

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorstand: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

**Merkmale der Immuno-thrombose in arteriellen Thromben von Patienten
mit akutem Myokardinfarkt und ischämischem Apoplex- eine
explorative Studie zum Vergleich der Histologie und zur Korrelation
klinischer Parameter**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig- Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von

Paul Henrich Jörg, geb. Oberdieck

aus

Berlin

Jahr

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Schulz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Schober
PD Dr. med. Nikolaus Sarafoff

Mitbetreuung durch
den promovierten
Mitarbeiter: Dr. med. Julia Novotny

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen
Prüfung: 19.11.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das Herz-Kreislauf-System.....	7
1.2	Arterien.....	8
1.2.1	Aufbau und Funktion.....	8
1.2.2	Überblick über die arteriellen Gefäßkrankheiten	9
1.2.3	Risikofaktoren der Atherosklerose	10
1.2.4	Pathogenese der Atherosklerose.....	13
1.3	Hämostase und arterielle Thrombose	17
1.3.1	Definition.....	17
1.3.2	Primäre Hämostase	17
1.3.3	Sekundäre Hämostase.....	19
1.3.4	Arterielle Thrombose.....	22
1.4	Koronare Herzerkrankung	23
1.4.1	Definition.....	23
1.4.2	Ätiologie und Pathogenese	24
1.4.3	Akuter Myokardinfarkt.....	24
1.4.3.1	Definition	24
1.4.3.2	Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik.....	25
1.4.3.3	Therapie.....	26
1.5	Ischämischer Apoplex	28
1.5.1	Allgemeine Definition des Apoplex	28
1.5.2	Ätiologie und Pathogenese	28
1.5.3	Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik.....	29
1.5.4	Therapie	30
1.6	Immunothrombose.....	32
1.6.1	Allgemeine Prinzipien	32
1.6.2	Rolle der Monozyten und neutrophilen Granulozyten	33
1.6.2.1	Monozyten.....	33
1.6.2.2	Neutrophile Granulozyten und neutrophil extracellular traps (NETs).....	34
1.7	Eosinophile Granulozyten und Lymphozyten in der arteriellen Thrombose	36
1.7.1	Eosinophile Granulozyten	36
1.7.2	B- und T- Lymphozyten	37
1.8	Fragestellung	38
2	Material.....	39

2.1	Chemikalien und Lösungen	39
2.2	(Verbrauchs-) Materialien	40
2.3	Geräte.....	41
2.4	Software.....	42
2.5	Antikörper.....	43
3	Methoden.....	44
3.1	Rekrutierung der Patienten und Gewinnung der Thromben.....	44
3.1.1	Einverständniserklärung und Ethikvotum	44
3.1.2	Patienten mit akutem Myokardinfarkt.....	44
3.1.3	Patienten mit akutem ischämischem Apoplex.....	45
3.1.4	Erhebung klinisch-interventioneller Parameter der Apoplexpatienten	45
3.1.5	Übersicht- Einschluss der Myokardinfarkt- und Apoplexpatienten	47
3.2	Aufarbeitung der Apoplexthromben für die Histologie	48
3.3	Aufarbeitung der Myokardinfarktthromben für die Histologie.....	48
3.4	Histologische Färbungen mit Färbelösungen	49
3.4.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung	49
3.4.2	Carstairs- Färbung	49
3.4.3	Luna- Färbung	50
3.5	Immunhistochemische Färbungen.....	51
3.5.1	Allgemeines Prinzip der Immunmarkierung	51
3.5.2	Protokoll der Immunfluoreszenzfärbungen.....	52
3.5.3	Labeled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode für die CD3 und CD20- Färbung	54
3.6	Lichtmikroskopie.....	56
3.6.1	Aufbau des Lichtmikroskops.....	56
3.6.2	Verwendete Mikroskope und Kameras	57
3.7	Digitaler Präparatscanner	57
3.8	Immunfluoreszenzmikroskopie	58
3.8.1	Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie.....	58
3.8.2	Aufbau und Strahlengang	59
3.9	Konfokale Mikroskopie	60
3.10	Auswertung und Statistik	61
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Vergleich der Thrombusmorphologie mit der HE- und Carstairs-Färbung	65
4.2	Vergleich der Myokardinfarkt- und Apoplexthromben.....	69
4.2.1	Höherer Anteil an Thrombozyten und Fibrin im Apoplex	69

4.2.2	Gleiche Anzahl an kernhaltigen Zellen und neutrophilen Granulozyten im Myokardinfarkt und Apoplex	74
4.2.3	Nachweis von NETs im Myokardinfarkt und Apoplex.....	78
4.2.4	Höhere Anzahl an intermediären/ nicht-klassischen Monozyten im Apoplex...	80
4.2.5	Höhere Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Apoplex.....	85
4.2.6	Höhere Anzahl an T- und B-Lymphozyten im Apoplex.....	86
4.3	Korrelation der Färbungen untereinander und mit klinischen Parametern.....	89
4.3.1	Vergleich klinischer Parameter der Apoplexpatienten.....	89
4.3.2	Positive Korrelation zwischen den kernhaltigen Zellen, NETs und dem Fibrin-/Thrombozytenanteil und deren Einfluss auf klinische Parameter im Apoplex.....	90
4.3.3	Zusammenhang zwischen der NIHSS pre und dem Fibrinanteil	93
4.3.4	Positive Korrelation zwischen der Zahl der kernhaltigen Zellen und der Zahl an Neutrophilen, NETs und Monozyten im Myokardinfarkt und Apoplex	96
4.3.5	Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf den Fibrin-/Thrombozytenanteil und das klinische Outcome der Patienten mit Apoplex.....	101
4.4	Basischarakteristika der Myokardinfarkt- und Apoplexpatienten.....	104
5	Diskussion	106
5.1	Zentrale Ergebnisse der Arbeit.....	106
5.2	Diskussion der Methoden.....	111
5.2.1	Gewinnung der Thromben.....	111
5.2.2	Einschluss der Patienten und möglicher Einfluss auf die Auswertung.....	111
5.2.3	Einbettung und Färbung der Thromben.....	112
5.2.4	Grenzen der Immunfluoreszenzmikroskopie.....	112
5.2.5	Grenzen der explorativen Studie	114
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	114
5.3.1	Einfluss der NETs auf die Thrombusmorphologie und das Outcome.....	114
5.3.2	Einfluss der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten	115
5.4	Ausblick.....	116
6	Zusammenfassung	117
7	Abkürzungsverzeichnis	118
8	Abbildungsverzeichnis	120
9	Tabellenverzeichnis	123
10	Literaturverzeichnis	125
11	Danksagung	135
12	Eidesstattliche Versicherung	136

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, d.h. Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, gehören weltweit zu den Haupttodesursachen. Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO starben im Jahr 2016 17,9 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen. Dies entsprach einem Anteil von etwa 31% aller Todesursachen weltweit. 85% dieser 17,9 Millionen verstarben dabei an den Folgen eines Myokardinfarkts oder Schlaganfalls (Apoplex) ¹. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind ein globales Phänomen und assoziiert mit einer Reihe von Risikofaktoren, die auch mit dem Lebensstil zusammenhängen und somit zum Teil vermeidbar sind. Die kardiovaskulären Hauptrisikofaktoren umfassen: Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, familiäre Disposition und das höhere Lebensalter ².

Die genannten Zahlen machen sowohl die hohe Relevanz der Prävention, als auch die besondere Rolle der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen deutlich. Daher ist es bedeutsam, die pathophysiologischen Mechanismen des akuten Myokardinfarkts und des ischämischen Apoplex auch auf zellulärer Ebene noch besser zu verstehen, da sie zu den beiden wichtigsten Manifestationen der kardiovaskulären Erkrankungen zählen.

Neben der antithrombozytären Therapie, die im heutigen klinischen Alltag zur Behandlung und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen eine zentrale Rolle spielt, könnten dabei in Zukunft noch spezifischere pharmakologische Therapien wichtig werden. Eine große Gefahr nämlich stellt bei den gängigen medikamentösen Therapien die erhöhte Inzidenz von Blutungskomplikationen, insbesondere bei längerer Dauer einer dualen antithrombozytären Therapie, dar ³. Eine solche spezifischere Therapie könnte dabei Zellen der Immunabwehr zum Ziel haben. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass diese an der Pathophysiologie der arteriellen Thrombose beteiligt sein können, was unter dem Terminus *Immunothrombose* zusammengefasst wird ⁴. So können z.B. neutrophile Granulozyten gerinnungsfördernde *neutrophil extracellular traps* (NETs) bilden, die die Stabilität der Thromben positiv beeinflussen und deren spezifische Hemmung möglicherweise zum Ziel neuer Therapiemöglichkeiten werden könnte ⁵.

In diesem Zusammenhang wurden in folgender Arbeit humane Thromben von Patienten mit akutem Myokardinfarkt und akutem ischämischem Apoplex mit histologischen Methoden untersucht und – auch hinsichtlich ihrer Ätiologie- verglichen. Ein wesentliches Ziel war dabei, die Rolle der beteiligten Zellen der *Immunothrombose* näher zu beleuchten und ihren Einfluss auf verschiedene klinische Parameter zu überprüfen.

1.1 Das Herz-Kreislauf-System

Das Herz, die arteriellen und venösen Blutgefäße, bilden ein in sich geschlossenes Bluttransportsystem, das Herzkreislaufsystem. Daneben existiert ein Lymphgefäßsystem, welches der Drainage von Flüssigkeit aus dem Gewebe dient und dem venösen System angeschlossen ist. Hauptfunktion des Herzkreislaufsystems ist es, für eine ausreichende Perfusion lebenswichtiger Organe wie etwa dem zentralen Nervensystem zu sorgen ⁶.

Definitionsgemäß werden Gefäße Arterien genannt, wenn sie Blut vom Herzen weg transportieren. Man unterscheidet dabei den Lungen- und Körperkreislauf. Morphologisch verzweigen sich Arterien dabei fortlaufend, während ihr Durchmesser kontinuierlich abnimmt. So gelangt das Blut über immer kleiner werdende Arterien in die Arteriolen und schließlich in das Kapillarnetz, in welchem der Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Gewebe geschieht ⁷. In den als Venolen bezeichneten Gefäßabschnitten sammelt sich das Blut und wird anschließend in die sich vergrößernden Venen überführt, bis das Blut über die Vena cava superior (obere Hohlvene) schließlich den rechten Vorhof und damit wieder das Herz erreicht. Das sogenannte Pfortadersystem bildet eine Ausnahme von diesem Bauprinzip. In diesem wird das Blut aus dem Kapillarsystem nicht direkt zurück zum Herzen, sondern erst in ein zweites, nachgeschaltetes Kapillargebiet geleitet ⁶.

Das Blutstromgebiet zwischen dem linken Ventrikel und rechtem Vorhof wird dabei als Körperkreislauf, das Gebiet der Lungenstrombahn als Lungenkreislauf bezeichnet. Das Herz gewährleistet durch seine Pumpfunktion die fortlaufende Zirkulation des Blutes im Gefäßsystem ⁸.

Das Gefäßsystem kann man funktionell wiederum in drei Teile aufteilen ^{8,9}:

Erstens, ein arterielles Hochdruck- und Widerstandssystem, welches das vom Herzen ausgeworfene Blut auf die Organe verteilt und durch Kontraktion oder Entspannung den peripheren Gefäßwiderstand und damit die Organdurchblutung reguliert.

Zweitens, ein kapilläres Austauschsystem, in welchem der Gas- und Nährstoffaustausch zwischen Blut und Gewebe stattfindet.

Drittens, das venöse Niederdrucksystem, welches den Blutrückfluss zum Herzen regelt und eine Reservoir-Funktion hat.

1.2 Arterien

1.2.1 Aufbau und Funktion

Der Wandaufbau der Arterien folgt einem dreischichtigen Prinzip, welches sich bis auf vereinzelte Ausnahmen bei den meisten Blutgefäßen finden lässt. Diese Schichten umfassen von intravasal nach extravasal die Intima (Endothel und subendotheliale Schicht), Media und die bindegewebige Adventitia.

Je nach vorherrschendem Baumaterial in der Media werden Arterien vom muskulären und elastischen Typ unterschieden. Zu letzterem gehören die herznahen Arterien, z.B. die Aorta und der Truncus pulmonalis mitsamt ihren großen Abgängen, welche wesentlich durch ihre Windkesselfunktion zu einer kontinuierlichen Blutströmung führen. Die daran anschließenden Segmente gehören zu den Arterien vom muskulären Typ ⁷.

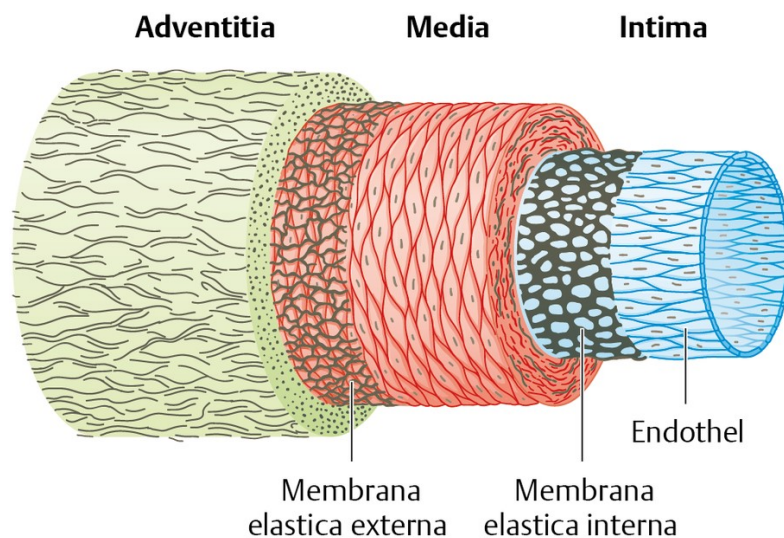


Abbildung 1: Wandschichten der Arterien des muskulären Typs (mit freundlicher Genehmigung von ⁷)

Allgemein sind Arterien von intravasal nach extravasal wie folgt aufgebaut:

Innen liegt die Intima mit dem Endothel und einer subendothelialen Schicht, welche überwiegend Extrazellulärmatrix und physiologischer Weise wenig Zellen enthält. Es folgt die Membrana elastica interna, ein Flechtwerk aus elastischen Fasern, welches von Öffnungen durchsetzt ist und somit die Diffusion von Stoffen durch die Gefäßwand ermöglicht. Die Funktionen des Endothels sind vielfältig und unterscheiden sich je nach Gefäßabschnitt. Zu den wichtigsten physiologischen Funktionen zählen ^{7,10-12}:

Erstens, die Funktion der Diffusionsbarriere, d.h. Verhinderung des passiven Durchtritts von Makromolekülen des Plasmas in die subendotheliale Schicht durch Verschlusskontakte.

Zweitens, Regulation der Leukozytenadhäsion an das Endothel und Emigration dieser Zellen durch Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen und Selektinen.

Drittens, Regulation der Blutgerinnung (d.h. sowohl Förderung als auch Hemmung) durch Sekretion und Oberflächenexpression verschiedener Proteine, Gerinnungsfaktoren und Prostaglandinen. Beispiele dafür sind die Expression von Prostacyclin, das die Thrombozytenaggregation hemmt und die des von-Willebrand-Faktors (vWF), welcher die Thrombozytenaggregation fördert.

Viertens, Regulation der Gefäßweite, u.a. durch Sezernierung von gefäßerweiterndem (vasodilatativem) Stickstoffmonoxid (NO) und gefäßverengenden (vasokonstriktorisches) Stoffen wie dem Peptid Endothelin.

Fünftens, Synthese von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix.

Die breiteste Schicht der Arterienwand, die Media, besteht aus glatten Muskelzellen und Extrazellulärmatrix. Bei Arterien vom muskulären Typ besteht die Media hauptsächlich aus zirkulär oder in Spiralen angeordneten Muskelzellen, welche funktionell durch *gap junctions* miteinander gekoppelt sind. Die Media der Arterien vom elastischen Typ dagegen besteht aus konzentrisch angeordneten elastischen Lamellen und jeweils dazwischen gelagerten Schichten glatter Muskelzellen. Die Membrana elastica externa liegt als lamelläre Schicht der Media auf⁷.

Die Adventitia als letzte Wandschicht besteht vorwiegend aus Bindegewebe, welches Fibroblasten und verschiedene Fasern enthält, und verankert das Gefäß in der Umgebung. Außerdem verlaufen hier die Lymph-, Nerven und Blutgefäße der Gefäße (*vasa vasorum*), die an der Grenze zwischen der Media und der Adventitia ein Geflecht aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen bilden⁷.

1.2.2 Überblick über die arteriellen Gefäßkrankheiten

Arterielle Gefäßkrankheiten haben eine große epidemiologische Relevanz. So gehören der Myokardinfarkt als eine Manifestationsform der koronaren Herzerkrankung (s. Kapitel 1.4) und der ischämische Apoplex (s. Kapitel 1.5), der u.a. durch arteriosklerotische Veränderungen der hirnversorgenden Gefäße entstehen kann, in den westlichen Industrieländern zu den häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter¹³.

Pathogenetisch lassen sich die die arteriellen Gefäßkrankheiten in die Entitäten degenerative, entzündliche und funktionelle Gefäßkrankheiten differenzieren:

Den degenerativen Gefäßerkrankungen, der häufigsten Form, liegt meist eine Arteriosklerose zugrunde. Arteriosklerose bezeichnet dabei einen Sammelbegriff für degenerative Veränderungen der arteriellen Gefäßwand. Die wichtigste Form dabei ist die Atherosklerose, welche -ausgehend von der Intima- die größeren Arterien betrifft und sich beispielsweise in Form der koronaren Herzerkrankung (KHK) oder einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) manifestiert. Eine zweite Form der Arteriosklerose, die Mönckeberg- Mediasklerose, die mit Lipideinlagerungen und nachfolgender Kalzifizierung der Media einhergeht, kann als eigenständiges Krankheitsbild, aber auch parallel zur Atherosklerose bestehen ^{2,9}.

Zu den entzündlich bedingten Gefäßerkrankungen, die durch immunologische Prozesse ausgelöst werden, gehören z.B. die Vaskulitiden. Als funktionelle Gefäßkrankheiten bezeichnet man Störungen der Gefäßregulation, wobei das Gefäß selbst primär nicht geschädigt ist ⁹.

1.2.3 Risikofaktoren der Atherosklerose

Als Ursachen der Atherosklerose listet die WHO verschiedene Risikofaktoren auf. Aufgrund der Tatsache, dass die Atherosklerose eine multifaktorielle Erkrankung darstellt, unterscheidet man dabei Hauptrisikofaktoren und weitere Risikofaktoren ¹⁴:

Arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus bilden die Gruppe der Hauptrisikofaktoren. Alter und Geschlecht als nicht beeinflussbare Risikofaktoren zählen ebenfalls zu dieser Gruppe. Weitere Risikofaktoren umfassen Adipositas, Lipidstoffwechselstörungen, Hyperurikämie, körperliche Inaktivität, Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie, genetische Faktoren, etc ¹⁵. Die Beteiligung der Hauptrisikofaktoren an der Atherosklerose wird im Folgenden noch etwas näher erläutert.

Die arterielle Hypertonie wird in verschiedene Schweregrade eingeteilt, eine Hypertonie Grad 1 ist meist definiert ab Blutdruckwerten $\geq 140/90$ mmHg ². Amerikanische Fachgesellschaften haben die Bluthochdruck-Definition 2017 jedoch überarbeitet und definieren eine manifeste arterielle Hypertonie bereits ab systolischen Werten von 130-139 mmHg oder diastolischen Werten ab 80-89 mmHg¹⁶. Hypertonie führt zur Dysfunktion des Endothels und fördert so atherosklerotische Läsionen ¹⁰.

Hypercholesterinämie ist ein wesentlicher Risikofaktor der Atherosklerose¹⁷. Cholesterin wird im Blut mittels des Lipoproteins LDL transportiert. Diese Partikel enthalten neben hohen Konzentrationen an Cholesterinestern auch Triglyceride und werden von einer hydrophilen Hülle umgeben, welche Phospholipide, freies Cholesterin und Apolipoprotein B-100 enthalten⁶. LDL-Partikel können in der Intima akkumulieren durch die Apolipoprotein B-100-vermittelte Bindung an Proteoglykane der Extrazellulärmatrix der Intima. Dies stellt einen wichtigen initialen Schritt bei der Entstehung der Atherosklerose dar¹⁸. Als protektiver Faktor dagegen wird eine hohe Konzentration des Lipoproteins HDL im Blut angesehen. HDL-Cholesterin korreliert dabei im Blut invers mit dem Risiko kardiovaskulärer Ereignisse¹⁹. So zeigte eine Metaanalyse mehrerer prospektiver Studien 2009 die Bedeutsamkeit der HDL-Messung im Blut von Patienten bezüglich der Risikoeinschätzung für eine koronare Herzerkrankung²⁰. HDL erfüllt zwei wichtige Funktionen: Erstens werden überschüssige extrahepatische Cholesterinester durch das Lipoprotein HDL mithilfe seiner wichtigsten Komponenten, den Apolipoproteinen ApoA-1 und ApoE, an verschiedene Zielzellen wie z.B. Hepatozyten der Leber mittels Scavenger-Rezeptoren abgegeben²¹. Zweitens ist das HDL an der Modulation von inflammatorischen Prozessen beteiligt²².

Inhalativer Zigarettenrauch und besonders das darin enthaltene Nikotin stellt einen weiteren Hauptrisikofaktor dar. Nikotin initiiert vielfältige Atherosklerose-fördernde Mechanismen: So führt es zur Freisetzung von Katecholaminen, was einerseits zur Erhöhung von Herzfrequenz und Blutdruck führt. Andererseits bedingt es die Aggregation von Thrombozyten, welche ihrerseits die Plaquebildung (s. Kapitel 1.2.4) beschleunigen, sowie über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie platelet-derived growth factor (PDGF) die Proliferation von glatten Muskelzellen in den Gefäßen fördern²³. Darüber hinaus führt Nikotin zur Beschleunigung der Plaquebildung durch Neovaskularisation²⁴.

Bereits in epidemiologischen klinischen Studien wie der Framingham Studie wurde Diabetes mellitus als wichtiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert²⁵. Weitere Studien stellten eine positive Korrelation zwischen dem Blutzuckerlangzeitwert HbA1c und kardiovaskulären Ereignissen wie dem Myokardinfarkt fest, sowohl bei Diabetes mellitus Typ I, als auch Typ II^{26,27}. Chronische Hyperglykämie führt dabei zur nichtenzymatischen Glykierung von Proteinen zu sogenannten advanced glycation end-products (AGEs)²⁸. Das Endothel der Gefäßwand exprimiert Rezeptoren für AGEs (RAGEs). An diese binden AGEs, was wiederum zu inflammatorischen Prozessen im vaskulären System führen und damit zur Genese der Atherosklerose beitragen kann²⁹. AGEs können daneben auch an AGE-Rezeptoren von Makrophagen binden und so die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren.

Diese können wiederum den Transkriptionsfaktor NFκB aktivieren, infolgedessen es zu einer proinflammatorischen Genexpression für Moleküle (wie z.B. VCAM-1 und MCP-1) kommt, welche die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen ermöglichen³⁰⁻³². Daneben führt Hyperglykämie über den second messenger DAG zu einer Stimulation der Proteinkinase C (PKC) mit multiplen Folgen³⁰: so wird beispielsweise die endotheliale NO-Synthase gehemmt und das Peptidhormon Endothelin-1 verstärkt gebildet, was insgesamt vasokonstriktiv wirkt. Darüber hinaus wird die Endothelpermeabilität erhöht durch die Produktion vom Wachstumsfaktor VEGF in glatten Muskelzellen³³. Des Weiteren induziert Hyperglykämie über den PKC-Signalweg oxidativen Stress und führt zur Hochregulation von Cyclooxygenase 2 (COX-2), einer erhöhten Produktion des vasokonstriktorischen Thromboxans und zu einer verminderten Verfügbarkeit des vasodilatativen NO³⁴.

Der physiologische Alterungsprozess ist ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung der Atherosklerose. Mehrere klinische Studien konnten zeigen, dass die Endothel-abhängige Vasodilatation sukzessive mit dem Alter abnimmt³⁵. Dieses Phänomen tritt bei Männern früher auf als bei Frauen³⁶. Darüber hinaus steigt mit dem Alter die Prävalenz von arterieller Kalzifikation und erhöht so das kardiovaskuläre Risiko³⁷. Vaskuläre Kalzifikation führt zu einer verminderten Elastizität und erhöhten Steifigkeit der Gefäßwand, was hämodynamische Parameter des kardiovaskulären Systems beeinträchtigt. Das daraus resultierende Auftreten von arterieller Hypertonie, kardialer Hypertrophie, ischämischer Herzerkrankung oder pAVK steigert die Mortalität der über 60-jährigen Patienten signifikant³⁸.

1.2.4 Pathogenese der Atherosklerose

1977 postulierten Ross et al. die „response- to- injury“- Hypothese ³⁹. Dabei nahmen sie an, dass Atherosklerose eine Folge von arterieller Endotheldysfunktion und -läsionen sei, ein Mechanismus, den Rudolf Virchow bereits 1856 beschrieben hatte ⁴⁰. Diese Hypothese gilt als Ausgangspunkt zur Erklärung der Pathogenese der Atherosklerose, die man heutzutage als eine inflammatorische Erkrankung auf Grundlage verschiedener Risikofaktoren ansieht ⁴¹. Sie lässt sich mechanistisch in verschiedene Phasen einteilen (siehe auch Abb. 2).

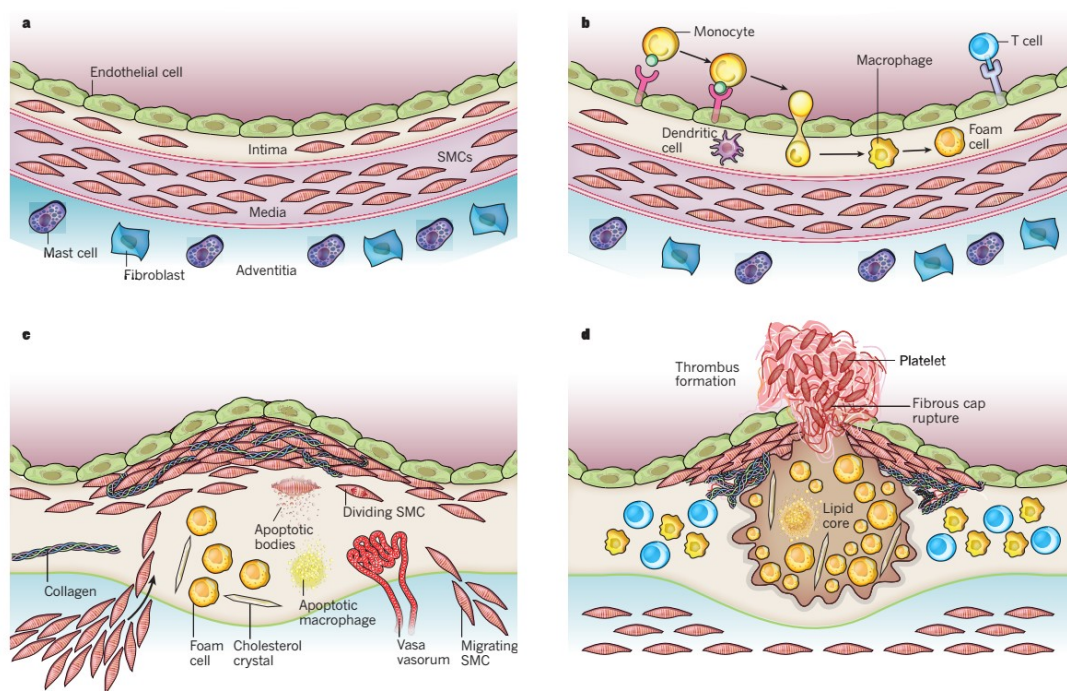


Abbildung 2: Entstehung und Ruptur einer atherosklerotischen Plaque (mit freundlicher Genehmigung von ⁴²)

(a) Die normale Gefäßwand besteht aus drei Schichten: der Intima mit dem Endothel, der Media mit glatten Muskelzellen (SMCs) und der Adventitia, die aus Bindegewebe und Zellen wie Fibroblasten oder Mastzellen enthält. Physiologischer Weise fungiert das Endothel als Barriere zwischen Extravasal- und Intravasalraum. Kommt es durch verschiedene Auslöser zur Endotheldysfunktion (b), wird die Endothelpermeabilität erhöht. Adhäsionsmoleküle führen darüber hinaus zum Andocken von Monozyten und T-Zellen an das Endothel und zur Einwanderung von Lipiden. Eingewanderte Monozyten in der Intima, die zu Makrophagen differenzieren, werden im Verlauf zu Schaumzellen (foam cells), die die oxidierten LDL-Partikel aufnehmen. Verschiedene Mechanismen führen zur Proliferation und Einwanderung von SMCs aus der Media in die Intima (c). Schaumzellen gehen durch Apoptose zugrunde. Im Verlauf bildet sich eine vulnerable lipidreiche Plaque (d), die an der sogenannten fibrösen Kappe rupturieren kann und über Freisetzung von thrombogenem Material zur Bildung eines Thrombus im Gefäß führt.

In der initialen Phase führen schädigende Faktoren (s. Kapitel 1.2.3) zu einer Endotheldysfunktion. Diese bedingt eine erhöhte Endothelpermeabilität und eine veränderte Genexpression, beispielsweise der NO-Synthase. Stickstoffmonoxid erfüllt physiologischer Weise eine vasodilatatorische Funktion und wirkt damit atheroprotektiv⁴³. Durch die erhöhte Endotheldurchlässigkeit gelangen LDL-Partikel aus dem Blut in die Intima. Hier kommt es zu Oxidationsprozessen und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dies führt schließlich zur Ablagerung von minimal oxidiertem LDL (Mo-LDL) in der Intima⁴⁴.

In der inflammatorischen Phase wird durch proinflammatorische Stimuli das Endothel aktiviert⁴³. Mo-LDL inhibieren die endotheliale NO-Synthese, gleichzeitig wird die endotheliale Expression von Zelladhäsionsmolekülen (wie z.B. VCAM-1 oder P-Selektin), chemotaktischen Proteinen wie MCP-1 und Wachstumsfaktoren gesteigert⁴⁴. Monozyten und T-Zellen docken über ihre Adhäsionsmoleküle am Endothel an. Eine sehr wichtige Rolle scheint dabei der CCR-2- Rezeptor der Monozyten zu spielen⁴⁵. Monozyten können das Endothel passieren und differenzieren in der Intima durch verschiedene Stimuli zu Makrophagen. MCP-1 spielt dabei wiederum eine entscheidende Rolle, tragen nicht nur die Makrophagen, sondern auch Endothelzellen und glatte Muskelzellen zu dessen Überexpression bei⁴³. Durch AGEs, die z.B. beim Diabetes mellitus entstehen (s. Kapitel 1.2.3), wird die Inflammation weiter verstärkt⁴⁴.

In der nächsten Phase entstehen durch ROS und andere Enzyme hoch oxidierte LDL⁴⁶, welche aggregieren und durch sogenannte Scavenger -Rezeptoren auf Makrophagen (u.a. SR-A, CD36) erkannt werden. Die Expression dieser Rezeptoren wird dabei von Zytokinen wie TNF- α und Interferon- γ vermittelt^{44,47}. Allerdings zeigte sich in Studien, dass die Deletion von SR-A und CD36 zwar zur Reduktion von atherosklerotischen Läsionen führt, die Bildung von Schaumzellen aber nicht unterbindet, weshalb weitere Mechanismen bei der Schaumzellbildung eine Rolle zu spielen scheinen⁴⁸. Durch verschiedene Mechanismen entstehen somit Schaumzellen, d.h. Makrophagen, die hohe Anteile an Cholesterinester enthalten. Gehen diese Schaumzellen durch Apoptose oder Nekrose zugrunde, führt dies zur Freisetzung von extrazellulären Lipiden und Debris in der Intima⁴⁴. Letztlich entstehen „fatty streak“- Läsionen, die auch makroskopisch sichtbar sind und vorwiegend aus T-Zellen und Schaumzellen bestehen⁴⁹.

Durch verschiedene Risikofaktoren, beispielsweise erhöhte Konzentrationen an Homocystein und Angiotensin II, werden unter anderem glatte Muskelzellen (smooth muscle cells) zur Proliferation und Migration in die Intima stimuliert^{50,51}. Dieser Effekt wird ebenfalls durch die Interaktion zwischen T-Zellen und Makrophagen durch nachfolgende Zytokinsynthese gefördert⁴⁴. Durch die Sezernierung extrazellulärer Matrix bilden die glatten Muskelzellen in der

Intima eine fibröse Plaque⁴⁹. Östrogene scheinen in dieser Phase über Steroidrezeptoren einen günstigen Effekt auf den Lipoproteinspiegel auszuüben und zudem zur Bildung von vasodilatatorischen Prostaglandinen und NO in den Endothelzellen zu führen, was insgesamt atheroprotektiv wirkt⁵². So und durch weitere pleiotrope Effekte des Östrogens erklärt man sich unter anderem, dass Frauen im Schnitt 10 bis 15 Jahre später als Männern kardiovaskuläre Erkrankungen entwickeln, sich aber das Risiko der Atherosklerose nach der Menopause vermutlich stark erhöht^{53,54}.

In der letzten Phase bildet sich schließlich eine komplexe Läsion. Dabei entstehen durch Matrixdegeneration vulnerable Plaques mit einer schmalen fibrösen Kappe. Die Degeneration wird einerseits vermittelt durch verschiedene Enzyme wie Kollagenasen, andererseits aber auch durch Inhibition der Matrixsekretion⁴⁴. So produzieren beispielsweise Makrophagen in den Plaques Matrix-Metalloproteinasen, zu denen auch die Kollagenasen gehören. Darüber hinaus führt die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Makrophagen zu einer weiteren Produktion von Kollagenasen durch die so stimulierten Makrophagen⁵⁵. Zusätzlich sekretieren aktivierte T_H1-Zellen das Zytokin Interferon- γ , das die Produktion von neuem interstitiellen Kollagen durch glatte Muskelzellen hemmt und so die fibröse Plaquekappe destabilisiert⁵⁶. Im Verlauf kommt es zur Verkalkung der Läsion in der Intima und Media und zur Bildung einer instabilen Plaque mit nekrotischem, atheromatösem Kern, der substantielle Mengen an Lipiden und glatte Muskelzellen enthält. Innerhalb dieser Plaque kommt es zusätzlich zu Neovaskularisationen, die wahrscheinlich durch Zytokine ausgelöst werden^{49,57}. An sogenannten Schulterregionen, die überwiegend von proinflammatorisch wirksamen T-Zellen und Mastzellen infiltriert sind, kann es zur Ruptur dieser Plaque kommen. Dadurch gelangt thrombogenes Material an die Endotheloberfläche. Dies kann nachfolgend zur Bildung eines Gerinnsels bis hin zum vollständigen Verschluss des Gefäßes führen⁴⁹ (s. Kapitel 1.3.4).

Neben diesen allgemeinen Mechanismen gibt es weitere auf zellulärer Ebene, die zur Atherosklerose beitragen können. Von diesen werden nachfolgend nur die wichtigsten skizziert.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass neutrophile Granulozyten ebenfalls eine Rolle in der Genese der Atherosklerose spielen^{58,59}. Hyperlipidämie führt zu einer Erhöhung von im Blut zirkulierenden Neutrophilen, die dabei z.B. CCL5- Rezeptoren nutzen, um in atherosklerotische Plaques zu gelangen⁶⁰. Oxidierte LDL scheinen zur Transmigration von Neutrophilen zu führen, die daraufhin ROS und verschiedene Peptide freisetzen, was wiederum zur Monozytenrekrutierung über die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen führt⁴⁹. Apoptotische Neutrophile erhalten darüber hinaus die Monozytenrekrutierung über

verschiedene Signale aufrecht ⁶¹. Weiterhin können Neutrophile über die Inaktivierung des TFPI und die Bildung von *neutrophil extracellular traps (NETs)* die Progression der Atherosklerose und das Thrombuswachstum verstärken ^{62,63}. NETs (s. Kapitel 1.6.2.2) können Signalwege der Makrophagen aktivieren, die ihrerseits proinflammatorische Zytokine freisetzen, die die Atherosklerose fördern. Darüber hinaus können NETs indirekt T_H17-Zellen stimulieren, welche die Rekrutierung von Immunzellen in atherosklerotischen Plaques verstärken ⁶⁴.

Thrombozyten haben ebenfalls eine wichtige Funktion in der Pathogenese der Atherosklerose. Thrombozyten binden bereits vor Entwicklung manifester atherosklerotischer Läsionen an das Endothel. Über diese Interaktion findet eine inflammatorische Genexpression mit nachfolgender Leukozyteneinwanderung in die atherosklerotische Plaque statt ⁶⁵.

Integrin $\alpha_2\beta_3$ vermittelte Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen führt zur Expressierung von P-Selektin auf den Thrombozyten, was u.a. die Freisetzung von Interleukin 1 β (IL-1 β) induziert ⁶⁶. IL-1 β wiederum fördert in den Endothelzellen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B ⁶⁷. Dies hat wiederum die Expression verschiedener inflammatorischer Gene wie ICAM-1 oder MCP-1 zur Folge und wirkt chemotaktisch auf Monozyten und Neutrophile ^{66,67}. An der Gefäßwand anheftende und aktivierte Thrombozyten interagieren darüber hinaus z.B. über das Adhäsionsmolekül P-Selektin mit PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand- 1) der Monozyten. So können sie die Sekretion von Chemokinen, Zytokinen und prokoagulatorischem tissue factor (TF) aus den Monozyten initiieren. Weiterhin führt diese Interaktion zu einer Hochregulierung und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und Proteasen und zu einer Induktion der Differenzierung zu Makrophagen ⁶⁶. Dadurch fördert das Zusammenspiel zwischen Thrombozyten und Monozyten ein Milieu an der Gefäßwand, welches die Plaqueformation unterstützt. Makrophagen produzieren in fortgeschrittenen Läsionen wiederum inflammatorische Mediatoren wie Proteasen, die typischerweise mit instabilen Plaques assoziiert sind ⁶⁸.

Neuere Forschungsergebnisse geben Hinweise darauf, dass auch die eosinophilen Granulozyten an der Pathogenese der Atherosklerose z.B. über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren beteiligt sind ⁶⁹. Die Anzahl an eosinophilen Granulozyten korreliert positiv mit dem Verkalkungsgrad in den Koronararterien ⁷⁰. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das eosinophile kationische Protein (ECP) als sensitiver Marker für Eosinophilenaktivierung ein Biomarker für die Atherosklerose in den Koronararterien ist. ECP ist assoziiert mit der Plaquegröße, aber nicht mit der Plaqueinstabilität ⁷¹.

1.3 Hämostase und arterielle Thrombose

1.3.1 Definition

Als Hämostase bezeichnet man den physiologischen Prozess der durch eine Verletzung der Gefäßwand hervorgerufenen Blutstillung, währenddessen der normale Blutfluss im sonstigen Gefäßsystem aufrechterhalten bleibt⁷². Der komplexe Ablauf der Hämostase erfordert dabei ein Zusammenspiel zwischen der Gefäßwand, den Thrombozyten und dem plasmatischen Gerinnungssystem.

Mechanistisch einteilen lässt sich die Blutstillung in die primäre und sekundäre Hämostase. Erstere umfasst dabei Vasokonstriktion und die Bildung eines Thrombozytenthrombus, letztere die Blutgerinnung durch Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade⁹.

1.3.2 Primäre Hämostase

Thrombozyten sind kernlose und etwa 1-4µm im Längsdurchmesser große Zellen, die durch Abschnürung des Zytoplasmas von Megakaryozyten des Knochenmarks gebildet werden. Der gesunde Erwachsene besitzt ca. $150-400 \times 10^9$ Thrombozyten pro Liter Blut. Ca. 5-11 Tage beträgt die Verweildauer der Thrombozyten im Blut, bis sie in der Leber, Lunge oder Milz abgebaut werden. Die Thrombozyten enthalten Granula und Lysosomen. Man unterscheidet elektronendichte Granula (enthalten u.a. Anionen und Kationen) und α -Granula (enthalten Plasmaproteine und Plättchen-spezifische Proteine)⁸. Bei der Thrombozytenaggregation und Blutgerinnung spielen sie eine zentrale Rolle. Eine wesentliche Funktion der Thrombozyten ist die Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität, wobei sie aber auch eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen und inflammatorischen Prozessen spielen, z.B. durch die Freisetzung bestimmter Zytokine, welche die Interaktion mit Leukozyten vermitteln^{73,74} (s. Kapitel 1.2.4).

Im gesunden Blutgefäß und bei normalem Blutfluss kommt es dabei normalerweise weder zur Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel, noch zur Aggregation. Das Endothel wirkt dabei thromboprotektiv, hauptsächlich durch NO, Prostazyklin und das Glykoprotein CD39⁷⁵⁻⁷⁷.

Kommt es zur Gefäßverletzung, werden vasokonstriktive Substanzen wie Thromboxan A₂, Serotonin oder Katecholamine durch das verletzte Gefäß freigesetzt. Gleichzeitig führt die vaskuläre Verletzung zur Freilegung von subendothelialen Matrixproteinen wie Kollagen, sowie zur Freisetzung von des Proteins von-Willebrand-Faktor (vWF) aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen^{8,78}.

Dadurch kommt es zur Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand und nachfolgend zur Aktivierung. Dies wird hauptsächlich über zwei Wege initiiert: einerseits über die Interaktion von Glykoprotein GPIb-V-IX der Thrombozyten mit dem vWF und GPVI mit freiliegendem Kollagen. Andererseits über tissue factor (TF), der über die Gerinnungskaskade (s. Kapitel 1.3.3) zur Bildung von Thrombin führt. Thrombin wiederum spaltet den Thrombozytenrezeptor PAR 1 und 4 auf den Thrombozyten, was zu deren Aktivierung u.a. durch die Freisetzung von ADP führt. Dieser Aktivierungsweg ist unabhängig von Kollagen^{75,79}. Daneben existieren weitere Rezeptoren auf den Thrombozyten, die bei der Aktivierung eine wichtige Rolle spielen, wie z.B. Integrin- $\alpha_2\beta_1$ mit seinem Liganden Kollagen, oder P2Y₁ und P2Y₁₂, deren Agonist ADP ist^{80,81}. Die aktivierten Thrombozyten verformen sich und bilden stachelartige Fortsätze, sogenannte Pseudopodien, aus. Unter ADP- Einwirkung kommt es zur reversiblen Aggregation, die durch Thrombin, Thromboxan A₂, Serotonin, Adrenalin und dem aus den Leukozyten stammenden Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) verstärkt wird. ADP und seine Agonisten verursachen eine Konformationsänderung von Rezeptoren wie GPIIb/IIIa, an welche Fibrinogen bindet und so die Thrombozyten untereinander verknüpft^{8,82}.

Letztlich kommt es zur GPVI-vermittelten Freisetzung von Inhaltsstoffen aus den Granula, die die Thrombozyten selbst aktivieren (ADP, parakrine Aktivierung von Thrombozyten) und die plasmatische Gerinnung, z.B. durch die Kalzium- abhängige Zelloberflächenexprimierung von Phospholipiden wie Phosphatidylserin, fördern^{83,84}. Schließlich aggregieren die Thrombozyten v.a. unter dem Einfluss von Thrombospondin-1, welches aus den α -Granula freigesetzt wird, irreversibel und bilden einen weißen Thrombus, der den Defekt provisorisch verschließt^{8,85}.

1.3.3 Sekundäre Hämostase

Als sekundäre Hämostase bezeichnet man die Blutgerinnung im engeren Sinne. Dabei werden proteolytische, in der Leber gebildete Blutgerinnungsfaktoren, die im Plasma in inaktiver Form vorliegen, kaskadenartig aktiviert und münden in der Bildung des Endprodukts Fibrin⁸. Die primäre und sekundäre Hämostase verlaufen simultan und beeinflussen sich gegenseitig⁷⁵.

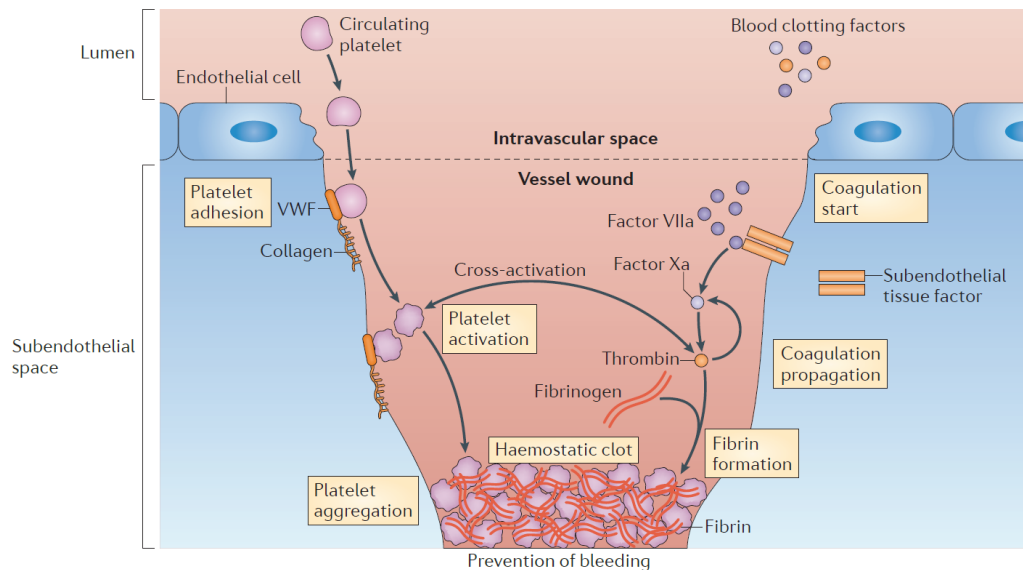


Abbildung 3: Grundlegende Prinzipien der Hämostase (mit freundlicher Genehmigung von⁴)

Die Blutgerinnung (Hämostase) ist vereinfacht ein Zusammenspiel zwischen Thrombozyten und dem plasmatischen Gerinnungssystem. Man unterscheidet mechanistisch die primäre und sekundäre Hämostase, die jedoch parallel ablaufen und sich gegenseitig beeinflussen. Durch einen Gefäßdefekt kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten an normalerweise durch das Endothel verdeckte subendotheliale Matrixproteine und infolgedessen zu deren Aktivierung und letztendlich zur Aggregation. Die Thrombozyten bilden einen weißen Thrombus, der den Defekt provisorisch verschließt. Gleichzeitig wird das plasmatische Gerinnungssystem über den subendothelialen tissue factor aktiviert. Die Gerinnungskaskade mündet schließlich in der Bildung von Fibrin, das den Defektverschluss stabilisiert.

Die beteiligten Gerinnungsfaktoren werden in der Nomenklatur mit römischen Ziffern bezeichnet, aktivierte Faktoren mit einem abgesetzten „a“ gekennzeichnet. Schematisch vereinfachend lassen sich beim Gerinnungssystem der intrinsische und extrinsische Weg unterscheiden, die in vivo jedoch Querverbindungen aufweisen und sich so gegenseitig aktivieren können. Das Gerinnungssystem ist ein sehr komplexes System und wird im Folgenden nur in seinen wichtigsten Grundzügen skizziert.

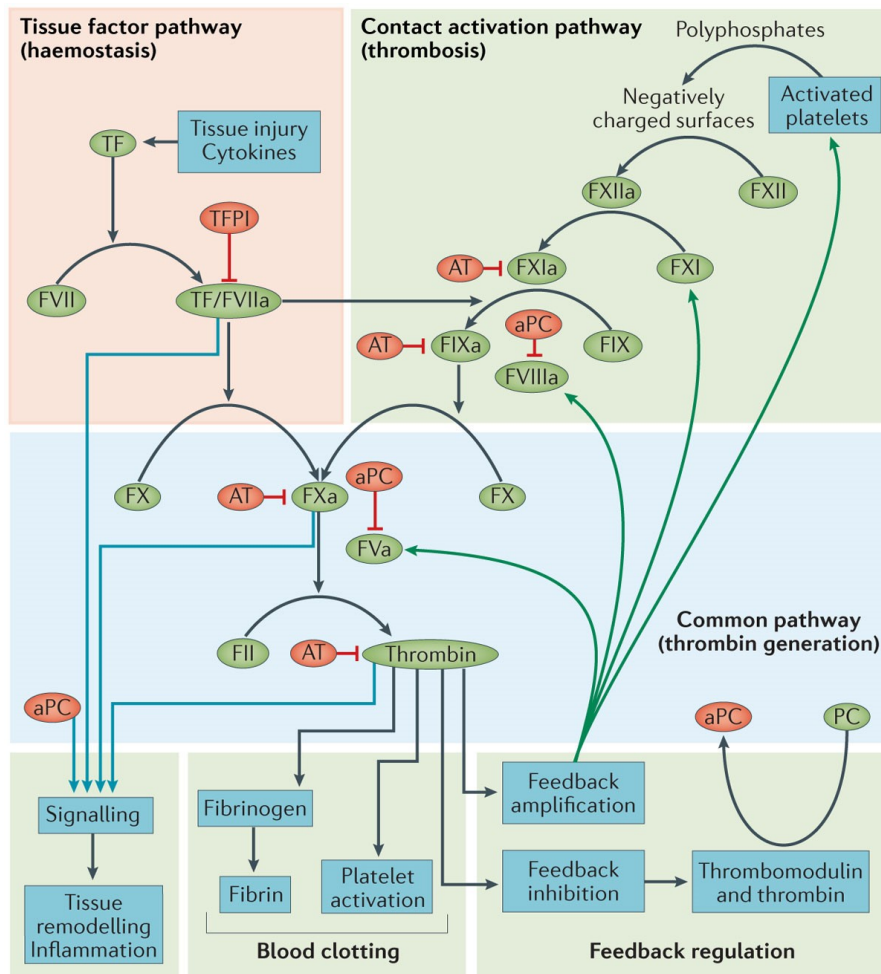


Abbildung 4: Das plasmatische Gerinnungssystem (nach mit freundlicher Genehmigung von ⁸⁶⁾)

Schematisch vereinfacht lässt sich das plasmatische Gerinnungssystem in einen extrinsischen und in einen intrinsischen Weg aufteilen, die in vivo jedoch eng verknüpft sind. Kommt es zur Gefäßverletzung, führt der sub-endotheliale tissue factor (TF) zu einer Aktivierung des extrinsischen Systems mit dem Faktor VII. Negativ geladene Oberflächen wie Kollagen aktivieren hingegen den Faktor XII. Durch kaskadenartige proteolytische Aktivierung der im Blut vorhandenen Gerinnungsfaktoren wird Thrombin aktiviert, das eine Vielzahl von Funktionen ausübt. Fibrin stellt dabei das Endprodukt der sekundären Hämostase dar, welches zur Bildung eines stabilen Gerinnsels beiträgt.

Kommt es zur Endothelläsion, bildet das nun zugängliche von glatten Muskelzellen und Fibroblasten exprimierte subendotheliale Membranprotein TF einen Komplex mit Phospholipiden. Dieser wird auch Gewebsthromboplastin genannt. Dieser Komplex bindet wiederum den Gerinnungsfaktor VII. Der so gebildete Gewebsthromboplastin/VII_a – Komplex aktiviert zusammen mit Ca²⁺-Ionen die Faktoren X und IX ^{8,72}. Dieser Weg wird als extrinsischer Gerinnungsweg bezeichnet.

Das intrinsische System wird aktiviert, indem Faktor XII mit negativ geladenen Oberflächen (z.B. Kollagen) interagiert. An der Aktivierung sind darüber hinaus hochmolekulares Kininogen und einige weitere proteolytische Enzyme beteiligt, wie z.B. Thrombin. Dies setzt eine kaskadenartige Aktivierung der Faktoren XI und IX in Gang, an dessen Ende ebenfalls die proteolytische Aktivierung von Faktor X steht ⁸.

Aktivierter Faktor X, Faktor V_a, Ca²⁺-Ionen und Phospholipide bilden den Prothrombinaktivator-Komplex, der aus Prothrombin (Faktor II) das enzymatisch aktive Thrombin abspalzt ⁷². Letzteres übt mehrere Funktionen aus: Einerseits wandelt es Fibrinogen zu Fibrinmonomeren um, die danach polymerisieren. Andererseits aktiviert Thrombin das Gerinnungssystem in einer positiven Rückkopplungsschleife selbst (Aktivierung von Faktor V, VIII, XI). Zusätzlich aktiviert Thrombin ebenfalls die Thrombozyten durch Spaltung des auf den Thrombozyten vorhandenen Protease-aktivierten Rezeptor (PAR) ⁸⁷.

Daneben gibt es weitere Faktoren, die die Blutgerinnung beeinflussen können. So wurde in Mausmodellen der Einfluss der Oxidoreduktase Proteindisulfid-Isomerase (PDI) untersucht ⁸⁸. Obwohl die genauen molekularen Mechanismen noch nicht ganz geklärt sind, konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von PDI aus aktivierten Thrombozyten, Endothelzellen oder geschädigten Gefäßzellen im Bereich einer Gefäßschädigung zur Aktivierung einer verschlüsselten Form des TF führen kann. Diese Form wird z.B. von Monozyten exprimiert und kann so zur Generierung von Fibrin beitragen ^{89,90}.

In intakten, gesunden Gefäßen ist die Gerinnungskaskade inaktiv. Zusätzlich existieren verschiedene antikoagulatorische Mechanismen. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das Vitamin-K-abhängige Proenzym Protein-C. Voraussetzung für dessen Aktivierung ist seine Bindung an das endotheliale transmembranöse Protein Thrombomodulin und den Endothelzell-Protein-C-Rezeptor (EPCR), sowie an die Serinprotease Thrombin (Faktor II_a). Aktiviertes Protein-C (APC) kann so die Faktoren V_a und VIII_a hemmen ⁹¹. Besonders wichtig ist ebenfalls die Serinprotease Antithrombin III. Diese schränkt die Wirkung der Faktoren II_a, IX_a, X_a, XI_a, XII_a ein, womit es die Bildung von Thrombin hemmt. Diesen Effekt macht man sich beispielsweise bei der pharmakologischen Antikoagulation zunutze durch die Gabe von Heparin, welches einen Komplex mit Antithrombin III bildet und dessen Wirkung um ein Vielfaches verstärkt ⁹². Darüber hinaus gibt es den TFPI (tissue factor pathway inhibitor), der direkt an den TF-Faktor-VIIa-Komplex bindet und ihn inhibiert ⁹³. Weitere Hemmfaktoren der Gerinnung sind α₂-Makroglobulin (hemmt u.a. Faktor II_a), α₁-Antitrypsin (u.a. Hemmung von Faktor II_a) und der C1-Inaktivator, der den Faktor XI_a, Faktor XII_a hemmt ⁸.

Um das Gerinnsel, das am Ende der sekundären Hämostase entsteht, wieder aufzulösen, muss die Fibrinolyse aktiviert werden. Dafür verantwortlich ist das Plasmaglobulin Plasminogen, welches zu Plasmin aktiviert wird durch verschiedene Aktivatoren aus dem Gewebe, Blut und Urin (Urokinase) und von körperfremden Mikroorganismen wie Streptokokken (Streptokinase). Plasmin besitzt eine große Affinität zu Fibrin und spaltet es letztlich zu löslichen Polypeptiden auf^{8,72}.

1.3.4 Arterielle Thrombose

Der akute peripher-arterielle Gefäßverschluss lässt sich einteilen in die arterielle Embolie (70-80%) und die arterielle Thrombose (20-30%)⁹.

Erstere umfasst die Ablösung eines Thrombus z.B. aus dem Herzen, sowie die Ablösung von Thromben oder atheromatösen Plaques aus arteriellen Aneurysmen. Eine seltene Ursache ist die paradoxe Embolie, d.h. der Verschluss eines arteriellen Gefäßes durch einen venösen Thrombus, der durch ein offenes foramen ovale des Herzens vom venösen ins arterielle System gelangt^{9,94}.

Zu ca. 90% entsteht die arterielle Thrombose dabei auf Grundlage von schweren arteriosklerotischen Wandveränderungen und entzündlichen Gefäßkrankheiten. Seltene Ursachen dieser Manifestationsform der Thrombose sind etwa thrombophile Blutgerinnungsstörungen wie z.B. das Antiphospholipidsyndrom⁹.

Arterielle Thrombose und Atherosklerose wurden früher traditionell für verschiedene Entitäten mit unterschiedlichen Pathomechanismen gehalten⁹⁵, da die Thrombose in erster Linie durch Thrombozyten und Fibrin vermittelt wird⁷⁵. Die Atherosklerose ist jedoch eine chronisch-inflammatorische Erkrankung und wird durch das Zusammenwirken von Leukozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Zellen der adaptiven Immunabwehr gefördert⁹⁶.

Es zeigte sich jedoch, dass die zellulären und biochemischen Mechanismen der Thrombose ebenfalls relevant für die Pathogenese der Atherosklerose sind⁹⁷. Dies ist erkennbar z.B. an der Rolle der Thrombozyten. Über eine Vielzahl von inflammatorischen Prozessen können Thrombozyten dazu beitragen, die atherosklerotische Läsionen zu initiieren und die Atherothrombose zu beschleunigen⁶⁶ (s. auch Kapitel 1.2.4). So spielen sie unter anderem eine Rolle bei der Genese der Endotheldysfunktion, aber auch bei der Plaqueruptur, z.B. über die Modulation der Angiogenese, die einen entscheidenden Faktor für die Plaquestabilität bildet⁹⁸.

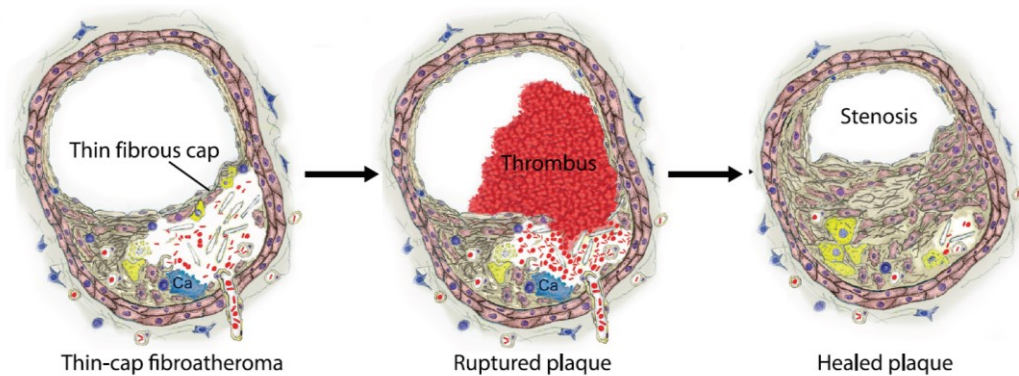


Abbildung 5: Plaqueruptur und Thrombose (mit freundlicher Genehmigung von ⁹⁹)

Die Schulterregion einer atherosklerotischen Läsion besteht aus einer dünnen fibrösen Kappe (linkes Bild). Diese kann rupturieren, wodurch thrombogenes Material mit dem Blut in Kontakt kommt. So kommt es zu einer Entstehung eines gefäßverschließenden Thrombus (mittleres Bild). Diese Stenose des Gefäßes kann vollständig oder unvollständig sein und unter Umbauprozessen ausheilen (rechtes Bild).

Die Ruptur der Plaque ist der häufigste Grund für die arterielle Thrombose. Dadurch gelangt thrombogenes Material, wie Kollagen oder Tissue factor (TF) in Kontakt mit dem Blut. Dies führt zur Aktivierung der Blutgerinnung und zur Stenosierung des Gefäßes durch die Bildung eines Thrombus. Thrombusmaterial kann sich dabei auch ablösen und in weiter entfernte Gefäßabschnitte embolisieren ⁹⁹.

1.4 Koronare Herzerkrankung

1.4.1 Definition

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist definiert als die Manifestation der Atherosklerose in den herzversorgenden Koronargefäßen. Kommt es in der Folge zu einer Verengung des Koronargefäßes, so wird dies als Koronarstenose bezeichnet. Ist diese Koronarstenose flusslimitierend, kommt es zur Koronarinsuffizienz, d.h. im Herzmuskel zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf ².

Die Koronarinsuffizienz ruft eine Myokardischämie, also eine Minderversorgung des Herzmuskels mit sauerstoffreichem Blut, hervor ⁹. Man unterscheidet die asymptomatische und die symptomatische KHK, zu der u.a. die stabile Angina pectoris und das akute Koronarsyndrom gehören. Das akute Koronarsyndrom wiederum unterteilt man in die instabile Angina pectoris, den akuten Myokardinfarkt und den plötzlichen Herztod ^{2,9}.

1.4.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Koronarinsuffizienz stellt das pathophysiologische Korrelat der KHK dar ⁹.

Die Abnahme der arteriellen Perfusion infolge einer Atherosklerose der Herzkranzgefäße ist dabei die Hauptursache der KHK. Daneben existieren weitere Ursachen der Koronarinsuffizienz wie Embolien, Koronarspasmen, autoimmune und infektiöse Entzündungen, Medikamente, etc ².

Die Stenosierung des Herzkranzgefäßes durch die Ruptur einer instabilen Plaque führt häufig zur Infarzierung im Stromgebiet des betroffenen Gefäßes. Die Wertigkeit der Koronarstenose ist dabei abhängig von Faktoren wie Querschnittsverminderung des Gefäßes, Länge der Stenose, Lokalisation, Anordnung der Plaques und Thrombenbildung ⁹.

Die Risikofaktoren für die KHK entsprechen weitestgehend denen der Atherosklerose in anderen Gefäßabschnitten ² (s. Kapitel 1.2.3). Neben Hypercholesterinämie, Rauchen, arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus, Alter und Geschlecht, gehören auch genetische Prädisposition, Adipositas, körperliche Inaktivität, psychosoziale Faktoren, obstruktive Schlafapnoe und Lipoprotein(a)-Erhöhung zu den Risikofaktoren ^{2,9,100}.

1.4.3 Akuter Myokardinfarkt

1.4.3.1 Definition

Als Myokardinfarkt bezeichnet man eine ischämische Myokardnekrose infolge einer hochgradigen Stenose einer Koronararterie ². Pathophysiologisch stellt die KHK mit Rupturierung einer vulnerablen Plaque und folgender Thrombosierung des betroffenen Herzkranzgefäßes die Hauptursache des akuten Myokardinfarkts dar ⁵⁷. In Abwesenheit einer KHK spielen Koronarspasmen, Embolien oder Dissektionen ätiologisch eine wichtige Rolle ¹⁰¹.

1.4.3.2 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik

Die klinische Symptomatik beim Myokardinfarkt kann sehr vielfältig sein. Zu den klassischen Infarktsymptomen gehören:

Intensive, anhaltende Angina pectoris, d.h. ein vorwiegend retrosternaler Schmerz, der z.B. in die linke Schulterregion ausstrahlen kann. Darüber hinaus können die Patienten Herzrhythmusstörungen, z.B. ventrikuläre Tachykardien, Kammerflimmern oder (höhergradige) AV-Blockierungen entwickeln. Zudem kann es zu Blutdruckabfall, Luftnot, Schwächegefühl, Angst und vegetativen Begleitsymptomen wie Schwitzen, Übelkeit, Erbrechen, etc. kommen ⁹.

Etwa 20- 40% der Myokardinfarkte gehen jedoch ohne Schmerzen einher ¹⁰². Diese sogenannten „stummen Infarkte“ können z.B. bei Patienten mit Diabetes mellitus infolge autonomer diabetischer Neuropathie auftreten ¹⁰³. 40% aller Myokardinfarktpatienten geben anamnestisch in der Vorgeschichte sogar gar keine Angina pectoris an, d.h. der Infarkt stellt die Erstmanifestation der KHK dar ².

Im Labor können ab ca. zwei Stunden nach Infarktbeginn bedingt durch die Myokardischämie die herzmuskelspezifischen Enzyme Troponin I und Troponin T nachgewiesen werden ^{9,104}. Hochsensitives Troponin (hsTn) ist dabei der entscheidende Biomarker zum Nachweis eines Myokardinfarkts ¹⁰⁵. Der negative prädiktive Wert des hsTn beträgt bei Aufnahme >95%, durch eine wiederholte Bestimmung nach 3 Stunden zur Detektion eines Myokardinfarkts nähert sich dessen Sensitivität der 100%-Marke. Als weitere Biomarker im Blut finden im Verlauf u.a. eine erhöhte Creatin-Kinase (CK) bzw. eine Erhöhung des herzmuskelspezifischen Isoenzym CK-MB, die jedoch eine geringere Sensitivität und Spezifität aufweisen als das Troponin ¹⁰⁶.

Zusätzlich spielt neben der klinischen Symptomatik und der serologischen Diagnostik das Elektrokardiogramm (EKG) eine entscheidende Rolle. Nach den initialen EKG-Veränderungen unterscheidet man beim Myokardinfarkt den NSTEMI (= Nicht-ST-Hebungsmyokardinfarkt) und STEMI (ST-Hebungsmyokardinfarkt). Wegweisend ist bei entsprechender Symptomatik ebenfalls ein neu aufgetretener Linksschenkelblock im EKG, der dann wie ein STEMI behandelt wird.

Ergänzend kann als bildgebendes Verfahren die Echokardiografie zur morphologischen und funktionellen Diagnostik, d.h. z.B. zur Beurteilung der Herzklappen und der Ventrikelwandbewegung, herangezogen werden ².

1.4.3.3 Therapie

Ziel der Therapie des Myokardinfarkts ist die Reperfusion, d.h. die Wiederherstellung des Blutflusses, des betroffenen Gefäßes. Dazu gehört ebenfalls die präventive Langzeittherapie zur Vorbeugung eines Reinfarktes². Im Folgenden werden die mechanische Rekanalisationstherapie und Grundzüge der medikamentösen Therapie im Überblick dargestellt.

Die perkutane Koronarintervention (PCI) bezeichnet die mechanische Rekanalisation eines stenosierten Herzkranzgefäßes mittels eines Linksherzkatheters über einen peripheren arteriellen Zugang^{2,107}. Ist im Falle eines NSTEMI die PCI indiziert, sollte diese innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden, da gezeigt werden konnte, dass ein Eingriff danach mit einer höheren Hospitalisierungsrate der Patienten assoziiert ist. Bei einem STEMI, bei dem meist das komplette Koronargefäß verschlossen ist, empfehlen europäische Richtlinien die unmittelbare PCI¹⁰⁸. Mehrere Studien konnten zeigen, dass durch die sofortige Reperfusion der Koronararterie die Größe des Infarkts und die Mortalität signifikant verringert werden konnte im Gegensatz zu Patienten, die erst verspätet therapiert wurden¹⁰⁹. Eine wichtige Rolle spielt dabei die *door-to-balloon-time*, d.h. die Zeit zwischen erstem medizinischem Kontakt des Patienten bis zur primären PCI. Diese sollte im Idealfall 90 Minuten oder weniger betragen, da diese Zeit mit einer verbesserten Morbidität und Mortalität korreliert¹⁰⁹⁻¹¹¹. Bei der PCI wird meist das Gefäß mit einem Ballon aufgedehnt und anschließend daran im betroffenen Gefäßabschnitt ein drug-eluting stent (DES) platziert, um das Gefäß langfristig offen zu halten und eine Restenose zu verhindern. Wurden früher noch unbeschichtete bare-metal stents (BMS) eingesetzt, empfiehlt die European Society of Cardiology seit 2014 den Einsatz von DES¹¹². DES sind mit proliferationshemmenden Substanzen beschichtete Stents⁹. Durch diese Entwicklung konnte das Auftreten von akuten Stentthrombosen deutlich verringert werden. Nichtsdestotrotz kann es zu seltenen, aber lebensgefährlichen Komplikationen wie der späten Stentthrombose (> 30 Tage nach Stentimplantation) kommen. Diese Gefahr ist bei BMS vergleichbar hoch wie bei DES der neueren Generation¹¹³. Begleitend zur PCI kann ebenfalls eine Aspiration des Thrombusmaterials, die Thrombektomie, durchgeführt werden. Jedoch konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass dieser routinemäßige Einsatz bei Patienten mit STEMI weder die Rate an Mortalität, Reinfarkten, kardiogenem Schock, noch Herzinsuffizienz verringert. Er ist im Gegenteil mit einer erhöhten Schlaganfallgefahr innerhalb der ersten 30 Tage assoziiert¹¹⁴.

Die medikamentöse Behandlung setzt bereits initial in der Prähospitalphase durch den Notarzt ein. Sie umfasst neben der Analgesie (Schmerzlinderung und Senkung des Sauerstoffbedarfs

im Herzen), Nitratgabe (Nachlastsenkung und Vasodilatation) und ggf. Sauerstoffgabe die antikoagulatorische bzw. antithrombozytäre Therapie. In der Hospitalphase kommt zusätzlich die fibrinolytische Therapie, sowie die Therapie von Komplikationen und weiteren Begleiterkrankungen hinzu ^{2,9}.

Eine wichtige Rolle spielt die Antikoagulation, um das Risiko einer weiteren Thrombusentstehung zu limitieren ⁹. Das Polysaccharid Heparin spielt dabei eine zentrale Rolle. Die Interaktion von Heparin mit dem Proteaseinhibitor Antithrombin, welche u.a. zur Hemmung von Thrombin und Faktor X_a führt, macht man sich therapeutisch zur Antikoagulation zunutze ⁹². Zum Einsatz kommen unfraktioniertes Heparin (UFH), niedermolekulare Heparine (NMH) und das Heparin-Analogon Fondaparinux, die sich in ihrer chemischen Struktur und (Neben-) Wirkungen unterscheiden. So hemmen beispielsweise NMH und Fondaparinux Faktor X_a selektiver als UFH ¹¹⁵. Thrombin hemmen sie im Gegensatz dazu weniger bzw. gar nicht, wodurch sie klinisch besser steuerbar sind und das Blutungsrisiko minimieren ^{92,115}. Studien konnten zeigen, dass der Einsatz von NMH verglichen mit UFH mit einer Reduktion der Mortalität und Blutungsraten assoziiert ist bei Patienten mit STEMI, bei denen eine PCI durchgeführt wurde ¹¹⁶.

Gibt es keine Kontraindikationen und keine Möglichkeit einer primären PCI, empfehlen die Leitlinien in der Prähospitalphase so schnell wie möglich eine Fibrinolysetherapie innerhalb eines bestimmten Zeitfensters ¹⁰⁸. Der Einsatz von Fibrinolytika im Rahmen einer längeren Transportdauer vor einer PCI verschlechtert das klinische Outcome der Patienten mit Myokardinfarkt nicht ¹¹⁷. Dies gilt jedoch nur für Patienten mit STEMI, da Studien zeigen konnten, dass bei der Fibrinolyse von Patienten mit NSTEMI die Risiken die Vorteile überwiegen ¹⁰⁷. Zum Einsatz kommen Fibrinolytika. Dies sind Plasminogenaktivatoren wie Streptokinase, wobei dessen neuere Abkömmlinge eine höhere Fibrinaffinität aufweisen und es so durch hohe lokale Effektivität am Thrombus zu weniger systemischen Effekten kommt ¹¹⁸.

Daneben spielt die duale antithrombozytäre Therapie initial und in der Sekundärprophylaxe eine entscheidende Rolle. Sie umfasst die kombinierte Gabe von Acetylsalicylsäure (ASS) und – je nach Indikation- einem P2Y₁₂- Inhibitor (Ticagrelor, Prasugrel, Clopidogrel) ². ASS ist ein irreversibler Cyclooxygenase-Hemmer. Dadurch kommt es zur Hemmung der thrombozytären Thromboxan A₂ – Synthese. Zusammen mit den ADP-Rezeptorantagonisten wird so Thrombozytenaggregation gehemmt ^{8,9}. Durch die duale antithrombozytäre Therapie lässt sich innerhalb des ersten Jahres die Mortalität nach Infarkt um etwa 15% senken und das Reinfarktisiko um ca. 30% ².

1.5 Ischämischer Apoplex

1.5.1 Allgemeine Definition des Apoplex

Als Apoplex bezeichnet man eine akute Durchblutungsstörung gehirnversorgender Gefäße, infolgedessen die betroffenen Nervenzellen durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel absterben ¹¹⁹. Man unterscheidet dabei den hämorrhagischen und den ischämischen Apoplex.

Hauptursache des hämorrhagischen Apoplex ist eine hypertensive Gefäßerkrankung, die zu Aneurysmenbildung in kleineren Gefäßen im Gehirn und schließlich zur Rupturierung dieser führt ¹²⁰.

Etwa 80% der Schlaganfälle sind dagegen ischämisch bedingt ¹²⁰. Der hämorrhagische Apoplex ist insbesondere initial im Vergleich zum ischämischen Apoplex mit einem schlechteren klinischen Outcome der Patienten und mit einer höheren Mortalität assoziiert, wobei sich diese im Verlauf nach etwa drei Monaten nach dem Apoplex angleicht ¹²¹.

1.5.2 Ätiologie und Pathogenese

Da für diese Studie nur der ischämische Apoplex untersucht wurde und zwar Thrombusmaterial, welches sich der Kategorie TOAST 1, 2, und 5 zuordnen ließ (s. Kapitel 3.1.3), eingeschlossen wurde, wird hier nur auf die Ätiologie und Pathogenese dieser drei Subgruppen eingegangen.

Der ischämische Schlaganfall lässt sich ätiologisch anhand der TOAST-Klassifikation verschiedenen Subgruppen zuordnen. Man unterscheidet dabei ätiologisch folgende Gruppen: Makroangiopathie (TOAST 1), Kardioembolie (TOAST 2), Mikroangiopathie (TOAST 3), andere Ätiologie (TOAST 4, umfasst z.B. Vaskulitis oder Dissektion), unklare Ätiologie (TOAST 5). Die Einteilung anhand der TOAST-Klassifikation erfolgt dabei anhand der wahrscheinlichsten pathophysiologischen Ursache, basierend auf dem klinischen Erscheinungsbild und apparativen Untersuchungsergebnissen wie z.B. der Computertomographie, Echokardiographie, extrakraniellen Duplexsonographie oder Serologie ¹²².

Zu den wichtigsten Risikofaktoren des Apoplex gehören: Arterielle Hypertonie, Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus, Stress, Alkohol, Dyslipidämie. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die arterielle Hypertonie dabei der wichtigste Risikofaktor für alle Subtypen des Apoplex ist ^{123,124}.

Ursache der des makroangiopathisch bedingten Apoplex (TOAST 1) ist die atherosklerotische Läsion eines Gefäßes mit anschließender Ruptur der Plaquesoberfläche, lokaler Thrombusbildung und möglicher konsekutiver peripherer Embolie, was die Ursache für ca. 10-15% der ischämischen Apoplexe ist ^{125,126}.

Etwa 20-30% der ischämischen Apoplexe sind kardioembolischen Ursprungs (TOAST 2), welche überproportional zu neurologischen Beeinträchtigungen führen, da sie meist größere intrakranielle Arterien verschließen ^{127,128}. Hauptursache ist dabei die Herzrhythmusstörung Vorhofflimmern. Die Mechanismen, welche dabei zur Thrombusentstehung führen, sind komplex. Es konnte aber gezeigt werden, dass alle Kriterien der „Virchow- Trias“ zur Entstehung eines Thrombus bei Vorhofflimmern erfüllt werden. So kommt es erstens durch abnormen Blutfluss zur Stase insbesondere im linken Vorhof, zweitens zu strukturellen Veränderungen in der Gefäßwand und schließlich auch zur Veränderung der Blutzusammensetzung durch Aktivierung von Thrombozyten, der Gerinnungskaskade und inflammatorischen Signalen ¹²⁹. Andere Gründe für die Kardioembolie umfassen den akuten Myokardinfarkt, Thromben aus den Ventrikeln, kardiale Tumore oder Herzklappenerkrankungen ¹²⁸.

In 20-40 % der Fälle lässt sich der ischämische Apoplex nach den klinischen Routineuntersuchungen keiner Ätiologie zuordnen und wird als kryptogen (TOAST 5) bezeichnet ¹³⁰. Neben den bereits oben genannten Ursachen spielen bei kryptogenen Schlaganfällen paroxysmales Vorhofflimmern, dilatative Kardiomyopathie und auch ein offenes foramen ovale eine Rolle, wodurch es zu paradoxen Embolien venöser Thromben aus dem rechten Herzen ins linke und damit in das arterielle Gefäßsystem kommen kann ¹³¹.

1.5.3 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik

Allgemein bestimmt die Lokalisation des Gefäßverschlusses die Symptomatik beim Apoplex. Leitsymptome des Apoplex sind motorische und sensible Halbseitensymptome, Sprachstörungen und Gesichtsfeldausfälle. Es kann begleitend dazu zu vegetativen Symptomen, Atem-, Kreislauf- und Bewusstseinsstörungen kommen.

Für die Diagnose eines Schlaganfalls spielen die Anamnese, klinische Untersuchung und apparative Diagnostik eine entscheidende Rolle. Neben Erfassung von Vitalparametern und Ausschluss einer kardialen Ursache ist dabei die bildgebende Differenzierung zwischen hämorrhagischem und ischämischen Apoplex essenziell, die möglichst zeit- und informationseffektiv ablaufen sollte ².

Bei der Diagnostik des Apoplex spielt die kraniale Computertomografie (cCT) eine entscheidende Rolle. Die entscheidende Bedeutung der nativen cCT liegt im Ausschluss bzw. der Detektion intrakranieller Blutungen und Infarktfrühzeichen. Somit ermöglicht sie die Indikationsstellung zur intravenösen Thrombolyse¹³². Die typischen Infarktfrühzeichen des ischämischen Apoplex zeigen sich wenige Stunden nach Symptombeginn. Sie umfassen unter anderem: Hypodensität im Parenchym, verstrichene Sulci, verminderte Abgrenzbarkeit der Basalganglien und des kortikalen Bandes und das hyperdense Mediazeichen^{133,134}. Die CT-Angiografie (CT-A), mit deren Hilfe Gefäße dargestellt werden können, dient dem Nachweis eines Gefäßverschlusses und damit der Indikation für eine Thrombektomie¹³⁵. Weitere Diagnostik bietet die CT-Perfusion (CT-P), d.h. eine funktionelle Diagnostik, welche mithilfe von Kontrastmittel Dichteänderungen im Hirngewebe in zeitlicher und örtlicher Auflösung detektiert. Sie dient dem Nachweis der sogenannten Penumbra, also der Infarkttrandzone mit grenzwertig versorgtem Hirngewebe, das durch eine Lysetherapie noch gerettet werden kann¹³⁶.

Die Magnetresonanztomografie (MRT) bietet bei der akuten zerebralen Ischämie eine umfassende Information über den Gewebezustand und die Gefäßsituation. Zwar kann die MRT mit vergleichbarer Sensitivität intrakranielle Blutungen nachweisen, im klinischen Alltag ist die cCT jedoch dazu meist ausreichend und hat Vorteile wie die Schnelligkeit der Bildgebung, die nahezu ubiquitäre Verfügbarkeit in der Notfalldiagnostik, und der besseren Überwachung instabiler Patienten. Darüber hinaus gibt es Kontraindikationen für die Durchführung einer MRT aufgrund ferromagnetischer Wechselwirkungen, beispielsweise bei Patienten mit manchen Herzschrittmachertypen oder Defibrillatoren¹³⁷.

Andere diagnostische Maßnahmen umfassen bildgebende Diagnostik der extra- und intrakraniellen Gefäße mittels Duplex-Sonografie oder der transkraniellen Farbduplexsonografie. Daneben können ergänzend auch bestimmte Biomarker im Blut in der Diagnostik des akuten Apoplex eine Rolle spielen, wie kürzlich gezeigt wurde^{138,139}.

1.5.4 Therapie

Zur Revaskularisierungstherapie des ischämischen Apoplex gehören die Lysetherapie und die mechanische Thrombektomie. Die intravenöse Lysetherapie mit dem rekombinanten Plasminogenaktivator rtPA wurde 1995 im Zuge der Ergebnisse der NINDS- und der ECASS- Studien im klinischen Alltag implementiert und gilt als erste kausale Therapie des ischämischen Apoplex. In diesen Studien zeigte sich, dass der Einsatz von rtPA bei ausgewählten Patienten mit

akutem Apoplex zu einem verbesserten klinischen Outcome, allerdings ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg von intrazerebralen Hämorrhagien führte^{140,141}. Die endovaskuläre Therapie des ischämischen Apoplex begann mit der lokalen Applikation fibrinolytischer Substanzen an bzw. in den Thrombus¹⁴². Diese Therapieform erzielte einen deutlichen Anstieg Rekanalisationsraten¹⁴³. Parallel dazu entwickelte sich die mechanische Thrombektomie. Mehrere Studien zeigten beim Vergleich dieser Therapieform mit der vorherigen Standardtherapie der alleinigen i.v.- Lyse eine signifikante Überlegenheit¹⁴⁴. Diese Ergebnisse führten zur Aufnahme der mechanischen Thrombektomie in europäische und amerikanische Leitlinien^{145,146}.

Laut der aktuellen Leitlinie der deutschen Gesellschaft der Neurologie zur medikamentösen Thrombolyse- und mechanischen Rekanalisationstherapie wird folgendes Vorgehen empfohlen:

Die intravenöse Behandlung mit dem rekombinanten Plasminogenaktivator rt-PA sollte innerhalb eines 4,5-Stunden-Fensters ohne obere Altersgrenze erfolgen. Bei selektierten Patienten kann sie auch zwischen 4,5 und 6 Stunden nach Beginn der Symptome als individueller Heilversuch zur Anwendung kommen, wobei weitere Bildgebungen herangezogen werden sollten. Dabei ist der Vorteil der rt-PA-Therapie zeitabhängig und sollte so früh wie möglich begonnen werden. Es gilt Kontraindikationen und mögliche Komplikationen wie ein gesteigertes Blutungsrisiko zu beachten¹⁴⁶.

Bei Patienten mit klinisch relevantem neurologischem Defizit und großem arteriellen Gefäßverschluss im vorderen Kreislauf ist die mechanische Thrombektomie bis zu 6 Stunden (Zeitpunkt der Leistenpunktion) nach Symptombeginn empfohlen. Bei fehlenden Kontraindikationen sollen die Patienten im 4,5-Stunden-Zeitfenster zusätzlich systemisch mit rtPA behandelt werden¹⁴⁶.

Die frühe Rekanalisation bei ischämischem Schlaganfall korreliert dabei mit dem funktionellen Outcome der Patienten und der Mortalität. Studien konnten zeigen, dass die Rekanalisationsrate bei alleiniger intravenöser Therapie mit rt-PA lediglich weniger als 50% beträgt, bei kombinierter intravenös-arterielle Therapie schon etwa 2/3 und die mechanische Thrombektomie Rekanalisationsraten von über 80% erreicht¹⁴⁷. Kürzlich konnte in einer Metaanalyse gezeigt werden, dass die kombinierte Therapie von Thrombektomie innerhalb von sechs bis acht Stunden zusätzlich nach der intravenösen rt-PA- Gabe hinsichtlich funktionellem Outcome zu den besten Therapieoptionen im Stromgebiet der Arteria carotis interna gehört¹⁴⁸. Rückführbare Stents (Stent-Retriever) zeigen dabei im Vergleich zu anderen Systemen Rekanalisationsraten bis zu >90%².

1.6 Immunothrombose

1.6.1 Allgemeine Prinzipien

Unter bestimmten Bedingungen kann die Thrombose physiologisch eine wichtige Rolle in der Immunabwehr einnehmen. Dieser Mechanismus wird unter dem Terminus *Immunothrombose* zusammengefasst. Einen wesentlichen Anteil haben daran Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten und bestimmte Thrombose-spezifische Moleküle wie z.B. Mikropartikel. Kommt es zur Dysregulation, können Immunzellen aktiv an der Entstehung der venösen, aber auch der arteriellen Thrombose partizipieren ⁴ (s. auch Abb.6).

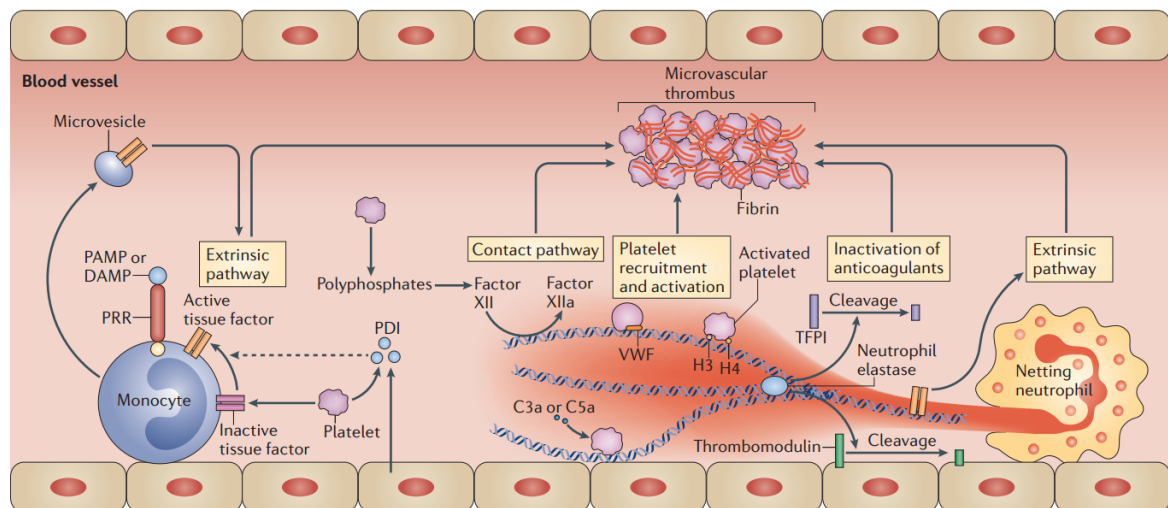


Abbildung 6: Grundlegende Mechanismen der Immunothrombose (mit freundlicher Genehmigung von ⁴)

Durch unterschiedliche Mechanismen können Zellen des angeborenen Immunsystems zur Thrombose innerhalb der Gefäße beitragen. Die beiden wichtigsten Zellenarten in diesem Zusammenhang sind die Monozyten und die neutrophilen Granulozyten. U.a. durch Interaktion mit Thrombozyten sind Monozyten dabei in der Lage, den extrinsischen Gerinnungsweg zu aktivieren. Neutrophile Granulozyten können über die Bildung von extrazellulären *neutrophil extracellular traps (NETs)*, die auf verschiedene Arten gerinnungsfördernd wirken, ebenfalls zur Bildung von intravaskulären Thromben beitragen.

In der arteriellen Thrombose kommt es zur Rekrutierung von Leukozyten durch aktivierte Thrombozyten, die verschiedene Rezeptoren wie P-Selektin exprimieren und unterschiedliche Chemokine freisetzen ^{75,149,150}. Die Interaktion von CD154 von aktivierten Thrombozyten mit CD40 des Endothels führt darüber hinaus zu Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und ICAM-1 und Freisetzung von Chemokinen wie CCL2, was zur weiteren Leukozytenrekrutierung führt ¹⁴⁹.

Über P-Selektin, das von Endothelzellen und aktivierten Thrombozyten exprimiert wird, werden Monozyten und neutrophile Granulozyten rekrutiert¹⁵⁰, die auf verschiedene Weise zur Thrombusentstehung beitragen können (s. Kapitel 1.6.2).

1.6.2 Rolle der Monozyten und neutrophilen Granulozyten

1.6.2.1 Monozyten

Monozyten sind zirkulierende Leukozyten im Blut, die eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr spielen. Sie machen etwa 2-10% der Blutleukozyten aus und wandern nach etwa 2-3 Tagen in das umliegende Gewebe ein. Dort differenzieren sie sich zu Makrophagen und z.T. zu antigenpräsentierenden dendritischen Zellen⁸. Interessanterweise stammen jedoch nicht alle Makrophagen von den Monozyten des Blutes ab, wie man lange Zeit annahm. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Ursprünge der Gewebsmakrophagen im Dottersack, einem embryonalen Gewebe, liegen, von dem aus Vorläuferzellen die verschiedenen Gewebe besiedeln und sich dort vermehren. Erst bei größerem Bedarf, bei Entzündungen oder Verlust, scheinen Monozyten aus dem Blut für den Nachschub an Gewebsmakrophagen zu sorgen^{151,152}.

Nach aktuellem Forschungsstand gibt es mindestens drei große Fraktionen der Monozyten¹⁵³. Diese können unterteilt werden nach der Expression von CD14, der zum Lipopolysaccharid-Rezeptor gehört und dem Fc-Rezeptor CD16. Die größte Gruppe der Monozyten (bis zu 85%) ist die klassische CD14⁺⁺/CD16⁻-Gruppe, d.h. sie exprimieren kein CD16. Dafür exprimieren sie aber CCR2, ein Rezeptor für MCP-1, womit die Adhäsion an Endothelzellen vermittelt wird. Klassische Monozyten können zu inflammatorischen TNF- α produzierenden Makrophagen differenzieren^{31,153,154}. Monozyten, die CD16 exprimieren, lassen sich in die intermediäre CD14⁺⁺/CD16⁺-Gruppe und die nicht-klassische CD14⁺/CD16⁺⁺-Gruppe unterteilen¹⁵⁵. Diese beiden Subgruppen exprimieren u.a. einen höheren Anteil des Fraktalkin-Rezeptors CX3CR1. Nicht-klassische Monozyten üben dabei eine patrouillierende Funktion im Gefäßsystem aus und können Zelldebris beseitigen. Intermediären Monozyten wird dagegen keine patrouillierende, sondern eine proinflammatorische Funktion zugeschrieben¹⁵⁶. Außerdem konnte gezeigt werden, dass insbesondere intermediäre Monozyten im akuten Myokardinfarkt mit Thrombozyten Aggregate bilden und diese möglicherweise eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts spielen¹⁵⁷.

Monozyten können auf verschiedene Arten an der *Immunothrombose* beteiligt sein. Beispielsweise können sie über verschiedene Rezeptoren (CD14 und TLRs) sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) wie mikrobielle Lipopolysaccharide (LPS) erkennen. Dies führt u.a. zur vermehrten Gentranskription von tissue factor¹⁵⁸. Damage-associated molecular patterns (DAMPs), die von geschädigten Zellen exprimiert oder freigesetzt werden, können ebenfalls zu einer Expressierung von aktiviertem TF auf den Monozyten führen¹⁵⁹. PAMPs und DAMPs führen somit über die Monozyten letztlich zur Aktivierung des extrinsischen Gerinnungswegs, wie Abbildung 6 zeigt.

Aktivierte Monozyten können darüber hinaus Vesikel aus Membranfragmenten bilden, sogenannte Mikropartikel, welche tissue factor exprimieren und so ebenfalls zur Aktivierung des extrinsischen Gerinnungswegs beitragen¹⁶⁰.

1.6.2.2 Neutrophile Granulozyten und neutrophil extracellular traps (NETs)

Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten spielen eine wesentliche Rolle in der akuten Inflammation und angeborenen unspezifischen Immunabwehr. Sie machen ca. 50-70% der zirkulierenden Leukozyten aus. Sie enthalten verschiedene Granula mit proinflammatorischen Proteinen und antimikrobiellen Abwehrstoffen. Typischerweise sind sie die erste Zellgruppe, die bei akuten Entzündungen rekrutiert werden und infolgedessen deren Anzahl im Blut rasch zunimmt^{8,161}. Neutrophile Granulozyten sind über intra- und extrazelluläre Mechanismen in der Lage, Krankheitserreger zu eliminieren. Einerseits können sie Mikroorganismen phagozytieren und mittels reaktiven Sauerstoffspezies und antibakteriellen Proteinen wie Kathepsinen, Defensinen, Laktoferrin oder Lysozym abtöten¹⁶². Andererseits können neutrophile Granulozyten antibakterielle Proteine auch nach extrazellulär freigegeben. Ein besonderer Mechanismus ist die Fähigkeit von aktivierten neutrophilen Granulozyten *neutrophil extracellular traps* (NETs) zu bilden, deren Charakteristika und antimikrobielle Funktion von Brinkmann et. al wie folgt beschrieben wurden: NETs sind Matrizen aus extrazellulärer DNA, Histonen und Granula-Proteinen, die Gram-positive und Gram-negative Bakterien binden und degradieren können. Durch ihre Form sind NETs in der Lage, Bakterien einzufangen und so ihre systemische Ausbreitung zu unterbinden¹⁶³. Aktiviert zur NET-Bildung werden neutrophile Granulozyten über direkte Stimulation durch Mikroorganismen oder indirekt über LPS, die an Toll-like-Rezeptoren (TLR4) von Thrombozyten binden, welche wiederum Neutrophile zur NET-Bildung, z.B. im Rahmen von Erkrankungen wie der Sepsis anregen können^{63,164,165}.

Allgemein befindet sich der Großteil der DNA der Neutrophilen als inaktives Heterochromatin im Zellkern, wobei die DNA um Histone gewickelt ist und so Nukleosomen formt. Die Bildung von NETs hängt vom Enzym Peptidyl-Arginin-Deiminase Typ 4 (PAD4) ab, welches die Umwandlung von Histon H3-Arginin zu Citrullin (CitH3) katalysiert, was die Histon-DNA-Bindung schwächt und letztlich die Nukleosomen aufwickelt¹⁶⁶. CitH3 ist dadurch ein spezifischer Marker für NETs, der z.B. bei Patienten mit ischämischen Schlaganfall im Plasma erhöht nachweisbar ist¹⁶⁷. Parallel dazu beginnen die Zellkernmembran und Granula der Neutrophilen zu zerfallen, wodurch Proteine wie die Myeloperoxidase in Kontakt mit Chromatin des Zellkerns kommen. Myeloperoxidase ist dabei ein Hauptauslöser für die Bildung von NETs zusätzlich zu PAD4⁵. Eine zentrale Rolle in der NET-Regulation spielt intrazelluläres Calcium als second messenger für die Aktivierung der Neutrophilen. PAD4 selbst wird durch Calcium aktiviert¹⁶⁸. Neutrophile Elastase ist ebenfalls wichtig für die NET-Bildung, da es zur Spaltung der Histone während der NET-Bildung beiträgt^{168,169}.

Eine Besonderheit der NETs besteht darin, dass sie darüber hinaus aktiv an der Thromboseentstehung beteiligt sein können, sowohl in der venösen, als auch in der arteriellen Thrombose^{62,170} (s. auch Abb. 6).

So können NETs erstens den Faktor XII direkt und damit den intrinsischen Gerinnungsweg aktivieren. Zweitens binden sie vWF und aktivieren so Thrombozyten. Drittens können die Histone H3 und H4 ebenfalls Thrombozyten aktivieren. Darüber hinaus inaktivieren NETs den TFPI über Granulaenzyme wie Neutrophile Elastase (NE) oder Myeloperoxidase (MPO) und können schließlich auch tissue factor binden, wodurch sie Einfluss auf den extrinsischen Gerinnungsweg haben^{62,171}. Neutrophile Elastase kann darüber hinaus natürliche Antikoagulantien wie Thrombomodulin spalten und so inaktivieren, was einen weiteren Mechanismus der NETs zur Thrombusentstehung erklären könnte¹⁷².

NETs spielen beispielsweise beim STEMI eine zentrale Rolle. Bei diesen Patienten kommt es im Bereich des Gefäßverschlusses zu einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten mit anschließender signifikant erhöhten NET-Bildung. NETs wiederum korrelieren positiv mit der Infarktgröße¹⁷³.

Neueste Forschungsergebnisse zeigen darüber hinaus, dass NETs auch durch die Interaktion mit Thrombozyten freigesetzt werden, nicht nur im Rahmen von Erkrankungen wie der Sepsis^{174,175}. Auch eine Aktivierung von Thrombozyten durch klassische Agonisten wie

Thrombin, ADP oder Kollagen kann zur NET-Bildung führen. Dies zeigt eine Verbindung zwischen der *Immunothrombose* und der klassischen primären Hämostase und damit die Rolle der NETs als Mediatoren von nicht-infektiösen Erkrankungen wie der Thrombose auf ¹⁷⁴.

1.7 Eosinophile Granulozyten und Lymphozyten in der arteriellen Thrombose

1.7.1 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind multifunktionelle Leukozyten, die beispielsweise bei parasitären Infektionen und allergischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen ⁸. Durch verschiedene Stimuli aktiviert, werden aus ihren Granula zytotoxische Proteine wie MBP (major basic protein), ECP (eosinophiles kationisches Protein), eosinophile Peroxidase und eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen freigesetzt. Über MBP werden Mastzellen aktiviert ¹⁷⁶. Außerdem interagieren eosinophile Granulozyten mit den anderen Leukozyten, z.B. mit T-Zellen u.a. über MHC-II- Rezeptoren und co-stimulatorische Moleküle, über Interleukine (IL-4, IL-13) mit Makrophagen und über MPB mit neutrophilen Granulozyten. Sie modulieren so die Funktion anderer Leukozyten ¹⁷⁷.

Verschiedene Studien geben Hinweise darauf, dass eosinophile Granulozyten darüber hinaus in der arteriellen Thrombose eine Rolle spielen, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Patienten mit idiopathischem hypereosinophilen Syndrom etwa haben ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse, wofür Proteine der eosinophilen Granula verantwortlich gemacht werden ¹⁷⁸. MBP z.B. kann das antikoagulatorische endotheliale Thrombomodulin hemmen ¹⁷⁹. Eosinophile Granulozyten, die ebenfalls DNA/Histon-Gemische nach extrazellulär ausstoßen können, dienen darüber hinaus als großer Pool für intravaskulären tissue factor (TF), was für eine Rolle in der Thrombogenese spricht ¹⁸⁰. Darüber hinaus spielen dass Eosinophile eine wichtige Rolle in der Stentthrombose beim Myokardinfarkt, was einen Hinweis darauf gibt, dass sie via Eosinophilen-assoziiertem tissue factor prothrombotisch wirken könnten ¹⁸¹.

1.7.2 B- und T- Lymphozyten

Bei den Lymphozyten, die etwa 20-50% der Blutleukozyten ausmachen, unterscheidet man die beiden Hauptgruppen B- und T-Lymphozyten, wobei die T-Zellen etwa 70-80% der Lymphozyten ausmachen. Die Hauptfunktion der Lymphozyten besteht in der spezifischen Immunantwort. Durch bestimmte Antigene stimuliert, differenzieren B-Lymphozyten zu Plasmazellen und bilden spezifische humorale Antikörper gegen diese Antigene. T-Lymphozyten dagegen bewirken eine spezifische zelluläre Immunreaktion. Man unterteilt sie weiter in CD4- und CD8-positive T-Zellen, je nachdem, welches von beiden Molekülen exprimiert wird ⁸.

Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle in der Atherosklerose und tragen so indirekt zur Thrombogenese bei, wobei hierbei viele Mechanismen noch unklar sind.

Die Subgruppen der T-Zellen können dabei entweder eine proatherogene, oder eine atheroprotektive Rolle spielen. CD4-positive T-Zellen z.B. können die Atherosklerose beschleunigen. So etwa die T_H1 - Zellen, eine Subgruppe der CD4-positiven Zellen, die Interferon- γ produzieren und zahlreich in atherosklerotischen Läsionen vorkommen ¹⁸².

Bei den B-Zellen unterscheidet man die beiden Hauptgruppen B1- und B2-Zellen, deren Rolle in der Atherosklerose nach wie vor diskutiert wird. Insgesamt gehen Studien von atheroprotektiven, als auch proatherogenen Funktionen der B-Zellen je nach Subgruppe aus. B1- Zellen scheinen dabei über die Bildung von IgM-Antikörpern atheroprotektiv zu wirken, wohingegen die B2-Gruppe atherosklerotische Läsionen eher fördert ¹⁸³. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Subgruppen der B-Zellen, die CD19+/CD40+ exprimieren, mit einem verringerten Schlaganfallrisiko, CD19+/CD86+ exprimierende B-Zellen jedoch mit einem erhöhten Schlaganfallrisiko assoziiert sind ¹⁸⁴.

1.8 Fragestellung

Das Ziel dieser explorativen Arbeit war es, durch den Vergleich von humanen Thromben von Patienten mit akutem Myokardinfarkt und ischämischem Apoplex folgende Fragen zu beantworten:

Erstens, gibt es Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede im morphologischen Aufbau der Thromben, insbesondere hinsichtlich ihrer Ätiologie? Wie ist die Verteilung von den Hauptakteuren der primären und sekundären Hämostase, d.h. Thrombozyten und Fibrin, innerhalb der verschiedenen Thromben?

Zweitens, welchen Einfluss haben bestimmte Zellen der *Immunothrombose* auf die Zusammensetzung der arteriellen Thromben? Diesbezüglich sollte die Frage beantwortet werden, ob es Unterschiede gibt hinsichtlich der Monozyten und neutrophilen Granulozyten. In diesem Zusammenhang wurden auch die von den neutrophilen Granulozyten gebildeten NETs untersucht. Weiterhin sollte auch die Frage nach der Beteiligung bzw. den Unterschieden weiterer Zellen wie der eosinophilen Granulozyten und der Lymphozyten in den Myokardinfarkt- und Apoplexthromben beantwortet werden.

Drittens, hat die Zusammensetzung des Thrombus, vor allem in Bezug auf die *Immunothrombose*, Einfluss auf klinische Parameter? Ergeben sich aus den Ergebnissen Hinweise, die vielleicht zu neuen Therapieansätzen der arteriellen Thrombose beitragen können?

2 Material

2.1 Chemikalien und Lösungen

- Aceton 2,5l (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Albumin Fraktion V 200g (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Anilinblau 500ml (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA)
- Biebrich -Scharlachrot- Lösung 1% 500ml (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA)
- Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako, Hamburg, Deutschland)
- Donkey serum (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol 2,5l (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T. Compound 125ml (Sysmex, Horgen, Schweiz)
- Eindeckmedium Dako Fluorescence mounting medium 15ml (Dako, Hamburg, Deutschland)
- Eindeckmedium Eukitt quick-hardening medium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Eisenhämalaunlösung 500ml (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA)
- Eosin-G-Lösung 0,5% 500ml (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Formaldehydlösung 4% 1000ml (Microcos, Garching, Deutschland)
- Formaldehyd- Lösung 16% 10ml (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA)
- Goat serum (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
- Hoechst 33342 10mg/ml (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
- Isopropanol 2,5l (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Lithiumcarbonat 99,99% (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Mayers- Hämatoxylin 500ml (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA)
- Natronlauge 2mol/l 1000ml (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumcitratdihydrat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Paraplast Plus ® Tissue embedding medium 1000g (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- PBS pH 7,4 (10x) 500ml (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA)

- Pikrinsäure Orange G 500ml (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA)
- Phosphowolframsäure 1% 500ml (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA)
- Ponceau-Fuchsin 500ml (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA)
- Salzsäure 2mol/l 1000ml (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Saponin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Trishydroxymethylaminomethan- Puffer pH 7,6 (Dako, Hamburg, Deutschland)
- Tween 20® (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid-Lösung 30% (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung A 500ml (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA)
- Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung B 500ml (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA)
- Xylol 2,5l (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Zitronensäuremonohydrat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

2.2 (Verbrauchs-) Materialien

- Bechergläser 100ml, 2000ml (Duran, Wertheim/Main, Deutschland)
- Deckgläser Menzel 24x50mm (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland)
- Einbettkassetten (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Entsorgungsbeutel 200x300mm (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Eppendorfgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml, 5ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Falcon 15ml (Corning, Corning, New York, USA)
- Färbekammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Färbekästen nach Hellendahl 76x26 mm (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Färbekästen nach Schiefferdecker 89x 71x 46 mm (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Fasstrichter (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Flächendesinfektionsmittel Bacillol AF 1000ml (Bode, Hamburg, Deutschland)
- Händedesinfektionsmittel Sterilium 500ml (Bode, Hamburg, Deutschland)
- Handschuhe Vasco (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Holzmundspatel (Medi-Inn, Hirten, Deutschland)

- Immersionsöl Imersol 518F 20ml (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Klarglasflaschen 1000ml (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Kryotomklingen S35 (Feather, Osaka, Japan)
- Liquid Blocker Super PAP Pen (Science Services, München, Deutschland)
- Mikrotomklingen S35 (Feather, Osaka, Japan)
- Objektträgerboxen (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Objektträgermappen (Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA)
- Objektiv- Reinigungspapier (Tiffen, Hauppauge, New York, USA)
- Objektträger Superfrost Plus Menzel 25x75x1,0mm (Menzel, Braunschweig, Deutschland)
- Objektträgerhalter 75x25x1mm (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Paraffinentferner (Medite, Burgdorf, Deutschland)
- Parafilm laboratory film „M“ (Bemis, Neenah, Wisconsin, USA)
- Pinsel (Faber-Castell, Stein, Deutschland)
- Pinzette 8mm (FST, Heidelberg, Deutschland)
- Pipetten 2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 1000µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen 0,1-10µl, 0,5-20µl, 2-200µl, 50- 1250µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen ep T.I.P.S 0,5- 20µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Präzisionswischtücher 11x 21cm (Kimberly-Clark, Koblenz/Rheinhafen, Deutschland)
- Spatel Macro Green 310mm (VWR, Darmstadt, Deutschland)
- Stripetten 5ml, 10ml, 25ml, 50ml (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Transferpipetten 3,5ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Wägebapier 10x13cm (neoLab, Heidelberg, Deutschland)
- Weithalsgewindeflaschen 200ml, 500ml (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Wischtücher Wypall X80 (Kimberly-Clark, Koblenz/Rheinhafen, Deutschland)

2.3 Geräte

- Abzug 2-453-DAHD (Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland)
- Dampfkochtopf Silit (WMF, Geislingen/Steige, Deutschland)
- Gefrierschrank -20°C (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
- Gefrierschrank -80°C (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)

- Gewebeeinbettautomat Citadel 1000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
- Inkubator BD (Binder, Tuttlingen, Deutschland)
- Kochplatte Severin 1091 (Severin, Sundern, Deutschland)
- Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Deutschland)
- Kryotom CryoStar NX70 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
- Kühlplatte COP30 (Medite, Burgdorf, Deutschland)
- Kühlschrank 4°C (Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland)
- Lichtmikroskop Leica DM LB (Leica, Wetzlar, Deutschland)
- Magnetrührer RCT basic (IKA, Staufen, Deutschland)
- Mikroskop Leica DM6 B (Leica, Wetzlar, Deutschland)
- Mikroskop Zeiss Axio Imager M2 (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Paraffinausgießkonsole Tissue-Tek Tec 5 (Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande)
- PC HP Workstation Z820 (HP, Palo Alto, Kalifornien, USA)
- pH-Meter inLab ph 7110 (Xylem Analytics, Weilheim, Deutschland)
- Pipettierhelfer accu-jet pro (Brand, Wertheim, Deutschland)
- Plattformschüttler Duomax 1030 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
- Präzisionswaage EW 3000 2M (Kern, Balingen, Deutschland)
- Rotationsmikrotom Microm HM 340E (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA)
- Slide Scanner NanoZoomer 2.0 HT C9600 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)
- Vortex-Gerät Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)
- Wasserbad 1052 (GFL, Burgwedel, Deutschland)
- Zentrifuge 5180R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge 5424 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.4 Software

- AxioVision Version SE64 4.9 (Zeiss, Jena, Deutschland)
- CampThrombus Version 1.0 (Lichao Wang, Helmholtz Zentrum München, Deutschland)
- Graphpad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA)
- Leica Application Suite X (Leica, Wetzlar, Deutschland)
- NDP.view2 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)

2.5 Antikörper

Zelltyp	Antigen	Methode	Primär-antikörper	Klon	Hersteller	Verdünnung	Isotyp-kontrolle
T-Lymphozyten	CD3	Kryo/Paraffin	Mouse	MRQ-37	Sigma-Aldrich	1:500	
Monozyten	CD14	Kryo	Mouse	M5E2	BD Pharmingen	1:50	Mouse IgG2 α , κ
	CD14	Paraffin	Goat	AHP1059	Bio-Rad	1:50	Goat IgG
	CD16	Kryo/Paraffin	Rabbit	ab94773	Abcam	1:50	Rabbit IgG
B-Lymphozyten	CD20	Kryo/Paraffin	Mouse	L26	Dako (M0755)	1:500	
Thrombozyten	CD41	Kryo	Mouse	M148	Abcam (ab11024)	1:100	Mouse IgG1
	CD41	Paraffin	Rabbit	orb167512	Biozol	1:100	Rabbit IgG
Leukozyten	CD45	Kryo/Paraffin	Mouse	HI30	BioLegend	1:100	Mouse IgG
Fibrinogen/Fibrin	Fibrinogen	Kryo/Paraffin	Rabbit	A0080	Dako	1:200	Rabbit IgG
Neutrophile Granulozyten	NE	Kryo/Paraffin	Rabbit	ab68672	Abcam	1:150	Rabbit IgG

Tabelle 1: Liste verwendeter humaner Primärantikörper und Isotypkontrollen

Antigen	Methode	Sekundärantikörper	Hersteller
CD14	Kryo	Donkey anti-mouse alexa fluor 488	ThermoFisher
	Paraffin	Donkey anti-goat alexa fluor 488	ThermoFisher
CD16	Kryo/Paraffin	Donkey anti-rabbit alexa fluor 594	ThermoFisher
CD41	Kryo	Goat anti-mouse alexa fluor 488	ThermoFisher
	Paraffin	Goat anti-rabbit alexa fluor 594	ThermoFisher
CD45	Kryo/Paraffin	Goat anti-mouse Cy3	LifeTechnologies
Fibrinogen/Fibrin	Kryo	Goat anti-rabbit alexa fluor 594	ThermoFisher
	Paraffin	Donkey anti-rabbit alexa fluor 594	ThermoFisher
NE	Kryo/Paraffin	Goat anti-rabbit alexa 594	ThermoFisher

Tabelle 2: Liste verwendeter Sekundärantikörper

3 Methoden

3.1 Rekrutierung der Patienten und Gewinnung der Thromben

3.1.1 Einverständniserklärung und Ethikvotum

Die Studie stellte eine Kollaboration mit der Neurologie/Neuroradiologie des Klinikums rechts der Isar und Medizinischen Klinik I der Ludwig-Maximilians-Universität München dar. Eingeschlossen wurden in diese Studie nur Patienten, die eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung des thrombotischen Materials und der klinischen Daten abgaben. Für diese Studie lag ein positives lokales Ethikvotum vor (Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar Projektnummer 5518/12, Deutsches Herzzentrum Projektnummer 4007/11a und Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München Projektnummer 18-343).

3.1.2 Patienten mit akutem Myokardinfarkt

Die Kohorte der Patienten mit Myokardinfarkt bestand aus 120 Patienten. Eingeschlossen in diese Studie wurden Patienten, bei denen das thrombotische Material aus der betroffenen Koronararterie mittels Absaugkatheter zur histologischen Analyse entfernt werden konnte. Ausgeschlossen wurden davon 25 Patienten mit nicht vergleichbaren Ätiologien (Stentthrombosen, venösem Bypass, perioperativer Embolisation), 19 mit letztlich unvollständiger Färbung oder unvollständigem Material, sowie 4 mit falscher Zuordnung. Die eingeschlossenen 72 Patienten teilten sich auf in: 45 Patienten mit STEMI, 23 Patienten mit NSTEMI, 3 Patienten mit stabiler Angina pectoris und ein Patient mit kardiogenem Schock, bei dem keine Information über STEMI oder NSTEMI vorlag.

Bei Aufnahme berichteten die eingeschlossenen Patienten zumeist von typischen klinischen Symptomen, die einen Hinweis auf das Vorliegen einer myokardialen Ischämie gaben (s. Kapitel 1.4.3.2). Zudem zeigten sich laborchemisch erhöhte myokardiale Marker und/oder Ischämie-typische EKG-Veränderungen. Aufgrund dessen wurde die Indikation zur Herzkatheteruntersuchung gestellt, in der eine Revaskularisierung des Zielgefäßes mittels Thrombusaspiration durch einen speziellen Katheter (Pronto™, Extraktionskatheter, Vascular Solutions, Minneapolis, USA), gefolgt von einer perkutanen Koronarintervention inklusive Stentimplantation

durchgeführt wurde. Direkt im Anschluss an die Intervention wurden die Blutgerinnsel kryokonserviert, d.h. in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren.

3.1.3 Patienten mit akutem ischämischem Apoplex

Als zweite Patientengruppe für diese Arbeit wurden Material von 137 Patienten mit ischämischem Apoplex gesammelt. Von diesen wurden insgesamt 71 Patienten mit ischämischem Apoplex des sogenannten vorderen Stromgebiets eingeschlossen. Zur Subgruppenanalyse des Ursprungs dieser Apoplexthromben wurde die TOAST- Klassifikation verwendet (s. 1.5.1). Eingeschlossen wurden dadurch Apoplexpatienten, deren Thromben sich der Kategorie TOAST 1 (n= 15), TOAST 2 (n= 35) oder TOAST 5 (n=21) zuordnen ließen.

Ausgeschlossen wurden dagegen Patienten mit Infarkten im sogenannten Basilarisstromgebiet, Thromben aus der TOAST-Gruppe 3 und 4 oder solche, deren thrombotisches Material ungenügend bzw. qualitativ schlecht war und bei denen keine Einverständniserklärung zur Studienteilnahme vorlag.

Unter Berücksichtigung individueller klinischer Umstände und nach Indikationsstellung zur mechanischen Rekanalisation, wurden diese Patienten in einem Zeitfenster von bis zu maximal 6 Stunden nach Symptombeginn nach Standardprotokoll der Neuroradiologie des Klinikums rechts der Isar therapiert. Dies erfolgte in Allgemeinanästhesie mittels eines distalen Zugangskatheters ohne proximale Ballonokklusion. Abhängig von der individuellen Situation wurde einer der folgenden Stent-Retriever verwendet: Solitaire 4-20, Solitaire 6-30 (ev3 Endovascular Inc., Plymouth, MN, USA), Trevo, Trevo pro 4 (Concentric Medical Inc., Mountain View, CA, USA) oder Penumbra Pulse (Penumbra Inc., Alameda, CA, USA).

Das durch dieses Verfahren geborgene Thrombusmaterial wurde unmittelbar nach der Intervention in 4%igem Formalin fixiert. Bei 44 dieser Patienten wurde vor Intervention eine intravenöse Lysetherapie mittels rtPA durchgeführt.

3.1.4 Erhebung klinisch-interventioneller Parameter der Apoplexpatienten

Zusätzlich wurden bei den Apoplexpatienten Parameter bezüglich der Intervention und des klinischen Outcome erhoben, die mit den Ergebnissen der Färbungen korreliert wurden.

Als Interventionsparameter (in Minuten) dienten die Zeit von Symptombeginn bis zum Start der Angiografie (= *Zeit bis zur Behandlung*). Dann die Zeit zwischen der ersten Angiografie nach der Aortenbogensondierung und der abschließenden Angiografie nach der mechanischen Rekanalisation (= *Rekanalisationszeit*), sowie die Zeit zwischen Symptombeginn und dem Ende der Rekanalisation (= *Gesamtzeit*). Darüber hinaus wurde die Anzahl der nötigen Rekanalisationsmanöver bestimmt.

Als klinische Scores wurden die *National Institutes of Health Stroke Scale* (NIHSS) vor der neuroradiologischen Intervention (= *NIHSS pre*) bzw. am Tag der Entlassung (= *NIHSS post*) verwendet. Die NIHSS bildet ein Scoresystem von 0 (= kein Defizit) bis 42 (= maximales Defizit) Punkten zur Beurteilung eines akuten Schlaganfalls im Rahmen einer neurologischen Befunderhebung, wobei ein höherer Punktwert für einen ausgedehnteren Schlaganfall spricht. In die NIHSS fließen neurologische Affektionen z.B. der Vigilanz, Sprache, (Okulo-)Motorik und der Sensibilität Patienten mit ein, für welche abhängig vom Schweregrad unterschiedliche Punktzahlen vergeben werden. Die NIHSS dient hauptsächlich der Ausgangs- und Verlaufsbeurteilung eines akuten Apoplex und ist von erfahrenen Ärzten in kurzer Zeit durchführbar¹⁸⁵.

Um den klinischen Langzeitstatus der Patienten, d.h. das klinische Outcome, zu beurteilen, wurde die modifizierte Rankin- Skala 90 Tage nach Entlassung (= *mRS 90d*) erhoben. Die mRS ist eine standardisierte Maßzahl, die den Grad der Beeinträchtigung des Alltags der Patienten nach einem Apoplex beschreibt. Sie wird unterteilt in sieben Maßzahlen (0 bis 6) und reicht von der Abwesenheit von Symptomen (mRS= 0) bis hin zum Tod infolge des Apoplex (mRS= 6), wie Tabelle 3 zeigt.

Maßzahl Ausmaß der Beeinträchtigung nach einem Schlaganfall

0	Keine Symptome
1	Keine relevante Beeinträchtigung Alltagsaktivitäten ausführbar
2	Leichte Beeinträchtigung Einschränkungen im Alltag, Versorgung ohne Hilfe möglich
3	Mittelschwere Beeinträchtigung hilfsbedürftig im Alltag, ohne Hilfe gehfähig
4	Höhergradige Beeinträchtigung hilfsbedürftig bei Körperpflege, nicht ohne Hilfe gehfähig
5	Schwere Behinderung Patient benötigt ständige pflegerische Hilfe, Bettlägrigkeit, Inkontinenz
6	Tod

Tabelle 3: Modifizierte Rankin-Skala (nach ¹⁸⁵)

3.1.5 Übersicht- Einschluss der Myokardinfarkt- und Apoplexpatienten

Eingeschlossen wurden wie oben beschrieben insgesamt 72 Patienten mit akutem Myokardinfarkt und 71 mit ischämischem Apoplex. Die Apoplexgruppe wiederum wurde nach Ätiologie in die TOAST 1- (n=15), TOAST 2- (n=35) und TOAST 3- (n=21) Gruppe unterteilt.

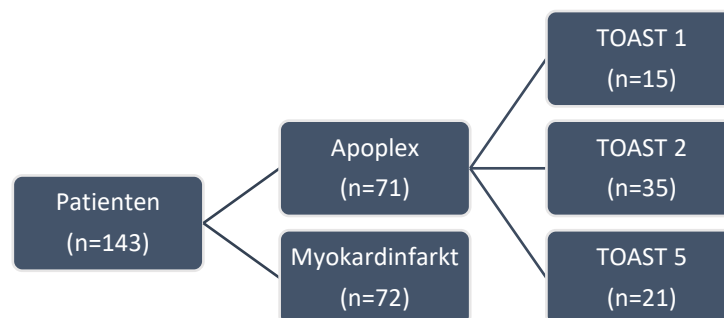


Abbildung 7: Übersicht über die eingeschlossenen Patienten der Apoplex- und Myokardinfarktgruppe

3.2 Aufarbeitung der Apoplexthromben für die Histologie

Die entnommenen Thromben der Patienten mit Apoplex wurden direkt in eine verdünnte und phosphatgepufferte 4%ige Formaldehydlösung gegeben und fixiert. Nach spätestens 48 Stunden wurden diese Thromben in 70%iges Ethanol überführt. In einem vollautomatischen Gewebereinbettautomaten wurden die fixierten Thromben nach folgendem Protokoll in einer auf- und absteigenden Alkoholreihe entwässert:

Ethanol 70% (60min), Ethanol 70% (60min), Ethanol 96% (60min), Ethanol 96% (60min), Ethanol 96% (60min), Ethanol 100% (60min), Ethanol 100% (60min), Ethanol 100% (60min), Xylol (90min), Xylol (90min), Paraplast (90min), Paraplast (90min).

Anschließend wurden die Thromben mithilfe einer Ausgießstation waagrecht für Längsschnitte in Paraffin eingebettet. Abgekühlt wurde das Paraffin auf einer Kälteplatte, woraufhin das Präparat aus der Ausgießwanne entfernt werden konnte.

Für die Anfertigung von 5µm dicken Schnitten aus den Paraffinblöcken wurde ein Rotationsmikrotom verwendet. Je nach Größe des Thrombus wurden mindestens 2 serielle Schnitte angefertigt, mit einem Pinsel und einer Pinzette angehoben und in ein 42°C warmes Wasserbad überführt, um faltenfreie Schnitte zu erhalten. Nachfolgend wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger aufgebracht und über Nacht in einen Trockenschrank bei 37°C gelagert, um einerseits die Haftung auf den Objektträgern zu verbessern, andererseits aber auch keine Antigene durch eine zu hohe Temperatur zu denaturieren.

3.3 Aufarbeitung der Myokardinfarktthromben für die Histologie

Die mithilfe eines Absaugkatheters gewonnenen Thromben der Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurden in kleine Eppendorf-Behälter überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Im Anschluss daran wurden die Proben bei -80°C gelagert. Zur Anfertigung der 5µm dicken Schnitte wurde ein Kryotom verwendet. Die eingefrorenen Thromben wurden mit Hilfe von Einbettmedium (Tissue-Tek) bei -25°C auf vorgekühlte Stempel fixiert. Jeweils zwei serielle Schnitte des Thrombus wurden auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht und anschließend in einem Gefrierschrank bei -20°C in Objektträgerboxen zur Aufbewahrung gelagert.

3.4 Histologische Färbungen mit Färbelösungen

3.4.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Um Leukozyten, Erythrozyten und Fibrin/Thrombozyten-Areale differenzieren zu können wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach dem Färbeprotokoll der Firma Merck durchgeführt¹⁸⁶. Zellkerne stellen sich in der HE-Färbung dunkelblau, Erythrozyten rot und Fibrin/Thrombozyten-Areale rosa dar. Die Paraffinschnitte der Apoplexthromben wurden in typischer Weise zunächst in 100% Xylol und dann in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydratisiert.

Anschließend wurden die Schnitte 3 Minuten in Mayers Hämalaun- Lösung gefärbt und wenige Sekunden in 0,1%iger HCl-Lösung gespült. Danach folgte die Differenzierung in fließendem Leitungswasser für 5 Minuten und im nächsten Schritt die Färbung in 0,5%iger Eosin-G-Lösung für 3 Minuten. Die Schnitte wurden danach für 30 Sekunden in Leitungswasser gespült. Zum Schluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt mounting medium mit Deckgläschen versehen.

Die Kryoschnitte der Myokardinfarktthromben wurden für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zunächst in 100%igen Aceton für 15min bei -20°C fixiert. Anschließend wurden sie luftgetrocknet, fünf Minuten in eine Hämalaun-Lösung eingetaucht und danach kurz in Aqua dest. und fünf Minuten in Leitungswasser gespült. Zur Anfärbung des Zytoplasmas folgte dann die dreiminütige Färbung in 0,5%iger Eosin-Lösung und das abermalige Spülen in Leitungswasser. Zuletzt wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe gegeben, in Xylol getaucht und zum Schluss mit Deckgläschen versehen.

3.4.2 Carstairs- Färbung

Um Fibrin, Thrombozyten und Erythrozyten gemeinsam darzustellen, ihre Verteilung innerhalb des Thrombus zu visualisieren und so die Heterogenität der einzelnen Thromben abbilden zu können, wurde die Carstairs- Färbung verwendet. Die benötigten Färbelösungen wurden von der Firma Electron Microscopy Sciences (EMS, Hatfield, Pennsylvania, USA) bezogen und das Protokoll modifiziert¹⁸⁷. Die Paraffinschnitte wurden vor den Färbeschritten 15min bei 55°C im Brutschrank gelagert.

Fibrin stellt sich in der Carstairs-Färbung orange bis rötlich dar, Thrombozyten blau bis grau, Erythrozyten rot, Kollagen hellblau und Muskulatur rot.

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

Zunächst wurden die Paraffinschnitte in folgender Reihenfolge entparaffiniert und rehydratisiert: 2x5min Xylol, 2x3min Ethanol 100%, 1x3min Ethanol 95%, 1x3min Ethanol 80%, 1x3min Ethanol 70%, 3x Wechsel in Leitungswasser bei Raumtemperatur.

Danach folgte das Beizen in Eisenhämalaunlösung für fünf Minuten, gefolgt von drei Wechseln in Leitungswasser bei Raumtemperatur. Als nächstes wurden die Schnitte mit Mayers-Hämatoxylin für fünf Minuten gefärbt und dann 10min unter lauwarmem Leitungswasser gewaschen. Anschließend folgte die Färbung mit Pikrinsäure Orange G- Lösung für 45min, kurzes Spülen in Aqua dest. und die Färbung mit Ponceau-Fuchsin für drei Minuten. Danach wurden die Schnitte abermals in Aqua dest. gespült (drei Wechsel) und schließlich in 1%iger Phosphowolframsäure differenziert für 7min. Der letzte Färbeschritt wurde mit Anilinblau durchgeführt für 30min, gefolgt von einem weiteren Spülen in Aqua dest. mit drei Wechseln.

Schließlich wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe entwässert nach folgendem Schema: 3x Wechsel in Leitungswasser, 15 dips in Ethanol 70%, 15 dips in Ethanol 80%, 15 dips in Ethanol 95%, 15 dips in Ethanol 100%, 15 dips in Xylol I, 3 dips in Xylol II.

Danach wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt und unter dem Abzug getrocknet.

Um die Carstairs-Färbung in den kryokonservierten Myokardthromben anzuwenden, wurden dieselben Färbelösungen wie bei den Paraffinschnitten verwendet. Zu Beginn wurden die Schnitte bei Raumtemperatur 40min mit 4%igen PFA fixiert und anschließend kurz in PBS gewaschen. Das Protokoll folgt dem der Färbung für Paraffinschnitten, wurde jedoch an einigen Stellen modifiziert. So wurde die Färbedauer von Mayer's Hämatoxylin auf 7min verlängert, ebenso die Färbedauer von Pikrinsäure Orange G auf 1h, Ponceau-Fuchsin auf 5min und Anilinblau auf 45min. Die Schritte der Dehydrierung wurden verkürzt, um eine schnelle Entfärbung des Gewebes zu vermeiden.

3.4.3 Luna- Färbung

Um eosinophile Granulozyten zu färben, wurde die Luna-Färbung angewandt. Diese stellen sich in der Färbung rot dar, ebenso wie Erythrozyten. Zellkerne werden blau angefärbt, während der Hintergrund vorwiegend hellblau bis weiß erscheint.

Vor der Färbung wurden die Paraffinschnitte in typischer Weise entparaffiniert und rehydriert (siehe Kapitel 3.4.1).

Die Färbung selbst wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zuerst wurden die Schnitte mit 1%iger wässriger Hämatoxylin-Biebrich Lösung fünf Minuten gefärbt. Anschließend wurden sie in 1%iger HCl-Lösung, die in 70%igen Ethanol verdünnt wurde differenziert (acht langsame dips). Dann wurden sie fünf Minuten in Leitungswasser gewaschen. Es folgte die Färbung mit 0,5%iger Lithiumcarbonat- Lösung (5 langsame dips) und das abermalige Waschen in laufendem Leitungswasser für zwei Minuten.

Die Paraffinschnitte wurden dann in aufsteigender Ethanolreihe, beginnend mit Ethanol 95%, über Ethanol 100% bis Xylol 100% dehydriert (je zwei Wechsel, je zwei Minuten) und daraufhin eingedeckt mit Eukitt- Eindeckmedium.

Analog zur Färbung von eosinophilen Granulozyten in Paraffinschnitten wurde die Luna-Färbung in den kryokonservierten Schnitten durchgeführt.

3.5 Immunhistochemische Färbungen

3.5.1 Allgemeines Prinzip der Immunmarkierung

Allgemein beruht das Prinzip der Immunhistochemie oder Immunmarkierung auf der Bindung von Antikörpern an Antigene. Man unterscheidet die direkte Immunmarkierung von der indirekten (s. Abb. 8).

Erstere ist eine Ein-Schritt-Methode, bei welcher der gegen das Antigen gerichtete Antikörper mit einem Marker gekoppelt ist, der im Licht- oder Elektronenmikroskop sichtbar ist oder über eine entsprechende Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Die indirekte Immunmarkierung dagegen ist meist eine Zwei-Schritt-Methode, bei der nicht der Primärantikörper, sondern ein Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, mit einem Marker (bspw. einem Fluorochrom) gekoppelt ist. In einem anderen Tier wird dieser gegen das IgG des Tieres hergestellt, welches den Primärantikörper produziert hat, und bindet an die Fc-Region des Primärantikörpers, was den Vorteil der Signalverstärkung hat, da mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können¹⁸⁸.

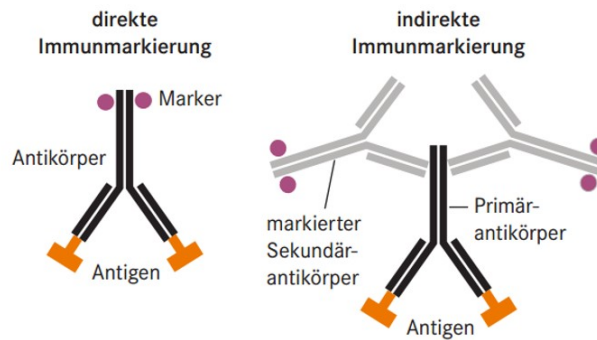


Abbildung 8: Direkte und indirekte Immunmarkierung (mit freundlicher Genehmigung von ¹⁸⁸)

Die Tierart, aus welcher der Primärantikörper stammt, sollte dabei nicht identisch sein mit der Tierart des zu markierenden Gewebes. Um eine optimale Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper zu erreichen, muss auf folgendes geachtet werden:

Der Sekundärantikörper muss gegen die Spezies gerichtet sein, in welcher der Primärantikörper produziert wurde. Des Weiteren muss der Sekundärantikörper bei einem polyklonalen Primärantikörper (Hauptbestandteil IgG) anti-IgG sein. Bei einem monoklonalen Primärantikörper einer IgG- Unterklasse wiederum kann der Sekundärantikörper gegen diese Unterklasse gerichtet oder anti-IgG (F_{ab}) sein. Bei einem monoklonalen Primärantikörper der IgM- Klasse die Verwendung der Sekundärantikörper anti-IgM oder anti-IgG (F_{ab}) möglich ¹⁸⁸.

3.5.2 Protokoll der Immunfluoreszenzfärbungen

Sämtliche Immunfluoreszenzfärbungen wurden nach folgendem Standardversuchsprotokoll durchgeführt und modifiziert ¹⁸⁹.

Die Paraffinschnitte wurden in typischer Weise entparaffiniert und rehydriert und für kurze Zeit in PBS 1:10 belassen. Da durch die Fixierung der Gewebe durch Paraffin und Formalin (FFPE) Proteine quervernetzt und zugehörige Epitope von entsprechenden Antikörpern nicht mehr erkannt werden können ¹⁹⁰, wurden die Schnitte zur Antigendemaskierung anschließend 7min in einem auf pH 6 eingestellten Citronensäuremonohydratpuffer (2,1 g/l) in hitzestabilen Plastikvötten gekocht. Zur Abkühlung wurden sie für 5min in PBS 1:10 gebracht.

Zum Auftauen wurden die bei -20°C gelagerten Kryoschnitte zunächst für 15min bei Raumtemperatur in einer lichtundurchlässigen Färbekammer gelagert. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurde die Färbekammer mit Wasser befüllt. Wie auch bei der Färbung der Paraffinschnitte wurden alle Färbeschritte in der Färbekammer durchgeführt. Die Präparate auf dem Objektträger wurden mit einem Fettstift umfahren zur Schaffung eines hydrophoben Mediums um das Gewebe, um die aufgetragenen Lösungen darauf zu halten. Anschließend wurde auf jeden Schnitt $100\mu\text{l}$ Formaldehydlösung 4% pipettiert und somit das Gewebe 10min fixiert. Nachfolgend wurden die Schnitte für 3x5min in PBS + Tween 0,1% gewaschen.

Das weitere Färbeprocedere der Paraffin- und Kryoschnitte wurde wie folgt durchgeführt:

Nach dem Waschen mit PBS, wurde die Waschlösung vorsichtig abgeklopft und die Schnitte wiederum mit einem Fettstift umrundet. Es wurde darauf geachtet, die Zeit zwischen jedem Färbeschritt so kurz wie möglich zu halten, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde je Schnitt $100\mu\text{l}$ Blocklösung pipettiert (3% BSA, 10% Esel- oder Ziegen Serum, 0,5% Saponin). Saponin wurde verwendet, um die Zellen zu permeabilisieren. Die Blocklösung wurde für eine Stunde auf den Schnitten belassen.

Nachfolgend wurde die Blocklösung abgeklopft und der Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung (mit der Blocklösung) auf das Präparat ($100\mu\text{l}$ / Schnitt) pipettiert (siehe Antikörpertabelle, Kapitel 2.5). Als *Isotypkontrolle* diente ein identischer Antikörper gleicher IgG-Klasse, welcher gegen ein nicht relevantes Antigen gerichtet war. Ebenfalls wurde parallel an einem weiteren Schnitt eine Kontrolle durchgeführt, wozu nur die Verdünnungslösung ohne entsprechenden Primärantikörper verwendet wurde (im Folgenden *Negativkontrolle* genannt). Dies diente dem Ausschluss möglicher unspezifischer Bindungen. Die Inkubationszeit betrug wiederum eine Stunde.

Danach wurden die Schnitte in Glasküvetten in PBS+ Tween 0,1% für 3x5min gewaschen. Tween ist ein Detergens, welches dazu eingesetzt wurde, ungebundene Antikörper vom Präparat zu waschen, um nachfolgend eine spezifische Antikörperbindung zu ermöglichen¹⁹⁰.

Anschließend wurde der entsprechende Sekundärantikörper (siehe Antikörpertabelle, Kapitel 2.5) in einer Verdünnung 1:200 zusammen mit Hoechst 1:1000, das der Darstellung von Zellkernen auf die Schnitte mit dem Primärantikörper dient, dem Isotypantikörper und dem der Negativkontrolle ohne Primärantikörper pipettiert und jeweils eine Stunde inkubiert. Hoechst

ist ein DNA- Fluoreszenzfarbstoff, der mit einem Emissionsmaximum von 461nm eine blaue Fluoreszenz aufweist ¹⁹¹.

Nach erneutem Waschen mit PBS + Tween 0,1% wurden 2 Tropfen Eindeckmedium auf die Objektträger mit den gefärbten Schnitten und ein Deckglas aufgebracht. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich das Medium gleichmäßig über dem Objektträger verteilte und keine Luftblasen über dem Gewebe verblieben.

Die Schnitte wurden dann in eine Objektträgermappe gelegt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C belassen und am Folgetag abfotografiert.

3.5.3 Labeled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode für die CD3 und CD20- Färbung

Die labeled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode, kurz LSAB-Methode, ist eine immunhistochemische Methode, die auf der indirekten Immunmarkierung basiert und sich die hohe Affinität von Streptavidin bzw. Avidin zum wasserlöslichen Vitamin Biotin zunutze macht ¹⁹².

Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes tetrameres Glykoprotein, das vier Biotin-Moleküle binden kann. Streptavidin wiederum ist ein Homolog des Avidins, genauer ein von dem Bakterium *Streptomyces avidinii* produziertes Protein, das kein Glykoprotein ist und somit weniger unspezifische Bindungen als Avidin eingeht ^{188,189}.

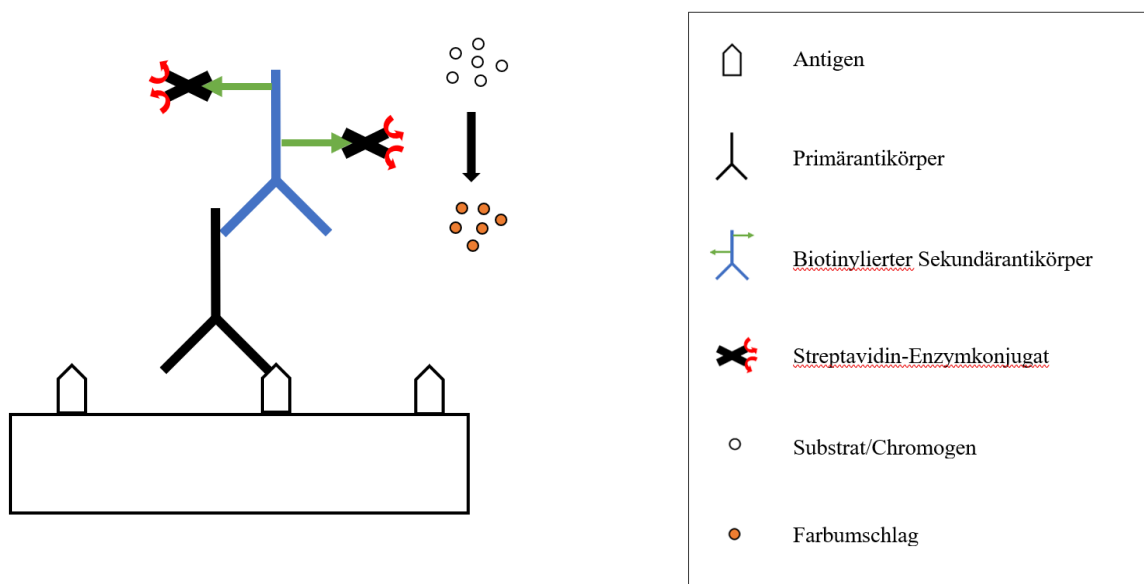


Abbildung 9: Prinzip der LSAB-Methode (modifiziert nach ¹⁸⁹)

Allgemein läuft die LSAB- Methode (s. Abb. 9) nach folgendem Prinzip ab ¹⁸⁹ :

Zunächst bindet ein primärer Antikörper an das gewünschte Antigen. Ein sekundärer biotinylierter Brückenantikörper bindet an den Primärantikörper.

Enzymmarkiertes (Strept-)Avidin bindet an das Biotin des Brückenantikörpers. Es entsteht ein Streptavidin- Enzymkonjugat. Danach folgt die Visualisierung durch Zugabe eines Chromogens/ Substrats. Das Enzym (z.B. Peroxidase) wandelt das farblose Chromogen in einen Farbkomplex um. Zuletzt wird mit Hämalaun gegengefärbt, um Zellkerne identifizieren zu können.

Ein für die Peroxidase verwendbares Chromogen ist beispielsweise das 3,3- Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB). Peroxidase wird Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten. Die freiwerdenden Protonen oxidieren das zuvor farblose Chromogen zu einem braunen Farbkomplex.

Um T- und B- Lymphozyten darzustellen, wurde die CD3 -bzw. CD20 -Färbung nach der oben beschriebenen LSAB-Methode durchgeführt. CD3 ist ein spezifischer Oberflächenmarker der T-Lymphozyten, CD20 der B-Lymphozyten ⁹. Als Positivkontrolle wurden Schnitte von humaner Milz bzw. Tonsille verwendet.

Für die Färbung von T-/B-Lymphozyten wurde ein auf der LSAB-Methode beruhendes Kit (Dako Real Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Dako, Hamburg, Deutschland) verwendet, welches in einem Drei-Schritt-Verfahren eingesetzt wurde. Zunächst wurde das Gewebe mit einem optimal verdünnten primären Maus- oder Kaninchenantikörper, danach mit biotinylierten sekundären Antikörpern und zuletzt mit Streptavidin- Peroxidase (HRP) inkubiert. Die Reaktion wurde mit dem DAB+- Chromogen sichtbar gemacht, was -wie oben beschrieben- zu einem braunen Endprodukt führte.

Folgendes Standardprotokoll ¹⁹³ wurde angewandt und modifiziert (bei den Kryoschnitten entfiel Schritt 1-3, sie wurden zuvor aufgetaut und in 4%igem Formalin fixiert):

Die Paraffinschnitte wurden bei 56°C über Nacht im Brutschrank gelagert. Wie folgt wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydratisiert: 2x10min Xylol, 2x5min Isopropanol 100%, 5min Ethanol 96%, 5min Ethanol 70%, kurz Aqua dest. Anschließend wurden die Schnitte im Citratpuffer (2l Aqua dest. + 2,1g Citronensäuremonohydrat; mit NaOH auf pH 6 eingestellt) sieben Minuten gekocht.

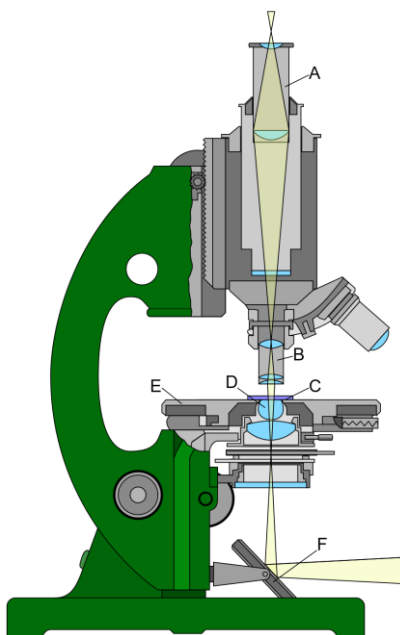
Kryoschnitte wurden zunächst aufgetaut, in 4%igen Formalin fixiert und dann kurz in PBS 1:10 gewaschen.

Die folgenden Protokollschritte waren für die Paraffin- und Kryoschnitte identisch:

Für 3x 2-3min wurden die Schnitte mit Tris-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die endogene Peroxidase mit H_2O_2 3% (1,5ml H_2O_2 30% in 50ml Aqua dest.) blockiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift 3x 2-3min mit Tris-Puffer. Die Schnitte wurden dann mit dem 1:500 verdünnten Primärantikörper (CD3 oder CD20) für eine Stunde inkubiert und wieder mit Tris-Puffer gewaschen. Danach wurden 2-3 Tropfen des sekundären biotinylierten Antikörper pro Objektträger für 25min zugegeben und wiederum 3x 2-3min mit Tris-Puffer gewaschen. Danach wurde Streptavidin-Peroxidase für 25min zugegeben, gefolgt von einem weiteren Waschen mit Tris-Puffer. Anschließend wurde das DAB-Chromogen mit HRP-Substratpuffer für 3min auf die Schnitte pipettiert und die Farbentwicklung unter dem Mikroskop betrachtet. Es folgte ein letzter Waschschrift mit Tris-Puffer und die Gegenfärbung mit Hämalaun für 20 Sekunden. Danach wurden die Schnitte mit Leitungswasser klargespült, in Aqua dest. gegeben und zuletzt in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

3.6 Lichtmikroskopie

3.6.1 Aufbau des Lichtmikroskops



Die wichtigsten Komponenten des einfachen Durchlichtmikroskops:

- A= Okular
- B= Objektiv
- C= Objektträger
- D= Kondensator
- E= Objektisch
- F= Beleuchtungsspiegel

Abbildung 10: Aufbau des Durchlichtmikroskops (mit freundlicher Genehmigung von ¹⁹⁴)

Der grundsätzliche Aufbau (s. Abb. 10) des Durchlichtmikroskops folgt folgendem Prinzip ¹⁸⁸:

Von einer Lichtquelle, die unten am Stativ befestigt ist, gelangt das Licht mittels Kollektorlinsen zu optional eingesetzten Filtern und wird am Beleuchtungsspiegel (F) vertikal umgelenkt. Anschließend gelangt das Licht durch eine Leuchtfeldblende, die den Präparatbereich, der durchleuchtet wird, bestimmt. Als nächste Komponente folgt der Kondensator (D), der meist die Aperturblende beherbergt, über die der auflösungsbegrenzende Beleuchtungswinkel eingestellt wird. Es folgt der Objektisch (E), der in x-, y- und z- Richtung verstellbar ist, mit dem Objektträger (C). Danach kommen die im Objektivrevolver eingeschraubten Objektive (B) und schließlich der Beobachtungstubus mit den darin befindlichen Okularen (A). Verfügt der Beobachtungstubus über einen Dokumentationsausgang, kann hier über einen geeigneten Kameraadapter eine Kamera verbunden sein.

3.6.2 Verwendete Mikroskope und Kameras

Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen dieser Arbeit wurden das Zeiss AxioVision Imager 2 -Mikroskop mit einer AxioCam ICc 5 Kamera (Zeiss, Jena, Deutschland) und das Leica DM6B- Mikroskop mit einer Leica DMC4500- Kamera (Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden von der HE-, Carstairs-, Luna-, CD3- und CD20 Färbung angefertigt. Hierbei wurden sowohl Übersichtsaufnahmen der gesamten Thrombusfläche (5fache Vergrößerung), als auch Detailaufnahmen in 40facher und 63facher Vergrößerung angefertigt.

3.7 Digitaler Präparatscanner

Um die Präparate einheitlich bei möglichst hoher Detailgenauigkeit abzufotografieren, wurden diese in 40facher Vergrößerung aufgenommen. Die sogenannte Mosaikfunktion der Mikroskope, bei der Einzelbilder in n-facher Vergrößerung aufgenommen und wie bei einem Mosaik digital zusammengesetzt werden, ist für Präparate einer bestimmten Größe impraktikabel. Stattdessen wurde der digitale Präparatscanner NanoZoomer 2.0 HT von Hamamatsu verwendet. Dieser bedient sich statt der herkömmlichen Mosaikfunktion einer Hochgeschwindigkeits-TDI (time delayed integration) , bei gleichzeitig hoher Sensitivität ¹⁹⁵. Vereinfacht ausgedrückt wird das Präparat dabei Reihe für Reihe abgescannt und anschließend digital zusammengesetzt (s.

Abb. 11). Diese Technik ist schneller, führt zu homogeneren Übergängen, d.h. keinen Überlappungen im Bild, und läuft vollautomatisch. Mit dem digitalen Präparatscanner wurden die Schnitte der HE-, Carstairs-, Luna-, CD3- und CD20- Färbung aufgenommen und anschließend mit der Hamamatsu NDP.view2 – Software bearbeitet.

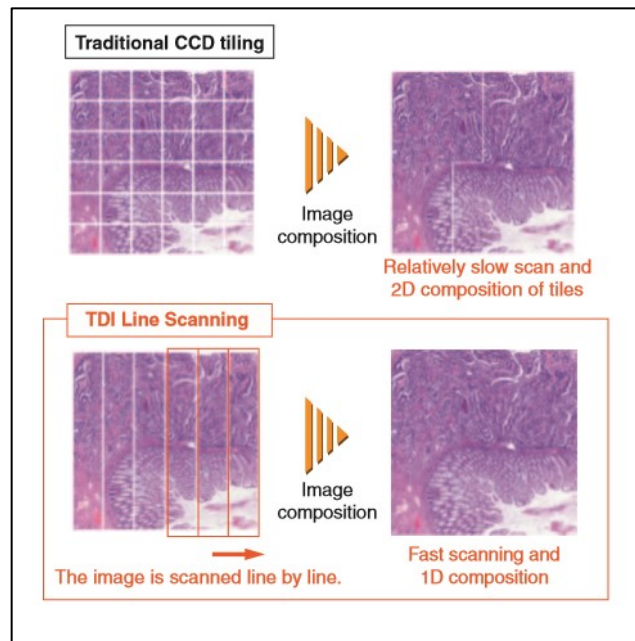


Abbildung 11: Prinzip des TDI line scanning (mit freundlicher Genehmigung von ¹⁹⁵)

3.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.8.1 Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass sich bestimmte Moleküle (Fluorochrome) mithilfe von Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen lassen. Sie emittieren und infolgedessen selbst Licht. Das vom Molekül ausgesendete Licht hat dabei eine größere Wellenlänge als das bestrahlende Licht. Die bei der Fluoreszenz auftretende Wellenlängenveränderung wurde nach dem Entdecker Sir George Stokes benannt (Stokes' Shift) ¹⁸⁸.

Die Elektronen der Fluorochrome werden bei Anregung durch Licht einer geeigneten Wellenlänge von ihrem Grundzustand in einen angeregten Zustand gehoben, in welchem sie durch Vibration einen Teil der notwendigen Energie für die Anregung verlieren. Durch Rückkehr in ihren Grundzustand emittieren sie die dabei freiwerdende Energie in Form von länger welligem Licht. Dieser Prozess dauert etwa 100ns, dabei ist die Farbe der Emission verglichen mit dem

notwendigen Anregungsspektrum immer zu längeren Wellenlängen hin verschoben (Stokes' Shift)¹⁸⁸. Die Fluorochrome bei der indirekten Immunmarkierung sind an die Sekundärantikörper gekoppelt, die gegen die Primärantikörper gerichtet sind, welche wiederum an das gewünschte Antigen binden (s. Kapitel 3.5.1).

Um das Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie nochmals vereinfacht auszudrücken: Das mit dem Fluorochrom gefärbte Präparat wird mit Licht geeigneter Wellenlänge und Intensität beschienen und das daraufhin entstehende Fluoreszenzlicht wird, getrennt vom Anregungslicht, dargestellt¹⁸⁸.

3.8.2 Aufbau und Strahlengang

Als Anregungslichtquelle dient ein Auflichtilluminator, meist eine Hochdruckmetalldampflampe (Quecksilber, Xenon), die für eine ausreichende Lichtintensität in den notwendigen Anregungswellenlängenbereichen sorgt (s. Abb. 12). Gebündelt wird das Anregungslicht von Kollimatorlinsen und anschließend auf den Anregungsfilter gelenkt, wodurch das Licht in seinem Spektrum einengt wird.

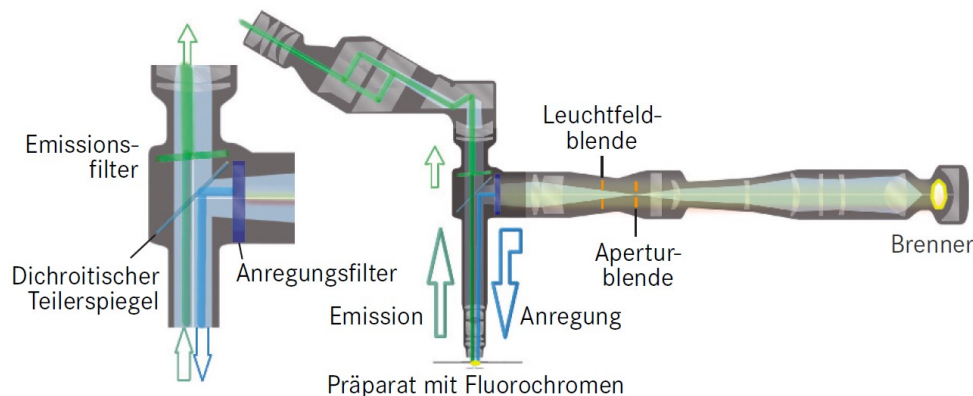


Abbildung 12: Darstellung des Fluoreszenzauflicht-Strahlengangs (mit freundlicher Genehmigung von¹⁸⁸)

Dadurch fällt nur ein bestimmter Teil des Lichts auf den für diese Wellenlängen undurchlässigen dichroitischen Teilerspiegel. Durch seine 45°-Anordnung wird nun das ankommende Licht vollständig zum Objektiv hin reflektiert und auf das Präparat fokussiert. Infolgedessen angeregt, emittieren die Fluorochrome im Präparat Licht. Dieses wird wiederum vom Objektiv aufgefangen und trifft auf den Teilerspiegel. Für das länger wellige Fluoreszenzlicht ist dieser nun durchlässig und lässt es passieren, wodurch es zum Emissionsfilter gelangt, welcher das Licht

noch weiter einengen kann, um die Spezifität des Lichtsignals zu erhöhen¹⁸⁸. Auf die Wahl geeigneter Anregungs- und Emissionsfilter, sowie Fluorochrome muss bei der Fluoreszenzmikroskopie dabei streng geachtet werden. Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde für die CD14/16-, NE-, CD41-, CD45- sowie für die Fibrin-/Fibrinogen- Färbung verwendet.

3.9 Konfokale Mikroskopie

Ein Nachteil der Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass die Fluoreszenz nicht nur in der Fokusebene eines Mikroskops, sondern auch in Bereichen unter- und oberhalb dieser Ebene angeregt wird. Dieser Effekt korreliert mit der Schnittdicke des Präparates. Es resultieren Bildüberlagerungen, welche die Bildqualität in Form von verminderter Auflösung und fehlenden Kontrast einschränken. Jenes Phänomen ließ sich, bis zur Einführung der Konfokalmikroskopie, nur mit sehr dünnen Präparatschnitten vermeiden¹⁸⁸.

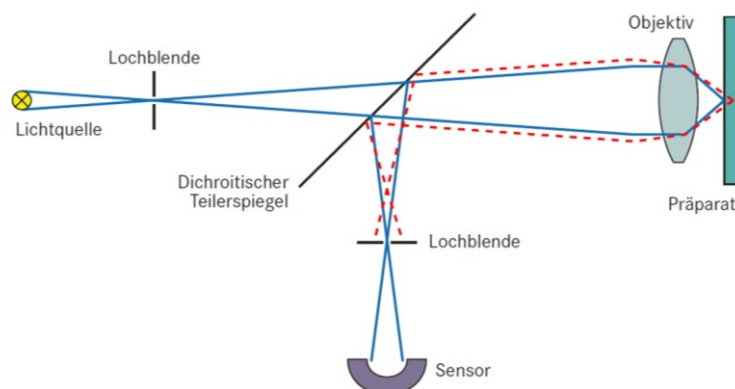


Abbildung 13: Darstellung eines konfokalen Strahlengangs (mit freundlicher Genehmigung von¹⁸⁸)

Störende Hintergrundinformation lässt sich durch die Verwendung von Konfokalmikroskopen deutlich reduzieren. Die Bilder haben dadurch eine wesentlich erhöhte optische Auflösung und einen verstärkten Bildkontrast. Dies wird erreicht durch die Verwendung zweier Lochblenden (s. Abb. 13). Die erste befindet sich in der Feldblendenebene des Mikroskops, die auf die Fokusebene des Objektivs abgestimmt ist, wodurch nur diese Ebene scharf abgebildet wird. Eine zweite Lochblende liegt, direkt vor dem Detektor, in einer weiteren konjugierten Ebene. So werden Signale, die außerhalb der Fokusebene liegen, ausgeblendet und gelangen nicht zum Detektor. Insgesamt werden auf diese Art Informationen von Bereichen außerhalb des Fokus

zweifach ausgeblendet, indem mit der ersten Lochblende die Intensität des anregenden Lichts abgeschwächt wird, sobald es nicht mehr in der Fokusebene liegt und mit der zweiten Lochblende Fluoreszenzsignale aus diesen Außenbereichen so abgeschwächt werden, dass sie nicht mehr zum Detektor gelangen können¹⁸⁸.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen wurden von den NETs angefertigt.

3.10 Auswertung und Statistik

Zur Auswertung der HE-Bilder wurde die gesamte Thrombusfläche mithilfe der CampThrombus-Software ausgewertet. Diese Software arbeitet farbkodiert und berechnet jeweils die Summe der Pixel einer ausgewählten Farbe anteilig an der Gesamtpixelzahl des Thrombus. So können relative Anteile ausgewählter Thrombusbestandteile bestimmt werden. In der HE-Färbung wurden so Leukozyten, Erythrozyten, Fibrin/Thrombozyten-Areale und Artefaktareale differenziert. Die HE-Färbung der kryokonservierten Myokardthromben wurde jedoch nicht ausgewertet, da sich- vermutlich bedingt durch die Konservierungsmethode- die Fraktionen Fibrin/Thrombozyten-Areale von den Erythrozyten nicht klar abgrenzen ließen und so eine suffiziente Analyse nicht möglich machten.

Die Carstairs- Färbung diente einer rein qualitativen Aussage über den heterogenen Aufbau der Thromben, insbesondere einer Darstellung der Verteilung von Fibrin und Thrombozyten.

Die Auswertung der Luna-, CD3- und CD20 Färbung wurde standardisiert mithilfe der NDP.view2- Software durchgeführt:

Bei den Myokardthromben, deren Fläche aufgrund der Gewinnung mittels Aspiration wesentlich kleiner war als die der Schlaganfallthromben, wurde dabei die gesamte Fläche des Thrombus in mm^2 bestimmt. Anschließend wurden die mit der jeweiligen Färbung spezifisch sichtbar gemachten Zellen ausgezählt und die Anzahl der positiven Zellen anschließend auf 1 mm^2 extrapoliert. Die Fläche des Schlaganfallthrombus wurde hingegen vor der Auszählung in Quadrate mit der Fläche von je 1 mm^2 unterteilt, deren Anzahl abhängig von der Flächengröße war. Nur gefärbte Zellen mit eindeutigem Zellkern innerhalb dieser Quadrate, auch die die auf den Linien lagen, wurden ausgezählt. Anschließend wurde wieder aus der Summe der Quadratflächen und der Anzahl der positiven Zellen die Zellzahl pro 1 mm^2 berechnet. Insgesamt wurde stets darauf geachtet, nur Schnitte aus der Mitte der Thromben zu verwenden. So stand

einerseits die größtmögliche Fläche zur Auszählung zur Verfügung, andererseits wurde verhindert, dass nur Randbereiche der Thromben auszählt wurden. Dies hätte durch Akkumulation von Zellen in diesen Bereichen zu falsch hohen Ergebnissen führen können.

Alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem Zeiss AxioVision Imager2 -Mikroskop aufgenommen. Zur Auswertung wurden Mosaikaufnahmen in 40facher Vergrößerung angefertigt, Detailaufnahmen in 63facher Vergrößerung mit Immersionsöl.

Bei der CD41- und Fibrin-/Fibrinogenfärbung wurde immer die gesamte Thrombusfläche ausgewertet. Hierbei wurde genau auf einen standardisierten Ablauf geachtet. Alle Thromben einer Färbung wurden jeweils mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Fotos der Thromben, die dadurch überbelichtet waren oder eine extreme Autofluoreszenz aufwiesen und so eine falsch hohe Fluoreszenzintensität aufwiesen, wurden ausgeschlossen.

Mithilfe der AxioVision SE 64 Vers. 4.9- Software von Zeiss wurde die Fluoreszenzintensität der Färbung berechnet. Dafür wurde ein geeignetes Fenster erstellt, das einen bestimmten Grauwertbereich in der Schwarz-Weiß- Darstellung dieses Kanals als fluoreszenzpositiv wertete. Für jeden Thrombus wurde genau das gleiche Fluoreszenzintensitätsfenster angewandt.

Positive Bereiche konnten mithilfe der Software so in μm^2 umgerechnet werden. Dieser positive Fluoreszenzbereich wurde anschließend anteilig an der Gesamtfläche berechnet. Dadurch ergab sich ein relativer Anteil der gefärbten Antigenfläche an der Gesamtfläche des Thrombus.

Auch die CD14/16-, CD45- und NE- Auswertung wurde einheitlich mit der AxioVision SE 64 Vers.4.9- Software durchgeführt.

Bei den Myokardthromben wurden die Fotos der Thromben in 40facher Vergrößerung aufgenommen und die Fläche anschließend standardisiert in vier Quadrate jeweils gleicher Größe (Fläche $176 \times 131 \mu\text{m}$) unterteilt. Um die Objektivität der Auswertung zu gewährleisten, wurden der Kanal des gefärbten Antigens (CD14, CD16, CD45 oder NE) vor der Auswertung ausgeschaltet und zunächst nur alle kernhaltigen Zellen innerhalb der Quadrate ausgezählt. Hierbei wurde darauf geachtet, nur Zellen zu zählen, die in einer Ebene lagen und ausschließlich solche auszuwählen, bei denen man eindeutig den Zellkern von den anderen Zellen abgrenzen konnte. Zellen auf den Seiten der Quadrate wurden miteingeschlossen. Anschließend wurde der Kanal, in dem das gewünschte Antigen dargestellt wurde, hinzugeschaltet, um die positiv gefärbten

Zellen zu zählen. Nur wenn diese auch kernhaltig waren, wurden sie mitgezählt. Nach Ende der Zählung wurde der Mittelwert der positiven Zellen der vier Quadrate berechnet und auf 1 mm² extrapoliert. Zusätzlich wurde bei der NE-Färbung auch der relative Anteil der Antigen-positiven NETs an den kernhaltigen, NE-positiven Zellen berechnet.

Bei den Schlaganfallthromben wurde, da sie in der Schnittflächengröße sehr variierten, anhand der kleinsten vorhandenen Thrombusfläche ein Quadrat der Fläche $A = 0,15485375 \text{ mm}^2$ definiert, das als Standardquadrat für alle weiteren Flächenberechnungen diente (s. Abb. 14). Je nach Fläche des jeweiligen Thrombus wurde dieses Quadrat n-mal verteilt, höchstens jedoch (nicht überlappend) zehn Mal. Die Auswahl, d.h. wo diese Quadrate platziert wurden, erfolgte wiederum unter vorheriger Ausschaltung des Kanals des gefärbten Antigens, um repräsentative Stichproben zu erhalten und nicht nur solche Flächen auszuwählen, auf denen die gefärbten Zellen möglicherweise kumulierten. Die Quadrate wurden gleichmäßig auf der Fläche verteilt, je nach Morphologie des Thrombus, aber immer so, dass sie die Thrombusfläche vollständig bedeckten. Zellen, die sich auf den Linien dieser Quadrate befanden, wurden wie bei den Myokardinfarktthromben per definitionem stets mitgezählt. Wie bei den anderen Fluoreszenzfärbungen von Zellen auch, wurden zunächst wieder nur alle kernhaltigen Zellen (blau, im DAPI-Kanal) ausgezählt und in einem zweiten Schritt der entsprechende Kanal des gefärbten Antigens zugeschaltet. Als positiv wurden Zellen gezählt, die ein eindeutiges Signal aufwiesen und immer auch kernhaltig waren.

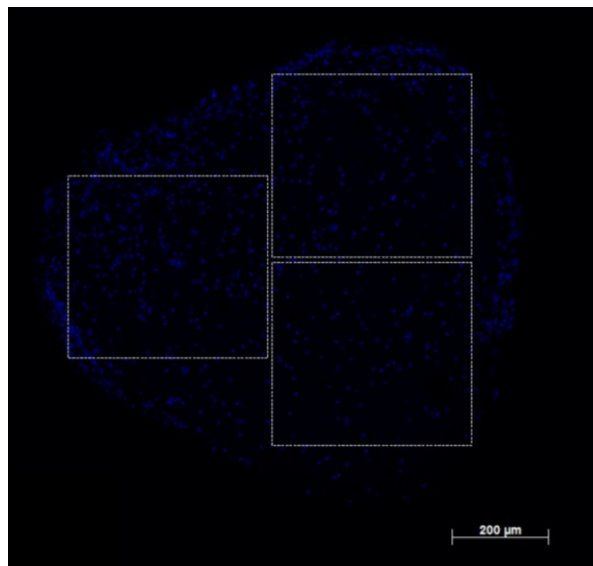


Abbildung 14: Auswertung der Schlaganfallthromben

Die Fläche eines Quadrats beträgt $A = 0,15485375 \text{ mm}^2$.

Bei der NE-Färbung kam nach den ersten beiden Auswerteschritten noch die Auszählung der NETs hinzu. Hierbei wurden zu Beginn der Arbeit drei Kriterien definiert, die eine Zellstruktur alle erfüllen musste, um als NET gezählt zu werden (s. Abb. 15):

Erstens (1) musste die kernhaltige Zelle eine filamentäre extrazelluläre DNA-Struktur aufweisen. Diese DNA-Struktur musste zweitens (2) aus einer NE-positiven Zelle stammen und drittens (3) von neutrophiler Elastase (hier rot) begleitet sein.

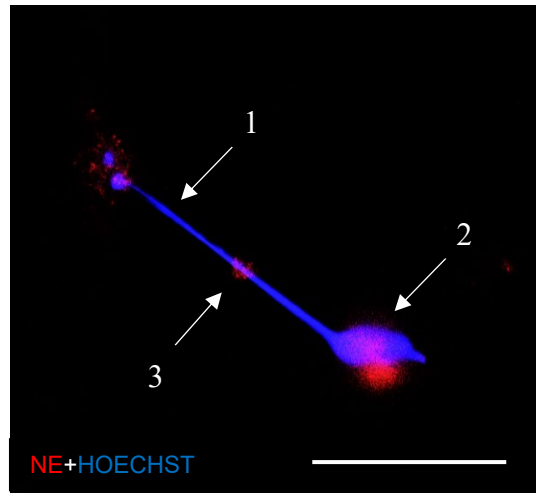


Abbildung 15: Kriterien für neutrophil extracellular traps (NETs)

Konfokalmikroskopische Darstellung eines NET (Maßstabsbalken: 50µm), NE in rot, DNA in blau

Am Schluss dieser Auswertung wurden aus der Summe der Quadratflächen und der Zellzahlen (kernhaltige Zellen, NE-positive Zellen und NETs) absolute Werte (kernhaltige Zellen/mm², Neutrophile Granulozyten/mm², NETs/mm²) und relative Anteile berechnet, d.h. neutrophile Granulozyten pro kernhaltige Zellen und NETs pro neutrophile Granulozyten.

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit der Graphpad Prism 5 -Software. Zum Test auf Normalverteilung wurde die Datenverteilung zunächst graphisch dargestellt und optisch überprüft, ob sie der klassischen Gauß'schen Normalverteilungskurve folgt. Anschließend wurde zur Überprüfung der Normalverteilung noch der D'Agostino- Pearson- Normalverteilungstest angewandt. Je nach Verteilung wurden anschließend parametrische oder nichtparametrische Tests durchgeführt. Es wurde im Vorfeld darauf geachtet, möglichst immer Gruppen ähnlich großer n-Zahlen zu vergleichen. Zum Vergleich zweier normalverteilter Gruppen diente der nicht-gepaarte t-Test, waren beide oder eine der beiden Gruppen nicht-normalverteilt, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Beim Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde

der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni post- hoc Korrektur verwendet. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse gewertet, bei denen $p < 0,05$ war. Graphisch wurden die Daten mittels Box-Plots dargestellt. Bei Korrelationen von parametrischen Daten wurde der Pearson-Korrelationskoeffizienten, bei nicht-parametrischen Daten der Spearman-Korrelationskoeffizient angewandt.

Zum Vergleich der Häufigkeiten der Basischarakteristika wurde der exakte Fisher-Test verwendet.

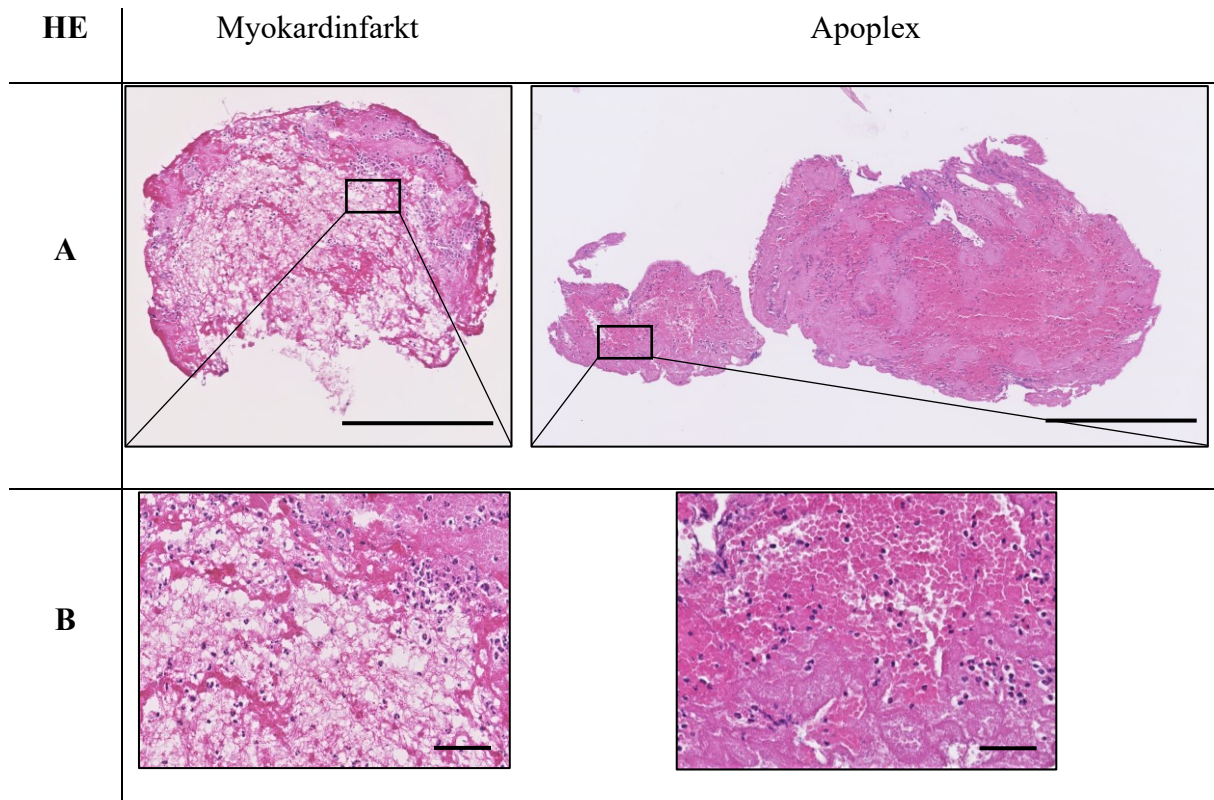
4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Thrombusmorphologie mit der HE- und Carstairs-Färbung

Zur Darstellung der Thrombusmorphologie wurden die Myokardinfarkt- und Apoplexthromben mit der Hämatoxylin-Eosin- (siehe Abb.16) und der Carstairs-Methode (Abb. 19) gefärbt.

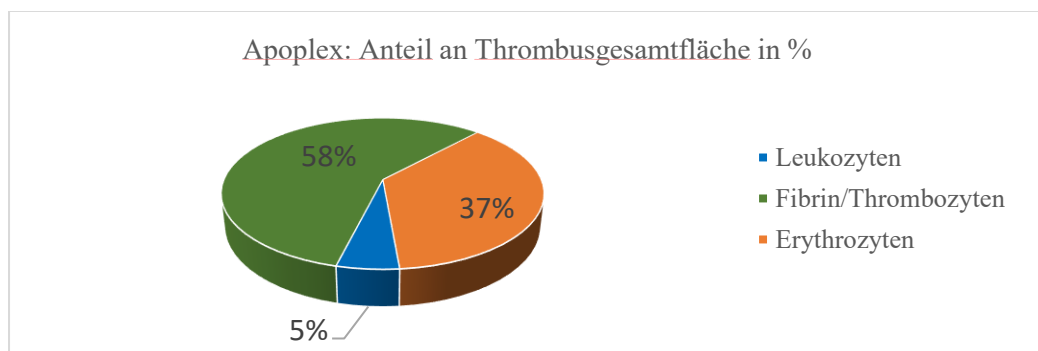
In der HE- Färbung ließen sich in den in Paraffin eingebetteten Schnitten Leukozyten, Fibrin-/Thrombozytenareale und Erythrozyten differenzieren. Zellkerne, also saure DNA-haltige Strukturen, kommen in dieser Färbung blau, basische Proteine dagegen rötlich zur Darstellung.

In den kryokonservierten Schnitten der Myokardinfarktthromben war eine exakte Differenzierung dieser Thrombusbestandteile womöglich aufgrund der histologischen Konservierungstechnik sowohl in der HE-, als auch in der Carstairs-Färbung nicht möglich.

**Abbildung 16:** HE-Färbung

Maßstab = 250µm (A) bzw. 50µm (B)

In der HE-Färbung zeigen sich morphologisch deutliche Unterschiede zwischen den Myokardinfarkt- und Apoplexthromben. Innerhalb der Apoplexthromben lassen sich Leukozyten (blau), Fibrin-/Thrombozyten Areale (rosa) und Erythrozytenareale (rot) voneinander abgrenzen, wohingegen diese exakte Differenzierung in den kryokonservierten Schnitten der Myokardinfarktthromben nicht möglich ist.

**Abbildung 17:** Verteilung der Thrombusbestandteile in der HE-Färbung

Prozentualer Anteil der Leukozyten, Fibrin/Thrombozyten-Fläche und Erythrozyten an der Thrombusgesamtfläche. Die Grafik zeigt die mediane Verteilung dieser Bestandteile innerhalb aller Apoplexthromben (n=71).

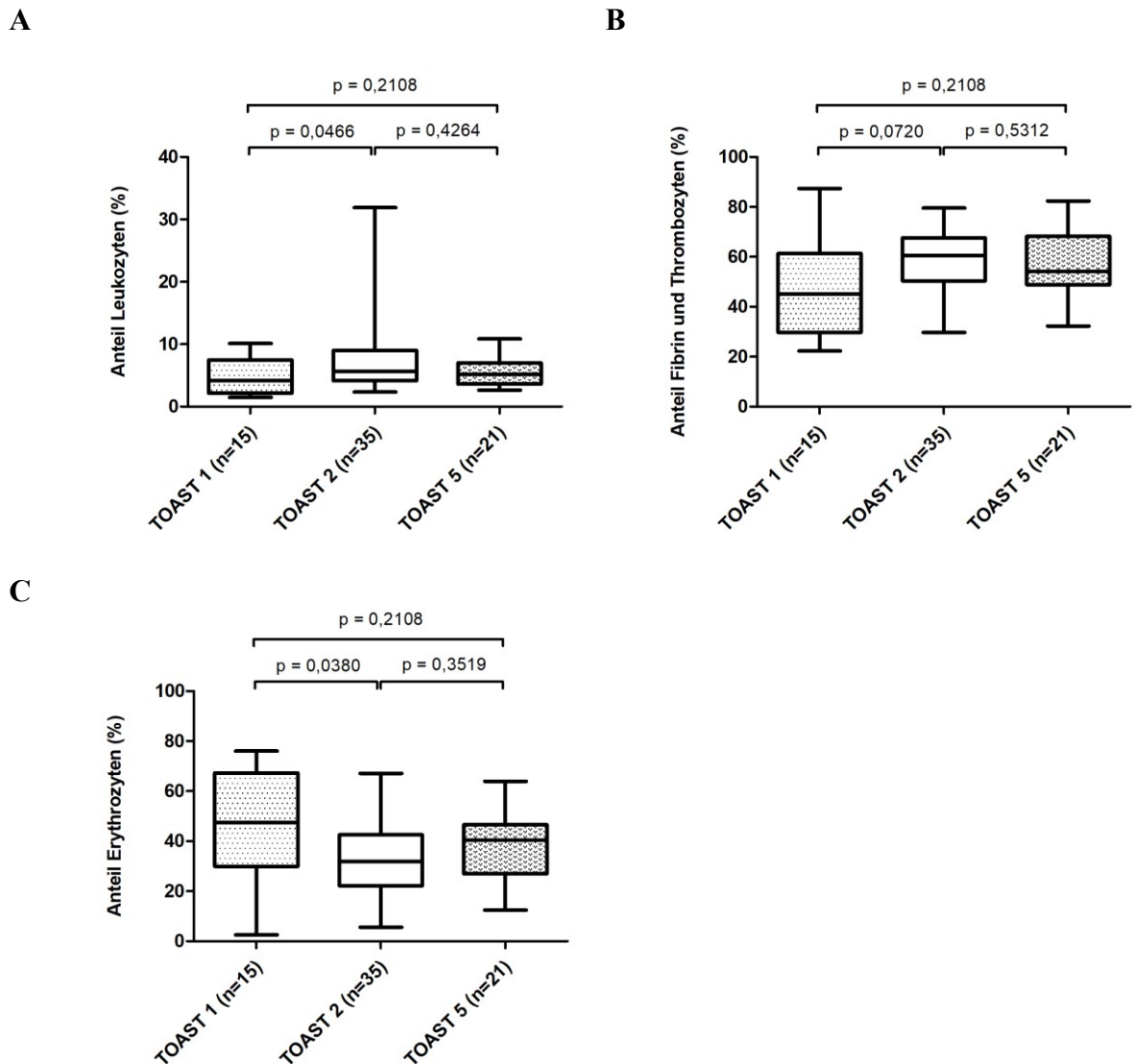


Abbildung 18: HE-Färbung- Vergleich der Thrombusbestandteile in den TOAST-Gruppen
Vergleich des Leukozyten-(A) und Fibrin-/Thrombozyten- (B) und Erythrozytenanteils (C) zwischen den TOAST-Gruppen in der HE-Färbung.

Gesamt betrachtet ergab sich in der HE-Färbung der Apoplexthromben ein jeweils medianer Anteil von 5% Leukozyten, 58% Fibrin-/Thrombozyten-Fläche und 37% Erythrozyten an der Gesamtfläche (s. Abb. 17). Beim statistischen Vergleich der einzelnen TOAST-Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Leukozyten- und Erythrozytenanteils jeweils zwischen der TOAST 1- und TOAST 2- Gruppe (s. Abb. 18). In der TOAST 1- Gruppe war dabei der Leukozytenanteil signifikant niedriger ($p = 0,0466$) und der Erythrozytenanteil ($p = 0,0380$) signifikant höher als in der TOAST 2- Gruppe. Der Fibrin-/Thrombozytenanteil in der TOAST 2- Gruppe war ebenfalls höher als in der TOAST 1-Gruppe, allerdings nicht statistisch signifikant ($p = 0,0720$).

Der Nachweis von Leukozyten war in der HE-Färbung sowohl im Myokardinfarkt als auch im Apoplex sicher möglich. Erythrozyten waren im Apoplex teilweise in ihrer ursprünglichen Morphologie als ovale Zellen erkennbar. Gemeinsame Fibrin-/Thrombozytenareale waren von diesen klar als rosafarbene flächige Anteile zu unterscheiden. In den kryokonservierten Myokardinfarktschnitten waren die Erythrozyten ebenfalls teilweise differenzierbar. Thrombozyten- und Fibrinanteile konnten jedoch nicht sicher abgegrenzt werden. Erkennbar waren aufgelockerte rötlich-filamentäre Strukturen, deren ätiologisch-pathologische Zuordnung nicht möglich war und als solche bei den in Paraffin eingebetteten Schnitten auch nicht auftraten. Diese könnten bei der Prozessierung der Myokardinfarktthromben durch die Kälteeinwirkung bei der Konservierung in flüssigem Stickstoff gegebenenfalls als Artefakt der Methodik zustande gekommen sein.

Um Fibrinanteile und Thrombozyten voneinander zu unterscheiden, wurde die Färbemethode nach Carstairs verwendet. Die Verwendung dieser Färbung diente dem Zweck, eine qualitative Aussage über die Verteilung vor allem der Hauptbestandteile Fibrin (rötlich-orange) und Thrombozyten (blau) getrennt voneinander zu treffen. Ähnlich wie bei der HE-Färbung war eine genaue Zuordnung ebenfalls nur in den Paraffin-eingebetteten Apoplexthromben möglich, weshalb hier auch nur die Färbung eines Apoplexthrombus zur Darstellung kommt (s. Abb. 19). Charakteristisch ist eine inselartige Verteilung der in blau gefärbten Thrombozytenareale.

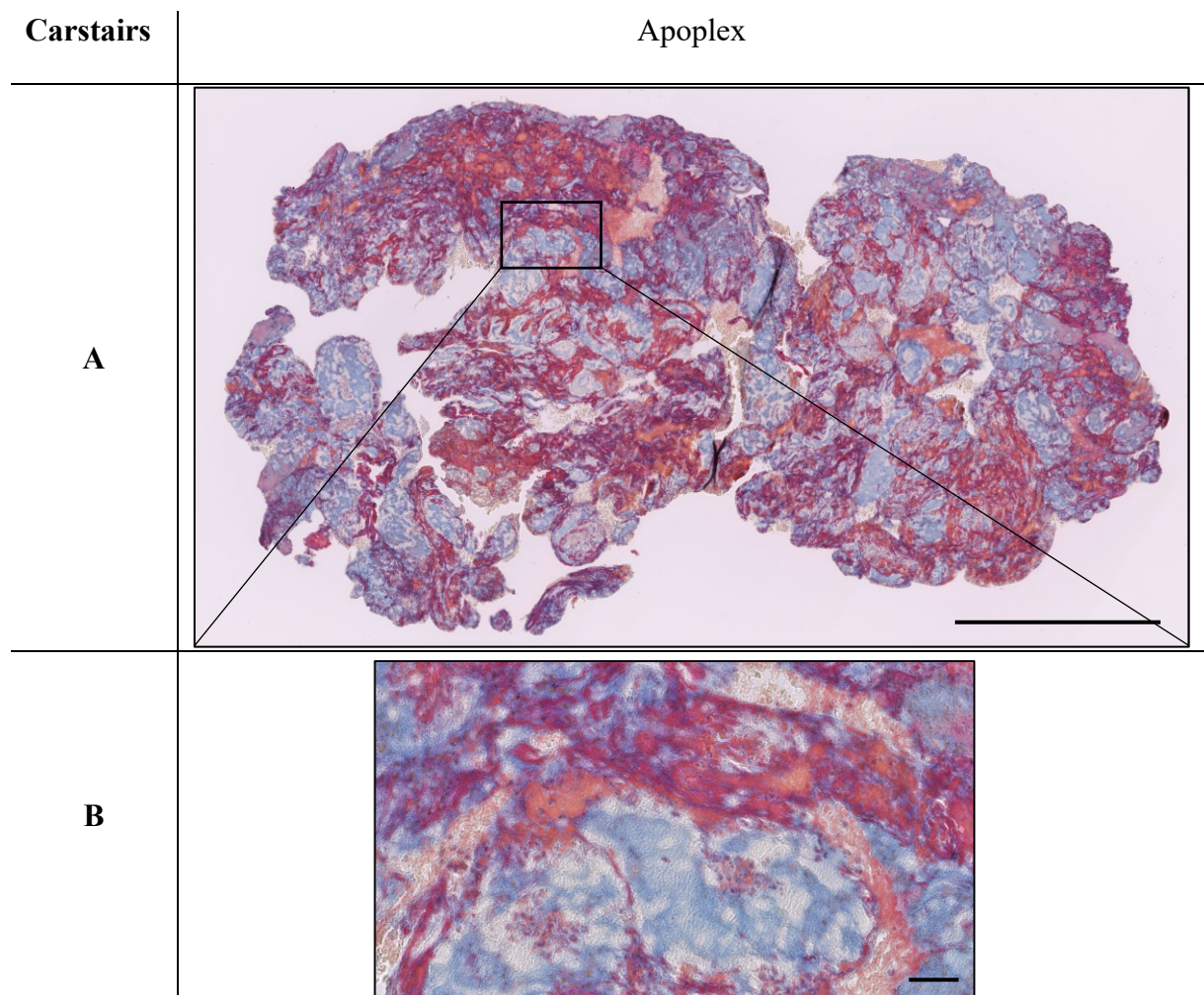


Abbildung 19: Carstairs-Färbung (Apoplex)

Maßstabsbalken 1000 μ m (A) bzw. 50 μ m (B). Darstellung von Fibrin (rötlich/orange), Thrombozyten (blau) und Erythrozyten (rot).

4.2 Vergleich der Myokardinfarkt- und Apoplexthromben

4.2.1 Höherer Anteil an Thrombozyten und Fibrin im Apoplex

Sowohl Thrombozyten, als auch Fibrin/Fibrinogen spielen bei der arteriellen Thrombose eine Schlüsselrolle. Deshalb wurde zunächst zur quantitativen Darstellung des Thrombozytenanteils in den Myokardinfarkt- und Apoplexthromben CD41 als Marker für Thrombozyten per Immunfluoreszenzfärbung dargestellt (s. Abb. 20).

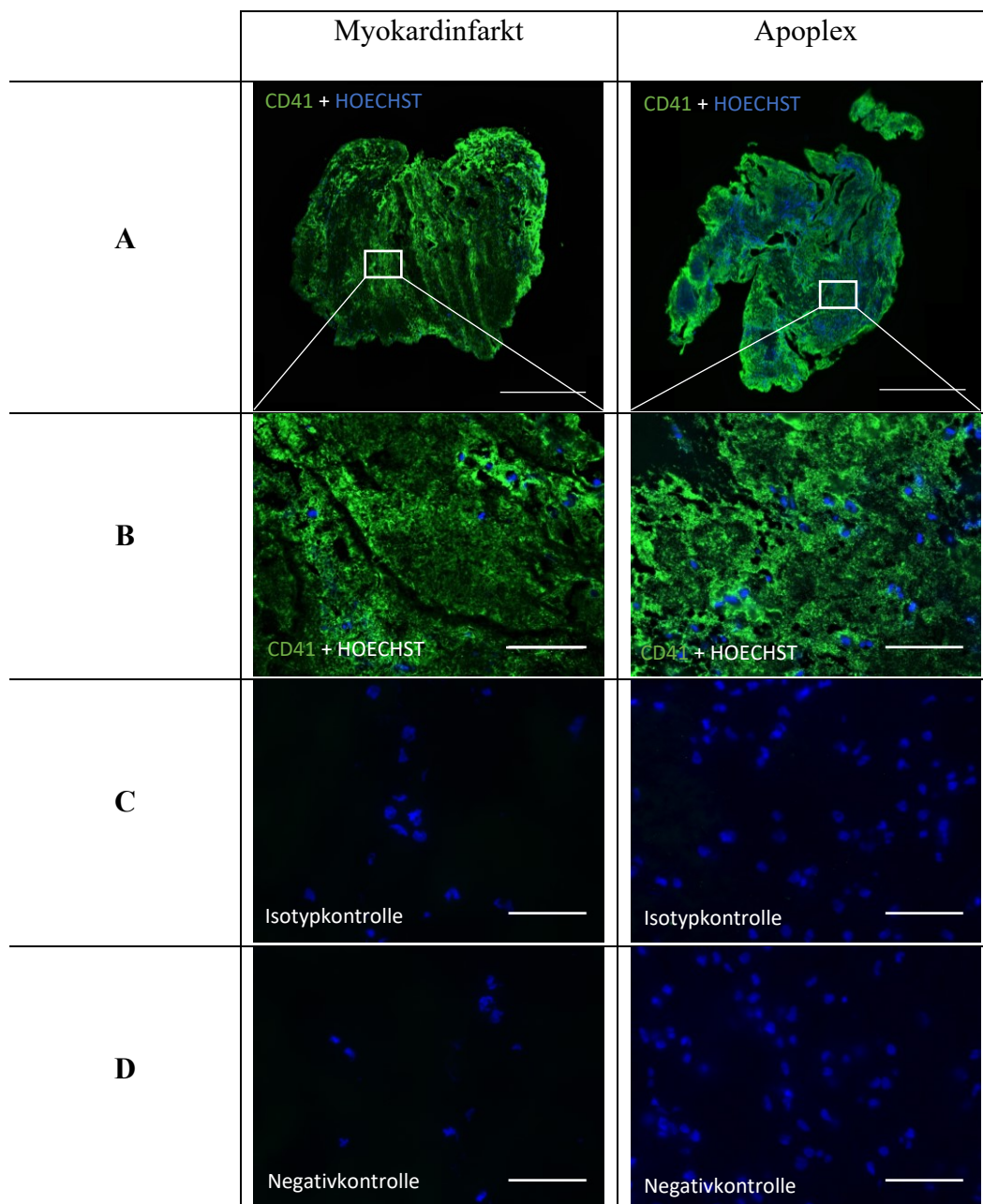


Abbildung 20: CD41-Färbung¹⁹⁶

CD41 in grün, Zellkerne in blau, Maßstabsbalken: 500µm (A) bzw. 50µm (B-D). Immunhistologische Darstellung der Thrombozytenverteilung innerhalb des Myokardinfarkt- und Schlaganfallthrombus. Übersichtsaufnahmen (A), Detailaufnahmen (B), Isotypkontrollen (C) und Negativkontrollen (D).

Hier zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an Thrombozyten in den Apoplexthromben, verglichen mit den Myokardinfarktthromben ($p < 0,0001$), wie Abbildung 21 zeigt.

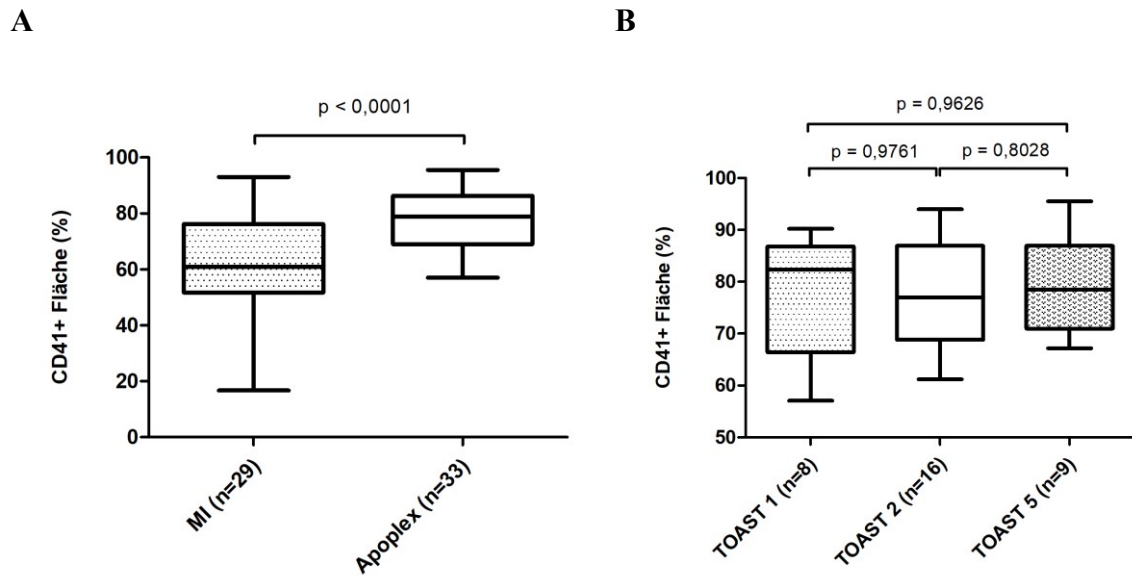


Abbildung 21: CD41- Vergleich zwischen Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST-Gruppen¹⁹⁶
Vergleich zwischen Myokardinfarkt und Apoplex (A) und innerhalb der TOAST- Gruppen (B)

Signifikant höher war dabei ebenfalls jeweils der Anteil an CD41-positiver Fläche innerhalb der einzelnen TOAST-Gruppen im Vergleich zum Myokardinfarkt. Zwischen den Subgruppen hingegen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (s. Tabelle 4).

CD41+	MI (n=29)	Apoplex (n=33)	TOAST 1 (n=8)	TOAST 2 (n=16)	TOAST 5 (n=9)
	p	p	p	p	p
MI		<math>< 0,0001</math>	0,0141	0,0008	0,0054
TOAST 1	0,0141			0,9761	0,9626
TOAST 2	0,0008		0,9761		0,8028
TOAST 5	0,0054		0,9626	0,8028	

Tabelle 4: Vergleich der CD41-positiven Flächen von Myokardinfarkt, aller Apoplexthromben und der einzelnen TOAST-Gruppen¹⁹⁶

Zur Darstellung des Fibrin-/Fibrinogenanteils der Thromben wurde das entsprechende Antigen innerhalb der Myokardinfarkt- und Apoplexthromben immunhistologisch angefärbt (s. Abb. 22).

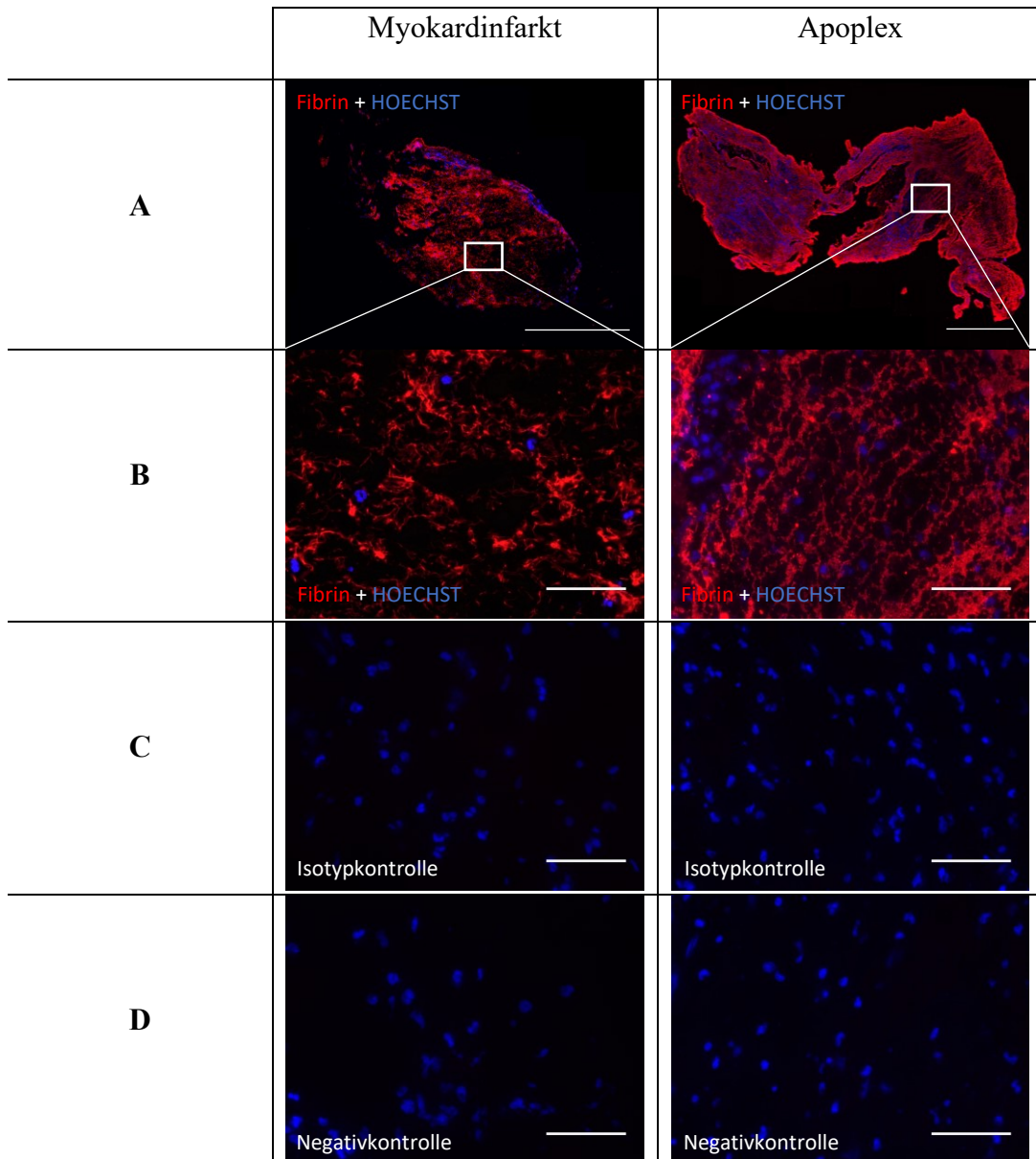


Abbildung 22: Fibrin/Fibrinogen-Färbung ¹⁹⁶

Fibrin/Fibrinogen in rot, Zellkerne in blau, Maßstabsbalken: 500 μ m (A) bzw. 50 μ m (B-D). Immunhistologische Darstellung der Fibrin-/Fibrinogenverteilung innerhalb des Myokardinfarkt- und Schlaganfallthrombus. Übersichtsaufnahmen (A), Detailaufnahmen (B), Isotypkontrollen (C) und Negativkontrollen (D).

Ähnlich wie beim Thrombozytenanteil war auch der Anteil der Fibrin-/Fibrinogen-positiven Fläche am Gesamtthrombus bei den Apoplexpatienten signifikant höher ($p < 0,0001$), wie Abbildung 23 zeigt.

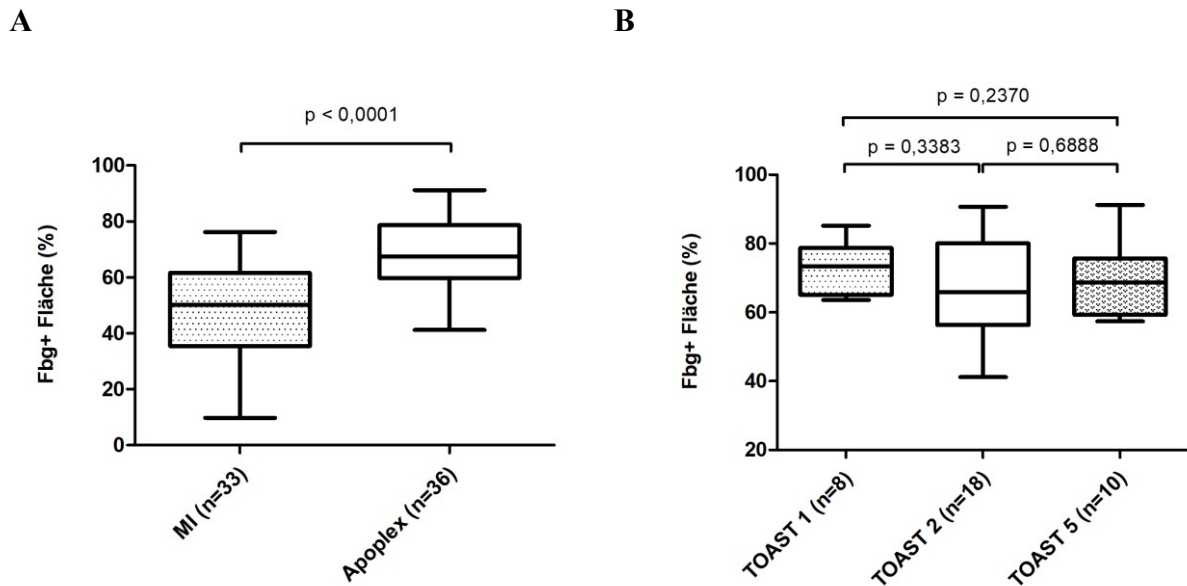


Abbildung 23: Fibrin/Fibrinogen- Vergleich zwischen Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST-Gruppen¹⁹⁶
Vergleich zwischen Myokardinfarkt und Apoplex (A) und innerhalb der TOAST-Gruppen (B).

Der statistische Vergleich der TOAST-Gruppen im Vergleich zum Myokardinfarkt zeigte ebenfalls signifikant höhere Anteile an Fibrin/Fibrinogen. Innerhalb der TOAST-Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (s. Tabelle 5).

Fbg+	MI (n=33)	Apoplex (n=36)	TOAST 1 (n=8)	TOAST 2 (n=18)	TOAST 5 (n=10)
	p	p	p	p	p
MI		<0,0001	0,0002	0,0003	0,0011
TOAST 1	0,0002			0,3383	0,2370
TOAST 2	0,0003		0,3383		0,6888
TOAST 5	0,0011		0,2370	0,6888	

Tabelle 5: Vergleich der Fibrinogen-positiven Flächen von Myokardinfarkt, aller Apoplexthromben und der einzelnen TOAST-Gruppen¹⁹⁶

4.2.2 Gleiche Anzahl an kernhaltigen Zellen und neutrophilen Granulozyten im Myokardinfarkt und Apoplex

Zur Darstellung der neutrophilen Granulozyten, der wichtigsten Zellfraktion der *Immunothrombose*, wurde die neutrophile Elastase (NE) als spezifisches Antigen der Neutrophilen angefärbt (s. Abb. 24).

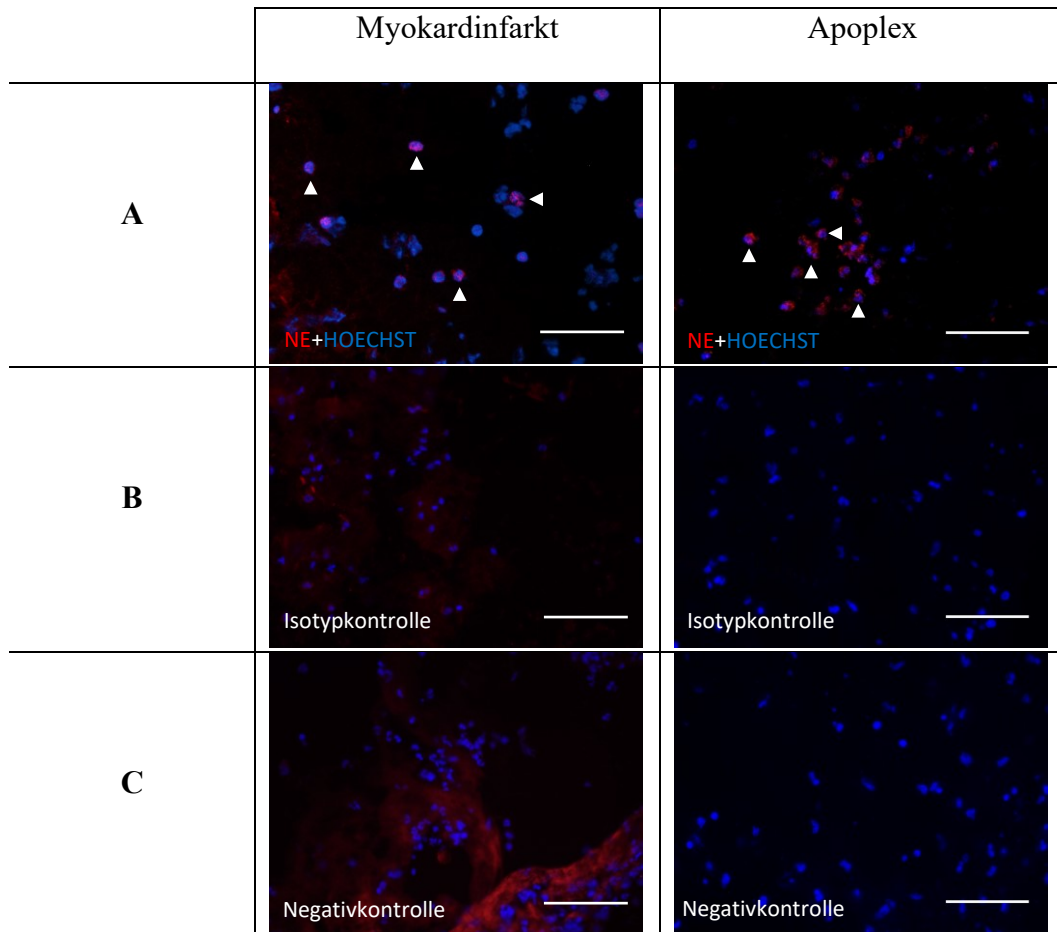


Abbildung 24: Neutrophile Elastase-Färbung ¹⁹⁶

NE in rot, Zellkerne in blau, Maßstabsbalken: 50µm. Immunhistologische Darstellung der neutrophilen Granulozyten (siehe Pfeile) innerhalb des Myokardinfarkt- und Apoplexthrombus. NE-Färbung (A), Isotypkontrollen (B), Negativkontrollen (C).

Zunächst wurde untersucht, ob sich Unterschiede in den kernhaltigen Zellen (n/mm^2) zwischen den Myokardinfarkt- und Apoplexthromben ergeben. Hierbei ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,1326$), wie Abbildung 25 zeigt. Gleiches galt für die Anzahl an neutrophilen Granulozyten, also NE-positiven Zellen ($p=0,5596$). Es zeigten sich jeweils auch keine

Unterschiede innerhalb der TOAST-Gruppen bzw. im Vergleich der einzelnen Subgruppen des Apoplex mit den Myokardinfarktthromben (s. Tabelle 6).

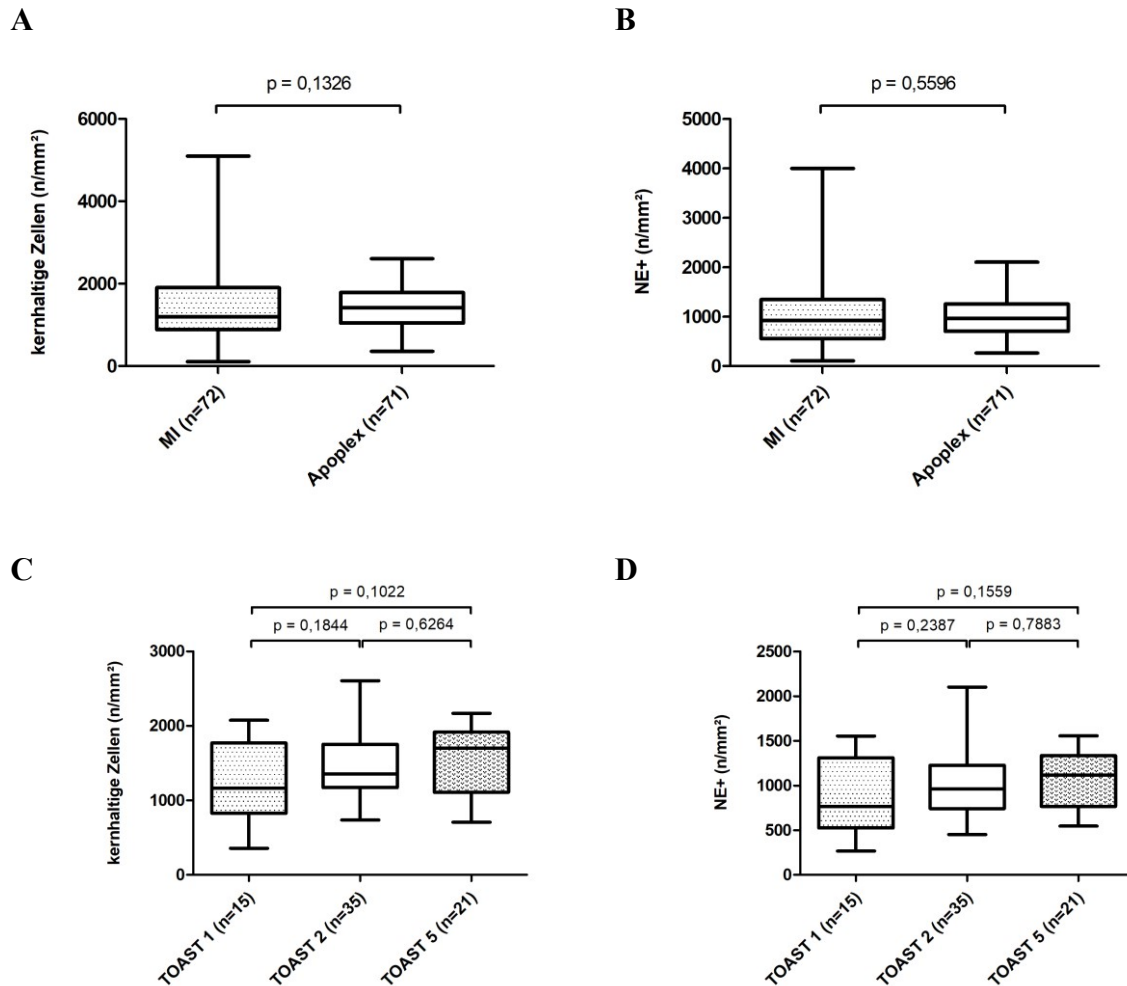


Abbildung 25: Vergleich der Anzahl der kernhaltigen Zellen und Neutrophilen zwischen Myokardinfarkt und Apoplex¹⁹⁶

Vergleich der Absolutzahl der kernhaltigen Zellen (A) und neutrophilen Granulozyten (B), sowie der kernhaltigen Zellen innerhalb der TOAST-Gruppen (C) und der neutrophilen Granulozyten innerhalb der TOAST-Gruppen (D).

A

kernhaltige Zellen n/mm ²	MI (n=72)	Apoplex (n=71)	TOAST 1 (n=15)	TOAST 2 (n=35)	TOAST 5 (n=21)
	p	p	p	p	P
MI		0,1326	0,7659	0,1163	0,1354
TOAST 1	0,7659			0,1844	0,1022
TOAST 2	0,1163		0,1844		0,6264
TOAST 5	0,1354		0,1022		

B

Neutrophile n/mm ²	MI (n=72)	Apoplex (n=71)	TOAST 1 (n=15)	TOAST 2 (n=35)	TOAST 5 (n=21)
	p	p	p	p	p
MI		0,5596	0,5858	0,4836	0,4214
TOAST 1	0,5858			0,2387	0,1599
TOAST 2	0,4836		0,2387		0,7883
TOAST 5	0,4214		0,1599		

Tabelle 6: Vergleich der Zahl der kernhaltigen Zellen und Neutrophilenanzahl zwischen Myokardinfarkt und Apoplex ¹⁹⁶

Vergleich der Absolutzahl der kernhaltigen Zellen (A) und der Neutrophilen Granulozyten (B) der Myokardinfarkt- und Apoplexthromben und der einzelnen TOAST-Gruppen.

Die Zahl der kernhaltigen Zellen entsprachen dabei weitestgehend den Leukozytenzahlen, sowohl im Myokardinfarkt, als auch im Apoplex. Hierzu wurde in einer Stichprobe der Leukozytenmarker CD45 verwendet und der Anteil der CD45-positiven Zellen an den mit Hoechst gefärbten kernhaltigen Zellen jeweils für die Myokardinfarkt- (n=3), als auch die Apoplexthromben (n=3) in mehreren Schnitten derselben Thromben berechnet. Die CD45-positiven Zellen waren dabei zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (s. Abb. 26 und 27).

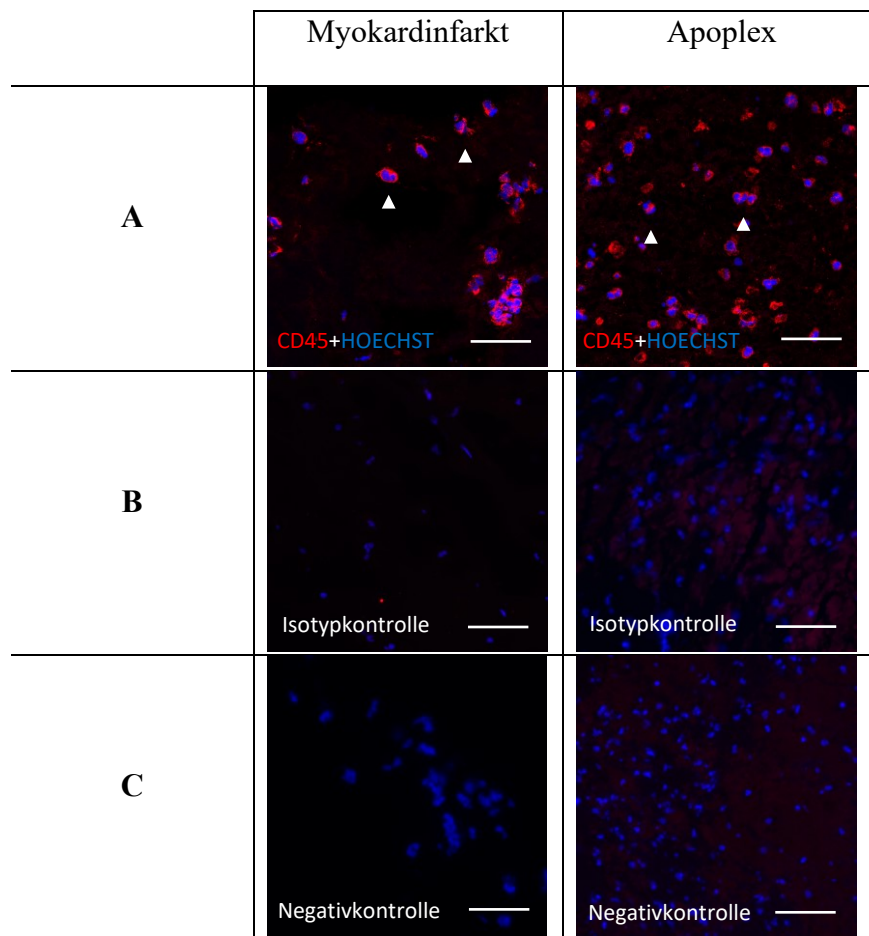


Abbildung 26: CD45-Färbung ¹⁹⁶

CD45 in rot, Zellkerne in blau, Maßstabsbalken: 50µm. Immunhistologische Darstellung der Leukozyten (siehe Pfeile) innerhalb des Myokardinfarkt- und Apoplexthrombus. NE-Färbung (A), Isotypkontrollen (B), Negativkontrollen (C).

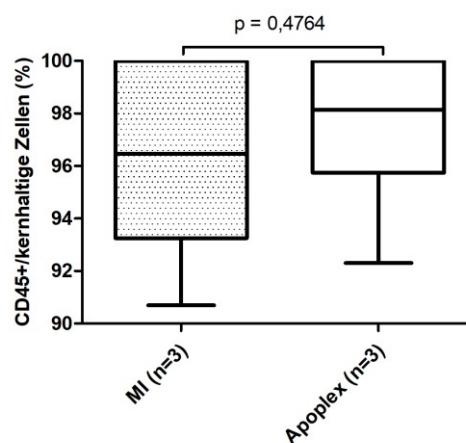


Abbildung 27: Vergleich der CD45-positiven Leukozyten pro kernhaltige Zellen zwischen Myokardinfarkt und Apoplex ¹⁹⁶

4.2.3 Nachweis von NETs im Myokardinfarkt und Apoplex

Wie in Kapitel 1.6.2.2 beschrieben, können neutrophile Granulozyten *neutrophil extracellular traps* (NETs) bilden und so zur Genese der arteriellen Thrombose beitragen. Zunächst wurde untersucht, ob sich NETs in den Myokardinfarkt- und Apoplexthromben der Patienten finden lassen. Dabei wurden die in Kapitel 3.10 beschriebenen NET-Kriterien angewandt. NETs konnten sowohl im Myokardinfarkt, als auch im Apoplex nachgewiesen werden (s. Abb. 28).

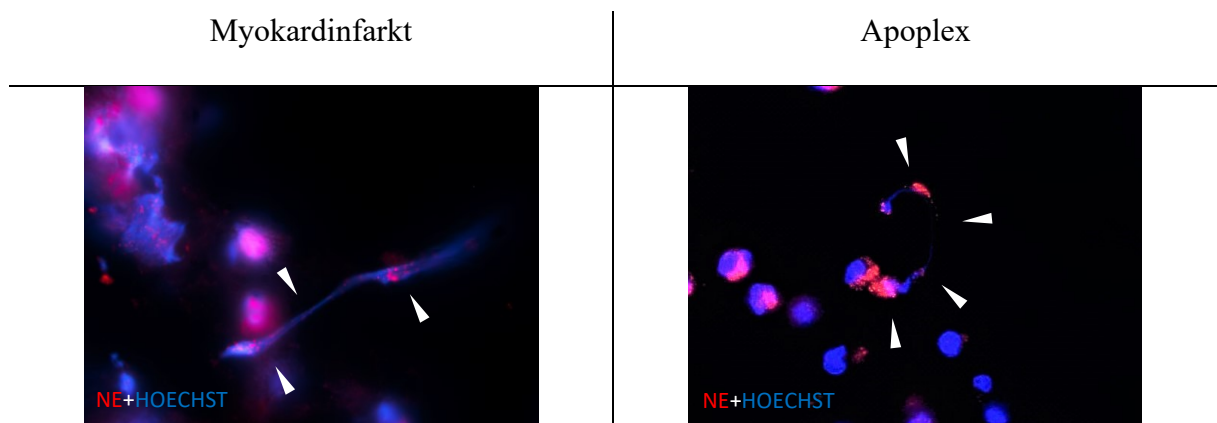


Abbildung 28: Darstellung von NETs ¹⁹⁶

NE in rot, DNA in blau, Maßstabsbalken: 50µm. Immunhistologische Darstellung der NETs (siehe Pfeile) innerhalb des Myokardinfarkt- und Apoplexthrombus.

Dabei wurden in etwa jedem fünften (ca. 21%) ausgewerteten Myokardinfarktthrombus NETs detektiert (s. Abb. 29).

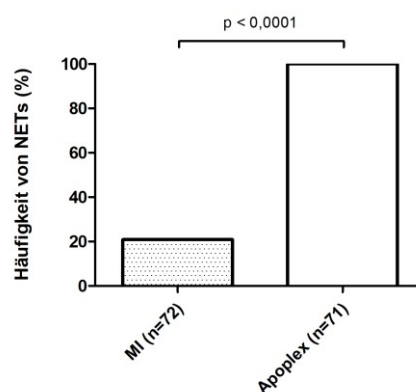


Abbildung 29: Vergleich der Häufigkeit der NETs zwischen Myokardinfarkt und Apoplex ¹⁹⁶

Beim Vergleich dieser Myokardinfarktthromben mit NET-Nachweis mit den Apoplexthromben ergab sich hinsichtlich der absoluten NET-Anzahl kein signifikanter Unterschied ($p = 0,7503$).

Auch der Anteil an NET-bildenden Neutrophilen war zwischen Myokardinfarkt- und Apoplexthromben nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,9394$), wie Abbildung 30 zeigt. Absolut und relativ zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der TOAST 1 -und TOAST 2 -Gruppe (s. Abb. 30 und Tabelle 7). Absolut war die Anzahl an NETs der TOAST 2- Gruppe ($p=0,0476$) höher, was sich auch relativ bestätigte: NET-bildende Neutrophile traten signifikant häufiger in der TOAST 2-Gruppe auf ($p=0,0184$). Darüber hinaus war die Anzahl an NETs in der TOAST 1- Gruppe signifikant niedriger als in der TOAST 5- Gruppe ($p=0,0485$).

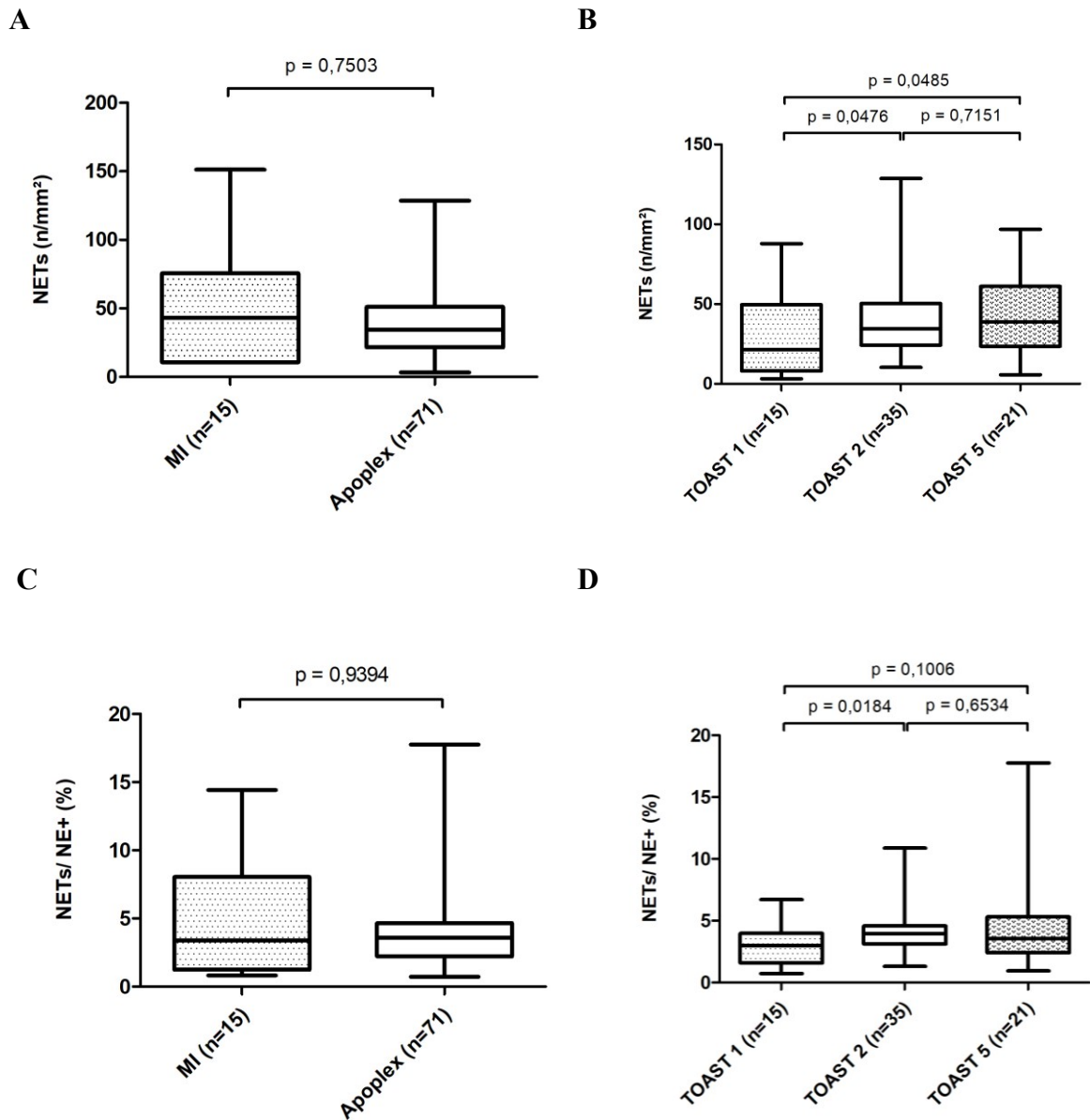


Abbildung 30: Vergleich der NETs absolut und relativ zwischen Myokardinfarkt und Apoplex ¹⁹⁶
Vergleich der NETs absolut zwischen Myokardinfarkt und Apoplex (A), innerhalb der TOAST-Gruppen (B) und relativ zwischen den Myokardinfarkt und Apoplex (C), sowie innerhalb der TOAST-Gruppen (D).

A

NETs n/mm ²	MI (n=15)	Apoplex (n=71)	TOAST 1 (n=15)	TOAST 2 (n=35)	TOAST 5 (n=21)
	p	p	p	p	p
MI		0,7503	0,1455	0,9831	0,8724
TOAST 1	0,1455			0,0476	0,0485
TOAST 2	0,9831		0,0476		0,7151
TOAST 5	0,8724		0,0485	0,7151	

B

NETs/NE+ (%)	MI (n=15)	Apoplex (n=71)	TOAST 1 (n=15)	TOAST 2 (n=35)	TOAST 5 (n=21)
	p	p	p	p	p
MI		0,9394	0,2808	0,6114	0,7727
TOAST 1	0,2808			0,0184	0,1006
TOAST 2	0,6114		0,0184		0,6534
TOAST 5	0,7727		0,1006	0,6534	

Tabelle 7: Vergleich der NETs absolut und relativ ¹⁹⁶

Vergleich der Absolutzahlen der NETs (A) und Vergleich der NET-bildenden Neutrophilen (B) von Myokardinfarkt-, aller Apoplexthromben und der einzelnen TOAST-Gruppen.

4.2.4 Höhere Anzahl an intermediären/ nicht-klassischen Monozyten im Apoplex

Als weitere wichtige Zellgruppe der *Immunothrombose* wurden die Monozyten untersucht (s. Abb. 31). Wie in Kapitel 1.6.2.1 beschrieben, lässt sich diese Zellgruppe anhand ihrer exprimierenden Antigene in klassische Monozyten (CD14⁺/16⁻) und intermediäre bzw. nicht-klassische Monozyten (CD14⁺⁺/16⁺ bzw. CD14⁺/16⁺⁺) unterteilen. In der Immunhistologie lässt sich bei Anfärbung von CD14 und CD16 lediglich die Unterteilung in die Gruppen klassische und intermediäre/ nicht-klassische Monozyten vornehmen, da visuell CD14⁺⁺/16⁺ von CD14⁺/16⁺⁺-exprimierenden Monozyten nicht zu unterscheiden sind.

Zunächst wurde überprüft, ob sich die Monozyten, d.h. CD14-exprimierende Zellen, im Myokardinfarkt und Apoplex unterscheiden. Dazu wurde eine zufällige Stichprobe mit etwa gleicher Zahl aus der Myokardinfarkt- und Apoplexgruppe gezogen und explorativ auf statistische Unterschiede untersucht (s. Abb. 32 und Tabelle 8). Es zeigten sich eine signifikant höhere CD14- positive Zellzahl im Apoplex ($p = 0,0052$) und keine signifikanten Unterschiede innerhalb der TOAST-Gruppen.

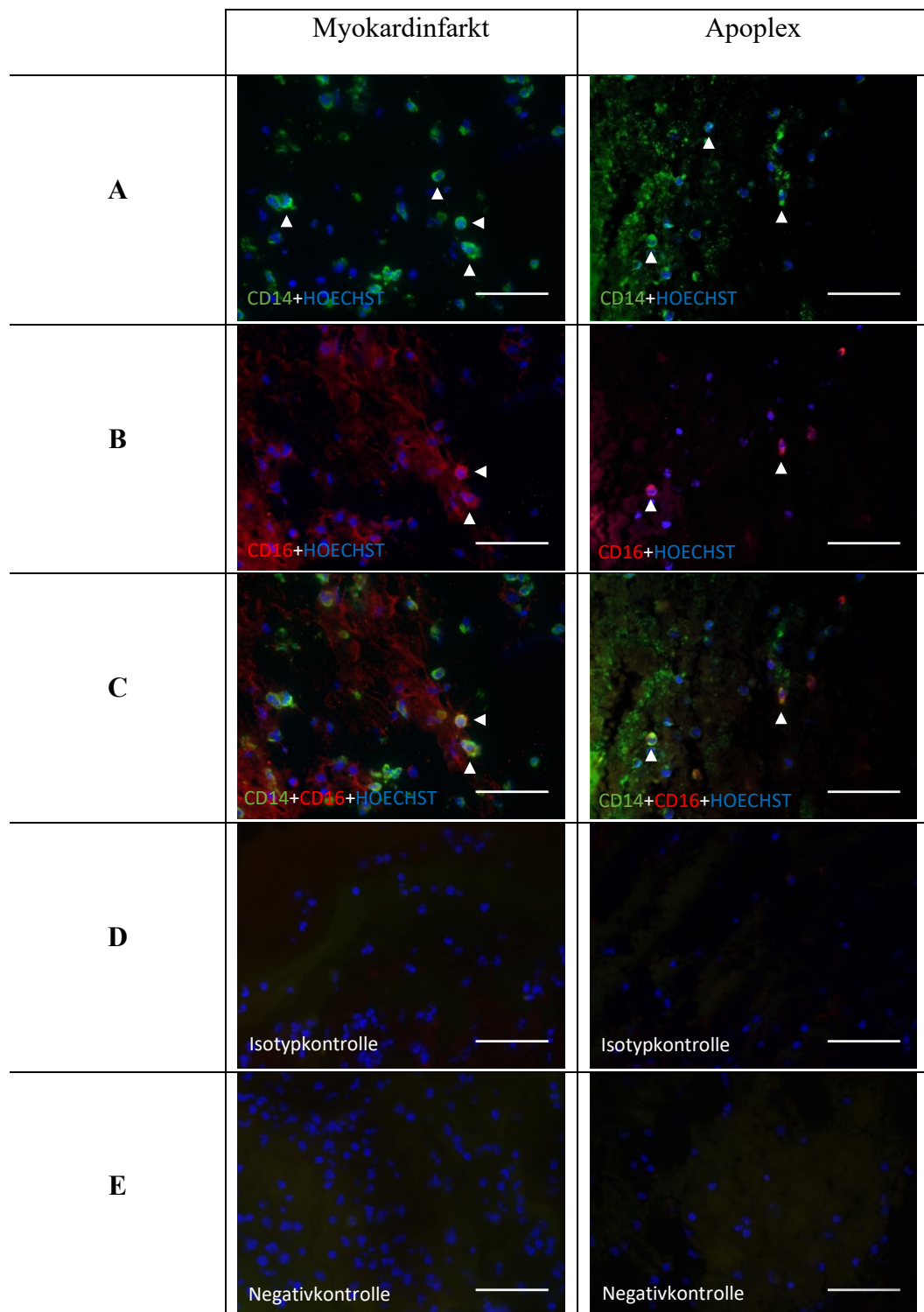


Abbildung 31: CD14/16-Färbung ¹⁹⁶

CD14⁺ in grün, CD16⁺ in rot, Zellkerne in blau, Maßstabsbalken: 50µm. Immunhistologische Darstellung der Monozyten (siehe Pfeile) innerhalb des Myokardinfarkt- und Schlaganfallthrombus. CD14⁺-exprimierende Monozyten (A), CD16⁺-exprimierende Zellen (B), CD14⁺/16⁺-exprimierende Monozyten (C), Isotypkontrollen (D), Negativkontrollen (E).

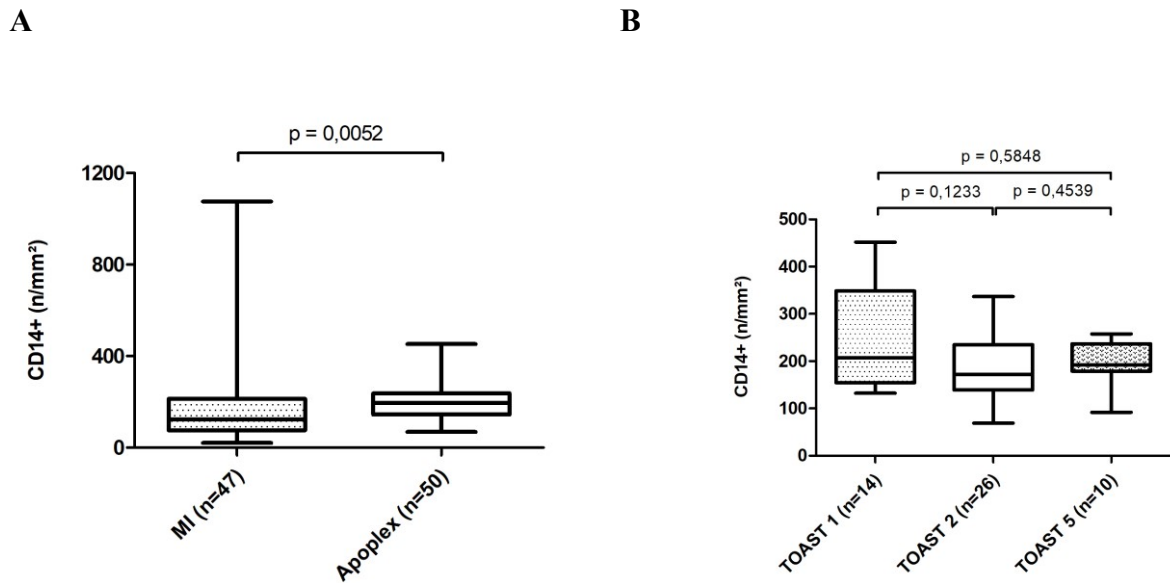


Abbildung 32: CD14- Vergleich der Absolutzahlen der Monozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST Gruppen ¹⁹⁶
Vergleich zwischen Myokardinfarkt und Apoplex (A) und innerhalb der TOAST-Gruppen (B).

CD14 n/mm ²	MI (n=47)	Apoplex (n=50)	TOAST 1 (n=14)	TOAST 2 (n=26)	TOAST 5 (n=10)
	p	p	p	p	p
MI		0,0052	0,0120	0,0365	0,0633
TOAST 1	0,0120			0,1233	0,5848
TOAST 2	0,0365		0,1233		0,4539
TOAST 5	0,0633		0,5848	0,4539	

Tabelle 8: Vergleich der Anzahl der CD14-positiven Zellen zwischen Myokardinfarkt und Apoplex ¹⁹⁶
Vergleich der Anzahl an CD14-positiven Zellen zwischen Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST-Gruppen.

Aufgrund der gezeigten Unterschiede wurde in einer nächsten Stichprobe untersucht, ob sich Unterschiede in den Subpopulationen der Monozyten, d.h. CD14⁺16⁻ bzw. CD14⁺16⁺ exprimierenden Monozyten zeigten (s. Abb. 33 und Tabelle 9).

In der untersuchten Stichprobe machte der Anteil der CD14⁺16⁻-Monozyten an allen Monozyten (d.h. CD14⁺ exprimierenden Zellen) im Myokardinfarkt einen signifikant höheren Anteil aus als im Apoplex (p= 0,0003), umgekehrt war somit der Anteil an intermediären/nicht-klassischen Monozyten im Apoplex signifikant höher (p= 0,0003).

Der mediane Anteil an klassischen $CD14^+16^-$ -exprimierenden Zellen in der untersuchten Stichprobe im Myokardinfarkt lag dabei bei 95,4%, im Apoplex bei 84,3%. Der mediane Anteil an nicht-klassischen bzw. intermediären Monozyten betrug umgekehrt 4,6% im Myokardinfarkt und 15,7% im Apoplex.

Absolut zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an $CD14^+16^+$ exprimierenden Monozyten im Apoplex ($p < 0,0001$).

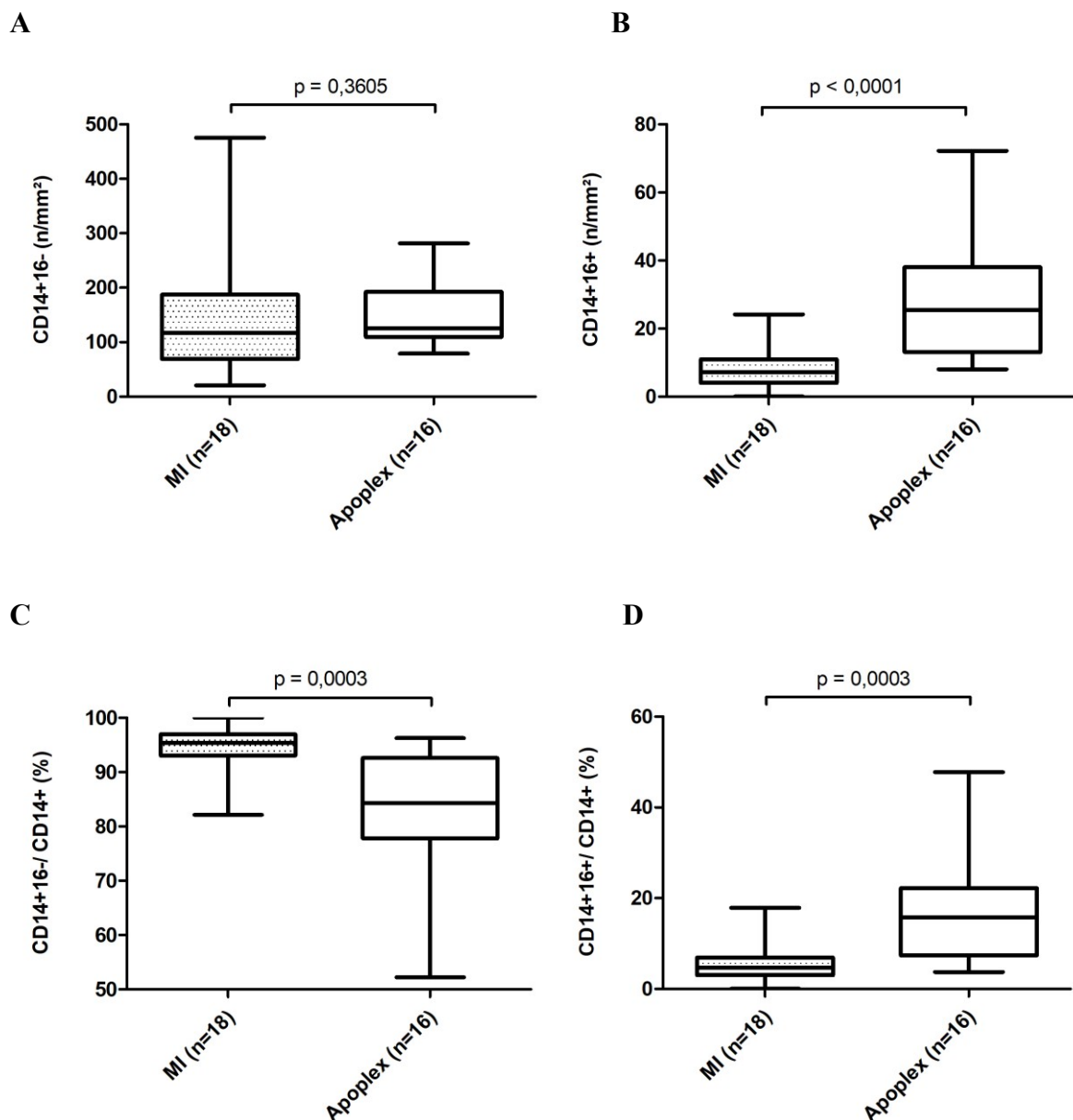


Abbildung 33: Vergleich der Subpopulationen der Monozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex. Vergleich der klassischen (A) und der nicht-klassischen/intermediären Monozyten (B) zwischen Myokardinfarkt und Apoplex. Anteil der klassischen (C) bzw. nicht-klassischen/intermediären (D) Monozyten an allen $CD14^+$ -exprimierenden Monozyten

A

CD14+16- n/mm ²	MI (n= 18)	Apoplex (n=16)	TOAST 1 (n=5)	TOAST 2 (n=10)	TOAST 5 (n=1)
	p	p	p	p	
MI		0,3605	0,3515	0,5490	
TOAST 1	0,3515			0,3710	
TOAST 2	0,5490		0,3710		
TOAST 5					

B

CD14+16+ n/mm ²	MI (n= 18)	Apoplex (n=16)	TOAST 1 (n=5)	TOAST 2 (n=10)	TOAST 5 (n=1)
	p	p	p	p	
MI		<0,0001	0,0041	0,0005	
TOAST 1	0,0041			0,3710	
TOAST 2	0,0005		0,3710		
TOAST 5					

Tabelle 9: Vergleich der Anzahl der Subpopulationen der Monozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex. Vergleich der Anzahl an CD14+16- (A) bzw. CD14+16+ (B) exprimierenden Monozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST-Gruppen.

Beim Vergleich der Anzahl von klassischen bzw. nicht-klassischen/intermediären Monozyten (s. Tabelle 9) zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an CD14⁺16⁺ exprimierenden Monozyten in der TOAST 1- und TOAST 2-Gruppe verglichen mit dem Myokardinfarkt. Bei den klassischen Monozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

4.2.5 Höhere Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Apoplex

Ebenfalls untersucht wurden die eosinophilen Granulozyten, welche mithilfe der Luna-Färbung detektiert werden konnten (s. Abb. 34).

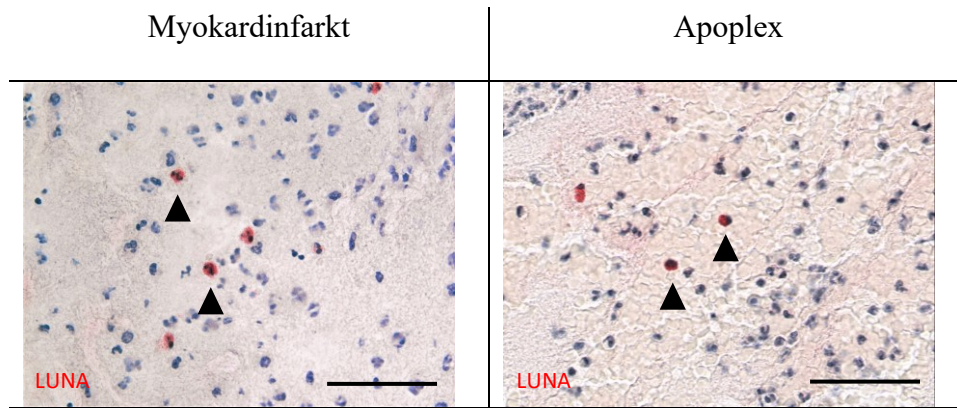


Abbildung 34: Luna-Färbung¹⁹⁶
Maßstabsbalken: 50µm. Darstellung der eosinophilen Granulozyten (in rot, siehe Pfeile).

Die statistische Vergleich der eosinophilen Granulozyten pro mm² Fläche zeigte signifikant höhere Anzahlen im Apoplex ($p < 0,0001$), der TOAST 2- Gruppe ($p < 0,0001$) und der TOAST 5- Gruppe ($p = 0,0164$) im Vergleich zum Myokardinfarkt (s. Abb. 35 und Tabelle 10).

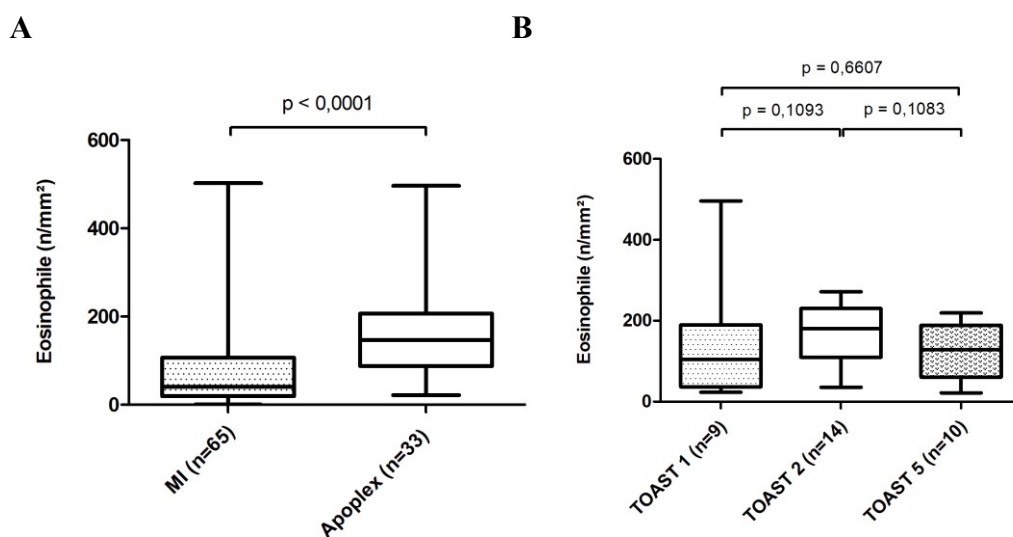


Abbildung 35: Vergleich der Absolutzahlen der eosinophilen Granulozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex, sowie innerhalb der TOAST- Gruppen¹⁹⁶

Eosinophile n/mm ²	MI (n=65)	Apoplex (n=33)	TOAST 1 (n=9)	TOAST 2 (n=14)	TOAST 5 (n=10)
	p	p	p	p	p
MI		<0,0001	0,1065	<0,0001	0,0185
TOAST 1	0,1065			0,1093	0,6607
TOAST 2	<0,0001		0,1093		0,1083
TOAST 5	0,0185		0,6607	0,1083	

Tabelle 10: Vergleich Absolutzahlen der eosinophilen Granulozyten von Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST-Gruppen ¹⁹⁶

4.2.6 Höhere Anzahl an T- und B-Lymphozyten im Apoplex

Als letzte Zellgruppe wurden die T- und B-Lymphozyten untersucht. Hierbei wurde CD3 als Marker für die T-Zellen und CD20 für die B-Zellen angefärbt (s. Abb. 36).

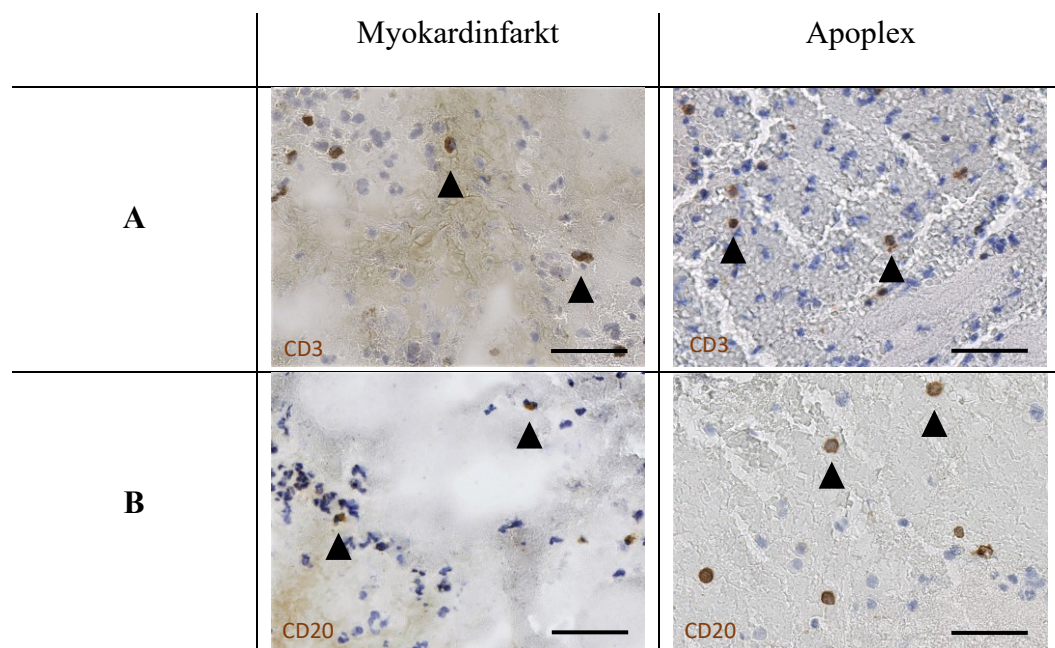


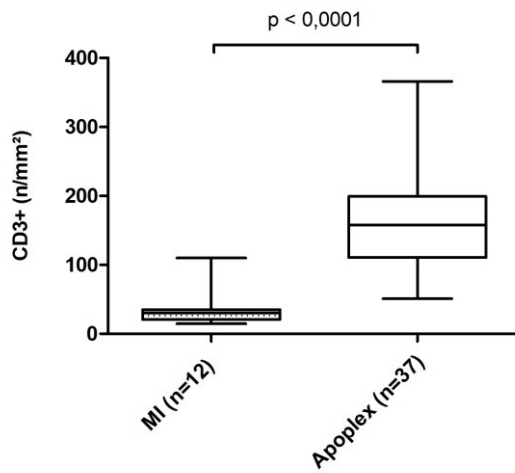
Abbildung 36: CD3- und CD20-Färbung ¹⁹⁶

Maßstabsbalken: 50µm. Darstellung der CD3-positiven T-Lymphozyten (A) bzw. CD20-positiven B-Lymphozyten (B) im Myokardinfarkt und Apoplex (in braun, s.Pfeile).

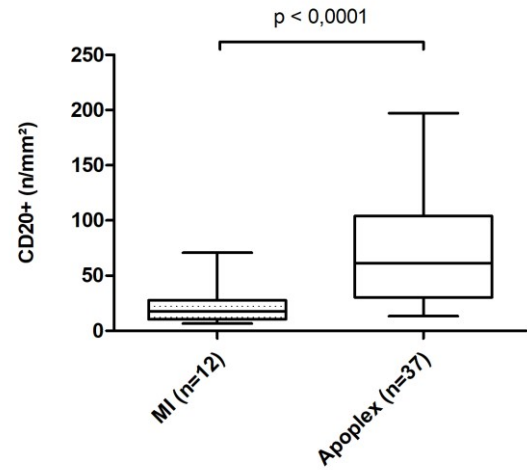
In den zufälligen Stichproben der CD3- und CD20-Färbung zeigten sich sowohl bei den T-Lymphozyten, als auch den B-Lymphozyten jeweils eine signifikant höhere Anzahl an Lymphozyten in der Apoplexgruppe verglichen mit der Myokardinfarktgruppe (CD3: $p < 0,0001$,

CD20: $p < 0,0001$), wie Abbildung 37 zeigt. Dies galt ebenfalls für die einzelnen TOAST-Gruppen. Innerhalb der TOAST-Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (s. Tabelle 11).

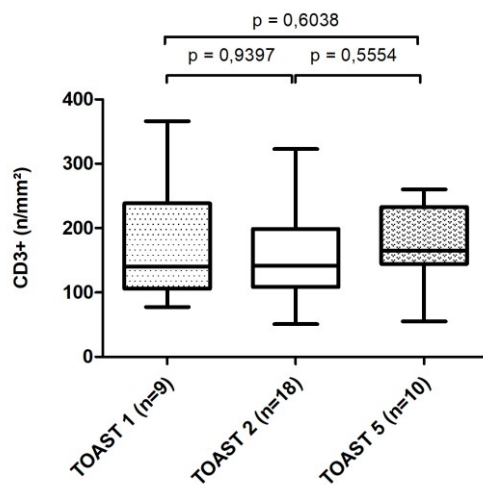
A



B



C



D

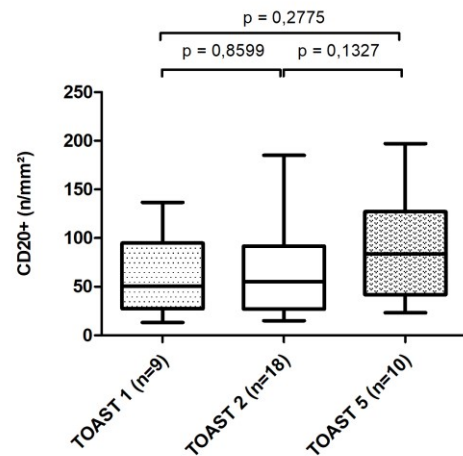


Abbildung 37: Vergleich der Absolutzahlen der T-/B-Lymphozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex¹⁹⁶
 Vergleich der Absolutzahlen der CD3- (A) und CD20-Zellen (B) zwischen Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST-Gruppen (C,D).

A

CD3+ n/mm ²	MI (n=12)	Apoplex (n=37)	TOAST 1 (n=9)	TOAST 2 (n=18)	TOAST 5 (n=10)
	p	p	p	p	p
MI		<0,0001	0,0003	<0,0001	0,0002
TOAST 1	0,0003			0,9397	0,6038
TOAST 2	<0,0001		0,9397		0,5554
TOAST 5	0,0002		0,6038	0,5554	

B

CD20+ n/mm ²	MI (n=12)	Apoplex (n=37)	TOAST 1 (n=9)	TOAST 2 (n=18)	TOAST 5 (n=10)
	p	p	p	p	p
MI		0,0001	0,0062	0,0021	0,0004
TOAST 1	0,0062			0,8599	0,2775
TOAST 2	0,0021		0,8599		0,1327
TOAST 5	0,0004		0,2775	0,1327	

Tabelle 11: Vergleich der Absolutzahlen der T-/B-Lymphozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex¹⁹⁶
Vergleich Absolutzahlen der T-Lymphozyten (A) und B-Lymphozyten (B) von Myokardinfarkt und Apoplex
und innerhalb der TOAST-Gruppen.

4.3 Korrelation der Färbungen untereinander und mit klinischen Parametern

4.3.1 Vergleich klinischer Parameter der Apoplexpatienten

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, wurden verschiedene klinisch- interventionelle Parameter der Apoplexpatienten erhoben und anschließend untereinander korreliert (s. Tabelle 12).

Apoplex		Zeit bis Behandlung (min)	Rekanalisationszeit (min)	Gesamtzeit (min)	Rekanalisationsmanöver (RM) (n)	NIHSS pre	NIHSS post	mRS 90 Tage
Zeit bis Behandlung (min)	r	/	/	0,7997	/	0,2453	0,3458	0,4874
	p	/	/	<0,0001	/	0,0589	0,0120	0,0157
	n	/	/	61	/	60	52	24
Rekanalisationszeit (min)	r	/	/	0,4782	0,8517	0,05521	0,3476	0,3548
	p	/	/	<0,0001	<0,0001	0,6547	0,0061	0,0753
	n	/	/	63	70	68	61	26
Gesamtzeit (min)	r	0,7997	0,4782	/	/	0,2637	0,5571	0,6133
	p	<0,0001	<0,0001	/	/	0,0400	<0,0001	0,0011
	n	61	63	/	/	61	54	25
RM (n)	r	/	0,8517	/	/	/	0,4362	0,2207
	p	/	<0,0001	/	/	/	0,0004	0,2786
	n	/	70	/	/	/	61	26
NIHSS pre	r	0,2453	0,05521	0,2637	/	/	0,5316	0,4073
	p	0,0589	0,6547	0,0400	/	/	<0,0001	0,0389
	n	60	68	61	/	/	61	26
NIHSS post	r	0,3458	0,3476	0,5571	0,4362	0,5316	/	0,7990
	p	0,0120	0,0061	<0,0001	0,0004	<0,0001	/	<0,0001
	n	52	61	54	61	61	/	22
mRS 90 Tage	r	0,4874	0,3548	0,6133	0,2207	0,4073	0,7990	/
	p	0,0157	0,0753	0,0011	0,2786	0,0389	<0,0001	/
	n	24	26	25	26	26	22	/

Tabelle 12: Vergleich klinischer Parameter der Apoplexpatienten¹⁹⁶

Es zeigte sich, dass eine längere Zeit bis zur Behandlung positiv mit der NIHSS post ($r=0,3458$, $p=0,0120$), sowie mit der mRS 90d ($r=0,4874$, $p=0,0157$) korrelierte. Eine längere Zeit bis zur Behandlung korrelierte also mit einem schlechteren klinischen Outcome. Gleiches zeigte sich für die Korrelation zwischen Rekanalisationszeit und der NIHSS post, die ebenfalls positiv miteinander korrelierten ($r=0,3476$, $p=0,0061$). Bei der Korrelation der Gesamtzeit mit der NIHSS post ($r=0,5571$, $p<0,0001$) und der mRS 90d ($r=0,6133$, $p=0,0011$) zeigten sich hoch signifikante positive Korrelationen. Je mehr Rekanalisationsmanöver durchgeführt wurden, desto länger war in der Folge die Rekanalisationszeit ($r=0,8517$, $p<0,0001$) und desto höher war wiederum die NIHSS post ($r=0,4362$, $p=0,0004$).

Die NIHSS pre korrelierte ebenfalls positiv mit der NIHSS post ($r= 0,5316$, $p<0,0001$), sowie mit der mRS 90d ($r= 0,4073$, $p= 0,0389$) und der Gesamtzeit ($r= 0,2637$, $p= 0,0400$).

Je höher die NIHSS post war, desto höher auch die Maßzahl der mRS 90d ($r= 0,7990$, $p<0,0001$). Das bedeutete: eine erhöhte NIHSS post war mit einem verschlechterten neurologischen Patientenstatus nach 90 Tagen assoziiert.

Insgesamt profitierten die Patienten mit akutem ischämischen Apoplex also- wie erwartet -von einer sehr zeitnahen Vorstellung in der Klinik, unmittelbar nach Symptombeginn. Darüber hinaus profitierten sie in der Folge von einer zügigen Behandlung im Krankenhaus einschließlich Bildgebung und Rekanalisation mit möglichst wenig Manövern. Dies ist vergleichbar mit den Daten bezüglich einer schnellen Rekanalisation bei Patienten mit STEMI, bei denen leitliniengerecht eine Versorgung innerhalb kurzer Zeit nach Aufnahme in der Klinik angestrebt wird (s. Kapitel 1.4.3.3).

4.3.2 Positive Korrelation zwischen den kernhaltigen Zellen, NETs und dem Fibrin-/Thrombozytenanteil und deren Einfluss auf klinische Parameter im Apoplex

Die Ergebnisse der HE-Färbung der Apoplexpatienten wurden mit denen der anderen Färbungen, sowie mit den oben beschriebenen klinischen Parametern verglichen (s. Tabelle 13).

Um zu verifizieren, dass die Zahl der kernhaltigen Zellen (n/mm^2) der Fluoreszenzfärbungen und der relative Anteil an Leukozyten der HE-Färbung gleichgerichtete Ergebnisse liefern, wurden beide miteinander korreliert ($r= 0,3893$, $p= 0,0008$). Außerdem wurden sie mit dem Anteil an Fibrin-/Thrombozytenfläche und der Erythrozytenfläche der HE-Färbung korreliert.

Je höher die Leukozytenzahl, desto höher der Anteil an Fibrin/Thrombozyten ($r= 0,2643$, $p= 0,0259$) und desto geringer der Anteil an Erythrozyten pro Fläche ($r= -0,3641$, $p= 0,0018$). Diese Ergebnisse bestätigten sich bei der Korrelation des Leukozytenanteils in der HE-Färbung mit ebendiesen (s. Tabelle 13 und Abb. 38).

Je höher der Leukozytenanteil war, desto geringer die Anzahl der CD3-positiven Zellen ($r= -0,3606$, $p= 0,0284$). Beim Erythrozytenanteil zeigte sich hingegen eine positive Korrelation mit der Anzahl der CD3-positiven Zellen ($r= 0,3557$, $p= 0,0307$). Darüber hinaus zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an eosinophilen Granulozyten und dem Fibrin-/Thrombozytenanteil ($r= 0,3867$, $p= 0,0262$) bzw. eine negative Korrelation zum Erythrozytenanteil ($r= -0,3870$, $p= 0,0261$)

Apoplex		Leukozyten (%)	Fibrin/Thrombozyten (%)	Erythrozyten (%)
kernhaltige Zellen (n/mm ²)	r	0,3893	0,2643	-0,3641
	p	0,0008	0,0259	0,0018
	n	71	71	71
Leukozyten (%)	r		0,3273	-0,5062
	p		0,0053	<0,0001
	n		71	71
Fibrin/Thrombozyten (%)	r	0,3273		-0,9641
	p	0,0053		<0,0001
	n	71		71
Erythrozyten (%)	r	-0,5062	-0,9641	
	p	<0,0001	<0,0001	
	n	71	71	
CD41+ (%)	r	0,3395	0,2858	-0,3231
	p	0,0533	0,1068	0,0667
	n	33	33	33
Fbg (%)	r	0,1917	-0,1050	0,06791
	p	0,2626	0,5421	0,6939
	n	36	36	36
Neutrophile (n/mm ²)	r	0,3866	0,1826	-0,2831
	p	0,0009	0,1275	0,0167
	n	71	71	71
NETs (n/mm ²)	r	0,4363	0,2694	-0,3344
	p	0,0001	0,0231	0,0044
	n	71	71	71
CD14+ (n/mm ²)	r	0,01561	0,06478	-0,03126
	p	0,9143	0,6549	0,8294
	n	50	50	50
Eosinophile (n/mm ²)	r	0,2480	0,3867	-0,3870
	p	0,1641	0,0262	0,0261
	n	33	33	33
CD3+ (n/mm ²)	r	-0,3606	-0,3238	0,3557
	p	0,0284	0,0505	0,0307
	n	37	37	37
CD20+ (n/mm ²)	r	-0,2062	-0,2269	0,2424
	p	0,2208	0,1768	0,1484
	n	37	37	37
Zeit bis Behandlung (min)	r	0,09862	0,1297	-0,1033
	p	0,4457	0,3149	0,4244
	n	62	62	62
Rekanalisationszeit (min)	r	0,2635	0,09647	-0,1483
	p	0,0275	0,4269	0,2206
	n	70	70	70
Gesamtzeit (min)	r	0,1382	0,1543	-0,1478
	p	0,2801	0,2271	0,2476
	n	63	63	63
Rekanalisationsmanöver (n)	r	0,2888	0,1310	-0,1804
	p	0,0146	0,2763	0,1323
	n	71	71	71
NIHSS pre	r	0,09884	-0,05183	0,02306
	p	0,4191	0,6723	0,8508
	n	69	69	69
NIHSS post	r	0,2645	0,2379	-0,2856
	p	0,0394	0,0649	0,0257
	n	61	61	61
mRS 90 Tage	r	0,02353	0,06600	0,01662
	p	0,9092	0,7487	0,9358
	n	26	26	26

Tabelle 13: Korrelation der Ergebnisse der HE-Färbung der Apoplexpatienten mit verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen, sowie Korrelation mit klinischen Parametern¹⁹⁶

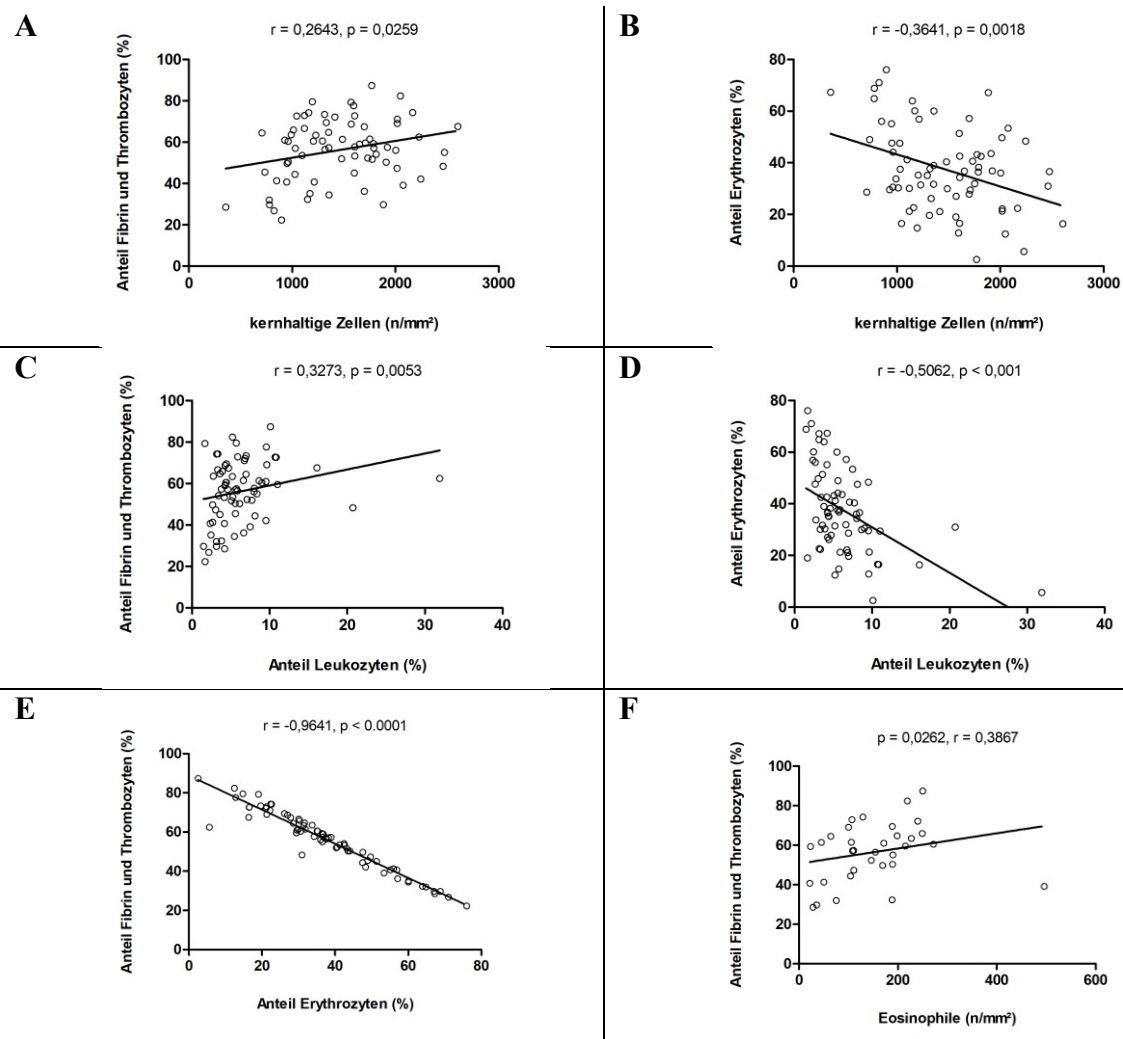


Abbildung 38: Korrelation der Ergebnisse der HE-Färbungen (Apoplex) untereinander und mit weiteren Färbungen

Korrelation der Zahl der kernhaltigen Zellen mit dem Fibrin-/Thrombozytenanteil (A), mit dem Anteil an Erythrozyten (B) Korrelation des Leukozytenanteils mit dem Fibrin-/Thrombozytenanteil (C), bzw. mit dem Erythrozytenanteil (D) Korrelation des Fibrin-/Thrombozytenanteils mit dem Erythrozytenanteil (E), sowie mit den Eosinophilen (F).

Da die Anzahl der Rekanalisationsmanöver ($r = 0,2888$, $p = 0,0146$) und die Rekanalisationzeit ($r = 0,2635$, $p = 0,0275$) positiv mit dem Leukozytenanteil der HE-Färbung korrelierte, wurde untersucht, ob ein größerer Anteil von den neutrophilen Granulozyten gebildeten NETs, die zur Stabilisierung der Thromben durch Bildung von Fibrin-/Thrombozytenaggregaten beitragen können, nachweisbar war. Je höher der Anteil an Leukozyten in der HE-Färbung, desto höher war dabei der Anteil der NETs in der Fluoreszenzfärbung ($r = 0,4363$, $p < 0,0001$). NETs korrelierten dabei positiv mit der Thrombozyten-/Fibrinfläche in der HE-Färbung ($r = 0,2694$, $p = 0,0231$), wie Abbildung 39 zeigt.

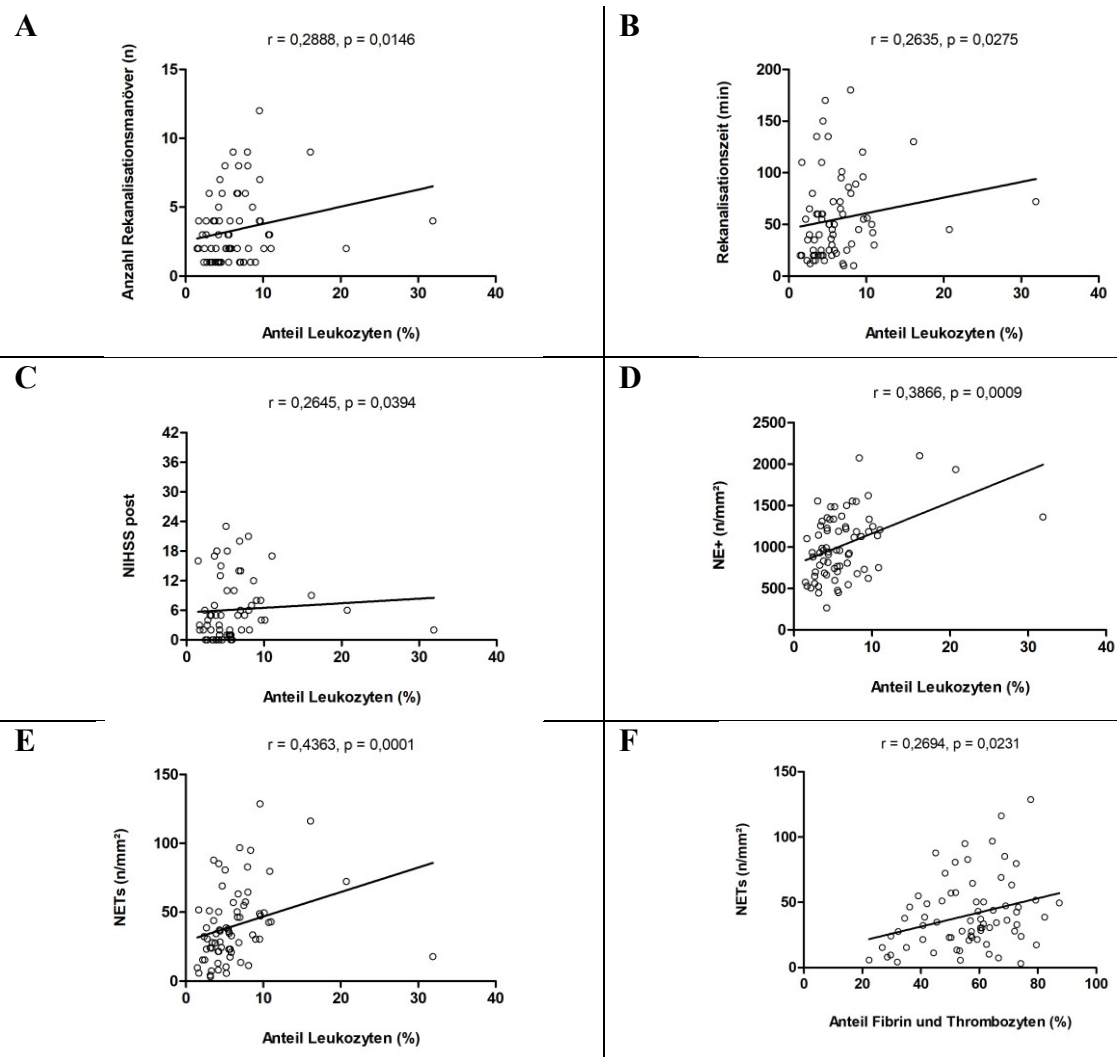


Abbildung 39: Korrelation der Ergebnisse der HE-Färbung mit klinischen Parametern und Immunfluoreszenzfärbungen¹⁹⁶

Korrelation des Leukozytenanteils mit der Anzahl an Rekanalisationsmanövern (A), der Rekanalisationszeit (B) und der NIHSS post (C), Korrelation des Leukozytenanteils mit den Neutrophilen (D) und NETs (E), sowie Korrelation des Fibrin-/Thrombozytenanteils mit den NETs (F)

Des Weiteren zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Leukozytenanteil und der NIHSS post ($r = 0,2645, p = 0,0394$), somit also eine Assoziation mit einem schlechteren klinischen Outcome. Umgekehrt zeigte sich bei einem höheren Erythrozytenanteil eine negative Korrelation mit der NIHSS post ($r = -0,2856, p = 0,0257$).

4.3.3 Zusammenhang zwischen der NIHSS pre und dem Fibrinanteil

Um den Fibrin-/Leukozytenanteil der HE-Färbung weiter zu differenzieren, wurden die Ergebnisse der Thrombozyten- und Fibrinfärbung mit der NE-, und CD14-Färbung, sowie im Apoplex mit den klinischen Parametern korreliert (s. Tabelle 14).

Apoplex		CD41+ (%)	Fbg+ (%)
CD41+ (%)	r		0,2247
	p		0,2086
	n		33
Fbg (%)	r	0,2247	
	p	0,2086	
	n	33	
kernhaltige Zellen (n/mm ²)	r	0,1846	-0,02495
	p	0,3038	0,8851
	n	33	36
Neutrophile (n/mm ²)	r	0,1275	-0,02737
	p	0,4797	0,8741
	n	33	36
NETs (n/mm ²)	r	0,02023	0,08676
	p	0,9110	0,6149
	n	33	36
CD14+ (n/mm ²)	r	0,1408	-0,1075
	p	0,4345	0,5386
	n	33	35
Eosinophile (n/mm ²)	r	0,003674	-0,1574
	p	0,9852	0,4149
	n	28	29
CD3+ (n/mm ²)	r	-0,1993	-0,3132
	p	0,2742	0,0670
	n	32	35
CD20+ (n/mm ²)	r	-0,1362	-0,04280
	p	0,4573	0,8071
	n	32	35
Zeit bis Behandlung (min)	r	0,1904	0,4440
	p	0,3136	0,0096
	n	30	33
Rekanalisationszeit (min)	r	-0,04670	-0,1944
	p	0,7996	0,2630
	n	32	35
Gesamtzeit (min)	r	0,1177	0,3024
	p	0,5432	0,0925
	n	29	32
Rekanalisations- manöver (n)	r	0,02242	0,02255
	p	0,9014	0,8961
	n	33	36
NIHSS pre	r	-0,1049	0,3527
	p	0,5613	0,0321
	n	33	35
NIHSS post	r	-0,08775	0,1236
	p	0,6508	0,5003
	n	29	32
mRS 90 Tage	r	0,1504	-0,1413
	p	0,6590	0,6786
	n	11	11

Tabelle 14: Korrelation der CD41- und Fibrinogenfärbung mit weiteren Färbungen, sowie mit klinischen Parametern (Apoplex) ¹⁹⁶

Eine positive Korrelation zeigte sich bei der Zeit bis zur Behandlung und dem Anteil an Fibrin/Fibrinogen pro Thrombusgesamtfläche ($r= 0,4440$, $p= 0,0096$). Ebenfalls korrelierte die NIHSS pre positiv mit dem Anteil an Fibrin/Fibrinogen ($r= 0,3527$, $p= 0,0321$). Eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an NETs und CD41 bzw. Fibrinogen, die untersucht wurde wegen der oben beschriebenen Ergebnisse der HE-Färbung, zeigte sich nicht. Dies galt sowohl für die Apoplex-, als auch die Myokardinfarktthromben (s. Tabelle 15).

Myokardinfarkt		CD41+ (%)	Fbg+ (%)
CD41+ (%)	r		0,2800
	p		0,1519
	n		24
Fbg (%)	r	0,2800	
	p	0,1519	
	n	24	
kernhaltige Zellen (n/mm ²)	r	0,2190	0,09295
	p	0,2536	0,6069
	n	29	33
Neutrophile (n/mm ²)	r	-0,02576	0,08406
	p	0,8945	0,6419
	n	29	33
NETs (n/mm ²)	r	0,2975	-0,01950
	p	0,3235	0,9496
	n	13	13
CD14+ (n/mm ²)	r	0,07708	0,01282
	p	0,7267	0,9494
	n	23	27
Eosinophile (n/mm ²)	r	0,08625	-0,07625
	p	0,6688	0,6835
	n	27	31
CD3+ (n/mm ²)	r	0,3827	-0,4914
	p	0,2483	0,2162
	n	11	8
CD20+ (n/mm ²)	r	-0,1385	-0,5934
	p	0,6847	0,1210
	n	11	8

Tabelle 15: Korrelation der CD41- und Fibrinogenfärbung mit weiteren Färbungen (Myokardinfarkt)

4.3.4 Positive Korrelation zwischen der Zahl der kernhaltigen Zellen und der Zahl an Neutrophilen, NETs und Monozyten im Myokardinfarkt und Apoplex

Bei Untersuchung der Ergebnisse der HE-Färbung zeigte sich, dass ein höherer Anteil an Leukozyten mit einem erhöhten Anteil an NETs assoziiert ist. Dieses Ergebnis wurde in der Immunfluoreszenzfärbung nochmals mit absoluten Zellzahlen überprüft.

Außerdem wurden Korrelationen zwischen kernhaltigen Zellen, Neutrophilen, Monozyten, Eosinophilen und den Lymphozyten sowohl im Myokardinfarkt als auch im Apoplex durchgeführt (s. Tabellen 16, 17).

Myokardinfarkt		kernhaltige Zellen (n/mm ²)	Neutrophile (n/mm ²)	NETs gesamt (n/mm ²)	NETs vorhanden (n/mm ²)	CD14+ (n/mm ²)
kernhaltige Zellen (n/mm ²)	r	/	0,7639	0,2955	0,3082	0,3560
	p	/	<0,0001	0,0117	0,2638	0,0140
	n	/	72	72	15	47
Neutrophile (n/mm ²)	r	0,7734	/	0,2167	0,3884	0,3202
	p	<0,0001	/	0,0675	0,1525	0,0282
	n	72	/	72	15	47
NETs gesamt (n/mm ²)	r	0,2955	0,2167	/	/	0,06288
	p	0,0117	0,0675	/	/	0,6746
	n	72	72	/	/	47
NETs vorhanden (n/mm ²)	r	0,3082	0,3884	/	/	0,4036
	p	0,2638	0,1525	/	/	0,1524
	n	15	15	/	/	14
CD14+ (n/mm ²)	r	0,3560	0,3202	0,06288	0,4036	/
	p	0,0140	0,0282	0,6746	0,1524	/
	n	47	47	47	14	/
Eosinophile (n/mm ²)	r	0,2081	0,2902	0,1005	-0,06654	0,1575
	p	0,0961	0,0190	0,4259	0,8212	0,3015
	n	65	65	65	14	45
CD3+ (n/mm ²)	r	0,3497	-0,2797	0,2502	/	/
	p	0,2652	0,3786	0,4328	/	/
	n	12	12	12	/	/
CD20+ (n/mm ²)	r	0,1748	-0,2657	0,4379	/	/
	p	0,5868	0,4038	0,1545	/	/
	n	12	12	12	/	/

Tabelle 16: Korrelation der kernhaltigen Zellen, Neutrophilen, NETs und Monozyten (Myokardinfarkt)¹⁹⁶

Apoplex		kernhaltige Zellen (n/mm ²)	Neutrophile (n/mm ²)	NETs (n/mm ²)	CD14+ (n/mm ²)
kernhaltige Zellen (n/mm ²)	r		0,9330	0,4611	0,3189
	p		<0,0001	<0,0001	0,0240
	n		71	71	50
Neutrophile (n/mm ²)	r	0,9330		0,6229	0,2644
	p	<0,0001		<0,0001	0,0635
	n	71		71	50
NETs (n/mm ²)	r	0,4611	0,6229		0,1008
	p	<0,0001	<0,0001		0,4863
	n	71	71		50
CD14+ (n/mm ²)	r	0,3189	0,2644	0,1008	
	p	0,0240	0,0635	0,4863	
	n	50	50	50	
Eosinophile (n/mm ²)	r	0,2824	0,2667	0,3412	0,1422
	p	0,1113	0,1335	0,0520	0,4536
	n	33	33	33	30
CD3+ (n/mm ²)	r	0,01984	0,06009	0,1142	
	p	0,9072	0,7239	0,5010	
	n	37	37	37	
CD20+ (n/mm ²)	r	0,02159	0,05191	0,2698	
	p	0,8991	0,7603	0,1063	
	n	37	37	37	

Tabelle 17: Korrelation der kernhaltigen Zellen, Neutrophilen, NETs und Monozyten (Apoplex)¹⁹⁶

Folgende signifikante positive Korrelationen gefunden werden:

Erstens, je mehr kernhaltige Zellen absolut vorhanden waren, desto mehr neutrophile Granulozyten (**Myokardinfarkt**: $r = 0,7734$, $p < 0,0001$; **Apoplex**: $r = 0,9330$, $p < 0,0001$) und CD14-positive Monozyten (**Myokardinfarkt**: $r = 0,3560$, $p = 0,0140$; **Apoplex**: $r = 0,3189$, $p = 0,0240$) fanden sich (s. Abb. 40).

Zweitens, eine höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten war in den untersuchten Stichproben sowohl im Myokardinfarkt ($r = 0,3202$, $p = 0,0282$), als auch im Apoplex mit einer erhöhten Anzahl an Monozyten assoziiert (s. Abb. 41), in letzterem allerdings nicht statistisch signifikant ($r = 0,2644$, $p = 0,0635$).

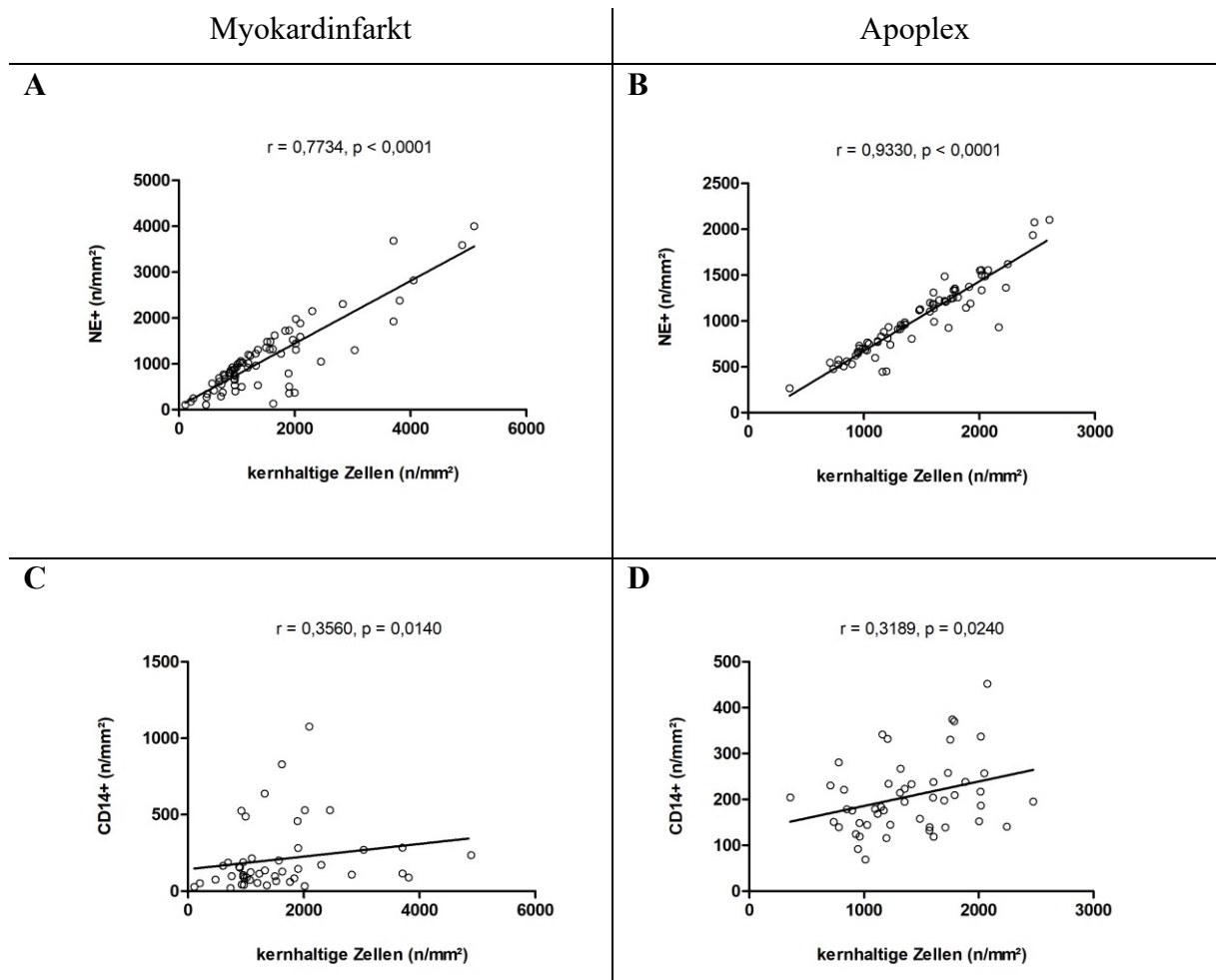


Abbildung 40: Korrelation der NE- und CD14- Färbung

Korrelation der kernhaltigen Zellen mit neutrophilen Granulozyten (A,B) und mit Monozyten (C,D) im Myokardinfarkt und Apoplex.

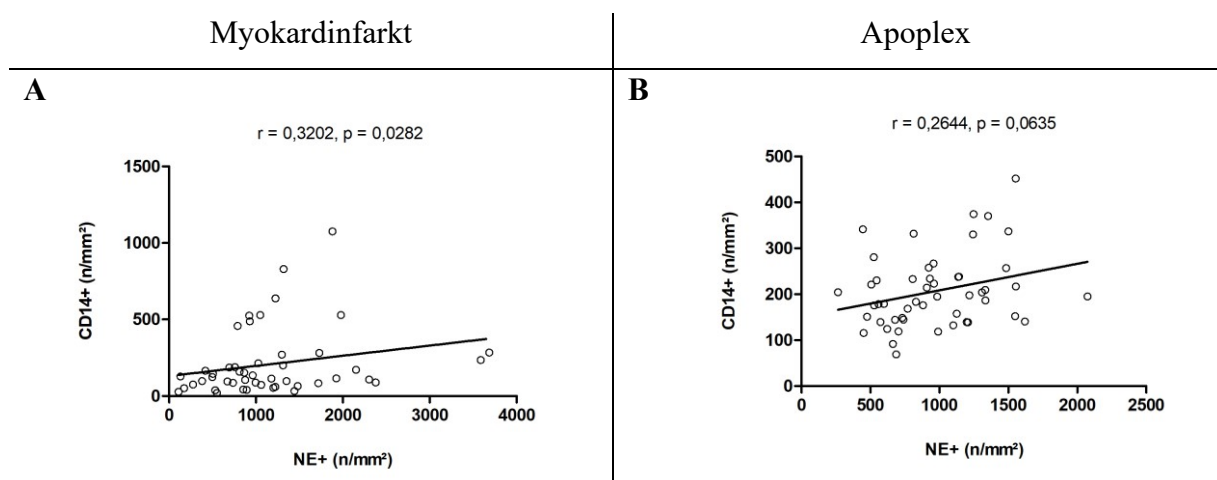


Abbildung 41: Korrelation der NE- mit der CD14-Färbung

Korrelation der neutrophilen Granulozyten mit den CD14-positiven Monozyten im Myokardinfarkt (A) und Apoplex (B)

Drittens, im Apoplex konnte gezeigt werden, dass eine höhere Anzahl an kernhaltigen Zellen ($r = 0,4611$, $p < 0,0001$) bzw. neutrophilen Granulozyten ($r = 0,6229$, $p < 0,0001$) auch mit einer erhöhten Anzahl an NETs assoziiert war. Bei der Untersuchung im Myokardinfarkt zeigte sich dagegen lediglich eine signifikante positive Korrelation zwischen kernhaltigen Zellen und vorhandenen NETs ($r = 0,2955$, $p = 0,0117$), jedoch nicht zwischen Neutrophilen und NETs aller Patienten ($r = 0,3884$, $p = 0,1525$), s. Abb. 42.

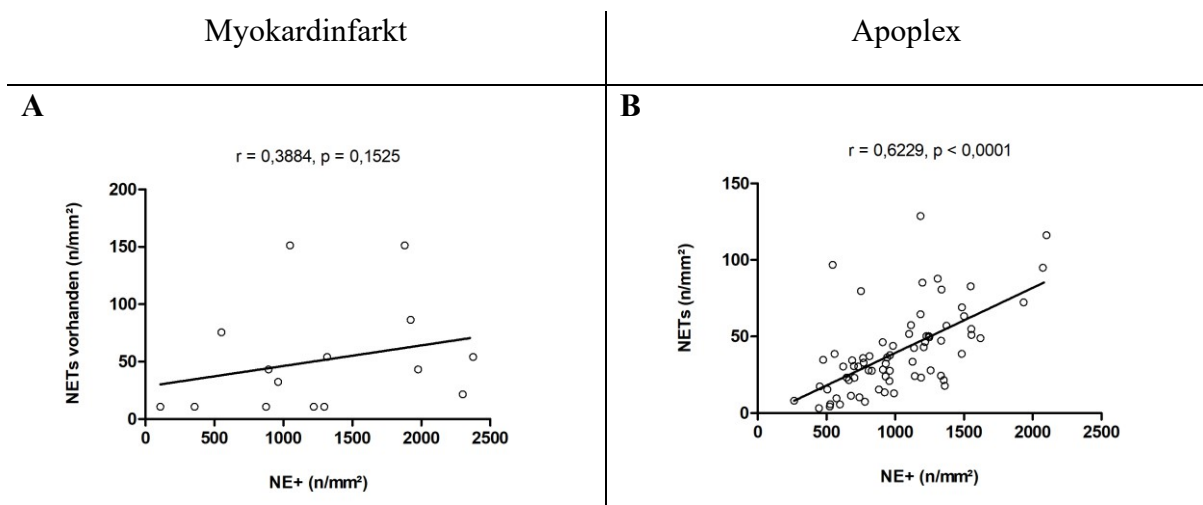


Abbildung 42: Korrelationen der NE-Färbung

Korrelation der vorhandenen NETs im Myokardinfarkt (A) und NETs im Apoplex (B) jeweils mit der Anzahl an Neutrophilen

Untersucht wurde weiterhin die Korrelation der kernhaltigen Zellen, Neutrophilen, NETs und Monozyten mit den oben beschriebenen klinischen Parametern der Apoplexpatienten (s. Tabelle 18).

Apoplex		kernhaltige Zellen (n/mm ²)	Neutrophile (n/mm ²)	NETs (n/mm ²)	Monozyten (n/mm ²)
Zeit bis zur Behandlung (min)	r	-0,03746	-0,07343	-0,02025	-0,1755
	p	0,7725	0,5706	0,8759	0,2544
	n	62	62	62	44
Rekanalisationszeit (min)	r	0,1895	0,2982	0,3823	0,05258
	p	0,1161	0,0121	0,0011	0,7197
	n	70	70	70	49
Gesamtzeit (min)	r	0,1656	0,1792	0,2523	-0,03718
	p	0,1946	0,1599	0,0460	0,8129
	n	63	63	63	43
Rekanalisationsmanöver (n)	r	0,2123	0,3095	0,4919	-0,08225
	p	0,0756	0,0086	<0,0001	0,5701
	n	71	71	71	50
NIHSS pre	r	0,1721	0,1956	0,1420	0,06565
	p	0,1574	0,1072	0,2445	0,6506
	n	69	69	69	50
NIHSS post	r	0,1702	0,2513	0,4449	0,1430
	p	0,1897	0,0508	0,0003	0,3546
	n	61	61	61	44
mRS 90 Tage	r	0,035	0,208	0,440	0,176
	p	0,837	0,210	0,006	0,410
	n	38	38	38	24

Tabelle 18: Korrelation der kernhaltigen Zellen, Neutrophilen, NETs und Monozyten mit klinischen Parametern (Apoplex)¹⁹⁶

Hier zeigte sich, dass eine höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten positiv mit der Anzahl an Rekanalisationsmanövern ($r= 0,3095$, $p= 0,0086$) und mit der Rekanalisationszeit ($r= 0,2982$, $p= 0,0121$) korrelierte.

Die von den neutrophilen Granulozyten gebildeten NETs korrelierten positiv mit der Anzahl der Rekanalisationsmanöver ($r= 0,4919$, $p<0.0001$), der Rekanalisationszeit ($r= 0,3823$, $p= 0,0011$), der Gesamtzeit ($r= 0,2523$, $p= 0,0460$), und der NIHSS post ($r= 0,4449$, $p= 0,0003$) und der mRS 90d ($r= 0,440$, $p= 0,006$), wie der Abbildung 43 zu entnehmen ist.

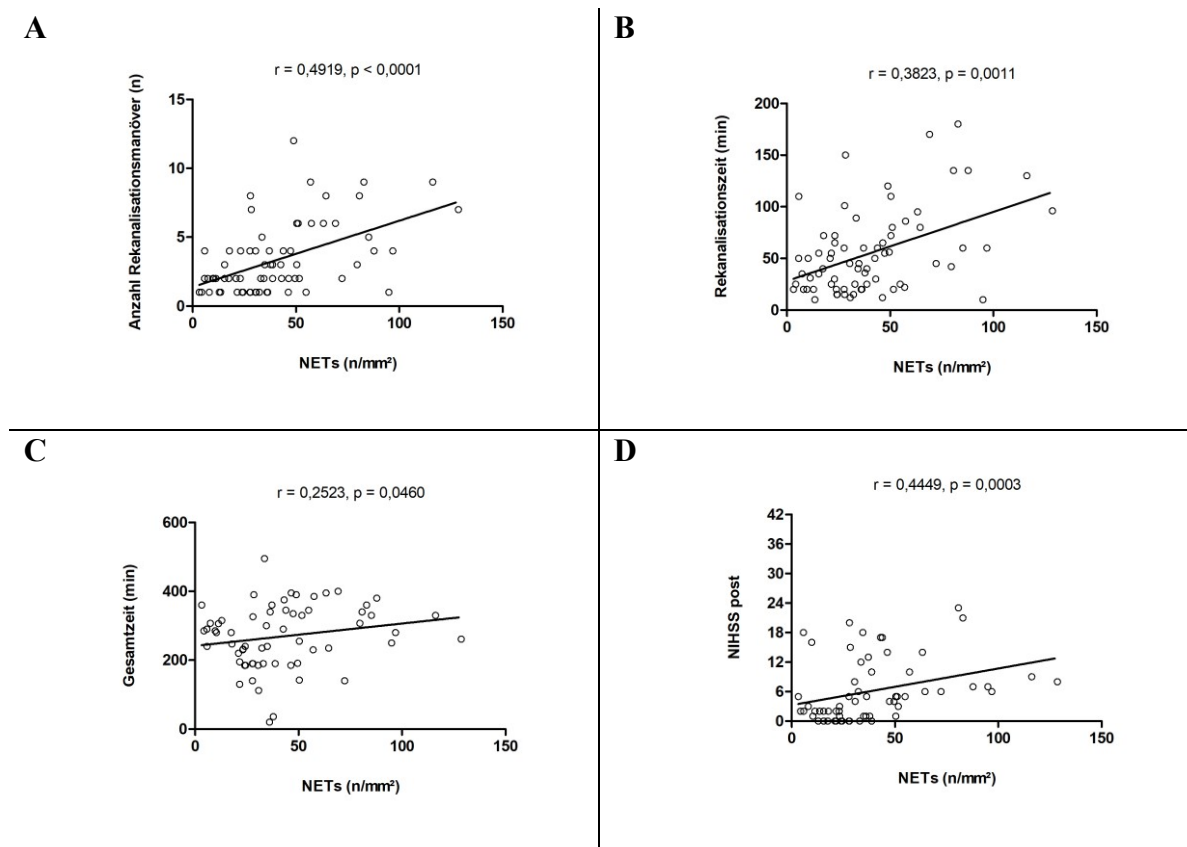


Abbildung 43: Korrelation der NE-Färbung mit klinischen Parametern (Apoplex) ¹⁹⁶
 Einfluss der NETs im Apoplex auf die Anzahl der Rekanalisationsmanöver (A), die Rekanalisationszeit (B), die Gesamtzeit (C) und die NIHSS post (D).

4.3.5 Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf den Fibrin-/Thrombozytenanteil und das klinische Outcome der Patienten mit Apoplex

Zuletzt wurden die Ergebnisse der Färbungen der T- und B-Lymphozyten, sowie der eosinophilen Granulozyten mit der HE-, NE-, CD14-, CD41-, und Fibrinfärbung korreliert. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der Färbungen der Apoplexpatienten mit den klinischen Parametern korreliert (Abb. 44, 45, sowie Tabelle 19).

Im Myokardinfarkt zeigte sich dabei eine positive Korrelation der Anzahl der eosinophilen Granulozyten und der Anzahl der neutrophilen Granulozyten ($r = 0,2902$, $p = 0,0190$), wohingegen im Apoplex keine positive Korrelation zwischen eosinophilen Granulozyten und Neutrophilen gefunden werden konnte ($r = 0,2667$, $p = 0,1335$), wie Abbildungen 44 zeigt.

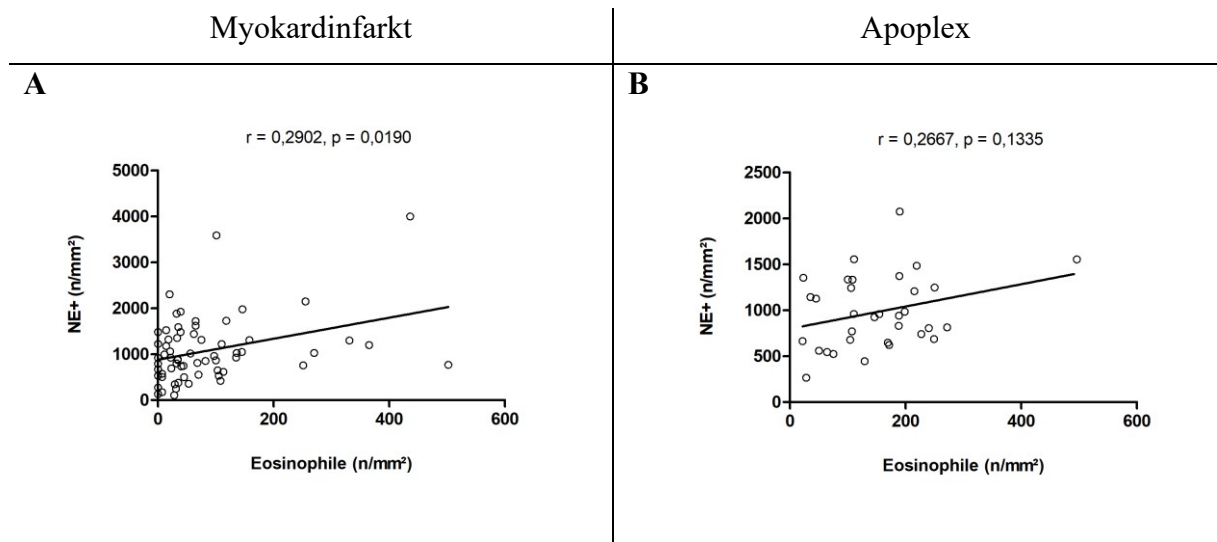


Abbildung 44: Korrelation der Luna-Färbung mit der NE-Färbung
Korrelation der Luna-Färbung mit der NE-Färbung im Myokardinfarkt (A) und Apoplex (B)

Apoplex

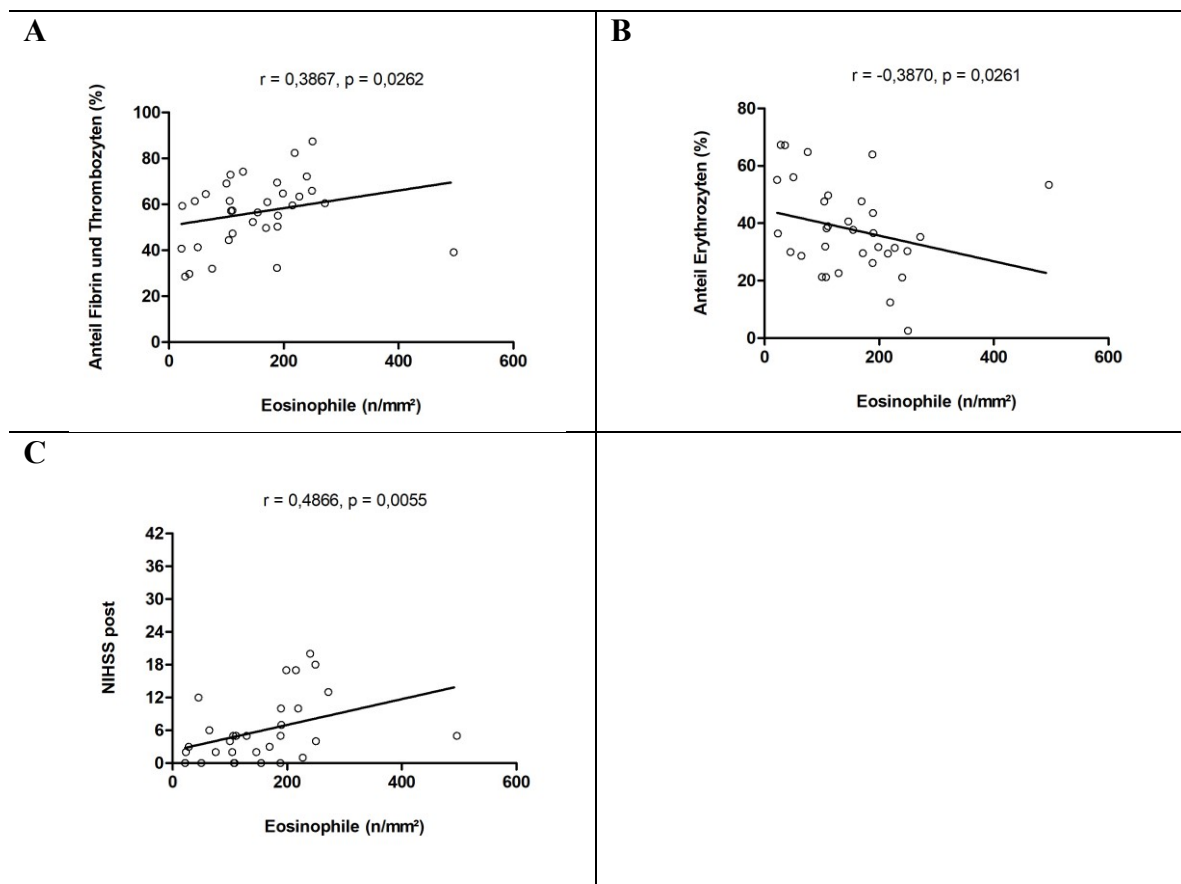


Abbildung 45: Korrelation der Luna-Färbung mit der HE-Färbung und klinischen Parametern
Korrelation der Eosinophilen mit dem Fibrin-/Thrombozytenanteil (A) und dem Erythrozytenanteil (B), sowie der NIHSS post (C).

Im Apoplex zeigte sich, dass die Anzahl an eosinophilen Granulozyten positiv mit der Fibrin-/Thrombozytenfläche der HE-Färbung ($r= 0,3867$, $p= 0,0262$), negativ mit der Erythrozytenfläche ($r= -0,3870$, $p= 0,0261$), sowie positiv mit der NIHSS post ($r= 0,4866$, $p= 0,0055$) korrelierte, wie Abbildung 45 und Tabelle 19 zeigen.

Apoplex		CD3+ (n/mm ²)	CD20+ (n/mm ²)	Eosinophile (n/mm ²)
Zeit bis zur Behandlung (min)	r	-0,1100	-0,04403	0,3606
	p	0,5423	0,8078	0,0594
	n	33	33	28
Rekanalisationszeit (min)	r	-0,06729	0,09686	0,06810
	p	0,6966	0,5741	0,7111
	n	36	36	32
Gesamtzeit (min)	r	-0,1151	-0,04822	0,3517
	p	0,5304	0,7933	0,0720
	n	32	32	27
Rekanalisationsmanöver (n)	r	-0,1625	-0,009011	0,1502
	p	0,3367	0,9578	0,4042
	n	37	37	33
NIHSS pre	r	0,02172	0,003071	0,1577
	p	0,8985	0,9856	0,3809
	n	37	37	33
NIHSS post	r	-0,2472	0,01315	0,4866
	p	0,1655	0,9421	0,0055
	n	33	33	31
mRS 90 Tage	r	-0,01113	0,2417	0,06251
	p	0,9741	0,4740	0,8638
	n	11	11	10

Tabelle 19: Korrelation Eosinophilen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten mit klinischen Parametern (Apoplex)¹⁹⁶

4.4 Basischarakteristika der Myokardinfarkt- und Apoplexpatienten

In Tabelle 20 sind die Basischarakteristika der Myokardinfarkt- und Apoplexgruppe aufgeführt.

Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, wurden 72 Myokardinfarktpatienten und 71 Patienten mit ischämischem Apoplex in diese Arbeit eingeschlossen.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den nicht beeinflussbaren kardiovaskulären Risikofaktoren Alter und Geschlecht. Die Gruppe der Myokardinfarktpatienten war im Mittel signifikant jünger ($p < 0,0001$), wohingegen mehr Männer eingeschlossen wurden als in der Apoplexgruppe, was statistisch ebenfalls signifikant war ($p = 0,0008$).

Bei weiteren kardiovaskulären Hauptrisikofaktoren zeigte sich jeweils ein signifikant höherer Anteil an (Ex-) Nikotinabusus ($p < 0,0001$), familiärer Disposition ($p < 0,0001$) und Hypercholesterinämie ($p = 0,0007$) in der Myokardinfarktgruppe. Der Anteil an Patienten mit Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie war zwischen den Myokardinfarkt- und Apoplexpatienten nicht signifikant unterschiedlich.

Bei der antithrombozytären Dauertherapie in der Vorgeschichte mittels Acetylsalicylsäure (=ASS), Acetylsalicylsäure und thrombozytenaggregationshemmenden Dipyrimadol, ADP-Rezeptor-Antagonisten oder einer dualen antithrombozytären Therapie (=DAPT) zeigten sich zwischen beiden Gruppen jeweils keine Unterschiede.

Auch beim Vergleich der Therapie mit Antikoagulantien, i.e. Cumarinen und den neuen oralen Antikoagulantien (NOAKs), zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

In der Vorgeschichte der Patienten zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an bereits zuvor stattgehabten Schlaganfällen ($p = 0,0004$) bzw. an Vorhofflimmern ($p < 0,0001$) in der Apoplexgruppe. Letzteres wurde nochmals weiter differenziert zwischen bekanntem Vorhofflimmern ($p = 0,0008$) und bei der Erstdiagnose von Vorhofflimmern bei Aufnahme ($p = 0,0002$).

Beiden Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich eines Nierenversagens oder einer aktiven malignen Erkrankung.

Leitliniengerecht wurde bei keinem der Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine Lyse durchgeführt, wohingegen in 64,7% der Fälle bei den Apoplexpatienten leitliniengerecht nach Ausschluss von Kontraindikationen eine Lysetherapie vor der mechanischen Rekanalisation erfolgte.

Basischarakteristika	Myokardinfarkt	Apoplex	
n (gesamt)	72	71	
Alter ---- Mittelwert \pm SD	61,5 \pm 10,9	69,9 \pm 13,8	p< 0,0001
Geschlecht ---- n (%)	72	71	
männlich	57 (79,2)	37 (5,1)	p= 0,0008
Risikofaktoren ---- n (%)	71	69	
Diabetes mellitus	12 (16,9)	13 (18,8)	p= 0,8267
Arterielle Hypertonie	48 (67,6)	52 (75,4)	p= 0,3524
Ex-/Raucher	35 (49,3)	12 (17,4)	p< 0,0001
Familiäre Disposition	30 (42,3)	1 (1,4)	p< 0,0001
Hypercholesterinämie	48 (67,6)	26 (37,7)	p= 0,0007
Antithrombozytäre Therapie, orale Antikoagulation bei Intervention --- n (%)	69	69	
ASS	14 (20,3)	21 (30,4)	p= 0,2402
ASS + Dipyrimadol	0 (0,0)	3 (4,3)	p= 0,2445
ADP-Rezeptor Antagonist	7 (10,1)	4 (5,8)	p= 0,5316
DAPT	5 (7,2)	3 (1,4)	p= 0,7183
Cumarin	1 (1,4)	7 (10,1)	p= 0,0624
NOAK	0 (0,0)	1 (1,5)	p> 0,9999
Lysetherapie vor Intervention --- n (%)	0	68	
---	0 (0,0)	44 (64,7)	
Vorerkrankungen --- n (%)	72	69	
Nierenversagen (GFR<30ml/min)	0 (0,0)	1 (2,7) n=37	p= 0,3394
Dialyse	0 (0,0)	0 (0,0)	p> 0,9999
Apoplex	1 (1,4)	13 (19,1)	p= 0,0004
Myokardinfarkt	8 (11,1)	9 (13,0)	p= 0,7991
Vorhofflimmern (VHF) gesamt	7 (9,9) n=71	34 (49,3)	p< 0,0001
- bekanntes VHF	7 (9,9)	23 (33,3)	p= 0,0008
- Erstdiagnose VHF bei Aufnahme	0 (0,0)	11 (15,9)	p= 0,0002
Aktive maligne Erkrankung	2 (2,8)	2 (2,9)	p> 0,9999

Tabelle 20: Darstellung der Basischarakteristika der Myokardinfarkt- und Apoplexpatienten ¹⁹⁶

5 Diskussion

5.1 Zentrale Ergebnisse der Arbeit

In dieser Arbeit wurden arterielle Thromben von Patienten mit akutem Myokardinfarkt und mit ischämischem Apoplex verglichen. Nach Etablierung der immunhistologischen Färbungen wurden Unterschiede und Gemeinsamkeiten der verschiedenen Thromben untersucht, auch im Hinblick auf die Ätiologie der Apoplexthromben mittels der TOAST-Klassifikation. Ein besonderes Interesse galt dabei möglichen Unterschieden zwischen den pathophysiologisch unterschiedlich entstandenen Apoplex-Subgruppen der TOAST 1- und TOAST 2- Gruppe. Darüber hinaus wurde evaluiert, ob die histologische Zusammensetzung Einfluss auf verschiedene klinische Parameter im ischämischen Apoplex hat.

Ganz allgemein wurde zunächst die histologische Zusammensetzung der Myokardinfarkt- und Apoplexthromben untersucht. Von besonderem Interesse waren dabei die beiden Hauptkomponenten der primären und sekundären Hämostase, d.h. der Thrombozyten- und Fibrinanteil. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Myokardinfarkt und Apoplex.

Im Falle des Fibrins zeigte sich ein signifikant niedrigerer Anteil im Myokardinfarkt. Dies könnte mit der standardisierten präklinischen Gabe von Heparin bei den Myokardinfarktpatienten (s. Kapitel 1.4.3.3) erklärt werden, zumal nur wenige Apoplexpatienten eine vorhergehende Therapie mit Antikoagulantien wie Cumarin oder den NOAKs erfahren hatten (s. Basischarakteristika, Kapitel 4.4). Wie in Kapitel 1.3.3 erläutert, degradiert Heparin Fibrin und könnte als Erklärung für den signifikant niedrigeren Anteil im Myokardinfarkt dienen. Heparin verhindert das weitere Thrombuswachstum in den Koronargefäßen durch Verstärkung der Wirkung von Antithrombin III⁹. Der präklinische Einsatz von Heparin ist bei Patienten mit STEMI vor einer PCI mit einem geringeren Risiko für koronare Thromben und totalem Gefäßverschluss assoziiert und verbessert das klinische Outcome^{197,198}.

Dennoch muss beachtet werden, dass es durch systemische Lysetherapie mittels des Plasminogenaktivators rtPA im Apoplex ebenfalls zur Degradierung von Fibrin kommt (s. Kapitel 1.5.4). Dabei führt rtPA zur Fibrinolyse an der Oberfläche der Thromben, aber auch innerhalb des Thrombus via Diffusion. Es zeigt sich jedoch eine Abhängigkeit von der Zeit. Je älter die Thromben sind, desto stabiler sind die Fibrinnetze, was die Diffusion des Medikaments hemmt und den Erfolg der Lysetherapie somit einschränkt¹⁹⁹.

Jedoch muss einschränkend hervorgehoben werden, dass der verwendete Antikörper keine Differenzierung zwischen Fibrin und Fibrinogen zuließ, da mit diesem beides angefärbt wird.

Ebenso signifikant vermindert war der Anteil an Thrombozyten im Myokardinfarkt im Vergleich zum Apoplex. Dieser Unterschied könnte mit der präklinischen Gabe von Acetylsalicylsäure (ASS) bei den Patienten mit Myokardinfarkt erklärt werden. ASS führt wie in Kapitel 1.4.3.3 beschrieben zur Thrombozytenaggregationshemmung.

Interessanterweise waren in dieser Studie die medianen Anteile an CD41-positiver Fläche größer als die Fibrinanteile, sowohl im Myokardinfarkt, als auch im Apoplex. Es gibt zahlreiche Studien, die die histologische Zusammensetzung der Thromben von Patienten mit Myokardinfarkt untersucht haben^{200,201}. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Fibrin- und Thrombozytenanteil einer zeitlichen Dynamik unterliegt²⁰², die pathophysiologisch erklärt werden kann. Im Falle der arteriellen Thrombose, die aufgrund der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque entsteht, sind die Thrombozytenanteile in der Frühphase zunächst höher und nehmen im Verlauf der Zeit ab, invers dazu verhält es sich mit dem Fibrinanteil (zur Pathogenese der arteriellen Thrombose siehe Kapitel 1.3.4). Ältere Thromben sowohl aus den Koronararterien, als auch Zerebralarterien enthalten mehr Fibrinanteile¹⁹⁹. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Zusammensetzung der Fibrin- und Thrombozytenanteile im Myokardinfarkt auch von der Pathogenese abhängen. So zeigen sich Unterschiede zwischen Thromben, die durch Plaqueruptur entstanden sind und typischerweise reich an Fibrin sind und weniger Thrombozyten enthalten und solchen, die durch Plaqueeosion entstehen und bei denen das Verhältnis von Fibrin und Thrombozyten umgekehrt ist²⁰³. Für die Plaqueeosion, die in etwa 20-40% der Fälle für einen akuten Myokardinfarkt verantwortlich ist, ist dabei typisch, dass sie reich an glatten Muskelzellen und Thrombozyten sind, die fibröse Kappe intakt und die Gefäßstruktur unversehrt ist und es nur zur oberflächlichen Endothelläsion kommt²⁰⁴.

Zur histologischen Zusammensetzung der Thromben von Patienten mit ischämischen Apoplex existieren ebenfalls zahlreiche Studien. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass- verglichen mit nicht-kardioembolischen Thromben- der Leukozyten- und Fibrin-/Thrombozytenanteil in der Gruppe der kardioembolischen TOAST 2-Gruppe erhöht und der Erythrozytenanteil erniedrigt ist²⁰⁵.

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war es darüber hinaus, die Rolle der *Immunothrombose*, insbesondere die der Monozyten und neutrophilen Granulozyten, sowie der von ihnen gebildeten

NETs, zu beleuchten. Die absoluten Zahlen der kernhaltigen Zellen, die weitestgehend den Leukozyten entsprechen (s. Kapitel 4.2.2), waren im Myokardinfarkt und Apoplex insgesamt nicht unterschiedlich und damit gut miteinander vergleichbar. Es zeigte sich, dass in beiden Gruppen eine erhöhte Anzahl an kernhaltigen Zellen positiv mit einer erhöhten Monozyten- und Neutrophilenzahl, den wichtigsten Zellen der *Immunothrombose*, korrelierte. Wiederum korrelierte eine erhöhte Neutrophilenzahl mit einer erhöhten Anzahl an NETs.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich auch Unterschiede in der Anzahl an (Immun-)Zellen zwischen den Subgruppen der Apoplexthromben finden ließen. Ein erstes Indiz lieferte dafür die Feststellung, dass der Leukozytenanteil in der HE-Färbung in der TOAST 1- Gruppe signifikant niedriger war als in der TOAST 2- Gruppe. Umgekehrt war der Erythrozytenanteil in der TOAST 1- Gruppe signifikant höher als in der TOAST 2-Gruppe. Unterschiede innerhalb der TOAST- Gruppen fanden sich darüber hinaus in den von den neutrophilen Granulozyten gebildeten NETs. Sowohl die Absolutzahl an NETs (n/mm^2), als auch die relative Anzahl, d.h. die Anzahl an NETs pro Neutrophile war jeweils in der TOAST 2-Gruppe höher als in der TOAST 1- Gruppe. Diese Ergebnisse bestätigen, dass NETs bei Patienten mit kardioembolischen Apoplex erhöht sind, wie mittels des NET-Markers citH3 bereits in vorherigen Studien gezeigt werden konnte¹⁶⁷ (s. Kapitel 1.6.2). Darüber hinaus bestätigte sich ebenfalls, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der TOAST 2- und der TOAST 5- Gruppe bezüglich des Leukozyten-/Fibrin-/Thrombozyten- und Erythrozytenanteils gab. Dies unterstützt die These, dass Thromben der kryptogenen TOAST 5-Gruppe zum Großteil kardioembolischen Ursprungs sind, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien deckt²⁰⁶. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die NETs in der TOAST 2- und TOAST 5- Gruppe erhöht waren verglichen mit TOAST 1, wohingegen sich keine Unterschiede zwischen der TOAST 2- und TOAST 5- Gruppe zeigten. Dies könnte ebenfalls darauf hindeuten, dass die Thromben der TOAST 5-Gruppe überwiegend kardioembolischen Ursprungs sind. Die Ergebnisse unterstützen somit die These, dass die Histologie der Apoplexthromben Hinweise auf die Ätiologie gibt.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die neutrophilen Granulozyten und insbesondere die von ihnen gebildeten NETs in der arteriellen Thrombose eine wichtige Rolle spielen und sowohl das Ausmaß des Schlaganfalls, als auch das klinische Outcome der Patienten mit Apoplex über die Bildung von NETs beeinflussen können. Ausgehend von den Ergebnissen der HE-Färbung, die zeigten, dass ein erhöhter Anteil an kernhaltigen Zellen bzw. Leukozyten positiv mit den Rekanalisationsmanövern, der Rekanalisationszeit und der NIHSS post korrelierte, wurden dabei die neutrophilen Granulozyten und die von ihnen gebildeten NETs untersucht. Die Anzahl der Neutrophilen im Apoplex korrelierte positiv mit der Anzahl an Rekanalisationsmanövern und

der Rekanalisationszeit. Zuschreiben kann man diese Korrelation mit großer Wahrscheinlichkeit den von den Neutrophilen gebildeten NETs.

NETs korrelierten positiv mit der Anzahl an Rekanalisationsmanövern, der Rekanalisationszeit, der Gesamtzeit, sowie mit dem Schlaganfallausmaß (NIHSS post) und dem Patientenstatus nach 90 Tagen (mRS 90d). Die Assoziation mit dem Schlaganfallausmaß bestätigt Ergebnisse vorhergehender Studien, die erhöhte Biomarker für NETs im Plasma von Patienten untersuchte und eine positive Korrelation mit der NIHSS post bei ausgedehnten Schlaganfällen zeigen konnte¹⁶⁷. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NETs und der Fibrin-/Thrombozytenanteil der HE-Färbung in den Schlaganfallthromben positiv korrelierten, was pathophysiologisch erklärt werden könnte (s. Kapitel 1.6.2.2). Allerdings bestätigten sich diese Ergebnisse bei Korrelation der NETs mit den Immunfluoreszenzfärbungen von Thrombozyten und Fibrin/Fibrinogen weder im Myokardinfarkt noch im Schlaganfall.

Insgesamt fanden sich in der Apoplexgruppe deutlich mehr NETs als in der Myokardinfarktgruppe. Eine Erklärung für das Vorhandensein von NETs bei lediglich 21% der Myokardinfarktthromben könnte sein, dass ein Großteil (ca. 80%) der Myokardinfarktpatienten präklinisch mit Heparin therapiert wurde. Heparin hat u.a. eine hohe Affinität zu Histonen und entfernt diese vom Chromatin der NETs, was zu deren Destabilisierung führt¹⁷⁰. Auch in vivo konnte bei der venösen Thrombose gezeigt werden, dass Heparin NETs degradiert¹⁷¹.

Darüber hinaus nimmt die Wahrscheinlichkeit NETs zu detektieren bei kleinerer Thrombuschnittfläche und somit weniger neutrophilen Granulozyten wie im Falle der Myokardinfarktthromben ab. Lediglich $4,7 \pm 4,5$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung) NETs pro Neutrophile konnten bei den Myokardinfarktthromben detektiert werden (n=15). Nimmt man auch die Thromben hinzu, in denen sich keine NETs zeigten, liegt der Anteil von NETs an Neutrophilen nur noch bei $1,0 \pm 2,9$ %.

Dennoch zeigten sich NETs in diesen 21% der Myokardinfarktpatienten, was die Frage aufwirft, warum sie überhaupt vorhanden waren. In Studien wurde gezeigt, dass NETs durch Heparin unter standardisierten Laborbedingungen beinahe vollständig degradiert werden¹⁷⁰. Unter nicht-standardisierten Bedingungen sind jedoch verschiedene Szenarien denkbar, weshalb trotz Heparinabgabe NETs detektiert werden konnten. So wurden NETs durch die verabreichte Heparindosis möglicherweise nicht immer vollständig degradiert. Ein weiterer Erklärungsansatz bietet der Faktor Zeit. Zur vollständigen Degradierung muss eine bestimmte Dosis Heparin in einer bestimmten Zeit gegeben werden. Bei den eingeschlossenen Patienten kann jedoch die genaue Zeit von der Gabe bis zur Therapie via Thrombektomie nicht genau nachvollzogen werden,

weshalb man über das Vorhandensein der NETs lediglich diskutieren kann. Möglich ist auch, dass das Ausmaß des Myokardinfarkts, d.h. seine Größe, eine Rolle spielt. So ist denkbar, dass bei größeren Thromben die Penetration mit Heparin unvollständiger ist als bei kleineren Thromben, was einen weiteren Erklärungsansatz für das Vorhandensein von NETs bietet.

Lediglich ein Myokardinfarktpatient (n=1) der insgesamt 15 mit detektierbaren NETs erhielt gesichert präklinisch kein Heparin, was das Vorhandensein von NETs hier erklären könnte. Bei 10 Patienten (n=10) mit NETs wurde meist das standardisierte medikamentöse Schema von 5000 I.E. Heparin + 500mg ASS präklinisch gegeben. Bei den restlichen Patienten (n=4) mit NETs fehlten die notärztlichen Angaben zur Medikation. Heparin scheint bei diesen Patienten folglich nicht zu einer vollständigen NET-Degradierung geführt zu haben. Letztlich muss konstatiert werden, dass das Vorhandensein und die (medikamentöse) Degradierung der NETs ein komplexer pathophysiologischer Prozess ist und das Nichtvorhandensein nicht nur durch die alleinige Gabe von Heparin erklärbar ist.

Als weitere zentrale Zellgruppe in der *Immunothrombose* wurden die Monozyten untersucht. Die Anzahl an CD14-exprimierenden Monozyten war im Apoplex verglichen zum Myokardinfarkt signifikant erhöht. Bei Untersuchung der Subpopulationen der Monozyten zeigte sich, dass die Gruppe der klassischen Monozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex nicht signifikant unterschiedlich war. Signifikant höher war jedoch die Anzahl an intermediären/nicht-klassischen Monozyten im Apoplex. Studien zeigen, dass der Anteil an intermediären Monozyten in der akuten und subakuten Phase des ischämischen Apoplex erhöht ist, insbesondere bei kardioembolischem Ursprung²⁰⁷. Dadurch, dass die Immunhistologie jedoch die intermediäre und nicht-klassische Subpopulation nicht differenzieren kann, bestätigt das die oben genannten Ergebnisse nur indirekt.

Als weiteres interessantes Ergebnis zeigte sich, dass die eosinophilen Granulozyten ebenfalls eine wichtige Rolle in der arteriellen Thrombose zu spielen scheinen. So konnte im Apoplex eine positive Korrelation zwischen eosinophilen Granulozyten und dem Fibrin-/Thrombozytenanteil bzw. der NIHSS post, sowie eine negative Korrelation mit dem Erythrozytenanteil nachgewiesen werden. Eine Beeinflussung der Thrombusmorphologie, sowie des Schlaganfallausmaßes kann durch diese Ergebnisse angenommen werden. Auch in dieser Arbeit zeigen sich somit Hinweise auf eine bedeutende Rolle der Eosinophilen in der arteriellen Thrombose. Andere Studien konnten zeigen, dass diese Rolle unter anderem mit der Fähigkeit der eosinophilen Granulozyten zusammenhängt, Thrombin zu bilden²⁰⁸.

5.2 Diskussion der Methoden

5.2.1 Gewinnung der Thromben

Die Technik der Gewinnung des untersuchten Materials war bei den Myokardinfarkt- und Apoplexpatienten unterschiedlich (s. Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Zwar wurden bei beiden Katheter-gestützte Systeme verwendet, dennoch konnte durch die mechanische Rekanalisation bei den Apoplexpatienten wahrscheinlich ein vollständigerer Teil des ursprünglichen Thrombus geborgen werden als mittels Aspiration der Thromben bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Dies wird beispielsweise schon ersichtlich an der Größe des gewonnenen Materials. Die Myokardinfarktthromben waren wesentlich kleiner, ein nicht unwesentlicher Verlust von diesem Material bei der Aspiration kann also angenommen werden. Allerdings muss auch der Gefäßdurchmesser beachtet werden, der bei den Apoplex- und Myokardinfarktpatienten unterschiedlich ist. In diese Arbeit wurden nur Apoplexthromben aus Gefäßen des sogenannten vorderen Stromgebiets eingeschlossen, deren Durchmesser im Mittel größer sind als die Koronargefäße^{209,210}. Dies lässt auch auf größere Thromben schließen. Um die Vergleichbarkeit bei den Ergebnissen zu gewährleisten, wurden die Ergebnisse auf Quadratmillimeter (mm²) extrapoliert.

5.2.2 Einschluss der Patienten und möglicher Einfluss auf die Auswertung

In Kapitel 3.1.2 sind die Einschlusskriterien der Myokardinfarktpatienten beschrieben. Eingeschlossen wurden Patienten mit STEMI, NSTEMI, stabiler Angina pectoris und ein Patient mit kardiogenem Schock. Dadurch ergab sich für die histologische Analyse eine nicht gänzlich homogene Gruppe, was zu Limitationen der Ergebnisse führen könnte. So gibt es Hinweise darauf, dass z.B. NETs bei Patienten mit stabiler Angina pectoris unmittelbar nach der PCI weniger häufig vorkommen als bei Patienten mit STEMI, wobei dieser Unterschied mittels im Blut gemessener NET-Marker gemessen wurde²¹¹.

Des Weiteren wurde bereits in Kapitel 5.1 diskutiert, dass die Thrombusmorphologie hinsichtlich des Fibrin- und Thrombozytenanteils einer zeitlichen Dynamik unterliegt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Thromben von Patienten, bei denen die Zeit zwischen Einsetzen der Infarktsymptomatik und der perkutanen Koronarintervention (PCI) mehr als 6 Stunden betrug, auch der Anteil an Leukozyten, d.h. Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten, erhöht ist²¹². Daher ist nicht auszuschließen, dass die unterschiedliche Zeit zwischen Symptombeginn

und PCI dieser eingeschlossenen Patienten Einfluss auf die Zellzusammensetzung gehabt haben könnte.

Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben wurden Patienten mit ischämischen Apoplex aufgrund fehlender Einverständniserklärungen aus der Studie ausgeschlossen (n=28). Diese 28 Patienten setzten sich wie folgt zusammen: TOAST 1 (n=4), TOAST 2 (n=17), TOAST 5 (n=7). Somit wurden überproportional viele Patienten der Gruppe TOAST 2 ausgeschlossen. Die Einverständniserklärungen zum Studieneinschluss wurden aufgrund der Dringlichkeit der medizinischen Behandlung erst nach Intervention eingeholt. So kann es sein, dass es dadurch zu einer Selektion der Patienten mit schlechterem klinischem Outcome kam. Möglicherweise wurden also Patienten ausgeschlossen, die fulminantere Infarkte erlitten hatten und nach der Intervention nicht fähig waren, dem Studieneinschluss zuzustimmen. Dieser Umstand muss insbesondere bei Analyse der klinischen Parameter und Korrelationen berücksichtigt werden.

5.2.3 Einbettung und Färbung der Thromben

Die Einbettung der gesammelten Thromben erfolgte nach unterschiedlichen Methoden (s. Kapitel 3.1.2 und 3.1.3). Während sich Paraffinschnitte allgemein besser für Standardfärbungen wie die HE-Färbung eignen, lassen sich in kryokonservierten Schnitten Immunfluoreszenzfärbungen leichter durchführen. Durch die Einbettung in Paraffin werden die Epitope verdeckt, die in aufwendigeren Schritten demaskiert werden mussten, um für die Immunfluoreszenzfärbungen zugänglich zu sein (durch ein sogenanntes *antigen retrieval*)¹⁹⁰. Da jedoch dieselben Antigene angefärbt wurden und valide Färbungen (Isotyp- und Negativ-, Positivkontrollen der Färbungen) etabliert werden konnten, kann man allgemein von einer guten Vergleichbarkeit der Apoplex- und Myokardinfarktthromben in dieser Arbeit ausgehen.

5.2.4 Grenzen der Immunfluoreszenzmikroskopie

Hauptmethode dieser Arbeit war die Darstellung von Antigenen mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie. Vorteil dieser Methode ist, dass durch die optische Darstellung und der Auswertung nach standardisiertem Schema eine verlässliche Auszählung möglich ist. Ein Beispiel da-

für sind etwa die in Kapitel 3.10 beschriebenen NET-Kriterien. Voraussetzung dafür sind standardisierte Färbeschritte mit Auswahl geeigneter Sekundärantikörper und genau abgestimmten Färbeintervallen, sowie entsprechende standardisierte Belichtungszeiten bei den Aufnahmen. Unerlässlich ist die Überprüfung der Färbungen mittels Isotyp- und Negativkontrollen. Nur so können Aufnahmen geeigneter Qualität entstehen.

Dennoch muss man berücksichtigen, dass der Immunfluoreszenzmikroskopie Grenzen gesetzt sind.

Zum einen sind ab einer gewissen Größe des Materials lediglich Stichproben möglich, eine manuelle Auszählung aller Schnitte eines Thrombus ist bei entsprechender Zellzahl impraktikabel. Durch die Auswahl der größten Schnittfläche der Thromben, sowie ein standardisiertes Auszählschema wurde jede Auswertung so einheitlich wie möglich gestaltet (s. Kapitel 3.10).

Andererseits können durch die Immunfluoreszenzmikroskopie auch nur eine begrenzte Anzahl an Strukturen angefärbt werden, um durch die Überlappung von Fluoreszenzsignalen der angefärbten Strukturen keine falsch positiven Ergebnisse zu bekommen. Außerdem können bestimmte Strukturen mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht dargestellt werden. Als Beispiel ist hier etwa die CD14/16-Färbung zu nennen, bei der kein Unterschied zwischen intermediären $CD14^{++}/16^{+}$ und den nicht-klassischen $CD14^{+}/16^{++}$ Monozyten gemacht werden konnte, da die Intensität der Signale nicht unterscheidbar war. Für die weitere Differenzierung wäre etwa die Durchflusszytometrie eine praktikable Methode.

Darüber hinaus können falsch hohe Ergebnisse bei der Immunfluoreszenz nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Ein Problem der Immunfluoreszenzmikroskopie ist Phänomen der Autofluoreszenz einiger Gewebe, wodurch falsch positive Ergebnisse entstehen können¹⁸⁸. Ein Beispiel für falsch positive Ergebnisse lässt sich auch anhand der CD41- und Fibrinfärbung erläutern. Durch die Definition eines bestimmten Fluoreszenzintensitätsbereichs wurden die Antigen-positiven Flächen beider Färbungen gemessen. Um die Ergebnisse zu standardisieren, wurde für jede Färbung bei entsprechender Belichtungszeit ein Intensitätsbereich festgelegt und auf jeden Schnitt angewandt. Besonders an den Schnitträndern der Thromben kommt es gelegentlich jedoch zu minimalen Überlappungen des Gewebes und somit Vergrößerung der Schichtdicke. In diesem Bereich sind falsch positive Fluoreszenzsignale möglich. Da es in dieser Arbeit jedoch vornehmlich um den Vergleich relativer Zahlen dieser Färbungen ging, war ein valider Vergleich möglich.

5.2.5 Grenzen der explorativen Studie

Da in dieser Arbeit ausschließlich mit humanem Thrombusmaterial gearbeitet wurde, ist sie als explorative retrospektive Studie angelegt. Das bedeutet, dass es ging primär darum ging, Unterschiede und Korrelationen zwischen den Myokardinfarkt- und Schlaganfallthromben, bzw. den klinischen Daten retrospektiv aufzuzeigen und nicht um einen mechanistisch-erklärenden Ansatz. So sollten etwa die Fragen beantwortet werden, ob NETs im ischämischen Apoplex eine Rolle spielen, ob es Unterschiede im Vergleich zum Myokardinfarkt gibt und ob sich positive Korrelationen zwischen ihnen und klinisch-interventionellen Parameter zeigen. Die Ergebnisse sollten in konfirmativen Studien bestätigt werden.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Einfluss der NETs auf die Thrombusmorphologie und das Outcome

Zentrale Fragen dieser Arbeit waren, Charakteristika der Thromben von Patienten mit akutem Myokardinfarkt und ischämischen Apoplex zu vergleichen und zu untersuchen, welchen Einfluss die verschiedenen Thrombusbestandteile bzw. Zellen auf das klinische Outcome der Patienten der Patienten mit Apoplex haben. Hierbei war von besonderem Interesse, Charakteristika der *Immunothrombose* näher zu beleuchten.

Für die Apoplexpatienten galt dabei:

War der Anteil an Leukozyten erhöht, korrelierte dieser positiv mit einem erhöhten Fibrin-/Thrombozytenanteil in der HE-Färbung bzw. mit einem erhöhten Anteil an CD41-positiver Fläche (letztere Korrelation war jedoch nicht signifikant, $r = 0,3395$, $p = 0,0533$). Ein erhöhter Fibrinanteil korrelierte wiederum positiv mit einer erhöhten NIHSS pre, also dem Schlaganfallausmaß vor Behandlung. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass die von den neutrophilen Granulozyten gebildeten NETs unter anderem Einfluss auf den Fibrin-/Thrombozytenanteil und damit auf das klinische Outcome der Patienten haben können. Ein erhöhter Leukozytenanteil bzw. eine erhöhte Neutrophilenzahl korrelierte hochsignifikant mit dem Anteil an NETs. Je mehr kernhaltige Zellen insgesamt vorhanden waren, desto mehr Neutrophile, aber auch Monozyten waren vorhanden. Interessanterweise zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an NETs in der TOAST 2-Gruppe verglichen mit TOAST 1. NETs scheinen also abhängig von der Ätiologie des Apoplexes eine unterschiedliche Rolle zu spielen und sind vor allem wie in

Kapitel 5.1 beschrieben insbesondere bei kardioembolischen Patienten erhöht. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit mittels Immunhistologie bestätigt werden.

Vor allem die NETs im Apoplex zeigten ihren großen Einfluss auf das klinische Outcome der Patienten. Ein erhöhter Anteil an NETs korrelierte signifikant mit einer verlängerten Behandlung (gemessen als Anzahl an Rekanalisationsmanövern, Rekanalisationszeit und der Gesamtzeit) und einem verschlechterten klinischen Outcome (gemessen als NIHSS post und mRS 90).

Insgesamt lässt sich konstatieren, dass die pathophysiologisch beschriebenen Prozesse der *Immunothrombose* auch in vivo einen großen Einfluss haben. Eine zentrale Rolle spielen dabei die von den neutrophilen Granulozyten gebildeten NETs. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Neutrophile und NETs für die Thrombusentstehung im ischämischen Apoplex eine wichtige Rolle spielen und sie damit in Zukunft Angriffspunkt für neue medikamentöse Therapien wie einer verbesserten Lysetherapie sein könnten ²¹³.

5.3.2 Einfluss der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten

Es zeigte sich in dieser Arbeit, dass die eosinophilen Granulozyten ebenfalls signifikanten Einfluss auf die Thrombusmorphologie im Sinne eines erhöhten Fibrin-/Thrombozytenanteils und ebenfalls auf das klinische Outcome (NIHSS post) der Apoplexpatienten haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen also den in anderen Studien beobachteten Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf die arterielle Thrombose (s. Kapitel 1.7.1). Neue Studienergebnisse zeigen, dass Eosinophile v.a. mit Thrombozyten interagieren, wodurch sich beide Zellgruppen aktivieren. Sogenannte *eosinophil extracellular traps* (EETs), die in humanen arteriellen Thromben nachgewiesen wurden, sind mit MBP bestückt und induzieren dadurch die Aktivierung von Thrombozyten ²¹⁴.

Dennoch ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit weitere Fragen, z.B. weshalb die Anzahl an eosinophilen Granulozyten signifikant höher im Apoplex im Vergleich mit dem Myokardinfarkt war.

Gleiches gilt für die ebenfalls signifikant höheren Zellzahlen der T- und B-Lymphozyten im Apoplex. Da jeweils Positivkontrollen der CD3- und CD20-Färbung angefertigt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die richtigen Antigene angefärbt wurden. Auch das Verhältnis der T- und B-Lymphozyten entspricht in etwa den physiologischen Verhältnissen.

So lassen sich in dieser explorativen Arbeit letztlich nur die genannten Unterschiede bei den Eosinophilen und Lymphozyten konstatieren, jedoch nicht mechanistisch erklären. Wie in Kapitel 1.7.2 erläutert scheinen unterschiedliche Subgruppen der B-Lymphozyten beispielsweise auch unterschiedliche Funktionen in der arteriellen Thrombose einzunehmen. In dieser Studie wurden diese Subgruppen jedoch nicht differenziert. Folgestudien sollten die Ergebnisse überprüfen (etwa mit Immunfluoreszenzverfahren) und anschließend die Gründe für die Unterschiede aufklären.

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Ätiologie von humanen arteriellen Thromben maßgeblich zu deren histologischen Morphologie beiträgt und sich Unterschiede zwischen Myokardinfarkt- und Apoplexthromben, sowie innerhalb der Subgruppen des Schlaganfalls zeigen. Außerdem scheinen Charakteristika der *Immunothrombose*, v.a. die von den neutrophilen Granulozyten gebildeten NETs, eine wichtige Rolle in der arteriellen Thrombusentstehung, bzw. -stabilisierung zu spielen. So haben sie auch Einfluss auf das klinische Outcome der Patienten. Das genaue Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge könnte wegweisend werden zur Etablierung zielgerichteter neuartiger Therapieoptionen für den Myokardinfarkt und ischämischen Apoplex als den wichtigsten Manifestationen der arteriellen Thrombose. Unerlässlich ist es dabei, die Rolle der wichtigsten Zellen in der *Immunothrombose*, d.h. der Neutrophilen und Monozyten, sowie aber auch die der eosinophilen Granulozyten mechanistisch noch differenzierter zu untersuchen. Wie schon in anderen Studien untersuchte spezifische Hemmstoffe der *Immunothrombose* könnten in Zukunft dazu beitragen, das Blutungsrisiko einer medikamentösen Therapie zu mindern und das klinische Outcome der Patienten mit akutem Myokardinfarkt oder ischämischen Apoplex zu verbessern⁶². Mögliche medikamentöse Ansätze zur Hemmung der NET-Bildung sind dabei etwa der Einsatz von extrazellulärer DNase, die ex vivo zu einer verbesserten Lyse von Koronarthromben führte oder Hemmstoffe der PAD4^{173,215}. Auch im Falle von humanen Thromben von Patienten mit akutem ischämischen Apoplex konnte ex vivo gezeigt werden, dass rekombinante DNase 1 die durch rtPA induzierte Thrombolysen noch verbessern kann²¹⁶.

6 Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt und ischämische Apoplex als die beiden wichtigsten Manifestationsformen der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen spielen eine zentrale Rolle in der Medizin. Das Verständnis ihrer Pathophysiologie zu vertiefen, war Gegenstand jahrzehntelanger Forschung und hält bis zum heutigen Tage an. Erst die genaue Kenntnis über die Zusammenhänge von Ätiologie und Thrombusentstehung innerhalb des arteriellen Gefäßsystems konnte zu wegweisenden Therapieformen wie den heutigen medikamentösen und interventionellen Therapien führen.

Dennoch zeigte sich in der Forschung der letzten Jahre, dass es weitere pathophysiologische Mechanismen der Thrombusentstehung und -stabilisierung gibt, die noch nicht zu Genüge aufgeklärt sind. Dazu zählt etwa die aktive Partizipation von Immunzellen wie die der neutrophilen Granulozyten an der arteriellen Thrombose. Hierbei spielen die von den Neutrophilen gebildeten NETs, d.h. netzartige Gemische aus DNA und Histonen, eine zentrale Rolle. Über verschiedenste Wege sind sie in der Lage, das intravaskuläre Gerinnungssystem positiv zu beeinflussen und so zur Thrombusentstehung beizutragen. Unter dem Terminus *Immunothrombose* wird dabei die aktive Teilnahme von Leukozyten, typischerweise innatere Immunzellen, an thrombotischen Prozessen durch Freisetzung Plättchen-aktivierender und prokoagulatorischer Moleküle subsummiert.

In dieser Arbeit wurden Thromben von Patienten mit akutem Myokardinfarkt, sowie Thromben von Patienten mit ischämischem Apoplex histologisch miteinander verglichen. Unter Berücksichtigung unterschiedlicher Ätiologien des Apoplex und der medikamentösen Vorbehandlung der Patienten wurde dabei vor allem die Rolle der Thrombozyten, des Fibrins, sowie der neutrophilen Granulozyten und weiterer relevanter Zellarten näher untersucht.

Es zeigte sich, dass maßgebliche Unterschiede zwischen den Myokardinfarkt- und Apoplexthromben, sowie innerhalb der ätiologisch verschiedenen Subgruppen des Apoplex existieren. Darüber hinaus wurde unter anderem festgestellt, dass vor allem NETs die Thrombusmorphologie beeinflussen und so Auswirkungen auf verschiedene klinisch relevante Parameter haben.

Die in dieser explorativen Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten die Grundlage für die Erforschung neuartiger medikamentöser Therapien bilden, deren Fokus auf den Mechanismen der *Immunothrombose* liegt.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
%ig	prozentig
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	advanced glycation end products
APC	aktiviertes Protein C
ASS	Acetylsalicylsäure
AV	atrioventrikulär
B-Lymphozyten	B= Bursa fabricii; bone-marrow derived
BSA	Bovines Serumalbumin
Cit	Citrullin
CCL	C-C chemokine ligand
CCR	C-C chemokine receptor
cCT	cranielle Computertomografie
CD	Cluster of differenciation
CK	Creatin-Kinase
COX	Cyclooxygenase
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
DAB	3,3- Diaminobenzidin
DAG	1,2- Diacylglycerin
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAPT	Dual antiplatelet therapy
DC	Dendritic cells
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DWI	Diffusion weighted imaging
ECP	Eosinophil cationic proteine
EKG	Elektrokardiogramm
EPCR	Endothelzell-Protein-C-Rezeptor
EtOH	Ethanol
FFPE	Formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue
g	Gramm
GFR	Glomerular filtration rate
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDL	High-densitiy lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish Peroxidase
hsTn	hoch-sensitives Troponin
ICAM	Intercellular adhesion molecule
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzerkrankung

Kryo	Kryokonservierung
l	Liter
LDL	Low-density lipoprotein
LSAB	Labeled (Strept-)Avidin- Biotin
MBP	Major basic protein
MCS-F	Monocyte colony stimulation factor
MCP	Monocyte chemotactic protein
MI	Myokardinfarkt
min	Minuten
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
mol	Mol
Mo-LDL	Minimal oxydiertes LDL
MRT	Magnetresonanztomografie
n	Anzahl
NaOH	Natronlauge
NE	Neutrophile Elastase
NET	Neutrophil extracellular trap
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
NO	Nitric oxide
NOAK	Neue orale Antikoagulantien
ns	Nanosekunden
NSTEMI	non-ST-segment elevation myocardial infarction (Nicht-ST-Hebungsmyokardinfarkt)
p	probability
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PAR	Protease aktivierende Rezeptoren
PBS	Phosphate buffered saline
PKC	Proteinkinase C
PFA	Paraformaldehyde
PSGL	P-Selektin Glykoprotein Ligand
r	Korrelationskoeffizient (Pearson bzw. Spearman)
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standardabweichung
SMC	Smooth muscle cell
SR	Scavenger receptor
STEMI	ST-segment elevation myocardial infarction (ST-Hebungsmyokardinfarkt)
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TLR	Toll-like receptor
T-Lymphozyten	Thymus- Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	Von-Willebrand-Faktor
x	Mal/ fach

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wandschichten der Arterien des muskulären Typs (mit freundlicher Genehmigung von ⁷⁾)

Abbildung 2: Entstehung und Ruptur einer atherosklerotischen Plaque (mit freundlicher Genehmigung von ⁴²⁾)

Abbildung 3: Grundlegende Prinzipien der Hämostase (mit freundlicher Genehmigung von ⁴⁾)

Abbildung 4: Das plasmatische Gerinnungssystem (nach mit freundlicher Genehmigung von ⁸⁶⁾)

Abbildung 5: Plaqueruptur und Thrombose (mit freundlicher Genehmigung von ⁹⁹⁾)

Abbildung 6: Grundlegende Mechanismen der Immunothrombose (mit freundlicher Genehmigung von ⁴⁾)

Abbildung 7: Übersicht über die eingeschlossenen Patienten der Apoplex- und Myokardinfarktgruppe

Abbildung 8: Direkte und indirekte Immunmarkierung (mit freundlicher Genehmigung von ¹⁸⁸⁾)

Abbildung 9: Prinzip der LSAB-Methode (modifiziert nach ¹⁸⁹⁾)

Abbildung 10: Aufbau des Durchlichtmikroskops (mit freundlicher Genehmigung von ¹⁹⁴⁾)

Abbildung 11: Prinzip des TDI line scanning (mit freundlicher Genehmigung von ¹⁹⁵⁾)

Abbildung 12: Darstellung des Fluoreszenzauflicht-Strahlengangs (mit freundlicher Genehmigung von ¹⁸⁸⁾)

Abbildung 13: Darstellung eines konfokalen Strahlengangs (mit freundlicher Genehmigung von ¹⁸⁸⁾)

Abbildung 14: Auswertung der Schlaganfallthromben

Abbildung 15: Kriterien für neutrophil extracellular traps (NETs)

Abbildung 16: HE-Färbung

Abbildung 17: Verteilung der Thrombusbestandteile in der HE-Färbung

Abbildung 18: HE-Färbung- Vergleich der Thrombusbestandteile in den TOAST-Gruppen

Abbildung 19: Carstairs-Färbung (Apoplex)

Abbildung 20: CD41-Färbung

Abbildung 21: CD41- Vergleich zwischen Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST-Gruppen

Abbildung 22: Fibrin/Fibrinogen-Färbung

Abbildung 23: Fibrin/Fibrinogen- Vergleich zwischen Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST-Gruppen

Abbildung 24: Neutrophile Elastase-Färbung

Abbildung 25: Vergleich der Anzahl der kernhaltigen Zellen und Neutrophilen zwischen Myokardinfarkt und Apoplex

Abbildung 26: CD45-Färbung

Abbildung 27: Vergleich der CD45-positiven Leukozyten pro kernhaltige Zellen zwischen Myokardinfarkt und Apoplex

Abbildung 28: Darstellung von NETs

Abbildung 29: Vergleich der Häufigkeit der NETs zwischen Myokardinfarkt und Apoplex

Abbildung 30: Vergleich der NETs absolut und relativ zwischen Myokardinfarkt und Apoplex

Abbildung 31: CD14/16-Färbung

Abbildung 32: CD14- Vergleich der Absolutzahlen der Monozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST Gruppen

Abbildung 33: Vergleich der Subpopulationen der Monozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex

Abbildung 34: Luna-Färbung

Abbildung 35: Vergleich der Absolutzahlen der eosinophilen Granulozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex, sowie innerhalb der TOAST- Gruppen

Abbildung 36: CD3- und CD20-Färbung

Abbildung 37: Vergleich der Absolutzahlen der T-/B-Lymphozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex

Abbildung 38: Korrelation der Ergebnisse der HE-Färbungen (Apoplex) untereinander und mit weiteren Färbungen

Abbildung 39: Korrelation der Ergebnisse der HE-Färbung mit klinischen Parametern und Immunfluoreszenzfärbungen

Abbildung 40: Korrelation der NE- und CD14- Färbung

Abbildung 41: Korrelation der NE- mit der CD14-Färbung

Abbildung 42: Korrelationen der NE-Färbung

Abbildung 43: Korrelation der NE-Färbung mit klinischen Parametern (Apoplex)

Abbildung 44: Korrelation der Luna-Färbung mit der NE-Färbung

Abbildung 45: Korrelation der Luna- Färbung mit der HE-Färbung und klinischen Parametern

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste verwendeter humaner Primärantikörper und Isotypkontrollen

Tabelle 2: Liste verwendeter Sekundärantikörper

Tabelle 3: Modifizierte Rankin-Skala (nach ¹⁸⁵)

Tabelle 4: Vergleich der CD41-positiven Flächen von Myokardinfarkt, aller Apoplexthromben und der einzelnen TOAST-Gruppen

Tabelle 5: Vergleich der Fibrinogen-positiven Flächen von Myokardinfarkt, aller Apoplexthromben und der einzelnen TOAST-Gruppen

Tabelle 6: Vergleich der Zahl der kernhaltigen Zellen und Neutrophilenanzahl zwischen Myokardinfarkt und Apoplex

Tabelle 7: Vergleich der NETs absolut und relativ

Tabelle 8: Vergleich der Anzahl der CD14-positiven Zellen zwischen Myokardinfarkt und Apoplex

Tabelle 9: Vergleich der Anzahl der Subpopulationen der Monozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex

Tabelle 10: Vergleich Absolutzahlen der eosinophilen Granulozyten von Myokardinfarkt und Apoplex und innerhalb der TOAST-Gruppen

Tabelle 11: Vergleich der Absolutzahlen der T-/B-Lymphozyten zwischen Myokardinfarkt und Apoplex

Tabelle 12: Vergleich klinischer Parameter der Apoplexpatienten

Tabelle 13: Korrelation der Ergebnisse der HE-Färbung der Apoplexpatienten mit verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen, sowie Korrelation mit klinischen Parametern

Tabelle 14: Korrelation der CD41- und Fibrinogenfärbung mit weiteren Färbungen, sowie mit klinischen Parametern (Apoplex)

Tabelle 15: Korrelation der CD41- und Fibrinogenfärbung mit weiteren Färbungen (Myokardinfarkt)

Tabelle 16: Korrelation der kernhaltigen Zellen, Neutrophilen, NETs und Monozyten (Myokardinfarkt)

Tabelle 17: Korrelation der kernhaltigen Zellen, Neutrophilen, NETs und Monozyten (Apoplex)

Tabelle 18: Korrelation der kernhaltigen Zellen, Neutrophilen, NETs und Monozyten mit klinischen Parametern (Apoplex)

Tabelle 19: Korrelation Eosinophilen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten mit klinischen Parametern (Apoplex)

Tabelle 20: Darstellung der Basischarakteristika der Myokardinfarkt- und Apoplexpatienten

10 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Available at [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (2017).
2. Herold, G. *Innere Medizin 2017* (2016).
3. Valgimigli, M. *et al.* 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS. The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *European heart journal* **39**, 213–260 (2018).
4. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 34–45 (2012).
5. Pfeiler, S., Stark, K., Massberg, S. & Engelmann, B. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica* **102**, 206–213 (2017).
6. Aumüller, G. *Anatomie*. 2nd ed. (Thieme, Stuttgart, 2010).
7. Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 3rd ed. (Thieme, Stuttgart, 2009).
8. R.F. Schmidt, F. Lang & M. Heckmann eds. *Physiologie des Menschen* (Springer Medizin-Verl., Heidelberg, 2010).
9. Renz-Polster, H. & Krautzig, S. *Basislehrbuch Innere Medizin*. 5th ed. (Urban & Fischer in Elsevier, München u.a., 2013).
10. Dharmashankar, K. & Widlansky, M.E. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. *Current hypertension reports* **12**, 448–455 (2010).
11. Michiels, C. Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology* **196**, 430–443 (2003).
12. Aird, W.C. Endothelium and haemostasis. *Hamostaseologie* **35**, 11–16 (2015).
13. Mozaffarian, D. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **133**, e38-360 (2016).
14. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (2017).
15. Glass, C.K. & Witztum, J.L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**, 503–516 (2001).
16. American Heart Association, Inc. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. Available at <http://hyper.ahajournals.org/content/early/2017/11/10/HYP.0000000000000065> (2017).
17. Dahlöf, B. Cardiovascular disease risk factors. Epidemiology and risk assessment. *The American journal of cardiology* **105**, 3A-9A (2010).
18. Hansson, G.K. & Hermansson, A. The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology* **12**, 204–212 (2011).
19. Mahdy Ali, K., Wonnerth, A., Huber, K. & Wojta, J. Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL cholesterol—current therapies and future opportunities. *British journal of pharmacology* **167**, 1177–1194 (2012).
20. Di Angelantonio, E. *et al.* Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* **302**, 1993–2000 (2009).
21. Rassow, J. *Biochemie*. 2nd ed. (Thieme, Stuttgart, 2008).
22. Navab, M., Reddy, S.T., van Lenten, B.J. & Fogelman, A.M. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nature reviews. Cardiology* **8**, 222–232 (2011).
23. Lee, J. & Cooke, J.P. The role of nicotine in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **215**, 281–283 (2011).
24. Heeschen, C. *et al.* Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nature medicine* **7**, 833–839 (2001).

25. Kannel, W.B. & McGee, D.L. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. *Diabetes care* **2**, 120–126 (1979).
26. Turner, R.C. *et al.* Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ (Clinical research ed.)* **316**, 823–828 (1998).
27. Prince, C.T., Becker, D.J., Costacou, T., Miller, R.G. & Orchard, T.J. Changes in glycaemic control and risk of coronary artery disease in type 1 diabetes mellitus: findings from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study (EDC). *Diabetologia* **50**, 2280–2288 (2007).
28. Vlassara, H. & Palace, M.R. Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of internal medicine* **251**, 87–101 (2002).
29. Ramasamy, R., Yan, S.F. & Schmidt, A.M. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1243**, 88–102 (2011).
30. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813–820 (2001).
31. Piga, R., Naito, Y., Kokura, S., Handa, O. & Yoshikawa, T. Short-term high glucose exposure induces monocyte-endothelial cells adhesion and transmigration by increasing VCAM-1 and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* **193**, 328–334 (2007).
32. Chait, A. & Bornfeldt, K.E. Diabetes and atherosclerosis: is there a role for hyperglycemia? *Journal of lipid research* **50 Suppl**, S335-9 (2009).
33. Williams, B., Gallacher, B., Patel, H. & Orme, C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* **46**, 1497–1503 (1997).
34. Cosentino, F. *et al.* High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* **107**, 1017–1023 (2003).
35. Brandes, R.P., Fleming, I. & Busse, R. Endothelial aging. *Cardiovascular research* **66**, 286–294 (2005).
36. Celermajer, D.S. *et al.* Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *Journal of the American College of Cardiology* **24**, 471–476 (1994).
37. Rennenberg, R.J.M.W., Schurgers, L.J., Kroon, A.A. & Stehouwer, C.D.A. Arterial calcifications. *Journal of cellular and molecular medicine* **14**, 2203–2210 (2010).
38. Karwowski, W., Naumnik, B., Szczepanski, M. & Mysliwiec, M. The mechanism of vascular calcification - a systematic review. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **18**, RA1-11 (2012).
39. Ross, R., Glomset, J. & Harker, L. Response to injury and atherogenesis. *The American journal of pathology* **86**, 675–684 (1977).
40. Virchow, R. von. Phlogose und Thrombose im Gefäß-System. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin. *Meidinger, Frankfurt* (1856).
41. Hansson, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* **352**, 1685–1695 (2005).
42. Libby, P., Ridker, P.M. & Hansson, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**, 317–325 (2011).
43. Falk, E. Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* **47**, C7-12 (2006).
44. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U. & Moch, H. *Repetitorium Pathologie*. 2nd ed. (Urban & Fischer in Elsevier, München u.a., 2008).

45. França, C.N. *et al.* Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease. *Clinical science (London, England : 1979)* **131**, 1215–1224 (2017).
46. Goncharov, N.V., Avdonin, P.V., Nadeev, A.D., Zharkikh, I.L. & Jenkins, R.O. Reactive oxygen species in pathogenesis of atherosclerosis. *Current pharmaceutical design* **21**, 1134–1146 (2015).
47. Moore, K.J. & Tabas, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* **145**, 341–355 (2011).
48. Manning-Tobin, J.J. *et al.* Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **29**, 19–26 (2009).
49. Weber, C. & Noels, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine* **17**, 1410–1422 (2011).
50. Guthikonda, S. & Haynes, W.G. Homocysteine: role and implications in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports* **8**, 100–106 (2006).
51. Weiss, D., Sorescu, D. & Taylor, W.R. Angiotensin II and atherosclerosis. *The American journal of cardiology* **87**, 25C–32C (2001).
52. Nathan, L. & Chaudhuri, G. Estrogens and atherosclerosis. *Annual review of pharmacology and toxicology* **37**, 477–515 (1997).
53. Murphy, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circulation research* **109**, 687–696 (2011).
54. Baker, L. *et al.* The role of estrogen in cardiovascular disease. *The Journal of surgical research* **115**, 325–344 (2003).
55. Libby, P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *The New England journal of medicine* **368**, 2004–2013 (2013).
56. Amento, E.P., Ehsani, N., Palmer, H. & Libby, P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* **11**, 1223–1230 (1991).
57. Badimon, L., Padro, T. & Vilahur, G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *European heart journal. Acute cardiovascular care* **1**, 60–74 (2012).
58. Zernecke, A. *et al.* Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circulation research* **102**, 209–217 (2008).
59. Rotzius, P. *et al.* Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE^{-/-} mice. *The American journal of pathology* **177**, 493–500 (2010).
60. Drechsler, M., Megens, R.T.A., van Zandvoort, M., Weber, C. & Soehnlein, O. Hyperlipidemia-Triggered Neutrophilia Promotes Early Atherosclerosis. *Circulation* **122**, 1837–1845 (2010).
61. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* **10**, 427–439 (2010).
62. Massberg, S. *et al.* Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature medicine* **16**, 887–896 (2010).
63. Papayannopoulos, V. & Zychlinsky, A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in immunology* **30**, 513–521 (2009).
64. Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q. & Papayannopoulos, V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science (New York, N.Y.)* **349**, 316–320 (2015).
65. Massberg, S. *et al.* A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation. *J Exp Med* **196**, 887–896 (2002).
66. Gawaz, M., Langer, H. & May, A.E. Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of clinical investigation* **115**, 3378–3384 (2005).

67. Gawaz, M. *et al.* Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* **148**, 75–85 (2000).
68. Nahrendorf, M., Pittet, M.J. & Swirski, F.K. Monocytes. Protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* **121**, 2437–2445 (2010).
69. Niccoli, G. & Cosentino, N. Eosinophils: a new player in coronary atherosclerotic disease. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* **35**, 269–271 (2012).
70. Tanaka, M. *et al.* Eosinophil count is positively correlated with coronary artery calcification. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* **35**, 325–328 (2012).
71. Niccoli, G. *et al.* Eosinophil cationic protein: A new biomarker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* **211**, 606–611 (2010).
72. Gale, A.J. Current Understanding of Hemostasis. *Toxicologic pathology* **39**, 273–280 (2011).
73. Duerschmied, D., Bode, C. & Ahrens, I. Immune functions of platelets. *Thrombosis and haemostasis* **112**, 678–691 (2014).
74. Hundelshausen, P. von & Weber, C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circulation research* **100**, 27–40 (2007).
75. Furie Bruce & Furie Barbara C. Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* **359**, 938–949 (2008).
76. Marcus, A.J. *et al.* Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **31**, 234–246 (2005).
77. Dorsam, R.T. & Kunapuli, S.P. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *J. Clin. Invest.* **113**, 340–345 (2004).
78. Green, D. Coagulation cascade. *Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis* **10 Suppl 2**, S2-4 (2006).
79. Vu, T.K., Hung, D.T., Wheaton, V.I. & COUGHLIN, S.R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057–1068 (1991).
80. Broos, K., Feys, H.B., Meyer, S.F. de, Vanhoorelbeke, K. & Deckmyn, H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews* **25**, 155–167 (2011).
81. Jung, S.M. & Moroi, M. Activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1): its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. *Trends in cardiovascular medicine* **10**, 285–292 (2000).
82. Jurk, K. & Kehrel, B.E. Platelets: physiology and biochemistry. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **31**, 381–392 (2005).
83. Clemetson, K.J. Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis research* **129**, 220–224 (2012).
84. Lentz, B.R. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Progress in lipid research* **42**, 423–438 (2003).
85. Isenberg, J.S. *et al.* Thrombospondin-1 stimulates platelet aggregation by blocking the antithrombotic activity of nitric oxide/cGMP signaling. *Blood* **111**, 613–623 (2008).
86. Madhusudhan, T., Kerlin, B.A. & Isermann, B. The emerging role of coagulation proteases in kidney disease. *Nature reviews. Nephrology* **12**, 94–109 (2016).
87. COUGHLIN, S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* **3**, 1800–1814 (2005).
88. Manukyan, D., Bruehl, M.-L. von, Massberg, S. & Engelmann, B. Protein disulfide isomerase as a trigger for tissue factor-dependent fibrin generation. *Thrombosis research* **122**, S19-S22 (2008).
89. Reinhardt, C. *et al.* Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *The Journal of clinical investigation* **118**, 1110–1122 (2008).

90. Cho, J., Furie, B.C., Coughlin, S.R. & Furie, B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *The Journal of clinical investigation* **118**, 1123–1131 (2008).
91. Griffin, J.H., Fernandez, J.A., Gale, A.J. & Mosnier, L.O. Activated protein C. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **5 Suppl 1**, 73–80 (2007).
92. Gray, E., Mulloy, B. & Barrowcliffe, T.W. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thrombosis and haemostasis* **99**, 807–818 (2008).
93. Lwaleed, B.A. & Bass, P.S. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *The Journal of pathology* **208**, 327–339 (2006).
94. Loscalzo, J. Paradoxical embolism: clinical presentation, diagnostic strategies, and therapeutic options. *American heart journal* **112**, 141–145 (1986).
95. Jackson, S.P. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nature medicine* **17**, 1423–1436 (2011).
96. Ross, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American heart journal* **138**, S419-20 (1999).
97. Ruggeri, Z.M. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine* **8**, 1227–1234 (2002).
98. Nording, H.M., Seizer, P. & Langer, H.F. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Frontiers in immunology* **6**, 98 (2015).
99. Bentzon, J.F., Otsuka, F., Virmani, R. & Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research* **114**, 1852–1866 (2014).
100. Bucci, M., Tana, C., Giamberardino, M.A. & Cipollone, F. Lp(a) and cardiovascular risk: Investigating the hidden side of the moon. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* **26**, 980–986 (2016).
101. White, H.D. & Chew, D.P. Acute myocardial infarction. *The Lancet* **372**, 570–584 (2008).
102. Sheifer, S.E., Manolio, T.A. & Gersh, B.J. Unrecognized myocardial infarction. *Annals of internal medicine* **135**, 801–811 (2001).
103. Serhiyenko, V.A. & Serhiyenko, A.A. Cardiac autonomic neuropathy. Risk factors, diagnosis and treatment. *World journal of diabetes* **9**, 1–24 (2018).
104. Donnelly, R. & Millar-Craig, M.W. Cardiac troponins. IT upgrade for the heart. *The Lancet* **351**, 537–539 (1998).
105. Keller, T. *et al.* Serial changes in highly sensitive troponin I assay and early diagnosis of myocardial infarction. *JAMA* **306**, 2684–2693 (2011).
106. Achenbach, S., Szardien, S., Zeymer, U., Gielen, S. & Hamm, C.W. Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne persistierende ST-Streckenhebung. *Kardiologe* **6**, 283–301 (2012).
107. Reed, G.W., Rossi, J.E. & Cannon, C.P. Acute myocardial infarction. *The Lancet* (2016).
108. Neumann, F.-J. *et al.* 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *European heart journal* (2018).
109. Cannon, C.P. *et al.* Relationship of symptom-onset-to-balloon time and door-to-balloon time with mortality in patients undergoing angioplasty for acute myocardial infarction. *JAMA* **283**, 2941–2947 (2000).
110. O'Gara, P.T. *et al.* 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **127**, e362-425 (2013).
111. Steg, P.G. *et al.* ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* **33**, 2569–2619 (2012).
112. Kolh, P. *et al.* 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: the Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European

- Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **46**, 517–592 (2014).
113. Tada, T. *et al.* Risk of Stent Thrombosis Among Bare-Metal Stents, First-Generation Drug-Eluting Stents, and Second-Generation Drug-Eluting Stents. *JACC: Cardiovascular Interventions* **6**, 1267–1274 (2013).
114. Jolly, S.S. *et al.* Randomized trial of primary PCI with or without routine manual thrombectomy. *The New England journal of medicine* **372**, 1389–1398 (2015).
115. Mulloy, B., Hogwood, J., Gray, E., Lever, R. & Page, C.P. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. *Pharmacological reviews* **68**, 76–141 (2016).
116. Navarese, E.P. *et al.* Low-molecular-weight heparins vs. unfractionated heparin in the setting of percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction: a meta-analysis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **9**, 1902–1915 (2011).
117. Beri, A., Printz, M., Hassan, A. & Babb, J.D. Fibrinolysis versus primary percutaneous intervention in ST-elevation myocardial infarction with long interhospital transfer distances. *Clinical cardiology* **33**, 162–167 (2010).
118. Chapin, J.C. & Hajjar, K.A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood reviews* **29**, 17–24 (2015).
119. Corbyn, Z. Statistics: a growing global burden. *Nature* **510**, S2-3 (2014).
120. Donnan, G.A., Fisher, M., Macleod, M. & Davis, S.M. Stroke. *The Lancet* **371**, 1612–1623 (2008).
121. Andersen, K.K., Olsen, T.S., Dehlendorff, C. & Kammergaard, L.P. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: stroke severity, mortality, and risk factors. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **40**, 2068–2072 (2009).
122. Adams, H.P., JR *et al.* Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **24**, 35–41 (1993).
123. O'Donnell, M.J. *et al.* Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study). A case-control study. *The Lancet* **376**, 112–123 (2010).
124. Lawes, C.M.M., Bennett, D.A., Feigin, V.L. & Rodgers, A. Blood pressure and stroke: an overview of published reviews. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **35**, 1024 (2004).
125. Krishnamurthi, R.V. *et al.* Stroke Incidence by Major Pathological Type and Ischemic Subtypes in the Auckland Regional Community Stroke Studies. Changes Between 2002 and 2011. *Stroke* **49**, 3–10 (2018).
126. Hajat, C. *et al.* Incidence of aetiological subtypes of stroke in a multi-ethnic population based study. The South London Stroke Register. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **82**, 527–533 (2011).
127. Ferro, J.M. Cardioembolic stroke: an update. *The Lancet. Neurology* **2**, 177–188 (2003).
128. Freeman, W.D. & Aguilar, M.I. Prevention of cardioembolic stroke. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **8**, 488–502 (2011).
129. Watson, T., Shantsila, E. & Lip, G.Y.H. Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation. Virchow's triad revisited. *The Lancet* **373**, 155–166 (2009).
130. Sanna, T. *et al.* Cryptogenic stroke and underlying atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* **370**, 2478–2486 (2014).
131. Saver, J.L. CLINICAL PRACTICE. Cryptogenic Stroke. *The New England journal of medicine* **374**, 2065–2074 (2016).
132. Thomalla, G. *et al.* Bildgebung beim Schlaganfall – eine Übersicht und Empfehlungen des Kompetenznetzes Schlaganfall. *Akt Neurol* **36**, 354–367 (2009).

133. Marks, M.P. *et al.* Evaluation of early computed tomographic findings in acute ischemic stroke. *Stroke* **30**, 389–392 (1999).
134. Mair, G. *et al.* Sensitivity and specificity of the hyperdense artery sign for arterial obstruction in acute ischemic stroke. *Stroke* **46**, 102–107 (2015).
135. Douglas, V., Shamy, M. & Bhattacharya, P. Should CT Angiography be a Routine Component of Acute Stroke Imaging? *The Neurohospitalist* **5**, 97–98 (2015).
136. Heit, J.J., Zaharchuk, G. & Wintermark, M. Advanced Neuroimaging of Acute Ischemic Stroke. Penumbra and Collateral Assessment. *Neuroimaging clinics of North America* **28**, 585–597 (2018).
137. Schlaganfall-Gesellschaft, D. Leitlinien - Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft. Available at <http://www.dsg-info.de/leitlinien.html> (2016).
138. Jickling, G.C. & Sharp, F.R. Biomarker panels in ischemic stroke. *Stroke* **46**, 915–920 (2015).
139. Wang, W. *et al.* Diagnosis of Hyperacute and Acute Ischaemic Stroke. The Potential Utility of Exosomal MicroRNA-21-5p and MicroRNA-30a-5p. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* **45**, 204–212 (2018).
140. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **333**, 1581–1587 (1995).
141. Hacke, W. *et al.* Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* **274**, 1017–1025 (1995).
142. Zeumer, H., Hacke, W., Kolmann, H.L. & Poeck, K. Lokale Fibrinolysetherapie bei Basilaris-Thrombose. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* **107**, 728–731 (1982).
143. Furlan, A. *et al.* Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study. A randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA* **282**, 2003–2011 (1999).
144. Goyal, M. *et al.* Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke. A meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet* **387**, 1723–1731 (2016).
145. Powers, W.J. *et al.* 2015 American Heart Association/American Stroke Association Focused Update of the 2013 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke Regarding Endovascular Treatment. A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **46**, 3020–3035 (2015).
146. Heide, M. 030/140 Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls – Rekanalisierende Therapie (Ergänzung 2015). Available at <https://www.dgn.org/leitlinien/3198-030-140-rekanalisierende-therapie-ergaenzung-akuttherapie-schlaganfall#therapie> (2017).
147. Rha, J.-H. & Saver, J.L. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **38**, 967–973 (2007).
148. Rodrigues, F.B. *et al.* Endovascular treatment versus medical care alone for ischaemic stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)* **353**, i1754 (2016).
149. Semple, J.W., Italiano, J.E., JR & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews. Immunology* **11**, 264–274 (2011).
150. Palabrica, T. *et al.* Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* **359**, 848–851 (1992).
151. Gomez Perdiguero, E. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**, 547–551 (2015).
152. Schulz, C. & Massberg, S. Atherosclerosis--multiple pathways to lesional macrophages. *Science translational medicine* **6**, 239ps2 (2014).
153. Berg, K.E. *et al.* Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circulation. Cardiovascular genetics* **5**, 122–131 (2012).
154. Woollard, K.J. & Geissmann, F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews. Cardiology* **7**, 77–86 (2010).

155. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74-80 (2010).
156. Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C.C. & Hanna, R.N. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **35**, 1306–1316 (2015).
157. Loguinova, M. *et al.* Monocytes of Different Subsets in Complexes with Platelets in Patients with Myocardial Infarction. *Thrombosis and haemostasis* (2018).
158. Guha, M. & Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling* **13**, 85–94 (2001).
159. Wolberg, A.S., Monroe, D.M., Roberts, H.R. & Hoffman, M.R. Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* **10**, 201–210 (1999).
160. Muller, I. *et al.* Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 476–478 (2003).
161. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159–175 (2013).
162. Hager, M., Cowland, J.B. & Borregaard, N. Neutrophil granules in health and disease. *Journal of internal medicine* **268**, 25–34 (2010).
163. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 1532–1535 (2004).
164. Kraemer, B.F. *et al.* Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS pathogens* **7**, e1002355 (2011).
165. Clark, S.R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine* **13**, 463–469 (2007).
166. Li, P. *et al.* PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of experimental medicine* **207**, 1853–1862 (2010).
167. Vallés, J. *et al.* Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke. Prognostic significance. *Thrombosis and haemostasis* **117**, 1919–1929 (2017).
168. Wang, S. & Wang, Y. Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1829**, 1126–1135 (2013).
169. Bonaventura, A. *et al.* The Pathophysiological Role of Neutrophil Extracellular Traps in Inflammatory Diseases. *Thrombosis and haemostasis* **118**, 6–27 (2018).
170. Fuchs, T.A. *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 15880–15885 (2010).
171. Bruhl, M.-L. von *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of experimental medicine* **209**, 819–835 (2012).
172. Glaser, C.B. *et al.* Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. *The Journal of clinical investigation* **90**, 2565–2573 (1992).
173. Mangold, A. *et al.* Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circulation research* **116**, 1182–1192 (2015).
174. Carestia, A., Kaufman, T. & Schattner, M. Platelets: New Bricks in the Building of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in immunology* **7**, 271 (2016).

175. Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *The Journal of cell biology* **198**, 773–783, <http://jcb.rupress.org/content/jcb/198/5/773.full.pdf> (2012).
176. Rothenberg, M.E. & Hogan, S.P. The eosinophil. *Annual review of immunology* **24**, 147–174 (2006).
177. Rosenberg, H.F., Dyer, K.D. & Foster, P.S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature reviews. Immunology* **13**, 9–22 (2013).
178. Todd, S., Hemmaway, C. & Nagy, Z. Catastrophic thrombosis in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *British journal of haematology* **165**, 425 (2014).
179. Slungaard, A., Vercellotti, G.M., Tran, T., Gleich, G.J. & Key, N.S. Eosinophil cationic granule proteins impair thrombomodulin function. A potential mechanism for thromboembolism in hypereosinophilic heart disease. *The Journal of clinical investigation* **91**, 1721–1730 (1993).
180. Moosbauer, C. *et al.* Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood* **109**, 995–1002 (2007).
181. Riegger, J. *et al.* Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium†. *European heart journal* (2015).
182. Hedrick, C.C. Lymphocytes in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **35**, 253–257 (2015).
183. Tsiantoulas, D., Diehl, C.J., Witztum, J.L. & Binder, C.J. B cells and humoral immunity in atherosclerosis. *Circulation research* **114**, 1743–1756 (2014).
184. Mantani, P.T. *et al.* Circulating CD40+ and CD86+ B cell subsets demonstrate opposing associations with risk of stroke. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **34**, 211–218 (2014).
185. Lees, K.R. *et al.* Contemporary outcome measures in acute stroke research. Choice of primary outcome measure. *Stroke* **43**, 1163–1170 (2012).
186. HE Färbung. Hämatoxylinfärbung nach Gill III, Mayers Hämalalaun Lösung und Eosin G-Lösung. Available at <http://uk.vwr-cmd.com/ex/downloads/brochures/clinical/W287021.pdf> (2016).
187. Technical Data Sheets. Carstairs' Method for Fibrin & Platelets EMS Catalog #: 26381-Series. Available at <https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/26381.aspx> (2016).
188. M. Mulisch & U. Welsch eds. *Romeis. Mikroskopische Technik* (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010).
189. Gudrun Lang. *Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2nd ed. (Springer-WienNewYork, Wien, 2006).
190. Noll, S. & Schaub-Kuhnen, S. *Praxis der Immunhistochemie*. 1st ed. (Urban und Fischer, München u.a., 2000).
191. Hoechst Stains. Available at <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp21486.pdf> (2016).
192. Osterwalder, E. Immunhistochemie kompakt. Eine Einführung in die wichtigsten Grundlagen zu Theorie und Praxis. Available at http://www.histologietechnik.ch/downloads/einfuehrung_immunhistochemie.pdf (2016).
193. Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse. Available at <http://www.dako.com/de/download.pdf?objectid=128470001> (2016).
194. Wikipedia. Microscope-letters - Lichtmikroskop. Available at User:Tomia (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscope-letters.svg>), „Microscope-letters“, <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode> (2018).
195. NanoZoomer series. Available at http://www.hamamatsu.com/resources/pdf/sys/SBIS0043E_NanoZoomers.pdf (2016).
196. Novotny, J. *et al.* Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction. *Neurology* **94**, 2346–2360 (2020).

197. Karlsson, S. *et al.* Heparin pre-treatment in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and the risk of intracoronary thrombus and total vessel occlusion. Insights from the TASTE trial. *European heart journal. Acute cardiovascular care*, 2048872617727723 (2017).
198. Giralt, T. *et al.* Time-dependent effects of unfractionated heparin in patients with ST-elevation myocardial infarction transferred for primary angioplasty. *International journal of cardiology* **198**, 70–74 (2015).
199. Kraljicková, D. *et al.* Fibrin Clot Architecture in Acute Ischemic Stroke Treated With Mechanical Thrombectomy With Stent-Retrievers - Cohort Study. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **82**, 866–873 (2018).
200. Silvain, J. *et al.* Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **57**, 1359–1367 (2011).
201. Yunoki, K. *et al.* Thrombus aspiration therapy and coronary thrombus components in patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **20**, 524–537 (2013).
202. Sadowski, M., Ząbczyk, M. & Undas, A. Coronary thrombus composition. Links with inflammation, platelet and endothelial markers. *Atherosclerosis* **237**, 555–561 (2014).
203. Sato, Y. *et al.* Proportion of fibrin and platelets differs in thrombi on ruptured and eroded coronary atherosclerotic plaques in humans. *Heart (British Cardiac Society)* **91**, 526–530 (2005).
204. Dai, J. *et al.* In vivo predictors of plaque erosion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. A clinical, angiographical, and intravascular optical coherence tomography study. *European heart journal* **39**, 2077–2085 (2018).
205. Sporns, P.B. *et al.* Ischemic Stroke: What Does the Histological Composition Tell Us About the Origin of the Thrombus? *Stroke* **48**, 2206–2210 (2017).
206. Boeckh-Behrens, T. *et al.* Thrombus Histology Suggests Cardioembolic Cause in Cryptogenic Stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **47**, 1864–1871 (2016).
207. Kaito, M. *et al.* Relevance of distinct monocyte subsets to clinical course of ischemic stroke patients. *PloS one* **8**, e69409 (2013).
208. Uderhardt, S. *et al.* Enzymatic lipid oxidation by eosinophils propagates coagulation, hemostasis, and thrombotic disease. *The Journal of experimental medicine* **214**, 2121–2138 (2017).
209. Ruan, L. *et al.* Correlates of common carotid artery lumen diameter in black and white younger adults. The Bogalusa Heart Study. *Stroke* **40**, 702–707 (2009).
210. Dodge, J.T., Brown, B.G., Bolson, E.L. & Dodge, H.T. Lumen diameter of normal human coronary arteries. Influence of age, sex, anatomic variation, and left ventricular hypertrophy or dilation. *Circulation* **86**, 232–246 (1992).
211. Helseth, R., Solheim, S., Arnesen, H., Seljeflot, I. & Opstad, T.B. The Time Course of Markers of Neutrophil Extracellular Traps in Patients Undergoing Revascularisation for Acute Myocardial Infarction or Stable Angina Pectoris. *Mediators of inflammation* **2016**, 2182358 (2016).
212. Ramaiola, I. *et al.* Changes in thrombus composition and profilin-1 release in acute myocardial infarction. *European heart journal* **36**, 965–975 (2015).
213. Laridan, E. *et al.* Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Annals of neurology* (2017).
214. Marx, C. *et al.* Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis by eosinophil extracellular traps. *Blood* (2019).
215. Knight, J.S. *et al.* Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. *Circulation research* **114**, 947–956 (2014).
216. Ducroux, C. *et al.* Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* **49**, 754–757 (2018).

11 Danksagung

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Schulz für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, den wertvollen fachlichen Austausch über das interessante Thema dieser Dissertation und die große Unterstützung während aller Phasen dieser Dissertation.

Gleichermaßen danke ich Herrn Prof. Dr. med. Massberg für die Möglichkeit, in seinem Labor meine Dissertation anzufertigen, sowie den vielen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, die mich bei den Experimenten unterstützt und die Zeit im Labor zu einer interessanten Erfahrung gemacht haben.

Ich danke Herrn Dr. med. Boeckh-Behrens von der Technischen Universität München für den exzellenten wissenschaftlichen Austausch und die Unterstützung bei vielen Fragestellungen.

Einen besonderen Dank möchte ich der Deutschen Herzstiftung aussprechen, die mir mit dem *Kaltenbach-Doktorandenstipendium* ermöglicht hat, mich ein ganzes Jahr in Vollzeit auf die Anfertigung dieser Dissertation konzentrieren zu können.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich, weil sie mich stets unterstützt und mir das Studium der Medizin ermöglicht haben.

Zuletzt danke ich meiner Frau Laura für ihre Motivation, Unterstützung und unglaubliche Geduld.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Merkmale der Immuno­thrombose in arteriellen Thromben von Patienten mit akutem Myokardinfarkt und ischämischen Apoplex- eine explorative Studie zum Vergleich der Histologie und zur Korrelation klinischer Parameter“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01.12.2019

Paul Jörg