

Aus dem
Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung (ISD)
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Martin Dichgans

**Einfluss präanalytischer Prozesse auf das zirkulierende Metabolom
bei Schlaganfallpatienten – und patientinnen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hanna Christina Kollmeier

aus
München

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. Martin Dichgans
Mitberichtersteller: Prof. Dr. Christian Opherke
Priv. Doz. Dr. Lucia Gerstl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Dr. Steffen Tiedt

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2025

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Martin Dichgans bedanken für die Möglichkeit, am Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung unter seiner Leitung Forschungsarbeit zu lernen und zu promovieren. Ausdrücklich möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Dr. med. Steffen Tiedt bedanken, der mit viel Motivation, Ausdauer und Hingabe seine Doktorandinnen und Doktoranden betreut. Er unterstützte mich in dem Prozess dieser Arbeit stets und stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Außerdem gilt mein Dank Asli Kaya Wenig und Julian Angermeier, mit denen ich gemeinsam an der „CIRCULAS“-Studie arbeiten durfte und die mich somit bei meiner Doktorarbeit begleitet haben. Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung für die viele Unterstützung und die kollegiale Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt den Patientinnen und Patienten sowie deren Angehörigen und den Probandinnen und Probanden, die sich trotz teils akuter Erkrankung einverstanden gezeigt haben, an der Studie teilzunehmen und damit einen wichtigen Beitrag zur Forschungsarbeit zu leisten. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Mann bedanken für die Ausdauer, mit der sie mir während des Prozesses dieser Arbeit stets beistanden.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1. Definition	7
1.2. Epidemiologie.....	8
1.3. Kosten	9
1.4. Pathophysiologie	9
1.5. Ätiologie	11
1.6. Risikofaktoren	12
1.7. Prävention	15
1.8. Diagnostik	18
1.9. Therapie	21
1.10. Biomarker in der Medizin	22
1.10.1. Begriffsdefinition und Anwendungsbereiche.....	22
1.10.2. Vor- und Nachteile von Biomarkern.....	24
1.10.3. Biomarker beim ischämischen Schlaganfall	26
1.10.3.1. Potentielle Anwendungsbereiche	26
1.10.3.2. Identifizierung neuer Biomarker mittels Multi-Omik-Analysen	29
1.10.4. Auswirkungen präanalytischer Prozesse in der Metabolomik	35
2. RELEVANZ UND INHALT DER FORSCHUNGSFRAGE.....	38
3. MATERIAL UND METHODEN.....	40
3.1. Studiendesign	40
3.2. Datenerhebung	40
3.2.1. Ethikvotum.....	40
3.2.2. Krankengeschichte	41
3.2.3. Gruppenzuordnung.....	41
3.2.4. Drei-Monats-Follow-Up	42
3.3. Probengewinnung und -verarbeitung	43
3.3.1. Blutentnahme	43

3.3.2.	Prozessierung der Proben	43
3.3.3.	Abweichungen in der Probengewinnung und -verarbeitung.....	44
3.3.4.	Messung der Metabolite.....	45
3.4.	Statistische Methoden.....	45
4.	ERGEBNISSE	51
4.1.	Deskriptive Statistik.....	51
4.2.	Analysen bzgl. der Zeit von der Blutentnahme bis zum Einfrieren	55
4.3.	Analysen bzgl. der Zeit von der Blutentnahme bis zur Zentrifugation	58
4.4.	Analysen bzgl. der Zeit von der Zentrifugation bis zum Einfrieren	61
4.5.	Analysen bzgl. einer potentiellen Hämolyse	64
4.6.	Analysen bzgl. der venösen Blutentnahme.....	65
4.7.	Zusammenfassung der Ergebnisse	67
5.	DISKUSSION	69
6.	LIMITATIONEN	75
7.	ZUSAMMENFASSUNG	77
8.	SUMMARY	78
9.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	79
10.	TABELLENVERZEICHNIS	80
11.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	81
12.	LITERATURVERZEICHNIS	83
13.	ANHANG	102
13.1.	Publikationsliste	102
13.2.	Lebenslauf	103
13.3.	Eidesstattliche Versicherung.....	105

13.4.	Übereinstimmungserklärung der gebundenen und der elektronischen Fassung.....	106
--------------	---	------------

1. Einleitung

1.1. Definition

Dem Krankheitsbild Schlaganfall werden eine Reihe von Begriffen zugeordnet, die im Folgenden erklärt werden sollen: Ein ZNS-Infarkt ist ein auf eine Ischämie zurückzuführender Zelltod des Gehirns, des Rückenmarks oder der Netzhaut, der auf dem pathologischen, bildgebenden oder sonstigen objektiven Nachweis einer fokalen ischämischen Schädigung des Gehirns, des Rückenmarks oder der Netzhaut in einer definierten Gefäßverteilung basiert. Der klinische Nachweis einer fokalen ischämischen Schädigung des Gehirns, des Rückenmarks oder der Netzhaut gelingt aufgrund von Symptomen, die ≥ 24 Stunden oder bis zum Tod andauern, wobei andere Ursachen ausgeschlossen sind. Im Rahmen des Schlaganfalls differenziert man weiter den ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall, wobei sich der ischämische Schlaganfall durch eine akute neurologische Symptomatik auszeichnet, die durch einen Infarkt bedingt ist, und sich der hämorrhagische Schlaganfall durch eine Ansammlung von Blut im Gehirnparenchym oder in den Ventrikeln ohne stattgehabtes Trauma auszeichnet. Des Weiteren wird der Begriff „stiller ZNS-Infarkt“ für bildmorphologisch oder neuropathologisch nachgewiesene Infarktläsionen ohne stattgehabte passende Klinik hierfür verwendet. Simultan existiert der Begriff der „stillen Blutung“, wobei bildmorphologisch oder neuropathologisch Blut im Gehirnparenchym, in den Ventrikeln oder im Subarachnoidalraum nachgewiesen werden kann ohne stattgehabte passende Symptomatik. Außerdem zählt man die Subarachnoidalblutung sowie Infarkte oder Blutungen als Folge einer Sinus- oder Venenthrombose zu dem Begriff Schlaganfall^{1, 2}. Eine weitere wichtige Definition stellt die der transitorischen ischämischen Attacke dar, die lange als akut aufgetretenes, fokales neurologisches Defizit mit einer Dauer von weniger als 24 Stunden definiert wurde. Aktuell spricht man von einer transitorischen ischämischen Attacke bei einer passageren fokalen neurologischen Symptomatik aufgrund einer Ischämie ohne Nachweis eines Infarktes oder eines Gewebeuntergangs. Man bezeichnet diese Definition auch als gewebebasiert im Vergleich zur zeitbasierten veralteten Definition²⁻

1.2. Epidemiologie

Der ischämische Schlaganfall ist eine der häufigsten Ursachen für Mortalität und Langzeitbehinderung weltweit. Im Jahr 2021 lebten in 204 untersuchten Ländern weltweit 93,8 Millionen Patientinnen und Patienten mit ischämischem Schlaganfall und 7,3 Millionen Menschen starben in Folge eines ischämischen Schlaganfalls⁵. Nach der ischämischen Herzkrankheit steht der ischämische Schlaganfall international an zweiter Stelle als Auslöser für sogenannte „DALYs“ (disability-adjusted life-years). Diese Bezeichnung wurde von der Weltgesundheitsorganisation als „die Summe verlorengegangener Jahre eines Menschenlebens aufgrund von verfrühtem Tod oder Behinderung durch eine Erkrankung“ definiert⁶. Innerhalb neurologischer Krankheitsbilder trägt der ischämische Schlaganfall bezüglich der DALYs global gesehen die größte Belastung bei⁵. Obwohl die Inzidenz, Mortalität und DALYs innerhalb der letzten Jahrzehnte in Ländern mit hohem Einkommen deutlich sank, nimmt die globale Belastung durch ischämische Schlaganfälle aktuell zu. Dies erklärt sich vor allem durch die steigenden Fallzahlen in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen. So sah man in diesen Ländern in den letzten vier Jahrzehnten einen Anstieg der Inzidenz des ischämischen Schlaganfalls um 100 %, während sie in Ländern mit hohem Einkommen um 42 % abfiel⁷. Die Verbesserung in den reichen, entwickelten Ländern lässt sich am besten durch Fortschritte bezüglich der Präventions-, Therapie- und Rehabilitationsmaßnahmen erklären⁸. Die Zunahme der globalen Belastung durch diese Erkrankung liegt wohl vor allem am Wachstum der weltweiten Bevölkerung, der zunehmenden Alterung und dem häufigeren Vorliegen von modifizierbaren, aber schlecht therapierten kardiovaskulären Risikofaktoren, besonders in Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen⁸. Hierbei muss besonders darauf hingewiesen werden, dass in Ländern mit schneller Veränderung der epidemiologischen Situation - wie das aktuell beispielsweise in Entwicklungsländern der Fall ist - aktuelle Daten oftmals nicht vorhanden sind. Außerdem ist ein internationaler Vergleich hinsichtlich epidemiologischer Daten problematisch aufgrund sehr verschiedener Definitionen der Erkrankung Schlaganfall und unterschiedlicher Art und Ausmaß der Datengewinnung, welche zu einer Über- und Unterrepräsentation bestimmter Regionen führen kann⁹. Laut Stahmeyer et al. erlitten in Deutschland im Jahr 2010/2011 im Schnitt 292 Menschen von 100 000 Einwohnern jährlich einen Schlaganfall, wovon ca. 81 % ischämische Schlaganfälle waren. Die Angaben zur Inzidenz variieren in Deutschland je nach methodischen Herangehensweisen und Studienpopulation. Das Risiko eines Rezidivs nach ischämischem Schlaganfall beträgt 11 % innerhalb des ersten Jahres und 15 % innerhalb der ersten

zwei Jahre, was die Notwendigkeit für systematische Präventionsmaßnahmen aufzeigt. Wie in vielen entwickelten Ländern über die letzten Jahre beobachtet, sinkt auch in Deutschland die Mortalität des ischämischen Schlaganfalls, was meist durch bedeutende Fortschritte in Diagnostik und Therapie erklärt wird¹⁰.

1.3. Kosten

Im Jahr 2019 war der ischämische Schlaganfall global betrachtet die zweithäufigste Todesursache nach der ischämischen Herzkrankheit. Im Jahr 2021 wurde der ischämische Schlaganfall durch die COVID-19-Krankheit auf Platz drei der häufigsten Todesursachen weltweit verdrängt¹¹. In Deutschland belaufen sich im Jahr 2020 die Kosten pro Schlaganfallpatientin oder -patient pro Jahr auf 34.133 US-Dollar¹². Die gemessenen Ausgaben beinhalten die direkten Kosten, die im Rahmen der Versorgung des Gesundheitssystems entstehen, und die indirekten Kosten, die auf die verlorene Produktivität infolge der Morbidität und Mortalität der Erkrankung zurückzuführen sind und somit im Verlauf entstehen¹³. Unter den kardiovaskulären Erkrankungen wird der Schlaganfall als die Erkrankung angesehen, die in Zukunft den größten relativen Anstieg der medizinischen Kosten verursachen könnte¹⁴.

1.4. Pathophysiologie

Der zugrundeliegende Mechanismus einer zerebralen Ischämie besteht aus einer lokalen Minderdurchblutung des Hirngewebes. Dadurch kommt es zu einer Unterversorgung der Zellen mit Sauerstoff und Glucose, was letztendlich je nach Ausmaß und Dauer dieser Unterversorgung zu Funktionseinschränkungen und bis zum irreversiblen Ausfall der betroffenen Zellen führen kann¹⁵. Bei Sauerstoffmangel beginnt der Körper mit der anaeroben Form der Energiegewinnung, wobei Laktat entsteht, welches zu metabolischen Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt der Zellen führt. Außerdem werden aufgrund des Glucosemangels Energie produzierende Prozesse in der Zelle gehemmt. Diese Mechanismen sind jedoch essentiell für die Zellfunktion, die nun beeinträchtigt wird. Die Neurone gehen unter und setzen in der Folge vermehrt Glutamat frei, was zu einer Stimulation anderer Zellen wie Mikroglia und Astrozyten führt¹⁶. Im Verlauf kommt es durch die Energiereduktion zu einer Störung der Ionenhomöostase und zur mitochondrialen Dysfunktion, die letztendlich zu Nekrose und Apoptose führt. Durch oxidative freie Radikale werden zelluläre Schäden verstärkt. Außerdem findet eine

inflammatorische Reaktion statt, die eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, einen sekundären neuronalen Schaden und ein zerebrales Ödem zur Folge hat^{15, 16}. Innerhalb der geschädigten Neurone kommt es postischämisch zu einer falschen Faltung und Aggregation von Proteinen, was wiederum zur Beeinträchtigung zellulärer Signalwege führt und neurotoxisch sein kann¹⁷. Die größte Gruppe aggregierender Proteine bei Ischämie sind RNA-bindende Proteine, wobei das genaue Ausmaß von betroffenen Proteinen aktuell noch unklar und Gegenstand der Forschung ist¹⁸. Im Kern des Ischämiegebietes entsteht der größte Schaden, wobei die Randzone oftmals durch Kollateralen ausreichend mit Blut versorgt wird. Dieser Bereich wird als Penumbra bezeichnet und ist potentiell durch therapeutische Maßnahmen vor dem Zelltod zu retten. Durch eine schnelle Wiederherstellung der Zirkulation kann es also gelingen, die Ausprägung des Infarktkerns zu minimieren. Jedoch muss man bedenken, dass nicht nur die Größe des infarzierten Gebietes, sondern auch die Lokalisation dieser Region, die Perfusions-toleranz des dort lokalisierten Gewebes und die Gefäßversorgung vor Ort entscheidend für das Defizit der Patientinnen und Patienten sind¹⁵. So beschreiben Cai et al. eine verstärkte Anfälligkeit der sogenannten „neurovaskulären Einheit“ bei Ischämien im Laufe des Alterungsprozesses. Der Begriff „neurovaskuläre Einheit“ wurde geprägt durch neue Erkenntnisse bezüglich der Entstehung von funktionellen Defiziten nach ischämischem Schlaganfall. So kam man in den letzten Jahren zunehmend davon ab, nur die neuronale Schädigung als Ursache der Defizite zu sehen. Denn die Funktion des Gehirns basiert auf Interaktionen zwischen vielen verschiedenen Komponenten, die unter dem Begriff „neurovaskuläre Einheit“ zusammengefasst wurden. Dazu gehören die Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten, Endothelzellen und Perizyten. All diese Komponenten verändern sich im Rahmen des Alterungsprozesses und reagieren sensibler auf Ischämien oder auch neurodegenerative Erkrankungen. Im Rahmen einer Ischämie kann man im Alter dementsprechend vermehrt Nekrose und Apoptose, eine verstärkte inflammatorische Reaktion mit Störung der Blut-Hirn-Schranke und eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit beobachten¹⁹.

Das Verständnis dieser pathophysiologischen Prozesse im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls hat große Bedeutung bezüglich der Erforschung neuer diagnostischer und therapeutischer Optionen.

1.5. Ätiologie

Der Ursache der Minderdurchblutung im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls auf den Grund zu gehen, hat Bedeutung für die Therapie, Prävention und Prognose der Patientinnen und Patienten. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Studie „Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment“ (TOAST) ein Diagnosesystem für die Schlaganfallssubtypen entwickelt. Dieses Klassifikationssystem beinhaltet fünf verschiedene Kategorien, die es bei der Ursachenabklärung eines ischämischen Schlaganfalls zu berücksichtigen gilt. Dazu gehören die Makroangiopathie (1), kardial embolische Ursachen (2), die Mikroangiopathie (3), eine andere erklärende Ursache (4) und eine unbekannte Ätiologie (5). Um diese Einteilung zu ermöglichen, sind verschiedene diagnostische Methoden notwendig wie z. B. eine Bildgebung des Gehirns und des Herzens, die Darstellung der intra- und extrakraniellen Gefäße und Laborwerte z. B. bezüglich Störungen des Blutgerinnungssystems. Dabei trifft die Klassifikation der Makroangiopathie zu, wenn eine Stenose $> 50\%$ oder ein Verschluss einer großen Gehirnarterie klinisch und bildgebungstechnisch nachgewiesen werden kann und eine kardiale Emboliequelle ausgeschlossen wurde. Eine Zuordnung zur zweiten Gruppe der TOAST-Klassifikation benötigt hingegen den Nachweis einer kardialen Emboliequelle. Eine Mikroangiopathie als Ursache kann festgestellt werden, wenn die Bildgebung lakunäre Infarkte zeigt und eine Makroangiopathie und eine kardiale Emboliequelle ausgeschlossen werden konnten. Lakunäre Infarkte zeichnen sich durch eine typische klinische Präsentation ohne Zeichen für eine kortikale Schädigung aus, wobei die Bildgebung entweder unauffällig sein sollte oder lediglich kleine ($< 1,5$ cm Durchmesser), subkortikale oder infratentorielle Läsionen zeigen sollte. Die vierte Kategorie der TOAST-Klassifikation beinhaltet seltene Ursachen für ischämische Schlaganfälle wie z. B. Vaskulopathien oder Gerinnungsstörungen, die laborchemisch oder bildgebungstechnisch diagnostiziert werden. Zuletzt existiert die Gruppe der ischämischen Schlaganfälle unklarer Ätiologie. Dies kann bedeuten, dass trotz ausführlicher Diagnostik keine Ursache gefunden wurde, die Diagnostik nicht vervollständigt werden konnte oder zwei oder mehr potentiell konkurrierende Ursachen vorliegen, weshalb die eindeutige Zuordnung zu einer Gruppe nicht möglich ist²⁰. Verschiedene Studien untersuchten die Vor- und Nachteile der Verwendung der TOAST-Klassifikation zur Einteilung der ischämischen Schlaganfälle. So wurde diese Klassifikation entwickelt als objektive, einfache Alternative, die eine Aussage machen kann über funktionelle Abhängigkeit und Tod je nach Schlaganfallssubtyp und somit prognostischen Nutzen haben soll^{21, 22}. Doch über die Jahre zeigten sich nach und nach auch Limitationen dieses neuen

Systems. Beispielsweise erfolgt eine Einteilung in die Gruppe fünf in 40 % der Fälle, was durch die harten Kriterien für die anderen Gruppen, durch unvollständige Diagnostik oder konkurrierende Ätiologien begründet werden kann. Denn alle diese Fälle gehören gemäß der TOAST-Klassifikation in die Gruppe der Schlaganfälle unklarer Ätiologie²¹. Yang et al. zeigten außerdem einen möglichen Einfluss der Erfahrung des Untersuchers auf die Zuverlässigkeit der Einteilung nach der TOAST-Klassifikation. Dies bezieht sich sowohl auf die intra- als auch interindividuelle Reliabilität²³. Ein ideales Klassifikationssystem müsste folgende Eigenschaften besitzen: valide, einfach in der Handhabung, evidenz-basiert und aktuell. Dementsprechend versuchte man in den letzten Jahren weitere neue Klassifikationssysteme zu entwickeln wie z. B. CCS („Causative Classification System“), ASCO („Atherosclerosis, Small Vessel Disease, Cardiac Source, Other Cause“) oder CISS („Chinese Ischemic Stroke Subclassification“), die ebenfalls ihre Vor- und Nachteile haben und in Zukunft weiter untersucht werden müssen²¹.

1.6. Risikofaktoren

Die „INTERSTROKE“ Studie war die erste große standardisierte Fall-Kontroll-Studie bezüglich der Risikofaktoren des ischämischen Schlaganfalls. In diesem Rahmen wurden im Jahr 2010 3000 Fälle und 3000 Kontrollen aus 22 verschiedenen Ländern und im Jahr 2016 13 000 Fälle und über 13 000 Kontrollen aus 32 verschiedenen Ländern analysiert^{24, 25}. Dabei konnte gezeigt werden, dass 90 % der ischämischen Schlaganfälle auf zehn modifizierbare Risikofaktoren zurückzuführen sind. Dies sind die arterielle Hypertonie, die physische Aktivität, das Verhältnis von Apolipoprotein B zu A1, die Ernährung, das Taille-zu-Hüft-Verhältnis, psychosoziale Faktoren, das Rauchen, kardiale Ursachen, der Alkoholkonsum und der Diabetes mellitus. Es konnten Unterschiede je nach Geschlecht und Alter festgestellt werden, wobei die Risikofaktoren Rauchen und Alkoholkonsum stärker unter Männern und der Risikofaktor Taille-zu-Hüft-Verhältnis vermehrt bei Frauen repräsentiert ist^{17,26}.

Die arterielle Hypertonie stellt den wichtigsten Risikofaktor für den ischämischen Schlaganfall dar, wobei sie 65,1 % der DALYs in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen und 59,8 % der DALYs in Ländern mit hohem Einkommen verursacht⁷.

Des Weiteren konnten Lee et al. zeigen, dass eine moderate und intensive körperliche Betätigung mit einem niedrigeren Risiko für das Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls und mit einer geringeren Mortalität dieser Erkrankung einhergeht^{27, 28}. Hierfür gibt es verschiedene

mögliche Erklärungen: Einerseits führt körperliche Aktivität zur Verbesserung des Blutdruckes und des Lipidprofils. Andererseits spielt sie eine Rolle in endothelialen Mechanismen und kann antithrombozytäre Wirkung haben, was wiederum das Vorkommen kardiovaskulärer Ereignisse vermindern kann^{20,29}.

Im Rahmen der prospektiven „AMORIS-Studie“ konnte ein signifikanter Zusammenhang von hohen ApoB-Spiegeln und niedrigen ApoA1-Spiegeln mit dem Risiko besonders für den ischämischen Schlaganfall gezeigt werden. Demnach ist das Verhältnis von Apolipoprotein B zu A1 ein stärkerer Prädiktor für das Schlaganfallrisiko als die Verhältnisse zwischen Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin³⁰⁻³².

Der Einfluss der Ernährung und der Darmflora auf das kardiovaskuläre System erlangt immer mehr an Bedeutung³³. So konnte gezeigt werden, dass eine mediterrane Ernährung und der Verzicht auf rotes Fleisch und Eier das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse wie ischämische Schlaganfälle oder Myokardinfarkte senken kann^{24, 34}. Chiu et al. untersuchten die Assoziation zwischen einer rein vegetarischen Ernährung und der Inzidenz für ischämische Schlaganfälle in Taiwan. Die Vegetarierinnen und Vegetarier zeigten niedrigere Vitamin-B-12-Spiegel und höhere Folat- und Homocystein-Spiegel als die Kontrollgruppe. Des Weiteren hatte die vegetarische Gruppe ein um 74 % geringeres Risiko für das Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls. Diese Assoziation wurde nur leicht abgeschwächt unter Berücksichtigung bekannter kardiovaskulärer Mediatoren und Komorbiditäten³⁵. Man geht davon aus, dass durch die Ernährung verursachte Veränderungen der Darmflora ebenfalls eine Induktion von Thrombozyten und thrombotische Ereignisse fördern können und somit eine Rolle in der Pathogenese des ischämischen Schlaganfalls spielen^{36, 37}.

Eine Erhöhung des ebenfalls zu den metabolischen Risikofaktoren gehörenden Taille-zu-Hüft-Verhältnisses geht mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Tod oder Pflegebedürftigkeit nach dem ersten Auftreten eines akuten ischämischen Schlaganfalls bei beiden Geschlechtern einher³⁸.

Einen weiteren Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen stellt die psychosoziale Belastung dar. Das Ausmaß der Assoziation hängt von der Ausprägung, Dauer und individuellen Reaktion auf die stressverursachenden Bedingungen ab, wobei psychosoziale Faktoren in

jeder Altersstufe eine Rolle spielen können und vermehrt bei Frauen eine Assoziation zu einem erhöhten Schlaganfallrisiko festgestellt werden konnte^{39, 40}.

Besonders innerhalb des männlichen Geschlechts aber auch geschlechtsübergreifend stellt der Nikotinkonsum einen wichtigen Risikofaktor für den Schlaganfall dar²⁵. Raucher haben im Vergleich zu Nichtrauchern ein erhöhtes Risiko für die meisten Subtypen des Schlaganfalles, wobei die Höhe des Risikos von der Dosis abhängt. Eine Steigerung des Zigarettenkonsums um fünf Zigaretten täglich erhöht das Gesamtrisiko für einen Schlaganfall um 12 %⁴¹. Zigarettenrauch kann durch seine toxischen Inhaltsstoffe zu endothelialer Dysfunktion, Lipidoxidation, Inflammation, Thrombozytenaktivierung, Thrombogenese und erhöhter Koagulabilität führen^{42, 43}. Des Weiteren geht man davon aus, dass Rauchen einen hämodynamischen Effekt hat und den arteriellen Blutfluss beeinflussen kann⁴⁴. All diese Mechanismen beeinträchtigen das kardiovaskuläre System und können das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen⁴². Dabei spielen sie sowohl bei aktivem als auch bei passivem Rauchen eine Rolle⁴⁵. Ein Rauchstopp hingegen kann dieses Risiko schnell und zuverlässig wieder reduzieren, weshalb die Raucherentwöhnung als präventive Maßnahme von solch großer Bedeutung ist^{43, 46}.

Der Anteil an kardioembolischen Ursachen für ischämische Schlaganfälle wird immer größer⁴⁷. Außerdem ist diese Ätiologie die, die am häufigsten zu schweren Schlaganfällen mit schwerwiegenden funktionellen Defiziten, zum Tod oder zu Schlaganfallrezidiven führt⁴⁸. Vorhofflimmern ist mit über 33 Millionen betroffenen Menschen weltweit die häufigste Rhythmusstörung mit klinischer Signifikanz⁴⁹. Ungefähr 24,6 % der Patientinnen und Patienten mit ischämischem Schlaganfall leiden unter Vorhofflimmern, was wiederum einen negativen Einfluss auf die Mortalität hat⁵⁰. Man geht davon aus, dass die Inzidenz des Vorhofflimmerns aufgrund der zunehmenden Alterung der Bevölkerung und Gewohnheiten mit negativem Einfluss auf das kardiovaskuläre System in den nächsten Jahrzehnten weiter steigen wird⁵¹. Als weitere kardiale Ursachen für einen ischämischen Schlaganfall sollten das offene Foramen ovale mit der Gefahr einer paradoxen Embolie, der Zustand nach Myokardinfarkt (25 % Schlaganfälle innerhalb vier Wochen nach akutem Herzinfarkt) und seltenere Ursachen wie die infektiöse Endokarditis oder eine Thrombosierungsneigung bei prothetischen Herzklappen erwähnt werden⁴⁷.

Einen weiteren Risikofaktor für die Entstehung eines ischämischen Schlaganfalls stellt der Alkoholkonsum dar. Hierbei hängt das jeweilige Risiko von der Dosis und Art der

Alkoholeinnahme ab. Moderater Alkoholkonsum von ein bis zwei Getränken täglich an vier Tagen pro Woche kann protektiv auf das kardiovaskuläre System wirken^{52, 53}. Wird dieselbe Gesamtmenge jedoch an weniger Tagen aufgenommen, kann dies negative Einflüsse haben⁵³. Das Gesamtrisiko für das Auftreten eines Schlaganfalls steigt signifikant ab einer Alkoholaufnahme von mehr als 40 g täglich⁵⁴.

Zuletzt wird der Diabetes mellitus als wichtiger Risikofaktor behandelt. Man geht davon aus, dass die globale Zahl an Erwachsenen mit der Diagnose Diabetes mellitus in den nächsten Jahren deutlich steigen wird: Ein Anstieg der Prävalenz um 69 % in Entwicklungsländern und um 20 % in entwickelten Ländern wird vermutet, was besonders durch die zunehmende Häufigkeit des metabolischen Syndroms erklärt werden kann⁵⁵. Diabetes erhöht das Risiko für die wichtigsten Subtypen des Schlaganfalls circa um das Zweifache, weshalb ein Anstieg der Prävalenz dieser Erkrankung enormen Einfluss auf die Epidemiologie des Schlaganfalls haben kann⁵⁶. Dieser Effekt wird beim weiblichen Geschlecht als signifikant höher beschrieben⁵⁷. Pathophysiologische Veränderungen durch Diabetes sind gekennzeichnet durch endotheliale Dysfunktion, erhöhte Steifigkeit der arteriellen Gefäße, systemische Inflammation und Verdickung der Basalmembran der Kapillaren⁵⁵. Diese Mechanismen können zu mikroangiopathischen Veränderungen und infolgedessen zu lakunären Schlaganfällen führen⁵⁸.

Neben diesen modifizierbaren Risikofaktoren bestehen auch einige nicht modifizierbare Faktoren wie das Alter der Patientinnen und Patienten, das Geschlecht, die ethnische Herkunft, geographische Unterschiede und genetische Mechanismen, die bei der Abschätzung des Schlaganfallrisikos bedacht werden müssen⁵⁹.

1.7. Prävention

Wie im Kapitel über die Risikofaktoren des ischämischen Schlaganfalls bereits erwähnt, ist die Kenntnis dieser enorm wichtig für präventive Maßnahmen, die wiederum im Hinblick auf die oben beschriebenen epidemiologischen Entwicklungen und Kosten für die Gesellschaft immer mehr an Bedeutung gewinnen. Es sind verschiedene Ansätze zur Verwirklichung präventiver Maßnahmen vorhanden. Dazu gehören Herangehensweisen, die auf die Bevölkerung als Ganzes und solche, die speziell auf das Individuum abzielen sowie eine Kombination aus beiden Ansätzen⁷.

Im Rahmen der Primordialprävention ist das Ziel die Manifestation der Erkrankung zu vermeiden, indem die Entstehung der Risikofaktoren verhindert wird. Diese beinhaltet beispielsweise Änderungen der Lebensgewohnheit der Menschen wie eine Reduktion des Nikotinkonsums, eine gesunde Ernährung und sogenannte „gesunde Städte“⁶⁰, was am ehesten dem bevölkerungsbasierten Konzept der Prävention entspricht⁷.

Die sogenannte Primärprävention richtet sich an Menschen mit bereits vorhandenen Risikofaktoren für das Auftreten eines Schlaganfalls⁷. Hierbei spielt die medikamentöse Einstellung der Risikofaktoren eine wichtige Rolle. Die sogenannte „polypill“-Strategie zielt darauf ab, die Compliance der Patientinnen und Patienten bezüglich der Einnahme der Medikamente zu verbessern, indem mehrere Wirkstoffe in einer Tablette kombiniert werden und die Patientinnen und Patienten damit nur eine Pille einnehmen müssen⁶¹⁻⁶³. Einen weiteren Aspekt der Primärprävention stellt das Konzept mit dem Namen „mHealth“⁶⁴ dar. Dabei handelt es sich um die Nutzung elektronischer Geräte wie beispielsweise Smartphones, um Patientinnen und Patienten und Personal im Gesundheitswesen Gesundheitsdienste und Informationen zur Verfügung zu stellen, was das Wissen über gesundheitliche Inhalte und auch das Verhalten bezüglich Risikofaktoren verbessern kann^{64, 65}. Auch eine Umverteilung von Aufgaben innerhalb des Gesundheitssystems kann hilfreich sein, um den Zugang zu präventiven Maßnahmen insbesondere in Entwicklungsländern zu verbessern. Denn dort ist vor allem in ländlichen Regionen die ärztliche Versorgung der Patientinnen und Patienten oft nicht ausreichend vorhanden⁶⁶. Die Bildung von Gruppen aus Ärztinnen und Ärzten sowie geschultem nicht-ärztlichem Gesundheitspersonal zur Überwachung der Risikofaktoren stellt eine Möglichkeit dar, den Mangel an ärztlichem Personal auszugleichen^{65, 67, 68}. Selbstverständlich zählen die Umstellung von Ernährungsgewohnheiten⁶⁹ und beispielsweise die Salzreduktion ebenfalls zur Primärprävention⁷.

Die Sekundärprävention dient der Verhinderung eines Rezidivs nach stattgehabtem ischämischem Schlaganfall oder transitorischer ischämischer Attacke. Das Risiko eines Rezidivs scheint in den ersten Tagen nach dem Ereignis am höchsten zu sein⁷⁰, weshalb der frühe Beginn präventiver Maßnahmen von großer Bedeutung ist. Das Gesamtrisiko für das Auftreten eines Rezidivschlaganfalls innerhalb von fünf Jahren beträgt aktuell etwa 10 %⁷¹. Effektive Maßnahmen im Rahmen dieser Sekundärprävention sind die Akuttherapie auf einer spezialisierten Schlaganfallstation, der Beginn einer die Thrombozytenaggregation hemmenden

Therapie und eine frühzeitige Revaskularisation⁷². Die tägliche Einnahme von Aspirin als sekundär präventive Maßnahme reduziert die Gefahr der Gesamtschlaganfälle um ein Fünftel⁷³. Eine duale antithrombozytäre Therapie kann das Risiko eines Rezidivs insbesondere in der Frühphase nach ischämischem Schlaganfall reduzieren, geht jedoch potentiell mit einem höheren Blutungsrisiko für die Patientinnen und Patienten einher⁷⁴. Im Rahmen der „CHANCE“-Studie konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von Aspirin und Clopidogrel bei Patientinnen und Patienten nach transitorischer ischämischer Attacke oder kleinem Infarkt der alleinigen Therapie mit Aspirin bezüglich des Rezidivrisikos in den ersten neunzig Tagen überlegen ist, wobei das Blutungsrisiko nicht signifikant erhöht ist^{75, 76}.

Patientinnen und Patienten mit kardioembolischem Schlaganfall, beispielsweise aufgrund eines Vorhofflimmerns, benötigen je nach CHA₂DS₂-VASc-Score⁷⁷ eine Antikoagulationstherapie im Rahmen der Sekundärprävention, um die Entwicklung weiterer ischämischer Schlaganfälle zu verhindern. Der CHA₂DS₂-VASc-Score dient der Risikoabschätzung bezüglich des Auftretens von Schlaganfällen bei bekanntem Vorhofflimmern⁷⁷. Aktuell stehen hierfür verschiedene Substanzen zur Verfügung: Vitamin-K-Antagonisten (z. B. Warfarin, Marcoumar) und die sogenannten neuen oralen Antikoagulantien, auch direkte orale Antikoagulantien genannt, (z. B. Dabigatran, Apixaban, Rivaroxaban, Edoxaban)⁷⁸. Verschiedene Studien zeigten eine deutliche Reduktion des Schlaganfallrisikos bei Patientinnen und Patienten mit Vorhofflimmern unter Warfarin-Einnahme^{79, 80}, wobei ein Ziel-INR von 2,0 bis 3,0 angestrebt werden sollte^{81, 82}. Apixaban, Rivaroxaban und Dabigatran scheinen keine schlechtere Wirkung als Warfarin zu haben⁸³, wobei Rivaroxaban sogar effektiver als Warfarin bezüglich der Prävention ischämischer Schlaganfälle zu sein scheint und dabei ein geringeres Risiko für intrazerebrale Blutungen, jedoch ein höheres Risiko für gastrointestinale Blutungen aufweist⁸⁴. Apixaban ist wohl ähnlich gut wirksam wie Warfarin bei einem geringeren Risiko für intrazerebrale Blutungen⁸⁵. Lee et al. konnten einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Edoxaban und einem niedrigeren Schlaganfallrisiko im Vergleich zur Warfarin-Einnahme in der asiatischen Bevölkerung zeigen⁸⁶. Die neuen oralen Antikoagulantien spielen also eine immer größere Rolle in der Schlaganfallprävention bei Patientinnen und Patienten mit Vorhofflimmern. Der klare Vorteil dieser Medikamente im Vergleich zu den Vitamin-K-Antagonisten ist die einfachere Handhabung für die Patientinnen und Patienten⁸⁷.

Auch die Einnahme von Statinen nach einem ischämischen Schlaganfall oder einer transitorischen ischämischen Attacke kann das Risiko eines erneuten zerebrovaskulären Ereignisses um mehr als 20 % reduzieren^{88, 89}.

Ein weiterer Aspekt der Sekundärprävention ist die Revaskularisation bei symptomatischer Karotisstenose⁷². Hierbei ist selbstverständlich, wie bei jeder medizinischen Intervention, eine Nutzen-Risiko-Abwägung nötig. Bei Patientinnen und Patienten mit kürzlich symptomatischer 70-99 %iger Karotisstenose nach NASCET lässt sich das Schlaganfallrisiko durch eine operative Thrombendarteriektomie halbieren. Eine Risikoreduktion um ein Viertel kann bei Patientinnen und Patienten mit einer 50-69 %iger Karotisstenose nach NASCET erreicht werden. Dabei beträgt das perioperative Risiko für einen Schlaganfall oder Tod innerhalb von 30 Tagen nach der Intervention 7 %. Bei Karotisstenosen unter 50 % nach NASCET überwiegt der Nutzen die Risiken nicht, wobei diese Intervention bei Stenosen unter 30 % sogar schädlich sein kann⁹⁰. Eine Alternative zum operativen Eingriff stellt aktuell das Verfahren des sogenannten „endovaskulären Stenting“ dar. Im Rahmen der „CREST“-Studie konnten ähnliche Restenose- und Okklusions-Raten zwei Jahre nach operativer Thrombendarteriektomie oder Stenting gezeigt werden⁹¹. Allerdings scheint die Thrombendarteriektomie bezüglich der prozeduralen Sicherheit und einer effektiven Schlaganfallprävention aktuell das überlegenere Verfahren zu sein^{92, 93}. Das Stenting als relativ neue Methode wird in Zukunft weitere technische und anwenderspezifische Verbesserungen benötigen, um eine gute minimalinvasive Alternative zum operativen Vorgehen zu werden⁹³.

1.8. Diagnostik

Die Genauigkeit und die zeitliche Dauer der Diagnosestellung ischämischer Schlaganfälle sind von großer Bedeutung für die Therapie und die Prognose der Patientinnen und Patienten⁹⁴. Man verliert 1,9 Millionen Neurone in jeder Minute, in der ein Schlaganfall nicht therapiert wird, weshalb sich der Ausdruck „time is brain“ in der Neurologie verbreitet hat⁹⁵. Das schnelle und sichere Erkennen dieses Krankheitsbildes soll aktuell durch bestimmte Score-Systeme und zerebrale Bildgebung ermöglicht werden, wobei sowohl die präklinische als auch die klinische Phase berücksichtigt werden muss.

Anamnestisch ergibt sich oftmals ein plötzlicher Beginn der für eine Ischämie typischen Symptomatik⁹⁴. Zur klinischen Einschätzung eignen sich bestimmte Score-Systeme: Duvekot et al.

postulierten, dass die drei Scores RACE („Rapid Arterial occlusion Evaluation“)⁹⁶, G-FAST („gaze-face-arm-speech-time test“)⁹⁷ und CG-FAST („Conveniently-Grasped Field Assessment Stroke Triage“)⁹⁸ am besten geeignet sind für die präklinische Anwendung⁹⁹. In der klinischen Situation wird in der Frühphase des Schlaganfalls der NIHSS („National Institutes of Health Stroke Scale“)¹⁰⁰ verwendet¹⁰¹. Dieses System zeichnet sich durch eine hohe Intra- und Inter-Observer-Reliabilität¹⁰² und durch eine hohe Validität bezüglich der Korrelation mit dem Infarktvolumen¹⁰³ und der Prognose der Patientinnen und Patienten¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ aus.

Die Durchführung der zerebralen Bildgebung ist ein essenzieller Bestandteil der Diagnostik des ischämischen Schlaganfalls. Ziel ist es, eine intrakranielle Blutung oder andere Raumforderungen auszuschließen, das Ausmaß des Infarktkernes und der Penumbra festzulegen und die Gefäße darzustellen¹⁰⁸. Im Anschluss kann entsprechend der Befunde der Diagnostik möglichst schnell die passende Therapie eingeleitet werden. In der Akutphase stellt die native Computertomographie, die sich durch eine hohe Verfügbarkeit, schnelle Durchführung und hohe Sensitivität hinsichtlich der Darstellung intrakranieller Blutungen¹⁰⁹ auszeichnet, eine wichtige Untersuchungsmethode dar, wobei hier primär mögliche Kontraindikationen für eine systemische Lysetherapie ausgeschlossen werden sollen¹¹⁰. Infarkte mit kleinem Volumen und in frühen Stadien sind CT-tomographisch jedoch deutlich schwerer zu detektieren¹¹¹. Der Infarktkern, der als das ischämisch irreversibel geschädigte Hirngewebe definiert ist, kann CT-tomographisch als Hypodensität und MR-tomographisch als DWI-Läsion dargestellt werden. Areale mit Diffusionsstörung zeigen jedoch teilweise rückläufige Schäden und können somit auch Teil der Penumbra sein. Die Darstellung des Infarktkernes dient der Prognoseabschätzung. Hierfür gibt es bestimmte Scores wie z. B. den ASPECT-Score im Rahmen der CT-Bildgebung¹⁰⁸. Die Darstellung der Penumbra stellt ebenfalls eine wichtige Aufgabe der Bildgebung hinsichtlich weiterer Therapieentscheidungen und der Prognose dar. Als Penumbra bezeichnet man den Anteil des kritisch hypoperfundierten Hirngewebes, das durch zeitnahe Reperfusion noch gerettet werden kann¹¹². Um die Penumbra bildmorphologisch einschätzen zu können, benötigt man eine Perfusionsbildgebung mittels CT-Perfusion oder MR-Perfusion. Diese beiden zeichnen sich dadurch aus, dass sie dynamische Darstellungen liefern¹⁰⁸. Mithilfe dieser Methoden kann das sogenannte „Mismatch“ bestimmt werden. Unter einem Diffusions-Perfusions-Mismatch versteht man den MR-tomographisch dargestellten Unterschied des ischämie-bedingten Schadens in der Diffusions- und Perfusionswichtung. Ein Mismatch liegt vor, wenn der Schaden sich in der Perfusionswichtung größer darstellt als in der

Diffusionswichtung. In solch einem Fall ist davon auszugehen, dass noch zu rettendes Hirngewebe vorhanden ist. Aktuell werden verschiedene Softwares und Techniken mit dem Ziel der genaueren bildmorphologischen Abschätzung der Penumbra und damit einhergehenden Therapieentscheidungen getestet¹¹³. Zur Gefäßdarstellung eignen sich ebenfalls CT- und MRT-Modalitäten. Hierbei kommen die CT-Angiographie oder MR-Angiographie zum Einsatz. MR-tomographisch können die intrakraniellen Gefäße ohne Kontrastmittel mittels TOF (time of flight technic) dargestellt werden. Mittels der Gefäßdarstellung kann man proximale Gefäßverschlüsse nachweisen und eine entsprechende Therapie mit mechanischer Thrombektomie einleiten. Des Weiteren lässt sich die Kollateralisierung einschätzen, die sich auf das Ausmaß des Infarktkernes auswirken kann. Außerdem kann man Stenosen, Tandemverschlüsse oder andere Gefäßpathologien wie ggf. Dissektionen darstellen^{108, 110}. Um den arteriellen Blutfluss unmittelbar zu erkennen, kann man eine Katheterangiographie durchführen, wodurch man sehr genaue Angaben zur Kollateralisierung sowie zur Gefäßanatomie und Gefäßpathologien machen kann. Dies ist jedoch eine invasive Maßnahme, die speziellen Fragestellungen vorbehalten ist¹¹⁰.

Im Vergleich zur CT-Untersuchung stellt die kraniale MRT-Bildgebung eine Untersuchungsmethode dar, deren Sensitivität bezüglich des Nachweises eines zerebralen Infarktes sowie dessen Ausmaß innerhalb der ersten sechs Stunden nach Symptombeginn höher ist¹¹⁴⁻¹¹⁶. Mittels der DWI-Sequenzen im Rahmen der MRT-Untersuchung lassen sich kleine, hyperakute, zerebrale Infarkte sowie atypisch gelegene, zerebrale Infarkte, die in der nativen CCT-Untersuchung übersehen werden können, darstellen¹¹⁰. Es muss jedoch erwähnt werden, dass bei einem Drittel der Patientinnen und Patienten mit kleinen Schlaganfällen und bei zwei Dritteln der Patientinnen und Patienten mit transitorischen ischämischen Attacken keine DWI-Veränderung in der MRT-Untersuchung nachweisbar ist¹¹⁰. Ein weiterer Vorteil der kranialen MRT-Bildgebung ist die Möglichkeit einer bildmorphologischen Abschätzung des Symptombeginns bei anamnestisch unklarem Zeitbeginn mittels des DWI-Flair-Mismatches. Veränderungen in der DWI-Sequenz können bereits wenige Minuten nach Symptombeginn im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalles nachgewiesen werden. FLAIR-Veränderungen zeigen sich jedoch erst nach einigen Stunden, sodass man bei einer vorhandenen DWI-Läsion ohne korrelierende FLAIR-Läsion davon ausgehen kann, dass sich das ischämische Ereignis in einem Zeitfenster ereignet haben muss, das mittels intravenöser Lysetherapie sicher und effektiv behandelt werden kann¹¹⁷. Die MRT-Bildgebung hat jedoch auch diverse Nachteile. So kommt es durch

die längere Dauer der Untersuchung zu einem Zeitverlust bezüglich der Akuttherapie. Um das Minimum an Sequenzen zu erhalten (T2-Wichtung, DWI, FLAIR und T2*), einen ischämischen Schlaganfall von einem hämorrhagischen Schlaganfall oder von Stroke Mimics zu unterscheiden, wird eine Untersuchungszeit von mind. 15 Minuten benötigt. Des Weiteren sind MRT-Geräte kostenintensiver, im klinischen Alltag weniger häufig und insbesondere nachts oft nicht verfügbar¹¹⁰. Dementsprechend stellt die CT-Untersuchung in der Akutsituation meist die häufiger genutzte Methode dar, wobei die MRT-Untersuchung auch hinsichtlich der oben erwähnten Vorteile zunehmend an Bedeutung gewinnt.

1.9. Therapie

In der Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls gibt es zwei Behandlungsmethoden, die einzeln oder in Kombination angewendet werden können. Zum einen ist hier die intravenöse Thrombolyse mit rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator) vorhanden. Wie der Name bereits sagt, handelt sich hierbei um einen rekombinanten Aktivator von Plasminogen zu Plasmin, welches durch Fibrinolyse die Blutgerinnung hemmt¹¹⁸. Im Rahmen der “European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) III trial” zeigte sich eine Wirksamkeit von rt-PA im Vergleich zu einem Placebo bei der Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls, sofern die Therapie innerhalb von 3-4,5 Stunden nach Beginn der Schlaganfallsymptomatik verabreicht wird¹¹⁹. Dementsprechend empfehlen amerikanische und deutsche Leitlinien den Einsatz der systemischen Lyse als Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls nach Ausschluss von Kontraindikationen^{120, 121}. Es existieren viele Studien bezüglich einer Ausweitung des sogenannten Zeitfensters von 4,5 Stunden^{122, 123}. Bei MR-tomographisch dargestelltem DWI-FLAIR-Mismatch¹²⁴ oder einem CT- oder MR-tomographisch dargestelltem Mismatch zwischen Infarktkern und Penumbra in einem Zeitfenster von maximal neun Stunden (vom Mittelpunkt des Schlafes entfernt) empfiehlt die deutsche Leitlinie die Anwendung einer systemischen Lysetherapie^{121, 125}. Ein erhöhtes Risiko für intrakranielle Blutungen muss hierbei beachtet werden¹²². Als neuere Alternative kann mittlerweile laut deutscher Leitlinie auch Tenecteplase (eine genetisch modifizierte Variante der rt-PA) zur intravenösen Lysetherapie verwendet werden, sofern ein Großgefäßverschluss vorliegt und zusätzlich eine mechanische Thrombektomie geplant ist¹²¹. Bezüglich des klinischen Outcomes und des Risikos einer symptomatischen intrazerebralen Blutung sowie der Letalität ergab sich weder eine Über- noch Unterlegenheit von Tenecteplase im Vergleich zu rt-PA¹²⁶⁻¹²⁸.

Die zweite Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls stellt die mechanische Thrombektomie dar, bei der zerebrale Gefäßverschlüsse endovaskulär wieder eröffnet werden und die Perfusion des Hirngewebes wieder hergestellt werden soll. Die Cochrane Stroke Group untersuchte 2021 19 Studien mit insgesamt 3793 Probandinnen und Probanden, wobei die Mehrheit einen Großgefäßverschluss im vorderen Stromgebiet erlitten hatte und innerhalb von sechs Stunden nach Symptombeginn mittels mechanischer Thrombektomie behandelt wurde. Dabei zeigte sich, dass sich durch die Therapie das funktionelle Outcome (gemessen am mRS) besserte und die Wahrscheinlichkeit für Todesfälle reduziert wurde. Das Risiko für symptomatische intrakranielle Blutungen wurde dabei durch die mechanische Thrombektomie nicht gesteigert¹²⁹. Im Verlauf konnten zwei große Studien zeigen, dass bei ischämischen Schlaganfällen im hinteren Stromgebiet mit Großgefäßverschluss eine ähnliche Effektivität der mechanischen Thrombektomie besteht wie bei Gefäßverschlüssen im vorderen Stromgebiet^{130, 131}. Zwei weitere Studien hingegen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der endovaskulären Therapie und der medikamentösen Therapie für vertebrobasiläre Gefäßverschlüsse^{132 133}. Jedoch wiesen beide dieser Studien systematische Limitationen auf. 2022 konnte mit der „ATTENTION“-Studie gezeigt werden, dass Patientinnen und Patienten mit einem Verschluss der A.basilaris innerhalb von zwölf Stunden seit Symptombeginn durch eine mechanische Thrombektomie ein besseres funktionelles Outcome nach 90 Tagen zeigten als Patientinnen und Patienten ohne interventionelle Therapie. Jedoch war die mechanische Thrombektomie mit dem erhöhten Risiko für durch die Intervention hervorgerufenen Komplikationen und für intrazerebrale Blutungen verbunden¹³⁴.

1.10. Biomarker in der Medizin

1.10.1. Begriffsdefinition und Anwendungsbereiche

Im Jahr 2001 legte die Arbeitsgruppe „Biomarkers Definition Working Group“ der US-amerikanischen „National Institutes of Health“ folgende Begriffsdefinition fest: Unter einem Biomarker versteht man ein Merkmal, das objektiv gemessen wird und als Indikator für physiologische oder pathologische Prozesse oder für eine pharmakologische Reaktion auf therapeutische Interventionen zu bewerten ist¹³⁵. Eine aktuellere Definition des Begriffs Biomarker lieferte FitzGerald im Jahr 2016. Er bezeichnete Biomarker als funktionale Varianten oder

quantitative Indizes eines biologischen Prozesses, die die Entwicklung oder Prädisposition für eine Krankheit oder eine Reaktion auf eine Therapie vorhersagen oder reflektieren¹³⁶. Beide Definitionen können jedoch die Komplexität des Begriffs Biomarker nicht abbilden. Die Arbeitsgruppe „Biomarkers Definition Working Group“ lässt mit ihrer Definition die Tatsache aus, dass nicht alle Biomarker objektiv gemessen werden können (z. B. histologische oder radiologische Untersuchungen). Des Weiteren bleiben bei dieser Definition nicht pharmakologische Interventionen wie z. B. chirurgische Eingriffe unbeachtet. FitzGerald hingegen lässt die Möglichkeit von strukturellen im Vergleich zu funktionellen Varianten sowie qualitativen im Vergleich zu quantitativen Indizes in seiner Definition unerwähnt. Außerdem beinhaltet seine Definition nicht die Möglichkeit, das Vorhandensein einer Krankheit mittels Biomarkern zu verifizieren¹³⁷.

Etwas spezifischer können jedoch die Anwendungsmöglichkeiten von Biomarkern definiert werden: Hier unterscheidet man sogenannte diagnostische Biomarker, Monitoring Biomarker, pharmakodynamische Biomarker, prädiktive Biomarker, prognostische Biomarker, Sicherheitsbiomarker, Risikobiomarker sowie Surrogatmarker. Biomarker können als diagnostisches Mittel zur Identifikation einer Erkrankung (z. B. erhöhte Blutglucosewerte zur Diagnosestellung eines Diabetes mellitus¹³⁸) verwendet werden¹³⁵. Außerdem gibt es sogenannte Monitoring Biomarker, die durch wiederholte Messungen den Status einer Erkrankung oder den Effekt einer therapeutischen Intervention zeigen können (z. B. Messung der CD4-Zellzahl im Rahmen der Therapie der HIV-Infektion¹³⁹). Des Weiteren unterscheidet man pharmakodynamische Biomarker, die sich durch die Verwendung eines medizinischen Produktes oder durch einen Umweltstoff (z. B. blutdrucksenkende Wirkung von ACE-Hemmern bei primärer Hypertonie¹⁴⁰) verändern. Eine weitere Art der Biomarker stellen prädiktive Biomarker dar. Diese sind dadurch definiert, dass das Vorhandensein oder eine Veränderung des Biomarkers vorhersagt, dass eine Person oder eine Gruppe von Personen mit höherer Wahrscheinlichkeit eine günstige oder ungünstige Auswirkung durch die Exposition gegenüber einem medizinischen Produkt oder einem Umweltstoff (z. B. besseres Therapieansprechen auf Trastuzumab/Pertuzumab bei Her2-positiven Patientinnen und Patienten mit Mammakarzinom¹⁴¹) erfahren wird. Prognostische Biomarker werden verwendet, um die Wahrscheinlichkeit eines klinischen Ereignisses, eines Krankheitsrückfalls oder eines Krankheitsverlaufs bei Patientinnen und Patienten mit einer bestimmten Krankheit oder einem bestimmten medizinischen Zustand zu ermitteln (z. B. prognostische Aussagekraft der Amplifikation von Her2/neu-Genen

bei Mammakarzinom¹⁴¹). Sicherheitsbiomarker werden vor oder nach der Exposition mit einem medizinischen Produkt oder einem Umweltstoff gemessen, um die potentielle Toxizität zu bestimmen bzw. zu überwachen und dienen damit der Applikationssicherheit (z. B. Messung des Serumkreatininwertes bei Gabe von nephrotoxischen Medikamenten¹⁴²). Als Risikobiomarker bezeichnet man diejenigen, die das Potenzial für die Entwicklung einer Krankheit oder eines medizinischen Zustands bei einer Person anzeigen, die derzeit unter keiner klinisch erkennbaren Krankheit leidet (z. B. Nachweis von Apolipoprotein E Genvariationen als Risikobiomarker für eine Prädisposition an der Alzheimerkrankheit zu erkranken¹⁴³). Zuletzt können bestimmte Biomarker auch im Rahmen klinischer Studien angewendet werden. Hierfür werden zunächst klinische Endpunkte definiert. Dies sind Messungen oder Analysen von Krankheitsmerkmalen im Rahmen einer Studie, die die Wirkung einer therapeutischen Intervention widerspiegeln. Dabei kann der klinische Endpunkt durch einen hierfür geeigneten Biomarker ersetzt werden, den man dann als Surrogatmarker bezeichnet. Dieser muss das Vorhandensein oder Fehlen eines klinischen Nutzens oder Schadens auf der Grundlage von epidemiologischen, therapeutischen, pathophysiologischen oder anderen wissenschaftlichen Erkenntnissen vorhersagen können. Dementsprechend sind alle Surrogatmarker Biomarker, aber bei Weitem nicht jeder Biomarker ist ein Surrogatmarker^{135, 144}.

1.10.2. Vor- und Nachteile von Biomarkern

Um einen Biomarker als solchen zu identifizieren, ist es nötig, die Pathophysiologie der Erkrankung sowie alle Aspekte, die damit assoziiert sind, zu kennen. Im nächsten Schritt muss dann der Mechanismus erkannt werden, der die Pathophysiologie beeinflusst. Letztendlich muss nachgewiesen werden, dass die potentiellen Biomarker mit diesen Prozessen korrelieren¹³⁷. Zu guter Letzt muss der jeweilige Biomarker validiert werden, was bedeutet, dass der Biomarker unter realen Bedingungen zuverlässig das gewünschte Ergebnis erbringt. Die Validität wird mittels weiterer, unabhängiger klinischer Studien getestet¹³⁷.

Einen Vorteil von Blut-basierten Biomarkern stellt die einfachere und kostengünstigere Messung z.B. im Vergleich aufwendiger Bildgebung sowie die Möglichkeit der wiederholten Analyse über einen kurzen Zeitraum dar. Blut-basierte Biomarker ermöglichen es außerdem, ethische Probleme zu verhindern, die im Rahmen von Studien entstehen können, wenn klinische Endpunkte gemessen werden sollen¹³⁷. Beispielsweise kann die Paracetamolkonzentration im

Serum bei Paracetamolüberdosierung gemessen werden, um eine Therapieentscheidung zu treffen, statt zu warten, bis bei den Patientinnen und Patienten eine Leberschädigung nachgewiesen werden kann¹⁴⁵. Ein Nachteil des Einsatzes von Biomarkern ergibt sich durch die Gefahr einer Fehlinterpretation des Zusammenhanges zwischen dem Biomarker und den Auswirkungen auf die Erkrankung. Beispielsweise ist CA 19-9 als Tumormarker bekannt, der im Rahmen eines Pankreaskarzinoms erhöht sein kann. Es können jedoch auch erhöhte Werte im Rahmen einer Cholestase oder Lebererkrankung ohne Vorhandensein einer Malignität detektiert werden¹⁴⁶. Außerdem können gewisse Störfaktoren wie z.B. die Einnahme von Medikamenten die Messung von Biomarkern beeinflussen. Des Weiteren ist es möglich, dass sich Dosis-Wirkungs-Kurven für Effekte einer Intervention auf das primäre Ergebnis und auf die Biomarker unterscheiden. In diesem Fall spiegelt eine Veränderung des Biomarkers möglicherweise nicht das genaue Ausmaß auf das Outcome wider. Ebenfalls kann eine mangelnde Reproduzierbarkeit der Methoden zur Messung der Biomarker deren Verwendung limitieren. Beispielsweise gibt es kein standardisiertes Messverfahren zur Bestimmung der Aktivität der Thiopurin-Methyltransferase. Es muss auch hinterfragt werden, ob ein einzelner Biomarker alle Facetten abbilden kann, die zur Überwachung einer Intervention nötig sind. Aus diesen Gründen ist es von großer Bedeutung Biomarker vor ihrer Verwendung gründlich zu testen¹³⁷. Ein Großteil der Biomarker schafft es nicht eine 100%ige Sensitivität und Spezifität zu erreichen¹⁴⁷. Aus diesem Grund werden zunehmend Panels von Biomarkern angewendet, statt sich auf einzelne Biomarker zu fokussieren¹⁴⁸. Biomarker sollten nie als alleinige Grundlage für diagnostische, prognostische und therapeutische Entscheidungen verwendet werden, sondern eher leiten und, kombiniert mit ärztlichem Fachwissen und klinischem Urteilsvermögen, eingesetzt werden^{147, 149}. Um hypothesenfrei und global neue Biomarker identifizieren zu können, wird der Fokus zunehmend auf sogenannte Omik-Untersuchungen gelegt, zu denen die Transkriptomik, Genomik, Proteomik und Metabolomik gehören¹⁵⁰.

1.10.3. Biomarker beim ischämischen Schlaganfall

1.10.3.1. Potentielle Anwendungsbereiche

Die Verwendung von Blut-basierten Biomarkern im Rahmen der Diagnostik, Therapie und prognostischen Abschätzung beim ischämischen Schlaganfall ist Teil vieler aktueller klinischer Studien.

Zum einen wird untersucht, inwiefern bestimmte Blut-basierte Biomarker als diagnostische Marker beim ischämischen Schlaganfall verwendet werden können. Wie oben bereits beschrieben stützt sich die aktuelle Diagnostik dieser Erkrankung auf aufwendige bildgebende Verfahren. Eine einfachere, schnellere und kostengünstigere Methode zur Diagnosestellung des ischämischen Schlaganfalls wäre wünschenswert. Die Bestimmung von Blut-basierten Biomarkern im Vergleich zur CT-Bildgebung könnte insbesondere auch präklinisch zum Einsatz kommen, um beispielsweise die Entscheidung zu einer systemischen Lysetherapie und deren Durchführung bereits präklinisch zu ermöglichen und damit die Zeit bis zur Therapie zu verringern^{150, 151}. Tiedt et al. konnten im Jahr 2020 41 Metabolite detektieren, die im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant mit dem Vorhandensein eines ischämischen Schlaganfalls assoziiert sind. Des Weiteren konnten vier Metabolite (asymmetrisches und symmetrisches Dimethylarginin, Pregnenolonsulfat und Adenosin) herausgefiltert werden, die mit einem AUC-Wert (area under the curve) von 0,9 der CT-Bildgebung, die einen AUC-Wert von 0,8 hat, bezüglich der Unterscheidung zwischen ischämischen Schlaganfällen und Stroke Mimics überlegen waren. Alle vier Metabolite waren in den Messungen 90 Tage nach dem Ereignis auf demselben Level wie die Messungen in der Kontrollgruppe, was darauf schließen lässt, dass sie im Rahmen des Akutereignisses erhöht sind¹⁵². Zum anderen existieren Studien, die sich mit der Frage der Unterscheidung zwischen ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfällen mittels Blut-basierten Biomarkern beschäftigen, was in der Akutphase der Diagnostik von großer Bedeutung ist, um die korrekte Therapie einzuleiten. Hierbei zeigten sich bei Patientinnen und Patienten mit ischämischem Schlaganfall andere Metabolite erhöht als bei Patientinnen und Patienten mit hämorrhagischem Schlaganfall, was auf die unterschiedliche Pathophysiologie der Erkrankungen zurückzuführen ist¹⁵³. Im Rahmen vieler weiterer Studien konnten Metabolite detektiert werden, mit Hilfe derer ischämische Schlaganfälle erkannt werden

können und eine Unterscheidung zwischen ischämischem und hämorrhagischem Schlaganfall möglich ist¹⁵³⁻¹⁵⁷. Hierbei stellen die zwei Biomarker GFAP (glial fibrillary acidic protein) und RBP4 (retinol-binding protein 4) eine gute Option dar, den ischämischen Schlaganfall vom hämorrhagischen zu unterscheiden¹⁵⁰. GFAP wird nach einem hämorrhagischen Schlaganfall rasch ins Blut freigesetzt und zeigt signifikant höhere Werte bei Patientinnen und Patienten mit hämorrhagischem Schlaganfall im Vergleich zu Patientinnen und Patienten mit ischämischem Schlaganfall^{158, 159}. Die Kombination von GFAP mit RBP4 verbessert die Unterscheidung der beiden Krankheitsbilder zudem¹⁶⁰.

Die Etablierung eines diagnostischen Biomarkers für die transitorische ischämische Attacke wäre ebenfalls hilfreich, da die Patientinnen und Patienten bei Ankunft in der Klinik meist bereits wieder asymptomatisch sind und die Diagnosestellung deshalb aktuell hauptsächlich auf der Anamnese beruht^{150, 161}.

Ein weiterer Aspekt in der Verwendung von Biomarkern im Rahmen der Diagnostik stellt die Bestimmung der Ätiologie des ischämischen Schlaganfalls dar. Bei 25 % aller Patientinnen und Patienten mit ischämischem Schlaganfall lässt sich trotz umfassender Diagnostik keine spezifische zugrundeliegende Ätiologie feststellen. Es wird vermutet, dass ein Großteil dieser Patientinnen und Patienten unter paroxysmalem Vorhofflimmern als Ursache des ischämischen Schlaganfalls leidet, was oftmals nicht detektiert werden kann¹⁶². Llombart et al. konnten zeigen, dass BNP (b-type natriuretic peptide) sowie NT-pro-BNP (N-terminal pro-BNP) bei Patientinnen und Patienten mit kardioembolischen Schlaganfällen signifikant höher ausfallen als bei Patientinnen und Patienten mit anderen Schlaganfallsubtypen^{163, 164}. Im Rahmen der „AR-CADIA“-Studie wird aktuell untersucht, ob durch eine antikoagulatorische Therapie bei Patientinnen und Patienten mit embolischem Infarkt mit unbekannter Emboliequelle und atrialer Kardiopathie (Hierfür muss mind. eines der folgenden Kriterien zutreffen: negativer Anteil der P-Welle in V1 > 5000µV im EKG, Serum NT-pro-BNP > 250 pg/ml, linker Vorhofdurchmesser $\geq 3\text{cm/m}^2$ in der Echokardiographie) das Risiko eines erneuten Schlaganfalls gesenkt werden kann¹⁶⁵. Hier wird also ebenfalls NT-pro-BNP als Biomarker für kardioembolische Infarkte untersucht. Im Rahmen der „STROKESTOP II“-Studie konnte gezeigt werden, dass NT-pro-BNP als Screeningmethode für Vorhofflimmern in der Allgemeinbevölkerung nützlich sein könnte^{150, 166}. Tiedt et al. beobachteten, dass die Messungen von symmetrischem Dimethylarginin bei Patientinnen und Patienten mit kardioembolischem Schlaganfall signifikant höher

ausfielen im Vergleich zu atherosklerotischen Schlaganfällen oder Schlaganfällen unklarer Ätiologie. Das könnte darauf hindeuten, dass symmetrisches Dimethylarginin auch zur Bestimmung der Ätiologie eines Schlaganfalls nützlich sein könnte¹⁵². Ätiologie spezifische Biomarker könnten in Zukunft die primäre und sekundäre Prävention des ischämischen Schlaganfalls verbessern und somit das Auftreten des ischämischen Schlaganfalls und Rezidive verhindern.

Des Weiteren werden prädiktive Biomarker untersucht, die das Ansprechen der Patientinnen und Patienten auf die Therapieoptionen des ischämischen Schlaganfalls vorhersagen sollen. Die Bestimmung von Fibrinolyse-Inhibitoren vor Therapiebeginn kann das Risiko für eine symptomatische intrakranielle Blutung unter oder nach systemischer Lysetherapie vorhersagen¹⁶⁷. Niedrige Spiegel von ADAMTS13 (Eine Metalloprotease, die von-Willebrand-Faktor, der ein Schlüsselfaktor in der Thrombusbildung ist, wirksam abbaut¹⁶⁸.) zeigen außerdem eine Korrelation mit einem schlechten Ansprechen auf rekanalisierende Maßnahmen, wobei dies für die systemische Lysetherapie und mechanische Rekanalisation zutrifft¹⁶⁹. Es wurden außerdem Biomarker beschrieben, die mit einem Risiko für eine hämorrhagische Transformation des ischämischen Schlaganfalls assoziiert sind¹⁷⁰⁻¹⁷⁴. Mit Hilfe dieser Biomarker könnte in Zukunft also das individuelle Ansprechen einer Patientin oder eines Patienten auf die Schlaganfalltherapie vorhergesagt werden, was eine personalisierte Therapie ermöglichen könnte.

Das Outcome von Patientinnen und Patienten mit stattgehabtem ischämischem Schlaganfall unterscheidet sich von Patientin und Patient zu Patientin und Patient sehr¹⁵⁰, weshalb prognostische Biomarker hilfreich wären, um eine individuelle Aussage bezüglich der Prognose machen zu können. Es konnte z. B. gezeigt werden, dass inflammatorische Parameter wie Interleukin-6 und Copeptin bei Patientinnen und Patienten mit ischämischem Schlaganfall zusätzliche prädiktive Informationen bezüglich des funktionellen Outcomes und der Mortalität nach 90 Tagen liefern können¹⁷⁵. Ebenfalls scheint die initiale Bestimmung von Procalcitonin ein unabhängiger Prädiktor für das funktionelle Outcome und die Mortalität von Patientinnen und Patienten mit ischämischem Schlaganfall zu sein¹⁷⁶. Das Vorhandensein von SAA1/2 (Serum Amyloid A) korreliert wohl mit dem Risiko für die Entwicklung einer Infektion bei Patientinnen und Patienten mit ischämischem Schlaganfall¹⁷⁷. Diese Prädiktoren könnten in Zukunft eine individualisierte Prognoseabschätzung ermöglichen.

1.10.3.2. Identifizierung neuer Biomarker mittels Multi-Omik-Analysen

Bisher konnte jedoch keiner dieser Blut-basierten Biomarker beim ischämischen Schlaganfall in die klinische Routine überführt werden. Multi-Omik Analysen stellen eine neue Möglichkeit dar, potentielle Biomarker für ein Erkrankungsbild zu identifizieren. Hierzu gehören die Proteomik (Erforschung der in einer Zelle oder einem Lebewesen unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt vorliegenden Proteine¹⁷⁸), die Genomik (Erforschung des Aufbaus von Genomen und der Wechselwirkungen zwischen Genen¹⁷⁹), die Transkriptomik (Analyse von RNA-Molekülen zur Untersuchung der Genexpression¹⁸⁰) und die Metabolomik (Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten und Erforschung der Wechselwirkungen der Metabolite^{181, 182}).

Im Rahmen der Proteomik wurde die Expression von Matrix Metalloproteinasen in den Neuronen und dem Gefäßsystem im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls untersucht. Dabei konnte eine selektive, zellabhängige Sekretion von Matrix Metalloproteinase gezeigt werden¹⁸³. Mit der Weiterentwicklung der Analysetechniken konnten im Verlauf Veränderungen in der Proteinexpression im gesamten Gehirngewebe von Schlaganfallpatientinnen und -patienten je nach Lokalisation dargestellt werden¹⁸⁴. Mit einer weiteren Verbesserung der Technik war es möglich, bisher nicht bekannte Proteine im ischämischen Gehirngewebe zu detektieren, wobei 51 verschiedene Proteine mit veränderter Expression im ischämischen Gehirngewebe identifiziert werden konnten¹⁸⁵. Im Jahr 2018 wurden erstmals die Veränderungen der Proteinexpression im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls in jeder einzelnen Komponente der neurovaskulären Einheit untersucht. Zum weiteren Verständnis der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls wurde die Proteomik vom Gehirngewebe auf extrazelluläre Flüssigkeiten wie Gewebsflüssigkeit, Blut und Liquor ausgeweitet¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Die Proteomik führte in den letzten Jahren dazu, dass viele potentielle diagnostische und prognostische Biomarker für den ischämischen Schlaganfall gefunden werden konnten. Jedoch konnte bisher keiner dieser Biomarker in die klinische Anwendung überführt werden. Dies liegt wohl vor allem daran, dass man eine Einheitsgröße für alle Individuen finden wollte, was aber wohl nicht der Realität entspricht. Denn Patientinnen und Patienten reagieren individuell unterschiedlich auf Therapien, was die Fokussierung auf eine personalisierte Medizin nötig macht¹⁵⁰. Ein weiterer Faktor, der aktuell die Anwendung im klinischen Alltag behindert, ist die Komplexität des Proteoms im menschlichen Blut, was die Identifikation von spezifischen zerebrovaskulären Biomarkern

schwierig macht^{150, 178}. Um eine klinische Anwendung dieser Biomarker in Zukunft zu ermöglichen, werden deutlich größere Proteomikstudien mit großen Fallzahlen an Patientinnen und Patienten und damit verbundenen hohen Kosten nötig sein¹⁵⁰.

Die Genomik des ischämischen Schlaganfalls zu entschlüsseln, stellte sich aufgrund der Heterogenität dieser Erkrankung im Vergleich zu anderen vaskulären oder neurologischen Erkrankungen als komplex heraus¹⁵⁰. Hohe Fallzahlen sind nötig, um auf diesem Gebiet eine ausreichende statistische Power zu erreichen. Hierfür wurden große internationale Konsortien gebildet, was zu einem deutlichen Fortschritt in diesem Forschungsgebiet beitrug^{189, 190}. Im Rahmen der „MEGASTROKE“-Studie konnten insgesamt 32 Genloci gefunden werden, die mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Schlaganfalls einhergehen¹⁹¹. Es konnten außerdem Genloci identifiziert werden, die mit bestimmten Schlaganfallsubtypen assoziiert sind¹⁹²⁻²⁰¹. Genetische Assoziationen mit der Erkrankung Schlaganfall zu identifizieren, kann helfen, die molekularen Prozesse des Schlaganfalls besser zu verstehen und gezielte Therapien für dieses Erkrankungsbild zu entwickeln. Dies stellt ein wichtiges Ziel im Rahmen dieser Forschung dar^{150, 191}. Des Weiteren kann die Kenntnis dieser Genloci hilfreich sein, um das individuelle Risiko einer Person für die Entwicklung dieser Erkrankung zu bestimmen¹⁵⁰. Dies stellt sich beim Schlaganfall aufgrund der polygenetischen Assoziationen als sehr komplex dar im Vergleich zu anderen seltenen Erkrankungen mit monogenetischen Mutationen²⁰². Im Rahmen der Genomik werden individuelle Unterschiede der Gene untersucht, die im einzelnen Individuum jedoch während der Lebenszeit stabil bleiben. Die Epigenomik hingegen beschäftigt sich mit dynamischen und gewebsspezifischen Regulationsmechanismen der Genexpression, wobei die häufigste Form die DNA-Methylierung darstellt. Damit kann untersucht werden, inwiefern epigenetische Faktoren komplexe Erkrankungen beeinflussen. Die DNA-Methylierung könnte die Mechanismen des Schlaganfalls durch Einfluss von genetischen oder Umweltfaktoren verändern, könnte aber auch als Biomarker dienen, falls epigenetische Veränderungen eine Ursache oder eine Folge der Erkrankung sind¹⁵⁰.

Im Rahmen der Transkriptomik werden die Genexpression in peripheren Blutzellen sowie RNAs im Plasma als potentielle Biomarker mittels Studien untersucht¹⁵⁰. Moore et al. konnten im Jahr 2005 zeigen, dass sich das Genexpressionsprofil in mononukleären Zellen des menschlichen Blutes im Rahmen des akuten ischämischen Schlaganfalls im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe verändert. Einige dieser Veränderungen stehen pathophysiologisch im

Einklang mit der Anpassung an eine Ischämie im zentralen Nervensystem²⁰³. Des Weiteren konnten Unterschiede im Transkriptom von Patientinnen und Patienten mit ischämischem Schlaganfall, hämorrhagischem Schlaganfall und gesunder Kontrollgruppe festgestellt werden²⁰⁴. Aktuell stellt der zeitliche Aufwand zur Messung der RNAs noch eine Limitation für die klinische Anwendung dar¹⁵⁰. Es wird außerdem untersucht, inwiefern Genexpressionsprofile zur Unterscheidung von Schlaganfallsubtypen genutzt werden können²⁰⁵⁻²⁰⁷. Dies stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar, die Ätiologie der Infarkte mit unklarer Ätiologie vorherzusagen²⁰⁸. Weiterer Bestandteil der Transkriptomik ist die Untersuchung von zirkulierenden ncRNAs (non coding RNAs). Die Menge an vorhandenen ncRNAs ist enorm, da zwar ein Großteil des Genoms in RNA transkribiert wird, jedoch nur ein sehr geringer Anteil in Proteine translatiert wird^{209, 210}. Neben den ribosomalen und transfer RNAs gehören hierzu eine Menge an regulatorischen RNA-Klassen. Innerhalb der ncRNA unterscheidet man wie folgt: lncRNA (long non-coding RNA mit einer Länge von ≥ 200 Nukleotiden) und small non-coding RNA (< 200 Nukleotide), zu denen unter anderem Micro-RNAs zählen²⁰⁹. Im Jahr 2016 konnte im Rahmen einer Studie gezeigt werden, dass sich die Expression von 299 lnc-RNAs bei Männern und 97 lnc-RNAs bei Frauen mit ischämischem Schlaganfall signifikant von der Kontrollgruppe unterschied²¹¹. Weitere Studien konnten ebenfalls signifikante Veränderungen nachweisen^{212, 213}. Micro-RNAs sind wichtige epigenetische Regulatoren des Immunsystems, die die zelluläre Genexpression beeinflussen²¹⁴. Es konnten Veränderungen der extrazellulären micro-RNAs, die z. B. aus dem ischämischen Gehirn stammen, im Plasma von Schlaganfallpatientinnen und -patienten nachgewiesen werden^{209, 214, 215}. Ebenfalls zeigten sich Veränderungen der intrazellulären micro-RNAs in zirkulierenden Leukozyten oder anderen Blutzellen beim akuten Schlaganfall. Man geht davon aus, dass diese micro-RNAs die Aktivierung des Immunsystems im Rahmen des Schlaganfalls regulieren²¹⁶.

Die Metabolomik ist eine sehr vielversprechende Strategie zur Identifizierung von Blut-basierten Biomarkern²¹⁷. Im Rahmen dieses Forschungsbereiches werden Profile von Metaboliten in Bioflüssigkeiten, Zellen und Geweben erstellt²¹⁸. Metabolite sind kleine Moleküle (typischerweise $< 1,5\text{kDa}$)¹⁵⁰, die Substrate und Produkte des Stoffwechsels sind, die wesentliche zelluläre Funktionen wie Energieerzeugung und -speicherung, Signaltransduktion und Apoptose steuern²¹⁸. Sie umfassen beispielsweise Aminosäuren, Lipide, Kohlenhydrate, Kofaktoren/Vitamine, Energiemetabolite, Nukleotide, Peptide und Xenobiotika²¹⁹. Eine Hirnischämie verursacht lokale und systemische metabolische Veränderungen wie z. B. Veränderungen

im zellulären Energiestoffwechsel aber auch eine globale Stressreaktion, weshalb es naheliegt, nach Metaboliten als potentiellen Blut-basierten Biomarkern für den Schlaganfall zu suchen. Technisch basiert dieser Ansatz auf der sogenannten Massenspektrometrie und Kernspinresonanz²²⁰. Man unterscheidet zwei Herangehensweisen: Der ungezielte Ansatz wird im Rahmen von hypothesengenerierenden Studien verwendet, die im Allgemeinen eine unvoreingenommene umfassende Analyse der gesamten Metabolitenmenge beinhaltet. Dabei wird auf den Vergleich metabolischer Profile zwischen Patientinnen und Patienten mit einer bestimmten Erkrankung und einer Kontrollgruppe abgezielt. Dadurch können neue Metabolite grundsätzlich relativ zuverlässig identifiziert werden. Jedoch weist dieser Ansatz eine geringe Präzision und eine geringe Genauigkeit auf²²¹. Im Gegensatz dazu validiert der gezielte metabolische Ansatz potentielle Biomarker, die bereits identifiziert wurden, bevor sie klinisch verwendet werden. Diese Strategie misst eine relativ kleine Anzahl bekannter Metaboliten und bietet daher eine optimale Sensitivität und Spezifität gegenüber ungezielten Ansätzen²²². Das Metabolom ist hoch dynamisch, zeitabhängig und reagiert sensitiv auf viele Umweltbedingungen²²³. Es kommt dem Phänotypen am nächsten bzw. kann den Phänotypen am besten vorhersagen²²³. Diese Eigenschaften sind von Vorteil in der Verwendung als Biomarker. Jedoch gibt es viele chemisch verschiedene Metabolite, was die Wahl des richtigen Extraktionsverfahrens schwierig macht bzw. die Verwendung vieler verschiedener Methoden nötig macht²²⁴. Es werden laufend neue Bioinformatik-Tools entwickelt, mit dem Ziel die komplexen Fragen in diesem Bereich zu beantworten²²³. Im Rahmen der Metabolomik kann es also gelingen gewebe- bzw. mechanismusspezifische Biomarker zu identifizieren²²¹. Dadurch wird ein tiefer und dynamischer Einblick in die Stoffwechselfunktionen von Zellen, Geweben und Organen ermöglicht²²⁵. Dies kann zu einem besseren Verständnis pathophysiologischer Vorgänge führen²²⁶. Insbesondere für Krankheiten, bei denen Stoffwechselstörungen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten spielen, wie z.B. dem ischämischen Schlaganfall, stellen Metabolite somit gute potentielle Blut-basierte Biomarker dar²²⁵. Metabolite sind klein und können die Blut-Hirn-Schranke passieren. Deshalb könnten sie beim ischämischen Schlaganfall gut als diagnostischer Biomarker eingesetzt werden, da ihre Veränderungen in der akuten Krankheitsphase ggf. früher detektiert werden können im Vergleich zu anderen Blut-basierten Biomarkern wie z.B. Proteinen¹⁵⁰.

Im Folgenden soll anhand der verschiedenen Metabolitenklassen der aktuelle Stand der Forschung hinsichtlich Metaboliten beim ischämischen Schlaganfall aufgeführt werden.

Hu et al. konnten bestimmte Aminosäuren detektieren, die bei Patientinnen und Patienten mit ischämischem Schlaganfall im Vergleich zur Kontrollgruppe und Patientinnen und Patienten mit hämorrhagischem Schlaganfall erhöht waren, sodass diese als diagnostische Biomarker Verwendung finden könnten. Die Verallgemeinerbarkeit dieser Ergebnisse muss jedoch in Frage gestellt werden, da keine Adjustierung für demographische und vaskuläre Risikofaktoren und keine externe Validierung durchgeführt wurden^{150, 154}. Dahingegen scheinen verzweigtkettige Aminosäuren im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls vermindert zu sein, wobei der Grad der Verminderung mit dem neurologischen Outcome korreliert²²⁷. Hier käme eine Verwendung als prognostische Biomarker in Frage.

Lipide erfüllen diverse Funktionen im menschlichen Körper, wobei es über 1000 verschiedene Lipide gibt. Durch ihre charakteristische chemische Beschaffenheit können sie sich zu Membranen und Lipidtröpfchen formieren, beeinflussen die Organisation von Membranen und sind an der Signaltransduktion beteiligt^{228, 229}. Triacylglycerine und Cholesterolester mit niedriger Kohlenstoffzahl und niedrigem Doppelbindungsanteil konnten 2014 im Rahmen einer Studie als stärkste Prädiktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen herausgefiltert werden²³⁰. In einer weiteren Studie zeigten sich 2019 die langkettigen Dicarbonsäuren Tetradecandioat und Hexadecandioat mit einem höheren Risiko für ischämischen Schlaganfall und insbesondere für den kardioembolischen Schlaganfall assoziiert²³¹. Sie wären also als prädiktive Biomarker denkbar. Außerdem scheinen Sphingolipide bei Patientinnen und Patienten mit Schlaganfall im Plasma erhöht zu sein und die Sphingolipidwerte scheinen mit dem Volumen des ischämischen Hirngewebes assoziiert zu sein²³², was diagnostischen und prognostischen Wert hätte.

Kohlenhydrate sind chemisch definiert als Monosaccharide, Disaccharide (Zucker), Polyole, Oligosaccharide und Polysaccharide²³³. Eine große britische Studie konnte im Jahr 2023 zeigen, dass eine höhere Einnahme von freiem Zucker signifikant assoziiert ist mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und ischämischen Schlaganfall, wobei die Einnahme von Ballaststoffen mit einem niedrigeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen verbunden war²³⁴.

Kofaktoren sind Substanzen, die zusätzlich zu einem Enzym vorhanden sein müssen, um eine Reaktion zu katalysieren. Vitamine fungieren oftmals als Kofaktoren. Sie spielen ebenfalls eine Rolle in der Pathophysiologie vieler Erkrankungen. So zeigten sich niedrige Magnesiumspiegel beispielsweise assoziiert mit kardiovaskulären Erkrankungen und Schlaganfall²³⁵. Ein Vitamin-

B12-Mangel führt zu einer Anhäufung von Stoffwechselsubstraten wie Homocystein, die die Immunhomöostase verändern und zu atherosklerotischen Erkrankungen, einschließlich ischämischem Schlaganfall, beitragen können²³⁶. Im Rahmen der „Vitamin Intervention in Stroke Prevention study“ konnte eine hochdosierte Gabe von Folsäure, Vitamin B6 und B12 das Risiko eines erneuten Schlaganfalls oder Myokardinfarktes jedoch nicht signifikant senken²³⁷.

Im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls kommt es außerdem zu Veränderungen des Energiemetabolismus innerhalb der Zelle. Hierzu gehören eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion, der Zell-Zell-Kommunikation sowie der programmierte Zelltod²³⁸⁻²⁴⁰. Es konnte z. B. gezeigt werden, dass Veränderungen von Succinat (Bestandteil der Atmungskette) mit kardioembolischen Schlaganfällen und atrialer Dysfunktion assoziiert sind²⁴¹.

Ein Nukleotid stellt den Grundbaustein der DNA und RNA dar und besteht aus einem Basen-, Zucker- und Phosphatanteil. NADH (Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrid) und FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid), die auch als Koenzyme wirken, spielen eine Rolle im Rahmen metabolischer Aktivitäten und mitochondrialer Dysfunktion, weshalb sie als potentielle Biomarker hierfür in Frage kommen²⁴². Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Aptamer BT200 (ein Oligonukleotid) von-Willebrand-Faktor und die Thrombozytenfunktion hemmt, was therapeutisch im Rahmen der Sekundärprophylaxe genutzt werden könnte^{243, 244}.

Die Klasse der Peptide wird ebenfalls als Metabolite untersucht, die im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls beeinflusst werden. Ein Peptid ist eine organische chemische Verbindung, die aus einer Verknüpfung von zwei oder mehr Aminosäuren besteht. Unter Neuropeptiden versteht man Peptide, deren Genexpression und Biosynthese in Neuronen stattfindet, die reguliert freigesetzt werden und die die Fähigkeit besitzen neuronale Funktionen zu modulieren²⁴⁵. Neuropeptide werden im Rahmen einer ischämischen Schädigung des Gehirns überexprimiert und scheinen eine neuroprotektive Wirkung zu haben, wobei sie wohl anti-apoptisch, anti-inflammatorisch und anti-oxidativ wirken. Dies eröffnet potentiell neue therapeutische Möglichkeiten, sofern es gelingt, solche neuroprotektiven Peptide als Therapeutika zu etablieren²⁴⁶.

Xenobiotika sind chemische Verbindungen, die dem biologischen Stoffkreislauf eines Organismus fremd sind²⁴⁷. Hierzu zählen z. B. Pharmaka, Nahrungsmittel und Umweltgifte^{248 249}. Hier besteht ein enger Zusammenhang mit dem Darmmikrobiom, da dieses die Aufnahme der

Xenobiotika reguliert und damit Einfluss auf deren Wirkung im menschlichen Körper hat²⁵⁰. Bestimmte Medikamente, wie z. B. Erythropoetin, kombinierte Kontrazeptiva, Bevacizumab, Tamoxifen und Antipsychotika, zeigten eine hohe Assoziation für das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden²⁵¹. Nikotin scheint das Gehirnödem im Rahmen eines ischämischen Ereignis zu verschlimmern²⁵², beeinträchtigt die Blut-Hirn-Schranke²⁵³ und erhöht das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden²⁵⁴. Die Verwendung von Chemikalien in der Agrarwirtschaft steht in Zusammenhang mit dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen²⁵⁵. Anhand dieser Beispiele lässt sich erkennen, dass Xenobiotika als sogenannte Risikobiomarker eingesetzt werden können.

Wie die oben genannten Beispiele zeigen, könnten Metabolite in Zukunft also Potential als diagnostische, prognostische, prädiktive und Risikobiomarker haben. Weitere Studien, insbesondere bezüglich der Übertragbarkeit in die klinische Anwendung, sind jedoch nötig.

1.10.4. Auswirkungen präanalytischer Prozesse in der Metabolomik

Metabolomanalysen reagieren empfindlich auf Schwankungen in der Handhabung und Vorbereitung der Proben. Um die Sensitivität und Spezifität von Metabolomikstudien zu maximieren und robuste und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, ist ein spezifisches Wissen darüber erforderlich, wie Unterschiede in den Bedingungen der Probenentnahme, der Probenverarbeitung und der Probenlagerung die Metabolite beeinflussen können. Dies kann nützlich sein, um die Auswirkungen präanalytischer Faktoren auf die Metabolite bei Studien mit bereits entnommenen Proben in die Bewertung miteinzubeziehen sowie den Entnahmeprozess im Rahmen zukünftiger Studien zu optimieren²⁵⁶.

Im Folgenden Abschnitt soll dementsprechend der aktuelle Stand der Forschung bezüglich des Einflusses von präanalytischen Abweichungen im Rahmen von Metabolomikstudien dargestellt werden. Zunächst untersuchten mehrere Studien den Einfluss der Verwendung von Serum- oder Plasmaproben. Hierbei zeigt sich, dass sowohl Serum- als auch Plasmaproben für die Metabolomforschung geeignet sind, sich aber in Bezug auf Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit unterscheiden können. Verschiedene Studien kamen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Frage, ob Plasma- oder Serumproben hinsichtlich Sensitivität und Reliabilität überlegen sind²⁵⁶. Des Weiteren wurde untersucht, ob die verwendeten Zusätze

innerhalb der Probenröhrchen einen Einfluss auf die Messungen der Metabolite haben. Bezüglich Plasmaproben ergab sich für die Zusätze Heparin, EDTA, Natriumfluorid oder Citrat keine starke Evidenz²⁵⁶⁻²⁶⁴. Explizit Serumproben wurden nur in einer Studie untersucht, wobei sich kein Unterschied zwischen Röhrchen mit und ohne Gelbarriere ergab²⁶⁵. Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss des zirkadianen Rhythmus auf Messungen der Metabolite. Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass tageszeitliche Schwankungen in der Probenentnahme einen Einfluss auf Metabolite wie beispielsweise Kortison und Aminosäuren haben können²⁶⁶. Lipide sind ebenfalls assoziiert mit dem Biorhythmus, was in Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme stehen könnte²⁶⁷. Als ein weiterer Faktor im Rahmen der präanalytischen Prozesse, der die Metabolitenmessung beeinflussen kann, stellte sich die Hämolyse der Proben dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hämolyse innerhalb der Blutproben mit einer hohen Variabilität bezüglich der Messungen der Metabolite einhergeht²⁶¹ und die Konzentrationen der Metabolite beeinflusst^{261, 268, 269}. Allerdings wurden im Rahmen dieser Studien nur Plasmaproben untersucht und keine Serumproben. Da Hämolyse gekennzeichnet ist durch die Freisetzung von Hämoglobin und anderen intrazellulären Bestandteilen wie Stoffwechselprodukten (Strukturproteine, Lipide, Kohlenhydrate) aus den Erythrozyten in die umgebende extrazelluläre Flüssigkeit nach einer Beschädigung oder Störung der Zellmembran, scheint ein Einfluss auf die Messung der Metaboliten durch Hämolyse durchaus erklärbar zu sein^{270, 271}. In zahlreichen Studien wurde der Einfluss verschiedener Zeit- und Temperaturverzögerungen zwischen Blutentnahme und Zentrifugation zur Gewinnung von Serum oder Plasma auf metabolomische Profile untersucht²⁵⁶. Hierbei konnte vor allem gezeigt werden, dass zeitliche Verzögerungen sowie eine Exposition gegenüber Raumtemperatur einen signifikanten Einfluss auf die quantitative Messung von vielen Metaboliten haben^{261, 272, 273}. In Serumproben zeigte sich dabei ein größerer Einfluss von zeitlichen Verzögerungen auf die Messung der Metabolite als in Plasmaproben²⁷³. Ein Erklärungsansatz, wie es zu einem Einfluss von zeitlichen Verzögerungen vor der Zentrifugation auf die Messungen der Metabolite kommen kann, ist der Metabolismus der Blutzellen in den Blutproben²⁶⁸. Durch den Prozess der Glykolyse im Rahmen des anaeroben Stoffwechsels innerhalb der Erythrozyten, die keine Mitochondrien besitzen, geht man davon aus, dass es zu einem Abfall der Glucosekonzentrationen und einem Anstieg der Laktatkonzentrationen kommt²⁷³⁻²⁷⁵. Weitere Erklärungsansätze beinhalten Enzymaktivitäten, die Degradierung und Synthese bestimmter Metabolite sowie die Aktivierung der Gerinnungskaskade ex vivo²⁷⁶. Einige Studien kamen zu dem Schluss, dass sowohl zeitliche Verzögerungen

vor als auch zeitliche Verzögerungen nach der Zentrifugation die gemessenen Konzentrationen der Metabolite beeinflussen können, wobei zeitliche Verzögerungen bei Raumtemperatur mehr Einfluss zu haben scheinen als bei 0-4 °C^{256, 264, 272-274, 277}. Mittels weiterer Studien wurde der Einfluss der Zentrifugationsbedingungen untersucht, wobei sich lediglich geringe Veränderungen der Metabolite in Abhängigkeit von der Zentrifugationsgeschwindigkeit, der Temperatur und der Zeit zeigten²⁷⁸⁻²⁸⁰. Bei der Lagerung der Blutproben im Gefrierschrank können sich ebenfalls Schwankungen der Metabolitenmessungen ergeben. Bei Lagerung mit einer Temperatur von – 80 °C und darunter konnten Studien jedoch zeigen, dass die Metabolite über einen langen Zeitraum sehr stabil bleiben^{257, 281, 282}.

2. Relevanz und Inhalt der Forschungsfrage

Der ischämische Schlaganfall ist eine häufige Erkrankung und zählt weltweit zu einer der führenden Ursachen für Tod und langfristige Behinderungen. Er verursacht hohe Kosten für die Gesellschaft. Die Diagnose erfordert weiterhin aufwendige und kostenintensive bildgebende Verfahren. Da die zerebrale Perfusion entscheidend ist und eine unzureichende Blutversorgung innerhalb kurzer Zeit zu irreversiblen Schäden im Gehirn führen kann, ist eine schnelle und präzise Diagnosestellung bei Verdacht auf einen ischämischen Schlaganfall unerlässlich. Die Bestimmung von Biomarkern im peripheren Blut könnte eine kostengünstige und schnelle Alternative zur herkömmlichen Diagnostik bieten. Diese Biomarker könnten nicht nur helfen, Schlaganfälle frühzeitig zu erkennen, sondern auch prädiktive und prognostische Informationen liefern. Dadurch könnten präventive Maßnahmen verbessert und Therapieentscheidungen individueller gestaltet werden. Ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen neurovaskulärer Erkrankungen könnte die Strategien zur Prävention, Diagnose und Therapie weiter optimieren^{150, 283}. Die Metabolomik ist eine vielversprechende Methode zur Identifizierung von Blut-basierten Biomarkern²¹⁷. Das Metabolom ist hoch dynamisch und reagiert empfindlich auf verschiedene Umweltfaktoren²²³. Es kommt dem Phänotypen am nächsten bzw. kann den Phänotypen am besten vorhersagen²²³. Diese Eigenschaften sind von Vorteil in der Verwendung als Biomarker²²⁴. Bisher wurden mehrere zirkulierende Metabolite mit dem Risiko und der Diagnose von Schlaganfällen in Verbindung gebracht. Es existieren jedoch weiterhin Inkonsistenzen, die auf unterschiedliche Studiendesigns zurückzuführen sind. Auch die präanalytischen Prozesse variieren zwischen den Studien, und es kommen verschiedene Methoden zur Detektion der Metabolite zum Einsatz¹⁵⁰. In dieser Arbeit sollen mögliche präanalytische Störfaktoren untersucht werden, die die Konzentration von Metaboliten im Blut beeinflussen können. Der Fokus liegt auf Abweichungen bei der Probenentnahme und -verarbeitung. Es werden Proben von Patienten mit ischämischem Schlaganfall, transitorischer ischämischer Attacke, Stroke Mimics sowie von gesunden Probanden analysiert. Dabei werden insbesondere folgende Aspekte betrachtet: die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Zentrifugation sowie dem Einfrieren der Proben, und Abweichungen bei der Blutentnahme selbst. Dabei werden hier einmal das Vorhandensein von hämolytischen Proben bzw. die Gefahr für hämolytische Proben (Serum sichtbar hämolytisch, lange venöse Stauung bei der Blutentnahme, Proben geschüttelt, langes Aspirieren) und einmal die Abnahme aus einem

arteriellen oder venösen Gefäß untersucht. Ziel dieser Arbeit soll es sein, zu analysieren, ob diese Abweichungen einen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Konzentrationen der Metabolite haben. Damit sollen mögliche Störfaktoren im Rahmen der Probenentnahme und -verarbeitung aufgedeckt und deren Einfluss auf die Analyse metabolomischer Daten spezifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Studiendesign

Bei der „CIRCULAS“-Studie handelt es sich um eine beobachtende, prospektive Kohortenstudie, in die Patientinnen und Patienten mit Verdacht auf Schlaganfall bereits in der Notaufnahme des Universitätsklinikums Großhadern eingeschlossen wurden. Im weiteren Verlauf wurden Proben und klinische Informationen am darauffolgenden Tag und ca. 90 Tage nach Erkrankung gewonnen. Für diese Arbeit wurden Daten von 263 Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern verwendet, die im Zeitraum von Februar 2014 bis November 2016 in die „CIRCULAS“-Studie eingeschlossen wurden. Diese wurden je nach Diagnose vier verschiedenen Gruppen zugeordnet.

Als Einschlusskriterium für die Studie galt der klinische Verdacht auf einen Schlaganfall. Patientinnen und Patienten, deren Symptome zum Zeitpunkt der Blutentnahme schon mehr als 24 Stunden bestanden oder deren Symptombeginn unklar war, wurden ausgeschlossen. Des Weiteren wurden alle Patientinnen und Patienten ausgeschlossen, die in den letzten drei Monaten bereits einen ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfall erlitten hatten, aktuell an einer aktiven malignen Erkrankung oder einer entzündlichen oder infektiologischen Erkrankung litten oder in den letzten drei Monaten operiert wurden. Minderjährige Patientinnen und Patienten wurden ebenfalls nicht in die Studie eingeschlossen. Bei fehlender Zustimmung zur Teilnahme an der Studie erfolgte ebenfalls der Ausschluss.

3.2. Datenerhebung

3.2.1. Ethikvotum

Die Patientinnen und Patienten bzw. Angehörige oder Betreuerinnen und Betreuer der Patientinnen und Patienten sowie die Probandinnen und Probanden wurden ausführlich über die Vorgehensweise und Ziele der Studie aufgeklärt und erklärten sich schriftlich mit der Studienteilnahme einverstanden. Die Prozesse innerhalb der Studie wurden durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München geprüft. Die Datengewinnung

und -aufbewahrung erfolgte nach den geltenden Bestimmungen zum Datenschutz und der Datensicherheit.

3.2.2. Krankengeschichte

Zur Bestimmung möglicher Risiko- und Einflussfaktoren wurde die Krankengeschichte der Patientinnen und Patienten inklusive der Vormedikation durch Befragung und durch Einsicht der Krankenakte erhoben. Besonderes Interesse galt den kardiovaskulären Risikofaktoren, zu denen die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus, die Dyslipoproteinämie, die koronare Herzkrankheit, die Adipositas (BMI), der Nikotin- und Alkoholabusus, eine positive Familienanamnese, das männliche Geschlecht und das Alter zählen. Die arterielle Hypertonie wurde definiert ab einem Blutdruck von 140/90 mmHg und höher oder bei Einnahme einer antihypertensiven Medikation. Die Nebendiagnose Diabetes mellitus wurde ab einem HbA1c $\geq 6.5\%$ gestellt. Eine Hypercholesterinämie wurde festgelegt ab einem Gesamtcholesterinwert von größer 240 mg/dl oder bei einer Statineinnahme. Der Nikotinabusus wurde mittels der Packungsjahre (pack years) quantifiziert. Hinsichtlich des Alkoholkonsums sollten die Patientinnen und Patienten angeben, wie viele Getränke pro Woche sie zu sich nehmen (< 7 Getränke, 7-14 Getränke, 15-21 Getränke, > 21 Getränke). Eine positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen wurde definiert bei Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit, eines Myokardinfarktes, eines ischämischen Schlaganfalls oder einer transitorischen ischämischen Attacke bei Verwandten ersten Grades, wobei das Ereignis bei männlichen Verwandten vor dem 55. Lebensjahr und bei weiblichen Verwandten vor dem 65. Lebensjahr stattgefunden haben muss. Des Weiteren wurden potentielle Konsequenzen dieser kardiovaskulären Risikofaktoren aufgenommen wie der Zustand nach Myokardinfarkt, transitorisch ischämischer Attacke oder ischämischem Schlaganfall.

3.2.3. Gruppenzuordnung

Wie oben bereits erwähnt erfolgte die Gruppenzuteilung anhand der Diagnose der Patientinnen und Patienten. Die Diagnose ischämischer Schlaganfall wurde dabei anhand klinischer und bildmorphologischer Kriterien gestellt. Klinisches Kriterium stellte das akute fokale neurologische Defizit dar, welches weniger als 24 Stunden vor Aufnahme in die Klinik aufgetreten sein

musste. In der Bildgebung zeigte sich entweder eine hyperintense Läsion in der diffusionsgewichteten MRT-Untersuchung oder eine neu aufgetretene Hypodensität bzw. Demarkierung in der nativen CT-Untersuchung. Der Gruppe transitorische ischämische Attacke wurden alle Patientinnen und Patienten zugeteilt, deren fokal neurologisches Defizit weniger als 24 Stunden anhielt und deren Bildgebung kein Korrelat für ein ischämisches Ereignis oder eine konkurrierende Diagnose darstellte. Die Diagnose Stroke Mimic erhielten alle Patientinnen und Patienten, bei denen ein ischämischer oder hämorrhagischer Schlaganfall, eine intrakranielle Blutung, eine Sinus- oder Venenthrombose und eine transitorische ischämische Attacke ausgeschlossen werden konnte und eine andere Diagnose als zugrundeliegende Ursache für die Symptomatik gestellt wurde. Unter Stroke Mimics versteht man dementsprechend Krankheitsbilder, die schlaganfallähnliche Symptome verursachen, deren Ursache jedoch kein Schlaganfall ist. Die häufigsten Ursachen stellen dabei peripher vestibuläre Defizite, metabolische oder toxische Ursachen, epileptische Anfälle, funktionelle Störungen oder Migräne dar²⁸⁴. In die Gruppe der gesunden Kontrollen wurden gesunde Probandinnen und Probanden ohne neurologische Symptomatik eingeschlossen, die in den letzten drei Monaten keinen ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfall, keine transitorische ischämische Attacke und keine intrakraniellen Blutungen erlitten hatten. Dabei wurde darauf geachtet, dass hinsichtlich der Alters- und Geschlechtsverteilung eine Vergleichbarkeit gegenüber den anderen Gruppen erreicht wird.

3.2.4. Drei-Monats-Follow-Up

Ca. 90 Tage nach der Erkrankung kamen die Patientinnen und Patienten mit der Diagnose ischämischer Schlaganfall zur Verlaufskontrolle in die Ambulanz des Instituts für Schlaganfall- und Demenzforschung oder in die neurologische Ambulanz des Klinikums Großhadern. Im Rahmen dieses Termins wurden die Patientinnen und Patienten erneut nach ihrem Gesundheitszustand oder etwaigen Änderungen in ihrer Krankheitsgeschichte befragt sowie der aktuelle NIHSS und mRS Score erhoben. Des Weiteren erfolgte eine erneute Blutentnahme.

3.3. Probengewinnung und -verarbeitung

3.3.1. Blutentnahme

Alle Proben wurden im Rahmen der „CIRCULAS“-Studie in der Notaufnahme, der Stroke Unit, der neurologischen Intensivstation, der neurologischen Normalstation oder der neurologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Großhadern sowie in der Ambulanz des Instituts für Schlaganfall- und Demenzforschung entnommen. Die erste Entnahme der Blutproben für die Studie erfolgte initial im Rahmen der ersten Blutentnahme der Patientinnen und Patienten in der Notaufnahme des Klinikums Großhadern. Im stationären Verlauf wurden weitere Proben am zweiten und siebten Tag nach Ereignis oder am Entlasstag abgenommen. Die letzte Blutentnahme für die Studie wurde bei Patientinnen und Patienten mit der Diagnose ischämischer Schlaganfall im Rahmen der Nachkontrolle ca. 90 Tage nach Erkrankung im Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung oder in der neurologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Großhadern abgenommen. Für alle Blutentnahmen wurde der genaue Zeitpunkt dokumentiert.

Für die venöse Blutentnahme wurden Sarstedt Safety Multifly® Kanülen 21G / 23G SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland verwendet. Für die venöse und arterielle Blutentnahme wurde eine S-Monovette® 7.5 ml / 4.5 ml Z (Serum) SARSTEDT AG & Co. als Blutröhrchen verwendet. Bei der venösen Blutentnahme wurde unter Verwendung eines Stauschlauches entweder mittels Butterfly einmalig peripher venös punktiert oder Blut aus einem neu gelegten peripher oder zentral venösen Katheter entnommen. Die arterielle Blutentnahme erfolgte aus einem bereits liegenden arteriellen Zugang.

3.3.2. Prozessierung der Proben

Nach der Entnahme des Blutes in ein Serumröhrchen ließ man dieses 30 bis 45 Minuten stehen. Danach wurden die Proben 10 Minuten lang bei 15°C und 2000G zentrifugiert. Das bedeutet, dass die Zentrifugalbeschleunigung das 2000-fache der Erdbeschleunigung beträgt²⁸⁵. Aus der zentrifugierten Serumprobe wurden als nächstes jeweils 300 µl des Überstandes in maximal acht verschiedene Röhrchen abpipettiert. Die Röhrchen wurden anschließend bis zur

Analyse bei -80 °C gelagert. Während dieses Vorgangs wurden sowohl der Zeitpunkt der Zentrifugation als auch der Zeitpunkt des Einfrierens dokumentiert.

Für die Probenverarbeitung wurden folgende Materialien und Geräte verwendet:

- Falcon™ 15 ml Conical Centrifuge Tubes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Filter Tips Pipettenspitzen, VWR Peqlab, Darmstadt, Deutschland
- Heraeus™ Labofuge™ 400, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Heraeus™ Megafuge™ 16, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Matrix™ 500 µl ScrewTop Tubes mit 2D-Barcode, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Mikrotiterplatten 96 Wells, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- peqGOLD SafeGuard™ Pipettenspitzen, VWR Peqlab, Darmstadt, Deutschland
- Pipetman classic Pipetten P2 / P10 / P20 / P100/ P200 / P1000, Gilson, Middleton, USA
- Racks for Matrix™ ScrewTop Tubes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Zentrifuge 5427 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- -80 °C Gefrierschrank Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

3.3.3. Abweichungen in der Probengewinnung und -verarbeitung

Für die Fragestellung dieser Arbeit besonders wichtig sind Faktoren in den Abläufen der Probengewinnung und -verarbeitung, die einen Zusammenhang mit den Ergebnissen der Messung der Metabolite haben könnten. Diese wurden im Rahmen der einzelnen Schritte der Blutentnahme und der Prozessierung dokumentiert. Folgende mögliche Einflussfaktoren konnten in den für diese Arbeit untersuchten Proben festgestellt werden:

Die Zeitdifferenzen zwischen der Abnahme der Blutproben, der Zentrifugation und dem Einfrieren können protokoll- und alltagsbedingt bei den verschiedenen Proben abweichen. Dabei wurde die Differenz zwischen der Blutentnahme und dem Einfrieren, zwischen der Blutentnahme und der Zentrifugation sowie zwischen der Zentrifugation und dem Einfrieren dokumentiert.

Des Weiteren wurden die Proben auf unterschiedliche Art und Weise gewonnen. Die meisten Blutentnahmen wurden venös über eine Flügelkanüle (Butterfly) abgenommen, wobei vereinzelt auch Proben über einen peripheren oder zentralen Venenverweilkatheter gewonnen wurden. Bei Patientinnen und Patienten, die krankheitsbedingt einen arteriellen Zugang hatten, wurde dieser für die Blutentnahme genutzt.

Außerdem wurden Abweichungen wie eine makroskopisch sichtbare Hämolyse der Blutproben, eine Stauung der Venen bzw. ein Aspirieren des Blutes von über einer Minute im Rahmen der Blutentnahme sowie Abweichungen im Ablauf der Probengewinnung wie z. B. eine zeitliche Verzögerung, ein Schütteln der Proben oder ein Zusammenfügen zweier Serumröhrchen dokumentiert. Diese Faktoren wurden als Gefahr für eine potentielle Hämolyse zusammengefasst.

3.3.4. Messung der Metabolite

Die Erstellung der Metabolitenprofile wurden am Genomanalysezentrum (Helmholtz-Zentrum München) sowie von Metabolon (Durham, NC) durchgeführt. Die Messungen der Metabolite erfolgten mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und einer Massenspektrometrie¹⁵². Mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erfolgt die Probenaufbereitung im Sinne einer Auftrennung der einzelnen Komponenten eines Stoffgemisches²⁸⁶. Die Massenspektrometrie dient dazu, Atome oder Moleküle zu ionisieren, sie nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis zu trennen und mittels Detektor zu erfassen²⁸⁷. Mittels der Massenspektrometrie werden die Substanzen also identifiziert und quantifiziert. Diese Analysen sind somit auf Ebene der molekularen Struktur der jeweiligen Stoffe möglich und weisen damit eine hohe Stoffspezifität auf²⁸⁶.

3.4. Statistische Methoden

Alle statistischen Auswertungen werden mit dem Programm R (Version 4.1.2) durchgeführt.

Zur Datenvorbereitung vor Beginn der statistischen Analysen werden die Metabolite mit mehr als 50 % fehlenden Werten im Rahmen dieser Arbeit entfernt. Die restlichen fehlenden Daten werden mittels multipler Imputation aufgefüllt. Zur Reduktion von Ausreißern werden Werte in den drei Variablen der Differenzen, die mehr als zwei Standardabweichungen vom

jeweiligen Mittelwert entfernt sind, aus dem Datensatz entfernt. Im Rahmen der deskriptiven Statistik wird die Bestimmung von Lage- und Streumaßen verwendet, wobei der Median und der Interquartilsabstand benutzt werden. Im Rahmen der weiteren statistischen Analyse werden zunächst einfache und multiple lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Für die einfachen linearen Regressionsanalysen werden die entsprechenden Voraussetzungen geprüft. Diese beinhalten die Skalierung der Variablen, die ordinal- oder intervallskaliert sein müssen. Die in dieser Arbeit verwendeten unabhängigen Variablen sind metrisch, wobei dichotome Variablen als metrisch behandelt werden dürfen. Die abhängigen Variablen sind ebenfalls metrisch und erfüllen hiermit die Voraussetzungen bezüglich der Skalierung. Des Weiteren müssen die Variablen normalverteilt sein. Hierfür werden die Metabolite und die Differenzen analytisch mittels des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet²⁸⁸. Im Rahmen dessen zeigt sich keiner der Metabolite normalverteilt. Aus diesem Grund erfolgt eine logarithmische Transformation der abhängigen Variablen (Metabolite). Ebenso werden die Differenz-Variablen logarithmisch transformiert. Die logarithmische Transformation führt ebenfalls zu einer Linearisierung der abhängigen Variablen, sodass davon auszugehen ist, dass nun eine Linearität ebenfalls gegeben ist, was eine weitere Voraussetzung für die einfache lineare Regressionsanalyse darstellt. Eine Prüfung auf Normalverteilung nach logarithmischer Transformation im Rahmen des hier beispielhaft verwendeten Regressionsmodells mit der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren und der abhängigen Variable Guanosin zeigt Abbildung 1. Die graue gestrichelte Linie zeigt hierbei die erwartete Normalverteilung, wobei die einzelnen Kreise, die zusammengefasst als dicke schwarze Linie imponieren, die tatsächliche Verteilung der Daten zeigt. Hier sieht man also, dass die verwendeten Daten annähernd der Kurve der erwarteten Normalverteilung entsprechen, sodass hier das Vorliegen einer Normalverteilung angenommen werden kann.

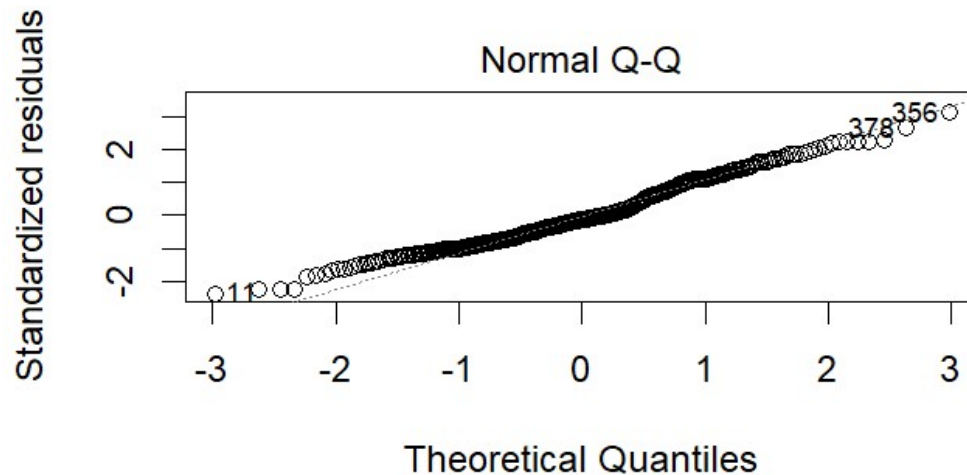


Abbildung 1: Test auf Normalverteilung. X-Achse: theoretische Quantile, Y-Achse: standardisierte Residuen.

Eine weitere Voraussetzung stellt das Fehlen von Ausreißern dar. Hierfür wird geprüft, ob Ausreißer innerhalb der Daten einen Einfluss auf das Regressionsmodell haben. Zur Beurteilung dieser Fragestellung wird die Cook-Distanz verwendet, die ein Maß für den Einfluss eines Ausreißers auf das Regressionsmodell ist. Solange die Cook-Distanz $< 0,5$ ist, geht man von einem vernachlässigbaren Einfluss auf das Regressionsmodell aus²⁸⁹. Außerdem kann man die Hebelwerte der Ausreißer bestimmen, um den Einfluss auf das Regressionsmodell abzubilden. Sind die Hebelwerte nahe Null, haben die Ausreißer einen geringen Einfluss. Abbildung 2 zeigt die Analyse der Hebelwerte anhand des Beispiels des Regressionsmodells mit der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren und der abhängigen Variable Guanodin, wobei man sehen kann, dass diese gering ausgeprägt sind. Die Beobachtungen liegen außerdem weit unterhalb des Wertes von 0,5 der Cook-Distanz, sodass die Cook-Distanz in dieser Graphik nicht zu sehen ist. Sie wäre wie in der Legende zu sehen mit einer rot gestrichelten Linie eingezeichnet.

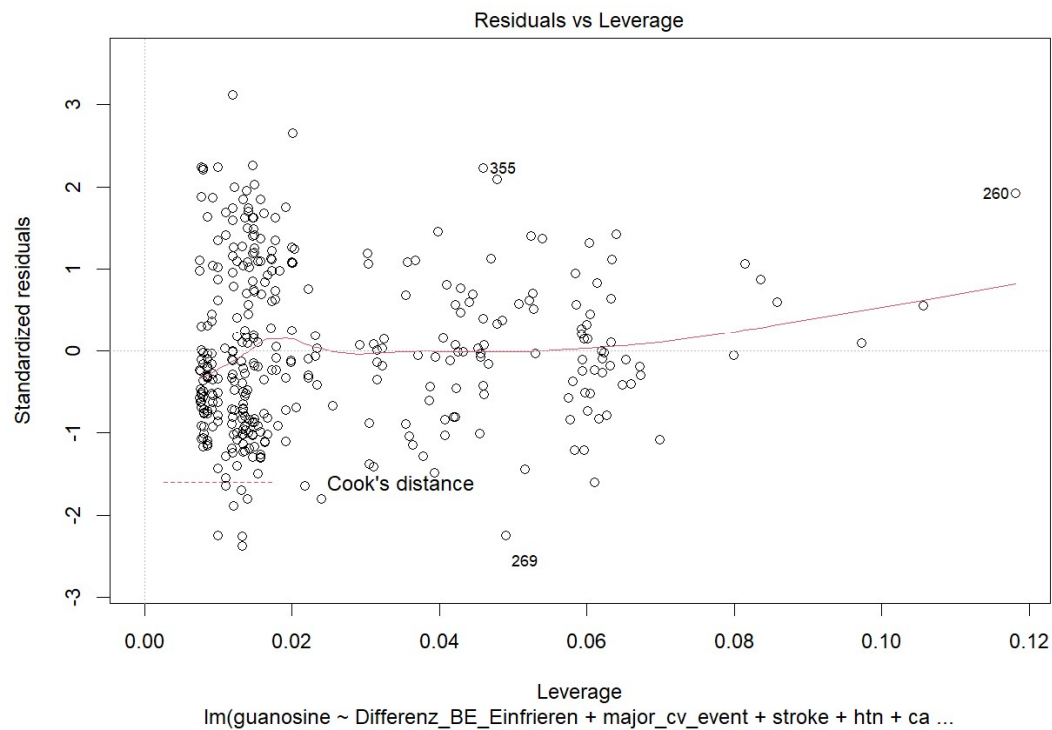


Abbildung 2: graphische Darstellung des Einflusses der Ausreißer auf das Regressionsmodell, X-Achse: Hebelwerte, Y-Achse: standardisierte Residuen

Außerdem muss eine Homoskedastizität der Residuen bestehen. Abbildung 3 zeigt beispielhaft am Regressionsmodell mit der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren und der abhängigen Variable Guanosin den graphischen Test auf Homoskedastizität, wobei zu sehen ist, dass die Residuen mehr oder weniger gleichmäßig verteilt sind. Das bedeutet, dass die Varianz der Residuen konstant ist und hier Homoskedastizität angenommen werden kann. Es kann also beispielhaft dargestellt werden, dass in dem in dieser Arbeit erstellten Regressionsmodell alle benötigten Voraussetzungen erfüllt sind.

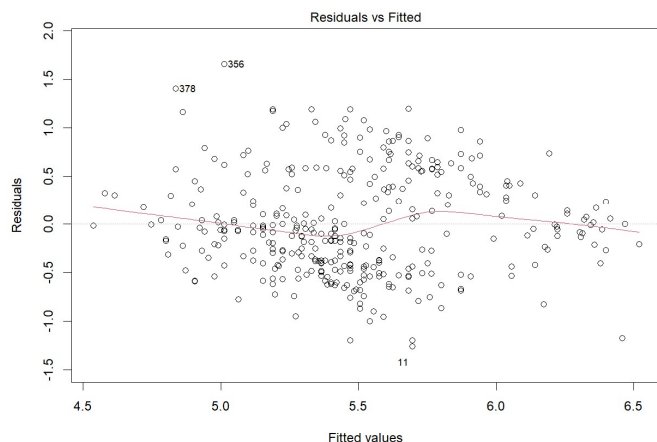


Abbildung 3: Test auf Homoskedastizität, X-Achse: vorhergesagter Wert durch Regressionsmodell, Y-Achse: Residuen = Abweichung zwischen Vorhersage und tatsächlichem Wert.

Die multiple lineare Regressionsanalyse hat dieselben Voraussetzungen wie die einfache lineare Regressionsanalyse mit Ausnahme einer weiteren Voraussetzung. Diese stellt die fehlende Multikollinearität dar²⁹⁰. Um das Vorhandensein von Multikollinearität in den Variablen dieser Arbeit zu beurteilen, wird für alle Regressionsanalysen der sogenannte GVIF („global variance influence factor“) berechnet²⁹¹. Um ein Fehlen von Multikollinearität anzunehmen, muss der GVIF Wert kleiner zehn betragen²⁹². Die in dieser Arbeit berechneten Werte für den GVIF waren maximal bei 2,57, sodass man davon ausgehen kann, dass keine Multikollinearität vorliegt und somit alle Voraussetzungen für eine multiple lineare Regressionsanalyse erfüllt sind. Im Rahmen der Regressionsanalyse wird der sogenannte standardisierte Regressionskoeffizient (beta) berechnet, der die Richtung des Zusammenhangs angibt. Im Anschluss werden die errechneten Regressionskoeffizienten jeweils mittels t-Test auf Signifikanz getestet, wobei der Test bei $p < 0,05$ als signifikant gilt²⁹³. Für multiples Testen wird mittels Step-up-Verfahren korrigiert.

In dieser Arbeit werden Regressionsmodelle erstellt mit der unabhängigen Variable der jeweiligen Differenz (Differenz Blutentnahme-Einfrieren, Differenz Blutentnahme-Zentrifugation, Differenz Zentrifugation-Einfrieren) und der abhängigen Variable Metabolit, wobei insgesamt 314 Metabolite untersucht werden. Des Weiteren wird ein Regressionsmodell mit der unabhängigen Variable potentielle Hämolyse sowie der abhängigen Variable Metabolit und ein Modell mit der unabhängigen Variable venöse Blutentnahme und der abhängigen Variable Metabolit erstellt. Im nächsten Schritt wird die Regressionsanalyse für potentielle Störvariablen adjustiert.

Bezüglich möglicher Abweichungen der jeweiligen Differenzvariablen werden Gruppenvergleiche mittels t-Test verwendet, wobei ebenfalls für multiples Testen mittels Step-up-Verfahren korrigiert wird.

Die 314 untersuchten Metabolite können folgenden acht Klassen zugeordnet werden: Aminosäuren, Lipide, Kohlenhydrate, Kofaktoren/Vitamine, Energiemetabolite, Nukleotide, Peptide und Xenobiotika. Es soll untersucht werden, ob sich diese acht Gruppen hinsichtlich der Anzahl der signifikanten Metabolite im Rahmen der Regressionsanalyse unterscheiden. Hierfür werden die signifikanten, nach Bonferroni korrigierten p-Werte aus der zuvor durchgeführten Regressionsanalyse verwendet. Im Rahmen dieser Fragestellung wird der Fisher-Exakt-Test verwendet.

Im nächsten Schritt werden Pathway Analysen durchgeführt. Diese Analyse beinhaltet eine Anreicherungsanalyse, im Rahmen derer Daten analysiert werden, um relevante Gruppen von Metaboliten zu erkennen, die in Fallproben im Vergleich zu einer Kontrolle verändert sind. Die Daten werden mit sogenannten Referenzmetaboliten verglichen, um Unterschiede festzustellen. Im nächsten Schritt können die veränderten Metabolite biologischen Stoffwechselwegen zugeordnet werden, sodass eine Aussage darüber gemacht werden kann, in welchen Stoffwechselwegen veränderte Metabolite überrepräsentiert sind²⁹⁴. Im Rahmen dieser Arbeit werden Pathway Analysen mit Hilfe der Homepage „metabolanalyst.ca“ (Version: Metabolanalyst 6.0)²⁹⁵ erstellt. Hierfür werden die transformierten Daten in einem CSV-Format auf metaboanalyst.ca hochgeladen. Als Referenzmetabolom wird folgende Datenbank verwendet: „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ (KEGG). Für multiples Testen wird mittels Bonferroni-Holm korrigiert. Im Rahmen der Pathway Analysen wird zum einen untersucht, welche Metabolite signifikant verändert sind ($p < 0,05$). Zum anderen dient die Analyse auch dazu, eine Aussage darüber zu machen, ob die Metabolite einen signifikanten Einfluss auf den jeweiligen Stoffwechselweg haben ($\text{Impact} > 0,1$), was von ihrer Position innerhalb des Stoffwechselweges abhängt. Bei Nutzung der Plattform Metabolanalyst.ca wird die Frage nach signifikant veränderten Metaboliten mittels einer Regressionsanalyse unter Verwendung des sogenannten globalen F-Tests untersucht.

4. Ergebnisse

4.1. Deskriptive Statistik

Insgesamt werden für diese Arbeit 445 Serumproben von 263 Patientinnen und Patienten sowie Probandinnen und Probanden untersucht. 114 Patientinnen und Patienten wurden der Gruppe ischämischer Schlaganfall, 24 der Gruppe transitorisch ischämische Attacke, 13 der Gruppe Stroke Mimics und 112 der Gruppe gesunde Kontrolle zugeteilt. In der Gruppe der ischämischen Schlaganfälle wurden bei 114 Patientinnen und Patienten am Tag der Erkrankung, bei 114 Patientinnen und Patienten am darauffolgenden Tag und bei 32 Patientinnen und Patienten um den 90. Tag nach Erkrankung Blut abgenommen. Bei den Patientinnen und Patienten mit der Diagnose transitorisch ischämische Attacke wurden am Tag der Erkrankung bei 24 und am darauffolgenden Tag bei 23 Erkrankten Proben abgenommen. In der Gruppe der Stroke Mimics wurde bei allen 13 Patientinnen und Patienten sowohl am ersten als auch am darauffolgenden Tag Blutabnahmen durchgeführt. Bei den gesunden Kontrollprobandinnen und -probanden fand jeweils eine Blutentnahme statt.

Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die Verteilung bestimmter Faktoren innerhalb der untersuchten Gruppen, die einen Einfluss auf die Messung der Metabolite haben können, da sie Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen wie den ischämischen Schlaganfall bzw. die Konsequenz aus den Risikofaktoren darstellen. Es ergibt sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen beim Alter, Geschlecht, der arteriellen Hypertonie, der Hypercholesterinämie, dem Diabetes mellitus Typ 2, Nikotinkonsum, der koronaren Herzkrankheit, Z.n. transitorisch ischämischer Attacke, Z.n. Schlaganfall und Z.n. nach kardiovaskulärem Ereignis.

	Ischämischer Schlaganfall (260)	Transitorisch ischämische Attacke (47)	Stroke Mimic (26)	Gesunde Kontrollen (112)	p-Wert des Vergleichs der Gruppen
Demographische Charakteristika					
Alter, Median (IQR), Jahre	74 (13,9)	76 (16,1)	73,9 (13,7)	71,7 (14,6)	0,0436
Weiblich, %	42,7	72,3	61,5	52,7	0,0009
Vaskuläre Risikofaktoren					
Arterielle Hypertonie, %	73,5	66	61,5	52,7	0,0014
Hypercholesterinämie, %	32,7	48,9	30,8	25,9	0,0451
Diabetes mellitus Typ 2, %	18,1	23,4	7,7	4,5	0,0013
Nikotinkonsum, %	52,6	51,1	30,8	39,3	0,0323
Positive Familienanamnese, %	15	12,8	30,8	12,5	0,12
Koronare Herzkrankheit, %	14,6	4,3	0	6,3	0,0082
Z.n. Myokardinfarkt, %	7,3	8,5	7,7	3,6	0,53
Z.n. TIA, %	3,9	17	7,7	0,9	0,0002
Z.n. Schlaganfall, %	22,7	27,7	38,5	0,9	0,0001
Z.n. kardiovaskulärem Ereignis, %	26,9	53,2	46,2	6,3	<0,0001
BMI, Median (IQR), kg/m ²	25,8 (4,6)	25,7 (4,0)	28 (6,2)	25,3 (4,6)	0,30

Tabelle 1: Lage- und Streuungsparameter der metrischen Variablen sowie relative Verteilung der kategorialen Variablen für die Gruppen ischämischer Schlaganfall, transitorisch ischämische Attacke, Stroke Mimic und gesunde Kontrollen, p-Wert der Gruppenvergleiche der vier Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test bzw. Chi-Quadrat-Test.

In Tabelle 2 sieht man, dass die Differenzen Blutentnahme-Einfrieren, Blutentnahme-Zentrifugation und Zentrifugation-Einfrieren sowie die Variable potentielle Hämolyse einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen aufweisen. Des Weiteren lässt sich feststellen, dass sowohl bei der Variable potentielle Hämolyse als auch bei der venösen Blutentnahme der Anteil an hämolytischen Proben und Proben mit arterieller Blutentnahme sehr gering ist.

	Ischämischer Schlaganfall	Transitorisch ischämische Attacke	Stroke Mimic	Gesunde Kontrollen	p-Wert des Gruppenvergleichs
Metrische Variablen					
Differenz Blutentnahme-Einfrieren, Median (IQR), min	59 (12,3)	60 (13)	55 (5)	54,5 (10,3)	<0,0001
Differenz Blutentnahme-Zentrifugation, Median (IQR) min	41 (10)	43 (10,5)	39,5 (6,8)	38 (8)	<0,0001
Differenz Zentrifugation-Einfrieren, Median (IQR), min	17 (3)	17 (3)	15 (1)	16 (3)	0,0009
Kategoriale Variablen					
Potentielle Hämolyse, %	6,5	10,6	0	0	0,0080
Venöse Blutentnahme, %	97,3	100	100	100	0,17

Tabelle 2: : Lage- und Streuungsparameter der metrischen Differenzvariablen und relative Verteilung der kategorialen Variablen potentielle Hämolyse und venöse Blutentnahme, p-Wert der Gruppenvergleiche der vier Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test bzw. Chi-Quadrat-Test.

Nach der Datenaufbereitung im Sinne einer Reduktion von Ausreißern zeigt sich für die Differenz Blutentnahme-Einfrieren ein verbliebener Ausreißer für die Gruppe der Stroke Mimics (Abbildung 4).

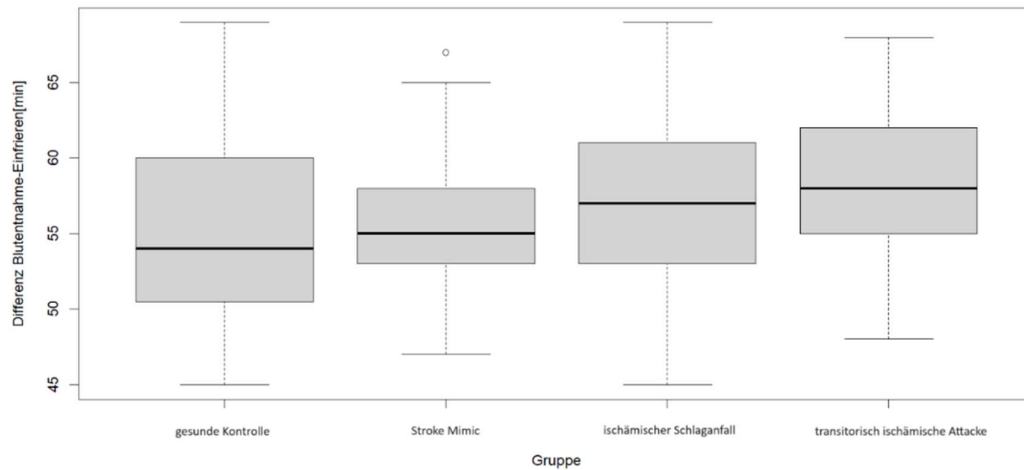


Abbildung 4: Boxplot für die Differenz Blutentnahme-Einfrieren nach Gruppenzugehörigkeit, mittlere Linie = Median der Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren, unteres Ende der Box = 1. Quartil, oberes Ende der Box = 3. Quartil, oberer „Whisker“ = Maximum, unterer „Whisker“ = Minimum, einzelne Punkte = Ausreißer.

Die Variable Differenz Blutentnahme-Zentrifugation enthält noch Ausreißer in den Gruppen gesunde Kontrollen, Stroke Mimics und ischämischer Schlaganfall (Abbildung 5).

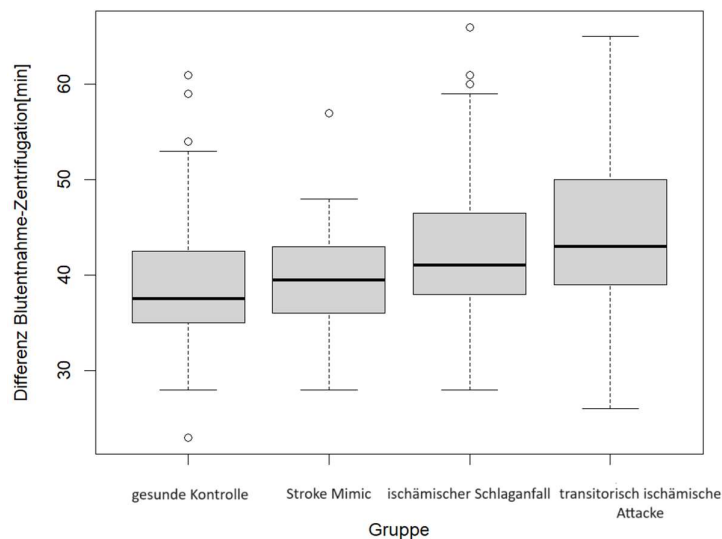


Abbildung 5: Boxplot für die Differenz Blutentnahme-Zentrifugation nach Gruppenzugehörigkeit, mittlere Linie = Median der Variable Differenz Blutentnahme-Zentrifugation, unteres Ende der Box = 1. Quartil, oberes Ende der Box = 3. Quartil, oberer „Whisker“ = Maximum, unterer „Whisker“ = Minimum, einzelne Punkte = Ausreißer.

In allen vier Gruppen ergeben sich weiterhin Ausreißer für die Differenz Zentrifugation-Einfrieren (Abbildung 6).

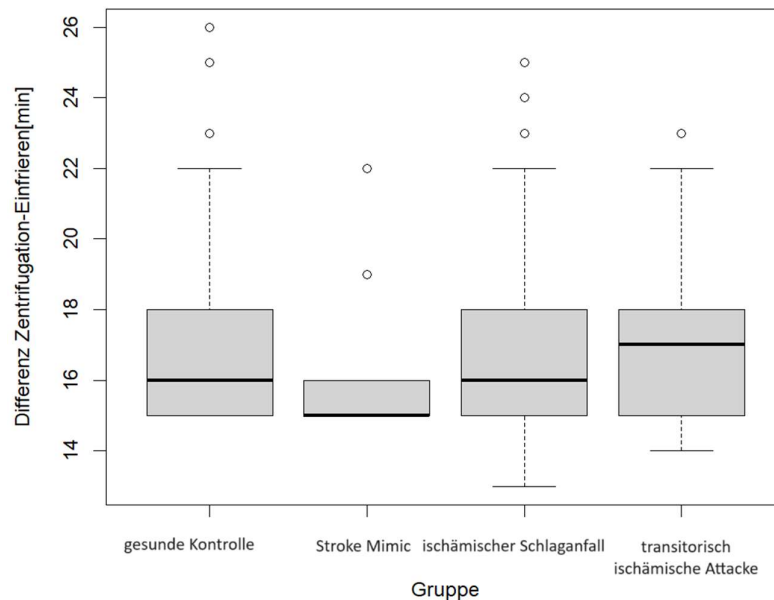


Abbildung 6: Boxplot für die Differenz Zentrifugation-Einfrieren nach Gruppenzugehörigkeit, mittlere Linie = Median der Variable Differenz Zentrifugation-Einfrieren, unteres Ende der Box = 1. Quartil, oberes Ende der Box = 3. Quartil, oberer „Whisker“ = Maximum, unterer „Whisker“ = Minimum, einzelne Punkte = Ausreißer.

Im letzten Schritt erfolgt die Darstellung der untersuchten Metabolite. Insgesamt wurden 314 Metabolite untersucht, die sich mehrheitlich in die folgenden acht Klassen aufteilen lassen: Aminosäuren, Kohlenhydrate, Kofaktoren und Vitamine, Energiemetabolite, Lipide, Nukleotide, Peptide, Xenobiotika. Abbildung 7 und Tabelle 3 zeigen die Verteilung der Metabolite innerhalb der Klassen sowie je drei Beispiele pro Klasse.

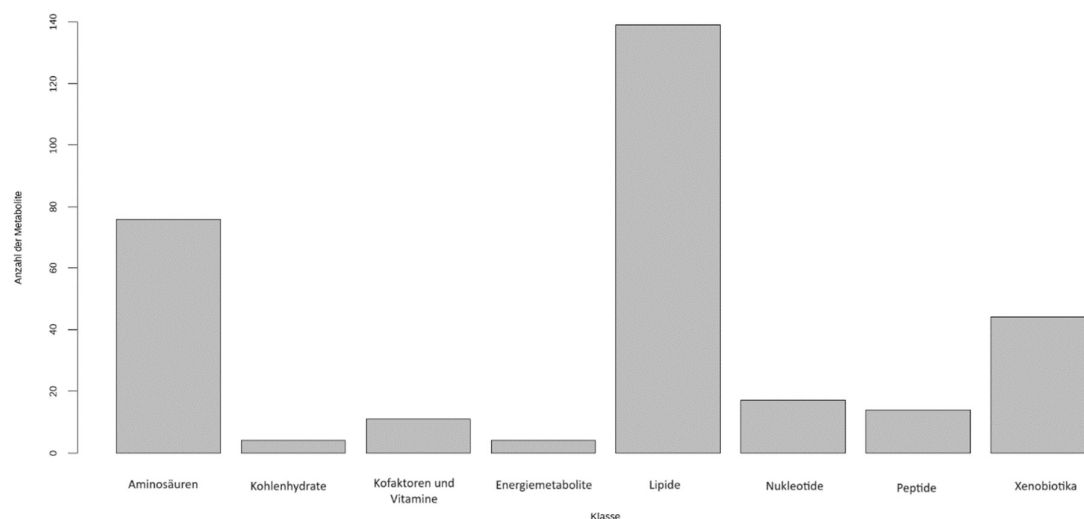


Abbildung 7: absolute Verteilung der Metabolite nach Klassenzugehörigkeit. X-Achse: Metabolitenklassen. Y-Achse: Anzahl der Metabolite.

Klassen der Metabolite	Metabolitenanzahl	Beispiele
Aminosäuren	76	Trigonellin (Nicotinsäure-N-methylbetain), Phenyllactat (PLA), N-Acetylmethionin
Kohlenhydrate	4	Sucrose, Pyruvat, Lactat
Kofaktoren und Vitamine	11	Gamma-CEHC, Biliverdin, Pantothenat
Energiemetabolite	4	Citrat, Succinat, Succinylcarnitin
Lipide	139	Glycochenodeoxycholat, Glycocholat, Glycoursodeoxycholat
Nukleotide	17	Guanosin, Inosin, Adenosin
Peptide	14	Gamma-Glutamylglutamin, Gamma-Glutamylisoleucin*, Gamma-Glutamylleucin
Xenobiotika	44	4-Vinylguaiacol Sulfat, N-(2-Furoyl)glycin, Koffein

Tabelle 3: absolute Verteilung der Metabolite je nach Klassenzugehörigkeit und Beispiele.

4.2. Analysen bzgl. der Zeit von der Blutentnahme bis zum Einfrieren

Im Rahmen der linearen Regressionsanalyse wird der Zusammenhang zwischen der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren und der abhängigen Variable Metabolit untersucht. Hierbei zeigen 85,0 % der Metabolite einen negativen, standardisierten Regressionskoeffizienten. 96,8% der Metabolite weisen ein signifikantes Ergebnis auf. Nach Korrektur für multiples Testen nach Step-up-Verfahren sind 100% der Metabolite signifikant.

Nachdem sich die Differenzvariablen nicht normalverteilt gezeigt haben, werden verschiedene Transformationen (log10-Transformation, log2-Transformation, Quadratwurzel-Transformation, Kubikwurzel-Transformation, Inversionsmethode) mit dem Ziel des Erreichens einer Normalverteilung getestet. Durch die Inversionsmethode wird das beste Ergebnis erzielt. Mit den so transformierten Daten werden erneut oben beschriebene Regressionsanalysen durchgeführt, wobei sich bei der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren 100 % der Metabolite signifikant nach Korrektur mittels Step-up-Verfahren zeigen. Damit kann kein wesentlicher Unterschied der Ergebnisse zwischen der Analyse mit und ohne Transformation der Variable Differenz erkannt werden.

Da kardiovaskuläre Risikofaktoren potentielle Störvariablen darstellen, wird die Regressionsanalyse im nächsten Schritt nach Alter, arterieller Hypertonie, Geschlecht, Diabetes mellitus Typ 2 und Nikotinkonsum adjustiert, wobei weiterhin 96,8% der Metabolite signifikant sind (100% nach Korrektur mit Step-up-Verfahren). Außerdem wird nach Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronarer Herzkrankheit adjustiert. Hierbei zeigen sich 97,5% der Metabolite signifikant (100% nach Step-up-Verfahren). Um einen möglichen Einfluss des Tages der Blutentnahme auf die Regressionsanalyse zu untersuchen, wird nach dem Tag der Blutentnahme (Tag 1, 2 und 90) adjustiert, wobei 89,2% der Metabolite signifikant bleiben (97,5% nach Korrektur mit Step-up-Verfahren).

Um zu prüfen, ob Zeitvariablen einen signifikanten Einfluss auf die Identifizierung von Metaboliten als Biomarker für Schlaganfälle haben, werden zunächst mit einem t-Test die Metabolite ermittelt, die signifikant zwischen den Gruppen der ischämischen Schlaganfallpatientinnen und -patienten und gesunden Kontrollen variieren. Anschließend wird für diese Metabolite eine Regressionsanalyse durchgeführt, die die Gruppenzugehörigkeit berücksichtigt und für die Differenz zwischen Blutentnahme und Einfrieren adjustiert. Nach dieser Anpassung bleiben 39,5 % der zuvor signifikanten Metabolite auch nach der Korrektur mit der Step-up-Verfahren signifikant.

Im nächsten Schritt werden mögliche Abweichungen der Differenz Blutentnahme-Einfrieren untersucht. Dabei werden zwei Gruppen gebildet für einen Gruppenvergleich mittels t-Test. Die eine Gruppe beinhaltet die Differenzen Blutentnahme-Einfrieren, die kleiner als 58min sind (211 Proben). Die zweite Gruppe wird mit den Differenzen Blutentnahme-Einfrieren gebildet, die größer gleich 58min betragen (156 Proben). Der Wert 58min entspricht dem

Median der Differenz Blutentnahme-Einfrieren. Im Gruppenvergleich zeigen 94,9 % der Metabolite einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, wobei nach Korrektur mit Step-up-Verfahren 100% der Metabolite signifikant sind.

Des Weiteren wird untersucht, ob sich die oben bereits erwähnten acht Klassen hinsichtlich der Anzahl der signifikanten Metabolite im Rahmen der Regressionsanalyse mit der Differenz Blutentnahme-Einfrieren unterscheiden. Im Vergleich der signifikanten Ergebnisse der Regressionsanalyse mit der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren innerhalb der Klassen zeigt der Fisher-Exakt-Test mit einem p-Wert von 0,019 einen signifikanten Unterschied innerhalb der Klassen. Hier zeigt die Klasse der Kofaktoren/Vitamine mit einem p-Wert von 0,007 einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den anderen Klassen. Graphisch ist ebenfalls sichtbar, dass in der Klasse Kofaktoren/Vitamine weniger signifikante Metabolite vorliegen im Vergleich zu den restlichen Klassen (Abbildung 8).

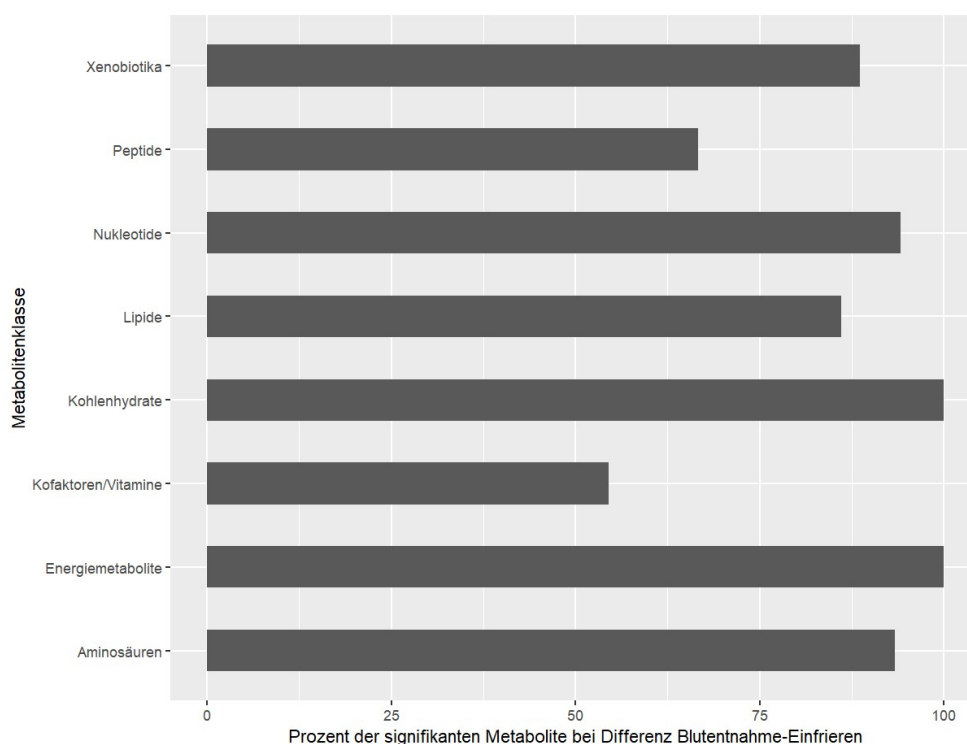


Abbildung 8: relative Verteilung der signifikanten Metabolite nach Klasse im Rahmen der Regressionsanalyse mit der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren.

Im nächsten Schritt werden Pathway Analysen für die Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren durchgeführt. Signifikante Ergebnisse mit hohem Impact zeigen hier vor allem

Stoffwechselwege in Bezug auf die Biosynthese, Degradation und den Metabolismus von Aminosäuren und der Koffeinmetabolismus (Abbildung 9). In einer getrennten Untersuchung der negativ und positiv assoziierten Metabolite ergibt sich für die negativ assoziierten Metabolite ein vergleichbares Ergebnis wie in der Untersuchung aller Metabolite. Dies ist durch das Vorhandensein von 85% negativ assoziierten Metaboliten zu erklären. Eine separate Untersuchung der positiv assoziierten Metabolite ergibt keinen Stoffwechselweg, der signifikant ist und einen Impact >0,1 besitzt. Dies kann an der geringen Anzahl an positiv assoziierten Metaboliten liegen.

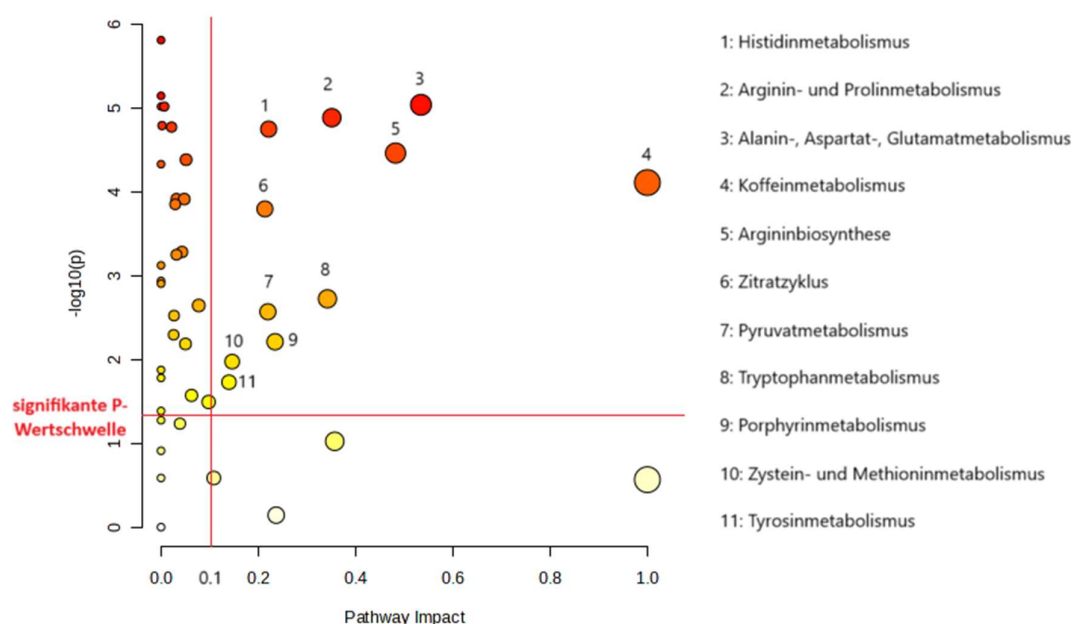


Abbildung 9: graphische Darstellung der Pathway Analyse mit der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren mittels Metaboanalyst.ca. X-Achse: Pathway Impact. Y-Achse: P-Wert mittels $-\log(p)$ der Regressionsanalyse. Jeder Kreis repräsentiert einen Stoffwechselweg. Die einzelnen Kreise sind farbkodiert je nach P-Wert und Impact. Je mehr Metabolite Teil dieses Stoffwechselweges sind, desto größer ist der jeweilige Kreis abgebildet. Eine Beschriftung besteht für alle signifikanten Stoffwechselwege mit ausreichend hohem Impact ($p < 0,05$ und Pathway Impact $> 0,1$).

4.3. Analysen bzgl. der Zeit von der Blutentnahme bis zur Zentrifugation

Aufgrund der hohen Anzahl an signifikanten Metaboliten in der Analyse für die Gesamtzeit von der Blutentnahme bis zum Einfrieren, sollen in den nächsten Schritten Zwischenzeiten gemessen werden, um zu explorieren, welche Schritte und Zeiten kritisch sind.

In der linearen Regressionsanalyse der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Zentrifugation zeigen 84,4 % der Metabolite einen negativen, standardisierten Regressionskoeffizienten. 91,7 % der Metabolite ergeben ein signifikantes Ergebnis, wobei 97,0 % der Metabolite nach Korrektur für multiples Testen mittels Step-up-Verfahren signifikant sind. Wie oben bereits beschrieben erfolgt im nächsten Schritt eine Transformation der Differenz mittels der Inversionsmethode. Die erneute Durchführung der Regressionsanalyse ergibt dabei, dass 99,7 % der Metabolite signifikant nach Korrektur mittels Step-up-Verfahren sind. Auch hier kann also kein wesentlicher Unterschied der Ergebnisse zwischen den Analyse mit und ohne Transformation der Variable Differenz erkannt werden.

Nach Adjustierung für die potentiellen Störvariablen Alter, arterielle Hypertonie, Geschlecht, Diabetes mellitus Typ 2 und Nikotinkonsum sind weiterhin 91,1% der Metabolite signifikant (98,7% nach Korrektur mittels Step-up-Verfahren). Adjustiert man für Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronarer Herzkrankheit verbleiben 95,9% der Metabolite signifikant (100% nach Korrektur mittels Step-up-Verfahren). Nach Adjustierung für den Tag der Blutentnahme verbleiben 80,9% der Metabolite signifikant (91,7% nach Korrektur mit Step-up-Verfahren).

In dieser Untersuchung wird ebenfalls geprüft, ob Zeitvariablen einen signifikanten Einfluss auf die Gruppenzugehörigkeit (ischämischer Schlaganfall oder gesunde Kontrollen) haben. Dabei werden die Metabolite identifiziert, die signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufweisen. In der Regressionsanalyse zur Gruppenzugehörigkeit bleibt nach der Adjustierung für die Differenz zwischen Blutentnahme und Zentrifugation noch ein Anteil von 76,3 % der zuvor signifikanten Metabolite signifikant, auch nach der Korrektur mit der Step-up-Verfahren. Das bedeutet, dass ein Großteil der Metabolite weiterhin signifikant ist.

Im nächsten Schritt werden mögliche Abweichungen der Differenz Blutentnahme-Zentrifugation untersucht. Dabei werden zwei Gruppen gebildet für einen Gruppenvergleich mittels t-Test. Die eine Gruppe beinhaltet die Differenzen Blutentnahme-Zentrifugation, die kleiner als 40min sind (200 Proben). Die zweite Gruppe wird mit den Differenzen Blutentnahme-Zentrifugation gebildet, die größer gleich 40min betragen (222 Proben). Der Wert der 40min entspricht dem Median für die Differenz Blutentnahme-Zentrifugation. Im Gruppenvergleich zeigen 72,0% der Metabolite einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, wobei nach Korrektur mit Step-up-Verfahren 20,7% der Metabolite signifikant sind.

Die Untersuchung der Unterschiede der signifikanten Ergebnisse der Regressionsanalyse mit der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Zentrifugation innerhalb der acht Metabolitenklassen ergibt keinen signifikanten Unterschied. Es kann ebenfalls graphisch dargestellt werden, dass die signifikanten Metabolite innerhalb der Klassen ähnlich verteilt sind (Abbildung 10).

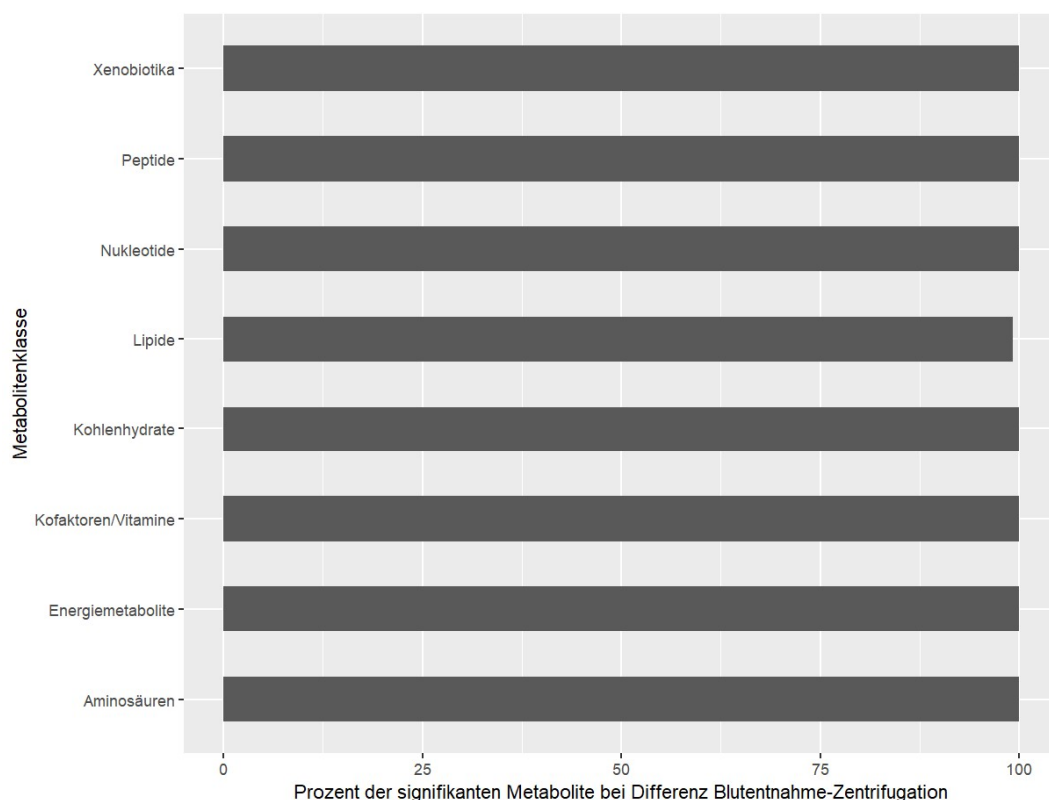


Abbildung 10: relative Verteilung der signifikanten Metabolite nach Klasse im Rahmen der Regressionsanalyse mit der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Zentrifugation.

Außerdem erfolgen auch für diese Differenzvariable Pathway Analysen, deren Ergebnisse in Abbildung 11 zu sehen sind. Signifikante Ergebnisse mit hohem Impact ergeben sich hier ebenfalls für Stoffwechselwege in Bezug auf die Biosynthese, Degradation und den Metabolismus von Aminosäuren und für den Koffeinmetabolismus. Untersucht man die negativ und positiv assoziierten Metabolite getrennt voneinander, zeigt sich hier für die negativ assoziierten Metabolite ebenfalls ein vergleichbares Ergebnis wie in der Untersuchung aller Metabolite. Einen Grund hierfür stellt das Vorhandensein sein von 84,4% negativ assoziierten Metaboliten dar. In der Analyse der positiv assoziierten Metabolite ergibt sich hier auch kein Stoffwechselweg,

der signifikant ist und einen Impact >0,1 besitzt. Dies kann durch die geringe Anzahl an positiv assoziierten Metaboliten erklärt werden.

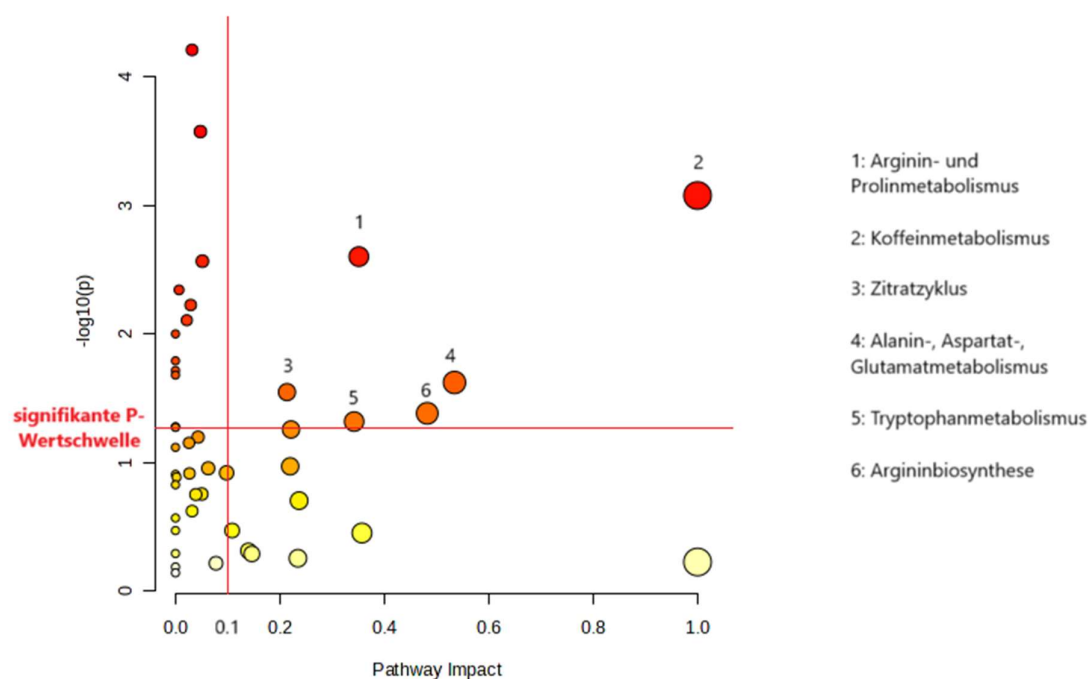


Abbildung 11: graphische Darstellung der Pathway Analyse mit der unabhängigen Variable Differenz Blutentnahme-Zentrifugation mittels Metaboanalyst.ca. X-Achse: Pathway Impact. Y-Achse: P-Wert mittels $-\log(p)$ der Regressionsanalyse. Jeder Kreis repräsentiert einen Stoffwechselweg. Die einzelnen Kreise sind farbkodiert je nach P-Wert und Impact. Je mehr Metabolite Teil dieses Stoffwechselweges sind, desto größer ist der jeweilige Kreis abgebildet. Eine Beschriftung besteht für alle signifikanten Stoffwechselwege mit ausreichend hohem Impact ($p < 0,05$ und Pathway Impact $> 0,1$).

4.4. Analysen bzgl. der Zeit von der Zentrifugation bis zum Einfrieren

In der linearen Regressionsanalyse mit der unabhängigen Variable Differenz Zentrifugation-Einfrieren haben 85,4 % der Metabolite einen negativen, standardisierten Regressionskoeffizienten. 98,7 % der Metabolite zeigen ein signifikantes Ergebnis mit weiterhin bestehendem signifikantem Ergebnis nach Korrektur mit Step-up-Verfahren bei 100 % der Metabolite. Nach Transformation der Differenz mittels der Inversionsmethode verbleiben nach Korrektur mit Step-up-Verfahren 100 % der Metabolite signifikant, sodass sich kein Unterschied der Ergebnisse zwischen der Analyse mit und ohne Transformation der Variable Differenz ergibt.

Adjustiert man nach den potentiellen Störvariablen Alter, arterielle Hypertonie, Geschlecht, Diabetes mellitus Typ 2 und Nikotinkonsum sind weiterhin 98,7% der Metabolite signifikant

(100% nach Korrektur mit Step-up-Verfahren). Nach Adjustierung für Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronarer Herzkrankheit verbleiben ebenfalls 98,7% der Metabolite signifikant (100% nach Korrektur mit Step-up-Verfahren). Nach Adjustierung für den Tag der Blutentnahme (Tag 1, 2 und 90) zeigen sich weiterhin 96,8% der Metabolite (100% nach Korrektur für Step-up-Verfahren) signifikant.

Zusätzlich wird untersucht, ob Zeitvariablen einen signifikanten Einfluss auf die Gruppenzugehörigkeit (ischämischer Schlaganfall oder gesunde Kontrollen) haben. Dabei werden die Metabolite identifiziert, die signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufweisen. In der Regressionsanalyse zur Gruppenzugehörigkeit bleiben nach der Adjustierung für die Differenz zwischen Zentrifugation und Einfrieren 100 % der zuvor signifikanten Metabolite auch nach der Korrektur mit Step-up-Verfahren signifikant.

Im nächsten Schritt werden mögliche Abweichungen der Differenz Zentrifugation-Einfrieren untersucht. Dabei werden zwei Gruppen gebildet für einen Gruppenvergleich mittels t-Test. Die eine Gruppe beinhaltet die Differenzen Zentrifugation-Einfrieren, die kleiner als 16min sind (126 Proben). Die zweite Gruppe wird mit den Differenzen Blutentnahme-Zentrifugation gebildet, die größer gleich 16min betragen (297 Proben). Im Gruppenvergleich zeigen 99,1% der Metabolite einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, wobei nach Korrektur mit Step-up-Verfahren 100% der Metabolite signifikant sind.

Die Untersuchung der Unterschiede der signifikanten Ergebnisse der Regressionsanalyse mit der unabhängigen Variable Differenz Zentrifugation-Einfrieren innerhalb der Klassen ergibt ebenfalls einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,0040, wobei sich hier die Klasse der Kofaktoren/Vitamine mit einem p-Wert von 0,0054 im Vergleich zu den anderen Klassen signifikant unterscheidet. Es kann ebenfalls graphisch dargestellt werden, dass die Klasse der Kofaktoren/Vitamine deutlich weniger signifikante Metabolite beinhaltet (Abbildung 12).

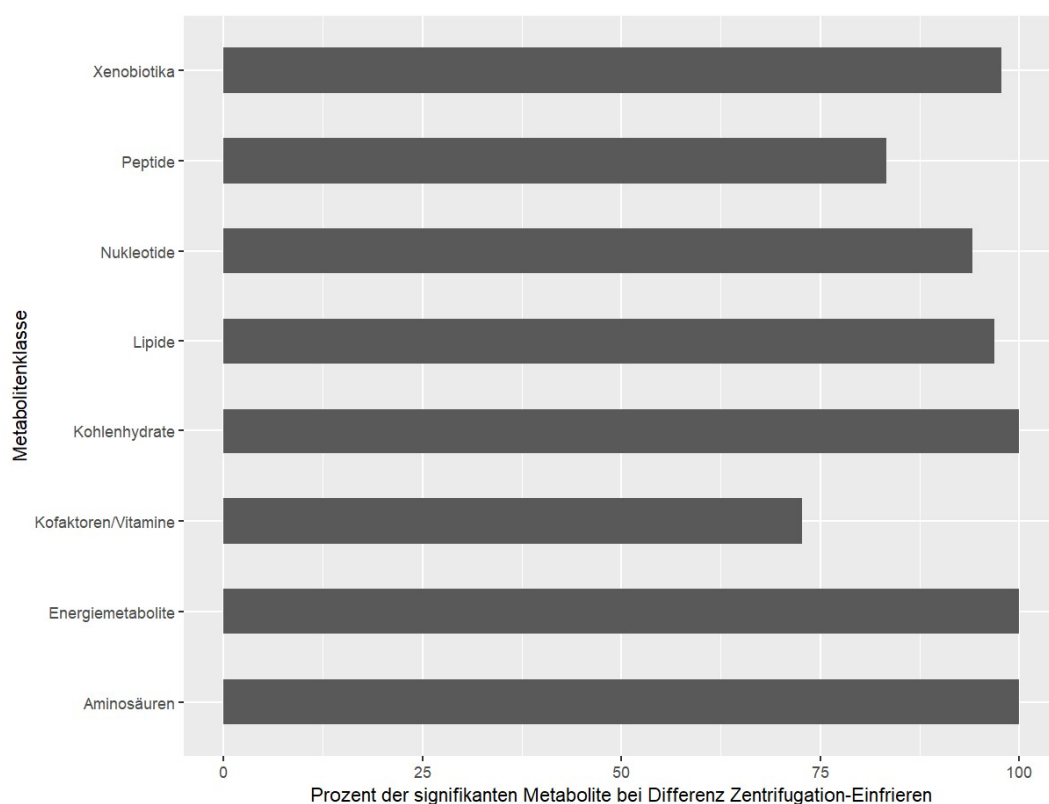


Abbildung 12: relative Verteilung der signifikanten Metabolite nach Klasse im Rahmen der Regressionsanalyse mit der unabhängigen Variable Differenz Zentrifugation-Einfrieren.

Des Weiteren werden auch für die Differenz Zentrifugation-Einfrieren Pathway Analysen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 13 zu sehen sind. Signifikante Ergebnisse mit hohem Impact ergeben sich hier ebenfalls hauptsächlich für Stoffwechselwege in Bezug auf die Biosynthese, Degradation und den Metabolismus von Aminosäuren. Vereinzelt können signifikante Ergebnisse bezüglich des Metabolismus von Lipiden sowie des Koffeinmetabolismus dargestellt werden. Analysiert man die negativ und positiv assoziierten Metabolite separat, ergeben sich für die negativ assoziierten Metabolite auch hier vergleichbare Ergebnisse wie in der Analyse über das gesamte vorhandene Metabolom. Dies lässt sich durch die hohe Anzahl an negativ assoziierten Metaboliten (85,4%) erklären. In der Untersuchung der positiv assoziierten Metabolite ergibt sich hier ebenfalls kein Stoffwechselweg, der signifikant ist und einen Impact $>0,1$ besitzt. Dies liegt an der geringen Anzahl an positiv assoziierten Metaboliten.

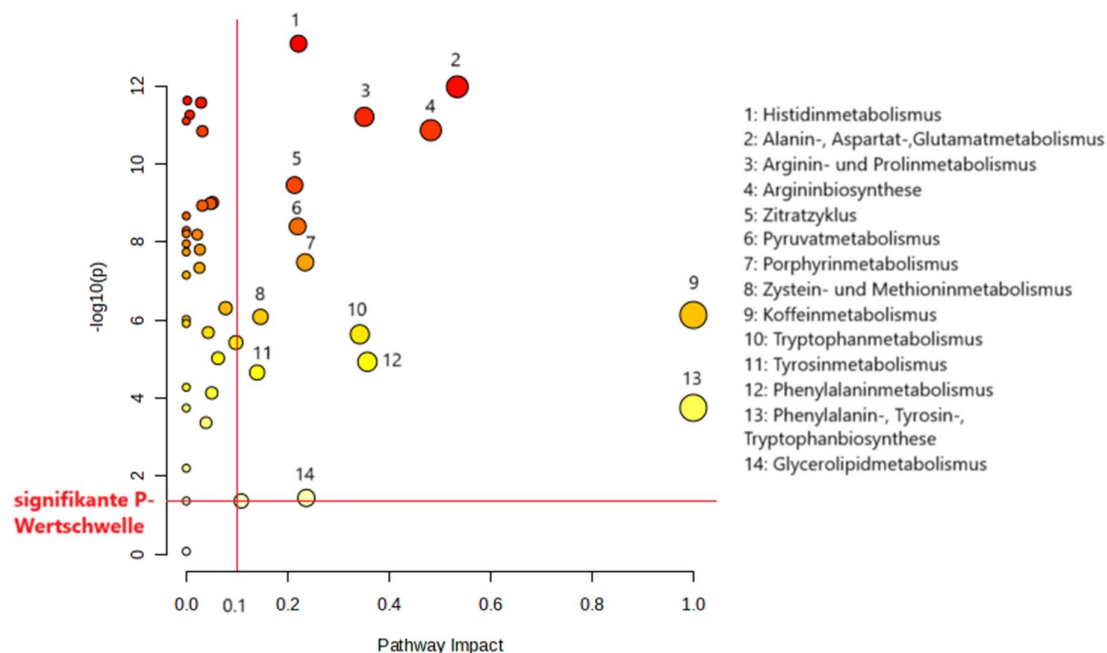


Abbildung 13: graphische Darstellung der Pathway Analyse mit der unabhängigen Variable Differenz Zentrifugation-Einfrieren mittels Metaboanalyst.ca. X-Achse: Pathway Impact. Y-Achse: P-Wert mittels $-\log(p)$ der Regressionsanalyse. Jeder Kreis repräsentiert einen Stoffwechselweg. Die einzelnen Kreise sind farbkodiert je nach P-Wert und Impact. Je mehr Metabolite Teil dieses Stoffwechselweges sind, desto größer ist der jeweilige Kreis abgebildet. Eine Beschriftung besteht für alle signifikanten Stoffwechselwege mit ausreichend hohem Impact ($p < 0,05$ und Pathway Impact $> 0,1$).

4.5. Analysen bzgl. einer potentiellen Hämolyse

Im Rahmen der Regressionsanalyse bezüglich der Gefahr für eine potentielle Hämolyse der untersuchten Proben ergibt sich bei 76,1 % der Metabolite ein positiver, standardisierter Regressionskoeffizient. Signifikante Ergebnisse können jedoch nur bei 1,0 % der Metabolite festgestellt werden, wobei nach Korrektur mit Step-up-Verfahren nur noch 0,3 % der Metabolite signifikant bleiben. Nach Adjustierung für die potentiellen Störvariablen Alter, arterielle Hypertonie, Geschlecht, Diabetes mellitus Typ 2 und Nikotinkonsum zeigen sich 1,3% der Metabolite signifikant (0,3% nach Korrektur mit Step-up-Verfahren). Adjustiert nach Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronare Herzkrankheit verbleiben 1,0% der Metabolite signifikant (0,3% nach Korrektur mit Step-up-Verfahren). Nach Adjustierung für den Tag der Blutentnahme zeigen sich 0,6% der Metabolite signifikant (nach Korrektur mit Step-up-Verfahren 0,3% der Metabolite).

Die Untersuchung der Unterschiede der signifikanten Ergebnisse der Regressionsanalyse bezüglich einer potentiellen Hämolyse innerhalb der Klassen wird aufgrund der sehr geringen Anzahl an signifikanten Metaboliten nicht durchgeführt.

Des Weiteren werden auch hier Pathway Analysen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 14 zu sehen sind. Ebenso wie bei der zuvor durchgeführten Regressionsanalyse ergeben sich nur wenige signifikante Stoffwechselwege. Signifikante Ergebnisse mit hohem Impact zeigen sich hier lediglich für den Zystein- und Methionin-Metabolismus sowie für den Porphyrinmetabolismus.

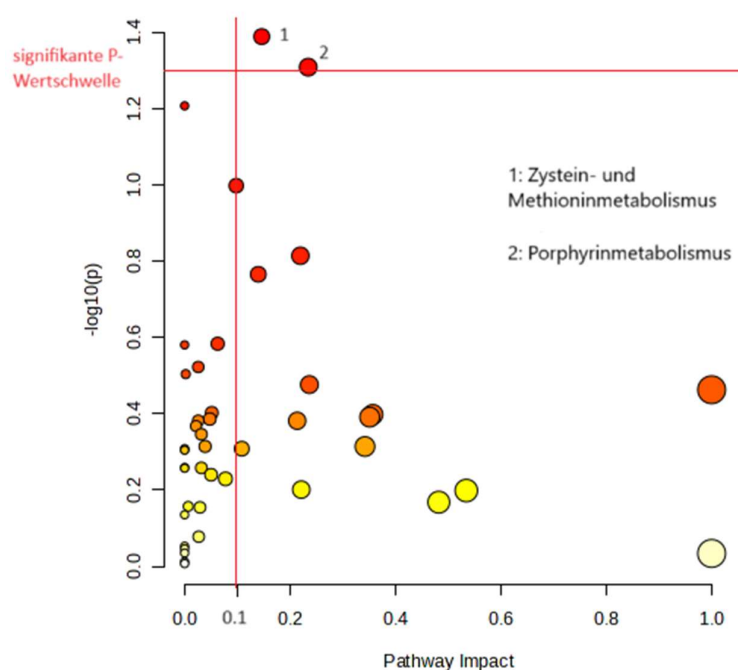


Abbildung 14: graphische Darstellung der Pathway Analyse mit der unabhängigen Variable Gefahr für potentielle Hämolyse mittels Metaboanalyst.ca. X-Achse: Pathway Impact. Y-Achse: P-Wert mittels $-\log(p)$ der Regressionsanalyse. Jeder Kreis repräsentiert einen Stoffwechselweg. Die einzelnen Kreise sind farbkodiert je nach P-Wert und Impact. Je mehr Metabolite Teil dieses Stoffwechselweges sind, desto größer ist der jeweilige Kreis abgebildet. Eine Beschriftung besteht für alle signifikanten Stoffwechselwege mit ausreichend hohem Impact ($p < 0,05$ und Pathway Impact $> 0,1$).

4.6. Analysen bzgl. der venösen Blutentnahme

Im Rahmen der linearen Regressionsanalyse bezüglich des Einflusses einer venösen versus arteriellen Blutentnahme auf die Messung der Metaboliten zeigen 63,4% einen negativen, standardisierten Regressionskoeffizienten. Für 2,9% der Metabolite ergibt sich ein signifikantes

Ergebnis, wobei nach Korrektur mit Step-up-Verfahren 0% der Metabolite signifikant verbleiben. Nach Adjustierung für die potentiellen Störvariablen Alter, arterielle Hypertonie, Geschlecht, Diabetes mellitus Typ 2 und Nikotinkonsum sowie Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronarer Herzkrankheit sind 3,2% der Metabolite signifikant (nach Korrektur mit Step-up-Verfahren 0%). Adjustiert man die durchgeführte Regressionsanalyse für den Tag der Blutentnahme verbleiben 0,6% der Metabolite signifikant (nach Korrektur mittels Step-up-Verfahren 0%).

Die Untersuchung der Unterschiede der signifikanten Ergebnisse der Regressionsanalyse bezüglich der venösen versus arteriellen Blutentnahme innerhalb der Klassen ist nicht möglich, da 0% der Metabolite nach Korrektur für multiples Testen signifikant verblieben.

Im Rahmen der Pathway Analysen hierfür ergeben sich passend zum Ergebnis der zuvor durchgeführten Regressionsanalyse keine signifikanten Stoffwechselwege (Abbildung 15).

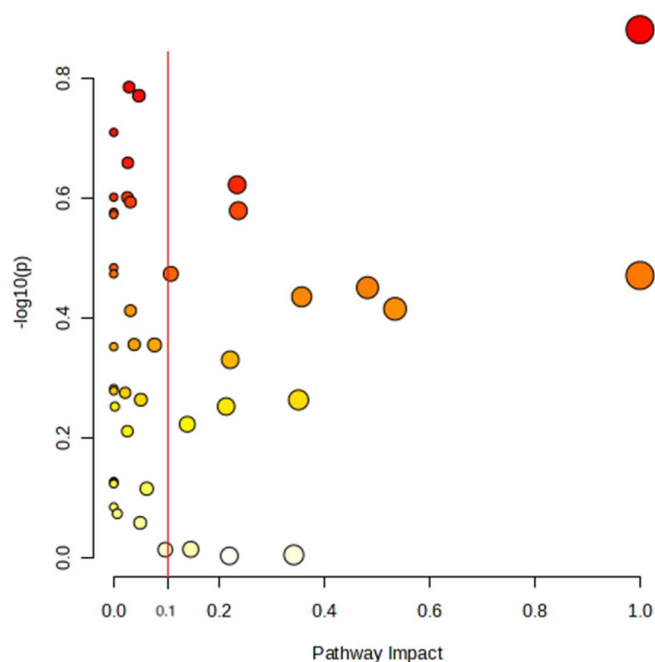


Abbildung 15: graphische Darstellung der Pathway Analyse mit der unabhängigen Variable venöse Blutentnahme mittels Metaboanalyst.ca. X-Achse: Pathway Impact. Y-Achse: P-Wert mittels $-\log(p)$ der Regressionsanalyse. Jeder Kreis repräsentiert einen Stoffwechselweg. Die einzelnen Kreise sind farbkodiert je nach P-Wert und Impact. Je mehr Metabolite Teil dieses Stoffwechselweges sind, desto größer ist der jeweilige Kreis abgebildet. Eine Beschriftung besteht für alle signifikanten Stoffwechselwege mit ausreichend hohem Impact ($p < 0,05$ und Pathway Impact $> 0,1$).

4.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

	Relativer Anteil der abhängigen Variable Metabolit mit $p < 0,05$	Relativer Anteil der abhängigen Variable Metabolit mit $p < 0,05$ nach Korrektur mit Step-up-Verfahren
Differenz Blutentnahme-Einfrieren		
Unadjustiert	96,8%	100%
Adjustiert nach kardiovaskulären Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, art. Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, Nikotinkonsum)	96,8%	100%
Adjustiert nach Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronarer Herzkrankheit	97,5%	100%
Adjustiert nach Tag der Blutentnahme	89,2%	97,5%
Differenz Blutentnahme-Zentrifugation		
Unadjustiert	91,7%	97,0%
Adjustiert nach kardiovaskulären Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, art. Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, Nikotinkonsum)	91,1%	98,7%
Adjustiert nach Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronarer Herzkrankheit	95,9%	100%
Adjustiert nach Tag der Blutentnahme	80,9%	91,7%
Differenz Zentrifugation-Einfrieren		
Unadjustiert	98,7%	100%
Adjustiert nach kardiovaskulären Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, art. Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, Nikotinkonsum)	98,7%	100%
Adjustiert nach Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronarer Herzkrankheit	98,7%	100%
Adjustiert nach Tag der Blutentnahme	96,8%	100%
Potentielle Hämolyse		
Unadjustiert	1,0%	0,3%
Adjustiert nach kardiovaskulären Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, art. Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, Nikotinkonsum)	1,3%	0,3%
Adjustiert nach Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronarer Herzkrankheit	1,0%	0,3%
Adjustiert nach Tag der Blutentnahme	0,6%	0,3%
Venöse Blutentnahme		
Unadjustiert	2,9%	0%
Adjustiert nach kardiovaskulären Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, art. Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, Nikotinkonsum)	3,2%	0%
Adjustiert nach Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronarer Herzkrankheit	3,2%	0%
Adjustiert nach Tag der Blutentnahme	0,6%	0%

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Regressionsanalysen bezüglich des Einflusses von präanalytischen Prozessen auf die Konzentrationen der Metabolite.

Zusammenfassend zeigen sich in den Regressionsanalysen bezüglich der Differenzen über 90% der Metabolite signifikant, wobei hier die Zeit von der Blutentnahme bis zur Zentrifugation, die Zeit von der Zentrifugation bis zum Einfrieren sowie die Zeit von der Blutentnahme bis zum Einfrieren untersucht wird. Diese Ergebnisse werden nicht beeinflusst durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, Z.n. kardiovaskulären Ereignissen oder den Tag der Blutentnahme. Ein Einfluss

der Faktoren potentielle Hämolyse oder die Art der Blutentnahme (venös oder arteriell) kann nur bei einem sehr geringen bzw. keinem Anteil der Metabolite festgestellt werden, wobei auch hier die oben genannten potentiellen Störvariablen keinen Einfluss zu haben scheinen (siehe Tabelle 4). Die Tatsache, dass nach Adjustierung teilweise mehr signifikante Metabolite nachzuweisen sind, kann durch den sogenannten Suppressionseffekt erklärt werden²⁹⁶.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss präanalytischer Prozesse auf das zirkulierende Metabolom mittels Regressionsanalysen untersucht. Dabei ließ sich ein in der Masse der Fälle negativer, signifikanter Zusammenhang zwischen den zeitlichen Abläufen und den Konzentrationen eines Großteils der Metabolite nachweisen. Dieser Effekt war unabhängig von potentiellen Störvariablen (Alter, arterielle Hypertonie, Geschlecht, Diabetes mellitus Typ 2, Nikotinkonsum, Z.n. kardiovaskulärem Ereignis und koronare Herzkrankheit). Auch der Tag der Blutentnahme scheint keinen Einfluss auf die durchgeführten Regressionsanalysen zu haben. Die Ergebnisse decken sich mit einigen bereits durchgeführten Studien bezüglich des Einflusses von präanalytischen Abweichungen im Rahmen von Metabolomikstudien. Hierbei konnte vor allem gezeigt werden, dass zeitliche Verzögerungen sowie eine Exposition gegenüber Raumtemperatur einen signifikanten Einfluss auf die quantitative Messung von vielen Metaboliten haben^{261, 272, 273}. Die in dieser Arbeit untersuchten zeitlichen Verzögerungen gingen automatisch mit einer längeren Exposition gegenüber Raumtemperatur einher, da die Proben sowohl zwischen der Blutentnahme und der Zentrifugation als auch im Zeitraum von der Zentrifugation bis zum Einfrieren Raumtemperatur ausgesetzt waren. Einige Studien kamen zu dem Schluss, dass sowohl zeitliche Verzögerungen vor als auch zeitliche Verzögerungen nach der Zentrifugation die gemessenen Konzentrationen der Metabolite beeinflussen können, was im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Dabei scheinen laut einiger Studien zeitliche Verzögerungen bei Raumtemperatur mehr Einfluss zu haben als bei 0-4 °C^{256, 264, 272-274, 277}.

Um die Richtung des festgestellten Zusammenhanges zu quantifizieren, wurde der standardisierte Regressionskoeffizient berechnet. Bei einem Großteil der untersuchten Metabolite zeigte sich im Rahmen dieser Studie ein negativer Zusammenhang mit den Differenzvariablen Blutentnahme-Einfrieren, Blutentnahme-Zentrifugation und Zentrifugation-Einfrieren. Eine Verzögerung in der Probenverarbeitung mit einer damit einhergehenden Erhöhung der jeweiligen Differenzen kann also zu einer Erniedrigung der Werte eines Großteils der Metabolite führen. Ebenso können kürzere Differenzen zu höheren Werten eines Großteils der Metabolite führen. In der Vergangenheit durchgeführte Studien kamen bezüglich dieser Fragestellung zu unterschiedlichen Ergebnissen. Löfgren et al. konnten im Jahr 2018 einen Abfall des Metaboliten Adenosin mit zunehmender zeitlicher Verzögerung in der Probenverarbeitung

erkennen. In einer Analyse von Plasmaproben konnten signifikante Veränderungen der Metabolite mit zunehmender Prozessierungszeit gezeigt werden, wobei 4-19% der Metabolite einen signifikanten Anstieg und 8-12% der Metabolite eine signifikante Reduktion zeigten²⁶⁸. Weitere Studien ergaben ebenfalls sowohl einen Anstieg als auch einen Abfall von Metabolitenkonzentrationen durch zeitliche Verzögerungen^{277, 297}.

Zur Untersuchung, ob die Differenzvariablen einen Einfluss auf die Gruppenzugehörigkeit (ischämischer Schlaganfall oder gesunde Kontrolle) haben, wurden weitere Regressionsanalysen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Metabolite in der Regressionsanalyse bezüglich der Gruppenzugehörigkeit weiterhin signifikant sind, nachdem für die Differenzen Blutentnahme-Zentrifugation und Zentrifugation-Einfrieren adjustiert wurde. Nach Adjustierung für die Differenz Blutentnahme-Einfrieren verblieben jedoch weniger als die Hälfte der Metabolite signifikant bezüglich der Gruppenzugehörigkeit. Hier kann ein Einfluss also nicht sicher ausgeschlossen werden. Die zeitlichen Verzögerungen Differenz Blutentnahme-Zentrifugation und Differenz Zentrifugation-Einfrieren scheinen also keinen signifikanten Einfluss auf die Identifizierung von Metaboliten als Biomarker für den Schlaganfall haben.

Um eine Vereinheitlichung von Protokollen zu erreichen, wurde mittels einem Gruppenvergleich untersucht, welche Abweichungen der jeweiligen Differenz sich signifikant auf einen Großteil der Metabolite auswirkt. Für die Differenz Blutentnahme-Einfrieren sollte entsprechend der oben beschriebenen Ergebnisse eine Zeitdauer von kleiner 58min angestrebt werden. Die Zeit zwischen Zentrifugation und Einfrieren sollte kleiner als 16min sein. Bezüglich der Zeitdauer zwischen Blutentnahme und Zentrifugation konnte der in dieser Arbeit gewählte Median als Anhaltspunkte (40min) nach Korrektur für multiples Testen nur bei einem geringen Anteil der Metabolite ein signifikantes Ergebnis erzielen, sodass hier weitere Untersuchungen nötig sind.

Im nächsten Schritt beschäftigte sich diese Arbeit mit der Fragestellung, in welchen Klassen von Metaboliten die Zeitvariablen besonders signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen der Metabolite haben. Verglichen wurden im Rahmen dieser Analyse wie oben bereits beschrieben die Klassen Aminosäuren, Lipide, Kohlenhydrate, Kofaktoren/Vitamine, Energiemetabolite, Nukleotide, Peptide und Xenobiotika. Hier zeigten sich Metabolite, die der Klasse Kofaktoren/Vitamine angehören, stabiler gegenüber zeitlichen Verzögerungen im Vergleich

zu den restlichen Klasse, wobei diese Ergebnisse sowohl für die Variable Differenz Blutentnahme-Einfrieren als auch für die Variable Differenz Zentrifugation-Einfrieren beobachtet werden konnten. Für Lipide konnte bereits gezeigt werden, dass zeitliche Verzögerungen zu einem signifikanten Abfall der Konzentrationen führen, was durch Oxidationsreaktionen erklärt wird²⁷³. Ebenfalls scheinen zeitliche Verzögerungen einen Einfluss auf die Messungen von Aminosäuren zu haben, was durch Degradierungsprozesse erklärbar scheint^{277, 297, 298}. Auch Zwischenprodukte des Energiestoffwechsels scheinen signifikant von zeitlichen Verzögerungen beeinflusst zu werden^{277, 299}. In Serumproben kann es durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade ex vivo zu einer Veränderung von Kohlenhydraten²⁵⁸, Aminosäuren und Lipiden kommen²⁷⁶, was durch eine zeitliche Verzögerung in der Probenverarbeitung verstärkt werden könnte. Auch Nukleotide zeigen Veränderungen bei zeitlichen Verzögerungen und bei Exposition gegenüber Raumtemperatur²⁷⁷. Wang et al. konnten im Jahr 2018 zeigen, dass Nukleotide, Energiemetabolite, Kohlenhydrate sowie Peptide besonders von zeitlichen Verzögerungen beeinflusst werden³⁰⁰. Im Rahmen all dieser Studien scheinen wie in dieser Arbeit die Kofaktoren und Vitamine nicht herauszusteichen, was den Einfluss von zeitlichen Verzögerungen angeht. Es kann also nach aktuellem Stand und hinsichtlich der Ergebnisse dieser Arbeit davon ausgegangen werden, dass Kofaktoren und Vitamine im Vergleich zu den anderen Gruppen stabiler gegenüber zeitlichen Verzögerungen sind.

Das Ziel der Pathway Analysen, die im nächsten Schritt durchgeführt wurden, ist es, Rückschlüsse auf biologische Prozesse ziehen zu können. Hierfür wurde untersucht, welche Metabolite signifikant verändert sind und ob sie einen signifikanten Einfluss auf den jeweiligen Stoffwechselweg haben. Hierbei zeigten für die Zeitvariablen vor allem die Biosynthese, der Metabolismus und die Degradation von Aminosäuren signifikante Ergebnisse mit hohem Impact auf den jeweiligen Stoffwechselweg, was die These aus oben berichteten Studien bestätigt, dass Metabolite des Aminosäurestoffwechsels signifikant durch zeitliche Verzögerungen beeinflusst werden. Des Weiteren konnte ein hoher Impact der Zeitvariablen auf den Zitratzyklus gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind kongruent zu den Ergebnissen von Hirayama et al.. Sie konnten zeigen, dass vor allem Metabolite aus primären Stoffwechselwegen (Glykolyse, Zitratzyklus, Nukleotidsynthese) und der Synthese oder Degradation von Aminosäuren (Arginin, Prolin, Methionin, Glycin, Serin, Threonin) von zeitlichen Verzögerungen betroffen sind²⁹⁷. Wie oben bereits beschrieben scheinen Vorgänge wie die Glykolyse der Erythrozyten sowie die Synthese oder Degradation von Aminosäuren innerhalb der Blutproben

ausschlaggebend für die Veränderungen zu sein. Ebenfalls signifikante Ergebnisse mit hohem Impact bezüglich der Differenzen wies der Koffeinmetabolismus auf, was in bisherigen Studien nicht nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass zeitliche Verzögerungen im Rahmen der Untersuchung von metabolomischen Daten eine wichtige Rolle spielen und bei der Interpretation der Ergebnisse mit einbezogen werden sollten. Insbesondere bei Metabolomikstudien, die meist multizentrisch und groß angelegt sind, sollte es ein wichtiges Ziel sein, vergleichbare Daten zu generieren. Präanalytische diagnostische Fehler sind ein häufiges Problem innerhalb von klinischen Studien, da einheitliche Protokolle oftmals fehlen³⁰¹. Es gibt bereits Ansätze zur Festlegung eines einheitlichen Protokolls im Rahmen von Metabolomikstudien^{299, 302}. Vorschläge bezüglich Protokollanpassungen wurden auch im Rahmen dieser Arbeit gemacht. Um diese Protokolle festlegen zu können und eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erreichen, sind weitere Studien nötig, auch um das genaue Ausmaß des Einflusses von zeitlichen Verzögerungen herauszufiltern. Aktuellere Studien fokussieren sich eher darauf, Tests zu entwickeln, die im Nachhinein eine Aussage treffen können, ob Proben möglicherweise Abweichungen im Rahmen der Verarbeitung ausgesetzt waren^{303, 304}. Auch hierfür benötigt es aber zunächst Untersuchungen, die Aufschluss darüber geben, inwiefern und in welchem Ausmaß es z. B. durch zeitliche Verzögerungen zu Veränderungen der Metabolitenkonzentrationen kommt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem der Einfluss einer potentiellen Hämolyse untersucht. Hierbei zeigten sowohl die Regressionsanalysen nur bei einem sehr geringen Anteil der Metabolite einen signifikanten Einfluss dieser unabhängigen Variable auf die Konzentrationen der Metabolite als auch die Pathway Analyse ergab einen geringen Anteil signifikanter Ergebnisse. Dies entspricht nicht den Ergebnissen aus anderen bereits veröffentlichten Studien. Dort konnte gezeigt werden, dass eine Hämolyse innerhalb der Blutproben mit einer hohen Variabilität bezüglich der Messungen der Metabolite einhergeht²⁶¹ und die Konzentrationen der Metabolite beeinflusst^{261, 268, 269}. Allerdings wurden im Rahmen dieser Studien nur Plasmaproben untersucht und keine Serumproben. Nichtsdestotrotz würde man für Serumproben ähnliche Ergebnisse erwarten, was im Rahmen dieser Arbeit nicht der Fall war. Dass sich die Ergebnisse dieser Arbeit nicht mit denen aus vorhergehenden Studien decken, kann an einer sehr geringen Probenanzahl mit einer potentiellen Hämolyse (6,5% in der Gruppe

ischämischer Schlaganfall, 10,6% in der Gruppe transitorisch ischämische Attacke, jeweils 0% in den Gruppen Stroke Mimic und gesunde Kontrollen) liegen. Dadurch kann es im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Regressionsanalysen und Pathway Analysen zu einer Unterschätzung des potentiellen Zusammenhanges und damit einhergehenden Einflusses gekommen sein. Dementsprechend sollte man alleine aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit nicht zum dem Schluss kommen, dass eine Hämolyse innerhalb der Blutproben keinen Einfluss auf die Messungen der Metabolite haben kann. Der Schluss, der hinsichtlich dieses Aspektes aus dieser Arbeit gezogen werden kann, ist die Notwendigkeit weiterer Studien zur Untersuchung dieser Fragestellung mit einer höheren Anzahl hämolytischer Proben.

Als letzter potentieller Einflussfaktor im Rahmen der Probenverarbeitung auf die Konzentrationen der Metabolite wurde in dieser Arbeit die unabhängige Variable venöse Blutentnahme untersucht. Hier konnte im Rahmen der Regressionsanalyse und der Pathway Analyse nach Korrektur für multiples Testen kein signifikantes Ergebnis dargestellt werden. Jedoch muss auch hier betont werden, dass in den untersuchten Daten nur eine sehr geringe Probenanzahl mit einer Abnahme aus einem arteriellen Zugang (2,7% in der Gruppe ischämischer Schlaganfall, jeweils 0% in den Gruppen transitorisch ischämische Attacke, Stroke Mimic und gesunde Kontrollen) vorhanden war. Die allermeisten Proben wurden venös gewonnen. Dementsprechend scheint es auch hier möglich zu sein, dass der potentielle Zusammenhang im Rahmen dieser Arbeit unterschätzt wurde. Weitere Studien mit einer größeren Fallzahl und mehr arteriellen Blutentnahmen wären nötig, um diese Fragestellung akkurat beantworten zu können. Dies wäre von besonderem Interesse, da der Einfluss einer venösen im Gegensatz zu einer arteriellen Blutentnahme im Rahmen von Metabolomikstudien bisher nicht untersucht wurde.

Zusammenfassend konnte mittels dieser Arbeit gezeigt werden, dass zeitliche Verzögerungen innerhalb der Probenverarbeitung einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration vieler Metabolite haben kann, wobei der Zusammenhang größtenteils negativ gerichtet war. Aus diesem Grund sollte diese präanalytische Abweichung in die Interpretation metabolomischer Daten mit einbezogen werden. Um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien und über die Zeit hinweg zu erreichen, sollten in Zukunft einheitliche Protokolle für Metabolomikstudien bezüglich der Probenverarbeitung entwickelt werden. Der potentielle Einfluss hämolytischer Proben und der Art der Probenentnahme (venös oder arteriell) auf metabolomische

Proben konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der oben erwähnten Limitationen nicht ausreichend geklärt werden. Hierfür sind zukünftig weitere Studien nötig. Insbesondere im Forschungsgebiet der Metabolomik ist es von großer Bedeutung, eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien herzustellen, um Fortschritte erzielen zu können³⁰⁵. Die Entwicklung von Biobanken, die als Grundlage für Studien mit hohem Durchsatz dienen sollen, erfordert die Entwicklung groß angelegter Strategien zur kurz- und langfristigen Überwachung der Probenqualität²⁷⁹. Der erste Schritt hierfür ist potentielle Qualitätsmängel zu identifizieren und Strategien zu entwickeln diese zu verhindern. Diesbezüglich einen Beitrag zu leisten, ist das Ziel dieser Arbeit.

6. Limitationen

Wie bereits erwähnt beinhalten die unabhängigen Variablen potentielle Hämolyse und venöse Blutentnahme eine zu geringe Probenanzahl mit hämolytischen Proben bzw. Proben mit arterieller Blutentnahme, was zu einer Unterschätzung eines möglichen Zusammenhanges im Rahmen der Regressionsanalysen führen kann.

Zudem werden in der Literatur potentielle Störvariablen beschrieben, die im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert werden konnten. So konnte in der Vergangenheit bereits ein Einfluss der Temperatur, der die Proben ausgesetzt waren, nachgewiesen werden^{302, 306, 307}. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Temperatur vor der Zentrifugation einen größeren Einfluss als die zeitliche Verzögerung vor der Zentrifugation hat³⁰³. Daten zur Temperatur wurden in dieser Studie nicht erfasst. Jedoch waren alle Proben während der zeitlichen Verzögerung Raumtemperatur ausgesetzt. Es lässt sich aber nicht endgültig klären, ob die Veränderungen der Metabolite durch die zeitliche Verzögerung oder durch die längere Exposition gegenüber Raumtemperatur zustande kommen. Hierfür wäre eine Studie nötig, im Rahmen derer die Proben während der zeitlichen Verzögerung vordefinierten, unterschiedlichen Temperaturen unterlegen sind. Des Weiteren kann die Art der verwendeten Probenröhrchen und deren Zusätze einen Einfluss auf die Konzentrationen der Metabolite haben. Für die im Rahmen dieser Studie verwendeten Serumröhrchen ergab sich jedoch kein Unterschied zwischen Röhrchen mit und ohne Gelbarriere²⁶⁵. Somit scheinen die verwendeten Blutröhrchen und deren Zusätze nach aktuellem Stand keinen signifikanten Einfluss auf die Messung von Metaboliten zu haben. Mittels weiterer Studien wurde der Einfluss der Zentrifugationsbedingungen untersucht, wobei sich lediglich geringe Veränderungen der Metabolite in Abhängigkeit von der Zentrifugationsgeschwindigkeit, der Temperatur und der Zeit zeigten²⁷⁸⁻²⁸⁰. Bei der Lagerung der Blutproben im Gefrierschrank können sich ebenfalls Schwankungen der Metabolitenmessungen ergeben. Bei Lagerung mit einer Temperatur von -80°C und darunter konnten Studien jedoch zeigen, dass die Metabolite über einen langen Zeitraum sehr stabil bleiben^{257, 281, 282}. Nachdem die in dieser Arbeit verwendeten Proben alle bei mindestens -80°C gelagert wurden, kann also davon ausgegangen werden, dass dies keinen wesentlichen Effekt auf die Metabolite hat. Des Weiteren wurden potentielle Abweichungen im Rahmen der Analyse mittels Massenspektrometrie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nicht in Betracht gezogen.

Dieser Schritt ist in der Regel jedoch stark standardisiert und weniger fehleranfällig³⁰⁷, sodass dies als vernachlässigbar angenommen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich als hauptsächliche Limitation dieser Arbeit die Tatsache definieren, dass die Temperaturen, denen die Serumproben ausgesetzt waren, nicht dokumentiert und in die Analyse einbezogen wurden. Um die Fragestellung, ob die zeitliche Verzögerung oder die Exposition gegenüber Raumtemperatur für die Veränderungen der Metabolite verantwortlich sind, beantworten zu können, benötigt es weiterer Untersuchungen.

Außerdem konzentriert sich diese Arbeit nur auf Daten aus dem Forschungsgebiet der Metabolomik ohne Betrachtung der Proteomik, Genomik und Transkriptomik. In Zukunft wird jedoch die sogenannte „Multi-Omik“ Sichtweise immer mehr an Bedeutung gewinnen, basierend auf der Weiterentwicklung der Technik und entsprechenden Softwares. Die zelluläre Aktivität und biologische Prozesse in ihrer Komplexität abzubilden, stellt eine Herausforderung dar, die durch die Integration von Multi-Omik-Daten gelingen kann, deren Ziel es ist, Wechselwirkungen von Genen, Proteinen und Metaboliten zu untersuchen³⁰⁸. Dementsprechend ist es auch von großem Interesse potentielle präanalytische Abweichungen und deren Auswirkungen innerhalb aller Omik-Bereiche zu kennen. Hierfür sollte die Fragestellung dieser Arbeit auf den Bereich der Proteomik, Genomik und Transkriptomik erweitert werden. Insbesondere in der Identifizierung von Biomarkern für den ischämischen Schlaganfall scheint die Multi-Omik-Herangehensweise für die Zukunft sinnvoll zu sein, da es sich um ein Erkrankungsbild mit komplexen biologischen Prozessen handelt.

7. Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall ist eine häufige Ursache für Langzeitbehinderung und Mortalität. Zukünftig könnte er den größten relativen Anstieg der medizinischen Kosten unter den kardiovaskulären Erkrankungen verursachen. Daher ist es wichtig, die Pathophysiologie zu verstehen, Risikofaktoren zu kennen sowie präventive, diagnostische und therapeutische Maßnahmen zu verbessern. Blutbasierte Biomarker könnten hierbei eine Rolle spielen, da sie einfacher und kostengünstiger zu bestimmen sind als andere diagnostische Möglichkeiten. Es gibt bereits potentielle Biomarker für den ischämischen Schlaganfall, die jedoch bisher nicht in die klinische Anwendung übertragen werden konnten. Die Metabolomik zeigt vielversprechende Ansätze zur Identifizierung solcher Biomarker, jedoch bestehen weiterhin Inkonsistenzen durch unterschiedliche Studiendesigns. In dieser Arbeit wurde der Einfluss prozeduraler Aspekte der Probengewinnung und -verarbeitung auf zirkulierende Metaboliten im Blut untersucht. Etwa 85% der Metabolite zeigten eine negative Assoziation mit der Dauer verschiedener Verarbeitungsschritte von der Blutentnahme bis zum Einfrieren. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und der Tag der Blutentnahme wurden als Störvariablen ausgeschlossen. Die Zeitdauer von der Blutentnahme bis zur Zentrifugation sowie von der Zentrifugation bis zum Einfrieren hatte keinen Einfluss auf die Identifizierung von Metaboliten als Schlaganfall-Biomarker. Metabolite aus der Klasse der Kofaktoren/Vitamine waren weniger betroffen als andere Klassen. Pathway-Analysen zeigten, dass insbesondere Aminosäuren-Stoffwechselwege von zeitlichen Verzögerungen betroffen waren. Hämolyse und die Art der Blutentnahme hatten kaum Einfluss auf die Metabolitenmessung, wobei eine Unterschätzung aufgrund der geringen Probenanzahl möglich ist. Weitere Limitationen sind unbeachtete Störfaktoren, wie die Temperaturen, denen die Proben ausgesetzt waren.

Zusammenfassend bestätigt diese Arbeit den Einfluss zeitlicher Verzögerungen auf die Messung von Metaboliten, ohne dass diese Assoziationen die Identifizierung von Biomarkern für den Schlaganfall beeinflussen. Dies ist besonders wichtig für multizentrische Studien in der Metabolomik, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten und Fortschritte zu ermöglichen. Zukünftig wird die Multi-Omik-Sichtweise an Bedeutung gewinnen, weshalb es sinnvoll wäre, die Fragestellung auf Proteomik, Genomik und Transkriptomik zu erweitern.

8. Summary

Ischaemic stroke is a common cause of long-term disability and mortality. In the future, it could cause the largest relative increase in medical costs among cardiovascular diseases. Hence it is important to understand the pathophysiology, recognise risk factors and improve preventive, diagnostic and therapeutic measures. Blood-based biomarkers could play a role here, as they are easier and cheaper to determine than other diagnostic options. Potential biomarkers for ischaemic stroke already exist, but have not yet been translated into clinical application. Metabolomics shows promising approaches for the identification of such biomarkers, but inconsistencies persist due to different study designs. In this work, the influence of procedural aspects of sample collection and processing on circulating metabolites in blood was investigated. About 85% of the metabolites showed a negative association with the duration of different processing steps from blood collection to freezing. Cardiovascular risk factors and the day of blood collection were excluded as confounding variables. The time from blood collection to centrifugation and from centrifugation to freezing had no influence on the identification of metabolites as stroke biomarkers. Metabolites from the cofactor and vitamin class were less affected than other classes. Pathway analyses showed that amino acid metabolic pathways in particular were affected by time delays. Haemolysis and the type of blood collection had hardly any influence on the metabolite measurement, although an underestimation is possible due to the low number of samples. Further limitations are unobserved confounding factors, such as the temperatures to which the samples were exposed.

In summary, this work confirms the influence of time delays on the measurement of metabolites without these associations affecting the identification of biomarkers for stroke. This is particularly important for multi-centre studies in metabolomics to ensure comparability and enable progress. In the future, the multi-omics perspective will gain in importance, which is why it would be useful to extend the research question to proteomics, genomics and transcriptomics.

9. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: TEST AUF NORMALVERTEILUNG.....	47
ABBILDUNG 2: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES EINFLUSSES DER AUSREIßER AUF DAS REGRESSIONSMODELL	48
ABBILDUNG 3: TEST AUF HOMOSKEDASTIZITÄT.....	49
ABBILDUNG 4: BOXPLOT FÜR DIE DIFFERENZ BLUTENTNAHME-EINFRIEREN NACH GRUPPENZUGEHÖRIGKEIT.	53
ABBILDUNG 5: BOXPLOT FÜR DIE DIFFERENZ BLUTENTNAHME-ZENTRIFUGATION NACH GRUPPENZUGEHÖRIGKEIT.....	53
ABBILDUNG 6: BOXPLOT FÜR DIE DIFFERENZ ZENTRIFUGATION-EINFRIEREN NACH GRUPPENZUGEHÖRIGKEIT.	54
ABBILDUNG 7: ABSOLUTE VERTEILUNG DER METABOLITE NACH KLASSENZUGEHÖRIGKEIT.....	55
ABBILDUNG 8: RELATIVE VERTEILUNG DER SIGNIFIKANTEN METABOLITE NACH KLASSE IM RAHMEN DER REGRESSIONSANALYSE MIT DER UNABHÄNGIGEN VARIABLE DIFFERENZ BLUTENTNAHME-EINFRIEREN.	57
ABBILDUNG 9: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PATHWAY ANALYSE MIT DER UNABHÄNGIGEN VARIABLE DIFFERENZ BLUTENTNAHME-EINFRIEREN MITTELS METABOANALYST.CA.	58
ABBILDUNG 10: RELATIVE VERTEILUNG DER SIGNIFIKANTEN METABOLITE NACH KLASSE IM RAHMEN DER REGRESSIONSANALYSE MIT DER UNABHÄNGIGEN VARIABLE DIFFERENZ BLUTENTNAHME- ZENTRIFUGATION.	60
ABBILDUNG 11: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PATHWAY ANALYSE MIT DER UNABHÄNGIGEN VARIABLE DIFFERENZ BLUTENTNAHME-ZENTRIFUGATION MITTELS METABOANALYST.CA.	61
ABBILDUNG 12: RELATIVE VERTEILUNG DER SIGNIFIKANTEN METABOLITE NACH KLASSE IM RAHMEN DER REGRESSIONSANALYSE MIT DER UNABHÄNGIGEN VARIABLE DIFFERENZ ZENTRIFUGATION-EINFRIEREN.	63
ABBILDUNG 13: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PATHWAY ANALYSE MIT DER UNABHÄNGIGEN VARIABLE DIFFERENZ ZENTRIFUGATION-EINFRIEREN MITTELS METABOANALYST.CA.....	64
ABBILDUNG 14: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PATHWAY ANALYSE MIT DER UNABHÄNGIGEN VARIABLE POTENTIELLE HÄMOLYSE MITTELS METABOANALYST.CA.	65
ABBILDUNG 15: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PATHWAY ANALYSE MIT DER UNABHÄNGIGEN VARIABLE VENÖSE BLUTENTNAHME MITTELS METABOANALYST.CA.....	66

10. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: LAGE- UND STREUUNGSPARAMETER DER METRISCHEN VARIABLEN SOWIE RELATIVE VERTEILUNG DER KATEGORIALEN VARIABLEN FÜR DIE GRUPPEN ISCHÄMISCHER SCHLAGANFALL, TRANSITORISCH ISCHÄMISCHE ATTACKE, STROKE MIMIC UND GESUNDE KONTROLLEN, P-WERT DER GRUPPENVERGLEICHE DER VIER GRUPPEN MITTELS KRUSKAL-WALLIS-TEST.BZW. CHI-QUADRAT-TEST ..	52
TABELLE 2: : LAGE- UND STREUUNGSPARAMETER DER METRISCHEN DIFFERENZVARIABLEN UND RELATIVE VERTEILUNG DER KATEGORIALEN VARIABLEN POTENTIELLE HÄMOLYSE UND VENÖSE BLUTENTNAHME, P-WERT DER GRUPPENVERGLEICHE DER VIER GRUPPEN.MITTELS KURSKAL-WALLIS-TEST BZW. CHI-QUADRAT-TEST	52
TABELLE 3: ABSOLUTE VERTEILUNG DER METABOLITE JE NACH KLASSENZUGEHÖRIGKEIT UND BEISPIELE.	55
TABELLE 4: ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER REGRESSIONSANALYSEN BEZÜGLICH DES EINFLUSSES VON PRÄANALYTISCHEN PROZESSEN AUF DIE KONZENTRATIONEN DER METABOLITE.	67

11. Abkürzungsverzeichnis

ACE.....	Angiotensin-konvertierendes Enzym, englisch: Angiotensin converting enzyme
ADAMTS13.....	A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains
ApoA1	Apolipoprotein A1
ApoB	Apolipoprotein B
ASCO	Atherosclerosis, Small Vessel Disease, Cardiac Source, Other Cause
ASPECT.....	Alberta stroke program early CT score
AUC	area under the curve
BMI	Body Mass Index
BNP	b-type natriuretic peptide
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise, beziehungsweise
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
ca.	circa
CCS.....	Causative Classification System
CD4	cluster of differentiation 4
CG-FAST	Conveniently-Grasped Field Assessment Stroke Triage
CIRCULAS	Circulating Biomarkers in Acute Stroke
CISS	Chinese Ischemic Stroke Subclassification
cm	Zentimeter
CSV.....	Comma-separated values
CT.....	Computertomographie
DALYs	disability-adjusted life-years
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure, englisch: deoxyribonucleic acid
DWI	diffusionsgewichtete Bildgebung, englisch: diffusion weighted image
et al.	et alii oder et aliae
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FLAIR.....	fluid attenuated inversion recovery
GFAP	glial fibrillary acidic protein
G-FAST	gaze-face-arm-speech-time test
ggf.	gegebenenfalls
GVIF	global variance influence factor
HbA1c	Hämoglobin A1c
HDL	High-Density-Lipoprotein
Her2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
kDa.....	Kilodalton
LDL	Low-Density-Lipoprotein
lncRNA	long non-coding ribonucleid acids
mHealth	mobile Gesundheit, englisch: mobile health
mind.....	mindestens
mRS.....	modifizierte Rankin-Skala
MRT	Magnetresonanztomographie

NADH	<i>Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrid</i>
NASCET	<i>North American Symptomatic Carotid End-arterectomy Trial</i>
ncRNAs	<i>non coding ribonucleid acids</i>
NIHSS	<i>National Institutes of Health Stroke Scale</i>
NT-pro-BNP.....	<i>N-terminal-pro-b-type natriuretic peptide</i>
RACE	<i>Rapid Arterial occlusion Evaluation</i>
RBP4	<i>retinol binding protein 4</i>
RNA.....	<i>Ribonukleinsäure, englisch: ribonucleid acid</i>
rt-PA.....	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
SAA1/2.....	<i>Serum Amyloid A</i>
TOAST	<i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
TOF	<i>time off light technic</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>
ZNS.....	<i>zentrales Nervensystem</i>

12. Literaturverzeichnis

1. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(7):2064-2089.
2. Coupland AP, Thapar A, Qureshi MI, et al. The definition of stroke. *J R Soc Med*. 2017;110(1):9-12.
3. Panuganti KK, Tadi P, Lui F. Transient Ischemic Attack. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC. 2024.

4. Easton JD, Saver JL, Albers GW, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke*. 2009;40(6):2276-2293.
5. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Neurol*. 2024;23(4):344-381.
6. WHO. Disability-adjusted life years (DALYs) Available: <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/158>, 24.04.2024.
7. Pandian JD, Gall SL, Kate MP, et al. Prevention of stroke: a global perspective. *The Lancet*. 2018;392(10154):1269-1278.
8. Katan M, Luft A. Global Burden of Stroke. *Semin Neurol*. 2018;38(2):208-211.
9. Kim J, Thayabaranathan T, Donnan GA, et al. Global Stroke Statistics 2019. *Int J Stroke*. 2020;15(8):819-838.
10. Stahmeyer JT, Stubenrauch S, Geyer S, et al. The Frequency and Timing of Recurrent Stroke. *Deutsches Aerzteblatt Online*. 2019.
11. Global burden of 288 causes of death and life expectancy decomposition in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet*. 2024;403(10440):2100-2132.
12. Strilciuc S, Grad DA, Radu C, et al. The economic burden of stroke: a systematic review of cost of illness studies. *J Med Life*. 2021;14(5):606-619.
13. Writing Group M, Lloyd-Jones D, Adams RJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121(7):e46-e215.
14. Heidenreich PA, Trogdon JG, Khavjou OA, et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(8):933-944.

15. Mattle HP, Hennerici M, Sztajzel R. [Pathophysiology, etiology and diagnosis of stroke]. *Ther Umsch.* 2003;60(9):499-507.
16. Koh SH, Park HH. Neurogenesis in Stroke Recovery. *Transl Stroke Res.* 2017;8(1):3-13.
17. Wu S, Du L. Protein Aggregation in the Pathogenesis of Ischemic Stroke. *Cell Mol Neurobiol.* 2020.
18. Kahl A, Blanco I, Jackman K, et al. Cerebral ischemia induces the aggregation of proteins linked to neurodegenerative diseases. *Sci Rep.* 2018;8(1):2701.
19. Cai W, Zhang K, Li P, et al. Dysfunction of the neurovascular unit in ischemic stroke and neurodegenerative diseases: An aging effect. *Ageing Res Rev.* 2017;34:77-87.
20. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, 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.* 1993;24(1):35-41.
21. Chen PH, Gao S, Wang YJ, et al. Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS. *CNS Neurosci Ther.* 2012;18(6):452-456.
22. Wei W, Li S, San F, et al. Retrospective analysis of prognosis and risk factors of patients with stroke by TOAST. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(15):e0412.
23. Yang XL, Zhu DS, Lv HH, et al. Etiological Classification of Cerebral Ischemic Stroke by the TOAST, SSS-TOAST, and ASCOD Systems: The Impact of Observer's Experience on Reliability. *Neurologist.* 2019;24(4):111-114.
24. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *The Lancet.* 2010;376(9735):112-123.
25. O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, et al. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *The Lancet.* 2016;388(10046):761-775.
26. Bushnell CD, Chaturvedi S, Gage KR, et al. Sex differences in stroke: Challenges and opportunities. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38(12):2179-2191.
27. Kramer SF, Hung SH, Brodtmann A. The Impact of Physical Activity Before and After Stroke on Stroke Risk and Recovery: a Narrative Review. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2019;19(6):28.
28. Lee CD, Folsom AR, Blair SN. Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. *Stroke.* 2003;34(10):2475-2481.
29. Ferrari L, Vicenzi M, Tarantini L, et al. Effects of Physical Exercise on Endothelial Function and DNA Methylation. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(14).
30. Walldius G, Aastveit AH, Jungner I. Stroke mortality and the apoB/apoA-I ratio: results of the AMORIS prospective study. *J Intern Med.* 2006;259(3):259-266.
31. Dong H, Chen W, Wang X, et al. Apolipoprotein A1, B levels, and their ratio and the risk of a first stroke: a meta-analysis and case-control study. *Metab Brain Dis.* 2015;30(6):1319-1330.

32. Chou YC, Chan PC, Yang T, et al. Apolipoprotein B Level and the Apolipoprotein B/Apolipoprotein A-I Ratio as a Harbinger of Ischemic Stroke: A Prospective Observation in Taiwan. *Cerebrovasc Dis.* 2020;49(5):487-494.
33. Spence JD. Nutrition and Risk of Stroke. *Nutrients.* 2019;11(3).
34. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med.* 2018;378(25):e34.
35. Chiu THT, Chang HR, Wang LY, et al. Vegetarian diet and incidence of total, ischemic, and hemorrhagic stroke in 2 cohorts in Taiwan. *Neurology.* 2020;94(11):e1112-e1121.
36. Zhu W, Gregory JC, Org E, et al. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell.* 2016;165(1):111-124.
37. Nie J, Xie L, Zhao BX, et al. Serum Trimethylamine N-Oxide Concentration Is Positively Associated With First Stroke in Hypertensive Patients. *Stroke.* 2018;49(9):2021-2028.
38. Bembenek JP, Karlinski M, Niewada M, et al. Measurement of Nutritional Status Using Body Mass Index, Waist-to-Hip Ratio, and Waist Circumference to Predict Treatment Outcome in Females and Males with Acute First-Ever Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2018;27(1):132-139.
39. Dar T, Radfar A, Abohashem S, et al. Psychosocial Stress and Cardiovascular Disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2019;21(5):23.
40. Graber M, Baptiste L, Mohr S, et al. A review of psychosocial factors and stroke: A new public health problem. *Rev Neurol (Paris).* 2019;175(10):686-692.
41. Pan B, Jin X, Jun L, et al. The relationship between smoking and stroke: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(12):e14872.
42. Larsson SC, Burgess S, Michaelsson K. Smoking and stroke: A mendelian randomization study. *Ann Neurol.* 2019;86(3):468-471.
43. Munzel T, Hahad O, Kuntic M, et al. Effects of tobacco cigarettes, e-cigarettes, and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes. *Eur Heart J.* 2020;41(41):4057-4070.
44. Benowitz NL. Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment. *Progress in Cardiovascular Diseases.* 2003;46(1):91-111.
45. Puranik R, Celermajer DS. Smoking and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis.* 2003;45(6):443-458.
46. Rigotti NA, Clair C. Managing tobacco use: the neglected cardiovascular disease risk factor. *Eur Heart J.* 2013;34(42):3259-3267.
47. Kamel H, Healey JS. Cardioembolic Stroke. *Circ Res.* 2017;120(3):514-526.
48. Lin HJ, Wolf PA, Kelly-Hayes M, et al. Stroke severity in atrial fibrillation. The Framingham Study. *Stroke.* 1996;27(10):1760-1764.
49. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation.* 2014;129(8):837-847.

50. Marini C, De Santis F, Sacco S, et al. Contribution of atrial fibrillation to incidence and outcome of ischemic stroke: results from a population-based study. *Stroke*. 2005;36(6):1115-1119.
51. Pistoia F, Sacco S, Tiseo C, et al. The Epidemiology of Atrial Fibrillation and Stroke. *Cardiol Clin*. 2016;34(2):255-268.
52. O'Keefe JH, Bhatti SK, Bajwa A, et al. Alcohol and cardiovascular health: the dose makes the poison...or the remedy. *Mayo Clin Proc*. 2014;89(3):382-393.
53. Mostofsky E, Chahal HS, Mukamal KJ, et al. Alcohol and Immediate Risk of Cardiovascular Events: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *Circulation*. 2016;133(10):979-987.
54. Zhang C, Qin YY, Chen Q, et al. Alcohol intake and risk of stroke: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int J Cardiol*. 2014;174(3):669-677.
55. Chen R, Ovbiagele B, Feng W. Diabetes and Stroke: Epidemiology, Pathophysiology, Pharmaceuticals and Outcomes. *Am J Med Sci*. 2016;351(4):380-386.
56. Emerging Risk Factors Collaboration; N Sarwar PG, S R Kondapally Seshasai, R Gobin, S Kaptoge, E Di Angelantonio, E Ingelsson, D A Lawlor, E Selvin, M Stampfer, C D A Stehouwer, S Lewington, L Pennells, A Thompson, N Sattar, I R White, K K Ray, J Danesh. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies *Lancet*. 2010;375:2215-2222.
57. Peters SAE, Huxley RR, Woodward M. Diabetes as a risk factor for stroke in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 64 cohorts, including 775 385 individuals and 12 539 strokes. *The Lancet*. 2014;383(9933):1973-1980.
58. Hill MD. Stroke and diabetes mellitus. *Handb Clin Neurol*. 2014;126:167-174.
59. Ovbiagele B, Nguyen-Huynh MN. Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. *Neurotherapeutics*. 2011;8(3):319-329.
60. Organization WH. Healthy Cities. Health Promotion Glossary. 1998.
61. Webster R, Patel A, Selak V, et al. Effectiveness of fixed dose combination medication ('polypills') compared with usual care in patients with cardiovascular disease or at high risk: A prospective, individual patient data meta-analysis of 3140 patients in six countries. *Int J Cardiol*. 2016;205:147-156.
62. Castellano JM, Sanz G, Penalvo JL, et al. A polypill strategy to improve adherence: results from the FOCUS project. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(20):2071-2082.
63. Yusuf S, Lonn E, Pais P, et al. Blood-Pressure and Cholesterol Lowering in Persons without Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2016;374(21):2032-2043.
64. Piette JD, List J, Rana GK, et al. Mobile Health Devices as Tools for Worldwide Cardiovascular Risk Reduction and Disease Management. *Circulation*. 2015;132(21):2012-2027.
65. Vedanthan R, Bernabe-Ortiz A, Herasme OI, et al. Innovative Approaches to Hypertension Control in Low- and Middle-Income Countries. *Cardiology Clinics*. 2017;35(1):99-115.
66. Organization WH. World health report 2006: working together for health. . 2006.

67. Lekoubou A, Awah P, Fezeu L, et al. Hypertension, diabetes mellitus and task shifting in their management in sub-Saharan Africa. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(2):353-363.
68. Labhardt ND, Balo JR, Ndam M, et al. Task shifting to non-physician clinicians for integrated management of hypertension and diabetes in rural Cameroon: a programme assessment at two years. *BMC Health Serv Res*. 2010;10:339.
69. Larsson S, Åkesson A, Wolk A. Primary prevention of stroke by a healthy lifestyle in a high-risk group. *Neurology* 2015;84(22):2224-2228.
70. Chandratheva A, Mehta Z, Geraghty OC, et al. Population-based study of risk and predictors of stroke in the first few hours after a TIA. *Neurology* 2009;72(22):1941-1947.
71. Flach C, Muruet W, Wolfe CDA, et al. Risk and Secondary Prevention of Stroke Recurrence: A Population-Base Cohort Study. *Stroke*. 2020;51(8):2435-2444.
72. Hankey GJ. Secondary stroke prevention. *The Lancet Neurology*. 2014;13(2):178-194.
73. Collaboration ATA, Baigent C, Blackwell L, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *The Lancet*. 2009;373(9678):1849-1860.
74. Stringberg A, Camden R, Qualls K, et al. Update on Dual Antiplatelet Therapy for Secondary Stroke Prevention. *Missouri Medicine*. 2019;116(4):303-307.
75. Wang Y, Wang Y, Zhao X, et al. Clopidogrel with aspirin in acute minor stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med*. 2013;369(1):11-19.
76. Wong KS, Wang Y, Leng X, et al. Early dual versus mono antiplatelet therapy for acute non-cardioembolic ischemic stroke or transient ischemic attack: an updated systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2013;128(15):1656-1666.
77. Lip GY, Nieuwlaat R, Pisters R, et al. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest*. 2010;137(2):263-272.
78. Wadhera RK, Russell CE, Piazza G. Cardiology patient page. Warfarin versus novel oral anticoagulants: how to choose? *Circulation*. 2014;130(22):e191-193.
79. Risk factors for stroke and efficacy of antithrombotic therapy in atrial fibrillation. Analysis of pooled data from five randomized controlled trials. *Arch Intern Med*. 1994;154(13):1449-1457.
80. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*. 2007;146(12):857-867.
81. Adjusted-dose warfarin versus low-intensity, fixed-dose warfarin plus aspirin for high-risk patients with atrial fibrillation: Stroke Prevention in Atrial Fibrillation III randomised clinical trial. *Lancet*. 1996;348(9028):633-638.
82. Hylek EM, Skates SJ, Sheehan MA, et al. An analysis of the lowest effective intensity of prophylactic anticoagulation for patients with nonrheumatic atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 1996;335(8):540-546.
83. Coleman CI, Peacock WF, Bunz TJ, et al. Effectiveness and Safety of Apixaban, Dabigatran, and Rivaroxaban Versus Warfarin in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation and Previous Stroke or Transient Ischemic Attack. *Stroke*. 2017;48(8):2142-2149.

84. Bai Y, Deng H, Shantsila A, et al. Rivaroxaban Versus Dabigatran or Warfarin in Real-World Studies of Stroke Prevention in Atrial Fibrillation: Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2017;48(4):970-976.
85. Avezum A, Lopes RD, Schulte PJ, et al. Apixaban in Comparison With Warfarin in Patients With Atrial Fibrillation and Valvular Heart Disease: Findings From the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) Trial. *Circulation*. 2015;132(8):624-632.
86. Lee SR, Choi EK, Han KD, et al. Edoxaban in Asian Patients With Atrial Fibrillation: Effectiveness and Safety. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(8):838-853.
87. Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014;45(7):2160-2236.
88. Aznaouridis K, Masoura C, Vlachopoulos C, et al. Statins in Stroke. *Curr Med Chem*. 2019;26(33):6174-6185.
89. Tramacere I, Boncoraglio GB, Banzi R, et al. Comparison of statins for secondary prevention in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Med*. 2019;17(1):67.
90. Orrapin S, Rerkasem K. Carotid endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;6:CD001081.
91. Lal BK, Beach KW, Roubin GS, et al. Restenosis after carotid artery stenting and endarterectomy: a secondary analysis of CREST, a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology*. 2012;11(9):755-763.
92. Rantner B, Kollerits B, Roubin GS, et al. Early Endarterectomy Carries a Lower Procedural Risk Than Early Stenting in Patients With Symptomatic Stenosis of the Internal Carotid Artery: Results From 4 Randomized Controlled Trials. *Stroke*. 2017;48(6):1580-1587.
93. Muller MD, von Felten S, Algra A, et al. Immediate and Delayed Procedural Stroke or Death in Stenting Versus Endarterectomy for Symptomatic Carotid Stenosis. *Stroke*. 2018;49(11):2715-2722.
94. Moulin S, Leys D. Stroke mimics and chameleons. *Curr Opin Neurol*. 2019;32(1):54-59.
95. Saver JL. Time is brain--quantified. *Stroke*. 2006;37(1):263-266.
96. Perez de la Ossa N, Carrera D, Gorchs M, et al. Design and validation of a prehospital stroke scale to predict large arterial occlusion: the rapid arterial occlusion evaluation scale. *Stroke*. 2014;45(1):87-91.
97. Chiu YC, Tang SC, Sun JT, et al. Using G-FAST to recognize emergent large vessel occlusion: a training program for a prehospital bypass strategy. *J Neurointerv Surg*. 2020;12(1):104-108.
98. Gong X, Chen Z, Shi F, et al. Conveniently-Grasped Field Assessment Stroke Triage (CG-FAST): A Modified Scale to Detect Large Vessel Occlusion Stroke. *Front Neurol*. 2019;10:390.
99. Duvekot MHC, Venema E, Rozeman AD, et al. Comparison of eight prehospital stroke scales to detect intracranial large-vessel occlusion in suspected stroke (PRESTO): a prospective observational study. *Lancet Neurol*. 2021;20(3):213-221.

100. Brott T, Adams HP, Olinger CP, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*. 1989;20(7):864-870.
101. Kasner SE. Clinical interpretation and use of stroke scales. *The Lancet Neurology*. 2006;5(7):603-612.
102. Goldstein LB, Samsa GP. Reliability of the National Institutes of Health Stroke Scale. Extension to non-neurologists in the context of a clinical trial. *Stroke*. 1997;28(2):307-310.
103. Schiemanck SK, Post MW, Witkamp TD, et al. Relationship between ischemic lesion volume and functional status in the 2nd week after middle cerebral artery stroke. *Neurorehabil Neural Repair*. 2005;19(2):133-138.
104. Adams HP, Jr., Davis PH, Leira EC, et al. Baseline NIH Stroke Scale score strongly predicts outcome after stroke: A report of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST). *Neurology*. 1999;53(1):126-131.
105. Schlegel DJ, Tanne D, Demchuk AM, et al. Prediction of hospital disposition after thrombolysis for acute ischemic stroke using the National Institutes of Health Stroke Scale. *Arch Neurol*. 2004;61(7):1061-1064.
106. Kasner SE, Chalela JA, Luciano JM, et al. Reliability and validity of estimating the NIH stroke scale score from medical records. *Stroke*. 1999;30(8):1534-1537.
107. Appelros P, Terent A. Characteristics of the National Institute of Health Stroke Scale: results from a population-based stroke cohort at baseline and after one year. *Cerebrovasc Dis*. 2004;17(1):21-27.
108. El-Koussy M, Schroth G, Brekenfeld C, et al. Imaging of acute ischemic stroke. *Eur Neurol*. 2014;72(5-6):309-316.
109. Christensen AF, Christensen H. Editorial: Imaging in Acute Stroke-New Options and State of the Art. *Front Neurol*. 2017;8:736.
110. Mair G, Wardlaw JM. Imaging of acute stroke prior to treatment: current practice and evolving techniques. *Br J Radiol*. 2014;87(1040):20140216.
111. Wardlaw JM, Farrall AJ, Perry D, et al. Factors influencing the detection of early CT signs of cerebral ischemia: an internet-based, international multiobserver study. *Stroke*. 2007;38(4):1250-1256.
112. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12(6):723-725.
113. Xiong Y, Luo Y, Wang M, et al. Evaluation of Diffusion-Perfusion Mismatch in Acute Ischemic Stroke with a New Automated Perfusion-Weighted Imaging Software: A Retrospective Study. *Neurol Ther*. 2022;11(4):1777-1788.
114. Saur D, Kucinski T, Grzyska U, et al. Sensitivity and interrater agreement of CT and diffusion-weighted MR imaging in hyperacute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003;24(5):878-885.
115. Fiebach JB, Schellinger PD, Jansen O, et al. CT and diffusion-weighted MR imaging in randomized order: diffusion-weighted imaging results in higher accuracy and lower interrater variability in the diagnosis of hyperacute ischemic stroke. *Stroke*. 2002;33(9):2206-2210.

116. Mullins ME, Schaefer PW, Sorensen AG, et al. CT and conventional and diffusion-weighted MR imaging in acute stroke: study in 691 patients at presentation to the emergency department. *Radiology*. 2002;224(2):353-360.
117. Thomalla G, Cheng B, Ebinger M, et al. DWI-FLAIR mismatch for the identification of patients with acute ischaemic stroke within 4.5 h of symptom onset (PRE-FLAIR): a multicentre observational study. *Lancet Neurol*. 2011;10(11):978-986.
118. Shehzad U. Medical Management of Acute Cerebral Ischemia. *Dela J Public Health*. 2023;9(3):20-26.
119. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1317-1329.
120. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, et al. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2019;50(12):e344-e418.
121. Ringleb P. KM, Jansen O., et altera. Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls, S2e-Leitlinie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2022.
122. Roaldsen MB, Lindekleiv H, Mathiesen EB. Intravenous thrombolytic treatment and endovascular thrombectomy for ischaemic wake-up stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;12(12):Cd010995.
123. Wardlaw JM, Murray V, Berge E, et al. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(7):Cd000213.
124. Thomalla G, Simonsen CZ, Boutitie F, et al. MRI-Guided Thrombolysis for Stroke with Unknown Time of Onset. *N Engl J Med*. 2018;379(7):611-622.
125. Ma H, Campbell BCV, Parsons MW, et al. Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke. *N Engl J Med*. 2019;380(19):1795-1803.
126. Wang Y, Cai X, Fang Q, et al. Efficacy and safety outcomes of Tenecteplase versus Alteplase for thrombolysis of acute ischemic stroke: A meta-analysis of 9 randomized controlled trials. *J Neurol Sci*. 2024;458:122912.
127. Saraf A, Gilvaz PC, Ramakrishnan TCR, et al. Prospective Observational Cohort Study of Tenecteplase: Results From the Indian Registry in Ischemic Stroke-Tenecteplase. *J Am Heart Assoc*. 2024:e036382.
128. Ma P, Zhang Y, Chang L, et al. Tenecteplase vs. alteplase for the treatment of patients with acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2022;269(10):5262-5271.
129. Roaldsen MB, Jusufovic M, Berge E, et al. Endovascular thrombectomy and intra-arterial interventions for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;6(6):Cd007574.
130. Weber R, Minnerup J, Nordmeyer H, et al. Thrombectomy in posterior circulation stroke: differences in procedures and outcome compared to anterior circulation stroke in the prospective multicentre REVASK registry. *Eur J Neurol*. 2019;26(2):299-305.

131. Meinel TR, Kaesmacher J, Chaloulos-Iakovidis P, et al. Mechanical thrombectomy for basilar artery occlusion: efficacy, outcomes, and futile recanalization in comparison with the anterior circulation. *J Neurointerv Surg*. 2019;11(12):1174-1180.
132. Langezaal LCM, van der Hoeven E, Mont'Alverne FJA, et al. Endovascular Therapy for Stroke Due to Basilar-Artery Occlusion. *N Engl J Med*. 2021;384(20):1910-1920.
133. Liu X, Dai Q, Ye R, et al. Endovascular treatment versus standard medical treatment for vertebrobasilar artery occlusion (BEST): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2020;19(2):115-122.
134. Tao C, Nogueira RG, Zhu Y, et al. Trial of Endovascular Treatment of Acute Basilar-Artery Occlusion. *N Engl J Med*. 2022;387(15):1361-1372.
135. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95.
136. FitzGerald GA. Measure for Measure: Biomarker standards and transparency. *Sci Transl Med*. 2016;8(343):343fs310.
137. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol*. 2017;76:9.23.21-29.23.17.
138. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38 Suppl:S8-s16.
139. Walker AS, Gibb DM. Monitoring of highly active antiretroviral therapy in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24(1):27-33.
140. Heran BS, Wong MM, Heran IK, et al. Blood pressure lowering efficacy of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;2008(4):Cd003823.
141. Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1-3):65-77.
142. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clin Chim Acta*. 2015;438:350-357.
143. Genin E, Hannequin D, Wallon D, et al. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry*. 2011;16(9):903-907.
144. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(3):213-221.
145. Ferner RE, Dear JW, Bateman DN. Management of paracetamol poisoning. *Bmj*. 2011;342:d2218.
146. Melichar B. Biomarkers in the treatment of cancer: opportunities and pitfalls. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(7):1329-1333.
147. Vincent JL, Bogossian E, Menozzi M. The Future of Biomarkers. *Crit Care Clin*. 2020;36(1):177-187.
148. Conway SR, Wong HR. Biomarker Panels in Critical Care. *Crit Care Clin*. 2020;36(1):89-104.
149. Vincent JL, Teixeira L. Sepsis biomarkers. Value and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(10):1081-1082.

150. Montaner J, Ramiro L, Simats A, et al. Multilevel omics for the discovery of biomarkers and therapeutic targets for stroke. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(5):247-264.
151. Ebinger M, Winter B, Wendt M, et al. Effect of the use of ambulance-based thrombolysis on time to thrombolysis in acute ischemic stroke: a randomized clinical trial. *Jama*. 2014;311(16):1622-1631.
152. Tiedt S, Brandmaier S, Kollmeier H, et al. Circulating Metabolites Differentiate Acute Ischemic Stroke from Stroke Mimics. *Ann Neurol*. 2020;88(4):736-746.
153. Zhang X, Li Y, Liang Y, et al. Distinguishing Intracerebral Hemorrhage from Acute Cerebral Infarction through Metabolomics. *Rev Invest Clin*. 2017;69(6):319-328.
154. Hu Z, Zhu Z, Cao Y, et al. Rapid and Sensitive Differentiating Ischemic and Hemorrhagic Strokes by Dried Blood Spot Based Direct Injection Mass Spectrometry Metabolomics Analysis. *J Clin Lab Anal*. 2016;30(6):823-830.
155. Jiang Z, Sun J, Liang Q, et al. A metabonomic approach applied to predict patients with cerebral infarction. *Talanta*. 2011;84(2):298-304.
156. Liu P, Li R, Antonov AA, et al. Discovery of Metabolite Biomarkers for Acute Ischemic Stroke Progression. *J Proteome Res*. 2017;16(2):773-779.
157. Sun R, Li Y, Cai M, et al. Discovery of a New Biomarker Pattern for Differential Diagnosis of Acute Ischemic Stroke Using Targeted Metabolomics. *Front Neurol*. 2019;10:1011.
158. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*. 2000;25(9-10):1439-1451.
159. Perry LA, Lucarelli T, Penny-Dimri JC, et al. Glial fibrillary acidic protein for the early diagnosis of intracerebral hemorrhage: Systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Int J Stroke*. 2019;14(4):390-399.
160. Llombart V, García-Berrocso T, Bustamante A, et al. Plasmatic retinol-binding protein 4 and glial fibrillary acidic protein as biomarkers to differentiate ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *J Neurochem*. 2016;136(2):416-424.
161. Penn AM, Bibok MB, Saly VK, et al. Validation of a proteomic biomarker panel to diagnose minor-stroke and transient ischaemic attack: phase 2 of SpecTRA, a large scale translational study. *Biomarkers*. 2018;23(8):793-803.
162. Hart RG, Diener HC, Coutts SB, et al. Embolic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct. *Lancet Neurol*. 2014;13(4):429-438.
163. Llombart V, Antolin-Fontes A, Bustamante A, et al. B-type natriuretic peptides help in cardioembolic stroke diagnosis: pooled data meta-analysis. *Stroke*. 2015;46(5):1187-1195.
164. Bai J, Sun H, Xie L, et al. Detection of cardioembolic stroke with B-type natriuretic peptide or N-terminal pro-BNP: a comparative diagnostic meta-analysis. *Int J Neurosci*. 2018;128(11):1100-1108.
165. Kamel H, Longstreth WT, Jr., Tirschwell DL, et al. The Atrial Cardiopathy and Antithrombotic Drugs In prevention After cryptogenic stroke randomized trial: Rationale and methods. *Int J Stroke*. 2019;14(2):207-214.
166. Kemp Gudmundsdottir K, Fredriksson T, Svennberg E, et al. Stepwise mass screening for atrial fibrillation using N-terminal B-type natriuretic peptide: the STROKESTOP II study. *Europace*. 2020;22(1):24-32.

167. Ribo M, Montaner J, Molina CA, et al. Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2004;35(9):2123-2127.
168. Chen X, Cheng X, Zhang S, et al. ADAMTS13: An Emerging Target in Stroke Therapy. *Front Neurol*. 2019;10:772.
169. Bustamante A, Ning M, García-Berrocso T, et al. Usefulness of ADAMTS13 to predict response to recanalization therapies in acute ischemic stroke. *Neurology*. 2018;90(12):e995-e1004.
170. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke*. 2001;32(12):2762-2767.
171. Castellanos M, Leira R, Serena J, et al. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34(1):40-46.
172. Yuan R, Tan S, Wang D, et al. Predictive value of plasma matrix metalloproteinase-9 concentrations for spontaneous haemorrhagic transformation in patients with acute ischaemic stroke: A cohort study in Chinese patients. *J Clin Neurosci*. 2018;58:108-112.
173. Wang L, Wei C, Deng L, et al. The Accuracy of Serum Matrix Metalloproteinase-9 for Predicting Hemorrhagic Transformation After Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(6):1653-1665.
174. Castellanos M, Leira R, Serena J, et al. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2004;35(7):1671-1676.
175. De Marchis GM, Katan M, Weck A, et al. Copeptin adds prognostic information after ischemic stroke: results from the CoRisk study. *Neurology*. 2013;80(14):1278-1286.
176. Wang C, Gao L, Zhang ZG, et al. Procalcitonin Is a Stronger Predictor of Long-Term Functional Outcome and Mortality than High-Sensitivity C-Reactive Protein in Patients with Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol*. 2016;53(3):1509-1517.
177. Azurmendi L, Lapierre-Fetaud V, Schneider J, et al. Proteomic discovery and verification of serum amyloid A as a predictor marker of patients at risk of post-stroke infection: a pilot study. *Clin Proteomics*. 2017;14:27.
178. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(11):845-867.
179. Del Giacco L, Cattaneo C. Introduction to genomics. *Methods Mol Biol*. 2012;823:79-88.
180. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):631-656.
181. Noto A, Fanos V, Dessì A. Metabolomics in Newborns. *Adv Clin Chem*. 2016;74:35-61.
182. Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(7):473-484.
183. Cuadrado E, Rosell A, Penalba A, et al. Vascular MMP-9/TIMP-2 and neuronal MMP-10 up-regulation in human brain after stroke: a combined laser microdissection and protein array study. *J Proteome Res*. 2009;8(6):3191-3197.

184. Cuadrado E, Rosell A, Colomé N, et al. The proteome of human brain after ischemic stroke. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(11):1105-1115.
185. García-Berrocso T, Penalba A, Boada C, et al. From brain to blood: New biomarkers for ischemic stroke prognosis. *J Proteomics*. 2013;94:138-148.
186. Dayon L, Turck N, Garcí-Berrocso T, et al. Brain extracellular fluid protein changes in acute stroke patients. *J Proteome Res*. 2011;10(3):1043-1051.
187. Dayon L, Hainard A, Licker V, et al. Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal Chem*. 2008;80(8):2921-2931.
188. Lescuyer P, Allard L, Zimmermann-Ivol CG, et al. Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. *Proteomics*. 2004;4(8):2234-2241.
189. Psaty BM, O'Donnell CJ, Gudnason V, et al. Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium: Design of prospective meta-analyses of genome-wide association studies from 5 cohorts. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(1):73-80.
190. Woo D, Falcone GJ, Devan WJ, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 1q22 as a susceptibility locus for intracerebral hemorrhage. *Am J Hum Genet*. 2014;94(4):511-521.
191. Malik R, Chauhan G, Traylor M, et al. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. *Nat Genet*. 2018;50(4):524-537.
192. Malik R, Chauhan G, Traylor M, et al. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. *Nat Genet*. 2018;50(4):524-537.
193. Kubo M, Hata J, Ninomiya T, et al. A nonsynonymous SNP in PRKCH (protein kinase C eta) increases the risk of cerebral infarction. *Nat Genet*. 2007;39(2):212-217.
194. Okazaki S, Morimoto T, Kamatani Y, et al. Moyamoya Disease Susceptibility Variant RNF213 p.R4810K Increases the Risk of Ischemic Stroke Attributable to Large-Artery Atherosclerosis. *Circulation*. 2019;139(2):295-298.
195. Traylor M, Mäkelä KM, Kilarski LL, et al. A novel MMP12 locus is associated with large artery atherosclerotic stroke using a genome-wide age-at-onset informed approach. *PLoS Genet*. 2014;10(7):e1004469.
196. Debette S, Kamatani Y, Metso TM, et al. Common variation in PHACTR1 is associated with susceptibility to cervical artery dissection. *Nat Genet*. 2015;47(1):78-83.
197. Bellenguez C, Bevan S, Gschwendtner A, et al. Genome-wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemic stroke. *Nat Genet*. 2012;44(3):328-333.
198. Holliday EG, Maguire JM, Evans TJ, et al. Common variants at 6p21.1 are associated with large artery atherosclerotic stroke. *Nat Genet*. 2012;44(10):1147-1151.
199. Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke. *Ann Neurol*. 2008;64(4):402-409.
200. Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdottir S, et al. A sequence variant in ZFX3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Nat Genet*. 2009;41(8):876-878.

201. Identification of additional risk loci for stroke and small vessel disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2016;15(7):695-707.
202. Khera AV, Chaffin M, Aragam KG, et al. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat Genet.* 2018;50(9):1219-1224.
203. Moore DF, Li H, Jeffries N, et al. Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation. *Circulation.* 2005;111(2):212-221.
204. Stamova B, Ander BP, Jickling G, et al. The intracerebral hemorrhage blood transcriptome in humans differs from the ischemic stroke and vascular risk factor control blood transcriptomes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019;39(9):1818-1835.
205. Xu H, Tang Y, Liu DZ, et al. Gene expression in peripheral blood differs after cardioembolic compared with large-vessel atherosclerotic stroke: biomarkers for the etiology of ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(7):1320-1328.
206. Jickling GC, Stamova B, Ander BP, et al. Profiles of lacunar and nonlacunar stroke. *Ann Neurol.* 2011;70(3):477-485.
207. Jickling GC, Xu H, Stamova B, et al. Signatures of cardioembolic and large-vessel ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2010;68(5):681-692.
208. Jickling GC, Stamova B, Ander BP, et al. Prediction of cardioembolic, arterial, and lacunar causes of cryptogenic stroke by gene expression and infarct location. *Stroke.* 2012;43(8):2036-2041.
209. Tiedt S, Prestel M, Malik R, et al. RNA-Seq Identifies Circulating miR-125a-5p, miR-125b-5p, and miR-143-3p as Potential Biomarkers for Acute Ischemic Stroke. *Circ Res.* 2017;121(8):970-980.
210. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489(7414):57-74.
211. Dykstra-Aiello C, Jickling GC, Ander BP, et al. Altered Expression of Long Noncoding RNAs in Blood After Ischemic Stroke and Proximity to Putative Stroke Risk Loci. *Stroke.* 2016;47(12):2896-2903.
212. Deng QW, Li S, Wang H, et al. Differential long noncoding RNA expressions in peripheral blood mononuclear cells for detection of acute ischemic stroke. *Clin Sci (Lond).* 2018;132(14):1597-1614.
213. Wang J, Ruan J, Zhu M, et al. Predictive value of long noncoding RNA ZFAS1 in patients with ischemic stroke. *Clin Exp Hypertens.* 2019;41(7):615-621.
214. Jickling GC, Ander BP, Shroff N, et al. Leukocyte response is regulated by microRNA let7i in patients with acute ischemic stroke. *Neurology.* 2016;87(21):2198-2205.
215. Eyileten C, Wicik Z, De Rosa S, et al. MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Ischemic Stroke-A Comprehensive Review and Bioinformatic Analysis. *Cells.* 2018;7(12).
216. Jickling GC, Ander BP, Zhan X, et al. microRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets. *PLoS One.* 2014;9(6):e99283.

217. Chumachenko MS, Waseem TV, Fedorovich SV. Metabolomics and metabolites in ischemic stroke. *Rev Neurosci.* 2022;33(2):181-205.
218. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(7):451-459.
219. Au A, Cheng KK, Wei LK. Metabolomics, Lipidomics and Pharmacometabolomics of Human Hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 2017;956:599-613.
220. Aranibar N, Ott KH, Roongta V, et al. Metabolomic analysis using optimized NMR and statistical methods. *Anal Biochem.* 2006;355(1):62-70.
221. Au A. Metabolomics and Lipidomics of Ischemic Stroke. *Adv Clin Chem.* 2018;85:31-69.
222. Griffiths WJ, Koal T, Wang Y, et al. Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(32):5426-5445.
223. Aretz I, Meierhofer D. Advantages and Pitfalls of Mass Spectrometry Based Metabolome Profiling in Systems Biology. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5).
224. Forcisi S, Moritz F, Kanawati B, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J Chromatogr A.* 2013;1292:51-65.
225. Newgard CB. Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* 2017;25(1):43-56.
226. Qiu S, Cai Y, Yao H, et al. Small molecule metabolites: discovery of biomarkers and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):132.
227. Kimberly WT, Wang Y, Pham L, et al. Metabolite profiling identifies a branched chain amino acid signature in acute cardioembolic stroke. *Stroke.* 2013;44(5):1389-1395.
228. van Meer G. Cellular lipidomics. *Embo j.* 2005;24(18):3159-3165.
229. Sunshine H, Iruela-Arispe ML. Membrane lipids and cell signaling. *Curr Opin Lipidol.* 2017;28(5):408-413.
230. Stegeman C, Pechlaner R, Willeit P, et al. Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based Bruneck study. *Circulation.* 2014;129(18):1821-1831.
231. Sun D, Tiedt S, Yu B, et al. A prospective study of serum metabolites and risk of ischemic stroke. *Neurology.* 2019;92(16):e1890-e1898.
232. Sheth SA, Iavarone AT, Liebeskind DS, et al. Targeted Lipid Profiling Discovers Plasma Biomarkers of Acute Brain Injury. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129735.
233. Hood LF, Wardrip EK, Bollenback G. Carbohydrates and health 1978.
234. Kelly RK, Tong TYN, Watling CZ, et al. Associations between types and sources of dietary carbohydrates and cardiovascular disease risk: a prospective cohort study of UK Biobank participants. *BMC Med.* 2023;21(1):34.
235. Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients.* 2015;7(9):8199-8226.
236. Roth W, Mohamadzadeh M. Vitamin B12 and gut-brain homeostasis in the pathophysiology of ischemic stroke. *EBioMedicine.* 2021;73:103676.

237. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *Jama*. 2004;291(5):565-575.
238. Chen Y. Disturbed cerebral circulation and metabolism matters: A preface to the special issue "Stroke and Energy Metabolism": A preface to the special issue "Stroke and Energy Metabolism". *J Neurochem*. 2022;160(1):10-12.
239. Sifat AE, Nozohouri S, Archie SR, et al. Brain Energy Metabolism in Ischemic Stroke: Effects of Smoking and Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15).
240. Li L, Cheng SQ, Sun YQ, et al. Resolvin D1 reprograms energy metabolism to promote microglia to phagocytize neutrophils after ischemic stroke. *Cell Rep*. 2023;42(6):112617.
241. Nelson SE, Ament Z, Wolcott Z, et al. Succinate links atrial dysfunction and cardioembolic stroke. *Neurology*. 2019;92(8):e802-e810.
242. Heikal AA. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark Med*. 2010;4(2):241-263.
243. Kovacevic KD, Greisenegger S, Langer A, et al. The aptamer BT200 blocks von Willebrand factor and platelet function in blood of stroke patients. *Sci Rep*. 2021;11(1):3092.
244. Zhu S, Gilbert JC, Hatala P, et al. The development and characterization of a long acting anti-thrombotic von Willebrand factor (VWF) aptamer. *J Thromb Haemost*. 2020;18(5):1113-1123.
245. Burbach JP. Neuropeptides from concept to online database www.neuropeptides.nl. *Eur J Pharmacol*. 2010;626(1):27-48.
246. Saklani P, Khan H, Gupta S, et al. Neuropeptides: Potential neuroprotective agents in ischemic injury. *Life Sci*. 2022;288:120186.
247. Nakov R, Velikova T. Chemical Metabolism of Xenobiotics by Gut Microbiota. *Curr Drug Metab*. 2020;21(4):260-269.
248. Spanogiannopoulos P, Bess EN, Carmody RN, et al. The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(5):273-287.
249. Koppel N, Maini Rekdal V, Balskus EP. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*. 2017;356(6344).
250. Tuteja S, Ferguson JF. Gut Microbiome and Response to Cardiovascular Drugs. *Circ Genom Precis Med*. 2019;12(9):421-429.
251. Marto JP, Strambo D, Livio F, et al. Drugs Associated With Ischemic Stroke: A Review for Clinicians. *Stroke*. 2021;52(10):e646-e659.
252. Paulson JR, Yang T, Selvaraj PK, et al. Nicotine exacerbates brain edema during in vitro and in vivo focal ischemic conditions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;332(2):371-379.
253. Naik P, Cucullo L. Pathobiology of tobacco smoking and neurovascular disorders: untied strings and alternative products. *Fluids Barriers CNS*. 2015;12:25.
254. Shah RS, Cole JW. Smoking and stroke: the more you smoke the more you stroke. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8(7):917-932.

255. Sekhotha MM, Monyeki KD, Sibuyi ME. Exposure to Agrochemicals and Cardiovascular Disease: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(2):229.
256. Stevens VL, Hoover E, Wang Y, et al. Pre-Analytical Factors that Affect Metabolite Stability in Human Urine, Plasma, and Serum: A Review. *Metabolites*. 2019;9(8).
257. Pinto J, Domingues MR, Galhano E, et al. Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics. *Analyst*. 2014;139(5):1168-1177.
258. Townsend MK, Clish CB, Kraft P, et al. Reproducibility of metabolomic profiles among men and women in 2 large cohort studies. *Clin Chem*. 2013;59(11):1657-1667.
259. Midttun O, Townsend MK, Nygård O, et al. Most blood biomarkers related to vitamin status, one-carbon metabolism, and the kynurenine pathway show adequate preanalytical stability and within-person reproducibility to allow assessment of exposure or nutritional status in healthy women and cardiovascular patients. *J Nutr*. 2014;144(5):784-790.
260. Hebels DG, Georgiadis P, Keun HC, et al. Performance in omics analyses of blood samples in long-term storage: opportunities for the exploitation of existing biobanks in environmental health research. *Environ Health Perspect*. 2013;121(4):480-487.
261. Yin P, Peter A, Franken H, et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem*. 2013;59(5):833-845.
262. Denery JR, Nunes AA, Dickerson TJ. Characterization of differences between blood sample matrices in untargeted metabolomics. *Anal Chem*. 2011;83(3):1040-1047.
263. Paglia G, Del Greco FM, Sigurdsson BB, et al. Influence of collection tubes during quantitative targeted metabolomics studies in human blood samples. *Clin Chim Acta*. 2018;486:320-328.
264. Malm L, Tybring G, Moritz T, et al. Metabolomic Quality Assessment of EDTA Plasma and Serum Samples. *Biopreserv Biobank*. 2016;14(5):416-423.
265. Breier M, Wahl S, Prehn C, et al. Targeted metabolomics identifies reliable and stable metabolites in human serum and plasma samples. *PLoS One*. 2014;9(2):e89728.
266. Ang JE, Revell V, Mann A, et al. Identification of human plasma metabolites exhibiting time-of-day variation using an untargeted liquid chromatography-mass spectrometry metabolomic approach. *Chronobiol Int*. 2012;29(7):868-881.
267. Dallmann R, Viola AU, Tarokh L, et al. The human circadian metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2625-2629.
268. Kamlage B, Maldonado SG, Bethan B, et al. Quality markers addressing preanalytical variations of blood and plasma processing identified by broad and targeted metabolite profiling. *Clin Chem*. 2014;60(2):399-412.
269. Theil PK, Pedersen LJ, Jensen MB, et al. Blood sampling and hemolysis affect concentration of plasma metabolites. *J Anim Sci*. 2012;90 Suppl 4:412-414.
270. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(6):764-772.
271. Hernandez VV, Barbas C, Dudzik D. A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. *Electrophoresis*. 2017;38(18):2232-2241.

272. Teahan O, Gamble S, Holmes E, et al. Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma. *Anal Chem*. 2006;78(13):4307-4318.
273. Bernini P, Bertini I, Luchinat C, et al. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *J Biomol NMR*. 2011;49(3-4):231-243.
274. Fliniaux O, Gaillard G, Lion A, et al. Influence of common preanalytical variations on the metabolic profile of serum samples in biobanks. *J Biomol NMR*. 2011;51(4):457-465.
275. Deprez S, Sweatman BC, Connor SC, et al. Optimisation of collection, storage and preparation of rat plasma for ¹H NMR spectroscopic analysis in toxicology studies to determine inherent variation in biochemical profiles. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;30(4):1297-1310.
276. Nishiumi S, Suzuki M, Kobayashi T, et al. Differences in metabolite profiles caused by pre-analytical blood processing procedures. *J Biosci Bioeng*. 2018;125(5):613-618.
277. Kamlage B, Neuber S, Bethan B, et al. Impact of Prolonged Blood Incubation and Extended Serum Storage at Room Temperature on the Human Serum Metabolome. *Metabolites*. 2018;8(1).
278. Ammerlaan W, Trezzi JP, Lescuyer P, et al. Method validation for preparing serum and plasma samples from human blood for downstream proteomic, metabolomic, and circulating nucleic acid-based applications. *Biopreserv Biobank*. 2014;12(4):269-280.
279. Jobard E, Trédan O, Postoly D, et al. A Systematic Evaluation of Blood Serum and Plasma Pre-Analytics for Metabolomics Cohort Studies. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
280. Lesche D, Geyer R, Lienhard D, et al. Does centrifugation matter? Centrifugal force and spinning time alter the plasma metabolome. *Metabolomics*. 2016;12(10):159.
281. Vaught JB. Blood collection, shipment, processing, and storage. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(9):1582-1584.
282. Yang W, Chen Y, Xi C, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based plasma metabolomics delineate the effect of metabolites' stability on reliability of potential biomarkers. *Anal Chem*. 2013;85(5):2606-2610.
283. Ramiro L, Simats A, García-Berrocso T, et al. Inflammatory molecules might become both biomarkers and therapeutic targets for stroke management. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11:1756286418789340.
284. Pohl M, Hesszenberger D, Kapus K, et al. Ischemic stroke mimics: A comprehensive review. *J Clin Neurosci*. 2021;93:174-182.
285. Gressner AM, Arndt T. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*: Springer Berlin Heidelberg 2019.
286. Vogeser M, Kobold U, Seidel D. Massenspektrometrie in der Medizin – Stellenwert der molekularen Analytik. *Dtsch Arztebl International*. 2007;104(31-32):A-2194.
287. Gruber L, Gruner A. Grundlagen und Verfahren der Massenspektrometrie. In Kramme R, (Ed). *Medizintechnik: Verfahren - Systeme - Informationsverarbeitung*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2016:1-10.

288. Einstichprobenprobleme. In Duller C, (Ed). Einführung in die nichtparametrische Statistik mit SAS und R: Ein anwendungsorientiertes Lehr- und Arbeitsbuch. Heidelberg: Physica-Verlag HD 2008:107-149.
289. Maindonald J, Braun WJ. Data Analysis and Graphics Using R: An Example-Based Approach: Cambridge University Press 2010.
290. Alexopoulos EC. Introduction to multivariate regression analysis. Hippokratia. 2010;14(Suppl 1):23-28.
291. Fox J, Monette G. Generalized collinearity diagnostics. Journal of the American Statistical Association. 1992;87(417):178-183.
292. Hair JF. Multivariate data analysis. 2009.
293. Regression analysis with standardized variables. In Allen MP, (Ed). Understanding Regression Analysis. Boston, MA: Springer US 1997:46-50.
294. García-Campos MA, Espinal-Enríquez J, Hernández-Lemus E. Pathway Analysis: State of the Art. Front Physiol. 2015;6:383.
295. Metaboanalyst 6.0. <https://www.metaboanalyst.ca/>.
296. MacKinnon DP, Krull JL, Lockwood CM. Equivalence of the mediation, confounding and suppression effect. Prev Sci. 2000;1(4):173-181.
297. Hirayama A, Sugimoto M, Suzuki A, et al. Effects of processing and storage conditions on charged metabolomic profiles in blood. Electrophoresis. 2015;36(18):2148-2155.
298. Anton G, Wilson R, Yu ZH, et al. Pre-analytical sample quality: metabolite ratios as an intrinsic marker for prolonged room temperature exposure of serum samples. PLoS One. 2015;10(3):e0121495.
299. Brunius C, Pedersen A, Malmödin D, et al. Prediction and modeling of pre-analytical sampling errors as a strategy to improve plasma NMR metabolomics data. Bioinformatics. 2017;33(22):3567-3574.
300. Wang Y, Carter BD, Gapstur SM, et al. Reproducibility of non-fasting plasma metabolomics measurements across processing delays. Metabolomics. 2018;14(10):129.
301. Lippi G, von Meyer A, Cadamuro J, et al. PREDICT: a checklist for preventing preanalytical diagnostic errors in clinical trials. Clin Chem Lab Med. 2020;58(4):518-526.
302. Gegner HM, Naake T, Dugourd A, et al. Pre-analytical processing of plasma and serum samples for combined proteome and metabolome analysis. Front Mol Biosci. 2022;9:961448.
303. Trezzi JP, Bulla A, Bellora C, et al. LacaScore: a novel plasma sample quality control tool based on ascorbic acid and lactic acid levels. Metabolomics. 2016;12:96.
304. Jain M, Kennedy AD, Elsea SH, et al. Analytes related to erythrocyte metabolism are reliable biomarkers for preanalytical error due to delayed plasma processing in metabolomics studies. Clin Chim Acta. 2017;466:105-111.
305. Leichtle AB, Dufour JF, Fiedler GM. Potentials and pitfalls of clinical peptidomics and metabolomics. Swiss Med Wkly. 2013;143:w13801.
306. Cao Z, Kamlage B, Wagner-Golbs A, et al. An Integrated Analysis of Metabolites, Peptides, and Inflammation Biomarkers for Assessment of Preanalytical Variability of Human Plasma. J Proteome Res. 2019;18(6):2411-2421.

-
307. Yin P, Lehmann R, Xu G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(17):4879-4892.
308. Demirel HC, Arici MK, Tuncbag N. Computational approaches leveraging integrated connections of multi-omic data toward clinical applications. *Mol Omics.* 2022;18(1):7-18.

13. Anhang

13.1. Publikationsliste

1. Tiedt S, Brandmaier S, **Kollmeier H**, Duering M, Artati A, Adamski J, Klein M, Liebig T, Holdt LM, Teupser D, Wang-Sattler R, Schwedhelm E, Gieger C, Dichgans M. Circulating Metabolites Differentiate Acute Ischemic Stroke from Stroke Mimics. *Ann Neurol*. 2020 Oct;88(4):736-746. doi: 10.1002/ana.25859. Epub 2020 Aug 29. PMID: 32748431.

13.3. Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Kollmeier, Hanna Christina

Name, Vorname

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

Einfluss präanalytischer Prozesse auf das zirkulierende Metabolom bei Schlaganfallpatienten – und patientinnen

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, 12.10.2025

Ort, Datum

Hanna Christina Kollmeier

Unterschrift Hanna Christina Kollmeier

13.4. Übereinstimmungserklärung der gebundenen und der elektronischen Fassung



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Kollmeier, Hanna Christina

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Einfluss präanalytischer Prozesse auf das zirkulierende Metabolom bei Schlaganfallpatienten – und patientinnen

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 12.10.2025

Ort, Datum

Hanna Christina Kollmeier

Unterschrift Hanna Christina Kollmeier