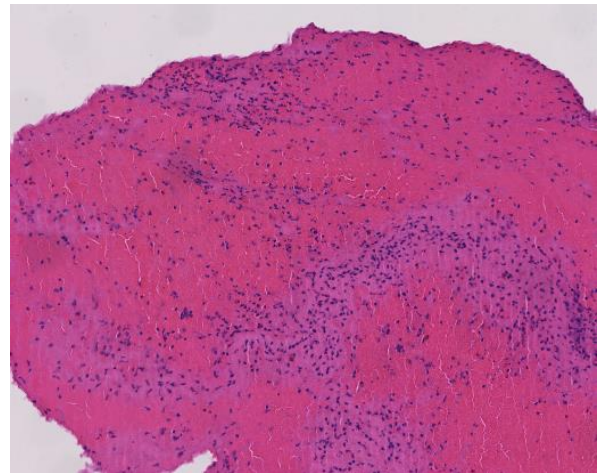


Abbildung 4: Ausschnitt eines HE-Präparates

Außerdem markierten wir in einem weiteren Farbbereich alle Pixel des Thrombus und schrieben in einer neuen Ebene mit der gleichen Funktion „Farbe ersetzen“ alle kopierten Pixel auf schwarz um. Wir konnten nun die jeweiligen auf weiß gesetzten Ebenen über die den gesamten Thrombus umfassende schwarze Ebene legen. Nun wurde mit der Funktion „Verschieben“ lediglich der Teil des Bildes markiert, der ursprünglich der schwarzen Ebene entsprach. Die Funktion „Histogramm“ zeigte nun einen Grauwert zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß) an, der prozentual umgerechnet das Verhältnis von weißer zu schwarzer Fläche

und damit den Anteil des jeweiligen Targets an der Gesamtfläche darstellte. **Abbildung 4** (Ursprungsbild) und **Abbildung 5** (Farbsegmentation) verdeutlichen den Prozess.

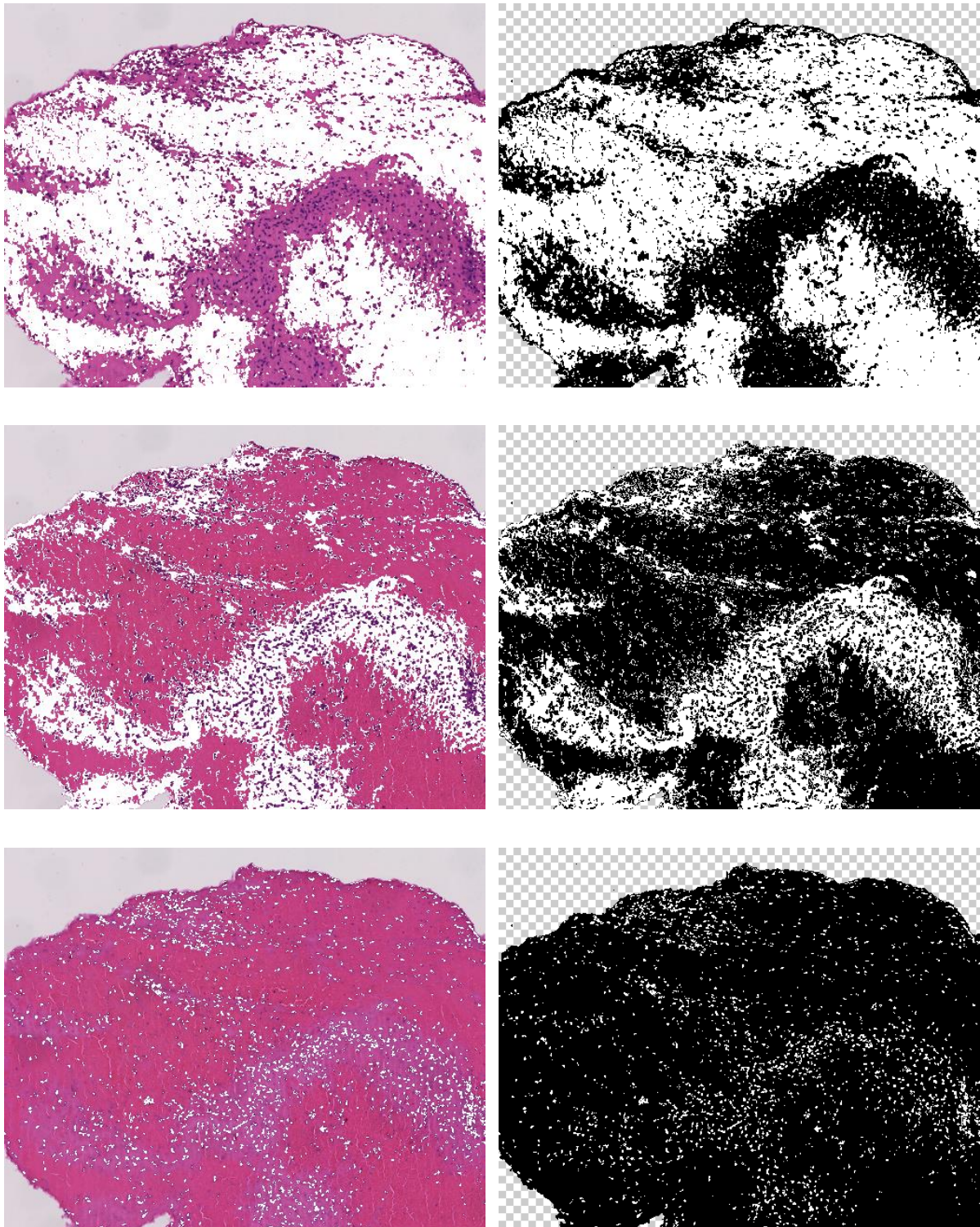


Abbildung 5: Farbsegmentation mittels Adobe Photoshop CS4

Verdeutlichung des Auswertungsprozesses. In der ersten Reihe sind die roten Pixel gleich weiß gesetzt worden, in der zweiten die rosafarbenen und in der dritten die blauen Pixel. In der linken Spalte wurde die weiße Ebene zur Qualitätskontrolle über die Grundfärbung gelegt, in der rechten Spalte über die schwarze Ebene aller Pixel. Aus den Bildern der rechten Spalte wurde der Grauwert bestimmt, um den prozentualen Anteil an der Gesamtfläche zu ermitteln.

Außerdem berechneten wir die Fläche der Schnitte (exemplarisch in der Fibrinogen-Färbung) und bedienten uns dabei des gleichen Prinzips. Wir erstellten dafür zunächst eine neue weiße Ebene. Anschließend verwendeten wir die gleiche schwarze Ebene wie für die Fibrinogen-Auswertung, in der alle Pixel des Thrombus auf schwarz gesetzt waren. Aus dem Grauwert dieser beiden Ebenen ließ sich nun prozentual berechnen, wie groß der Bereich des Thrombus im Vergleich zum gesamten Bild war. Ausgehend von den Bildmaßen in Pixeln konnten wir nun schlussfolgern, wie vielen Pixeln der Thrombus entsprach.

Eine wichtige Voraussetzung für diese Technik war, dass alle Bilddateien mit 5-facher Objektivvergrößerung aufgenommen wurden und die Pixel in verschiedenen Bildern so der gleichen realen Größe entsprachen. Hierbei entsprach 1mm in der Horizontalen oder Vertikalen stets genau der Länge von 550 Pixeln und 1mm² der Fläche von 302.500 Pixeln (= 550 x 550 Pixeln).

Mit der Funktion „Pixel zählen“ war es außerdem möglich, die auf den jeweiligen Ebenen befindlichen Farbbereiche außerhalb der Methodik der Grauwertanalyse zu zählen und so eine Qualitätskontrolle innerhalb des Programms sicherzustellen.

3.6 Qualitative Histologie

Neben der quantitativen Histologie wurden die Thromben auch qualitativ analysiert, insbesondere im Hinblick auf Endothelialisierung und andere Organisationszeichen. In der HE-Färbung stellt sich Endothelialisierung als leicht dunklere Kante mit randständigen Fibroblasten dar. Ebenfalls wurde nach Gefäßsprossungen als Zeichen einer beginnenden Rekanalisation gesucht. Des Weiteren achteten wir auf Zeichen für eine Kalzifizierung.

3.7 Beispielfall

Beispielhaft folgt in **Abbildung 6** der Thrombus eines kardioembolischen Infarkts der rechten A. cerebri media im M1-Segment in allen 4 angefertigten Färbungen.

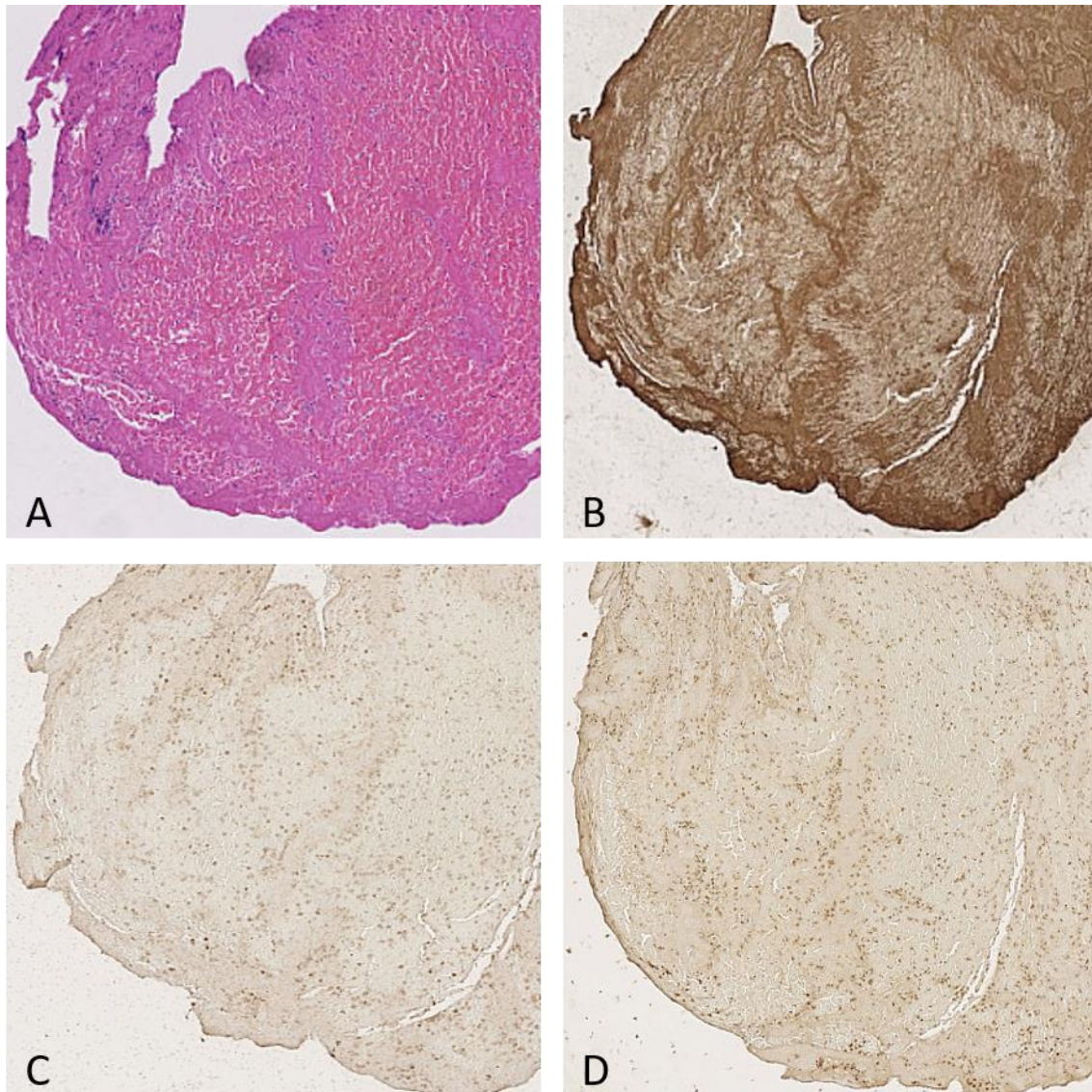


Abbildung 6: Beispieltrombus

Thrombus in 2,5-facher Objektiv-Vergrößerung. A: Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Es lassen sich rote, rosafarbene und blaue Anteile unterscheiden. Die roten Anteile entsprechen den Erythrozyten, die rosafarbenen Fibrin/Leukozyten und die blauen Leukozyten. B: Fibrinogen-Färbung. Die dunkelbraunen Anteile entsprechen Fibrinogen. C: Neutrophilen-Elastase-Färbung. Die dunkelbraune, zellgebundene Anfärbung entspricht Neutrophilen Elastase exprimierenden Zellen. D: CD45-Färbung. Die dunkelbraune, zellgebundene Anfärbung entspricht Leukozyten.

3.8 Neurologische und Neuroradiologische Datenerhebung

Es wurde eine Reihe von klinischen Daten in Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe in der Klinik und Poliklinik für Neurologie und der Abteilung für Neuroradiologie erhoben.

Folgende Daten wurden aus Arztbriefen der neurologischen Klinik extrahiert. Die Daten wurden außerdem durch die Assistenzärzte Dr. Regina Feurer und Dr. Dominik Sepp sowie durch den zuständigen Oberarzt PD Dr. Holger Poppert revalidiert.

- Applikation einer intravenösen Lysetherapie
- Wahrscheinliche Schlaganfallätiologie nach TOAST-Klassifikation
- NIHSS vor Intervention und bei Entlassung

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden durch die Doktorandin Lara Rehwald mRS-Werte aus den Arztbriefen der Rehabilitationseinrichtungen sowie aus Follow-Up-Befragungen nach 3 und 12 Monaten erhoben.

Der zuständige Oberarzt Dr. Tobias Boeckh-Behrens aus der Abteilung für Neuroradiologie stellte neuroradiologische Daten zur Verfügung. Im Einzelnen sind dies:

- Vorliegen eines hyperdensen Mediazeichens
- Rekanalisationsergebnis nach TICI-Score

3.9 Statistische Tests

Da nicht von normalverteilten Stichproben ausgegangen werden kann, wurde zur Anfertigung von Gruppenanalysen zwischen kategorialen (Verschlusslokalisation, TOAST, TICI) oder nominalen (Lysetherapie, Hyperdense Arterienzeichen) Werten einerseits und den quantitativen Werten aus der Histologie andererseits der Mann-Whitney-U-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Im Falle eines signifikanten Testergebnisses bei $n > 2$ Gruppen erfolgte eine Post-Hoc Analyse mittels paarweiser Vergleiche der Gruppen. Mit der standardisierten Teststatistik z erfolgte anschließend die Berechnung der Effektstärke r (Cohen, 1988). Die Effektstärken wurden kategorisiert nach

Tabelle 10.

Tabelle 10: Klassifizierung der Effektstärke r (Cohen, 1988)

$r = 0,10-0,29$	Schwacher Effekt
$r = 0,30-0,49$	Mittlerer Effekt
$r \geq 0,50$	Starker Effekt

Bei Testungen zwischen anderen quantitativen Werten (NIHSS) und den Histologiedaten wurden Rangkorrelationen nach Spearman-Rho angewendet. Das Signifikanzniveau wurde in beiden Fällen auf $p < 0,05$ festgelegt. Alle statistischen Analysen wurden mit IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk, New York, USA) durchgeführt.

Gruppenanalysen können mit Boxplot-Grafiken dargestellt werden (siehe **Abbildung 7**). Die Box wird dabei von der 25. und 75. Percentile gebildet und bildet so den Interquartilenabstand, der dicke mittlere Strich stellt den Median dar. Die obere und untere Antenne, auch *Whisker* genannt, repräsentieren 0% und 100%, sofern diese Werte innerhalb des 1,5-fachen-Interquartilenabstands unter der 25. bzw. über der 75. Percentile liegen. Liegen Werte außerhalb dieses Bereiches, werden sie als Ausreißer bzw. extreme Ausreißer klassifiziert. Ausreißer werden durch Kreise, extreme Ausreißer durch Sterne markiert.

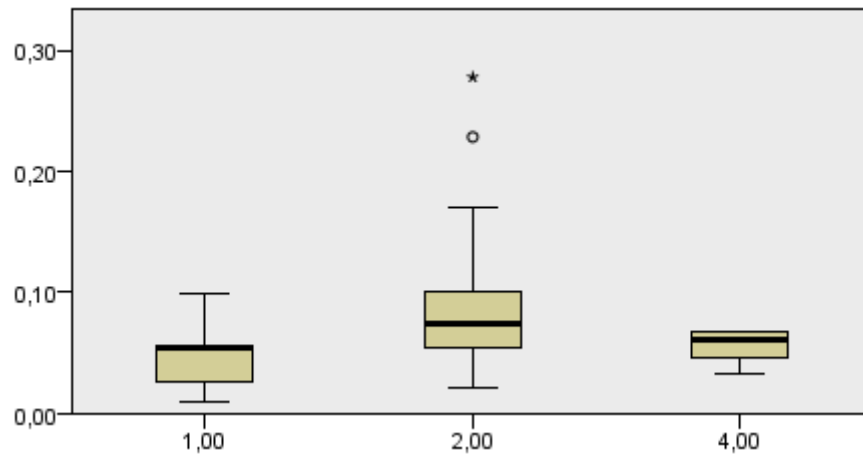


Abbildung 7: Beispiel einer Boxplot-Grafik

Die Statistiken in dieser Arbeit sind von Lynne Stecher, PhD vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München geprüft worden.

3.10 Liste der verwendeten Geräte, Materialien, Software und Chemikalien

Tabelle 11 zeigt die Liste der verwendeten Geräte, **Tabelle 12** die verwendeten Materialien, **Tabelle 13** die verwendete Software und **Tabelle 14** die verwendeten Chemikalien.

Tabelle 11: Verwendete Geräte

<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Beschreibung</i>
Axio Observer.Z1	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)	Mikroskop
Axioplan	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)	Mikroskop
COP30	Medite (Burgdorf, Deutschland)	Kühlplatte
DG 2423	Severin (Sundern, Deutschland)	Heißdampfer
Microm HM 335 E	Microm International (Walldorf, Deutschland)	Microtom
Modell 400	Memmert (Schwabach, Deutschland)	Wärmeschrank
NanoZoomer XR	Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan)	Mikroskop
Paraffin-Streckbad TFB35	Medite (Burgdorf, Deutschland)	Wasserbad
Promounter RCM 2000	Medite (Burgdorf, Deutschland)	Eindeckelungsautomat
Shandon Excelsior ES	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	Einbettungsautomat
TBS 88	Medite (Burgdorf, Deutschland)	Paraffinblockierungs-Automat
TST 44 C	Medite (Burgdorf, Deutschland)	Färbeautomat

Tabelle 12: Verwendete Materialien

<i>Produktbezeichnung (Art-Nr.)</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Beschreibung</i>
Dosatest (35309.606)	VWR BDH Prolab (Radnor, Pennsylvania, USA)	pH-Indikatorstreifen
Feather Microtome Blade S35 (207500000)	pfm medical (Köln, Deutschland)	Microtom-Messer
Menzel-Gläser	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	Deckgläser
Mini Pap Pen (00-8877)	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)	Hydrophober Stift
Superfrost Plus (J1800AMNZ)	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	Objektträger

Tabelle 13: Verwendete Software

<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Beschreibung</i>
NDP View 1.2.25	Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan)	Bildbearbeitung
Photohop CS4	Adobe (San Jose, Kalifornien, USA)	Bildbearbeitung
IBM SPSS Statistics	IBM (Armonk, New York, USA)	Statistik

Tabelle 14: Verwendete Chemikalien

<i>Produktbezeichnung (Art-Nr.)</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Beschreibung</i>
Anti-Mouse IgG biotinyliert (BA-2000)	Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)	Sekundärantikörper
Anti-Rabbit IgG biotinyliert (BA-1000)	Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)	Sekundärantikörper
Avidin / Biotin Blocking-Kit (SP-2001)	Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)	Blocking-Kit
Dulbecco's PBS 1x (H15-002)	PAA (Pasching, Österreich)	Puffer
Ethanol (108543)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	
Formaldehyd-Lösung 3,5%-3,7% (27244)	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)	Fixierungsmittel
Hematoxylin Ready to use (008011)	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)	Farbstoff
Liquid DAB+ Chromogen (K3468)	Dako (Glostrup, Dänemark)	Farbstoff
Monoclonal Mouse Anti-Human Neutrophil Elastase, Clone NP57 (M0752)	Dako (Glostrup, Dänemark)	Primärantikörper
Normal Goat Serum (S-1000)	Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)	Normalserum
Normal Horse Serum (S-2000)	Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)	Normalserum
Polyclonal Rabbit Anti-Human CD45 (AHP1726)	AbD Serotec (Kidlington, Großbritannien)	Primärantikörper
Proteinkinase K (107393)	Merck Milipore (Billerica, Massachusetts, USA)	Antigendemaskierung
Roti-Histokitt (6638.2)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Mounting Medium
Salzsäure (109058)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	
Trisodium Citrat (S1804)	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)	
Tween 20 (P9416)	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)	Detergenz
Vectastain ABC-Kit Elite (PK-6100)	Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)	ABC-Kit
Wasserstoffperoxid 30 % (107209)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	
Xylo (108684)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	

4 Ergebnisse

4.1 Basischarakteristika

Tabelle 15 zeigt die Basischarakteristika, **Tabelle 16** die Verteilung der therapeutischen Daten der eingeschlossenen Fälle.

Tabelle 15: Übersicht über die Verteilung der Basischarakteristika

<i>Kategorie</i>	<i>Wert</i>
Thromben, n	56
Patienten, n	55
Alter in Jahren, Median (Spanne)	70 (18 – 90)
Männliches Geschlecht, n (%)	26 (47%)
Dauer des stationären Aufenthalts in Tagen, Median (Spanne)	11 (2 – 45)
Lokalisation des Infarktes (n=56)	
Vorderes Stromgebiet, n (%)	42 (75%)
Hinteres Stromgebiet, n (%)	13 (23%)
Sinusvenenthrombose, n (%)	1 (2%)
TOAST (n=55)	
Arterioarteriell-embolisch, n (%)	7 (13%)
Kardioembolisch, n (%)	29 (55%)
Lakunär, n (%)	0 (0%)
Andere bekannte Ursache, n (%)	7 (13%)
- davon durch Dissektion, n (%)	6 (11%)
- davon durch komprimierenden Tumor, n (%)	1 (2%)
Unbekannte Ursache, n (%)	10 (19%)
NIHSS	
bei Aufnahme in Punkten (n=50), Median (Spanne)	12 (2 – 25)
bei Entlassung in Punkten (n=49) , Median (Spanne)	3 (0 – 23)
Differenz in Punkten (n=49); Median (Spanne)	7 (-12 – 21)
mRS (n=44)	
Nach 3 Monaten in Punkten, n (%)	≤ 2: 22 (50%)
Nach 12 Monaten in Punkten, n (%)	≤ 2: 20 (47%)
Tod nach 12 Monaten, n (%)	15 (35%)

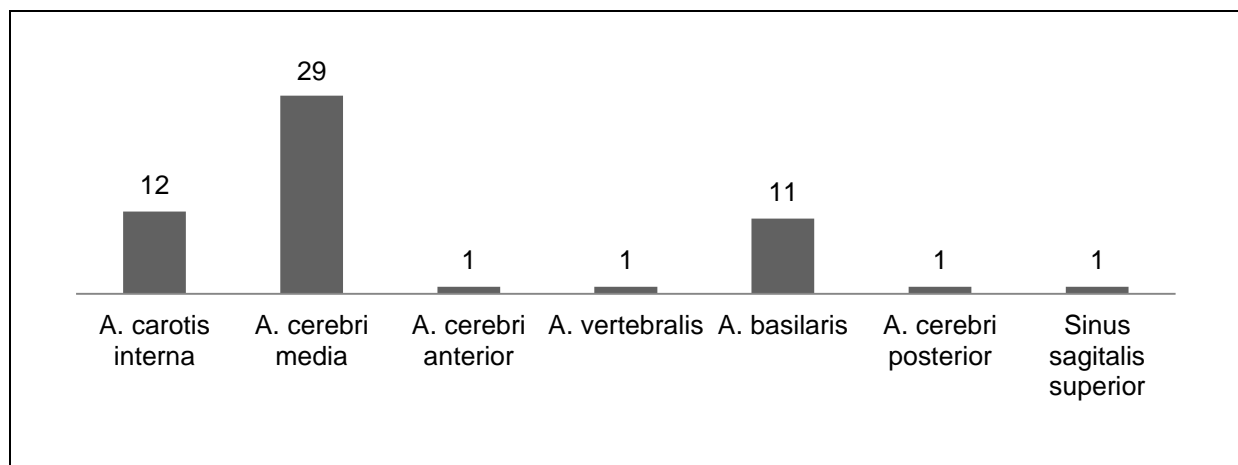


Diagramm 1: Verteilung nach verschlossenem Gefäß

Die weit überwiegende Anzahl der Fälle waren Verschlüsse des vorderen Stromgebietes (42, 75%), 13 Verschlüsse aus dem hinteren Stromgebiet wurden rekanalisiert. In einem Fall wurde eine Sinusvenenthrombose behandelt. Die genaue Verteilung zeigt **Diagramm 1**.

Tabelle 16: Übersicht über die Verteilung therapeutischer Daten

Kategorie	Wert
Zeit bis zur Behandlung in Minuten (n=42), Median (Spanne)	200 (15 – 625)
Rekanalisationszeit in Minuten (n=54) , Median (Spanne)	45 (10 – 180)
Gesamtzeit in Minuten (n=42) , Median (Spanne)	258 (25 – 664)
Zahl der Manöver (n=53), Median (Spanne)	3 (1 – 12)
intravenöse Lysetherapie (n=53), n (%)	28 (53%)
Hyperdenses Arterienzeichen (n=35), n (%)	12 (34%)
TICI-Score nach Intervention (n=56)	
1, n (%)	1 (2%)
2a, n (%)	1 (2%)
2b, n (%)	16 (29%)
3, n (%)	38 (68%)

Eine Übersicht über die Überschneidung der verschiedenen Stichproben und Variablen findet sich im Anhang.

4.2 Qualitative Histologie

4.2.1 Endothelialisierung & Gefäßneubildung

In den meisten Thromben (n=45, 80%) konnten Zeichen von beginnender Endothelialisierung festgestellt werden. Dabei war jeweils nur ein Teil der Oberfläche der Thromben endothelialisiert. Das Phänomen trat unabhängig von Lokalisation und Schlaganfallgenese nach TOAST-Klassifikation auf. Beispiele zeigt **Abbildung 8**.

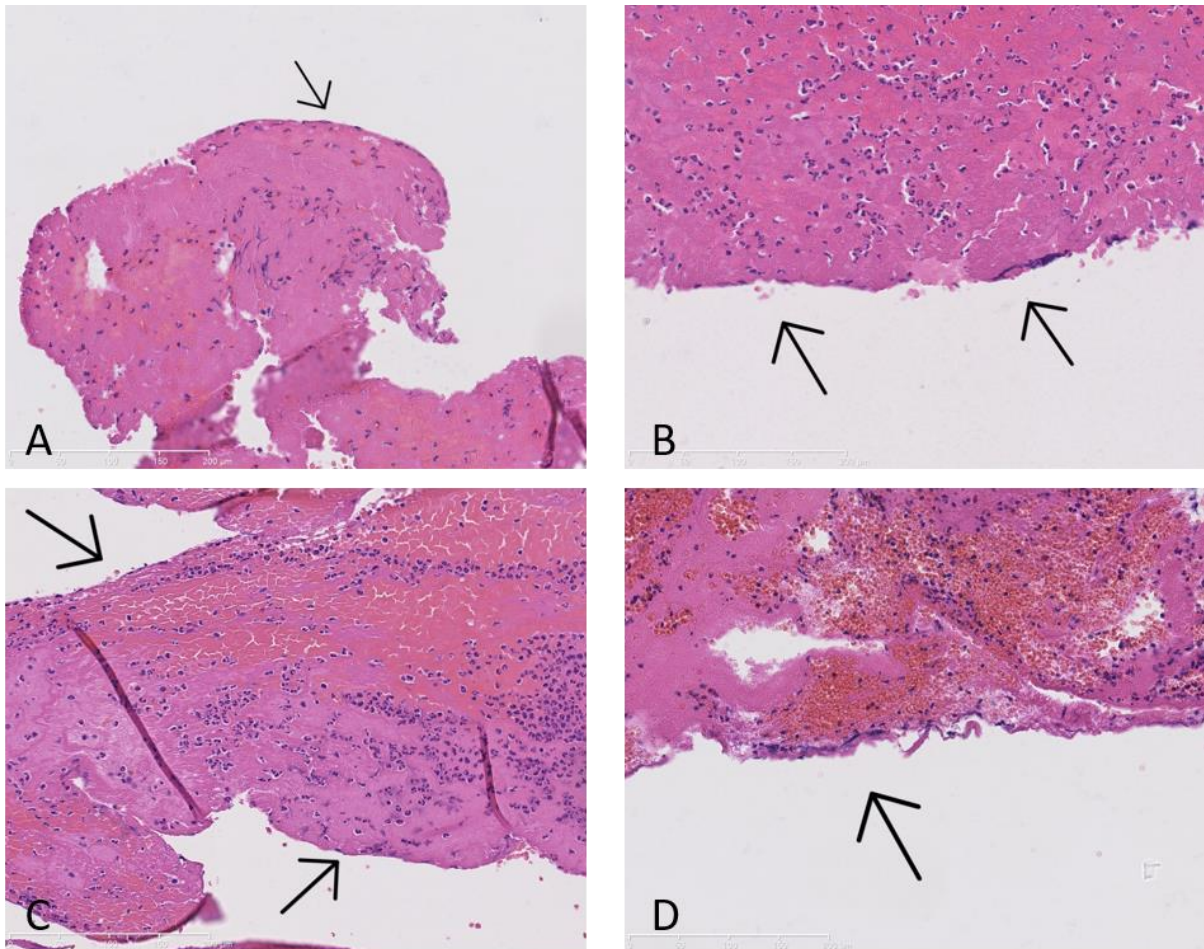


Abbildung 8: Endothelialisierung in HE-Färbung

Endothelialisierungszeichen in 4 Thromben. Die Ränder sind dunkler angefärbt und mit ovalen Fibroblasten besetzt (schwarze Pfeile). A: ein kardioembolischer Thrombus aus der A. cerebri media (M1). B: ein Dissektions-Thrombus aus der A. cerebri media (M2). C: ein arterioarteriell-embolischer Thrombus aus der A. carotis interna. D: ein Thrombus unbekannter Ätiologie aus der A. basilaris. In allen Fällen 20-fache Objektivvergrößerung, Maßstabsbalken 200 µm.

In 18 Fällen (32%) zeigten sich weiterhin beginnende Gefäßneubildungen und endothelialisierte Furchen als Zeichen einer weiteren Thrombusorganisation. Auch dies ließ sich unabhängig von Stromgebiet und mutmaßlicher Infarktetiologie beobachten. Beispiele zeigt **Abbildung 9**.

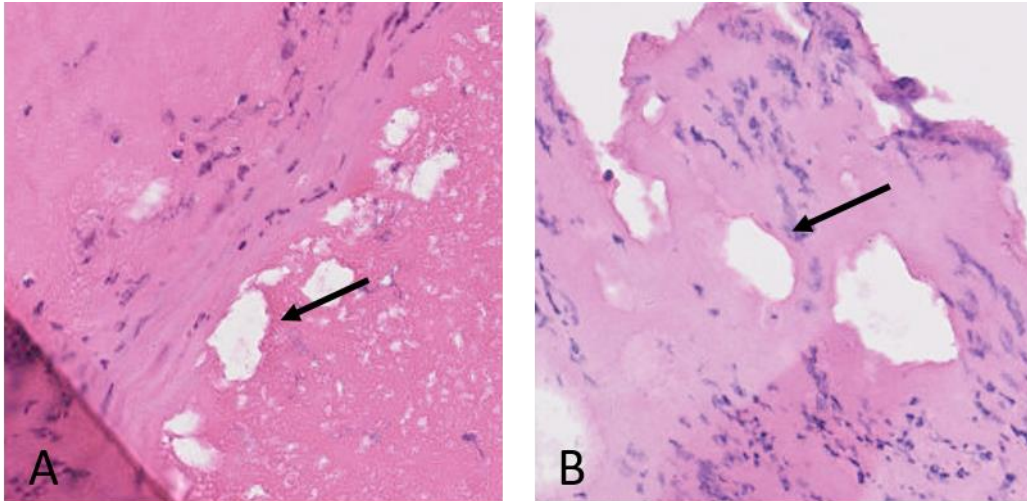


Abbildung 9: Gefäßneubildung in Thromben

Gefäßneubildung, mit Pfeilen markiert, beispielhaft innerhalb von 2 Thromben. A: Ein arterio-arteriellembolischer Thrombus sowie B: Ein kardioembolischer Thrombus. Beide Thromben wurden aus der A. cerebri media geborgen. 10-fache Objektivvergrößerung.

4.2.2 Kalzifizierung

In einem Fall fanden wir ein Präparat mit kalzifiziertem Kern, dies zeigt **Abbildung 10**.

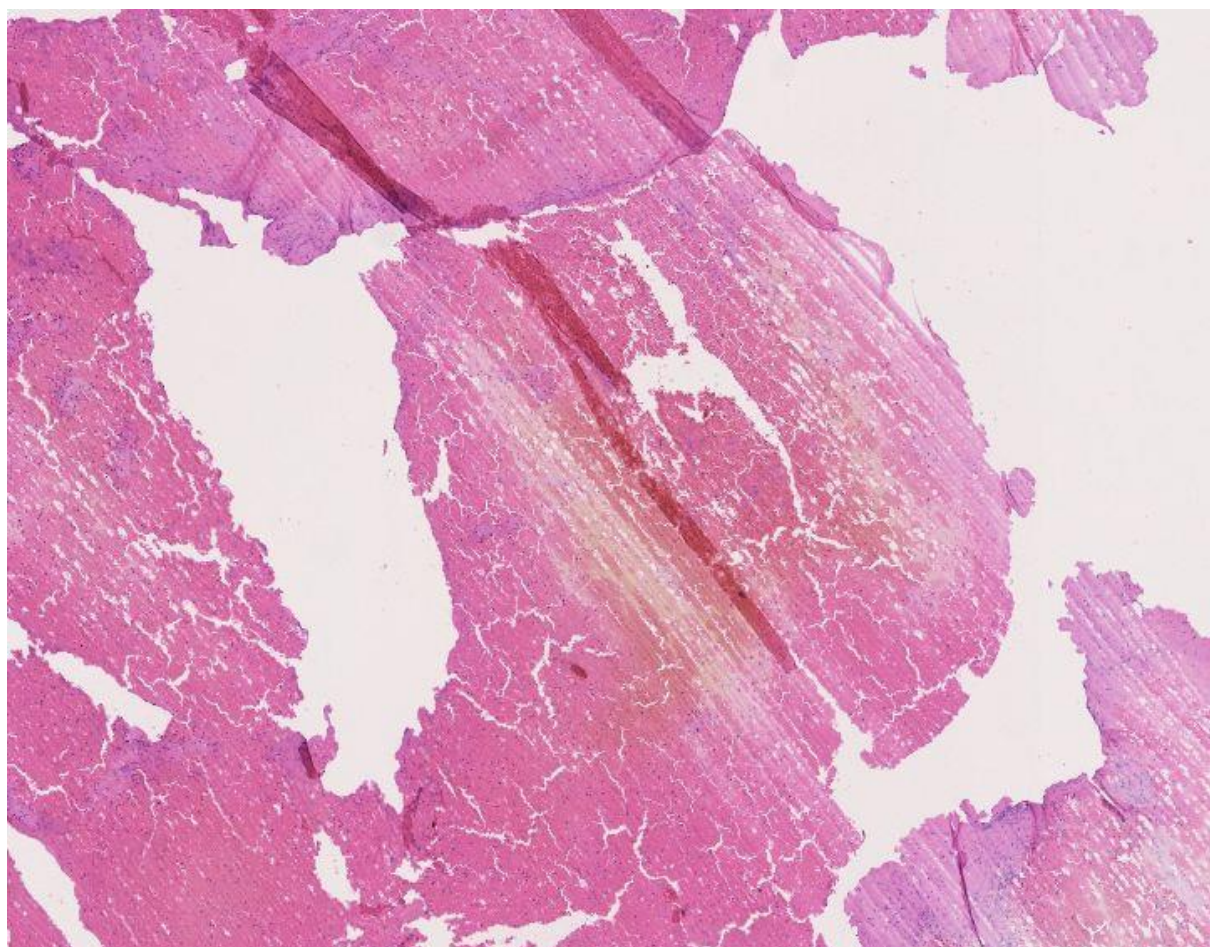


Abbildung 10: Kalzifizierung in HE-Färbung

Neben den überall beobachteten Erythrozyten-, Leukozyten- und Fibrin-Anteilen finden sich eingeschlossene gelbgefärbte Kalkbestandteile. Der extrem harte Thrombus war diffizil zu schneiden, was die gestreiften Schnittartefakte bedingt.

4.2.3 Plaque

In einem Fall wurde bei einer bereits wegen eines Schlaganfalls stationär aufgenommenen Patientin eine erneute klinische Verschlechterung mit fokalneurologischer Symptomatik beobachtet. Notfallmäßig innerhalb von nur wenigen Minuten wurde eine CT-Angiographie durchgeführt und das Gefäß in der Neuroradiologie rekanalisiert. Darüber hinaus wurde in der Folge die symptomatische Stenose der A. carotis interna chirurgisch entfernt. Auch diese artherosklerotische Plaque konnte in unsere Arbeit als Sonderfall mit eingeschlossen werden. Es zeigen sich luminalseits eine Endothelschicht, im Gewebe zahlreiche Fibroblasten. Luminalseits auch einzelne Leukozyten. **Abbildung 11** zeigt das histologische Präparat.

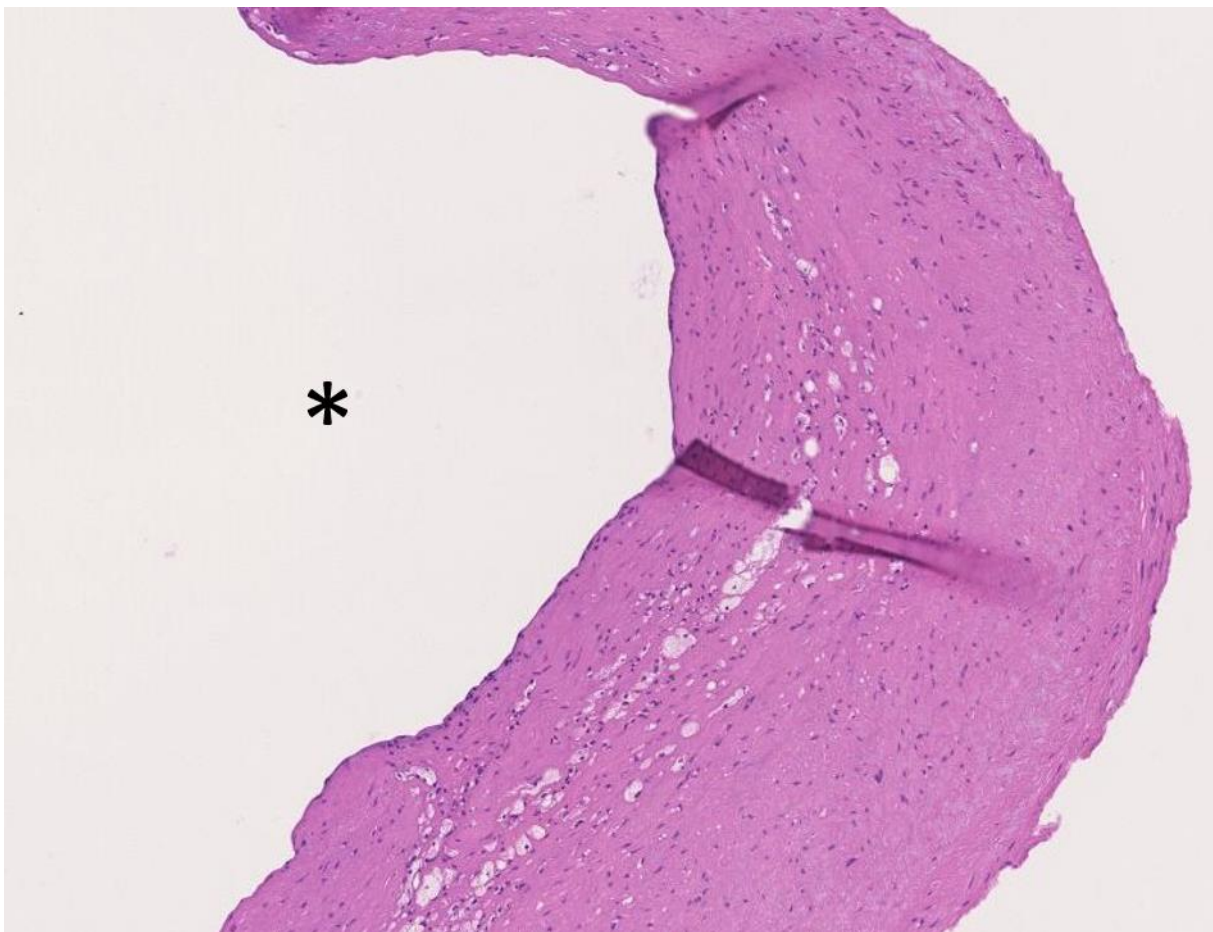


Abbildung 11: Artherosklerotische Plaque in HE-Färbung

Die Seite des Lumens ist mit einem Stern markiert. In dem aus einer Endarterioektomie der A. carotis interna stammenden Präparat erkennt man luminalseits eine deutliche Endothelschicht sowie im gesamten Gewebe zahlreiche Fibroblasten. Luminalseits vereinzelt Leukozyten.

4.2.4 Sinusvenenthrombose

In einem Fall wurde versucht, eine verschlossene Sinusvene mit konsekutiver Stauungsblutung zu rekanalisieren. Auch wenn Thrombusmaterial geborgen werden konnte, war keine funktionell relevante Rekanalisation erreichbar. Die Erstdiagnose der Sinusvenenthrombose lag zu diesem Zeitpunkt bereits 6 Wochen zurück und erst einer erneuten klinischen Verschlechterung folgte die Prozedur. **Abbildung 12** zeigt das histologische Präparat.

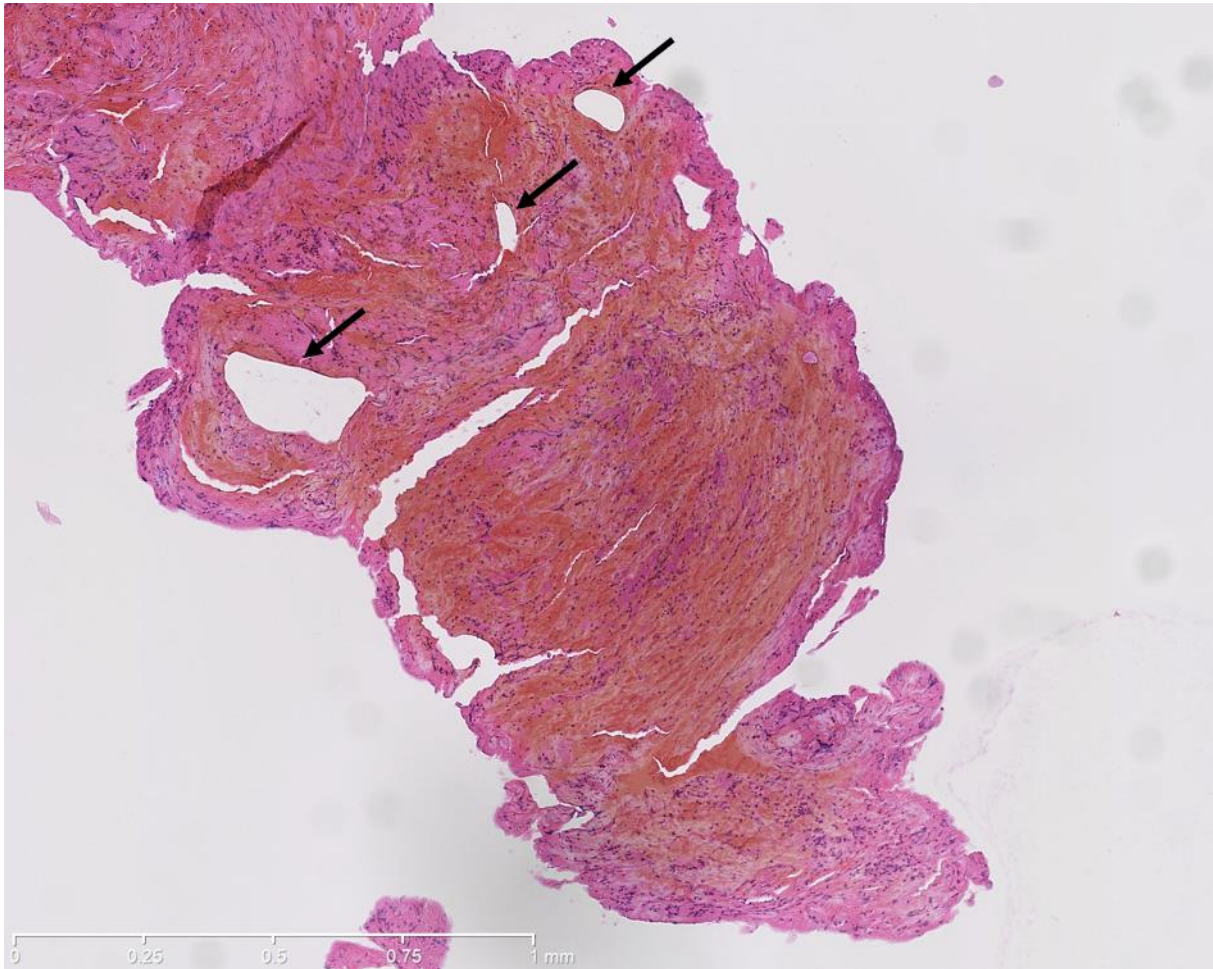


Abbildung 12: Sinusvenenthrombose in HE-Färbung

Der Thrombus ist insgesamt sehr reich an Leukozyten und dicht gepresst. Die erythrozytären Anteile wirken orange-blass, im Sinne einer Hämosiderin- bzw. Hämatoidin-Transformation bei fortgeschrittener Organisation (Irninger, 1963). Innerhalb des Thrombus haben sich endothelialisierte Furchen und Spalten gebildet im Sinne einer Gefäßneubildung (Pfeile). 5-fache Objektivvergrößerung, Maßstabsbalken 1 mm.

4.3 Quantitative Histologie

4.3.1 Validierung der Methode

Die Adjustierung der Thrombusbestandteile in verschiedene Kategorien durch die automatische Thrombusseparation wurde von mehreren Untersuchern (Michael Mehr, Dr. med. Tobias Boeckh-Behrens) unabhängig voneinander kontrolliert. Im Falle diskrepanter Bewertung wurde anschließend ein Konsens erzielt.

Eine Auswertung des Anteils der jeweiligen Thrombusbestandteile an der Gesamtfläche wurde wie in der Methodik definiert regelhaft durch eine Grauwertanalyse aufgeführt. Darüber hinaus wurde mit der Funktion „Pixel zählen“ des Programms Photoshop CS 4 (Adobe, San Jose, Kalifornien, USA) eine zweite Quantifizierung durchgeführt. Beide Analyseverfahren korrelierten gut miteinander ($R_s = 0,911$, $p < 0,0001$, siehe **Diagramm 2**).

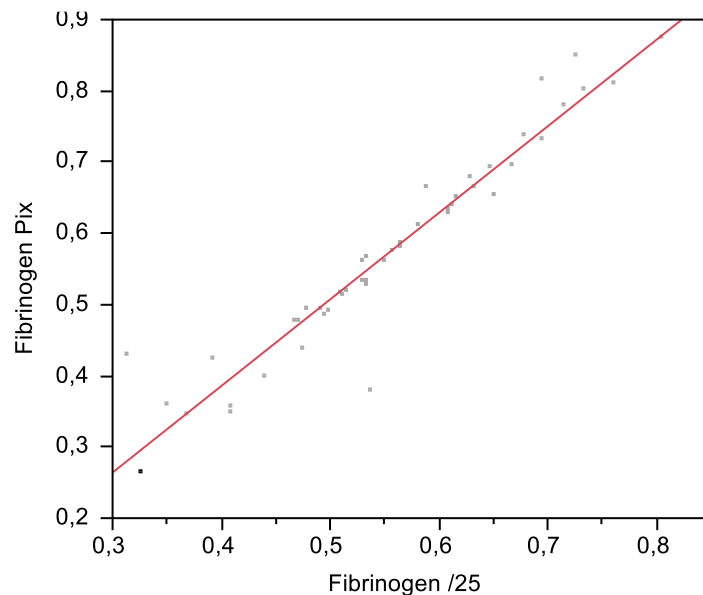


Diagramm 2: Vergleich der Auswertungsmethoden mit Adobe Photoshop CS4

Die Grauwertanalyse (Fibrinogen /255) und die Pixelzählung korrelieren gut ($R_s = 0,911$, $p < 0,0001$).

4.3.2 Färbungen

Tabelle 17: Übersicht über die Verteilung histologischer Daten

Kategorie	Wert
HE-Färbung (n=55)	
Anteil der Erythrozyten (RBC) an der Gesamtfläche, Median (Spanne)	39,2 % (1,7 % - 95,4 %)
Anteil von Fibrin/Thrombozyten an der Gesamtfläche, Median (Spanne)	53,1 % (2,5 % - 88,7 %)
Anteil der Leukozyten (WBC) an der Gesamtfläche, Median (Spanne)	7,9 % (0,9% - 27,8%)
Präparatgröße in mm ² , Median (Spanne)	10,0 (1,2 – 128,2)
CD45-Anitkörper-Färbung (n=43)	
Zahl der CD45-positiven Zellen pro Gesichtsfeld, Median (Spanne)	33 (8,4 – 84,2)
Neutrophilen-Elastase-Färbung (n=48)	
Zahl der NE-positiven Zellen pro Gesichtsfeld, Median (Spanne)	25,4 (6,4 – 88,2)
Fibrinogen-Färbung (n=47)	
Anteil der Fibrinogen-AK-positiven Fläche an der Gesamtfläche, Median (Spanne)	53,7% (31,3% – 80,4%)

Tabelle 18: Gruppierung der Thromben

Gruppe (n=55)	Anzahl (Prozent)
Fibrinreicher Thrombus (>60% Fibrin)	23 (42 %)
Erythrozythen-reicher Thrombus (> 60% Erythrozyten)	10 (18 %)
Gemischter Thrombus	22 (40 %)

In der statistischen Testung zwischen den korrespondierenden Färbungen mittels Spearman-Rho-Korrelation zeigten sich folgende Ergebnisse: Zum einen stellte sich ein starker negativer Zusammenhang zwischen Fibrin- und Erythrozyten-Anteil in der HE-Färbung dar ($R_s = -0,964$, $p < 0,001$), ebenso zwischen Leukozyten und Erythrozyten ($R_s = -0,432$, $p = 0,001$). Hohe Anteile von Erythrozyten gehen also mit niedrigen Anteilen von Fibrin und eher niedrigen Anteilen von Leukozyten einher. Zum anderen ist die Präparatgröße per se ein Faktor, der mit der Zusammensetzung des Thrombus korreliert. So sind große Thromben eher reich an Erythrozyten ($R_s = 0,339$, $p = 0,023$) und arm an Fibrin ($R_s = -0,311$, $p = 0,037$).

In der Immunhistochemie ergab sich eine starke Assoziation zwischen den CD45-positiven Zellen (Leukozyten) und den Neutrophilen-Elastase-positiven Zellen ($R_s = 0,698$, $p < 0,001$). Die CD45-Färbung zeigte einen Trend mit den Leukozyten in der HE-Färbung ($R_s = 0,304$, $p = 0,051$). Die Fibrinogenfärbung korrelierte hingegen nicht mit der HE-Fibrin-Thrombozyten-

Fraktion ($R_s = 0,085$, $p = 0,578$). Eine Übersicht über alle Korrelationen bieten die **Tabellen 19-21**.

Tabelle 19: Korrelation der HE Färbungs-Entitäten sowie der Präparatgröße

Spearman-Rho		HE Erythrozyten	HE Fibrin / Thrombozyten	HE Leukozyten
HE Fibrin / Thrombozyten	<i>R_s</i>	- 0,965		
	<i>p</i>	0,000		
	<i>N</i>	54		
HE Leukozyten	<i>R_s</i>	- 0,432	0,273	
	<i>p</i>	0,001	0,046	
	<i>N</i>	54	54	
Präparatgröße	<i>R_s</i>	0,339	- 0,308	- 0,035
	<i>p</i>	0,023	0,040	0,818
	<i>N</i>	45	45	46

Tabelle 20: Korrelation der Fibrinogenfärbung mit der Fibrin-Thrombozyten-Fraktion der HE-Färbung

Spearman-Rho		HE Fibrin / Thrombozyten
Fibrinogen	<i>R_s</i>	0,089
	<i>p</i>	0,560
	<i>N</i>	45

Tabelle 21: Korrelation der Leukozytenfärbungen

Spearman-Rho		HE Leukozyten	CD45
CD45	<i>R_s</i>	0,304	
	<i>p</i>	0,051	
	<i>N</i>	42	
Neutrophilen Elastase	<i>R_s</i>	0,219	0,698
	<i>p</i>	0,136	0,000
	<i>N</i>	48	42

4.3.3 Verschluss-Lokalisation

Die Gewebefläche auf Präparaten von Thromben der ACI (Median 25,6 mm²) war größer als in der MCA im Segment M1 (Median 12,1 mm²) bzw. im weiter distal gelegenen Segment M2 (Median 6,2 mm²) ($p = 0,011$). Die genaue Verteilung zeigt **Diagramm 3**.

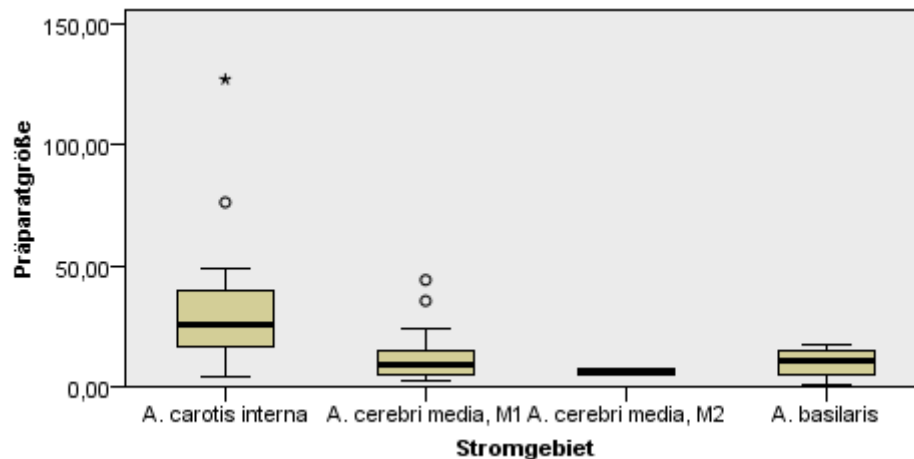


Diagramm 3: Gruppenanalyse zwischen Gefäß und Präparatgröße

Auf der X-Achse sind die verschiedenen Ursprungsgefäße dargestellt. Auf der Y-Achse findet sich die mittels Adobe Photoshop CS4 ermittelte Präparatfläche in mm². Im Kruskal-Wallis-Test ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang mit $p=0,011^*$, $n=44$, 3 Freiheitsgrade. Mit abnehmendem Gefäßdurchmesser im vorderen Stromgebiet (ACI > M1 > M2) sinken die Präparatgrößen. Die Post-hoc Analyse der Stichproben untereinander ergab folgendes Ergebnis:

Tabelle 22: Post-Hoc Analyse zu Diagramm 3

<i>Paarweiser Vergleich</i>	<i>z</i>	<i>p</i>	<i>n</i>	<i>r (Effektstärke nach Cohen)</i>
ACI vs. MCA (M1)	2,902	0,004	34	0,50
ACI vs. MCA (M2)	2,205	0,027	13	0,61
ACI vs. BA	2,433	0,015	19	0,56
MCA (M1) vs. MCA (M2)	0,856	0,392	25	0,17
MCA (M1) vs. BA	0,163	0,871	31	0,03
MCA (M2) vs. BA	0,714	0,475	10	0,23

In der Post-Hoc Analyse (**Tabelle 22**) zeigten sich die paarweisen Vergleiche zwischen A. carotis interna einerseits sowie der A. cerebri media (M1), A. cerebri media (M2) sowie A. basilaris signifikant bei starker Effektstärke nach Cohen.

Histologisch ergaben sich in der HE-Färbung keine Unterschiede im Hinblick auf den Anteil der Erythrozyten-, Fibrin/Thrombozyten- bzw. Leukozyten-Anteile in Abhängigkeit vom betroffenen Gefäß (**Tabelle 23**).

Tabelle 23: Ergebnisse der HE-Färbung in Abhängigkeit der Verschluss-Lokalisation, jeweils angegeben Median (Spanne) in % der Präparatfläche

	<i>HE Erythrozyten</i>	<i>HE Fibrin / Thrombozyten</i>	<i>HE Leukozyten</i>
ACI	43,2% (12,1% - 85,4%)	53,6% (11,9% - 84,7%)	6,7% (2,0% - 14,7%)
MCA (M1)	21,1% (1,7% - 95,4%)	69,9% (1,7% - 88,7%)	6,4% (2,1% - 27,8%)
MCA (M2)	55,5% (44,3% - 66,6%)	40,2% (30,1% - 50,2%)	4,3% (3,2% - 5,5%)
BA	42,5% (16,81% - 90,2%)	44,8% (0,8%-75,2%)	7,4% (0,9% - 21,6%)
Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test (p)	0,230	0,192	0,362

4.3.4 Hirninfarkt-Ätiologie

Die Zahl der in der HE-Färbung ausgewerteten Leukozyten war in den verschiedenen Gruppen der nach den TOAST-Kriterien ermittelten Schlaganfallätiologie unterschiedlich ($p = 0,035$). Der Leukozyten-Anteil kardioembolischer Thromben (Median 9,0%) war größer als der arterioarteriell-embolischer (Median 5,3%) Thromben und Thromben anderer definierter Ursache (Median 6,0%) .

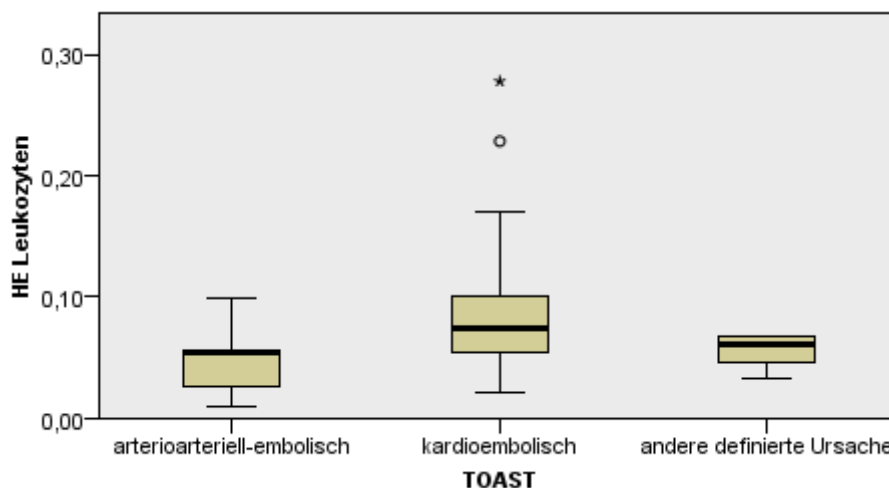


Diagramm 4: Gruppenanalyse zwischen TOAST-Kriterien und HE-Leukozyten

Auf der X-Achse werden die TOAST-Kriterien aufgeführt (andere definierte Ursachen waren zumeist Dissektionen). Auf der Y-Achse findet sich der prozentuale Anteil von blauen Pixeln im HE-gefärbten digitalisierten Präparat, die als Leukozyten interpretiert wurden ($1 = 100\%$). Im Kruskal-Wallis-Test ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang mit $p=0,035^*$, $n=42$, 2 Freiheitsgrade. Die Post-hoc Analyse der Stichproben untereinander ergab folgendes Ergebnis:

Tabelle 24: Post-Hoc-Analyse zu Diagramm 4

<i>Paarweise Vergleiche</i>	<i>z</i>	<i>p</i>	<i>n</i>	<i>r (Effektstärke nach Cohen)</i>
Arterioarteriell-embolisch vs. Kardioembolisch	2,218	0,027	36	0,37
Arterioarteriell-embolisch vs. Andere definierte Ursache	0,370	0,711	14	0,10
Kardioembolisch vs. Andere definierte Ursache	1,750	0,080	36	0,29

In der Post-Hoc Analyse (**Tabelle 24**) ergab sich eine signifikante Assoziation zwischen arterioarteriell-embolischen und kardioembolischen Thromben (bei mittlerer Effektstärke) sowie ein statistischer Trend zwischen kardioembolischen Thromben und Thromben anderer definierter Ursache (bei schwacher Effektstärke). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden immunhistochemische Färbungen mittels CD45-Antikörper und Neutrophilen-Elastase-Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse fasst **Tabelle 25** zusammen. Thromben kardioembolischer und anderer definierter Genese zeigten höhere Zahlen Neutrophilen-Elastase positiver Zellen ($p = 0,038$) als Thromben arterioarteriell-embolischer Genese.

Tabelle 25: Immunhistochemie: Median (Spanne) der Zellen / Gesichtsfeld, differenziert nach TOAST

	CD45+ Zellen	NE+ positive Zellen
arterioarteriell-embolisch	25,7 (8-43)	20,4 (7-24)
kardioembolisch	36,2 (12-63)	27,4 (6-88)
andere definierte Ursache	39,1 (18-49)	31,2 (20-47)
Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test (p)	0,321	0,038

Diagramm 5 bietet eine genauere Darstellung der Verteilung der Neutrophilen-Elastase-positiven Zellen in Bezug auf die TOAST Kriterien.

**Diagramm 5: Gruppenanalyse zwischen TOAST-Kriterien und NE-positiven Zellen**

Auf der X-Achse werden die TOAST-Kriterien aufgeführt (andere definierte Ursachen waren zumeist Dissektionen). Auf der Y-Achse findet sich die durchschnittlich pro Gesichtsfeld (40-fache Objektivvergrößerung) ermittelte Anzahl von Neutrophilen-Elastase positiven Zellen im immunhistochemisch gefärbten Präparat. Im Kruskal-Wallis-Test ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang mit $p=0,038^*$, $n=36$, 2 Freiheitsgrade.

Tabelle 26: Post-Hoc-Analyse zu Diagramm 5

	z	p	n	r (Effektstärke nach Cohen)
Arterioarteriell-embolisch vs. Kardioembolisch	-1,817	0,061	36	0,30
Arterioarteriell-embolisch vs. Andere definierte Ursache	-2,539	0,011	14	0,68
Kardioembolisch vs. Andere definierte Ursache	-1,285	0,199	36	0,21

In der Post-Hoc-Analyse (**Tabelle 26**) ergab sich eine signifikante Assoziation zwischen arterioarteriell-embolischen Thromben und Thromben anderer definierter Ursache (bei starker Effektstärke) sowie ein statistischer Trend zwischen arterioarteriell-embolischen und kardioembolischen Thromben (bei mittlerer Effektstärke).

Bei den o. g. Analysen wurde die Gruppe kryptogener Schlaganfälle ausgeklammert, da sie als Mischgruppe die Statistik stören würde. Dennoch ist natürlich gerade diese Gruppe von besonderem klinischen Interesse. Zur weiteren Analyse wurden die Thromben in kardioembolische und nicht-kardioembolische Thromben kategorisiert und die Ergebnisse anschließend mit den kryptogenen Thromben verglichen: Kardioembolische Thromben waren im Vergleich ärmer an Erythrozyten ($p = 0,037$) und reicher an Leukozyten ($p = 0,032$) als nicht-kardioembolische Thromben. Weiterhin bestand ein statistischer Trend, dass die kardioembolischen Thromben reicher an Fibrin/Thrombozyten ($p = 0,064$) waren als die nicht-kardioembolischen Thromben.

Ähnliche statistische Trends zeigten sich ebenfalls beim Vergleich zwischen kryptogenen und nicht-kardioembolischen Thromben. So waren die kryptogenen Thromben ärmer an Erythrozyten ($p = 0,096$) und reicher an Fibrin ($p = 0,086$) als die nicht-kardioembolischen. Die kardioembolischen und kryptogenen Thromben zeigten somit deutliche Gemeinsamkeiten. Die Ergebnisse fassen **Tabelle 27** sowie das **Diagramm 6** zusammen:

Tabelle 27: Ergebnisse der HE-Färbung in Abhängigkeit der Gruppierung nicht-kardioembolische vs. kardioembolische vs. kryptogene, angegeben als Median (Spanne) in % der Präparatfläche

	<i>HE Erythrozyten</i>	<i>HE Fibrin/Thrombozyten</i>	<i>HE Leukozyten</i>
nicht-kardioembolisch	49,4% (5%-93%)	42,0% (2%-85%)	5,4% (1%-22%)
kardioembolisch	31,6% (8%-88%)	61,3% (5%-80%)	7,1% (2%-17%)
kryptogen	32,0% (5%-63%)	54,3% (34-89%)	6,2% (2%-21%)

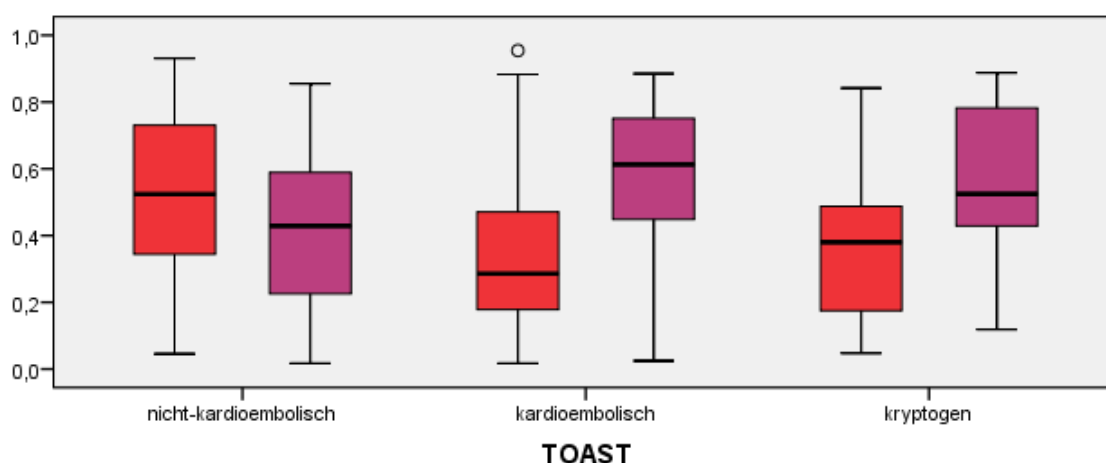


Diagramm 6: nicht-kardioembolische vs. kardioembolische vs. kryptogene Thromben: Verteilung von Erythrozyten (rot) und Fibrin/Thrombozyten (violett)

Boxplot-Darstellung. Auf der X-Achse werden die TOAST-Kriterien aufgeführt (kardioembolisch, nicht-kardioembolisch, kryptogen). Auf der Y-Achse findet sich der prozentuale Anteil von roten und rosa Pixeln im HE-gefärbten digitalisierten Präparat, die als Erythrozyten bzw. Fibrin/Thrombozyten interpretiert wurden (1 = 100%).

Zur weiteren Charakterisierung wurde eine Fibrinogen-Färbung durchgeführt. Hier zeigten sich jedoch keine Unterschiede im Hinblick auf die Schlaganfallätiologie (**Tabelle 28**).

Tabelle 28: Immunhistochemie: Ergebnisse der Fibrinogen-Färbung in Abhängigkeit der TOAST-Gruppierung, angegeben als Median (Spanne) in % der Präparatfläche

	<i>Fibrinogen-Immunhistochemie</i>
Kardioembolisch	58,8% (36,8%-73,3%)
Nicht-kardioembolisch	53,3% (31, %-64,7%)
Kryptogen	57,8% (32,5%-80,4%)
Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test (p)	0,423

4.3.5 Klinische Symptomatik

Die Präparatgröße korrelierte positiv mit dem NIHSS vor der Intervention ($R_s = 0,303$, $p = 0,043$, $n = 45$). Die Thrombuskomposition korrelierte dagegen nicht mit dem NIHSS vor der Intervention.

Darüber hinaus korrelierten erythrozytenarme ($R_s = -0,321$, $p = 0,020$) bzw. fibrinreiche ($R_s = 0,315$, $p = 0,023$) Thromben mit einer verschlechterten neurologischen Symptomatik bei Entlassung. 4 Patienten starben im Laufe ihres Aufenthaltes und wurden mit einem fiktiven Entlassungs-NIHSS von 50 Punkten in die Analyse miteinbezogen. Die **Tabelle 29** und das **Diagramm 7** fassen die Ergebnisse nochmals zusammen.

Tabelle 29: Spearman-Rho-Korrelationen des NIHSS

		NIHSS (vor Intervention)	NIHSS (Entlassung)	delta NIHSS (Differenz)
<i>HE Erythrozyten</i>	R_s	- 0,164	- 0,295	0,091
	p	0,260	0,036	0,533
	N	49	51	49
<i>HE Fibrin/Thrombozyten</i>	R_s	0,151	0,287	- 0,105
	p	0,300	0,041	0,473
	N	49	51	49
<i>HE Leukozyten</i>	R_s	0,142	0,172	- 0,035
	p	0,332	0,223	0,810
	N	49	52	49
<i>Präparatgröße</i>	R_s	0,395	0,198	0,017
	p	0,010	0,197	0,914
	N	42	44	42

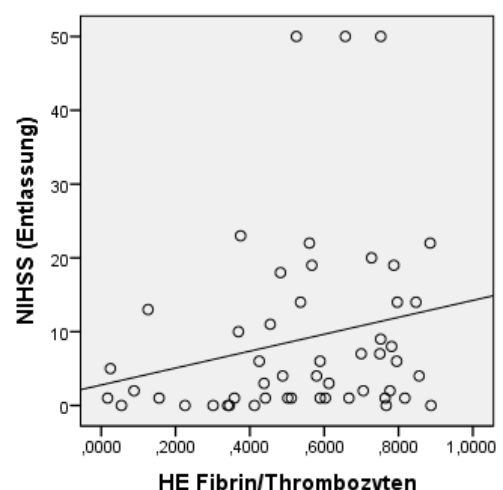
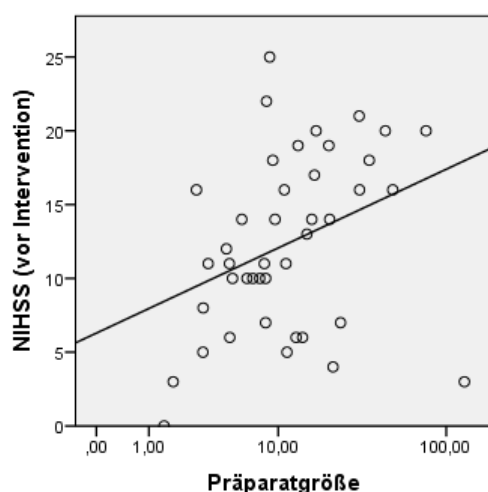


Diagramm 7: Zusammenhang von Präparatgröße, Fibrin-Anteil und NIHSS

links: auf der X-Achse ist in einem logarithmischen Maßstab die Präparatgröße in mm^2 aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die der NIHSS vor Intervention aufgetragen.

rechts: Auf der X-Achse ist der Anteil von Fibrin/Thrombozyten am Thrombus aufgetragen ($1,0 = 100\%$), auf der Y-Achse der NIHSS bei Entlassung. Patienten mit einem fiktiven NIHSS von 50 sind während des stationären Aufenthaltes verstorben.

4.3.6 Explorative weitere Untersuchungen

Keine signifikante Assoziation mit der Thrombuskomposition in der HE-Färbung ergab die Analyse im Hinblick auf

- eine vorangegangene Lysetherapie
- den Rekanalisationserfolg, definiert nach TICI Score
- das Vorhandensein eines hyperdensen Arterienzeichens.

Die exakten Ergebnisse stellen die **Tabellen 30-32** dar.

Tabelle 30: Ergebnisse der HE-Färbung gruppiert nach durchgeführter additiver Lysetherapie, angegeben als Median (Spanne) in % der Präparatfläche

	<i>HE Erythrozyten</i>	<i>HE Fibrin/Thrombozyten</i>	<i>HE Leukozyten</i>
Lyse nicht durchgeführt	29,1% (1,7% - 90,2%)	62,7% (8,8% - 85,5%)	6,7% (0,9% - 27,8%)
Lyse durchgeführt	24,5% (4,7% - 95,4%)	63,0% (2,5% - 88,7%)	5,8% (2,0% - 14,7%)
Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test (p)	0,200	0,300	0,355

Tabelle 31: Ergebnisse der HE-Färbung gruppiert nach Interventionserfolg nach TICI Score, angegeben als Median (Spanne) in % der Präparatfläche

	<i>HE Erythrozyten</i>	<i>HE Fibrin/Thrombozyten</i>	<i>HE Leukozyten</i>
TICI 2b	19,6% (4,5% - 88,3%)	72,7% (5,5% - 85,5%)	6,6% (4,1% - 14,7%)
TICI 3	33,0% (1,7% - 95,4%)	58,9% (2,4% - 88,8%)	6,3% (0,9% - 27,8%)
Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test (p)	0,173	0,155	0,186

Tabelle 32: Ergebnisse der HE-Färbung gruppiert nach hyperdensem Arterienzeichen, angegeben als Median (Spanne) in % der Präparatfläche

	<i>HE Erythrozyten</i>	<i>HE Fibrin/Thrombozyten</i>	<i>HE Leukozyten</i>
HAS negativ	19,6% (1,7% - 90,2%)	71,9% (5,4% - 85,5%)	6,8% (2,0% - 14,7%)
HAS positiv	30,2% (4,7% - 95,4%)	59,6% (2,5% - 88,7%)	5,8% (0,9% - 27,8%)
Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test (p)	0,345	0,466	0,683

5 Diskussion

5.1 Färbungen & qualitative Histologie

Bis dato wurden nur sehr wenige Studien publiziert, die Thromben von Schlaganfällen histopathologisch untersucht haben. 2006 veröffentlichten Marder et al. eine erste Analyse, die mit Erythrozyten, Leukozyten und Fibrin die drei Hauptkomponenten in der HE-Färbung identifizierte, ohne diese allerdings zu quantifizieren (Marder et al., 2006). Die gleiche Arbeitsgruppe publizierte im Jahr 2011 auch die erste quantitative Analyse, die eine durchschnittliche Verteilung von 34% Erythrozyten, 61% Fibrin und 4% Leukozyten ergab (Liebeskind et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse (39% Erythrozyten, 53% Fibrin, 7,9% Leukozyten) sind mit den Ergebnissen von Marder und Liebeskind vergleichbar.

Zwei wesentliche Unterschiede sind in Bezug auf die Publikationen und diese Arbeit jedoch zu beachten: Zum einen verwendeten Marder und Liebeskind keine Stent-Retriever, sondern das ältere, unter distal ansetzender Krafteinwirkung wirkende MERCI-System (Smith et al., 2008), das geringere Rekanalisationsraten zulässt. In der Publikation von Marder wurden in 32% der Fälle eine vollständige und in 56% eine partielle Rekanalisation (insgesamt 88%) erreicht, Liebeskind erreichte 36% bzw. 40% (insgesamt 76%). Die TICI-Scores in unserer Studie waren mit 68% vollständiger bzw. 31% teilweiser Rekanalisation deutlich besser (insgesamt 99%), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Thromben, die mit der Stent-Retriever-Technik geborgen wurden, vollständiger und damit aussagekräftiger sind. Der mögliche Bias durch nicht in die Analyse eingehende Thromben ist hier im Vergleich deutlich geringer.

Um die in der HE-Färbung identifizierten Bestandteile vertieft zu charakterisieren, hatten wir das Ziel immunhistochemische Färbungen durchzuführen. Hierzu musste die Methodik innerhalb der Arbeitsgruppe zunächst etabliert werden. In einem zweiten Schritt konnte nachgewiesen werden, dass im Thrombus Leukozyten und neutrophile Granulozyten in hoher Zahl vorkommen und somit die Zellen in der HE-Färbung richtig interpretiert werden. Die Leukozytenfärbung CD45 zeigte einen statistischen Trend mit dem zuvor in der HE-Färbung erfassten Leukozytenanteil. Die CD45-Färbung korrelierte außerdem mit der Neutrophilen-Elastase-Färbung. Ein methodisch bedingter Bias ist hier nicht vollständig auszuschließen, da in der HE-Färbung die gesamte Thrombusoberfläche ausgewertet wurde, in der Immunhistochemie jedoch nur Ausschnitte berücksichtigt werden konnten.

Weiterhin führten wir eine Färbung gegen Fibrinogen durch, um den in der HE-Färbung identifizierten Anteil von Fibrin / Thrombozyten genauer zu differenzieren. Fibrinogen als Vorstufe von Fibrin konnte in hohem Maß nachgewiesen werden und stellt definitiv einen wesentlichen Bestandteil der Thromben dar. Die Auswertung erfolgte in der gleichen Weise wie in der HE-Färbung. Die Korrelation mit den Anteilen in der HE-Färbung ergab jedoch kein signifikantes Ergebnis. In einigen Fällen war der Fibrinogen-Anteil immunhistochemisch deutlich größer als der basophile Anteil im HE-Präparat, in anderen Fällen deutlich geringer. Daraus lassen sich zunächst zwei Schlüsse ziehen. Erstens scheint die HE-Färbung den Fibrinogen-Anteil nur unzureichend abzubilden, insbesondere bei hohen Anteilen von Erythrozyten. Die Verwobenheit von Erythrozyten und Fibrin/Fibrinogen scheint in der HE-Färbung möglicherweise unterschätzt. Zum anderen bildet aber auch Fibrinogen den basophilen Anteil in der HE-Färbung nicht alleine ab, da andere Gerinnungsproteine und insbesondere Thrombozyten hier miterfasst werden.

Almekhlafi et al. haben im Jahr 2008 in einer kleinen Serie von 5 Schlaganfallpatienten Thromben qualitativ analysiert, bei allerdings schlechter Rekanalisationsrate (TICI 2: 41%, TICI 3: 0%) unter Verwendung des MERCI-Devices (Almekhlafi et al., 2008). Sie beschrieben Zeichen von Endothelialisierung an der Thrombusoberfläche sowie in einem Fall eine Kalzifizierung. Endothelialisierungen, Gefäßneubildung und Fibroblasten lassen sich in unserer Studie unabhängig von Stromgebiet und vermuteter Ätiologie nachweisen. Sie stellen ein erstes Zeichen der Organisation von Thromben an deren Oberfläche dar (Almekhlafi et al., 2008). Aus diesen Erkenntnissen lassen sich klinische Thesen ableiten: So ist es denkbar, dass eine voranschreitende Thrombusorganisation mit Endothelialisierung den Erfolg einer Lysetherapie beeinträchtigt, da das Medikament unter Umständen das zu lysierende Fibrin-Molekül nicht mehr erreicht.

Eine weitere Interpretation der Organisationszeichen betrifft einen Rückschluss auf das Thrombusalter: Zwar zeigen sich Organisationszeichen nicht nur im Rahmen von ischämischen Schlaganfällen, sondern auch bei in der Regel hochakuten Koronarthromben auf dem Boden von Plaquerupturen beim ST-Hebungs-Infarkt (Murakami et al., 1998; Rittersma et al., 2005; Silvain et al., 2011), sodass eine Klassifizierung und Altersbestimmung von Thromben anhand von Organisationszeichen mit Unsicherheiten behaftet ist (Remmele, 2013). Nichtsdestotrotz bieten die genannten Erkenntnisse dieser Arbeit zumindest einen Hinweis darauf, dass die Thromben sich zum Teil wahrscheinlich schon deutlich vor dem eigentlichen Symptombeginn im Rahmen des Schlaganfalls gebildet haben.

5.2 Verschluss-Lokalisation

In den Analysen von Marder und Liebeskind wurden mit Ausnahme eines einzigen Falls ausschließlich Thromben aus dem vorderen Stromgebiet geborgen, wohingegen in unserem Fall 23% der Thromben aus dem hinteren Stromgebiet geborgen wurden. In dieser Arbeit kann somit zusätzlich eine Aussage über die Zusammensetzung von Thromben im Vergleich von vorderen und hinteren Stromgebiet getroffen werden.

Es konnte eine signifikante Assoziation der Präparatgröße mit der Größe des Ursprungsgefäßes nachgewiesen werden. So sind die Thromben von distalen ACI-Verschlüssen deutlich größer als die von M1- und M2-Verschlüssen. Histologisch finden sich weder in der HE-Färbung noch in den immunhistochemischen Färbungen relevante Unterschiede zwischen den Infarktlokalisationen. Dies lässt sich mutmaßlich dadurch erklären, dass die Thromben nicht lokal entstehen, sondern je nach Grunderkrankung von verschiedenen Ursprungsorten embolisieren. Unsere Ergebnisse suggerieren, dass in erster Linie die Größe des verschleppten Blutgerinnsels und der Durchmesser des lokalen Blutgefäßes zusammenhängen, die Verteilung auf die Blutgefäße aber ansonsten zufällig geschieht.

Interessanterweise ergab sich insbesondere kein Unterschied zwischen den Thromben im vorderen und hinteren Stromgebiet im Hinblick auf die Thrombuskomposition. Prinzipiell handelt es sich bei der A. basilaris um ein weites Gefäß mit niedrigeren Flussgeschwindigkeiten im Vergleich zu den Arterien des vorderen Stromgebietes. Ein insgesamt größerer Appositionsthrombus mit höheren Anteilen von Erythrozyten wäre hier theoretisch eher zu erwarten gewesen. Möglicherweise handelt es sich hier jedoch auch um eine technische Limitation der Stent-Retriever, da die frischen, weichen Appositionsthromben unter Umständen nach Positionierung des Stent-Retrievers und unter Aspiration nicht mehr geborgen werden können.

5.3 Hirninfarkt-Ätiologie

In unserer Studie zeigten sich verschiedene Hinweise auf signifikante Assoziationen zwischen der Thrombuskomposition und der Hirninfarkt-Ätiologie. Es imponierte (i) eine unterschiedliche Verteilung von Leukozyten und Neutrophilen-Elastase positiven Zellen in Bezug auf die vermutete Schlaganfall-Ätiologie. Dabei zeigten die kardioembolischen Thromben die größte Streuung und die insgesamt höchsten Zahlen von Leukozyten und NE-positiven Zellen. Darüber hinaus zeigte sich (ii) ein Unterschied zwischen kardiogenen und nicht-kardiogenen Thromben im Hinblick auf den Erythrozyten- und Fibrin-/Thrombozyten-Anteil.

(i) Leukozyten im Schlaganfallthrombus

Bis dato sind in der Literatur keine ähnlichen Ergebnisse im Hinblick auf die Leukozytenverteilung publiziert worden. Dennoch gibt es einige Hinweise, die die Plausibilität dieser Beobachtung stützen. Es ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten und generell inflammatorische Prozesse bei der Thrombusbildung im Setting des ischämischen Schlaganfalls entscheidend beteiligt sind.

So zeigten Stoll et al., dass Mäuse, die keine T-Zellen haben, vor Hirninfarkten geschützt sind und umgekehrt eine Reihe von Proteinen der Gerinnungskaskade (von-Willebrand-Faktor, Glykoprotein Ib, Glykoprotein VI, Faktor XII) auch immunologisch wirken (Stoll et al., 2010). Auch Kochanek und Hallenbeck diskutierten bereits 1992 die damalige Literatur zur Rolle von Granulozyten und Monozyten beim ischämischen Schlaganfall (Kochanek et al., 1992). So zeigten Dutka et al. im Hundemodell, dass eine Granulozyten-Depletion mittels Mechlorethamin vor artifizieller Luftembolie den zerebralen Blutfluss signifikant verbessert (Dutka et al., 1989). In einem weiteren Experiment zeigte sich ein deutlich besseres neurologisches Outcome bei Mäusen mit ICAM1-Defizienz, einem wichtigen Zelladhäsionsmolekül in der Granulozyten-Endothel-Interaktion (Connolly et al., 1996). Aufgrund dieser grundlagenwissenschaftlichen Evidenz wurden zahlreiche therapeutische Ansätze der Immunsuppression in der Akutbehandlung des Schlaganfalls entwickelt, mit allerdings frustrierten Ergebnissen (Becker, 2002; del Zoppo, 2010; Jin et al., 2010).

Im Hinblick auf die Thrombogenese berichteten Massberg et al., dass Zellen der angeborenen Immunabwehr durch die sezernierten Proteasen Neutrophilen Elastase und Cathepsin G im Sinne eines evolutionsbiologisch wahrscheinlich sehr alten Mechanismus per se Koagulation anregen (Massberg et al., 2010). Für tiefe Beinvenenthrombosen zeigte dieselbe Arbeitsgruppe, dass neben Thrombozyten auch Monozyten und neutrophile Granulozyten die Gerinnung initiieren (von Bruhl et al., 2012). Engelman und Massberg prägen basierend auf

diesen Ergebnissen den Begriff der Immunothrombose (Engelmann et al., 2012). Neben den klassischen Wegen der Blutgerinnung beginnend bei Tissue Factor und von-Willebrand-Faktor bei Endothelverletzungen, postulieren sie einen immunologischen Aktivierungsweg. Einerseits sezernieren Monozyten bei Aktivierung durch Antigene Tissue Factor, andererseits produzieren neutrophile Granulozyten so genannte *Neutrophil extracellular traps* (NETs), die zum einen Mikroorganismen direkt schädigen, zum anderen aber auch über zahlreiche Wege die Blutgerinnung befördern. Dazu gehören sowohl die Aktivierung von Faktor XII, die Bindung von *Tissue Factor*, von-Willebrand-Faktor und Histonen sowie die proteolytische Aktivität von Neutrophilen Elastase in Bezug auf den *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI).

Eine mögliche Erklärung für das in dieser Arbeit beobachtete Phänomen der besonders hohen Dichte sowie hohen Streuung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten in kardioembolischen Thromben sind die verschiedenen Grunderkrankungen. Bei arterioarteriell-embolischen Thromben formiert sich das Blutgerinnsel unter hohem Fluss auf dem Boden einer rupturierten arteriosklerotischen Plaque. Die Gruppe kardioembolischer Thromben ist dagegen heterogener. Pathophysiologisch macht es einen großen Unterschied, ob ein Thrombus aufgrund einer Stase in einem flimmernden Vorhofohr entsteht oder beispielsweise im Zusammenhang mit einer künstlichen oder verkalkten Herzklappe oder Endokarditis.

Es ist daher plausibel, dass sich bei entsprechend niedrigen Drücken im Vorhof und Strömungsgeschwindigkeiten in der Umgebung des Thrombus mehr Leukozyten in sich formierenden Fibrinnetzen verfangen als unter peripher-arteriellen Bedingungen. Davon ausgehend, dass Vorhofflimmern für die meisten aller kardioembolischen Schlaganfälle verantwortlich ist, lassen sich so unter Umständen hohe Leukozyten- und Neutrophilenzahlen im Vergleich zu arterioarteriell-embolischen Thromben erklären. Die bereits erwähnte Arbeit von von Bruhl et al. zeigte die Verbindung von Neutrophilen-Elastase und prokoagulatorischer Funktion im Modell der venösen Thrombose, welche dem Setting der Vorhofohrthrombose am ehesten entspricht (von Bruhl et al., 2012).

Eine gesonderte Gruppe im Rahmen unserer Analyse bilden die Dissektionspatienten. In der Literatur finden sich Hinweise für eine Assoziation zwischen Dissektionen und lokalen Entzündungen. So beschreiben Pfefferkorn et al. bei Patienten mit Carotis-Dissektionen im PET-CT und MRT Entzündungsprozesse in der Gefäßwand (Pfefferkorn et al., 2011). Schievink et al. berichteten, dass Dissektionen gehäuft im Herbst auftreten, in der Zeit grippaler Infekte (Schievink et al., 1998). Grau et al. beobachteten in diesem Zusammenhang, dass mit Dissektionen anamnestisch häufig durchlaufene Infektionen einhergehen (Grau et al., 1999) und Forster et al. demonstrierten erhöhte Entzündungsparameter im Blut (Forster et

al., 2006). In unserer Arbeit weisen Thromben von Dissektionspatienten eine besonders hohe Zahl von neutrophilen Granulozyten auf. Neben der genannten Rolle im Rahmen der Thrombogenese sind neutrophile Granulozyten primär die Effektoren der primären Immunabwehr und damit im Rahmen von Entzündungsprozessen beteiligt. Ein Übergreifen des Entzündungsgeschehens von der Gefäßwand auf den konsekutiven Thrombus ist hierbei gut denkbar und könnte die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten, die im Rahmen der Thrombose geschieht, beschleunigen oder verstärken.

Ob sich die Leukozyten wie angedeutet in den Thromben verfangen oder unter Umständen sogar aktiv in diese migrieren, bzw. welche pathologische Rolle sie in welchem Stadium genau erfüllen, bleibt eine zu klärende Frage. Wie oben angedeutet, ist eine klare prokoagulatorische Funktion von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen. Darüber hinaus ist die Neutrophilen Elastase aber auch ein Enzym, das im Verlauf an der Verarbeitung und Organisation von Thromben durch seine proteolytische Funktion in Bezug auf Fibrin beteiligt ist. So beschrieben Rabai et al. *Elastase-Specific Fibrin Degradation Products* (NE-FDPs), die in Neutrophilenreichen Thromben in besonders hoher Zahl vorliegen (Rabai et al., 2010). Es könnte sich in diesem Sinne bei kardioembolischen Thromben also auch um organisiertere, ältere Thromben handeln, die sich über längere Zeit unter Stase-ähnlichen Bedingungen gebildet haben (Eder et al., 2013).

(ii) Erythrozyten und Fibrin/Thrombozyten im Schlaganfallthrombus

Hierzu passt auch das zweite wesentliche Ergebnis unserer Arbeit. Beim Vergleich zwischen kardioembolischen und nicht-kardioembolischen Thromben zeigte sich, dass kardioembolische einen höheren Anteil von Fibrin/Thrombozyten und weniger Erythrozyten besitzen.

Wie weiter oben bereits angedeutet, entstehen kardiogene Thromben zumeist unter low-flow Bedingungen im linken Herzohr und sollten nach traditioneller Annahme daher eher hohe Anteile an Erythrozyten enthalten. Unsere Ergebnisse können dies nicht bestätigen, sondern weisen in die entgegengesetzte Richtung. Sie sind damit jedoch kongruent mit den Ergebnissen von Niesten et al., die in ihrer kleinen Kohorte von 22 Präparaten ebenfalls einen höheren Anteil von Erythrozyten in arterioarteriell-embolischen als in kardioembolischen Thromben finden (Niesten et al., 2014).

Hierfür sind mehrere Gründe denkbar: So könnten low-flow Thromben vulnerabler gegenüber den high-flow Bedingungen im arteriellen Blutgefäßsystem sein und sich dort unter Umständen bereits zum Teil auflösen. Aus dem gleichen Grund ist auch eine höhere Anfälligkeit gegenüber

der Technik der Stent-Retriever-Thrombektomie plausibel. Darüber hinaus ist prinzipiell auch ein methodisch bedingter Bias durch falsch adjudizierte Rot- oder Rosa-Flächen in den sehr verwobenen Thrombusanteilen denkbar, auch wenn dies mit großer Sorgfalt und von verschiedenen unabhängigen Untersuchern durchgeführt wurde. In jedem Fall bedarf dieses Ergebnis jedoch der Bestätigung durch zukünftige Studien.

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass kardiogene und kryptogene Thromben erhebliche Ähnlichkeiten aufweisen. Die bereits angesprochene Arbeit von Niesten konnte dies bei allerdings kleiner Fallzahl im Hinblick auf kryptogene Thromben (n=5) nicht zeigen (Niesten et al., 2014). Nichtsdestotrotz bedarf das Ergebnis einer gesonderten Beachtung, insbesondere aufgrund des besonderen klinischen Interesses:

Patienten mit Vorhofflimmern und einem kardioembolischen Hirninfarkt werden in der Sekundärprophylaxe therapeutisch antikoaguliert, während die Empfehlung für Hirninfarkte auf dem Boden eines arterioarteriell-embolischen Geschehens eine Thrombozytenaggregationshemmung ist. Bei kryptogenen Infarkten ist die sekundärprophylaktische Therapie noch Teil einer wissenschaftlichen Diskussion (Kent et al., 2015) und die Reduktion des Anteils an kryptogenen Hirninfarkten ein wichtiges Ziel der Forschung. Aufgrund von Schwächen der anerkannten Klassifizierungsschemata wie der TOAST-Klassifikation sowie der These, dass eine Vielzahl der als kryptogen klassifizierten Ischämien mutmaßlich embolischer Genese sind, wurde 2014 der Begriff des *Embolic stroke of undetermined source* (ESUS) gebildet (Hart et al., 2014). So sind aktuell drei randomisierte klinische Studien (RESPECT ESUS - *Clinical Trial Identifier NCT02313909*, NAVIGATE ESUS - *Clinical Trial Identifier NCT02239120* und ATTICUS - *Clinical Trial Identifier NCT02427126*) im Gang, die eine direkte orale Antikoagulation mit einer antithrombozytären Standardtherapie im Rahmen eines ESUS vergleichen.

Eine mögliche Erklärung für eine Ähnlichkeit von kardioembolischen und kryptogenen Thromben ist unentdecktes Vorhofflimmern und damit letztlich die These, dass ein Teil der kryptogenen Thromben in Wirklichkeit kardiogene Thromben darstellen. So zeigte eine Meta-Analyse von Dalen et al., dass 24% der Patienten mit Hirninfarkt im Rahmen des stationären Aufenthaltes eine Erstdiagnose von Vorhofflimmern hatten (Dalen et al., 2016).

Die ASSERT-Studie von Healey et al. zeigte außerdem, dass über eine Beobachtungsperiode von 2 Jahren über ein Drittel der Patienten mit implantiertem Schrittmacher oder Cardioverter-Defibrillator (ICD) kurze Episoden von stummem Vorhofflimmern, sog. atriale Hochfrequenzepisoden (*atrial high frequency episodes*, AHRE) haben (Healey et al., 2012).

Die Schlaganfallrate der Patienten mit AHRE war gegenüber denen ohne nachgewiesene AHRE erhöht, jedoch niedriger als bei einem Kollektiv mit Vorhofflimmern zu erwarten gewesen wäre (Healey et al., 2012). Dies unterstreicht dennoch das Ausmaß der Relevanz von Rhythmusstörungen beim ischämischen Schlaganfall, weshalb auch für dieses Patientenkollektiv gerade eine primärprophylaktische Antikoagulationsstudie initiiert wurde (NOAH-AF NET - *Clinical Trial Identifier NCT02618577*). Allerdings muss hier beachtet werden, dass es sich um kardial vorerkrankte Patienten handelt, die unter Umständen anfälliger für Rhythmusstörungen sind als ein kardial gesundes Kollektiv.

Neben nicht-erkanntem Vorhofflimmern sind auch andere unterschätzte kardiale Emboliequellen denkbar. So ist auch bei den aktuellen ESUS-Guidelines eine transösophageale Echokardiographie mit der Frage nach intrakardialen Thromben oder Shunts nicht grundsätzlich vorgeschrieben (Hart et al., 2014). Auch nicht-erkannte linksatriale Dysfunktionen können ein weiterer Grund für kardioembolische, als ESUS klassifizierte Thromben sein (Goldberger et al., 2015; Yaghi et al., 2016). Ein weiteres Indiz für die Ähnlichkeit von ESUS und kardioembolischen Schlaganfällen sind die vergleichbaren Rezidivraten, die höher sind als bei nicht-kardioembolischen Schlaganfällen (Hart et al., 2017; Ntaios et al., 2015).

Insgesamt muss einschränkend hinzugefügt werden, dass die ungleiche Verteilung der Stichprobe dieser Arbeit in Bezug auf die TOAST-Kriterien ein limitierender Faktor für unsere Analyse darstellt. Über die Hälfte der Thromben wurde als kardioembolisch klassifiziert (55%), hingegen nur jeweils 13% einer arterioarteriell-embolischen oder anderen bekannten Ursache, zumeist Dissektionen, zugeordnet.

5.4 Klinische Symptomatik

In der bislang publizierten Literatur zeigen sich keine Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Thrombusmorphologie und klinischen Scores zur Evaluation der Symptomatik wie dem NIHSS (Almekhlafi et al., 2008; Liebeskind et al., 2011; Marder et al., 2006; Niesten et al., 2014).

Unsere Untersuchung demonstriert einen positiven Zusammenhang zwischen Präparatgröße und der Schwere der Symptomatik vor Intervention, gemessen mittels NIHSS. Dies erscheint auf den ersten Blick wenig überraschend, da die Präparatgröße wie oben beschrieben mit der Lokalisation des Verschlusses assoziiert ist. Eine Okklusion in einem weiter proximalen Gefäßabschnitt verursacht einen größeren Hirninfarkt und damit auch einen stärkeren Verlust neurologischer Funktionen. Dennoch ist dieses Ergebnis hervorzuheben, denn bisher konnte ein derartiger Zusammenhang – so wahrscheinlich er ist – noch nicht wissenschaftlich bestätigt werden. Außerdem handelt es sich um eine Qualitätskontrolle für die Vollständigkeit der geborgenen Thromben und zeigt, dass das geborgene Material den Infarkt widerspiegelt.

In Bezug auf das Outcome der Patienten ergibt sich ein anderes Bild. So können wir zeigen, dass die Thrombuszusammensetzung und der NIHSS bei Entlassung assoziiert sind. Patienten mit erythrozytenreichen und fibrinarmen Thromben zeigten bei Entlassung weniger stark ausgeprägte neurologische Symptome als Patienten mit erythrozytenarmen und fibrinreichen Thromben.

Die Frage, warum genau erythrozytenreiche und fibrinarme Thromben ein prognostisch günstiger Faktor zu sein scheinen, bleibt zum Teil offen. Prinzipiell kommen hierfür verschiedene Möglichkeiten in Betracht: Eine mögliche These wäre eine bessere Rekanalisierbarkeit der Thromben, jedoch zeigte sich in der Analyse im Hinblick auf den TICI-Score kein Unterschied bezogen auf die Thrombuskomposition. Patienten mit derartigen Thromben sind des Weiteren auch nicht initial symptomärmer wie der NIHSS vor Intervention belegt, noch sind andere Verschlussätiologien, wie beispielsweise die prognostisch günstigeren Dissektionen, eindeutig abgrenzbar. Eine mögliche Störvariable für das Outcome ist naturgemäß das Alter. So konnten wir feststellen, dass die Hirninfarkt-Ätiologie mit dem Alter korreliert und die Gruppen der kardioembolischen und kryptogenen Infarkte mit einem höheren Alter sowie einem höheren NIHSS bzw. mRS einhergehen. Eine signifikante Assoziation zwischen Alter und Thrombuskomposition zeigte sich jedoch nicht.

5.5 Explorative weitere Untersuchungen

Liebeskind et al. berichteten, dass das Auftreten eines hyperdensen Mediazeichens im Nativ-CT sowie eines Blooming-Artefakts im Nativ-MRT mit erythrozytenreichen Thromben korreliert (Liebeskind et al., 2011). Die Autoren klassifizierten die Thromben einerseits in erythrozytenreiche, fibrinreiche und gemischte Thromben und assoziieren dies mit dem Auftreten des Zeichens. Andererseits assoziieren sie analog zu unserer Vorgehensweise auch die relativen Werte der Erythrozyten-Anteile der Thromben mit den Ergebnissen der Bildgebung. Mit beiden Vorgehensweisen konnten signifikante Ergebnisse erzielt werden. Mit teils etwas divergenten Methoden konnten diese Ergebnisse von Simons et al. in einer Serie von 40 Patienten sowie von Niesten bei 22 Thromben bestätigt werden (Niesten et al., 2014; Simons et al., 2014). In unserer Arbeit zeigte sich beim Vergleich der Gruppen mit und ohne positives Arterienzeichen zwar ein Unterschied im Hinblick auf den Erythrozytenanteil (30% vs. 19,6%), dieser war jedoch nicht signifikant. Eine Reihe von Patienten mussten aufgrund fehlender Nativ-CTs ausgeschlossen werden, sodass unsere Fallzahl in Bezug auf diese Fragestellung nur bei 34 lag und die Stichprobe unter Umständen zu klein war.

Ob eine vorangegangene Lysetherapie einen Einfluss auf die Thrombuskomposition hat, ist vor unserer Studie nur in der bereits erwähnten Arbeit von Liebeskind et al. untersucht worden, ohne jedoch einen Zusammenhang feststellen zu können (Liebeskind et al., 2011). Zunächst können wir wie Liebeskind et al. belegen, dass eine vorangegangene Lysetherapie keinen Effekt auf den später geborgenen Thrombus hat, auch wenn in unserer Arbeit ein deutlich höherer Anteil der Patienten eine Lysetherapie erhalten hat als bei Liebeskind (53% gegenüber 14%). Dass rekombinanter Gewebsplasminogen-Aktivator (rt-PA) eine begrenzte Wirksamkeit hat, ist bekannt. So zeigten Meunier et al., dass ein Teil von Patienten per se als „non-responder“ eingestuft werden muss (Meunier et al., 2013). Auch dass die Thrombuszusammensetzung wahrscheinlich einen Effekt auf die Wirksamkeit der Thrombolyse hat, konnte bereits sehr früh in kardiologischen (Jang et al., 1989) und später auch in Tier-experimentellen (Niessen et al., 2003) und neuroradiologischen Studien (Kirchhof et al., 2003) nachgewiesen werden. Dass die Lysetherapie und die Thrombuskomposition in unserer Arbeit jedoch nicht assoziiert sind, ist dennoch erklärbar: Die geborgenen und zum Teil bereits endothelialisierten Thromben hatten als Gewebe allenfalls an den Rändern Kontakt zu Plasminogen und sind ansonsten residuell. Insbesondere bei großen Infarkten, der Hauptindikation der Thrombektomie, ist der Erfolg der Lysetherapie bekanntermaßen begrenzt (Zivin et al., 1985). Die Bereiche des Thrombus, in denen eine Lysetherapie dennoch erfolgreich war, sind außerdem mit den Mitteln der Thrombektomie wahrscheinlich nicht greifbar, sodass sich die Therapieformen in gewisser Weise ergänzen.

Eine weitere entscheidende Kenngröße ist der TICI-Score, mit dem der Therapieerfolg beschrieben wird. Die Gruppe von Liebeskind konnte hier keine relevante Korrelation aufzeigen. Dies können wir bestätigen. Insbesondere ist interessant, dass weder Liebeskind noch wir in unserer Studie die Ergebnisse von Yuki et al. bestätigen können, der in einer kleineren Serie (n=16) im Schweine-Modell künstlich Schlaganfälle initiierte (Yuki et al., 2012). Er verglich Thrombin-induzierte Erythrozyten-dominante Thromben mit mittels einer selbst entwickelten Technik (Kan et al., 2010) hergestellten fibrinreichen Thromben. Mithilfe des MERCI-Devices wurde bei 100% der erythrozytenreichen Thromben eine zumindest teilweise Rekanalisation erreicht, bei fibrinreichen Thromben jedoch nur bei 37,5%. Dies ist jedoch unter Umständen dem MERCI-Device als im Vergleich zu den Stent-Retrievern veraltetem System geschuldet. Außerdem handelt es sich bei den artifiziellen Thromben möglicherweise nur um eine unzureichende Abbildung physiologischer Thromben.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Schlaganfälle gehören zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Therapeutisch stehen grundsätzlich die medikamentöse Lyse sowie die mechanische kathetergestützte Rekanalisation zur Verfügung. Die mechanische endovaskuläre Therapie machte zum ersten Mal Thromben von Hirninfarkten der histopathologischen Forschung regelhaft zugänglich.

Methodik: 56 Thromben zerebraler Gefäßverschlüsse wurden histologisch aufgearbeitet und untersucht. Es kamen dabei die Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie immunhistochemische Verfahren zum Nachweis von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten sowie Fibrinogen zur Anwendung. Zellgebundene Färbungen wurden manuell lichtmikroskopisch ausgezählt. Flächige Färbungen wurden softwaregestützt halbautomatisch quantitativ ausgewertet. Anschließend wurden die Ergebnisse auf Assoziationen mit klinischen Variablen statistisch überprüft.

Ergebnisse: Es zeigte sich, dass kardioembolische Thromben besonders reich an Leukozyten sind ($p = 0,035$). Des Weiteren fanden sich in Thromben aus Kardioembolien und Dissektionen hohe Anteile an neutrophilen Granulozyten ($p = 0,038$). Im Vergleich mit nicht-kardioembolischen Thromben waren kardioembolische Thromben reicher an Fibrin / Thrombozyten ($p = 0,064$) und ärmer an Erythrozyten ($p = 0,037$). Die kryptogenen Thromben waren den kardiogenen Thromben ähnlich: Sie waren ebenso reicher an Fibrin / Thrombozyten ($p = 0,086$) und ärmer an Erythrozyten ($p = 0,096$) als die nicht-kardioembolischen.

Es zeigte sich ferner, dass größere Gefäßverschlüsse mit größeren Thromben einhergehen ($p = 0,011$), jedoch kein qualitativer Unterschied in Abhängigkeit der Lokalisation vorlag. Patienten mit großen Thromben zeigten eine besonders schwere Schlaganfall-Symptomatik vor Intervention ($p = 0,043$). Prognostisch günstig waren erythrozytenreiche, fibrinarme Thromben. Weitere Parameter wie das hyperdense Arterienzeichen, eine vorangegangene Lyse-Therapie oder das technische Thrombektomie-Ergebnis (TICI-Score) zeigten keine Assoziation mit der Thrombuskomposition.

Konklusion: Die in dieser Arbeit beschriebene Assoziation von Thrombuskomposition und – ätiologie sollte tiefergehender und in größerem Maßstab untersucht werden, um langfristig die Diagnostik und Therapie von Hirninfarkt-Patienten zu verbessern.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung eines Immunglobulin G (Mulisch et al., 2010)	14
Abbildung 2: Darstellung der ABC-Methode (Mulisch et al., 2010).....	15
Abbildung 3: Avidin-Biotin-Block (nach Mulisch et al., 2010)	23
Abbildung 4: Ausschnitt eines HE-Präparates	25
Abbildung 5: Farbsegmentation mittels Adobe Photoshop CS4	26
Abbildung 6: Beispielthrombus	28
Abbildung 7: Beispiel einer Boxplot-Grafik	31
Abbildung 8: Endothelialisierung in HE-Färbung.....	36
Abbildung 9: Gefäßneubildung in Thromben.....	37
Abbildung 10: Kalzifizierung in HE-Färbung.....	38
Abbildung 11: Artherosklerotische Plaque in HE-Färbung.....	39
Abbildung 12: Sinusvenenthrombose in HE-Färbung	40

7.2 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Verteilung nach verschlossenem Gefäß.....	35
Diagramm 2: Vergleich der Auswertungsmethoden mit Adobe Photoshop CS4.....	41
Diagramm 3: Gruppenanalyse zwischen Gefäß und Präparatgröße	44
Diagramm 4: Gruppenanalyse zwischen TOAST-Kriterien und HE-Leukozyten.....	46
Diagramm 5: Gruppenanalyse zwischen TOAST-Kriterien und NE-positiven Zellen.....	47
Diagramm 6: nicht-kardioembolische vs. kardioembolische vs. kryptogene Thromben: Verteilung von Erythrozyten (rot) und Fibrin/Thrombozyten (violett)	48
Diagramm 7: Zusammenhang von Präparatgröße, Fibrin-Anteil und NIHSS.....	50

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien für kardioembolische Schlaganfälle (Adams et al., 1993)	6
Tabelle 2: Lakunäre Syndrome (Bamford et al., 1987; Chamorro et al., 1991).....	6
Tabelle 3: Übersicht über die TOAST-Kriterien (Adams et al., 1993).....	7
Tabelle 4: Neurologische Befundung nach NIHSS (Goldstein et al., 1997)	9
Tabelle 5: Modifizierte Rankin-Skala (van Swieten et al., 1988).....	10
Tabelle 6: Ausschlusskriterien einer Lysetherapie (NINDS-Study-Group, 1997)	12
Tabelle 7: Thrombolysis in Cerebral Infarction Score (Noser et al., 2005)	12
Tabelle 8: Details der verwendeten Antikörper.....	20

Tabelle 9: Citratpufferherstellung.....	22
Tabelle 10: Klassifizierung der Effektstärke r (Cohen, 1988).....	30
Tabelle 11: Verwendete Geräte.....	32
Tabelle 12: Verwendete Materialien.....	32
Tabelle 13: Verwendete Software.....	33
Tabelle 14: Verwendete Chemikalien.....	33
Tabelle 15: Übersicht über die Verteilung der Basischarakteristika.....	34
Tabelle 16: Übersicht über die Verteilung therapeutischer Daten.....	35
Tabelle 17: Übersicht über die Verteilung histologischer Daten.....	42
Tabelle 18: Gruppierung der Thromben.....	42
Tabelle 19: Korrelation der HE Färbungs-Entitäten sowie der Präparatgröße.....	43
Tabelle 20: Korrelation der Fibrinogenfärbung mit der Fibrin-Thrombozyten-Fraktion der HE-Färbung.....	43
Tabelle 21: Korrelation der Leukozytenfärbungen.....	43
Tabelle 22: Post-Hoc Analyse zu Diagramm 3.....	44
Tabelle 23: Ergebnisse der HE-Färbung in Abhängigkeit der Verschluss-Lokalisation, jeweils angegeben Median (Spanne) in % der Präparatfläche.....	45
Tabelle 24: Post-Hoc-Analyse zu Diagramm 4.....	46
Tabelle 25: Immunhistochemie: Median (Spanne) der Zellen / Gesichtsfeld, differenziert nach TOAST.....	47
Tabelle 26: Post-Hoc-Analyse zu Diagramm 5.....	47
Tabelle 27: Ergebnisse der HE-Färbung in Abhängigkeit der Gruppierung nicht-kardioembolische vs. kardioembolische vs. kryptogene, angegeben als Median (Spanne) in % der Präparatfläche.....	48
Tabelle 28: Immunhistochemie: Ergebnisse der Fibrinogen-Färbung in Abhängigkeit der TOAST-Gruppierung, angegeben als Median (Spanne) in % der Präparatfläche.....	49
Tabelle 29: Spearman-Rho-Korrelationen des NIHSS.....	50
Tabelle 30: Ergebnisse der HE-Färbung gruppiert nach durchgeführter additiver Lysetherapie, angegeben als Median (Spanne) in % der Präparatfläche.....	51
Tabelle 31: Ergebnisse der HE-Färbung gruppiert nach Interventionserfolg nach TICl Score, angegeben als Median (Spanne) in % der Präparatfläche.....	51
Tabelle 32: Ergebnisse der HE-Färbung gruppiert nach hyperdensem Arterienzeichen, angegeben als Median (Spanne) in % der Präparatfläche.....	51

7.5 Literaturverzeichnis

- Adams, H. P., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L. und Marsh, E. E. "Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment" Stroke 24 (1993) 35-41
- Agarwal, P., Kumar, S., Hariharan, S., Eshkar, N., Verro, P., Cohen, B. und Sen, S. "Hyperdense middle cerebral artery sign: can it be used to select intra-arterial versus intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke?" Cerebrovasc Dis 17 (2004) 182-190
- Almekhlafi, M. A., Hu, W. Y., Hill, M. D. und Auer, R. N. "Calcification and endothelialization of thrombi in acute stroke" Ann Neurol 64 (2008) 344-348
- Arnold, M., Schroth, G., Nedeltchev, K., Loher, T., Remonda, L., Stepper, F., Sturzenegger, M. und Mattle, H. P. "Intra-arterial thrombolysis in 100 patients with acute stroke due to middle cerebral artery occlusion" Stroke 33 (2002) 1828-1833
- Assouline, E., Benziane, K., Reizine, D., Guichard, J. P., Pico, F., Merland, J. J., Bousser, M. G. und Chabriat, H. "Intra-arterial thrombus visualized on T2* gradient echo imaging in acute ischemic stroke" Cerebrovasc Dis 20 (2005) 6-11
- Bagot, C. N. und Arya, R. "Virchow and his triad: a question of attribution" Br J Haematol 143 (2008) 180-190
- Bamford, J., Sandercock, P., Jones, L. und Warlow, C. "The natural history of lacunar infarction: the Oxfordshire Community Stroke Project" Stroke 18 (1987) 545-551
- Bastianello, S., Pierallini, A., Colonnese, C., Brughitta, G., Angeloni, U., Antonelli, M., Fantozzi, L. M., Fieschi, C. und Bozzao, L. "Hyperdense middle cerebral artery CT sign. Comparison with angiography in the acute phase of ischemic supratentorial infarction" Neuroradiology 33 (1991) 207-211
- Becker, K. J. "Anti-leukocyte antibodies: LeukArrest (Hu23F2G) and Enlimomab (R6.5) in acute stroke" Curr Med Res Opin 18 Suppl 2 (2002) s18-22
- Bick, R. L. "Disseminated intravascular coagulation current concepts of etiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment" Hematol Oncol Clin North Am 17 (2003) 149-176
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. und Zychlinsky, A. "Neutrophil extracellular traps kill bacteria" Science 303 (2004) 1532-1535
- Bundesgesundheitsberichterstattung (2011) "Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen" (http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=80614276&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=4065&p_aid=31082458) Abrufdatum: 02.11.2012
- Castano, C., Dorado, L., Guerrero, C., Millan, M., Gomis, M., Perez de la Ossa, N., Castellanos, M., Garcia, M. R., Domenech, S. und Davalos, A. "Mechanical

- thrombectomy with the Solitaire AB device in large artery occlusions of the anterior circulation: a pilot study* Stroke 41 (2010) 1836-1840
- Chamorro, A., Sacco, R. L., Mohr, J. P., Foulkes, M. A., Kase, C. S., Tatemichi, T. K., Wolf, P. A., Price, T. R. und Hier, D. B. "*Clinical-computed tomographic correlations of lacunar infarction in the Stroke Data Bank*" Stroke 22 (1991) 175-181
- Cho, K. H., Kim, J. S., Kwon, S. U., Cho, A. H. und Kang, D. W. "*Significance of susceptibility vessel sign on T2*-weighted gradient echo imaging for identification of stroke subtypes*" Stroke 36 (2005) 2379-2383
- Christensen, H., Boysen, G. und Truelsen, T. "*The Scandinavian stroke scale predicts outcome in patients with mild ischemic stroke*" Cerebrovasc Dis 20 (2005) 46-48
- Cohen, J. In: "*Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*", Lawrence Erlbaum Associates, 1988, 2. Auflage
- Connolly, E. S., Jr., Winfree, C. J., Springer, T. A., Naka, Y., Liao, H., Yan, S. D., Stern, D. M., Solomon, R. A., Gutierrez-Ramos, J. C. und Pinsky, D. J. "*Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke*" J Clin Invest 97 (1996) 209-216
- Coons, A. H., Creech, H. J. und Jones, R. N. "*Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.*" Proc Soc Exp Biol Med 47 (1941) 200-202
- Costalat, V., Machi, P., Lobotesis, K., Maldonado, I., Vendrell, J. F., Riquelme, C., Mourand, I., Milhau, D., Heroum, C., Perrigault, P. F., Arquizan, C. und Bonafe, A. "*Rescue, combined, and stand-alone thrombectomy in the management of large vessel occlusion stroke using the solitaire device: a prospective 50-patient single-center study: timing, safety, and efficacy*" Stroke 42 (2011) 1929-1935
- Dalen, J. E. und Alpert, J. S. "*Silent Atrial Fibrillation and Cryptogenic Strokes*" Am J Med (2016)
- Dapson, R. W. "*Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments*" Biotech Histochem 68 (1993) 75-82
- del Zoppo, G. J. "*Acute anti-inflammatory approaches to ischemic stroke*" Ann N Y Acad Sci 1207 (2010) 143-148
- del Zoppo, G. J., Poeck, K., Pessin, M. S., Wolpert, S. M., Furlan, A. J., Ferbert, A., Alberts, M. J., Zivin, J. A., Wechsler, L., Busse, O. und et al. "*Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke*" Ann Neurol 32 (1992) 78-86
- Dutka, A. J., Kochanek, P. M. und Hallenbeck, J. M. "*Influence of granulocytopenia on canine cerebral ischemia induced by air embolism*" Stroke 20 (1989) 390-395
- Eder, M. und Gedigk, P. Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie. In: Springer, 2013,
- Engelmann, B. und Massberg, S. "*Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*" Nat Rev Immunol (2012)
- Eschenfelder, C. C., Zeller, J. A. und Stinge, R. "*Schlaganfall - Ursachen und Klassifikation*" Hämostaseologie 26 (2006) 298-308

- Feurer, R., Sadikovic, S., Sepp, D., Esposito, L., Schleef, M., Bockelbrink, A., Schwarze, J., Hemmer, B., Sander, D. und Poppert, H. "Patent foramen ovale is not associated with an increased risk of stroke recurrence" Eur J Neurol 17 (2010) 1339-1345
- Fisher, C. M. "Lacunar strokes and infarcts: a review" Neurology 32 (1982) 871-876
- Forster, K., Poppert, H., Conrad, B. und Sander, D. "Elevated inflammatory laboratory parameters in spontaneous cervical artery dissection as compared to traumatic dissection: a retrospective case-control study" J Neurol 253 (2006) 741-745
- French, J. E. "The Structure of Natural and Experimental Thrombi" Ann R Coll Surg Engl 36 (1965) 191-200
- Fritschy, J. M. "Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry" Eur J Neurosci 28 (2008) 2365-2370
- Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D. D., Jr., Wroblewski, S. K., Wakefield, T. W., Hartwig, J. H. und Wagner, D. D. "Extracellular DNA traps promote thrombosis" Proc Natl Acad Sci U S A 107 (2010) 15880-15885
- Furie, B. und Furie, B. C. "Mechanisms of thrombus formation" N Engl J Med 359 (2008) 938-949
- Furlan, A., Higashida, R., Wechsler, L., Gent, M., Rowley, H., Kase, C., Pessin, M., Ahuja, A., Callahan, F., Clark, W. M., Silver, F. und Rivera, F. "Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism" JAMA 282 (1999) 2003-2011
- Gacs, G., Fox, A. J., Barnett, H. J. und Vinuela, F. "CT visualization of intracranial arterial thromboembolism" Stroke 14 (1983) 756-762
- Goldberger, J. J., Arora, R., Green, D., Greenland, P., Lee, D. C., Lloyd-Jones, D. M., Markl, M., Ng, J. und Shah, S. J. "Evaluating the Atrial Myopathy Underlying Atrial Fibrillation: Identifying the Arrhythmogenic and Thrombogenic Substrate" Circulation 132 (2015) 278-291
- Goldstein, L. B. und Samsa, G. P. "Reliability of the National Institutes of Health Stroke Scale. Extension to non-neurologists in the context of a clinical trial" Stroke 28 (1997) 307-310
- Gong, J., Wu, B., Guo, T., Zhou, S., He, B. und Peng, X. "Hyperleukocytosis: A report of five cases and review of the literature" Oncol Lett 8 (2014) 1825-1827
- Gralla, J., Brekenfeld, C., Mordasini, P. und Schroth, G. "Mechanical thrombolysis and stenting in acute ischemic stroke" Stroke 43 (2012) 280-285
- Grau, A. J., Brandt, T., Buggle, F., Orberk, E., Mytilineos, J., Werle, E., Conradt, Krause, M., Winter, R. und Hacke, W. "Association of cervical artery dissection with recent infection" Arch Neurol 56 (1999) 851-856
- Grau, A. J., Weimar, C., Buggle, F., Heinrich, A., Goertler, M., Neumaier, S., Glahn, J., Brandt, T., Hacke, W. und Diener, H. C. "Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank" Stroke 32 (2001) 2559-2566
- Guesdon, J. L., Ternynck, T. und Avrameas, S. "The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques" J Histochem Cytochem 27 (1979) 1131-1139

- Hacke, W., Donnan, G., Fieschi, C., Kaste, M., von Kummer, R., Broderick, J. P., Brott, T., Frankel, M., Grotta, J. C., Haley, E. C., Jr., Kwiatkowski, T., Levine, S. R., Lewandowski, C., Lu, M., Lyden, P., Marler, J. R., Patel, S., Tilley, B. C., Albers, G., Bluhmki, E., Wilhelm, M., Hamilton, S., Investigators, A. T., Investigators, E. T. und Investigators, N. r.-P. S. G. "Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials" Lancet 363 (2004) 768-774
- Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Davalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K. R., Medeghri, Z., Machnig, T., Schneider, D., von Kummer, R., Wahlgren, N., Toni, D. und Investigators, E. "Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke" N Engl J Med 359 (2008) 1317-1329
- Hantson, L., De Weerd, W., De Keyser, J., Diener, H. C., Franke, C., Palm, R., Van Orshoven, M., Schoonderwalt, H., De Klippel, N., Herroelen, L. und et al. "The European Stroke Scale" Stroke 25 (1994) 2215-2219
- Hart, R. G., Catanese, L., Perera, K. S., Ntaios, G. und Connolly, S. J. "Embollic Stroke of Undetermined Source: A Systematic Review and Clinical Update" Stroke 48 (2017) 867-872
- Hart, R. G., Diener, H. C., Coutts, S. B., Easton, J. D., Granger, C. B., O'Donnell, M. J., Sacco, R. L., Connolly, S. J. und Cryptogenic Stroke, E. I. W. G. "Embollic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct" Lancet Neurol 13 (2014) 429-438
- Hayat, M. A. Microscopy, Immunohistochemistry and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy. In: Kluwer Academic, New York, NY, 2002,
- Healey, J. S., Connolly, S. J., Gold, M. R., Israel, C. W., Van Gelder, I. C., Capucci, A., Lau, C. P., Fain, E., Yang, S., Bailleul, C., Morillo, C. A., Carlson, M., Themeles, E., Kaufman, E. S., Hohnloser, S. H. und Investigators, A. "Subclinical atrial fibrillation and the risk of stroke" N Engl J Med 366 (2012) 120-129
- Horling, L., Neuhuber, W. L. und Raab, M. "Pitfalls using tyramide signal amplification (TSA) in the mouse gastrointestinal tract: endogenous streptavidin-binding sites lead to false positive staining" J Neurosci Methods 204 (2012) 124-132
- Houser, O. W., Campbell, J. K., Baker, H. L., Jr. und Sundt, T. S., Jr. "Radiologic evaluation of ischemic cerebrovascular syndromes with emphasis on computed tomography" Radiol Clin North Am 20 (1982) 123-142
- Huang, S. N., Minassian, H. und More, J. D. "Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion" Lab Invest 35 (1976) 383-390
- Irringer, W. "Histologische Altersbestimmung von Thrombosen und Embolien" Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin 336 (1963) 220-237
- Jang, I. K., Gold, H. K., Ziskind, A. A., Fallon, J. T., Holt, R. E., Leinbach, R. C., May, J. W. und Collen, D. "Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. A possible explanation for resistance to coronary thrombolysis" Circulation 79 (1989) 920-928

- Jansen, O., Macho, J. M., Killer-Oberpfalzer, M., Liebeskind, D. und Wahlgren, N. "Neurothrombectomy for the Treatment of Acute Ischemic Stroke: Results from the TREVO Study" Cerebrovasc Dis 36 (2013) 218-225
- Jin, R., Yang, G. und Li, G. "Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells" J Leukoc Biol 87 (2010) 779-789
- Kan, I., Yuki, I., Murayama, Y., Vinuela, F. A., Kim, R. H., Vinters, H. V. und Vinuela, F. "A novel method of thrombus preparation for use in a swine model for evaluation of thrombectomy devices" AJNR Am J Neuroradiol 31 (2010) 1741-1743
- Kattula, S., Byrnes, J. R. und Wolberg, A. S. "Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis" Arterioscler Thromb Vasc Biol 37 (2017) e13-e21
- Kent, D. M., Dahabreh, I. J., Ruthazer, R., Furlan, A. J., Weimar, C., Serena, J., Meier, B., Mattle, H. P., Di Angelantonio, E., Paciaroni, M., Schuchlenz, H., Homma, S., Lutz, J. S. und Thaler, D. E. "Anticoagulant vs. antiplatelet therapy in patients with cryptogenic stroke and patent foramen ovale: an individual participant data meta-analysis" Eur Heart J 36 (2015) 2381-2389
- Kirchhof, K., Welzel, T., Mecke, C., Zoubaa, S. und Sartor, K. "Differentiation of white, mixed, and red thrombi: value of CT in estimation of the prognosis of thrombolysis phantom study" Radiology 228 (2003) 126-130
- Kochanek, P. M. und Hallenbeck, J. M. "Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke" Stroke 23 (1992) 1367-1379
- Kohler, G. und Milstein, C. "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion" Eur J Immunol 6 (1976) 511-519
- Kolominsky-Rabas, P. L., Sarti, C., Heuschmann, P. U., Graf, C., Siemonsen, S., Neundoerfer, B., Katalinic, A., Lang, E., Gassmann, K. G. und von Stockert, T. R. "A prospective community-based study of stroke in Germany--the Erlangen Stroke Project (ESPro): incidence and case fatality at 1, 3, and 12 months" Stroke 29 (1998) 2501-2506
- Kulesh, S. D., Kastsinevich, T. M., Kliatskova, L. A., Sauchanka, M. E., Filina, N. A., Shumskas, M. S., Schwab, S., Hiltz, M. J. und Kolominsky-Rabas, P. L. "Long-term outcome after stroke in Belarus: the Grodno stroke study" Stroke 42 (2011) 3274-3276
- Lam, C. K., Yoo, T., Hiner, B., Liu, Z. und Grutzendler, J. "Embolus extravasation is an alternative mechanism for cerebral microvascular recanalization" Nature 465 (2010) 478-482
- Levine, S. R. "The time man has cometh to brain: tick...death....tick...death" Stroke 37 (2006) 10
- Leys, D., Pruvo, J. P., Godefroy, O., Rondepierre, P. und Leclerc, X. "Prevalence and significance of hyperdense middle cerebral artery in acute stroke" Stroke 23 (1992) 317-324
- Liebeskind, D. S., Sanossian, N., Yong, W. H., Starkman, S., Tsang, M. P., Moya, A. L., Zheng, D. D., Abolian, A. M., Kim, D., Ali, L. K., Shah, S. H., Towfighi, A., Ovbiagele, B., Kidwell, C. S., Tateshima, S., Jahan, R., Duckwiler, G. R., Vinuela, F., Salamon, N., Villablanca, J. P., Vinters, H. V., Marder, V. J. und Saver, J. L. "CT and MRI early vessel signs reflect clot composition in acute stroke" Stroke 42 (2011) 1237-1243

- Llanes, J. N., Kidwell, C. S., Starkman, S., Leary, M. C., Eckstein, M. und Saver, J. L. "The Los Angeles Motor Scale (LAMS): a new measure to characterize stroke severity in the field" Prehosp Emerg Care 8 (2004) 46-50
- Mackman, N. "Triggers, targets and treatments for thrombosis" Nature 451 (2008) 914-918
- Marder, V. J., Chute, D. J., Starkman, S., Abolian, A. M., Kidwell, C., Liebeskind, D., Ovbiagele, B., Vinuela, F., Duckwiler, G., Jahan, R., Vespa, P. M., Selco, S., Rajajee, V., Kim, D., Sanossian, N. und Saver, J. L. "Analysis of thrombi retrieved from cerebral arteries of patients with acute ischemic stroke" Stroke 37 (2006) 2086-2093
- Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M. L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A. B., Konrad, I., Kennerknecht, E., Reges, K., Holdenrieder, S., Braun, S., Reinhardt, C., Spannagl, M., Preissner, K. T. und Engelmann, B. "Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases" Nat Med 16 (2010) 887-896
- Meunier, J. M., Wenker, E., Lindsell, C. J. und Shaw, G. J. "Individual lytic efficacy of recombinant tissue plasminogen activator in an in vitro human clot model: rate of "nonresponse"" Acad Emerg Med 20 (2013) 449-455
- Molina, C. A. "Imaging the clot: does clot appearance predict the efficacy of thrombolysis?" Stroke 36 (2005) 2333-2334
- Mori, E., Yoneda, Y., Tabuchi, M., Yoshida, T., Ohkawa, S., Ohsumi, Y., Kitano, K., Tsutsumi, A. und Yamadori, A. "Intravenous recombinant tissue plasminogen activator in acute carotid artery territory stroke" Neurology 42 (1992) 976-982
- Mulisch, M. und Welsch, U. Schema der ABC-Technik. In: "Romeis Mikroskopische Technik", Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, 2010, 18. Auflage
- Murakami, T., Mizuno, S., Takahashi, Y., Ohsato, K., Moriuchi, I., Arai, Y., Mifune, J., Shimizu, M. und Ohnaka, M. "Intracoronary aspiration thrombectomy for acute myocardial infarction" Am J Cardiol 82 (1998) 839-844
- Niessen, F., Hilger, T., Hoehn, M. und Hossmann, K. A. "Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke" Stroke 34 (2003) 2019-2024
- Niessen, J. M., van der Schaaf, I. C., van Dam, L., Vink, A., Vos, J. A., Schonewille, W. J., de Bruin, P. C., Mali, W. P. und Velthuis, B. K. "Histopathologic composition of cerebral thrombi of acute stroke patients is correlated with stroke subtype and thrombus attenuation" PLoS One 9 (2014) e88882
- NINDS-Study-Group "Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group" Stroke 28 (1997) 2109-2118
- NINDS-Study-Group "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group" N Engl J Med 333 (1995) 1581-1587
- Nogueira, R. G., Lutsep, H. L., Gupta, R., Jovin, T. G., Albers, G. W., Walker, G. A., Liebeskind, D. S., Smith, W. S. und Trialists, T. "Trepo versus Merci retrievers for thrombectomy revascularisation of large vessel occlusions in acute ischaemic stroke (TREVO 2): a randomised trial" Lancet 380 (2012) 1231-1240

- Noser, E. A., Shaltoni, H. M., Hall, C. E., Alexandrov, A. V., Garami, Z., Cacayorin, E. D., Song, J. K., Grotta, J. C. und Campbell, M. S., 3rd "Aggressive mechanical clot disruption: a safe adjunct to thrombolytic therapy in acute stroke?" Stroke 36 (2005) 292-296
- Ntaios, G., Papavasileiou, V., Milionis, H., Makaritsis, K., Vemmou, A., Koroboki, E., Manios, E., Spengos, K., Michel, P. und Vemmos, K. "Embolitic Strokes of Undetermined Source in the Athens Stroke Registry: An Outcome Analysis" Stroke 46 (2015) 2087-2093
- Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B. C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y. M., Sajer, S. A. und Furie, B. "Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets" Nature 359 (1992) 848-851
- Penumbra-Pivotal-Stroke-Trial-Investigators "The penumbra pivotal stroke trial: safety and effectiveness of a new generation of mechanical devices for clot removal in intracranial large vessel occlusive disease" Stroke 40 (2009) 2761-2768
- Pfefferkorn, T., Saam, T., Rominger, A., Habs, M., Gerdes, L. A., Schmidt, C., Cyran, C., Straube, A., Linn, J., Nikolaou, K., Bartenstein, P., Reiser, M., Hacker, M. und Dichgans, M. "Vessel wall inflammation in spontaneous cervical artery dissection: a prospective, observational positron emission tomography, computed tomography, and magnetic resonance imaging study" Stroke 42 (2011) 1563-1568
- Prandoni, P. "Venous and arterial thrombosis: two aspects of the same disease?" Eur J Intern Med 20 (2009) 660-661
- Pressman, B. D., Tourje, E. J. und Thompson, J. R. "An early CT sign of ischemic infarction: increased density in a cerebral artery" AJR Am J Roentgenol 149 (1987) 583-586
- Rabai, G., Szilagyi, N., Sotonyi, P., Kovalszky, I., Szabo, L., Machovich, R. und Kolev, K. "Contribution of neutrophil elastase to the lysis of obliterative thrombi in the context of their platelet and fibrin content" Thromb Res 126 (2010) e94-101
- Ramos-Vara, J. A. "Technical aspects of immunohistochemistry" Vet Pathol 42 (2005) 405-426
- Remmele, W. Pathologie 1. In: Springer, 2013,
- Rha, J. H. und Saver, J. L. "The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis" Stroke 38 (2007) 967-973
- Riedel, C. H., Zimmermann, P., Jensen-Kondering, U., Stingele, R., Deuschl, G. und Jansen, O. "The importance of size: successful recanalization by intravenous thrombolysis in acute anterior stroke depends on thrombus length" Stroke 42 (2011) 1775-1777
- Rittersma, S. Z., van der Wal, A. C., Koch, K. T., Piek, J. J., Henriques, J. P., Mulder, K. J., Ploegmakers, J. P., Meesterma, M. und de Winter, R. J. "Plaque instability frequently occurs days or weeks before occlusive coronary thrombosis: a pathological thrombectomy study in primary percutaneous coronary intervention" Circulation 111 (2005) 1160-1165
- Roth, C., Papanagiotou, P., Behnke, S., Walter, S., Haass, A., Becker, C., Fassbender, K., Politi, M., Korner, H., Romann, M. S. und Reith, W. "Stent-assisted mechanical recanalization for treatment of acute intracerebral artery occlusions" Stroke 41 (2010) 2559-2567

- Ruhnau, J., Schulze, J., Dressel, A. und Vogelgesang, A. "Thrombosis, Neuroinflammation, and Poststroke Infection: The Multifaceted Role of Neutrophils in Stroke" J Immunol Res 2017 (2017) 5140679
- Saqqur, M., Uchino, K., Demchuk, A. M., Molina, C. A., Garami, Z., Calleja, S., Akhtar, N., Orouk, F. O., Salam, A., Shuaib, A., Alexandrov, A. V. und Investigators, C. "Site of arterial occlusion identified by transcranial Doppler predicts the response to intravenous thrombolysis for stroke" Stroke 38 (2007) 948-954
- Saver, J. L. "Time is brain--quantified" Stroke 37 (2006) 263-266
- Saver, J. L., Goyal, M., Bonafe, A., Diener, H. C., Levy, E. I., Pereira, V. M., Albers, G. W., Cognard, C., Cohen, D. J., Hacke, W., Jansen, O., Jovin, T. G., Mattle, H. P., Nogueira, R. G., Siddiqui, A. H., Yavagal, D. R., Baxter, B. W., Devlin, T. G., Lopes, D. K., Reddy, V. K., du Mesnil de Rochemont, R., Singer, O. C., Jahan, R. und Investigators, S. P. "Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke" N Engl J Med 372 (2015) 2285-2295
- Saver, J. L., Jahan, R., Levy, E. I., Jovin, T. G., Baxter, B., Nogueira, R. G., Clark, W., Budzik, R., Zaidat, O. O. und Trialists, S. "Solitaire flow restoration device versus the Merci Retriever in patients with acute ischaemic stroke (SWIFT): a randomised, parallel-group, non-inferiority trial" Lancet 380 (2012) 1241-1249
- Schievink, W. I., Wijdicks, E. F. und Kuiper, J. D. "Seasonal pattern of spontaneous cervical artery dissection" J Neurosurg 89 (1998) 101-103
- Sherry, S., National Research Council (U.S.). Task Force on Thrombosis. und International Committee on Haemostasis and Thrombosis. Thrombosis. In: "National Academy of Sciences Publication 1706", National Academy of Sciences, Washington., 1969,
- Shi, S. R., Key, M. E. und Kalra, K. L. "Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections" J Histochem Cytochem 39 (1991) 741-748
- Silvain, J., Collet, J. P., Nagaswami, C., Beygui, F., Edmondson, K. E., Bellemain-Appaix, A., Cayla, G., Pena, A., Brugier, D., Barthelemy, O., Montalescot, G. und Weisel, J. W. "Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction" J Am Coll Cardiol 57 (2011) 1359-1367
- Simons, N., Mitchell, P., Dowling, R., Gonzales, M. und Yan, B. "Thrombus composition in acute ischemic stroke: A histopathological study of thrombus extracted by endovascular retrieval" J Neuroradiol (2014)
- Smith, W. S., Sung, G., Saver, J., Budzik, R., Duckwiler, G., Liebeskind, D. S., Lutsep, H. L., Rymer, M. M., Higashida, R. T., Starkman, S., Gobin, Y. P., Multi, M. I., Frei, D., Grobelny, T., Hellinger, F., Huddle, D., Kidwell, C., Koroshetz, W., Marks, M., Nesbit, G. und Silverman, I. E. "Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial" Stroke 39 (2008) 1205-1212
- Speckmann, E.-J., Deetjen, P. und Hescheler, J. Blutstillung, Blutgerinnung. In: "Physiologie", Urban & Fischer Verlag/Elsevier, München und Jena, 2004, 5. Auflage
- Stoddard, M. F., Dawkins, P. R., Prince, C. R. und Ammass, N. M. "Left atrial appendage thrombus is not uncommon in patients with acute atrial fibrillation and a recent embolic event: a transesophageal echocardiographic study" J Am Coll Cardiol 25 (1995) 452-459

- Stoll, G., Kleinschnitz, C. und Nieswandt, B. "*Combating innate inflammation: a new paradigm for acute treatment of stroke?*" Ann N Y Acad Sci 1207 (2010) 149-154
- Streefkerk, J. G. "*Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol*" J Histochem Cytochem 20 (1972) 829-831
- Tomsick, T. A., Brott, T. G., Chambers, A. A., Fox, A. J., Gaskill, M. F., Lukin, R. R., Pleatman, C. W., Wiot, J. G. und Bourekas, E. "*Hyperdense middle cerebral artery sign on CT: efficacy in detecting middle cerebral artery thrombosis*" AJNR Am J Neuroradiol 11 (1990) 473-477
- Tomsick, T. A., Brott, T. G., Olinger, C. P., Barsan, W., Spilker, J., Eberle, R. und Adams, H. "*Hyperdense middle cerebral artery: incidence and quantitative significance*" Neuroradiology 31 (1989) 312-315
- Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. und Zychlinsky, A. "*Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms*" Cell Microbiol 8 (2006) 668-676
- van Swieten, J. C., Koudstaal, P. J., Visser, M. C., Schouten, H. J. und van Gijn, J. "*Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients*" Stroke 19 (1988) 604-607
- von Bruhl, M. L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Kollnberger, M., Byrne, R. A., Laitinen, I., Walch, A., Brill, A., Pfeiler, S., Manukyan, D., Braun, S., Lange, P., Riegger, J., Ware, J., Eckart, A., Haidari, S., Rudelius, M., Schulz, C., Echtler, K., Brinkmann, V., Schwaiger, M., Preissner, K. T., Wagner, D. D., Mackman, N., Engemann, B. und Massberg, S. "*Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*" J Exp Med 209 (2012) 819-835
- von Kummer, R., Meyding-Lamade, U., Forsting, M., Rosin, L., Rieke, K., Hacke, W. und Sartor, K. "*Sensitivity and prognostic value of early CT in occlusion of the middle cerebral artery trunk*" AJNR Am J Neuroradiol 15 (1994) 9-15; discussion 16-18
- Wahlgren, N., Ahmed, N., Davalos, A., Hacke, W., Millan, M., Muir, K., Roine, R. O., Toni, D., Lees, K. R. und investigators, S. "*Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study*" Lancet 372 (2008) 1303-1309
- Walcott, B. P., Boehm, K. M., Stapleton, C. J., Mehta, B. P., Nahed, B. V. und Ogilvy, C. S. "*Retrievable stent thrombectomy in the treatment of acute ischemic stroke: Analysis of a revolutionizing treatment technique*" J Clin Neurosci 20 (2013) 1346-1349
- Yaghi, S., Boehme, A. K., Hazan, R., Hod, E. A., Canaan, A., Andrews, H. F., Kamel, H., Marshall, R. S. und Elkind, M. S. "*Atrial Cardiopathy and Cryptogenic Stroke: A Cross-sectional Pilot Study*" J Stroke Cerebrovasc Dis 25 (2016) 110-114
- Yuki, I., Kan, I., Vinters, H. V., Kim, R. H., Golshan, A., Vinuela, F. A., Sayre, J. W., Murayama, Y. und Vinuela, F. "*The impact of thromboemboli histology on the performance of a mechanical thrombectomy device*" AJNR Am J Neuroradiol 33 (2012) 643-648
- Zivin, J. A., Fisher, M., DeGirolami, U., Hemenway, C. C. und Stashak, J. A. "*Tissue plasminogen activator reduces neurological damage after cerebral embolism*" Science 230 (1985) 1289-1292

7.6 Danksagung

Ich danke zunächst sehr herzlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Holger Poppert, Oberarzt an der Neurologischen Klinik des Klinikums rechts der Isar, der mich mit diesem hoch spannenden Thema betraut hat, mich dabei stets unterstützte und für alle Fragen und Probleme immer offen war.

Darüber hinaus danke ich meinem Betreuer Herrn Dr. med. Lucas Schirmer für die fachliche Unterstützung bei allen Arbeiten und die enge Begleitung. Weiterer Dank gebührt allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „zerebrovaskuläres System“.

Aus der Abteilung für Neuroradiologie des Klinikums rechts der Isar leistete einen großen Beitrag ebenfalls Herr Dr. med. Tobias Boeckh-Behrens, mit dem ich ebenso unkompliziert und direkt zusammen arbeiten konnte.

Zu guter Letzt und ganz besonders gilt mein Dank aber meiner Freundin Andrea und meiner Familie, die mich während meines Medizinstudiums und darüber hinaus immer von ganzem Herzen unterstützt haben.