

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Histologische Untersuchung intrakraniell geborgener Thromben beim akuten Schlaganfall

Ngoc Kim Morató Altimira

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

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Jan Holger Poppert
2. Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Die Dissertation wurde am 21.02.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.07.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Schlaganfall.....	1
1.2. Epidemiologie.....	2
1.3. Ätiologie.....	3
1.4. Pathogenese.....	7
1.5. Anatomie.....	9
1.6. Klinik.....	10
1.7. Diagnostik.....	14
1.8. Risikoeinschätzung bei VHF.....	14
1.9. Prophylaxe.....	16
1.10. Therapie.....	17
1.11. Lyse.....	18
1.12. Intervention.....	20
1.13. Histologie.....	22
1.14. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	22
1.15. Immunhistochemische Färbung.....	23
2. Fragestellung.....	27
3. Material und Methode.....	28
3.1. Patientenkollektiv.....	28
3.2. Probengewinnung.....	28
3.3. Aufbereitung der Thromben.....	28
3.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	29

3.5.	Immunhistochemie	29
3.5.1.	Antikörper	29
3.5.2.	Färbeprotokoll	30
3.5.2.1.	Alkoholreihe	30
3.5.2.2.	Antigendemaskierung.....	31
3.5.2.3.	Blockierungsschritte	31
3.5.2.4.	Applikation der Antikörper und ABC-Reaktion	32
3.5.2.5.	Färbung und Gegenfärbung.....	32
3.5.2.6.	Alkoholreihe und Eindeckelung	32
3.6.	Auswertung	33
3.7.	Klinische Daten	36
3.8.	Statistik.....	37
3.9.	Liste der verwendeten Geräte, Materialien, Software, Chemikalien	38
4.	Ergebnisse	41
4.1.	Patientenkollektiv.....	41
4.2.	Ätiologie	41
4.3.	Färbungen und Histologie	43
4.4.	Interventionelle Parameter	44
4.5.	Primäre Endpunkte.....	44
5.	Diskussion.....	49
5.1.	Baseline-Charakteristika.....	49
5.2.	Histologie.....	50
5.3.	Klinik	52
5.4.	Einschränkungen	54
5.5.	Schlussfolgerung.....	55
6.	Zusammenfassung.....	60
7.	Anhang	i

7.1.	Literaturverzeichnis.....	i
7.2.	Danksagung	xiv

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Hirnversorgende Gefäße “Circle of Willis” von Phil Schatz. CC BY 4.0	9
Abbildung 2 Mechanismus eines Stent-Retrievers (Fiehler and Gerloff, 2015)	21
Abbildung 3 Struktur eines IgGs (Ramos-Vara, 2005)	23
Abbildung 4 Direkte und indirekte IHC (Ramos-Vara, 2005)	25
Abbildung 5 Avidin-Biotin-Complex Methode (ABC) (Ramos-Vara, 2005)	26
Abbildung 6 Thrombus mit HE-Färbung	34
Abbildung 7 Beispiel Farbsegmentierung und Grauwertbestimmung	35
Abbildung 8 direkter Vergleich der Segmentierung mit Photoshop CS4 (Adobe).....	36
Abbildung 9 Zusammenhang Ätiologie & histologische Komponenten und Anzahl der Rekanalisationsmanöver/mRS (Boeckh-Behrens et al., 2016a).	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TOAST-Kriterien (Adams et al., 1993)	3
Tabelle 2 Kriterien für kardioembolische Schlaganfälle (Adams et al., 1993)	5
Tabelle 3 Endotheliale Moleküle der Thrombogenese (Blann, 2003)	8
Tabelle 4 Schweregrad eines Schlaganfalls	10
Tabelle 5 NIHSS (Goldstein and Samsa, 1997).....	11
Tabelle 6 Modifizierte Rankin Skala	13
Tabelle 7 CHA2DS2-VASc-Score (Kirchhof et al., 2016)	15
Tabelle 8 Schlaganfallrisiko nach Punkten (Camm et al., 2010)	15
Tabelle 9 Thrombolysis in Cerebral Infarction (TICI) (Noser et al., 2005)	17
Tabelle 10 Ausschlusskriterien einer Lysetherapie mit rt-PA nach NINDS	19
Tabelle 11 Details der verwendeten Antikörper	30
Tabelle 12 Geräte	38
Tabelle 13 Materialien	38
Tabelle 14 Software	39
Tabelle 15 Chemikalien	39
Tabelle 16 Baseline-Charakteristika (Boeckh-Behrens et al., 2016a).....	42
Tabelle 17 Interventionelle & histologische Parameter (Boeckh-Behrens et al., 2016a).	43
Tabelle 18 Vergleich nichtkardioembolischer und kardioembolischer Schlaganfallpatienten (Boeckh-Behrens, Kleine, et al., 2016).....	45
Tabelle 19 Vergleich nichtkardioembolischer und kryptogener Schlaganfallpatienten (Boeckh-Behrens et al., 2016a).	46

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
A.	Arteria (lat.), Arterie
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACA	Arteria cerebri anterior (lat.)
ACI	Arteria carotis interna (lat.)
AG	Antigen
AK	Antikörper
aPTT	Aktivierete partielle Thromboplastinzeit
Art.-Nr.	Artikelnummer
BA	Basilararterie
bzw.	beziehungsweise
CD45	Cluster of Differentiation 45 (engl.)
cCT	kraniale Computertomographie
D	Deutschland
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
d.h.	das heisst
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleic Acid (engl.), Desoxyribonukleinsäure
EHIS	European Health Interview Survey (engl.), europäischer Fragebogen

Abkürzungsverzeichnis

engl.	englisch
ESUS	Embolic stroke of undetermined source (engl.), embolischer Schlaganfall ungeklärter Quelle
et al.	et alii (lat.), und andere
Fab	variable antigenbindende Region eines Antikörpers
Fc	konstante Region eines Antikörpers
GEDA	Gesundheit in Deutschland aktuell (Befragung vom RKI)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IAT	Intraarterielle Thrombolyse
ICA	internal carotid artery (engl.), Arteria carotis interna (lat.)
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (engl.), 10. Revision der Internationalen Klassifikation der Krankheiten
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
INR	International Normalized Ratio (engl.)
IVT	intravenöse Thrombolyse
IV tPA	intravenous tissue-type plasminogen activator
lat.	Lateinisch
KM	Kontrastmittel

Abkürzungsverzeichnis

MCA	Middle cerebral artery (engl.), Arteria cerebri media (lat.)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRS	modified Rankin-Scale (engl., Klassifikation)
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NE	Neutrophile Elastase
NIHSS	National Institute of Health Stroke Scale (engl., Klassifikation)
NINDS	The National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NNT	Number needed to treat (engl.)
NOAC	Non Vitamin K antagonist oral anticoagulant (engl.)
NOAK	neue orale Antikoagulation
p	Signifikanz
PBS	Phosphate buffered saline (engl.), phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Posterior cerebral artery (engl.), Arteria cerebri posterior (lat.)
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie mit Computer-Tomographie
PFO	persistierend offenes Foramen ovale
RCVS	Reversibles zerebrales Vasokonstriktionssyndrom

Abkürzungsverzeichnis

RBC	Red-Blood-Cell-Count (engl.), Anteil an Erythrozyten in der HE-Färbung
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonucleic Acid (engl.), Ribonukleinsäure
rt-PA	recombinant tissue-type plasminogene activators (engl.), rekombinante gewebspezifische Plasminogen-Aktivatoren
sog.	so genannt
TEE	transoesophageale Echokardiographie
TF	tissue factor (engl.)
TIA	transitorische ischämische Attacke
TICI	Thrombolysis in Cerebral Infarction (engl.,Klassifikation)
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (engl., Klassifikation)
t-PA	gewebspezifische Plasminogen-Aktivatoren
TTE	transthorakale Echokardiographie
u. a.	unter anderem
VHF	Vorhofflimmern
VKA	Vitamin K-Antagonist
vWF	von Willebrand-Faktor
WBC	White-Blood-Cell-Count (engl.), Anteil an Leukozyten in der HE- Färbung
Z. n.	Zustand nach

1. Einleitung

1.1. Schlaganfall

Ein Schlaganfall ist definiert als neurologisches Defizit aufgrund einer akuten fokalen Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), vaskulärer Genese. Hierzu zählen zerebrale Infarkte, intrazerebrale Hämorrhagien und Subarachnoidalblutungen (Sacco et al., 2013). Prinzipiell wird nach der Ursache der Schlaganfälle zwischen ischämischen (etwa 80% der Fälle) und hämorrhagischen (etwa 20%) Schlaganfällen unterschieden (Kolominsky-Rabas et al., 1998). Bei ischämischen Schlaganfällen wird durch die fokale Minderversorgung des Gehirns aufgrund von Stenosierung oder Okkludierung eines Gefäßes der Ausfall von Funktionen des ZNS verursacht. Es kommt zum Sauerstoffmangel dieses Versorgungsgebietes aufgrund einer Thrombusbildung, was zum Zelltod führt (Sacco et al., 2013).

Etwa ein Drittel der akuten ischämischen Schlaganfälle sind unklarer Genese, werden demnach als kryptogen klassifiziert und können trotz intensiver Diagnostik nicht zugeordnet werden (Grau et al., 2001, Sacco et al., 1989, Guercini et al., 2008). Dies stellt uns vor zahlreiche Probleme, vor allem zur sekundären Schlaganfallprophylaxe, die gelöst werden müssen. Kryptogene Schlaganfälle sollten demnach im Fokus der Forschung in diesem Gebiet stehen (Putala and Tatlisumak, 2014). Diese Arbeit beschäftigt sich mit akuten ischämischen Schlaganfällen, die mittels mechanischer Rekanalisation und Thrombektomie therapiert worden sind sowie der histologischen Aufarbeitung der intrakraniell geborgenen Thromben. Ziel war es durch die Zusammensetzung der Thromben, mittels Analyse der histologischen Komponenten, die Ätiologie des Infarkts zu ermitteln. Die weiterführende Untersuchung der Thromben, inklusive spezifische immunhistochemische Färbungen, soll vor allem die Ätiologie der kryptogenen Thromben zeigen.

1.2. Epidemiologie

Der Schlaganfall ist weltweit die zweithäufigste Todesursache und eine der führenden Ursachen für eine Behinderung als Erwachsener (Lozano et al., 2012, Murray et al., 2012). Die 12-Monats-Prävalenz eines Schlaganfalls oder chronischer Beschwerden nach einem Schlaganfall liegt insgesamt bei unter 55Jährigen unter 1%, steigt danach aber schnell und überproportional auf bis zu 6,3% ab 75 Jahren an (Busch MA, Kuhnert R, 2017). Im Jahr 2013 starben insgesamt 58.556 Personen (35.389 Frauen und 23.167 Männer) an einer zerebrovaskulären Erkrankung (ICD-10: I60 bis I69). Darunter zählt als das wichtigste Krankheitsbild der Schlaganfall. Dies entspricht 6,6% aller Todesfälle (7,4% bei Frauen, 5,4% bei Männern). In Deutschland ist der Schlaganfall damit die zweithäufigste Todesursache nach der koronaren Herzkrankheit (RKI, Gesundheitsberichterstattung, 2015). Innerhalb der ersten zwölf Monate nach einem Schlaganfall versterben etwa ein Viertel bis ein Drittel der Patienten. Circa ein Zehntel der überlebenden Patienten mit einem erstmaligen Schlaganfall erleidet innerhalb eines Jahres einen weiteren Schlaganfall (Günster C, 2011; van den Bussche H et al., 2010). Unter den Patienten mit einem Schlaganfall unklarer Genese sind es sogar ein Drittel, die einen weiteren Schlaganfall innerhalb des ersten Jahres erleiden (Bang et al., 2003).

„The number of stroke patients and the healthcare costs of strokes in Germany will rise continuously until the year 2025. Therefore, stroke prevention and reduction of stroke-related disability should be made priorities in health planning policies.“ (Kolominsky-Rabas et al., 2006). Weltweit ändert sich die Epidemiologie der Schlaganfälle rasch. Eine regelmäßige Aktualisierung der Fallzahlen und deren Auswirkungen sind maßgebend für die Forschung zur Weiterentwicklung von Therapien und Präventionen (Feigin et al., 2015).

1.3. Ätiologie

Im klinischen Alltag hat sich die Klassifizierung der Subtypen akuter Schlaganfälle nach TOAST (Trial of Org 10172 in acute Stroke Treatment) etabliert. Dabei wird in fünf Kategorien nach dem Ursprung eines ischämischen Schlaganfalls unterteilt in Makroangiopathie, kardiale Embolie, Mikroangiopathie, Schlaganfall anderer Ursache und Schlaganfall unklarer Ursache. Die Einteilung in die Kategorien erfolgt durch Evaluation klinischer Parameter, der Bildgebung mittels kranialer Computertomographie (cCT) oder Magnetresonanztomographie (MRT), kardiologischer Untersuchungen, der Darstellung der extrakraniellen Gefäße, der Arteriographie und der Laborparameter. Dies ermöglicht eine einfache Handhabung der Klassifizierung sowie eine gute Reproduzierbarkeit (Adams et al., 1993). Auch zeigte sich die Einteilung in einer der fünf Kategorien als guter Prognosewert für das Langzeit-Überleben eines Schlaganfallpatienten, so dass sich die Anwendung der TOAST Kriterien im klinischen Alltag bewährt hat (Kolominsky-Rabas et al., 2001). Eine Übersicht der Kategorien zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1 TOAST-Kriterien (Adams et al., 1993)

Kategorie	Kriterien
1 Makroangiopathie	Kortikaler, subkortikaler, zerebellärer oder Hirnstamm-Infarkt >1,5cm, Stenose eines hirnversorgenden Gefäßes >50%
2 kardiale Embolie	Kortikaler, subkortikaler, zerebellärer oder Hirnstamm-Infarkt >1,5cm, Herzrhythmusstörungen, Klappenveränderungen, Z.n. Klappenersatz, kardiale Thromben, Endokarditis, dilatative Kardiomyopathie, Myokardinfarkt, angeborene Herzfehler
3 Mikroangiopathie	Lakunäres Syndrom, subkortikaler Infarkt < 1,5 cm

4 Andere Ursache	z.B. Vaskulopathien (Dissektionen), hämatologische Ursachen
5 Unklare Ursache	Keine oder konkurrierende oder nicht-konklusive klinische Befunde

TOAST 1: Unter der ersten Kategorie Makroangiopathie versteht man die arterioarteriell-embolischen Infarkte. Diese zeigen in der Bildgebung eine Stenose der A. carotis interna oder der A. vertebralis von über 50% zumeist bedingt durch Atherosklerose. Die Diagnose einer Claudicatio intermittens oder einer TIA im selben Versorgungsgebiet in der Vorgeschichte des Patienten unterstützen die klinische Diagnose eines Schlaganfalls arterioarteriell-embolischer Genese. Auch Läsionen von über 1,5cm Durchmesser im cCT oder MRT durch eine Thrombusbildung in größeren Arterien im kortikalen, subkortikalen, zerebellären Bereich des Hirns oder des Hirnstamms zählen ätiologisch zu den Makroangiopathien.

TOAST 2: Die zweite Kategorie beinhaltet die Schlaganfälle verursacht durch kardiale Embolien. Mindestens eine kardiale Ursache muss nachgewiesen werden können zur Diagnosestellung eines kardioembolischen Infarkts mit wahrscheinlicher oder möglicherweise kardioembolischer Genese. Hierunter zählen u.a. Herzrhythmusstörungen, Klappenveränderungen, Z. n. Klappenersatz, kardiale Thromben, Endokarditis, dilatative Kardiomyopathie, Myokardinfarkt. Durch fehlende Vorhofkontraktion beim VHF etwa, kommt es vermehrt zur Bildung von Vorhofthromben bevorzugt im linken Herzohr (Watson et al., 2009). Anschließend wird der Thrombus in distale Gefäße weitergeleitet, wo es, bei engeren Verhältnissen, zu einem Verschluss kommt. Klinisch und radiologisch zeigen sich die kardioembolischen Infarkte ähnlich den arterioarteriell-embolischen Infarkten. Eine vorangegangene TIA oder ein Schlaganfall in mehr als einem Versorgungsgebiet

unterstützen die klinische Diagnose eines kardioembolischen Infarktes. Tabelle 2 zeigt die Hochrisiko-Kriterien und die Kriterien für Patienten mit mittlerem Risiko.

Tabelle 2 Kriterien für kardioembolische Schlaganfälle (Adams et al., 1993)

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

TOAST 3: Basierend auf Mikroangiopathien zeigen lakunäre Infarkte, die dritte der fünf TOAST-Kategorien, ein sogenanntes lakunäres Syndrom. Das klinische Bild eines lakunären Infarkts wurde zusammengefasst zu vier lakunären Syndromen. Klinisch

imponiert der Patient z.B. mit einer rein motorischen Hemisymptomatik, einer rein sensorischen Hemisymptomatik, einer ataktischen Hemiparese oder einer gemischt sensomotorischen Hemisymptomatik (Bamford et al., 1987). Lakunäre Infarkte befinden sich zumeist in der Capsula interna, im Bereich der Corona radiata in den Basalganglien oder im Thalamus (Chamorro et al., 1991). Sie werden durch Verschluss der basal tiefliegenden Arterien verursacht, durch subkortikale Mikroangiopathien und sind demnach für die Therapie durch Thrombektomie nicht zugänglich. Trotz der anatomisch kleineren Läsionen können aus den lakunären Infarkten schwerwiegende kognitive Einschränkungen resultieren (Bamford et al., 1991, Makin et al., 2013). Diabetes mellitus oder Bluthochdruck unterstützen die klinische Diagnose eines lakunären Infarkts. Die Bildgebung zeigt ein normales cCT oder MRT oder eine Läsion des Hauptstamms oder der subkortikalen Hemisphäre kleiner 1,5cm. Kardiale Ursachen müssen ausgeschlossen werden. Die extrakraniellen Gefäße zeigen keine Stenose größer als 50%.

TOAST 4: Patienten mit z.B. Vaskulopathien oder hämatologischen Erkrankungen als Ursache für einen Schlaganfall gehören zur vierten Kategorie der akuten Schlaganfälle anderer Genese. Auch alle gesicherten anderen Ursachen wie das reversible zerebrale Vasokonstriktionssyndrom (RCVS) oder Carotidisdissektionen zählen dazu. In der Bildgebung zeigen sich Läsionen verschiedener Größe und unterschiedlicher Lokalisationen.

TOAST 5: Schlaganfälle unklarer Ursache bilden schließlich die fünfte Kategorie. Trotz ausführlicher Diagnostik kann keine klare Ursache gefunden werden. Auch können mehrere Diagnosen ursächlich für den Schlaganfall sein, so dass keine eindeutige Genese formuliert werden kann (Adams et al., 1993). Heute zählen diese zu den kryptogenen Schlaganfällen. Eine Untergruppe der kryptogenen Infarkte bildet ein embolic stroke of undetermined source (ESUS) bei denen man von einer embolischen Genese ausgeht (Geisler et al., 2018, Diener et al., 2017). Letztere werden durch

folgende Kriterien, nach Durchführung einer vollständigen Diagnostik, definiert: bildmorphologisch ist ein Infarkt im Gehirn mit einem nicht-lakunären Verteilungsmuster nachweisbar, eine über 50%ige Stenose eines intra- oder extrakraniellen Gefäßes, das das Infarktareal mitversorgt, und andere Ursachen wurde ausgeschlossen, es besteht kein Hauptrisikofaktor für eine kardiale Embolie (Hart et al., 2014).

1.4. Pathogenese

Grundlagen der Thrombosegenese basieren bis heute auf der sog. Virchow Trias. Diese postuliert die Entstehung eines Thrombus aufgrund von drei Faktoren: der Hyperkoagulabilität durch Veränderung der Blutzusammensetzung, der Stase durch Veränderung der Blutströmungsgeschwindigkeit und der Gefäßverletzung (Meeto, 2010). Heutzutage weiß man, dass viele weitere Prozesse und zahlreiche Substanzen zur Thrombogenese beitragen. Hierunter zählen Antithrombin III, Protein C, t-PA Inhibitoren und alpha 2-Antiplasmin. Eine zentrale Rolle bei der Veränderung der Blutgeschwindigkeit spielt die Immobilisation der Patienten bei z.B. einer Vollnarkose, einem Schlaganfall mit Hemiparese oder Herzerkrankungen. Ebenso wird die Strömung und Fließgeschwindigkeit des Blutes, durch fehlende Vorhofkontraktion, verändert. Es kommt, bevorzugt im linken Herzhohr, zur Bildung von Vorhofthromben (Watson et al., 2009, Stoddard et al., 1995). Ein gestörtes hämostatisches Gleichgewicht erhöht das Risiko einer Thrombusbildung auch durch Gefäßverletzungen. Dadurch werden Substanzen wie Thromboplastin und Kollagen vermehrt freigesetzt und gleichzeitig die Fibrinolyse vermindert (Bagot and Arya, 2008, Nielsen, 1991). Das gesunde Endothel sezerniert antikoagulatorische Faktoren, wie gewebsspezifische Plasminogen-Aktivatoren (t-PA) und das Enzym Adenosindiphosphatase sowie Vasodilatoren, wie Prostazyklin. Es kleidet das Gefäß, als Teil der Intima, von Innen aus und steht in direktem Kontakt zum Blut, so

dass es mitunter die Hämostase und den Blutdruck durch Regulierung der Gewebsflüssigkeit und des Gefäßtonus durch Vasokonstriktion steuert. Eine Liste an endothelialen Molekülen, die wichtig für die Thrombogenese und Hämostase sind zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3 Endotheliale Moleküle der Thrombogenese (Blann, 2003)

Oberflächenmoleküle	Thrombomodulin, Heparin, Protein C-Rezeptor, Gewebefaktor, Ectonucleotidase
Sezernierte/freigesetzte Moleküle	t-PA, vWF, Faktor V, Protein S, Plasminogenaktivator-Inhibitor, Prostazyklin, Thromboxane, Thrombozytenaktivierungs-Faktor

Kommt es zur Schädigung der Intima setzt das Endothel prokoagulatorische Substanzen frei. Darunter den von Willebrand-Faktor (vWF). Dieser verbindet Thrombozyten durch das Glykoprotein Ib und vermittelt die Adhäsion der Thrombozyten mit subendothelialen Substanzen, wie Kollagen (Blann, 2003). Das wiederum ist zusammen mit Thrombin einer der stärksten Aktivatoren der Thrombozyten. Sie stellen einer der wichtigsten Komponenten der primären zellulären Hämostase dar und tragen wesentlich zur Bildung eines Thrombus bei (Furie and Furie, 2008). Die sekundäre plasmatische Hämostase wird durch zahlreiche Gerinnungsfaktoren in der sog. Gerinnungskaskade reguliert und durch den Tissue Factor aktiviert. Dieser wird von den Thrombozyten freigesetzt (Mackman, 2006). Sie haben als Endziel den Thrombus durch die Spaltung von Fibrinogen mittels Thrombin zu stabilisieren. Es entstehen hierbei Fibrinmonomere, die eine Gerüst in Form eines Fibrinnetzes bilden (Di Nisio et al., 2005).

1.5. Anatomie

Grundsätzlich teilt sich die arterielle Blutversorgung des Gehirns in ein vorderes und ein hinteres Stromgebiet. Das vordere Stromgebiet wird durch die A. carotis interna (ACI) versorgt, die sich in die A. cerebri anterior (ACA) und A. cerebri media (MCA) aufzweigt. Das hintere Stromgebiet bilden die linke und rechte A. vertebralis. Diese vereinigen sich im Verlauf zur A. basilaris. Aus der A. basilaris entstehen die beiden A. cerebri posterior (PCA). Die Verbindung der zumeist paarigen Hirngefäße bildet der Circulus arteriosus Willisii. Er verbindet die beiden Stromgebiete über die Aa. communicans. Die Anatomie des Circulus arteriosus zeigt sich in vielen Fällen, sowohl während der Entwicklung als auch im Erwachsenenalter, als Variation (Ardakani et al., 2008, Van Overbeeke et al., 1991). Abbildung 1 zeigt schematisch die hirnversorgenden Gefäße.

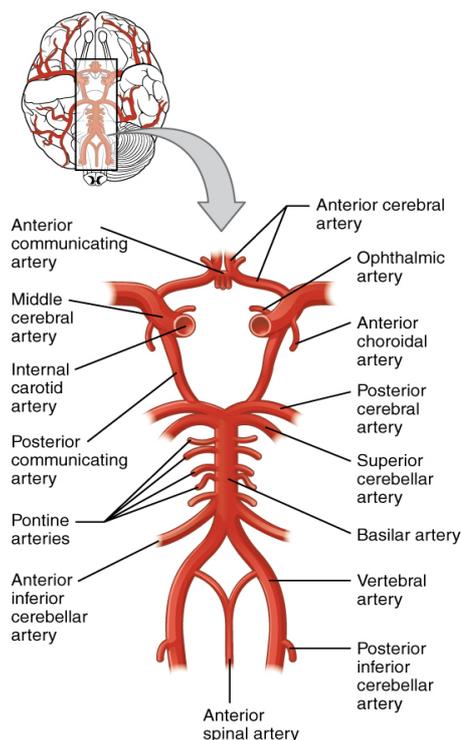


Abbildung 1 Hirnversorgende Gefäße "Circle of Willis" von Phil Schatz. CC BY 4.0

1.6. Klinik

Das klinische Bild eines Schlaganfalls zeigt zahlreiche Variationen. Entsprechend der Anatomie wird in Infarkte des vorderen und hinteren Stromgebiets unterteilt, was jedoch nach Symptomen der Schlaganfallpatienten nicht immer eindeutig zuzuordnen ist. Zur Reproduzierbarkeit und objektiven Beurteilung der Schwere eines Schlaganfalls hat sich vor allem ein Score im klinischen Alltag und auch international durchgesetzt: Der National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). Dieser beurteilt die neurologischen Einschränkungen eines Patienten verursacht durch einen Schlaganfall, darunter die Sprache, das Bewusstsein, visuelle Defizite, motorische und sensorische Einschränkungen. Er besteht aus 11 Kategorien, die jeweils 0 bis 4 Punkte vergeben. 0 Punkte bedeutet dabei eine normale Funktion ohne Einschränkungen. Je höher die Punktzahl, desto schwerwiegender die Einschränkung. Ursprünglich bestand der Score aus 15 Kategorien (Brott et al., 1989). Diese wurden mit der Zeit modifiziert, so dass letztendlich, nach Vergabe der jeweiligen Punkte in den 11 Kategorien, eine Endsumme entsprechend einem NIHSS Score von maximal 42 und einem Minimum von 0 entsteht. Eine grobe Einteilung des Schweregrades eines Schlaganfalls nach Punktzahl zeigt Tabelle 4 nach Hage et al., 2011.

Tabelle 4 Schweregrad eines Schlaganfalls

NIHSS Punkte	Schweregrad des Schlaganfalls
0	Keine Symptome eines Schlaganfalls
1-4	Leichter Schlaganfall
5-15	Moderater Schlaganfall
16-20	Moderater bis schwerer Schlaganfall
21-42	Schwerer Schlaganfall

Die modifizierte NIHSS ist in der Anwendung und Beurteilung der Symptome der Patienten übersichtlich und, auch für Nicht-Neurologen, einfach anzueignen, so dass er sich im klinischen Alltag bewährt hat (Goldstein and Samsa, 1997). Üblicherweise wird die NIHSS bei Ankunft in der Notaufnahme, bei Entlassung des Patienten und teils auch im Verlauf des Rehabilitationsaufenthaltes erstellt. Eine Übersicht der NIHSS zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5 NIHSS (Goldstein and Samsa, 1997)

Kategorie	Punkte
Ia Vigilanz	0 wach 1 benommen 2 somnolent 3 komatös
Ib Orientierung (Frage nach Monat und Alter)	0 beide Antworten korrekt 1 eine Antwort korrekt 2 keine Antwort korrekt
Ic Befolgen von Aufforderungen (Schließen von Augen und nicht paretischer Hand)	0 beide Aufforderungen richtig befolgt 1 eine Aufforderung richtig befolgt 2 keine Aufforderung richtig befolgt
II Okkulomotorik	0 normal 1 partielle Blickparese 2 komplette Blickparese oder forcierte Blickdeviation
III Gesichtsfeld	0 normal 1 partielle Hemianopsie 2 komplette Hemianopsie 3 bilaterale Hemianopsie

IV Facialisparesie	0 keine 1 geringe Paresie 2 partielle Paresie 3 komplette Paresie (ein- oder beidseits)
V/VI Motorik obere Extremität/ Motorik untere Extremität (seitengetrennter Halteversuch)	0 kein Absinken 1 Absinken im Verlauf 2 Anheben gegen Schwerkraft möglich 3 kein Anheben gegen Schwerkraft möglich 4 keinerlei Bewegung möglich
VII Extremitätenataxie	0 keine 1 eine Extremität 2 beide Extremitäten
VIII Sensibilität	0 normal 1 leichter bis mittelschwerer Sensibilitätsverlust 2 schwerer bis kompletter Sensibilitätsverlust
IX Aphasie	0 keine Aphasie 1 leichte bis mittelschwere Aphasie 2 schwere Aphasie 3 globale Aphasie, stummer Patient
X Dysarthrie	0 keine 1 leichte bis mittelschwere Dysarthrie 2 schwere Dysarthrie
XI Neglect	0 kein 1 leichte halbseitige Wahrnehmungsstörung 2 schwerer Neglect

Ob und wie der Patient im Alltag durch die Folgen eines Schlaganfalls beeinflusst wird klassifizieren sog. Behinderungsskalen. Diese nutzen meist mehrere etablierte Indexe, wie zum Beispiel den Barthel-Index, zur Beurteilung der Aktivitäten des Alltagslebens. Andere messen die allgemeine Unabhängigkeit des Patienten und berücksichtigen somit sowohl die mentale als auch die physische Verfassung des Patienten nach einem Schlaganfall. Hierunter zählt die modifizierte Rankin Skala. Diese teilt in 6 Grade nach Defiziten und Schwere der Behinderung im Alltag ein (van Swieten et al., 1988). Durch die Ermittlung des Grades kann man im Verlauf das Outcome des Patienten quantifizieren. Tabelle 6 zeigt die modifizierte Rankin Skala.

Tabelle 6 Modifizierte Rankin Skala

Grad	Beschreibung
0	Keine Symptome
1	Trotz vorliegender Symptome keinerlei Behinderung, alle täglichen Aufgaben können in üblicher Weise erledigt werden
2	Leichte Behinderung, früher durchgeführte Tätigkeiten können mit Einschränkung erledigt werden, es ist keine Unterstützung nötig
3	Moderate Behinderung, Hilfe wird benötigt, Gehen ohne Unterstützung möglich
4	Mittelschwere Behinderung, Unterstützung beim Gehen sowie bei der Selbstversorgung wird benötigt
5	Schwere Behinderung, bettlägeriger, inkontinenter Patient, ständige Unterstützung notwendig

1.7. Diagnostik

Die Diagnose eines akuten Schlaganfalls wird durch Beurteilung der klinischen Symptome des Patienten sowie Durchführung einer adäquaten Bildgebung gestellt. Auf die Klinik wurde bereits im vorherigen Kapitel 1.6. eingegangen. Mittels cCT oder MRT lassen sich ischämische von hämorrhagischen Schlaganfällen unterscheiden. Häufig wird die Untersuchung durch eine Angiographie oder Perfusionsdarstellung ergänzt, so dass die Lokalisation und Ausdehnung des Infarktes gut beurteilt werden kann (Mair and Wardlaw, 2014). Auch andere Ursachen, wie z.B. Raumforderungen, die neurologische Funktionsausfälle bewirken, können differentialdiagnostisch dargestellt werden.

1.8. Risikoeinschätzung bei VHF

Wie bereits im Kapitel Ätiologie erwähnt, besteht ein hohes Risiko für kardiale Embolien bei Patienten mit Vorhofflimmern (VHF). Etwa 20% der Schlaganfälle werden dadurch verursacht. Die Wahrscheinlichkeit einen Schlaganfall zu erleiden ist bei Patienten mit VHF 5mal größer als bei Patienten mit Sinusrhythmus (Hart et al., 1999). Eine Methode zur Risikoabschätzung eines Schlaganfalls bei Patienten mit Vorhofflimmern ist der sog. CHA2DS2-VASc-Score (Kirchhof et al., 2016). Dieser ist eine klinische Risikoanalyse, wodurch zuverlässig Patienten mit einem hohen Schlaganfallrisiko identifiziert werden können (Lip et al., 2010). Das Schema beinhaltet nach einem Punktesystem folgende Risikofaktoren: Chronische Herzinsuffizienz (1 Punkt), Hypertonie (1 Punkt), Alter ≥ 75 Jahre (2 Punkte), Diabetes mellitus (1 Punkt), Schlaganfall/TIA (2 Punkte), vaskuläre Erkrankung (1 Punkt), Alter 65 bis 74 Jahre (1 Punkt), weibliches Geschlecht (1 Punkt). Tabelle 7 zeigt den CHA2DS2-VASc-Score (Kirchhof et al., 2016).

Tabelle 7 CHA2DS2-VASc-Score (Kirchhof et al., 2016)

Risikofaktor	Punktzahl
Herzinsuffizienz (Congestive heart failure)	1
Hypertonie	1
Alter >75 Jahre	2
Diabetes mellitus	1
Schlaganfall/TIA	2
Gefäßerkrankungen (Vascular disease)	1
Alter 65-75 Jahre	1
Geschlecht weiblich (Sex category)	1

Je höher die Punktzahl, desto höher ist das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden.

Tabelle 8 zeigt das jährliche Risiko nach Höhe der Punktzahl.

Tabelle 8 Schlaganfallrisiko nach Punkten (Camm et al., 2010)

CHA2DS2-VASc-Score	Risiko in %/Jahr
1	1,3
2	2,2
3	3,2
4	4,0
5	6,7
6	9,8

7	9,6
8	6,7
9	15,2

1.9. Prophylaxe

Eine Indikation zur oralen Antikoagulation bei Patienten mit Vorhofflimmern zur Risikoreduktion eines Schlaganfalls besteht bereits ab einer Punktzahl von 1 bei Männern, ab 2 Punkten bei Frauen (Kirchhof et al., 2016). Eine Metaanalyse von Hart et al. zeigte, dass durch Einnahme eines Vitamin K-Antagonisten (VKA) das Schlaganfallrisiko um ca. 62% reduziert wird. Im Vergleich zu ASS beträgt die relative Risikoreduktion 36% (Hart et al., 1999). Bis heute werden häufig VKA, wie Warfarin oder Phenprocoumon, als orale Antikoagulation zur Prophylaxe eines Schlaganfalls verschrieben (Ansell et al., 2004). Mehr und mehr gewinnen jedoch Non Vitamin K antagonist oral anticoagulants (NOACs) an Bedeutung. Darunter zählen Dabigatran, ein direkter Thrombininhibitor, Rivaroxaban und Apixaban, als Faktor Xa-Inhibitoren (Olesen et al., 2015). Mittlerweile werden NOACs gegenüber den VKA bevorzugt (Kirchhof et al., 2016). Eine Vergleichsstudie zeigte, dass diese das Risiko für einen Schlaganfall sowie intrakraniellen Blutungen im Vergleich zur Einnahme von VKA reduzieren (Graham et al., 2015). Auch im alltäglichen Gebrauch zeigen NOACs relevante Vorteile. Eine regelmäßige laborchemische Kontrolle der Antikoagulation ist nicht notwendig. VKA hingegen haben eine wesentlich längere Halbwertszeit (Warfarin 40 Stunden, Phenprocoumon 144 Stunden) im Vergleich zu NOACs, wie Dabigatran (12-17 Stunden), und eine geringere therapeutische Breite, so dass ihre Wirkung regelmäßig mittels Bestimmung der International Normalized Ratio (INR) kontrolliert werden muss (Camm et al., 2010, Ansell et al., 2004, Stangier et al., 2007).

1.10. Therapie

Um eine Therapie bei einem Schlaganfallpatienten beginnen zu können muss zwingend zwischen ischämischer und hämorrhagischer Genese unterschieden werden. Davon abhängig wird so schnell wie möglich die jeweilige Therapie eingeleitet. Ziel bei ischämischen Schlaganfällen ist es den Blutfluss, durch Auflösung oder Entfernung des Thrombus, in den Hirnarterien wiederherzustellen. Der Erfolg lässt sich durch die klinische Beurteilung mittels NIHSS und dem sog. TICI-Score (Thrombolysis in Cerebral Infarction) messen. Der TICI-Score, dargestellt in Tabelle 9, teilt den Erfolg der Reperfusion durch angiographische Messung des Blutflusses nach Intervention in 3 Grade ein. Dabei zeigt Grad 0 weiterhin keine Perfusion des hirnversorgenden Gefäßes, Grad 3 eine vollständig wiederhergestellte Perfusion (Noser et al., 2005).

Tabelle 9 Thrombolysis in Cerebral Infarction (TICI) (Noser et al., 2005)

Grad	Beschreibung
0	Keine Perfusion hinter der Okklusion, kein Fluss messbar
1	Penetration, aber ohne Perfusion: Kontrastmittel (KM) kann passieren, hinter der Okklusion jedoch minimale Füllung des Gefäßes
2a	Partielle Perfusion mit unvollständiger Füllung <50%
2b	Unvollständige Perfusion des Versorgungsgebietes von 50-99%
2c	Fast komplette Perfusion ohne sichtbaren Thrombus, lediglich das KM flutet sich verspätet an
3	Vollständige Perfusion

1.11. Lyse

Ischämische Schlaganfälle werden klassischerweise mit rekombinanten gewebspezifischen Plasminogenaktivatoren (rt-PA) behandelt (1995). Dabei handelt es sich um eine Reproduktion des physiologischen Enzyms t-PA, der die Fibrinolyse aktiviert und die Hämostase durch Umwandlung von Plasminogen in Plasmin hemmt (van Zonneveld et al., 1986). Je schneller die Lysetherapie eingeleitet wird, desto effektiver ist sie. Klinische Studien von Hacke et al. zeigten, dass die Zeitspanne, bei der Schlaganfallpatienten mit ischämischer Genese signifikant von der Lyse profitieren, 4,5 Stunden beträgt. Hier verbesserte sich das klinische Outcome von 45,2% bei Placebogabe auf 52,4% bei Lysetherapie. Allerdings stieg damit auch die Rate an symptomatischen intrakraniellen Hämorrhagien von 17,6% auf 27% an (Hacke et al., 2008, Hacke et al., 2004). Komplikationen wie diese müssen zwingend bei einer systemischen Lysetherapie berücksichtigt werden. Des Weiteren wird zwischen einer systemischen intravenösen Thrombolyse (IVT) und einer intraarteriellen lokalen Thrombolyse (IAT) unterschieden. Letztere wird kathetergestützt im okkludierten Gefäß durchgeführt ohne den Thrombus selbst mechanisch zu manipulieren. Patienten, die eine Kontraindikation zur systemischen Lysetherapie aufweisen, können somit von einer lokalen Lysetherapie profitieren (Furlan et al., 1999). Kontraindikationen und Ausschlusskriterien nach NINDS (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke) zeigt Tabelle 10 (1995). Diese wurden 2007 ergänzt durch INR >1,7, CT-graphisch multilobulärer Infarkt (>1/3 der zerebralen Hemisphäre) sowie dem Verständnis des Patienten oder seiner Familie der potentiellen Risiken der Therapie (Adams et al., 2007).

Tabelle 10 Ausschlusskriterien einer Lysetherapie mit rt-PA nach NINDS

	Ausschlusskriterien
anamnestisch	<p>Schlaganfall oder schwere Kopfverletzung in den letzten 3 Monaten</p> <p>Größere Operationen in den letzten 2 Wochen Intrakranielle Hämorrhagie in der Vergangenheit</p> <p>Blutungen des GIT oder Urogenitaltrakts in den letzten 3 Wochen</p> <p>Z.n. arterieller Punktion einer nicht komprimierbaren Arterie in den letzten 7 Tagen</p>
klinisch	<p>V.a. Subarachnoidalblutung</p> <p>Epileptischer Anfall bei Symptombeginn</p> <p>Heparinisierung in letzten 48h mit PTT-Erhöhung</p>
laborchemisch	<p>Prothrombinzeit > 15s</p> <p>Thrombozyten < 100 000/ml</p> <p>Glukosespiegel < 40mg/dl oder > 400mg/dl</p>

Diese und andere Faktoren limitieren somit die Therapie der Schlaganfallpatienten. Zudem zeigte sich, dass Infarkte mit proximalen Verschlüssen der großen Arterien durch IVT Therapie nicht zur Rekanalisation führen (Yoon et al., 2010). Vor allem Verschlüsse der ICA und der MCA von über 8mm Thrombuslänge werden nicht von einer systemischen Lysetherapie erfasst. Bei Entlassung betrug der mRS bei diesen Patienten 5 im Vergleich zu einem mRS von 2 bei Patienten mit Thromben unter 8mm Länge (Riedel et al., 2011).

1.12. Intervention

Es entwickelten sich kombinierte Therapien mittels IAT und „Aggressive Mechanical Clot Disruption“ (AMCD), die bei frustraner IVT eine erfolgreiche Rekanalisation mit niedriger symptomatischer Blutungsrate sowie verbessertem klinischem Outcome erreichten (Higashida et al., 2003). AMCD ist hierbei definiert als mindestens einer der folgenden Interventionen: Thrombenerweichung/-fraktionierung durch Mikrokatheter, Perkutane Angioplastie (PTA), Stenting oder Schlingenanwendung. Die Therapie mittels AMCD nach IVT weist eine hohe sofortige Rekanalisationsrate von 38% der Patienten auf und gleichzeitig vergleichbar niedrige intrakranielle Blutungsraten zu IAT (Noser et al., 2005). Positiv wirken sich ein niedriger NIHSS, eine gute Kollateralisierung und eine erfolgreiche endovaskuläre Rekanalisierung auf das Outcome des Patienten aus. Eine Rekanalisierungsrate über 75% konnte bei einer kombinierten Therapie mit endovaskulären Techniken erreicht werden (Brekenfeld et al., 2005). Zunehmend haben sich in den letzten Jahren mechanische Verfahren entwickelt, die den Thrombus als Ganzen entfernen, die sog. Thrombektomien mittels Stent-Retriever. Kommt es zu einem proximalen thromboembolischen Verschluss beispielsweise der MCA, so wird hierbei ein Stent-Retriever mit Hilfe eines intraarteriellen Mikrokatheters neben dem Thrombus positioniert. Bei der Entfernung des Mikrokatheters wird der Stent rausgeschoben, so dass er innerhalb des Thrombus expandiert und sich in kurzer Zeit verhakt. Durch Rückzug in einen größeren Katheter wird der Thrombus dann im Ganzen entfernt (Fiehler and Gerloff, 2015). Abbildung 2 zeigt den Mechanismus eines Stent-Retrievers.

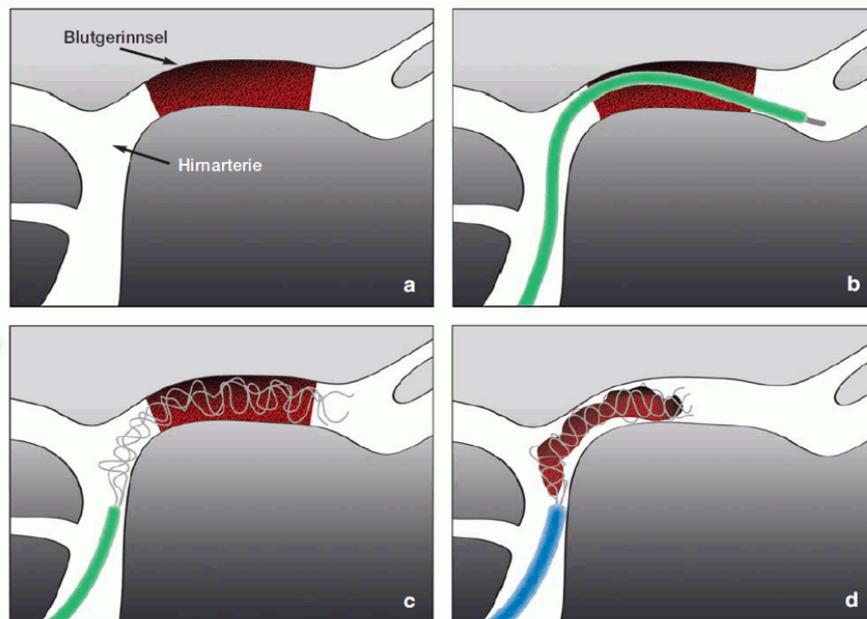


Abbildung 2 Mechanismus eines Stent-Retrievers (Fiehler and Gerloff, 2015)

Teilweise konnten Rekanalisierungsraten von über 90% (TICI >2a) erzielt werden (Jansen et al., 2013). Fünf große randomisierte Studien (MR CLEAN, ESCAPE, REVASCAT, SWIFT PRIME und EXTEND IA) wurden 2016 in Metaanalysen ausgewertet, die einen signifikanten Vorteil für Schlaganfallpatienten, mit Infarkten des vorderen proximalen Stromgebietes, nach endovaskulärer Thrombektomie in Kombination mit der IVT zeigten. Die Number needed to treat (NNT) lag hier bei 2,5-2,6 für eine Verbesserung des mRS um einen Grad nach 90 Tagen (Campbell et al., 2016, Goyal et al., 2016b). Die SWIFT PRIME-Studie zeigte beispielsweise, dass der Einsatz von Stent Retrievern bei einer Rekanalisation innerhalb von 150 Minuten ab Symptombeginn zu einer 91% Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Unabhängigkeit (definiert als mRS 0-2) des Patienten führt. Eine weitere Stunde, die benötigt wird zur Rekanalisation, senkt die Wahrscheinlichkeit um 10%. Jede folgende Stunde um weitere 20%. Hierbei wurde das Outcome der Patienten nach

Therapie mit IVT alleine oder in Kombination mit einem Solitaire Device verglichen (Goyal et al., 2016a). Weniger als 40% der Patienten erreichten einen mRS von 0-2 bei einer alleinigen intravenösen rtPA-Therapie. Dies zeigt die Überlegenheit des kombinierten Verfahrens. Zudem weist es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der 90-Tage Mortalität und der symptomatischen intrakraniellen Blutungen im Vergleich zur alleinigen IVT auf (Jovin et al., 2015, Saver et al., 2015). Die in dieser Arbeit aufgearbeiteten Thromben wurden alle mit einem Stent Retriever geborgen.

1.13. Histologie

Durch die Etablierung der mechanischen Rekanalisierung durch Stent Retriever wurden ganze menschliche Thromben der histologischen Auswertung zugänglich. Die Differenzierung der verschiedenen Ätiologien ist hier ausschlaggebend für die Prävention rezidivierender Schlaganfälle. Histopathologische Standardfärbungen, wie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und spezifische immunhistochemische Färbungen (IHC) geben weitere Informationen über die Pathologie der Infarkte (Sporns et al., 2017).

1.14. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zu den routinemäßig durchgeführten Standardfärbungen gehört die HE-Färbung. Diese färbt das unterschiedliche Gewebe nach ihren Eigenschaften an. Saure Stoffe, wie DNA und RNA, sind basophil und zeigen sich daher durch das Hämatoxylin blau verfärbt. Basische Anteile, wie Erythrozyten sind azidophil, durch das Eosin also tiefrot.

1.15. Immunhistochemische Färbung

Die in dieser Arbeit verwendeten IHC wurden in einer zuvor durchgeführten Arbeit etabliert (Mehr, 2019). Es handelt sich dabei um CD45 (Cluster of Differentiation 45), ein Antikörper (AK) gegen Leukozyten, und die NE-Färbung, welche neutrophile Granulozyten nachweist. Die IHC weisen durch AK zielgerichtet spezifische Substanzen, wie z.B. Proteine, nach. Man unterscheidet zwischen direkter und indirekter IHC. Bereits 1941 veröffentlichte Coons et al. eine Arbeit, die die immunfluoreszierende Technik nutzte, um zelluläre Antigene (AG) in Gewebe nachzuweisen. Seither bildet die IHC eine Verbindung zwischen Immunologie, Histologie und Chemie zur Darstellung von AG durch Bindung an spezifische AK. Dieser AG-AK-Komplex wird durch farbige histochemische Reaktionen mit Hilfe eines Lichtmikroskops oder durch fluoreszierende Farben mittels ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Das, in der IHC, am häufigsten genutzte Immunglobulin ist das IgG. Es besteht aus zwei identischen Leichtketten und zwei identischen schweren Ketten. Das IgG ist Y-förmig. Die beiden variablen AG-bindenden Arme bilden den Fab-Teil, der Schwanz den konstanten AK-bindenden Fc-Teil (Ramos-Vara, 2005). Die Struktur eines IgGs zeigt Abbildung 3.

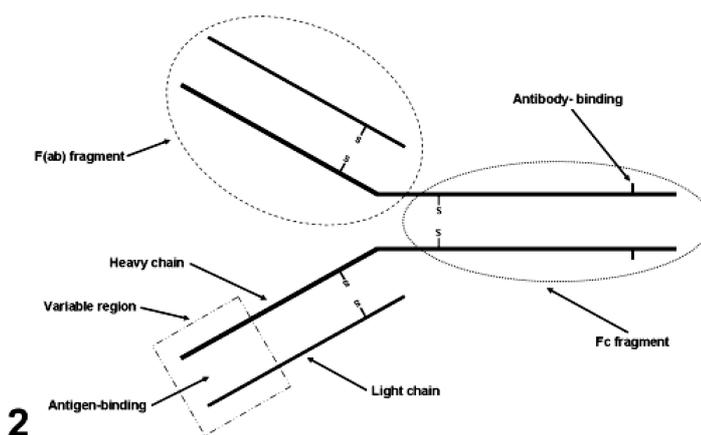


Abbildung 3 Struktur eines IgGs (Ramos-Vara, 2005)

AK, die für die IHC verwendet werden, sind entweder monoklonal oder polyklonal hergestellt. Sie werden aus Tieren gewonnen, die zuvor mit einem spezifischen AG beimpft worden sind. Polyklonale AK besitzen eine höhere Affinität und größere Reaktivität, jedoch geringere Spezifität AG zu binden. Dies kann zum Nachweis von verschiedenen Epitopen eines Proteins führen. Einerseits vorteilhaft, da man so eine breitere Anfärbung von AG-Variationen erreicht. Andererseits kann es zu einer falsch positiven Auswertung kommen (Mighell et al., 1998). Monoklonale AK sind hingegen spezifischer, färben von daher genauer und zielgerichteter das gesuchte AG an (Hayat, 2002). Dabei ist die Spezifität abhängig von der Qualität und dem Titer des AKs, je nachdem, wie das Tier beimpft worden ist (Nelson et al., 2000).

Zur Fixierung und Aufarbeitung der Thromben wurden diese in Formalin eingelegt. Dies sorgte für die sog. Maskierung der AG, d.h. Konservierung und Quervernetzung von Proteinen zur Stabilisierung der Epitope. Zur weiteren immunhistochemischen Färbung musste es also zunächst zu einer Lösung der Querverbindungen, der Antigendemaskierung, kommen. Diese wird durch verschiedene Verfahren initiiert. Mittels Heißdampf beispielsweise oder durch die Anwendung von Enzymen werden die Epitope demaskiert (Shi et al., 1991, Werner et al., 1996, Takamiya et al., 1978). Um falsch positive Ergebnisse durch unspezifische Bindungen von Gewebe oder ungezielten Epitopen zu verhindern, muss man diese, vor der eigentlichen IHC, blockieren. Die Verwendung von polyklonalen AK, die zahlreiche Moleküle binden, kann ansonsten die Ergebnisse immunhistochemischer Färbungen stark beeinflussen. Auch die unterschiedliche Gewebefixierung zur Stabilisierung von Epitopen und damit auch Veränderung der Epitope selbst, führen zu einer hohen Hintergrundfärbung und kann die Auswertung verfälschen. Zu den blockierenden Strukturen gehören beispielsweise die endogene Peroxidase, das endogene Biotin oder unspezifische Immunglobuline, die an den SekundärAK binden (Fritschy, 2008, Horling et al., 2012).

Man unterscheidet die direkte von der indirekten Immunhistochemie. Die direkte ist dabei die einfachste Methode, die mit nur einem Schritt unter Verwendung eines PrimärAKs das gesuchte AG sichtbar macht. Diese AK sind bereits markiert mit beispielsweise Fluorchrom, Enzymen, kolloidalem Gold oder Biotin (Polak and Van Noorden, 2003).

Die direkte Methode ist simpel und schnell, jedoch fehlt es ihr an Sensitivität. Die indirekte Methode hingegen ist aufwendiger, zeigt aber ein stärkeres Signal durch eine intensivere Reaktion. Hierbei bindet der nicht-markierte PrimärAK mit seinem Fab-Teil das AG und der Fc-Teil zwei markierte Sekundär-AK, so dass sich durch die Verdopplung des Chromogens bereits ein verstärktes Signal zeigt. Abbildung 3 zeigt eine Vereinfachung der direkten und indirekten Methode.

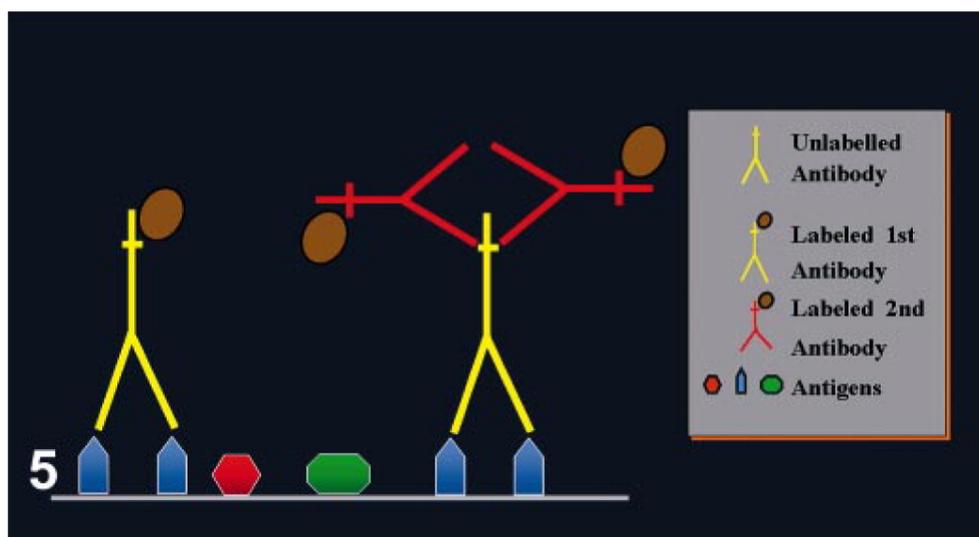


Abbildung 4 Direkte und indirekte IHC (Ramos-Vara, 2005)

Eine gängige indirekte IHC, die auch im Rahmen dieser Arbeit, verwendet worden ist, ist die Avidin-Biotin-Complex Methode (ABC). Dabei wird die hohe Affinität vom Glykoprotein Avidin zum Vitamin Biotin genutzt, die einmal gebunden, kaum mehr gelöst werden kann (Wilchek and Bayer, 1984). Sowohl ein Enzym, z.B. Peroxidase, als auch ein SekundärAK, der an den PrimärAK gekoppelt ist, werden mit Biotin markiert. Diese beiden Komponenten binden dann irreversibel das Avidin. So entsteht durch Bindung der biotinylierten Peroxidase an Avidin und des biotinylierten SekundärAKs an Avidin der sog. Avidin-Biotin-Komplex (Bratthauer, 2010). Die Verstärkung des Effekts und somit der Sichtbarkeit basiert auf vier aktiven Bindungsstellen von Avidin für Biotin, so dass die Komplexe dadurch vervielfacht werden (Guesdon et al., 1979). Abbildung 4 zeigt schematisch die ABC Methode.

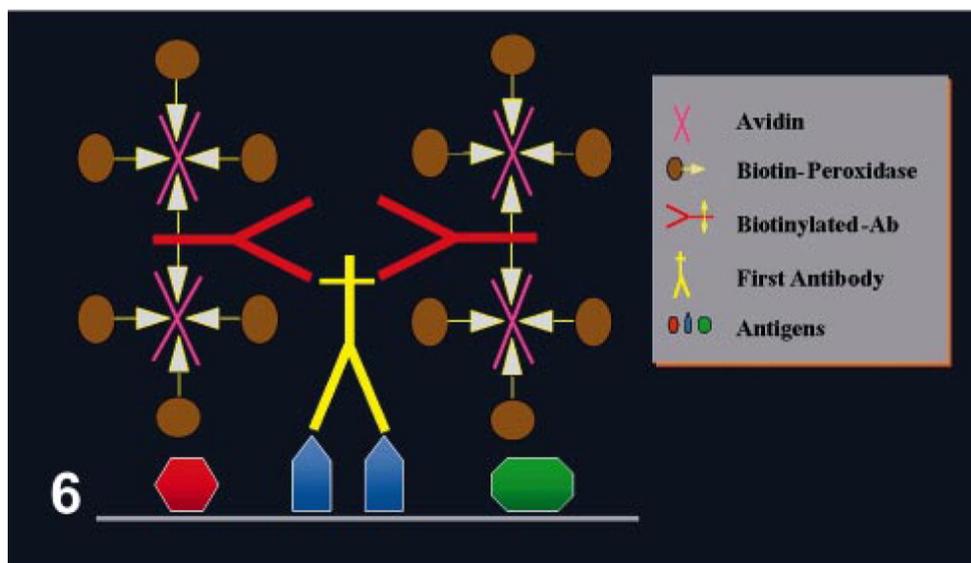


Abbildung 5 Avidin-Biotin-Complex Methode (ABC) (Ramos-Vara, 2005)

2. Fragestellung

Die histologische Aufarbeitung und Charakterisierung der Zusammensetzung von Thromben im ischämischen Schlaganfall soll in dieser Arbeit, mittels Hämatoxylin-Eosin- und weiterführenden immunhistochemischen Färbungen, die Zuordnung der Ätiologie des Infarkts ermöglichen.

Ziel war es, insbesondere die Ätiologie der kryptogenen Thromben, mittels der Verteilung der histologischen Komponenten zu ermitteln.

3. Material und Methode

3.1. Patientenkollektiv

Zwischen Oktober 2010 und September 2012 wurden 145 Thromben von Patienten mit akuten Schlaganfällen in der Abteilung für Neuroradiologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München notfallmäßig mit einer endovaskulären mechanischen Rekanalisation gewonnen. Die Thromben wurden, nach Bergung und Sicherung, aufgearbeitet, gefärbt und histologisch untersucht. Von diesen wurden für die weitere Auswertung 137 qualitativ geeignete Thromben verwendet (inklusive die Thromben der Patienten (n=34) der ersten Publikation der Arbeitsgruppe um Boeckh-Behrens/Poppert (Boeckh-Behrens et al., 2016b)).

Die Genehmigung der Studie durch die unabhängige Ethikkommission lag vor.

Diese Arbeit wurde im Juli 2016 unter dem Titel „*Thrombus Histology Suggests Cardioembolic Cause in Cryptogenic Stroke*“ im Stroke AHA-Journal publiziert.

3.2. Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte durch die Neuroradiologie mittels Thrombektomie. Auf die Methodik wurde bereits in Kapitel 1.10.2 in der Einleitung eingegangen. Nach notfallmäßiger Thrombektomie zur mechanischen Rekanalisierung wurden wir zeitnah zur weiteren Verarbeitung der Thromben benachrichtigt.

3.3. Aufbereitung der Thromben

Die Thromben wurden nach Bergung in einer Formaldehydlösung (3,5%-3,7%, Fischar) fixiert. Nach 24h-48h kamen sie in eine 70%-Ethanol-Lösung. Dem Gewebe wurde zur weiteren Verarbeitung mit einer aufsteigenden Xylol-Alkoholreihe das Wasser entzogen, um es anschließend in Paraffin zu betten. Die Einbettungsarbeiten führte das Institut für Pathologie des Klinikums rechts der Isar mithilfe des Shandon

Excelsior ES (Thermo Scientific) sowie des Tissue Block System TBS 88 (Medite) durch. Mit einem manuellen Rotationsmikrotom (HM 335 E, Microm) wurden von den Paraffinblöcken jeweils zwölf 2µm dünne Präparate geschnitten. Zur Aushärtung der Paraffinblöcke wurden diese zuvor auf einer Kühlplatte (COP30, Medite) bei -15°C gekühlt. Die geschnittenen Präparate entfalteteten sich dann in einem 39°C warmen Wasserbad (TFB35, Medite), so dass sie auf gläserne Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Scientific) überführt werden konnten. Die Präparate wurden anschließend über Nacht zur Fixierung in einem Wärmeschrank (Modell 400, Memmert) bei 50°C getrocknet.

3.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung wurde routinemäßig im Institut für Pathologie durch technische Assistenten vollautomatisiert durchgeführt (TST44, Medite). Zur Entfernung des Paraffins wird zunächst eine absteigende Xylol-Alkoholreihe durchlaufen. Die beiden hydrophilen Farbstoffe werden auf die Präparate gegeben und abschließend die Xylol-Alkoholreihe wieder rückwärts durchlaufen. Zuletzt werden die Präparate mit einem Eindeckmedium fixiert und eingedeckt (Promounter RCM 2000, Medite).

3.5. Immunhistochemie

3.5.1. Antikörper

Zur weiteren Unterscheidung der Zellzusammensetzung in den Thromben wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Wir führten Färbungen gegen CD45 und gegen die Neutrophile Elastase durch. In einer zuvor durchgeführten Arbeit von Michael Mehr, in der gleichen Arbeitsgruppe unter der Leitung von Professor Poppert, wurden folgende Färbungen bereits etabliert. Details der verwendeten Antikörper zeigt Tabelle 11.

Tabelle 11 Details der verwendeten Antikörper

Antikörper	CD45	Neutrophilen Elastase
Hergestellt in	Kaninchen	Maus
Spezifität	anti-human	anti-human
Klonalität	Polyklonal IgG	Monoklonal IgG 1, kappa, Klon NP57
Reaktion mit	Leukozyten	Neutrophilen Granulozyten, Monozyten
Verdünnung	1:200	1:200
Antigendemaskierung	Hitze	nicht notwendig
Hersteller	ab Serotec (Kidlington, GB)	Dako (Glostrup, Dänemark)

3.5.2. Färbeprotokoll

Es folgen die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Färbungen.

3.5.2.1. Alkoholreihe

Zum Entparaffinieren musste, wie bei der HE-Färbung, eine absteigende Xylol-Alkoholreihe durchlaufen werden. Nach 100% Xylol (Merck), folgte eine Mischung aus 50% Xylol und Ethanol (Merck), anschließend 100%, 96%, 70% und 50% Ethanol, das jeweils mit Wasser verdünnt wurde. Die Objektträger verblieben 10 Minuten in der Xylol-Küvette, in den anderen Lösungen jeweils 5 Minuten. Hiernach wurden diese in einer Küvette mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Dulbecco's PBS 1x, PAA) gewaschen.

Zwischen den einzelnen Schritten der immunhistochemischen Färbung wurden die Objektträger mit dieser Lösung jeweils 5 Minuten gewaschen, die färberlevanten Chemikalien mit PBS verdünnt.

3.5.2.2. Antigendemaskierung

Die Antigendemaskierung bei der CD45-Färbung erfolgte mittels Heißdampf. In einem Heißdampfgerät (DG 2423, Severin) wurden die Objektträger in einer Citratpuffer gefüllten Küvette über 20 Minuten erhitzt. Die Querverbindungen der Proteine, die zuvor zur Stabilisierung der Epitope mittels Formalinfixierung hergestellt wurden, wurden so wieder gelöst, so dass diese nun zur AK-Bindung freilagen. Zur Anfärbung der Neutrophilen Elastase wurde keine Antigendemaskierung benötigt.

Alle Schritte, bis auf die Demaskierung mittels Heißdampf, wurden in Glasküvetten durchgeführt. Aufgrund der hohen Temperatur verwendeten wir hier eine Plastikkuvette. Die Präparate wurden mit einem hydrophoben Stift (MiniPap Pen, Invitrogen) umrandet, um nur mit wenigen Tropfen das Gewebe komplett benetzen zu können.

3.5.2.3. Blockierungsschritte

Um die Hintergrundfärbung zu reduzieren führten wir Blockierungsschritte durch, die unspezifische Proteine und Enzyme im Gewebe bindeten. Das Blocken der endogenen Peroxidase geschah durch Auftragen einer 0,1%-Wasserstoffperoxid-Lösung (Merck) für 10 Minuten. Das Blockieren des endogenen Biotins durch Auftragen einer Avidinlösung (Vector) für 15 Minuten. Es folgte zur Neutralisierung der restlichen Avidinbindungsstellen eine Biotinlösung (Vector) für weitere 15 Minuten. Zuletzt wurde der Normalserumblock durchgeführt. Für die CD45-Färbung verwendeten wir Pferde-, für die NE-Färbung Ziegen Serum. Eine Verdünnung von 1:10 verblieb 30 Minuten auf dem Gewebe. Nach jedem Blockierungsschritt erfolgte 2x Waschen mit PBS für je 5 Minuten.

3.5.2.4. Applikation der Antikörper und ABC-Reaktion

Es folgte der spezifische Teil der Färbungen durch Applikation der Primärantikörper. Für die CD45-Färbung verwendeten wir polyklonale Kaninchen Antikörper (ab Serotec), für die NE-Färbung monoklonale Maus Antikörper (Dako). Mit einer Verdünnung von 1:200 wurden die Primärantikörper in einer Mischung aus PBS und Tween 20 (Sigma) verdünnt und aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht folgte die Applikation der biotinylierten Sekundärantikörper. Anti-Kaninchen-AK (Vector) für die CD45-Färbung bzw. Anti-Maus-AK (Vector) für die NE-Färbung wurden mit einer 1:200 Verdünnung für 2 Stunden aufgetragen. Zur zusätzlichen Verstärkung des Signals wurde Avidin und Biotin mit PBST verdünnt, 15 Minuten präinkubiert und dann für 45 Minuten auf den Objektträger gegeben. Die beiden Antikörper erwirkten so eine Signalamplifikation, d.h. eine Verstärkung des Signals mittels Avidin-Biotin-Complex-Reaktion.

3.5.2.5. Färbung und Gegenfärbung

Wir kombinierten den Avidin-Biotin-Complex mit einem Farbstoff. Die Farbentwicklung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Dako) zeigte eine irreversible braune Farbreaktion durch die Oxidation der Peroxidasen am Antigen. Hierzu wurden die Präparate tropfenweise unter mikroskopischer Kontrolle bedeckt. Sobald die Färbereaktion ausreichend war, wurde sie durch Leitungswasser unterbrochen. Anschließend wurden die Präparate für 1 Minute mit Hämatoxylin (Invitrogen, Carlsbad) gegengefärbt, um bis jetzt nicht angefärbte Strukturen darzustellen und somit besser differenzieren zu können.

3.5.2.6. Alkoholreihe und Eindeckelung

Der Wasserentzug erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die gefärbten Präparate wurden hiernach durch ein hydrophobes Medium haltbar gemacht. Mittels Deckgläschen wurde das Präparat luftblasenfrei versiegelt.

3.6. Auswertung

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte auf 2 verschiedene Art und Weisen. Die immunhistochemischen Färbungen konnten mittels mikroskopischer Zählung der Leukozyten bzw. der neutrophilen Granulozyten manuell ausgewertet werden. Die HE-Färbungen jedoch mussten digital ausgewertet werden, da es um den prozentualen Anteil der gefärbten Fläche ging. Diese Auswertung wurde, in Zusammenarbeit mit Dr. Boeckh-Behrens, in der bereits zuvor erwähnten Arbeit von Michael Mehr entwickelt und etabliert.

Da die CD45- und die NE-Färbung zellgebunden sind, somit die Leukozyten bzw. neutrophilen Granulozyten darstellen, zählten wir diese klassischerweise manuell unter dem Mikroskop aus. Für alle Präparate verwendeten wir ein 40-fach vergrößerndes Objektiv und ein 10-fach vergrößerndes Okular, d.h. eine 400-fache Vergrößerung. Da nicht alle Zellen homogen in einem Thrombus verteilt waren, verschafften wir uns zunächst eine Übersicht des Präparats. Wir wählten jeweils 5 repräsentative Gesichtsfelder aus. Diese wurden eingestellt, ausgezählt und zuletzt daraus ein Mittelwert bestimmt.

Um die HE-Färbungen auszuwerten, wurden alle Präparate eingescannt und digitalisiert. Die quantitative Analyse der Komponenten eines Thrombus wurde durch halbautomatische farbbasierte Segmentierung mittels Photoshop CS4 (Adobe) durchgeführt. Abbildung 6 zeigt den Schnitt eines Thrombus mit HE-Färbung.

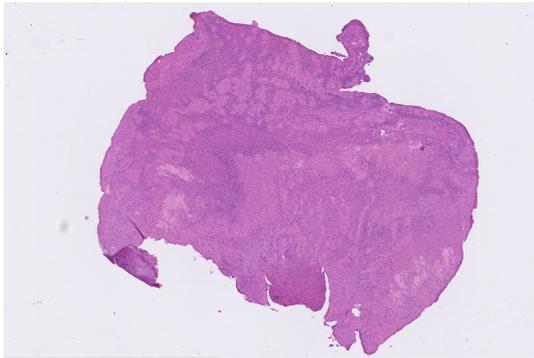


Abbildung 6 Thrombus mit HE-Färbung

Durch Farbsegmentation und Grauwertbestimmung mithilfe von Photoshop CS4 (Adobe) konnte letztendlich der jeweilige Flächenanteil des Thrombus berechnet werden. Für alle Präparate wurde das gleiche Schema der Grauwertanalyse zur Auswertung angewendet. Es folgten zahlreiche Markierungen und Befehle, die anhand der folgenden Bilder exemplarisch dargestellt sind. Zunächst wurden die Farben definiert. Die Funktion „Farbbereich“ definierte hier die Erythrozyten rot, das Fibrin und die Thrombozyten rosa, die Zellkerne blau. Nach Auswahl der Farbbereiche wurde ein jeweiliger Bereich in eine neue Ebene kopiert und anschließend durch „Farbe ersetzen“ auf weiß gesetzt. Es entstand eine Ebene mit ausschließlich weißen Pixeln. Äquivalent dazu führten wir die gleichen Schritte mit schwarz durch. Es entstand eine neue Ebene mit ausschließlich schwarzen Pixeln. Legte man nun die weiße Ebene auf die schwarze so zeigte die Funktion „Histogramm“ einen Grauwert an, entsprechend dem Verhältnis weißer zu schwarzer Fläche. Dieser lag zwischen 0 für schwarz und 255 für weiß. Dieser Grauwert entsprach also prozentual dem Flächenanteil der jeweiligen Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche.

Das gleiche Prinzip wendeten wir zur Bestimmung der Fläche des gesamten Thrombus auf dem Präparat im Verhältnis zum Gesamtbild an. Somit entsprach der am Ende entstehende Graubereich der prozentualen Größe des Thrombus im Gesamtbild. Alle Bilddateien wurden mit 5-facher Objektivvergrößerung

aufgenommen. 1mm in der Horizontalen oder Vertikalen entsprach der Länge von 550 Pixeln und 1qmm der Fläche von 302 500 Pixeln (= 550 x 550 Pixeln).

Abbildung 7 zeigt die verschiedenen Farbbereiche, hier mit einem Beispiel der Segmentierung der blauen bzw. rosanen Pixel durch Gleichsetzen mit weiß, und die dazugehörigen Grauwertbestimmungen durch Segmentierung über die schwarze Ebene.

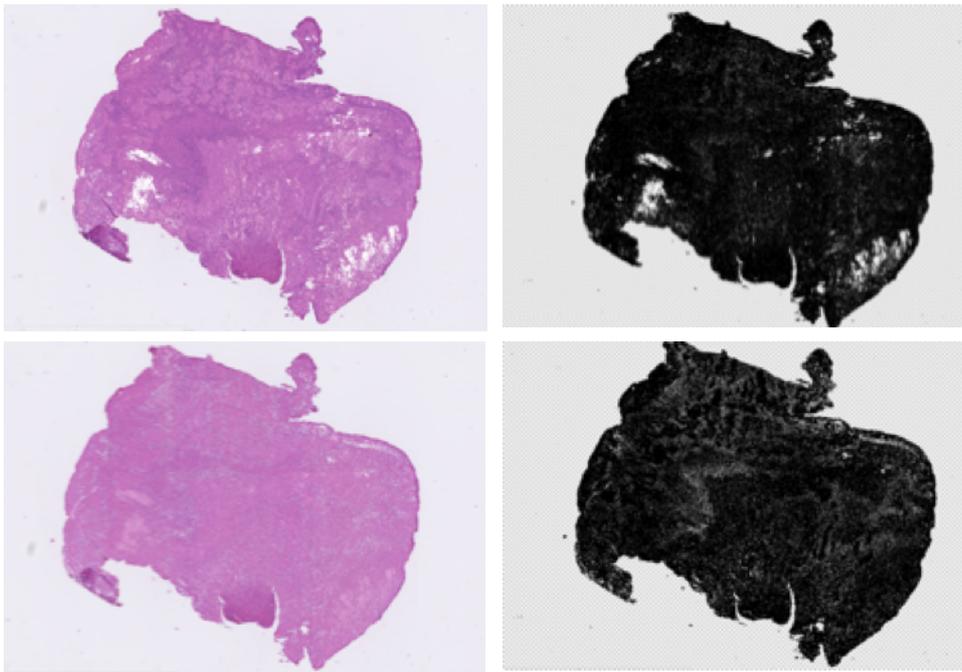


Abbildung 7 Beispiel Farbsegmentierung und Grauwertbestimmung

Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 8 einen direkten Vergleich eines HE-gefärbten Thrombus mit verschiedenen Segmentierungen mittels Photoshop CS4 (Adobe).

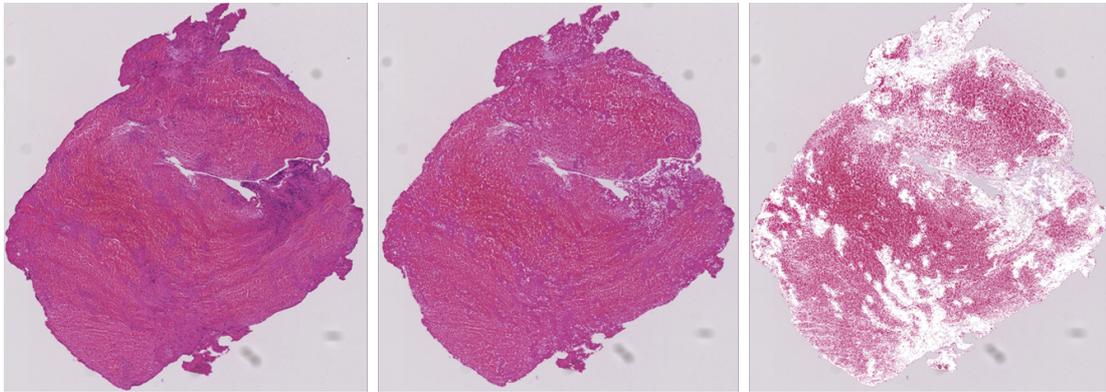


Abbildung 8 direkter Vergleich der Segmentierung mit Photoshop CS4 (Adobe)

3.7. Klinische Daten

In Zusammenarbeit der Klinik und Poliklinik für Neurologie und der Abteilung für Neuroradiologie des Instituts für Radiologie wurden die klinischen Daten erhoben.

Die Ursache eines Schlaganfalls wurde, basierend auf den TOAST Klassifikationen, festgelegt durch alle verfügbaren diagnostischen und klinischen Informationen für jeden Patienten, inklusive CT, CT Angiographie und MRT, trans- und extrakranielle Duplexsonographie, LZ-EKG und transthorakale oder transösophageale Echokardiographie. Alle TOAST Zuordnungen wurden zusätzlich durch Professor Poppert verifiziert.

Zudem wurden interventionelle und klinische Variablen erhoben, die potenziellen Zusammenhang mit der Ätiologie des Schlaganfalls haben könnten. Hierunter zählen die Zeit bis zur Reperfusion (Zeit von Symptombeginn bis zur Rekanalisation), Rekanalisierungszeit (Zeit von erster bis zur finalen Angiographie), Anzahl der

Thrombektomieversuche, NIHSS vor Intervention und bei Entlassung, und mRS innerhalb von 90 Tagen. NIHSS wurden hierbei vom jeweiligen verantwortlichen Neurologen, der mRS auch durch Telefoninterviews oder durch Aufarbeitung der Arztbriefe der Rehakliniken, bewertet.

Neuroradiologische Daten wurden durch Dr. Boeckh-Behrens zur Verfügung gestellt und validiert.

3.8. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm SPSS Statistics 23.0, IBM (SPSS Inc, IBM, Ehningen, Deutschland) und R (<http://www.r-project.org>).

Innerhalb der Gruppen wurden Unterschiede, vor allem der verschiedenen TOAST Gruppen, durch den nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test dargestellt. Boxplot Grafiken wurden zur Darstellung der Gruppenunterschiede verwendet. Alle statistischen Analysen wurden durch einen erfahrenen Statistiker (F. Scheipl, PhD, Institut für Statistik der Ludwig-Maximilian-Universität München, Deutschland) geprüft (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

3.9. Liste der verwendeten Geräte, Materialien, Software, Chemikalien

Tabelle 12 Geräte

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

Tabelle 13 Materialien

Material	Name (Artikelnummer), Hersteller
pH-Indikatorstreifen	Dosatest (35309.606), VWR BDH Prolab (Radnor, Pennsylvania, USA)
Microtom-Messer	Feather Microtome Blade S35 (207500000), pfm medical (Köln, D)
Deckgläser	Menzel-Gläser, Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Hydrophober Stift	Mini Pap Pen (00-8877), Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Objektträger	Superfrost Plus (J1800AMNZ), Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Tabelle 14 Software

	Name, Hersteller
Bildbearbeitung	NDP View 1.2.25, Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan)
Bildbearbeitung	Photoshop CS4, Adobe (San Jose, Kalifornien, USA)
Statistik	SPSS Statistics 23.0, IBM (SPSS Inc, IBM, Ehningen, Deutschland)

Tabelle 15 Chemikalien

Chemikalie	Name (Artikelnummer), Hersteller
Sekundärantikörper	Anti-Mouse IgG biotinyliert (BA-2000), Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)
Sekundärantikörper	Anti-Rabbit IgG biotinyliert (BA-1000), Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)
Blocking-Kit	Avidin / Biotin Blocking-Kit (SP-2001), Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)
Puffer	Dulbecco's PBS 1x (H15-002), PAA (Pasching, Österreich)
Ethanol	Ethanol (108543), Merck (Darmstadt, D)
Fixierungsmittel	Formaldehyd-Lösung 3,5%-3,7% (27244), Fischar (Saarbrücken, D)
Farbstoff	Hematoxylin Ready to use (008011), Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)

Farbstoff	Liquid DAB+ Chromogen (K3468), Dako (Glostrup, Dänemark)
Primärantikörper	Monoclonal Mouse Anti-Human Neutrophil Elastase, Clone NP57 (M0752), Dako (Glostrup, Dänemark)
Normalserum	Normal Goat Serum (S-1000), Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)
Normalserum	Normal Horse Serum (S-2000), Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)
Primärantikörper	Polyclonal Rabbit Anti-Human CD45 (AHP1726), abD Serotec (Kidlington, Großbritannien)
Mounting Medium	Roti-Histokitt (6638.2), Carl Roth (Karlsruhe, D)
Salzsäure	Salzsäure (109058), Merck (Darmstadt, D)
Trisodium Citrat	Trisodium Citrat (S1804), Sigma (St. Louis, Missouri, USA)
Detergenz	Tween 20 (P9416), Sigma (St. Louis, Missouri, USA)
ABC-Kit	Vectastain ABC-Kit Elite (PK-6100), Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)
Wasserstoffperoxid	Wasserstoffperoxid 30% (107209), Merck (Darmstadt, D)
Xylol	Xylol (108684) Merck (Darmstadt, D)

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv

145 Thromben wurden insgesamt geborgen, davon 137 qualitativ geeignete histologisch weiterverarbeitet und untersucht. Die klinischen Daten der 137 Patienten sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Das Verhältnis von Männern zu Frauen war nahezu gleich (49 zu 51%). Das mediane Alter lag bei 73 Jahren (18-92 Jahre). Als vaskuläre Risikofaktoren wurden arterielle Hypertonie, KHK, VHF, Diabetes mellitus und die Raucheranamnese erfasst. 68% der Patienten hatte eine arterielle Hypertonie (90/133), fast die Hälfte der Patienten Vorhofflimmern (63/134).

4.2. Ätiologie

Hinsichtlich der Ätiologie der Schlaganfälle waren fast die Hälfte (49,3%, 67/136) kardioembolischer Genese, TOAST 2. Als arterioembolische Schlaganfälle, TOAST 1, wurden 16,2% (22/136) klassifiziert.

Von 11 TOAST 4 (andere Ursachen) klassifizierten Schlaganfällen waren 8 Patienten mit Dissektionen, ein Patient mit einem entzündlichen Prozess, der die ICA infiltrierte, einer mit radiogener Stenose und ein Patient mit lokalem Thrombus nach Clipping der MCA bei Aneurysma.

Insgesamt wurden 36 (26,5%) kryptogene Schlaganfallpatienten (TOAST 5) in die Studie eingeschlossen. 12 zeigten eine unvollständige Aufarbeitung. 7 dieser Patienten verstarben frühzeitig, 4 wurden in ein anderes Krankenhaus überwiesen. Ein Patient erhielt keine Echokardiographie. Um verfälschte Ergebnisse zu vermeiden wurden diese Patienten für weitere Subgruppenanalysen ausgeschlossen.

Die Hauptverschlusslokalisation zeigte sich überwiegend im vorderen Stromgebiet, davon bei über 50% der Patienten in der MCA und etwa 20% in der ICA. Die Verschlüsse des hinteren Stromgebietes, der Basilararterie und der PCA betrug 11% (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

Tabelle 16 Baseline-Charakteristika (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

Characteristic	n=137
Age, y, median, range	73, 18–92
Sex, n (%)	
Female	70 (51)
Vascular risk factors	
Hypertension	68% (90/133)
Coronary artery disease	17% (22/133)
Atrial fibrillation	47% (63/134)
Diabetes mellitus	18% (24/133)
History of smoking	33% (35/106)
IV tPA, n (%)	85 (62)
Occlusion site, n (%)	
MCA	74 (54)
ICA including carotid-T	27 (20)
Combined ICA and MCA/ACA	19 (14)
ACA	2 (1)
Basilar artery/PCA	15 (11)
Baseline NIHSS (range, median±SD), n=125 (91.2%)	15, 2–33
mRS (90 d), n=69 (50.4%)	
0–2	27 (39.1%)
>2	42 (60.9%)
Stroke cause (TOAST), n=136, n (%)	
1=arterioembolic	22 (16.2)
2=cardioembolic	67 (49.3)
4=other determined cause	11 (8.1)
5=cryptogenic	36 (26.5)

4.3. Färbungen und Histologie

Primärer Endpunkt stellte der Zusammenhang zwischen der Ätiologie des Schlaganfalls und der Thrombuszusammensetzung dar, angegeben in Prozent der Hauptkomponenten Fibrin/Thrombozyten (F/P), Erythrozyten (RBC) und Leukozyten (WBC). Bei der HE-Färbung kann man nicht eindeutig zwischen Fibrin und Thrombozyten unterscheiden, so dass diese beiden Bestandteile zusammengefasst wurden (F/P).

Insgesamt zeigte die Thrombuszusammensetzung durchschnittlich vergleichbare Anteile von F/P (47%, 2-89) und RBC (43%, 2-96). Die medianen histologischen Ergebnisse zeigt Tabelle 17.

Tabelle 17 Interventionelle & histologische Parameter (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

Interventional parameters	
<i>Time to treat (min):</i> <i>median, range</i>	220, 15–625
<i>Recanalization time (min):</i> <i>median, range</i>	50, 10–308
<i>Number of maneuvers:</i> <i>median, range</i>	3, 1–12
<i>TICI score (percentage), n = 137</i>	
TICI 0	2.2%
TICI 2a	8%
TICI 2b	35%
TICI 3	54.7%
Histological parameters	
<i>Thrombus components , median</i> <i>percentage, range</i>	
F/P	47%, 2-89
RBC	43%, 2-96
WBC	7%, 1-31

4.4. Interventionelle Parameter

Die durchschnittliche Zeit bis zur Intervention betrug 220min (15-625min). Etwa 3 Manöver (1-12) wurden durchgeführt zur Rekanalisation, wobei im Median 50min (10-308min) Zeit benötigt wurden. In 89,7% wurde eine erfolgreiche Rekanalisation erreicht, definiert als TICI 2b oder 3. Ebenso zu sehen in Tabelle 17.

4.5. Primäre Endpunkte

Alle Hauptkomponenten der Thromben zeigten signifikante Unterschiede zwischen kardioembolischer (TOAST 2) und nicht-kardioembolischer Genese (TOAST 1 und 4). Kardioembolische Thromben hatten einen höheren Anteil an F/P (52,6% zu 40,9%, $p=0,009$), weniger RBC (38,3% zu 52,7%, $p=0,003$), und mehr WBC (9,1% zu 6,5%, $p=0,035$) als nicht-kardioembolische Thromben. Zudem zeigten auch alle prädefinierten therapeutischen und klinischen Daten, außer der Zeit bis zur Reperfusion, signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen (Boeckh-Behrens et al., 2016a). Tabelle 18 zeigt die Unterschiede zwischen nicht-kardioembolischen und kardioembolischen Schlaganfallpatienten.

Tabelle 18 Vergleich nichtkardioembolischer und kardioembolischer Schlaganfallpatienten (Boeckh-Behrens, Kleine, et al., 2016).

	Noncardioembolic, Mean (\pm SD)	Cardioembolic, Mean (\pm SD)	<i>P</i> Value
F/P, %*	40.9 (\pm 23.3)n=33	52.6 (\pm 18.6)n=67	0.009
RBC, %*	52.7 (\pm 25.2)n=33	38.3 (\pm 20.0)n=67	0.003
WBC, %*	6.5 (\pm 3.8)n=33	9.1 (\pm 6.4)n=67	0.035
NIHSS (pre)	12.0 (\pm 5.0)n=30	15.2 (\pm 6.2)n=63	0.016
NIHSS (post)	4.8 (\pm 9.2)n=31	11.9 (\pm 13.4)n=59	0.001
Difference NIHSS	8.38 (\pm 4.5)n=29	3.8 (\pm 10.8)n=58	0.026
mRS (90 d)	1.4 (\pm 1.8)n=12	3.6 (\pm 1.9)n=37	0.002
No. of maneuvers	2.1 (\pm 1.7)n=31	3.6 (\pm 2.7)n=62	0.001
Recanalization time, min	47.7 (\pm 41.1)n=31	64.1 (\pm 51.7)n=63	0.035
Time to reperfusion, min	248.3 (\pm 138.1)n=26	280.5 (\pm 113.7)n=58	0.753

F/P indicates fibrin/platelet; mRS, modified Rankin Scale; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; RBC, red blood cell; and WBC, white blood cells.

* Primary target variables.

Bei Patienten mit kryptogenen Schlaganfällen war der Anteil von F/P fast identisch zu dem Anteil von F/P bei kardioembolischen Schlaganfallpatienten (50,8% zu 52,6%, $p=0,592$), jedoch signifikant höher in nicht-kardioembolischen Thromben (50,8% zu 40,9%, $p=0,049$). Auch die Anzahl an RBC war ähnlich hoch in kryptogenen wie in kardioembolischen Thromben (42% zu 52,7%, $p=0,069$). Die WBC dagegen zeigten einen ähnlichen Anteil in Thromben kryptogener und nicht-kardioembolischer Genese (7,1% zu 6,5%, $p=0,487$). Bis auf die Zeit bis zur Reperfusion, dem Unterschied des NIHSS pre und post-interventionell und die Rekanalisationszeit, waren auch hier alle interventionellen und klinischen Daten signifikant unterschiedlich zwischen diesen beiden Gruppen.

Berücksichtigt man zudem die 12 der 36 Patienten mit kryptogenen Schlaganfällen, die keine vollständige Aufarbeitung erhalten haben, stellt sich der signifikante Unterschied, trotz kleinerer Fallzahl, noch deutlicher dar (n=24, p=0,028 für F/P Anteil: 53,9% und p=0,044 für den RBC Anteil:39,5%). Tabelle 19 zeigt die Unterschiede zwischen nicht-kardioembolischen und kryptogenen Schlaganfallpatienten.

Tabelle 19 Vergleich nicht-kardioembolischer und kryptogener Schlaganfallpatienten (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

	Noncardioembolic, Mean (\pm SD)	Cryptogenic, Mean (\pm SD)	P Value
F/P, %*	40.9 (\pm 23.3)n=33	50.8 (\pm 20.8)n=36	0.049
RBC, %*	52.7 (\pm 25.2)n=33	42.0 (\pm 21.4)n=36	0.069
WBC, %*	6.5 (\pm 3.8)n=33	7.1 (\pm 4.5)n=36	0.487
NIHSS (pre)	12.0 (\pm 5.0)n=30	16.3 (\pm 6.9)n=32	0.010
NIHSS (post)	4.8 (\pm 9.2)n=31	14.6 (\pm 16.9)n=32	0.006
Difference NIHSS	8.38 (\pm 4.5)n=29	3.1 (\pm 13.2)n=31	0.189
mRS (90 d)	1.4 (\pm 1.8)n=12	3.9 (\pm 2.2)n=21	0.004
No. of maneuvers	2.1 (\pm 1.7)n=31	3.7 (\pm 2.4)n=34	0.003
Recanalization time, min	47.7 (\pm 41.1)n=31	57.7 (\pm 39.5)n=34	0.096
Time to reperfusion, min	248.3 (\pm 138.1)n=26	271.9 (\pm 87.1)n=27	0.323

F/P indicates fibrin/platelet; mRS, modified Rankin Scale; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; RBC, red blood cell; and WBC, white blood cells.

* Primary target variables.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen allen Gruppen für den Anteil der RBC ($p=0,038$), jedoch keinen signifikanten Unterschied der Anteile von F/P ($p=0,056$) und WBC ($p=0,127$). Keine nachweisbaren Unterschiede zeigen die Thrombuszusammensetzungen zwischen arterioembolischen (TOAST 1) und Schlaganfällen anderer Genese (TOAST 4) und zwischen den Gruppen kardioembolischer (TOAST 2) und kryptogenen Schlaganfällen (TOAST 5), dargestellt als Boxplot-Diagramm A in Abbildung 7. RBC stellen die dominante Komponente in TOAST 1 und 4 dar, wohingegen bei TOAST 2 und 5 die Anteile F/P dominieren.

Darüber hinaus zeigen auch erhobene interventionelle sowie klinische Parameter Ähnlichkeit zwischen der TOAST 1 und 4 Gruppe sowie der TOAST 2 und 5 Gruppe. Abbildung 7 zeigt die Ähnlichkeiten mittels Boxplot, ausgewertet mittels Kruskal-Wallis Test ($P\text{-Werte} < 0,05$ tabellarisch dargestellt für signifikante Unterschiede, grau hinterlegt für Ähnlichkeiten zwischen den TOAST Gruppen), beispielhaft an der Anzahl der benötigten Manöver zur Rekanalisation (Abbildung 7B) und dem mRS nach maximal 90 Tagen (Abbildung 7C). Kardioembolische und kryptogene Schlaganfallpatienten zeigten eine signifikant höhere Anzahl an benötigten Manövern zur Rekanalisation und signifikant schlechtere mRS nach 90 Tagen im Vergleich zu den arterioembolischen oder Schlaganfällen anderer Genese (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

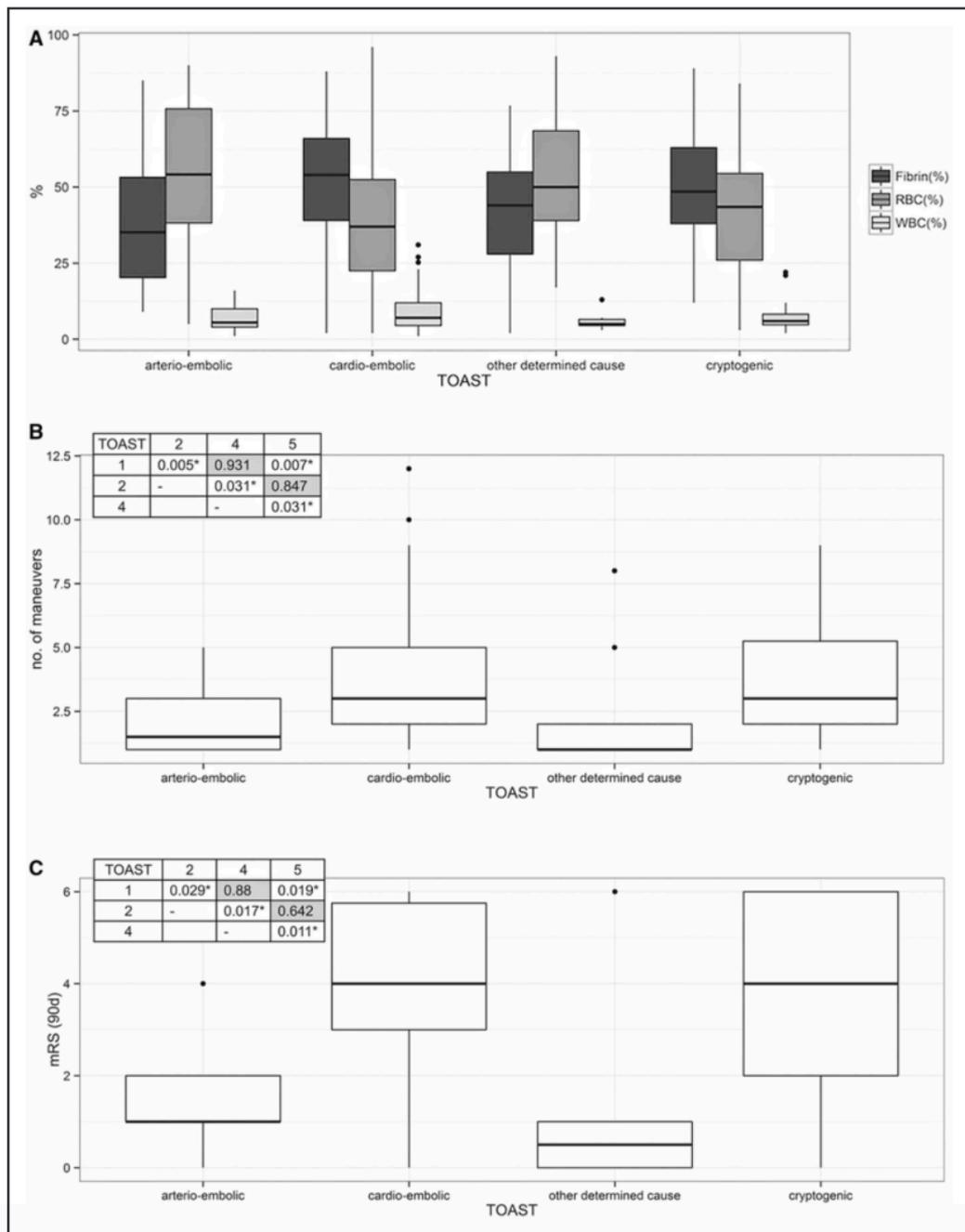


Abbildung 9 Zusammenhang Ätiologie & histologische Komponenten und Anzahl der Rekanalisationsmanöver/mRS (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

5. Diskussion

Erst mit der Bergung von Thromben durch gezielte Thrombektomien als Therapie von akuten Schlaganfällen ergab sich die Möglichkeit der histopathologischen Analyse von menschlichen Thromben. Die anschließende Entwicklung von Stentretreivern und die vermehrte Anwendung von mechanischen Thrombektomien im klinischen Alltag führten zu zahlreicheren und spezifischeren Thrombusanalysen. In vorangegangenen als auch unseren Studien zeigten sich unterschiedliche histologische Zusammensetzungen der Thromben abhängig von der Ätiologie. Auch interventionelle und klinische Ergebnisse lassen eine Schlussfolgerung auf die Herkunft der Thromben zu.

5.1. Baseline-Charakteristika

Die klinischen Daten der Patienten geben einen Überblick über erhobene Risikofaktoren sowie die kardiologische Vorgeschichte der Patienten, die die Zusammensetzung der Thromben beeinflussen könnten. Ein fortgeschrittenes Alter ist verbunden mit einem schlechterem klinischen Outcome sowie einer höheren Prävalenz an Vorhofflimmern. Dies beinhaltet eine höhere Inzidenz von kardioembolischen Ereignissen. Umgekehrt sind Patienten mit kardioembolischen Schlaganfällen im Schnitt älter als Schlaganfallpatienten mit anderer Genese (Marini et al., 2005, Putaala et al., 2015). Auch in unserer Studie können wir dies bestätigen. Das durchschnittliche Alter war bei Patienten mit kardioembolischen Schlaganfall signifikant höher als das der anderen Patienten, auch der kryptogenen Schlaganfallpatienten. Zudem waren die TOAST 4 Patienten signifikant jünger als alle anderen TOAST Gruppen, inklusive der arterioembolischen Schlaganfallpatienten. Folglich können die Ergebnisse unserer Studie, vor allem die Übereinstimmungen der technischen und klinischen Parameter von kryptogenen und kardioembolischen

sowie von TOAST 1 und TOAST 4 Gruppen, nicht durch eine ähnliche Altersverteilung begründet werden (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

5.2. Histologie

Die Daten unserer Studie mit insgesamt 137 Patienten unterstützen die Ergebnisse vorangegangener Studien, wie bereits oben erwähnt, dass kardioembolische Thromben histopathologisch unterschiedlich zu nicht-kardioembolischen, kryptogene Thromben aber aus Gleichen oder zumindest aus ähnlich bestehenden Komponenten wie kardioembolische Thromben zusammengesetzt sind. Insbesondere in Schlaganfällen kardioembolischer Genese zeigten sich höhere Anteile an F/P und Leukozyten und ein kleinerer Anteil an Erythrozyten im Vergleich zu anderen Ätiologien.

Auch die Ähnlichkeit der Zusammensetzung von kryptogenen und kardioembolischen Thromben konnten wir histopathologisch in unserer Studie demonstrieren. Dies unterstützt einmal mehr die Hypothese, dass die meisten kryptogenen Schlaganfälle kardioembolischer Genese sind.

Ebenso kamen Sporns et al. 2017 zum Ergebnis, dass kardioembolische Thromben einen höheren Anteil an Fibrin/Thrombozyten (60.0% versus 51.5%; $P=0.027$) sowie Leukozyten (8.0% versus 5.0%; $P=0.026$), dafür weniger Erythrozyten (28.0% versus 42.0%; $P=0.005$) beinhalten als nicht-kardioembolische Thromben (Sporns et al., 2017, Boeckh-Behrens et al., 2016a).

Die Studie von Maekawa et al. belegte einen höheren Anteil an Fibrin bei Thromben kardioembolischer Genese (66.2 ± 25.8 vs. $46.4 \pm 25.5\%$; $p = 0.03$) und einen niedrigeren Anteil an Erythrozyten (29.5 ± 26.2 vs. $49.6 \pm 26.1\%$; $p = 0.03$) als die nicht-kardioembolischer Genese. Es bestand jedoch in dieser Studie kein signifikanter Unterschied des Leukozytenanteils zwischen den Thromben von Patienten mit

Kardioembolien und denjenigen mit nicht-kardioembolischen Thromben (Maekawa et al., 2018).

Die Arbeitsgruppe um Niesten et al. dahingegen konnte keinen Zusammenhang zwischen dem Anteil an Fibrin oder an Thrombozyten und der Herkunft der Thromben sehen. Dies kann zunächst an der wesentlich kleineren Anzahl an untersuchten Thromben (n=22), aber auch an der unterschiedlichen Methodik zur Analyse der Thromben liegen. Hier wurde zwischen Fibrin und Thrombozyten unterschieden, wohingegen unsere Studie, bedingt durch die Anwendung der HE-Färbung, nicht zwischen diesen beiden Komponenten unterschieden hat. F/P galt als eine zusammengefasste Komponente der Thromben. Wir können jedoch bestätigen, ebenso wie Niesten et al., dass kardioembolische Thromben einen niedrigeren Anteil, nicht-kardioembolische Thromben den höchsten Anteil an RBC aufweisen (Niesten et al., 2014).

Im Gegensatz dazu zeigte die Studie von Kim et al. 2015, einen hohen Anteil an RBCs und einen niedrigen Anteil an Fibrin in kardioembolischen Thromben (Kim et al., 2015). Auch hier ist die Anzahl der Studienteilnehmer sehr viel kleiner (n=37). Nur 8 (21,6%) wurden als nicht-kardioembolische Thromben eingestuft. Ebenso wurde hier bei der Auswertung zwischen Fibrin und Thrombozyten unterschieden.

Thromben kryptogener Genese zeigen die gleiche Zusammensetzung wie kardioembolische Thromben, mit einem höheren Anteil an F/P und geringeren Anteil an RBC, im Gegensatz zu nicht-kardioembolischen Thromben (arterioembolische Genese TOAST 1 und TOAST 4, Abbildung 7A). Analoge Gemeinsamkeiten zwischen kryptogenen und kardioembolischen und Unterschiede zu nicht-kardioembolischen Schlaganfällen, bezogen auf interventionelle Parameter und klinischem Outcome (Abbildung 7B und 7C), wurden ebenso festgestellt. Die Unterschiede zwischen kryptogenen und nicht-kardioembolischen Schlaganfällen waren zwar nicht so

eindeutig wie die zwischen kardioembolischen und nicht-kardioembolischen Schlaganfällen, trotzdem weiterhin signifikant für F/P und für den Großteil der klinischen und interventionellen Parameter. Noch deutlicher zeigten sich die histologischen Unterschiede, wenn Patienten, deren diagnostische Untersuchungen unvollständig waren, aus der Auswertung ausgeschlossen wurden. Hier stellten sich die Gemeinsamkeiten von kryptogenen und kardioembolischen Thromben deutlich ausgeprägter dar. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Mehrzahl, wenn auch nicht alle, der kryptogenen Schlaganfälle kardioembolischer Genese sind (Boeckh-Behrens et al., 2016a). Zudem sahen in unseren histologischen Auswertungen arterio-arterielle embolische Thromben aus wie Dissektionsthromben. Die einen haben eine komplizierte atherosklerotische Plaquebildung, meist ältere Patienten, die anderen sind jung und haben keine Atherosklerose. Offensichtliche Plaquebestandteile einschließlich Kalk wurden jedoch praktisch nie gefunden.

5.3. Klinik

Mit unserer Auswertung der unterschiedlichen TOAST Gruppen in Zusammenhang mit den einzelnen Komponenten der Thromben sowie interventionellen und klinischen Parametern lassen die Ergebnisse, auch auf klinischer Ebene spekulieren, dass der Großteil der kryptogenen Schlaganfälle kardioembolischer Genese ist.

Die Resultate der Studie unserer Arbeitsgruppe, die dieser Arbeit vorgeschaltet waren, zeigten im ersten Schritt, dass Thromben mit hohem Anteil an Leukozyten vermehrt organisierte Thromben kardioembolischer Genese sind. Sie weisen eine geringere Rekanalisationsrate und ein schlechteres Outcome vor (Boeckh-Behrens et al., 2016b). Diese Ergebnisse können wir mit der vorliegenden Studie bestätigen. Kardioembolische Schlaganfälle benötigen eine höhere Anzahl an Rekanalisationsmanövern (Abbildung 7B) und haben ein schlechteres Outcome, bei

uns nachgewiesen durch einen höheren mRS (Abbildung 7C) und NIHSS, im Vergleich zu nicht-kardioembolischen Schlaganfällen. Auch andere Veröffentlichungen stimmen mit diesen Ergebnissen überein: Kardioembolische Schlaganfälle, vor allem durch Vorhofflimmern, zeigen ein schlechteres Outcome und eine höhere Rezidivrate (Marini et al., 2005, Kolominsky-Rabas et al., 2001). Arboix et al. betonen, dass kardioembolische Schlaganfälle zudem die höchste Mortalität (27,3%) im Vergleich zu Schlaganfällen anderer Genese aufweisen (Arboix and Alió, 2010).

Gleicherweise untersuchten andere Studien die Genese von kryptogenen Schlaganfällen und kamen zu dem Schluss, dass unter ebendiesen die Rate an Patienten mit Vorhofflimmern steigt, je intensiver eine Langzeit-Diagnostik durchgeführt wurde. Sposato et al. zeigte 2015 in einer groß angelegten Metaanalyse, dass nahezu ein Viertel der Patienten nach Schlaganfall Vorhofflimmern hatten (23,7%). Das sind mehr Patienten als früher angenommen, so dass dementsprechend vermutlich mehr Patienten von einer oralen Antikoagulation profitieren würden, um das Risiko eines Schlaganfallrezidivs zu reduzieren und dem vorzubeugen (Sposato et al., 2015).

Die intravenöse Verabreichung von rtPA kann direkten Einfluss auf die Thrombuszusammensetzung durch Störung des Gerinnungssystems haben, so dass ein histologischer Unterschied zwischen der Zusammensetzung der Thromben denkbar wäre. Da wir bei unseren Analysen keinerlei histologische Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen feststellen konnten, kann auch diese potentielle Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst unterstützen sowohl unsere histopathologischen Analysen als auch die klinischen und interventionellen Ergebnisse die Hypothese, dass kardioembolische und kryptogene Schlaganfälle sich überschneidende Ursachen

haben, jedoch von TOAST 1 und TOAST 4 Gruppen zu unterscheiden und abzugrenzen sind (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

5.4. Einschränkungen

Die Verwendung der HE-Färbung als einzige für die quantitative Auswertung der unterschiedlichen Zusammensetzung der Thromben erlaubt den direkten Vergleich der Komponenten, führt jedoch aufgrund der methodischen Auswertung dazu, dass Thrombozyten und Fibrin in der Analyse nicht differenziert werden können. Dies kann somit die Interpretation der Daten einschränken, beeinflusst jedoch nicht die Kernaussagen der Studie. Die Schlussfolgerungen aus den Analysen der einzelnen Gruppen zeigen weiterhin eindeutige Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der jeweiligen Zusammensetzung der Thromben. Dennoch könnte die genauere Auswertung der Thrombozyten zusätzliche Informationen zur Differenzierung der Ätiologie von Schlaganfällen zeigen. Weitere Studien sind demnach erstrebenswert, die noch genauer die einzelnen Bestandteile der Thromben differenzieren, berücksichtigt man vor allem bereits durchgeführte Analysen, die zeigen, dass der Thrombozytenanteil die Wahrscheinlichkeit einer Embolisation von kardialen Thromben beeinflusst (Wysocki et al., 2004).

Die geringe Anzahl an kryptogenen Schlaganfällen, die die ESUS Kriterien erfüllen, ist eine weitere Einschränkung. Trotzdem stellen sich die Gemeinsamkeiten von kryptogenen und kardioembolischen Thromben noch deutlicher nach Ausschluss von nicht vollständig ausgewerteten Patienten dar, so dass unsere Schlussfolgerungen offensichtlich nicht durch diese Einschränkung beeinflusst worden sind.

Auch die mechanisch geborgenen Thromben stellen nicht immer den gesamten Thrombus dar. Ein gewisser Bias kann somit nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Zudem ist durch das große Patientenkollektiv mit individuell stark unterschiedlichen Gegebenheiten, somit auch mit einem weiten Spektrum an

Thrombuszusammensetzungen, die quantitative Auswertung nicht immer repräsentativ für den tatsächlichen gesamten Thrombus. Durch kontinuierliche Auslegung der Thromben in optimaler längsgerichteter Ebene wurden solche systematische Fehlerquellen so gut wie möglich vermieden (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

5.5. Schlussfolgerung

Mechanisch geborgene Thromben von kardioembolischen und nicht-kardioembolischen Schlaganfallpatienten unterscheiden sich signifikant in ihrer histopathologischen Zusammensetzung. Kryptogene und kardioembolische Thromben hingegen zeigen deutliche Ähnlichkeiten sowohl in ihrer histopathologischen Zusammensetzung als auch auf interventioneller und klinischer Ebene. Ebenso sind beide eindeutig von anderen Schlaganfallursachen abzugrenzen. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass der Großteil kryptogener Schlaganfälle kardioembolischer Genese sind (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

Kryptogene Schlaganfälle umfassen etwa 25% aller ischämischen Schlaganfälle. Durch die Weiterentwicklung bildgebender Verfahren sowie dem besseren Verständnis der Pathophysiologie und der Erkenntnis, dass ESUS eine Subgruppe der kryptogenen Infarkte sind, regte Hart et al. bereits 2014 an, diese neu zu bewerten und ESUS eine größere Gewichtung zuzuschreiben. Therapeutisch stellt ESUS eine klare Indikation zur Plättchenhemmung des Patienten dar. Diese so Hart et al. reduziert wesentlich das Rezidivrisiko eines ischämischen Schlaganfalls (Hart et al., 2014). ASS wird bis heute zur sekundären Prophylaxe von kryptogenen Schlaganfällen verschrieben. Basierend auf der Hypothese, dass ESUS kardioembolischer Genese sind, beispielsweise bei unentdecktem Vorhofflimmern oder anderen embolischen Ereignissen, gibt es zahlreiche randomisierte Studien, die orale Nicht-Vitamin K-Antagonisten (NOAC) mit ASS vergleichen (Diener et al., 2017). Folgende

randomisierte klinische Studien vergleichen die direkte orale Antikoagulation mit einer antithrombozytären Standardtherapie im Rahmen eines ESUS. Die großangelegte Phase 3-Studie „The New Approach Rivaroxaban Inhibition of Factor Xa in a Global Trial vs. ASA to Prevent Embolism in Embolic Stroke of Undetermined Source (NAVIGATE-ESUS)“, durchgeführt in 31 Ländern, mit über 7000 Patienten verglich die Wirksamkeit und Sicherheit von Rivaroxaban mit Aspirin als sekundäre Schlaganfallprophylaxe bei Patienten mit kürzlichem ESUS (Kasner et al., 2018a). Die Patienten erhielten, aufgrund eines frühzeitigen Studienabbruchs bei Fehlen eines Vorteils bei Gabe von Rivaroxaban, für durchschnittlich 11 Monate ein Follow-up. Der fehlende Vorteil bezog sich hierbei auf das Schlaganfallrisiko und das höhere Risiko einer Blutung. Hart et al. zeigte, im Rahmen dieser NAVIGATE ESUS Studie, keine Überlegenheit von der täglichen Einnahme von Rivaroxaban (15mg) im Vergleich zur Einnahme von ASS (100mg) bezüglich des Rezidivrisikos eines Schlaganfalls bei Patienten nach initialem ESUS, jedoch ein höheres Risiko einer Blutung. Bei 158 Patienten in der Rivaroxabangruppe (jährliche Rate von 4,7%) und bei 160 Patienten in der ASS Gruppe (4,7%) kam es zu einem Schlaganfallrezidiv. Starke Blutungen zeigten 62 Patienten in der Rivaroxabangruppe (jährliche Rate von 1,8%), in der ASS Gruppe lediglich 23 Patienten (0,7%) (Hart et al., 2018).

Subgruppenanalysen von Patienten mit und ohne persistierend offenem Foramen ovale (PFO), basierend auf transoesophagealer (TEE) oder transthorakaler Echokardiographie (TTE), wurden durchgeführt. Insgesamt wurden bei 534 (7,4%) Patienten ein PFO diagnostiziert. Unter den Patienten mit ESUS bei PFO konnte die Antikoagulation das Risiko eines Schlaganfallrezidivs um fast die Hälfte senken. Patienten mit PFO, die ASS erhielten, hatten eine Schlaganfallrezidivrate von 4,8 Ereignissen. Im Vergleich zu 2,6 Ereignissen pro 100 Personenjahren bei Patienten, die mit Rivaroxaban behandelt wurden. Weitere Studien, die die Antikoagulation mit der antithrombozytären Therapie oder mit dem Verschluss des PFO, oder gar mit

beidem, vergleichen, sind erstrebenswert, um in dieser speziellen Patientengruppe eine genauere Schlussfolgerung treffen zu können. Das Risiko einer starken Blutung mit Rivaroxaban versus ASS war ähnlich bei Patienten mit neu diagnostiziertem PFO (Kasner et al., 2018b).

2015 verglich die Studie „Design of Randomized, double-blind, Evaluation in secondary Stroke Prevention comparing the Efficacy and safety of the oral Thrombin inhibitor dabigatran etexilate vs. acetylsalicylic acid in patients with Embolic Stroke of Undetermined Source (RE-SPECT ESUS)“ um Diener et al., die Wirkung von Dabigatran mit Aspirin bei Schlaganfallpatienten mit stattgehabtem ESUS. Etwa 6000 Patienten mit ESUS aus über 550 Zentren wurden mindestens 6 Monate, maximal bis zu 3 Jahre behandelt. Die Studie sollte zeigen, ob der orale Thrombin Inhibitor Dabigatran zur Prävention eines Schlaganfallrezidivs, eingenommen innerhalb von 3 Monaten nach ESUS, in seiner Wirkung und Sicherheit ASS überlegen ist. Dabei wurde, randomisiert und doppelblind, eine Dosis von 150mg Dabigatran zweimal am Tag (reduziert auf 110mg bei Patienten >75Jahre und/oder GFR 30-50ml/min) oder 100mg ASS einmal täglich verabreicht (Diener et al., 2015).

Die Ergebnisse wurden unter anderem 2019 von Diener et al. veröffentlicht: nach einem medianen follow-up von 19 Monaten hatten 177 Patienten (6,6%) aus der Dabigatran Gruppe (4,1% pro Jahr) und 207 Patienten (7,7%) aus der ASS Gruppe (4,8% pro Jahr) ein Schlaganfallrezidiv. Der Unterschied war somit statistisch nicht relevant ($p=0,10$). Ischämische Schlaganfälle zeigten 172 Patienten (4,0% pro Jahr) und 203 Patienten (4,7% pro Jahr). Bei Patienten mit kürzlich stattgehabtem ESUS zeigte demnach die Einnahme von Dabigatran keine überlegende Wirkung im Vergleich zu Aspirin bezüglich der Prävention eines Schlaganfallrezidivs. Auch das Risiko einer starken Blutung zeigte sich in diesen beiden Gruppen ähnlich (1,7% pro Jahr zu 1,4%). Dahingegen zeigten sich mehr klinisch relevante nichtstarke

Blutungsereignisse in der Dabigatran Gruppe (1,6% pro Jahr zu 0,9%) (Diener et al., 2019).

Der weltweite Standard zur sekundären Prophylaxe von kryptogenen Schlaganfällen ist weiterhin die antithrombozytäre Hemmung (Giruparajah et al., 2015). Auch aufgrund unserer Ergebnisse und zahlreicher anderer Studien sollte dies weiter diskutiert werden.

Favilla et al. zeigte beispielsweise, dass eine beträchtliche Anzahl an Patienten mit ESUS unentdecktes VHF haben können. Vor allem Patienten >60 Jahre oder mit vorherigen kortikalen oder zerebellären Infarkten zeigten einen erhöhten Nachweis an unentdecktem VHF (Favilla et al., 2015). In diesen Fällen ist das VHF asymptomatisch, subklinisch oder paroxysmal. Dementsprechend gibt es zwei Strategien die sekundäre Schlaganfallprävention bei Patienten mit ESUS zu verbessern: die eine Möglichkeit wäre die Anlage eines Langzeit-EKGs. Alternativ könnten alle Patienten mit ESUS, ohne Nachweis von VHF im kurzfristigen Monitoring, antikoaguliert werden. Letztere Methode ist im klinischen Alltag besser umsetzbar als die Verwendung eines Langzeit-EKGs (Diener et al., 2015).

Das Konzept von ESUS vereinfacht zwar die Entwicklung einer standardisierten Herangehensweise kryptogene Schlaganfälle zu diagnostizieren und klinische Studien durchzuführen. Bis heute konnten die großen randomisierten Studien jedoch keine Reduzierung des Schlaganfallrisikos mittels Gabe von Antikoagulantien zeigen, so dass antithrombozytäre Medikamente weiterhin das Mittel der ersten Wahl bei Patienten mit ESUS bleiben. Dennoch bedarf es einer genaueren Erhebung der Schlaganfallursache bei Patienten mit einem hohen Risiko eines Schlaganfallrezidivs (beispielsweise bei Patienten mit rezidivierenden embolischen Infarkten trotz Therapie mit Aspirin), inklusive kardialer Bildgebung und verlängerter kardialer Rhythmusüberwachung. Mehrere Studien mit ausstehenden Ergebnissen und mit

einem schnellen Fortschreiten in unserem Verständnis für die Pathophysiologie von ESUS, werden neue Subkategorien sowie Zuordnungen dieser für die optimale Behandlung für jede ESUS Subgruppe in naher Zukunft erwartet (Tsai et al., 2021).

Unsere Ergebnisse basieren auf Gruppenanalysen, die jedoch beträchtliche interindividuelle Schwankungen der erhobenen Parameter zeigen. Trotzdem wäre es wünschenswert die Auswertung der histologischen Zusammensetzung der Thromben zu nutzen, um Schlussfolgerungen zur Ursache von Schlaganfällen von individuellen Patienten erheben zu können. Eine solche Herangehensweise, durch histopathologische Analysen, kann in Zukunft erhebliche Zusatzinformationen generieren, auch beim individuellen Patienten. Die histologische Analyse der Thrombuszusammensetzung allein kann keine individuellen Behandlungsentscheidungen treffen. Dennoch könnte die Analyse der Thromben vor allem bei Patienten, wo die alltägliche Diagnostik zu keiner klaren Ursache des Schlaganfalls kommt, weiterführen (Boeckh-Behrens et al., 2016a).

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Der Schlaganfall ist weltweit die zweithäufigste Todesursache und eine der führenden Ursachen für eine Behinderung als Erwachsener. Mit der Bergung von Thromben durch gezielte Thrombektomien als Therapie von akuten Schlaganfällen ergab sich die Möglichkeit der histopathologischen Analyse von menschlichen Thromben, unter anderem, zur genaueren Zuordnung der Ätiologie des Infarkts.

Methode: 145 Patienten mit akuten Schlaganfällen wurden mit einer endovaskulären mechanischen Rekanalisation therapiert. 137 Thromben wurden zur weiteren histologischen und immunhistochemischen Analyse verwendet.

Die Auswertung der Präparate erfolgte auf 2 verschiedene Art und Weisen. Die immunhistochemischen Färbungen konnten mittels mikroskopischer Zählung der Leukozyten bzw. der neutrophilen Granulozyten manuell, die HE-Färbungen mussten digital ausgewertet werden. Hier wurde eine quantitative Analyse der Komponenten eines Thrombus durch halbautomatische farbbasierte Segmentierung mittels Photohop CS4 (Adobe) durchgeführt.

Ergebnisse: Alle Hauptkomponenten der Thromben zeigten signifikante Unterschiede zwischen kardioembolischer und nicht-kardioembolischer Genese. Kardioembolische Thromben hatten einen höheren Anteil an F/P ($p=0,009$), weniger RBC ($p=0,003$), und mehr WBC ($p=0,035$) als nicht-kardioembolische Thromben.

Bei Patienten mit kryptogenen Schlaganfällen war der Anteil von F/P fast identisch zu kardioembolischen Schlaganfallpatienten ($p=0,592$). Auch die Anzahl an RBC war ähnlich hoch in kryptogenen wie in kardioembolischen Thromben ($p=0,069$).

Darüber hinaus zeigten auch die interventionellen sowie klinischen Parameter Ähnlichkeit zwischen den Gruppen. Kardioembolische und kryptogene Schlaganfallpatienten zeigten eine signifikant höhere Anzahl an benötigten

Manövern zur Rekanalisation und einen signifikant schlechteren mRS nach 90 Tagen im Vergleich zu den arterioembolischen oder Schlaganfällen anderer Genese.

Schlussfolgerung: Mechanisch geborgene Thromben von kardioembolischen und nicht-kardioembolischen Schlaganfallpatienten unterscheiden sich signifikant in ihrer histopathologischen Zusammensetzung. Kryptogene und kardioembolische Thromben hingegen zeigen deutliche Ähnlichkeiten sowohl in ihrer histopathologischen Zusammensetzung als auch auf interventioneller und klinischer Ebene. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass der Großteil kryptogener Schlaganfälle kardioembolischer Genese sind.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

- ADAMS, H. P., JR., BENDIXEN, B. H., KAPPELLE, L. J., BILLER, J., LOVE, B. B., GORDON, D. L. & MARSH, E. E., 3RD 1993. 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, 35-41.
- ADAMS, H. P., JR., DEL ZOPPO, G., ALBERTS, M. J., BHATT, D. L., BRASS, L., FURLAN, A., GRUBB, R. L., HIGASHIDA, R. T., JAUCH, E. C., KIDWELL, C., LYDEN, P. D., MORGENSTERN, L. B., QURESHI, A. I., ROSENWASSER, R. H., SCOTT, P. A. & WIJDICKS, E. F. 2007. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke*, 38, 1655-711.
- ANSELL, J., HIRSH, J., POLLER, L., BUSSEY, H., JACOBSON, A. & HYLEK, E. 2004. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, 126, 204s-233s.
- ARBOIX, A. & ALIÓ, J. 2010. Cardioembolic stroke: clinical features, specific cardiac disorders and prognosis. *Curr Cardiol Rev*, 6, 150-61.
- ARDAKANI, S. K., DADMEHR, M., NEJAT, F., ANSARI, S., EFTEKHAR, B., TAJIK, P., EL KHASHAB, M., YAZDANI, S., GHODSI, M., MAHJOUR, F., MONAJEMZADEH, M., NAZPARVAR, B. & ABDI-RAD, A. 2008. The cerebral arterial circle (circulus arteriosus cerebri): an anatomical study in fetus and infant samples. *Pediatr Neurosurg*, 44, 388-92.
- BAGOT, C. N. & ARYA, R. 2008. Virchow and his triad: a question of attribution. *Br J Haematol*, 143, 180-90.
- BAMFORD, J., SANDERCOCK, P., DENNIS, M., BURN, J. & WARLOW, C. 1991. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet*, 337, 1521-6.
- BAMFORD, J., SANDERCOCK, P., JONES, L. & WARLOW, C. 1987. The natural history of lacunar infarction: the Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke*, 18, 545-51.

- BANG, O. Y., LEE, P. H., JOO, S. Y., LEE, J. S., JOO, I. S. & HUH, K. 2003. Frequency and mechanisms of stroke recurrence after cryptogenic stroke. *Ann Neurol*, 54, 227-34.
- BLANN, A. D. 2003. How a damaged blood vessel wall contributes to thrombosis and hypertension. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 33, 445-8.
- BOECKH-BEHRENS, T., KLEINE, J. F., ZIMMER, C., NEFF, F., SCHEIPL, F., PELISEK, J., SCHIRMER, L., NGUYEN, K., KARATAS, D. & POPPERT, H. 2016a. Thrombus Histology Suggests Cardioembolic Cause in Cryptogenic Stroke. *Stroke*, 47, 1864-71.
- BOECKH-BEHRENS, T., SCHUBERT, M., FÖRSCHLER, A., PROTHMANN, S., KREISER, K., ZIMMER, C., RIEGGER, J., BAUER, J., NEFF, F., KEHL, V., PELISEK, J., SCHIRMER, L., MEHR, M. & POPPERT, H. 2016b. The Impact of Histological Clot Composition in Embolic Stroke. *Clin Neuroradiol*, 26, 189-97.
- BRATTHAUER, G. L. 2010. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods Mol Biol*, 588, 257-70.
- BREKENFELD, C., REMONDA, L., NEDELTCHEV, K., V BREDOW, F., OZDOBA, C., WIEST, R., ARNOLD, M., MATTLE, H. P. & SCHROTH, G. 2005. Endovascular neuroradiological treatment of acute ischemic stroke: techniques and results in 350 patients. *Neurol Res*, 27 Suppl 1, S29-35.
- BROTT, T., ADAMS, H. P., JR., OLINGER, C. P., MARLER, J. R., BARSAN, W. G., BILLER, J., SPILKER, J., HOLLERAN, R., EBERLE, R., HERTZBERG, V. & ET AL. 1989. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*, 20, 864-70.
- CAMM, A. J., KIRCHHOF, P., LIP, G. Y., SCHOTTEN, U., SAVELIEVA, I., ERNST, S., VAN GELDER, I. C., AL-ATTAR, N., HINDRICKS, G., PRENDERGAST, B., HEIDBUCHEL, H., ALFIERI, O., ANGELINI, A., ATAR, D., COLONNA, P., DE CATERINA, R., DE SUTTER, J., GOETTE, A., GORENEK, B., HELDAL, M., HOHLOSER, S. H., KOLH, P., LE HEUZEY, J. Y., PONIKOWSKI, P. & RUTTEN, F. H. 2010. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Europace*, 12, 1360-420.
- CAMPBELL, B. C., HILL, M. D., RUBIERA, M., MENON, B. K., DEMCHUK, A., DONNAN, G. A., ROY, D., THORNTON, J., DORADO, L., BONAFE, A., LEVY, E. I., DIENER, H. C., HERNÁNDEZ-PÉREZ, M., PEREIRA, V. M., BLASCO, J., QUESADA, H., REMPEL, J., JAHAN, R., DAVIS, S. M., STOUCH, B. C., MITCHELL, P. J., JOVIN, T. G., SAVER, J. L. & GOYAL, M. 2016. Safety and Efficacy of Solitaire Stent Thrombectomy: Individual Patient Data Meta-Analysis of Randomized Trials. *Stroke*, 47, 798-806.
- CHAMORRO, A., SACCO, R. L., MOHR, J. P., FOULKES, M. A., KASE, C. S., TATEMACHI, T. K., WOLF, P. A., PRICE, T. R. & HIER, D. B. 1991. Clinical-computed

- tomographic correlations of lacunar infarction in the Stroke Data Bank. *Stroke*, 22, 175-81.
- DI NISIO, M., MIDDELDORP, S. & BÜLLER, H. R. 2005. Direct thrombin inhibitors. *N Engl J Med*, 353, 1028-40.
- DIENER, H. C., BERNSTEIN, R. & HART, R. 2017. Secondary Stroke Prevention in Cryptogenic Stroke and Embolic Stroke of Undetermined Source (ESUS). *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17, 64.
- DIENER, H. C., EASTON, J. D., GRANGER, C. B., CRONIN, L., DUFFY, C., COTTON, D., BRUECKMANN, M. & SACCO, R. L. 2015. Design of Randomized, double-blind, Evaluation in secondary Stroke Prevention comparing the EfficaCy and safety of the oral Thrombin inhibitor dabigatran etexilate vs. acetylsalicylic acid in patients with Embolic Stroke of Undetermined Source (RE-SPECT ESUS). *Int J Stroke*, 10, 1309-12.
- DIENER, H. C., SACCO, R. L., EASTON, J. D., GRANGER, C. B., BERNSTEIN, R. A., UCHIYAMA, S., KREUZER, J., CRONIN, L., COTTON, D., GRAUER, C., BRUECKMANN, M., CHERNYATINA, M., DONNAN, G., FERRO, J. M., GROND, M., KALLMÜNZER, B., KRUPINSKI, J., LEE, B. C., LEMMENS, R., MASJUAN, J., ODINAK, M., SAVER, J. L., SCHELLINGER, P. D., TONI, D. & TOYODA, K. 2019. Dabigatran for Prevention of Stroke after Embolic Stroke of Undetermined Source. *N Engl J Med*, 380, 1906-1917.
- FAVILLA, C. G., INGALA, E., JARA, J., FESSLER, E., CUCCHIARA, B., MESSÉ, S. R., MULLEN, M. T., PRASAD, A., SIEGLER, J., HUTCHINSON, M. D. & KASNER, S. E. 2015. Predictors of finding occult atrial fibrillation after cryptogenic stroke. *Stroke*, 46, 1210-5.
- FEIGIN, V. L., KRISHNAMURTHI, R. V., PARMAR, P., NORRVING, B., MENSAH, G. A., BENNETT, D. A., BARKER-COLLO, S., MORAN, A. E., SACCO, R. L., TRUELSEN, T., DAVIS, S., PANDIAN, J. D., NAGHAVI, M., FOROUZANFAR, M. H., NGUYEN, G., JOHNSON, C. O., VOS, T., MERETOJA, A., MURRAY, C. J. & ROTH, G. A. 2015. Update on the Global Burden of Ischemic and Hemorrhagic Stroke in 1990-2013: The GBD 2013 Study. *Neuroepidemiology*, 45, 161-76.
- FIEHLER, J. & GERLOFF, C. 2015. Mechanical Thrombectomy in Stroke. *Dtsch Arztebl Int*, 112, 830-6.
- FRITSCHY, J. M. 2008. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci*, 28, 2365-70.
- FURIE, B. & FURIE, B. C. 2008. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*, 359, 938-49.
- FURLAN, A., HIGASHIDA, R., WECHSLER, L., GENT, M., ROWLEY, H., KASE, C., PESSIN, M., AHUJA, A., CALLAHAN, F., CLARK, W. M., SILVER, F. & RIVERA, F. 1999. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *Jama*, 282, 2003-11.

- GEISLER, T., MENGEL, A., ZIEMANN, U. & POLI, S. 2018. Management of Embolic Stroke of Undetermined Source (ESUS). *Drugs*, 78, 823-831.
- GIRUPARAJAH, M., BOSCH, J., VANASSCHE, T., MATTINA, K., CONNOLLY, S. J., PATER, C. & HART, R. G. 2015. Global survey of the diagnostic evaluation and management of cryptogenic ischemic stroke. *Int J Stroke*, 10, 1031-6.
- GOLDSTEIN, L. B. & SAMSA, G. P. 1997. Reliability of the National Institutes of Health Stroke Scale. Extension to non-neurologists in the context of a clinical trial. *Stroke*, 28, 307-10.
- GOYAL, M., JADHAV, A. P., BONAFE, A., DIENER, H., MENDES PEREIRA, V., LEVY, E., BAXTER, B., JOVIN, T., JAHAN, R., MENON, B. K. & SAVER, J. L. 2016a. Analysis of Workflow and Time to Treatment and the Effects on Outcome in Endovascular Treatment of Acute Ischemic Stroke: Results from the SWIFT PRIME Randomized Controlled Trial. *Radiology*, 279, 888-97.
- GOYAL, M., MENON, B. K., VAN ZWAM, W. H., DIPPEL, D. W., MITCHELL, P. J., DEMCHUK, A. M., DÁVALOS, A., MAJOIE, C. B., VAN DER LUGT, A., DE MIQUEL, M. A., DONNAN, G. A., ROOS, Y. B., BONAFE, A., JAHAN, R., DIENER, H. C., VAN DEN BERG, L. A., LEVY, E. I., BERKHEMER, O. A., PEREIRA, V. M., REMPEL, J., MILLÁN, M., DAVIS, S. M., ROY, D., THORNTON, J., ROMÁN, L. S., RIBÓ, M., BEUMER, D., STOUCH, B., BROWN, S., CAMPBELL, B. C., VAN OOSTENBRUGGE, R. J., SAVER, J. L., HILL, M. D. & JOVIN, T. G. 2016b. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet*, 387, 1723-31.
- GRAHAM, D. J., REICHMAN, M. E., WERNECKE, M., ZHANG, R., SOUTHWORTH, M. R., LEVENSON, M., SHEU, T. C., MOTT, K., GOULDING, M. R., HOUSTOUN, M., MACURDY, T. E., WORRALL, C. & KELMAN, J. A. 2015. Cardiovascular, bleeding, and mortality risks in elderly Medicare patients treated with dabigatran or warfarin for nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation*, 131, 157-64.
- GRAU, A. J., WEIMAR, C., BUGGLE, F., HEINRICH, A., GOERTLER, M., NEUMAIER, S., GLAHN, J., BRANDT, T., HACKE, W. & DIENER, H. C. 2001. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke*, 32, 2559-66.
- GUERCINI, F., ACCIARRESI, M., AGNELLI, G. & PACIARONI, M. 2008. Cryptogenic stroke: time to determine aetiology. *J Thromb Haemost*, 6, 549-54.
- GUESDON, J. L., TERNYNCK, T. & AVRAMEAS, S. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem*, 27, 1131-9.
- 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. 2004.

- Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet*, 363, 768-74.
- HACKE, W., KASTE, M., BLUHMKI, E., BROZMAN, M., DÁVALOS, A., GUIDETTI, D., LARRUE, V., LEES, K. R., MEDEGHRI, Z., MACHNIG, T., SCHNEIDER, D., VON KUMMER, R., WAHLGREN, N. & TONI, D. 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 359, 1317-29.
- HART, R. G., BENAVENTE, O., MCBRIDE, R. & PEARCE, L. A. 1999. Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis. *Ann Intern Med*, 131, 492-501.
- 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. 2014. Embolic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct. *Lancet Neurol*, 13, 429-38.
- HART, R. G., SHARMA, M., MUNDL, H., KASNER, S. E., BANGDIWALA, S. I., BERKOWITZ, S. D., SWAMINATHAN, B., LAVADOS, P., WANG, Y., WANG, Y., DAVALOS, A., SHAMALOV, N., MIKULIK, R., CUNHA, L., LINDGREN, A., ARAUZ, A., LANG, W., CZLONKOWSKA, A., ECKSTEIN, J., GAGLIARDI, R. J., AMARENCO, P., AMERISO, S. F., TATLISUMAK, T., VELTKAMP, R., HANKEY, G. J., TONI, D., BERECZKI, D., UCHIYAMA, S., NTAIOS, G., YOON, B. W., BROUNS, R., ENDRES, M., MUIR, K. W., BORNSTEIN, N., OZTURK, S., O'DONNELL, M. J., DE VRIES BASSON, M. M., PARE, G., PATER, C., KIRSCH, B., SHERIDAN, P., PETERS, G., WEITZ, J. I., PEACOCK, W. F., SHOAMANESH, A., BENAVENTE, O. R., JOYNER, C., THEMELES, E. & CONNOLLY, S. J. 2018. Rivaroxaban for Stroke Prevention after Embolic Stroke of Undetermined Source. *N Engl J Med*, 378, 2191-2201.
- HAYAT, M. A. 2002. *Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods: for light and electron microscopy*, Springer Science & Business Media.
- HIGASHIDA, R. T., FURLAN, A. J., ROBERTS, H., TOMSICK, T., CONNORS, B., BARR, J., DILLON, W., WARACH, S., BRODERICK, J., TILLEY, B. & SACKS, D. 2003. Trial design and reporting standards for intra-arterial cerebral thrombolysis for acute ischemic stroke. *Stroke*, 34, e109-37.
- HORLING, L., NEUHUBER, W. L. & RAAB, M. 2012. Pitfalls using tyramide signal amplification (TSA) in the mouse gastrointestinal tract: endogenous streptavidin-binding sites lead to false positive staining. *J Neurosci Methods*, 204, 124-132.
- JANSEN, O., MACHO, J. M., KILLER-OBERPFALZER, M., LIEBESKIND, D. & WAHLGREN, N. 2013. Neurothrombectomy for the treatment of acute ischemic stroke: results from the TREVO study. *Cerebrovasc Dis*, 36, 218-25.
- JOVIN, T. G., CHAMORRO, A., COBO, E., DE MIQUEL, M. A., MOLINA, C. A., ROVIRA, A., SAN ROMÁN, L., SERENA, J., ABILLEIRA, S., RIBÓ, M., MILLÁN, M., URRÁ, X., CARDONA, P., LÓPEZ-CANCIO, E., TOMASELLO, A., CASTAÑO, C., BLASCO, J., AJA, L., DORADO, L., QUESADA, H., RUBIERA, M., HERNANDEZ-PÉREZ, M.,

- GOYAL, M., DEMCHUK, A. M., VON KUMMER, R., GALLOFRÉ, M. & DÁVALOS, A. 2015. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med*, 372, 2296-306.
- KASNER, S. E., LAVADOS, P., SHARMA, M., WANG, Y., WANG, Y., DÁVALOS, A., SHAMALOV, N., CUNHA, L., LINDGREN, A., MIKULIK, R., ARAUZ, A., LANG, W., CZLONKOWSKA, A., ECKSTEIN, J., GAGLIARDI, R., AMARENCO, P., AMERISO, S. F., TATLISUMAK, T., VELTKAMP, R., HANKEY, G. J., TONI, D. S., BEREZKI, D., UCHIYAMA, S., NTAIOS, G., YOON, B. W., BROUNS, R., DEVRIES BASSON, M. M., ENDRES, M., MUIR, K., BORNSTEIN, N., OZTURK, S., O'DONNELL, M., MUNDL, H., PATER, C., WEITZ, J., PEACOCK, W. F., SWAMINATHAN, B., KIRSCH, B., BERKOWITZ, S. D., PETERS, G., PARE, G., THEMELES, E., SHOAMANESH, A., CONNOLLY, S. J. & HART, R. G. 2018a. Characterization of Patients with Embolic Strokes of Undetermined Source in the NAVIGATE ESUS Randomized Trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 27, 1673-1682.
- KASNER, S. E., SWAMINATHAN, B., LAVADOS, P., SHARMA, M., MUIR, K., VELTKAMP, R., AMERISO, S. F., ENDRES, M., LUTSEP, H., MESSÉ, S. R., SPENCE, J. D., NEDELTECHEV, K., PERERA, K., SANTO, G., OLAVARRIA, V., LINDGREN, A., BANGDIWALA, S., SHOAMANESH, A., BERKOWITZ, S. D., MUNDL, H., CONNOLLY, S. J. & HART, R. G. 2018b. Rivaroxaban or aspirin for patent foramen ovale and embolic stroke of undetermined source: a prespecified subgroup analysis from the NAVIGATE ESUS trial. *Lancet Neurol*, 17, 1053-1060.
- KIM, S. K., YOON, W., KIM, T. S., KIM, H. S., HEO, T. W. & PARK, M. S. 2015. Histologic Analysis of Retrieved Clots in Acute Ischemic Stroke: Correlation with Stroke Etiology and Gradient-Echo MRI. *AJNR Am J Neuroradiol*, 36, 1756-62.
- KIRCHHOF, P., BENUSSI, S., KOTECHA, D., AHLSSON, A., ATAR, D., CASADEI, B., CASTELLA, M., DIENER, H. C., HEIDBUCHEL, H., HENDRIKS, J., HINDRICKS, G., MANOLIS, A. S., OLDGREN, J., POPESCU, B. A., SCHOTTEN, U., VAN PUTTE, B. & VARDAS, P. 2016. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J*, 37, 2893-2962.
- KOLOMINSKY-RABAS, P. L., HEUSCHMANN, P. U., MARSCHALL, D., EMMERT, M., BALTZER, N., NEUNDORFER, B., SCHOFFSKI, O. & KROBOT, K. J. 2006. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke*, 37, 1179-83.
- KOLOMINSKY-RABAS, P. L., SARTI, C., HEUSCHMANN, P. U., GRAF, C., SIEMONSEN, S., NEUNDOERFER, B., KATALINIC, A., LANG, E., GASSMANN, K. G. & VON STOCKERT, T. R. 1998. 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, 2501-6.

- KOLOMINSKY-RABAS, P. L., WEBER, M., GEFELLER, O., NEUNDOERFER, B. & HEUSCHMANN, P. U. 2001. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke*, 32, 2735-40.
- LIP, G. Y., FRISON, L., HALPERIN, J. L. & LANE, D. A. 2010. Identifying patients at high risk for stroke despite anticoagulation: a comparison of contemporary stroke risk stratification schemes in an anticoagulated atrial fibrillation cohort. *Stroke*, 41, 2731-8.
- LOZANO, R., NAGHAVI, M., FOREMAN, K., LIM, S., SHIBUYA, K., ABOYANS, V., ABRAHAM, J., ADAIR, T., AGGARWAL, R., AHN, S. Y., ALVARADO, M., ANDERSON, H. R., ANDERSON, L. M., ANDREWS, K. G., ATKINSON, C., BADDOUR, L. M., BARKER-COLLO, S., BARTELS, D. H., BELL, M. L., BENJAMIN, E. J., BENNETT, D., BHALLA, K., BIKBOV, B., BIN ABDULHAK, A., BIRBECK, G., BLYTH, F., BOLLIGER, I., BOUFOUS, S., BUCELLO, C., BURCH, M., BURNEY, P., CARAPETIS, J., CHEN, H., CHOU, D., CHUGH, S. S., COFFENG, L. E., COLAN, S. D., COLQUHOUN, S., COLSON, K. E., CONDON, J., CONNOR, M. D., COOPER, L. T., CORRIERE, M., CORTINOVIS, M., DE VACCARO, K. C., COUSER, W., COWIE, B. C., CRIQUI, M. H., CROSS, M., DABHADKAR, K. C., DAHODWALA, N., DE LEO, D., DEGENHARDT, L., DELOSSANTOS, A., DENENBERG, J., DES JARLAIS, D. C., DHARMARATNE, S. D., DORSEY, E. R., DRISCOLL, T., DUBER, H., EBEL, B., ERWIN, P. J., ESPINDOLA, P., EZZATI, M., FEIGIN, V., FLAXMAN, A. D., FOROUZANFAR, M. H., FOWKES, F. G., FRANKLIN, R., FRANSEN, M., FREEMAN, M. K., GABRIEL, S. E., GAKIDOU, E., GASPARI, F., GILLUM, R. F., GONZALEZ-MEDINA, D., HALASA, Y. A., HARING, D., HARRISON, J. E., HAVMOELLER, R., HAY, R. J., HOEN, B., HOTEZ, P. J., HOY, D., JACOBSEN, K. H., JAMES, S. L., JASRASARIA, R., JAYARAMAN, S., JOHNS, N., KARTHIKEYAN, G., KASSEBAUM, N., KEREN, A., KHOO, J. P., KNOWLTON, L. M., KOBUSINGYE, O., KORANTENG, A., KRISHNAMURTHI, R., LIPNICK, M., LIPSHULTZ, S. E., OHNO, S. L., et al. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380, 2095-128.
- MACKMAN, N. 2006. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol Dis*, 36, 104-7.
- MAEKAWA, K., SHIBATA, M., NAKAJIMA, H., MIZUTANI, A., KITANO, Y., SEGUCHI, M., YAMASAKI, M., KOBAYASHI, K., SANO, T., MORI, G., YABANA, T., NAITO, Y., SHIMIZU, S. & MIYA, F. 2018. Erythrocyte-Rich Thrombus Is Associated with Reduced Number of Maneuvers and Procedure Time in Patients with Acute Ischemic Stroke Undergoing Mechanical Thrombectomy. *Cerebrovasc Dis Extra*, 8, 39-49.
- MAIR, G. & WARDLAW, J. M. 2014. Imaging of acute stroke prior to treatment: current practice and evolving techniques. *Br J Radiol*, 87, 20140216.

- MAKIN, S. D., TURPIN, S., DENNIS, M. S. & WARDLAW, J. M. 2013. Cognitive impairment after lacunar stroke: systematic review and meta-analysis of incidence, prevalence and comparison with other stroke subtypes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84, 893-900.
- MARINI, C., DE SANTIS, F., SACCO, S., RUSSO, T., OLIVIERI, L., TOTARO, R. & CAROLEI, A. 2005. Contribution of atrial fibrillation to incidence and outcome of ischemic stroke: results from a population-based study. *Stroke*, 36, 1115-9.
- MIGHELL, A., HUME, W. & ROBINSON, P. 1998. An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. *Oral diseases*, 4, 217-223.
- MURRAY, C. J., VOS, T., LOZANO, R., NAGHAVI, M., FLAXMAN, A. D., MICHAUD, C., EZZATI, M., SHIBUYA, K., SALOMON, J. A., ABDALLA, S., ABOYANS, V., ABRAHAM, J., ACKERMAN, I., AGGARWAL, R., AHN, S. Y., ALI, M. K., ALVARADO, M., ANDERSON, H. R., ANDERSON, L. M., ANDREWS, K. G., ATKINSON, C., BADDOUR, L. M., BAHALIM, A. N., BARKER-COLLO, S., BARRERO, L. H., BARTELS, D. H., BASANEZ, M. G., BAXTER, A., BELL, M. L., BENJAMIN, E. J., BENNETT, D., BERNABE, E., BHALLA, K., BHANDARI, B., BIKBOV, B., BIN ABDULHAK, A., BIRBECK, G., BLACK, J. A., BLENCOWE, H., BLORE, J. D., BLYTH, F., BOLLIGER, I., BONAVENTURE, A., BOUFOUS, S., BOURNE, R., BOUSSINESQ, M., BRAITHWAITE, T., BRAYNE, C., BRIDGETT, L., BROOKER, S., BROOKS, P., BRUGHA, T. S., BRYAN-HANCOCK, C., BUCELLO, C., BUCHBINDER, R., BUCKLE, G., BUDKE, C. M., BURCH, M., BURNEY, P., BURSTEIN, R., CALABRIA, B., CAMPBELL, B., CANTER, C. E., CARABIN, H., CARAPETIS, J., CARMONA, L., CELLA, C., CHARLSON, F., CHEN, H., CHENG, A. T., CHOU, D., CHUGH, S. S., COFFENG, L. E., COLAN, S. D., COLQUHOUN, S., COLSON, K. E., CONDON, J., CONNOR, M. D., COOPER, L. T., CORRIERE, M., CORTINOVIS, M., DE VACCARO, K. C., COUSER, W., COWIE, B. C., CRIQUI, M. H., CROSS, M., DABHADKAR, K. C., DAHIYA, M., DAHODWALA, N., DAMSERE-DERRY, J., DANAEI, G., DAVIS, A., DE LEO, D., DEGENHARDT, L., DELLAVALLE, R., DELOSSANTOS, A., DENENBERG, J., DERRETT, S., DES JARLAIS, D. C., DHARMARATNE, S. D., et al. 2012. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380, 2197-223.
- NELSON, P., REYNOLDS, G., WALDRON, E., WARD, E., GIANNOPOULOS, K. & MURRAY, P. 2000. Demystified...: monoclonal antibodies. *Molecular pathology*, 53, 111.
- NIELSEN, H. K. 1991. Pathophysiology of venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost*, 17 Suppl 3, 250-3.
- NIESTEN, 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. & VELTHUIS, B. K. 2014. Histopathologic composition of cerebral thrombi of acute stroke patients is correlated with stroke subtype and thrombus attenuation. *PLoS One*, 9, e88882.

- NOSER, E. A., SHALTONI, H. M., HALL, C. E., ALEXANDROV, A. V., GARAMI, Z., CACAYORIN, E. D., SONG, J. K., GROTTA, J. C. & CAMPBELL, M. S., 3RD 2005. Aggressive mechanical clot disruption: a safe adjunct to thrombolytic therapy in acute stroke? *Stroke*, 36, 292-6.
- OLESEN, J. B., SØRENSEN, R., HANSEN, M. L., LAMBERTS, M., WEEKE, P., MIKKELSEN, A. P., KØBER, L., GISLASON, G. H., TORP-PEDERSEN, C. & FOSBØL, E. L. 2015. Non-vitamin K antagonist oral anticoagulation agents in anticoagulant naïve atrial fibrillation patients: Danish nationwide descriptive data 2011-2013. *Europace*, 17, 187-93.
- POLAK, J. M. & VAN NOORDEN, S. 2003. *Introduction to immunocytochemistry*, BIOS Scientific Publishers.
- PUTAALA, J., NIEMINEN, T., HAAPANIEMI, E., MERETOJA, A., RANTANEN, K., HEIKKINEN, N., KINNUNEN, J., STRBIAN, D., MUSTANOJA, S., CURTZE, S., PAKARINEN, S., LEHTO, M. & TATLISUMAK, T. 2015. Undetermined stroke with an embolic pattern--a common phenotype with high early recurrence risk. *Ann Med*, 47, 406-13.
- PUTAALA, J. & TATLISUMAK, T. 2014. Prime time for dissecting the entity of cryptogenic stroke. *Stroke*, 45, 950-2.
- RAMOS-VARA, J. A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42, 405-26.
- RIEDEL, C. H., ZIMMERMANN, P., JENSEN-KONDERING, U., STINGELE, R., DEUSCHL, G. & JANSEN, O. 2011. The importance of size: successful recanalization by intravenous thrombolysis in acute anterior stroke depends on thrombus length. *Stroke*, 42, 1775-7.
- SACCO, R. L., ELLENBERG, J. H., MOHR, J. P., TATEMACHI, T. K., HIER, D. B., PRICE, T. R. & WOLF, P. A. 1989. Infarcts of undetermined cause: the NINCDS Stroke Data Bank. *Ann Neurol*, 25, 382-90.
- SACCO, R. L., KASNER, S. E., BRODERICK, J. P., CAPLAN, L. R., CONNORS, J. J., CULEBRAS, A., ELKIND, M. S., GEORGE, M. G., HAMDAN, A. D., HIGASHIDA, R. T., HOH, B. L., JANIS, L. S., KASE, C. S., KLEINDORFER, D. O., LEE, J. M., MOSELEY, M. E., PETERSON, E. D., TURAN, T. N., VALDERRAMA, A. L. & VINTERS, H. V. 2013. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44, 2064-89.
- 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. 2015. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med*, 372, 2285-95.

- SHI, S. R., KEY, M. E. & KALRA, K. L. 1991. 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, 741-8.
- SPORNS, P. B., HANNING, U., SCHWINDT, W., VELASCO, A., MINNERUP, J., ZOUBI, T., HEINDEL, W., JEIBMANN, A. & NIEDERSTADT, T. U. 2017. Ischemic Stroke: What Does the Histological Composition Tell Us About the Origin of the Thrombus? *Stroke*, 48, 2206-2210.
- SPOSATO, L. A., CIPRIANO, L. E., SAPOSNIK, G., RUÍZ VARGAS, E., RICCIO, P. M. & HACHINSKI, V. 2015. Diagnosis of atrial fibrillation after stroke and transient ischaemic attack: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 14, 377-87.
- STANGIER, J., RATHGEN, K., STÄHLE, H., GANSSER, D. & ROTH, W. 2007. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 64, 292-303.
- STODDARD, M. F., DAWKINS, P. R., PRINCE, C. R. & AMMASH, N. M. 1995. 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, 452-9.
- TAKAMIYA, H., BODEMER, W. & VOGT, A. 1978. Masking of protein antigen by modification of amino groups with carbobenzoxychloride (benzyl chloroformate) and demasking by treatment with nonspecific protease. *J Histochem Cytochem*, 26, 914-20.
- TSAI, L. K., LEE, I. H., CHEN, Y. L., CHAO, T. F., CHEN, Y. W., PO, H. L., LIEN, L. M., CHU, P. H., HUANG, W. C., LIN, T. H., LIN, M. T., JENG, J. S. & HWANG, J. J. 2021. Diagnosis and Treatment for embolic stroke of undetermined source: Consensus statement from the Taiwan stroke society and Taiwan society of cardiology. *J Formos Med Assoc*, 120, 93-106.
- VAN OVERBEEKE, J. J., HILLEN, B. & TULLEKEN, C. A. 1991. A comparative study of the circle of Willis in fetal and adult life. The configuration of the posterior bifurcation of the posterior communicating artery. *J Anat*, 176, 45-54.
- VAN SWIETEN, J. C., KOUDSTAAL, P. J., VISSER, M. C., SCHOUTEN, H. J. & VAN GIJN, J. 1988. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke*, 19, 604-7.
- VAN ZONNEVELD, A. J., VEERMAN, H., MACDONALD, M. E., VAN MOURIK, J. A. & PANNEKOEK, H. 1986. Structure and function of human tissue-type plasminogen activator (t-PA). *J Cell Biochem*, 32, 169-78.
- WATSON, T., SHANTSILA, E. & LIP, G. Y. 2009. Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet*, 373, 155-66.

- WERNER, M., VON WASIELEWSKI, R. & KOMMINOTH, P. 1996. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*, 105, 253-60.
- WILCHEK, M. & BAYER, E. A. 1984. The avidin-biotin complex in immunology. *Immunol Today*, 5, 39-43.
- WYSOKINSKI, W. E., OWEN, W. G., FASS, D. N., PATRZALEK, D. D., MURPHY, L. & MCBANE, R. D., 2ND 2004. Atrial fibrillation and thrombosis: immunohistochemical differences between in situ and embolized thrombi. *J Thromb Haemost*, 2, 1637-44.
- YOON, W., PARK, M. S. & CHO, K. H. 2010. Low-dose intra-arterial urokinase and aggressive mechanical clot disruption for acute ischemic stroke after failure of intravenous thrombolysis. *AJNR Am J Neuroradiol*, 31, 161-4.

Sonstige Quellen:

Busch MA, Kuhnert R (2017) 12-Monats-Prävalenz von Schlaganfall oder chronischen Beschwerden infolge eines Schlaganfalls in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 2(1): 70 – 76 (www.rki.de/journalhealthmonitoring)

Günster C (2011) Schlaganfallversorgung in Deutschland - Inzidenz, Wiederaufnahmen, Mortalität und Pflegerisiko im Spiegel von Routinedaten. In: Günster C, Klose J, Schmacke N (Hrsg) *Versorgungs-Report 2011 - Schwerpunkt: Chronische Erkrankungen*, Schattauer, Stuttgart, S. 147 bis 163

Hage V (2011). "The NIH stroke scale: a window into neurological status". *Nursing Spectrum*. **24** (15): 44–49.

Mehr, Michael Georg Christian (2019) Dissertation: Pathohistologische Charakterisierung von Thromben aus mechanischen kathetergestützten Rekanalisationen bei akutem ischämischem Schlaganfall

Robert Koch-Institut (Hrsg) (2015) *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes* (http://www.gbe-bund.de/gbe10/ergebnisse.prc_pruef_verweise?p_uid=gast&p_aid=7737648&p_fid=25106&p_ftyp=TXT&p_pspkz=D&p_sspkz=&p_wsp=&p_vtrau=4&p_hlp_nr=2&sprache=D&p_sprachkz=D&p_lfd_nr=31&p_news=&p_modus=2&p_window=&p_janein=J#m44)

van den Bussche H, Berger K, Kemper C et al. (2010) Inzidenz, Rezidiv, Pflegebedürftigkeit und Mortalität von Schlaganfall: Eine Sekundärdatenanalyse von Krankenkassendaten. *Akt Neurol* 37(3):131 bis 135

Publikation

„Thrombus Histology Suggests Cardioembolic Cause in Cryptogenic Stroke“

Tobias Boeckh-Behrens, Justus F Kleine, Claus Zimmer, Frauke Neff, Fabian Scheipl, Jaroslav Pelisek, Lucas Schirmer, **Kim Nguyen**, Deniz Karatas, Holger Poppert

Stroke. 2016 Jul;47(7):1864-71. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.013105.

Epub 2016 May 19. PMID: 27197854

7.2. Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Dissertation sowie seinen fachlichen Rat und seine Geduld danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Holger Poppert sehr herzlich.

Mein Dank gilt Herrn Dr. med. Tobias Boeckh-Behrens für die Durchführung der Publikation, die stets freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit sowie für seine Hilfe bei der Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse, die mir das Gelingen dieser Dissertation ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit und in allen Lebenslagen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

